



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 325 044**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **97902881 .8**

96 Fecha de presentación : **03.01.1997**

97 Número de publicación de la solicitud: **0871780**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.10.1998**

54 Título: **Métodos para la clonación de cDNA entero.**

30 Prioridad: **03.01.1996 US 582562**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.08.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.08.2009

73 Titular/es: **Clontech Laboratories, Inc.**
1290 Terra Bella Avenue
Mountain View, California 94303-1837, US

72 Inventor/es: **Chenchik, Alex;**
Zhu, York;
Diatchenko, Luda y
Siebert, Paul

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 325 044 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

Métodos para la clonación de cDNA entero.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una tecnología mejorada para sintetizar selectivamente cDNA de longitud completa que tiene información secuencial total sobre mRNA de longitud completa.

10 **Fundamento de la invención**

Una tecnología básica en el campo de la biología molecular es la conversión de poli(A)+RNA (mRNA) en DNA complementario (cDNA) de doble cadena (ds; del inglés, double-stranded), el cual puede ser luego insertado en un vector de clonación para generar un banco de cDNA o la expresión en una célula huésped apropiada. Los progresos en la tecnología para construcción de bancos de cDNA han hecho posible el descubrimiento y la producción de una gran variedad de proteínas biológicamente importantes.

En *Methods in Enzymology* (1987), volumen 152, redactado por Wu, se revisan en conjunto diversos procedimientos para generar bancos de cDNA que han sido usados durante los últimos 15 años. En su mayor parte, en las tecnologías para construcción de bancos de cDNA se usa poli(A)+RNA como material de partida. El poli(A)+RNA intacto se caracteriza por una “cola” poliadenilada en su extremo 3’ y por una característica “estructura de caperuza (CAP) o sitio de caperuza” en el extremo 5’. Un requisito crítico para la construcción de bancos de cDNA es copiar completamente el poli(A)+RNA hasta cDNA de longitud completa y conservar la información secuencial total sobre la estructura de la proteína codificada por el mRNA.

En un método generalizado y comúnmente utilizado mediante el cual se copia el poli(A)+RNA hasta cDNA se emplea transcriptasa inversa, que comienza en el extremo 3’ del mRNA a partir de un cebador de oligo-d(T) y continúa hacia el extremo 5’ para generar un híbrido de cDNA:mRNA (Gubler *et al.*, 1983). Después se separa del híbrido la cadena de RNA por la acción de RNasa H, y luego se sintetiza una segunda cadena de DNA usando DNA polimerasa I. La mezcla heterogénea resultante de moléculas de cDNA ds puede ser luego clonada en adecuadas moléculas vector de DNA recombinante usando una diversidad de técnicas. Desafortunadamente, para la mayoría de los mRNAs, este método no permite la síntesis de cDNA de “longitud completa” porque la transcriptasa inversa no los puede copiar eficazmente hasta cDNAs de longitud completa. La eficacia de la copia es inversamente proporcional a la longitud del mRNA; por lo tanto, el problema de la síntesis de cDNA de “longitud completa” es más crítico para los mRNAs más largos. Además, con la tecnología actual se pueden generar deleciones en los extremos 5’ y 3’ del cDNA.

En un planteamiento alternativo, las colas de poli(A) de las moléculas de mRNA son primero hibridadas a un conector de oligo (dT) con DNA vector linealizado (cebador del vector) (Okayama *et al.*, 1982; Pruitt, Solicitud n° 89110816.9 de Patente Internacional). Luego, la primera cadena de cDNA sintetizada por la transcriptasa inversa es añadida al extremo 3’ por el oligo dt, lo que facilita la subsiguiente clonación por circularización en el cebador del vector. Con este método también se generan grandes cantidades de clones de cDNA que contienen cDNAs truncados a causa de la síntesis de cDNA de longitud no completa.

Como resultado de los inconvenientes que resultan del uso de las tecnologías presentes para generar bancos de cDNA convencionales, la mayoría de los clones de cDNA carecen de secuencias próximas al extremo 5’ de los mRNAs. Esto da lugar a la pérdida de una importante información necesaria para producir proteínas funcionales. Se han desarrollado dos procedimientos de selección en los esfuerzos para enriquecer los bancos de cDNA en cuanto a clones de cDNA de “longitud completa”. En el procedimiento de retención de CAP (*CAPture*), se usó la proteína ligante de la caperuza (factor 4E eucariótico de iniciación) en combinación con RNasa A para purificar híbridos de cDNA:mRNA de longitud completa (Edery *et al.*, 1995; Sonenberg *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.219.989). Los dúplex más cortos que corresponden a fragmentos de cDNA de longitud no completa no son seleccionados ya que la estructura de CAP del mRNA es separada de la porción de RNA por tratamiento con nucleasa. Aunque el método *CAPture* podría enriquecer potencialmente bancos de cDNA en cuanto a clones que contienen los extremos 5’ auténticos, la producción de cDNAs de longitud completa es muy baja, especialmente para cDNAs largos (1-5%). La baja producción es una desventaja significativa de esta tecnología.

En el método de “oligo-formación de caperuza” (*oligo-capping* en inglés), la estructura de CAP del mRNA es selectivamente sustituida por un oligorribonucleótido, generándose de esta forma productos intermedios químicos de oligonucleótido/mRNA de longitud completa que son posteriormente utilizados para la síntesis de cDNAs de longitud completa (Maruyama *et al.*, 1994; Fromont-Racine *et al.*, 1993; Kato *et al.*, Publicación n° 0.625.572 A1 de Patente Europea, Solicitud n° 93921061.3). Sin embargo, este método es complicado, implicando el tratamiento del mRNA con una fosfatasa alcalina, la eliminación de la caperuza del mRNA con pirofosfatasa ácida de tabaco, y la ligación del oligonucleótido al extremo 5’ del mRNA mediante RNA ligasa de T4. Estas múltiples operaciones enzimáticas degradan el mRNA, generándose por ello fragmentos de cDNA incompletos para los subsiguientes procedimientos de clonación. La distribución de tamaños de los insertos de cDNA en los bancos de cDNA generados al utilizar el método de “oligo-formación de caperuza” es típicamente inferior a 3 kb. Ésta es mucho menor que la distribución de tamaños del mRNA de longitud completa (Kato *et al.*, 1994) e indica la baja eficacia de la clonación de cDNA de “longitud completa” mediante la tecnología de “oligo-formación de caperuza”.

Como se puede entender de lo precedente, los métodos convencionales para construir bancos de cDNA que contengan clones de cDNA de longitud completa están limitados por la baja eficacia y por el uso de múltiples operaciones de larga duración. En consecuencia, es muy deseable un método sencillo que genere cDNA de longitud completa y alta calidad a partir de RNA.

Breve compendio de la invención

La presente invención proporciona un método ventajoso para la síntesis y clonación de cDNA de longitud completa, o de fragmentos de cDNA, que corresponda a la secuencia total de los extremos 5' de moléculas de mRNA. El método de la presente invención comprende hibridar un cebador para síntesis de cDNA con dicha molécula de RNA y sintetizar una primera cadena de cDNA con una transcriptasa inversa para formar un producto intermedio de RNA-cDNA; poner dicho producto intermedio de RNA-cDNA en contacto con un oligonucleótido de cambio de molde, en que dicho oligonucleótido de cambio de molde se hibrida con el término de dicho producto intermedio de RNA-cDNA que comprende el extremo 3' de dicha primera cadena de cDNA y el extremo 5' de dicho RNA, dicho oligonucleótido de cambio de molde sirve como molde para la extensión de dicho extremo 3' de dicha primera cadena de cDNA, y dicho oligonucleótido de cambio de molde tiene una preseleccionada secuencia de nucleótidos arbitraria en su extremo 5' y al menos un resto ribonucleotídico en su extremo 3'; y extender dicho extremo 3' de dicha primera cadena de cDNA para producir un DNA que es complementario de dicha molécula de RNA y dicho oligonucleótido de cambio de molde.

Breve descripción de los dibujos

En la Figura 1 se muestra una representación de un mecanismo de la tecnología de cambio de molde de acuerdo con la invención objetivo.

En la Figura 2 se muestra una representación de un procedimiento en que se utilizan los métodos y materiales de la presente invención para clonar la secuencia 5' terminal del DNA de longitud completa.

En la Figura 3 se muestra una representación de métodos y materiales de la presente invención, basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction), para la construcción de bancos de cDNA de longitud completa de acuerdo con la invención objetivo.

En la Figura 4 se muestra una representación de la tecnología CAPswitch para construcción de bancos de cDNA de longitud completa, basada en una estrategia de adaptador PRE-cebador.

Descripción detallada de la invención

La invención objetivo trata de métodos para construir bancos de cDNA a partir de nanogramos de RNA total o poliA+RNA. También se describen composiciones para los mismos. Se describen aquí las composiciones y métodos en que se emplean oligonucleótidos de cambio de molde. El método de la presente invención comprende poner RNA en contacto con un cebador que se puede hibridar con RNA, una transcriptasa inversa, y un oligonucleótido de cambio de molde bajo unas condiciones suficientes para permitir la extensión, dependiente del molde, del cebador hibridado para generar un híbrido de mRNA-cDNA. El oligonucleótido de cambio de molde se puede hibridar con el sitio de CAP del extremo 5' de la molécula de RNA y sirve como un corto molde extendido para la extensión, dependiente del CAP, del extremo 3' del cDNA de cadena sencilla (ss; del inglés, single-stranded) que es complementario del oligonucleótido de cambio de molde. El resultante cDNA ss de longitud completa incluye el extremo 5' completo de la molécula de RNA, así como la secuencia complementaria del oligonucleótido de cambio de molde. La secuencia complementaria del oligonucleótido de cambio de molde puede luego servir como un sitio de cebado universal en la subsiguiente multiplicación del cDNA.

Específicamente, la invención objetivo proporciona un método para la síntesis de cDNA de cadena sencilla (ss) y longitud completa, o de fragmentos de cDNA ss, a partir de RNA. El cDNA sintetizado mediante el método presente tiene una secuencia ancla arbitraria en el extremo 3', seguida de una secuencia de nucleótidos complementaria de la molécula de RNA a partir del sitio de caperuza del mRNA. En una realización preferida, el procedimiento de la invención objetivo comprende las operaciones siguientes:

1. Incubar una muestra de poli(A)+RNA o RNA total en presencia de un cebador para síntesis de cDNA (cebador de CDS) que se puede hibridar con mRNA, y una enzima que posee actividad transcriptasa inversa bajo unas condiciones suficientes para permitir que la extensión del cebador, dependiente del molde, genere un híbrido de mRNA-cDNA; y
2. Incubar la mezcla para síntesis de cDNA de primera cadena, obtenida en la operación 1, con un oligonucleótido de cambio de molde de la presente invención (al que también se hace aquí referencia como "oligonucleótido CAPswitch"), lo que puede proporcionar la extensión, dependiente de CAP, de cDNA de longitud completa por la transcriptasa inversa utilizando como molde el oligonucleótido de cambio de molde, y la adición por ello de una secuencia de nucleótidos complementaria del oligonucleótido de cambio de molde al extremo 3' del cDNA ss de longitud completa (al que aquí se hace referencia como "híbrido de cDNA:mRNA anclado"). El oligonucleótido de cambio de molde tiene una preseleccionada secuencia de nucleótidos arbitraria en su extremo 5' y al menos un resto de riboguanina en su extremo 3'.

Las operaciones 1 y 2 del método están sólo separadas en el tiempo. En una realización preferida, la operación 1 va seguida de la operación 2. Sin embargo, se entiende que la mezcla para síntesis de cDNA de primera cadena de la operación 1 puede incluir un oligonucleótido de cambio de molde que será utilizado en la operación 2. Alternativamente, se puede añadir un oligonucleótido de cambio de molde a la mezcla de reacción en el momento de la síntesis del cDNA de primera cadena o después de la síntesis. En una realización preferida, el cebador para la síntesis de cDNA es un cebador de oligo(dT) modificado.

También se describe un método para aislar un fragmento de cDNA de longitud completa correspondiente a un extremo 5' del (de los) mRNA(s) diana usando como molde el híbrido de cDNA:mRNA anclado, generado en la operación 2. Este método comprende la realización de las operaciones 1 y 2, seguidas por la operación 3A o la operación 3B alternativa, que se describen a continuación:

3A. Incubar un híbrido de cDNA:mRNA anclado, generado en la operación 2, con una combinación de (a) un cebador oligonucleotídico que corresponde parcial o completamente a la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido de cambio de molde, (b) un(os) cebador(es) oligonucleotídico(s) que es(son) complementario(s) de una secuencia de nucleótidos del(de los) mRNA(s) diana, y (c) una cantidad eficaz de otros reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La incubación se lleva a cabo bajo unas condiciones suficientes para que se realice la PCR y se genere por ello un producto de multiplicación correspondiente al fragmento de longitud completa del extremo 5' del cDNA diana.

3B. Tratar el híbrido de cDNA:mRNA anclado de la operación 2 bajo unas condiciones bajo las cuales se sintetice una segunda cadena de cDNA, utilizando la primera cadena de cDNA anclada como molde.

También se describe un método para generar bancos de cDNA que contengan cDNAs de longitud completa. En este método se usa como molde el híbrido de cDNA:mRNA anclado, generado en la operación 2. Este método comprende la realización de las operaciones 1 y 2, seguidas por la operación 3C o la operación 3D alternativa, que se describen a continuación:

3C. Incubar el híbrido de cDNA:mRNA anclado, generado en la operación 2, con una combinación de cebadores que corresponden parcial o completamente a la secuencia del oligonucleótido de cambio de molde y del cebador para la síntesis de cDNA, respectivamente, y una cantidad eficaz de otros reactivos necesarios para llevar la PCR a cabo. La incubación se realiza bajo unas condiciones suficientes para que se lleve la PCR a cabo, para generar un producto de multiplicación que corresponda al banco representativo de cDNA ds de longitud completa.

3D. Tratar el híbrido de cDNA:mRNA anclado de la operación 2 bajo unas condiciones bajo las cuales se sintetice una segunda cadena de cDNA, utilizando la primera cadena de cDNA anclada como molde.

En un aspecto de la presente invención, el resultante producto de cDNA generado en la operación 2 ó 3 se puede insertar en vehículos de clonación recombinantes y, de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica (Kimmel *et al.*, 1987), se pueden transformar huéspedes con estos vehículos.

La invención objetivo permite la síntesis de cDNA de longitud completa, el cual ha sido difícil de sintetizar por métodos convencionales. La presente invención incluye la nueva operación 2 anteriormente descrita, que puede ser utilizada en procedimientos estándares para preparación/clonación de cDNA que son bien conocidos en la técnica. El uso de oligonucleótidos de cambio de molde en el método objetivo permite ventajosamente una selección negativa de los cDNAs que no son complementarios del extremo 5' del RNA molde, mientras que los cDNAs de longitud completa pueden ser fácilmente seleccionados. Además, los métodos objetivos pueden simplificar significativamente la síntesis y clonación de cDNA. Puesto que los clones de cDNA obtenidos a partir del banco de cDNA de longitud completa preparado de acuerdo con el presente método contienen información completa sobre la estructura primaria de la proteína, la invención también se refiere a un procedimiento para utilizar los clones, obtenidos a partir de dicho banco de cDNA de longitud completa, para producir las proteínas codificadas.

En otro aspecto, la invención proporciona métodos mediante los cuales el resultante producto de cDNA generado en la operación 3 puede ser utilizado como material de partida para uso en métodos para sustracción de cDNA. Específicamente, el método de la invención objetivo puede ser utilizado junto con procedimientos para sustracción de cDNA, para preparar una población de cDNA que contenga una representación muy enriquecida de las especies de cDNA que están presentes en una población de DNA (la población comprobadora) pero que son menos abundantes o están ausentes en otra población de DNA (la población conductora). Preferiblemente, se utiliza cDNA ds comprobador y conductor, multiplicado mediante métodos y materiales de la presente invención, en combinación con la tecnología de Hibridación Sustractiva por Supresión descrita por Chenchik *et al.* (Patente de EE.UU. nº 5.565.340). También se pueden emplear otros métodos de hibridación sustractiva descritos, por ejemplo, por Wigler *et al.* (Patente de EE.UU. nº 5.436.142), Hampson *et al.* [Nucl. Acids Res. 20: 2899 (1992)], Yang *et al.* [Anal. Biochem. 237: 109-114 (1996)], Balzer *et al.* [Nucl. Acids Res. 22: 2853-2854 (1994)] y otros.

El cDNA ds preparado de acuerdo con la presente invención puede ser también utilizado como una sonda de hibridación. Como se utiliza aquí, la expresión "sonda de hibridación" significa que el cDNA generado a partir de RNA total aislado de organismos sanos, enfermos o infectados, o como sustraído del modo descrito por Chenchik *et al.*

(Patente de EE.UU. n° 5.565.340), puede ser marcado con radioisótopos, grupos fluorescentes y otros grupos informadores mediante procedimientos convencionales para marcación química o enzimática. El cDNA marcado puede ser luego utilizado en ensayos de hibridación estándares conocidos en la técnica; es decir, el cDNA marcado es puesto en contacto con los oligonucleótidos/polinucleótidos definidos que corresponden a un conjunto particular de los genes inmovilizados sobre una superficie sólida, durante un tiempo suficiente para permitir la formación de patrones de hibridación sobre las superficies causados por la hibridación entre ciertas secuencias polinucleótídicas de la sonda de hibridación y ciertos oligonucleótidos/polinucleótidos definidos inmovilizados. Los patrones de hibridación se obtienen usando técnicas convencionales disponibles, tales como cuenta de centelleo, autorradiografía, medición de fluorescencia, medición calorimétrica y medición de emisión lumínica. Las técnicas y condiciones para la marcación, hibridación y detección son bien conocidas en este campo técnico (véanse, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1989, y Keller *et al.*, 1993).

El cDNA marcado puede ser también utilizado para identificar genes que se expresan diferentemente en dos estados predeterminados diferentes de un organismo (véanse, por ejemplo, Maniatis *et al.*, 1989, y la Patente Internacional WO 95/21944).

El cDNA ss generado después del procedimiento de síntesis de cDNA de primera cadena-cambio de molde (operación 2) o el cDNA ds generado después de la operación de multiplicación por 5'-RACE (operación 3) puede ser utilizado como una sonda de hibridación para recuperar selectivamente una deseada molécula de ácido nucleico diana complementaria a partir de una mezcla o un banco de ácido nucleico ss o ds que contiene dicha molécula. El método mediante el que la sonda de hibridación es haptenilada y es usada para obtener una fuente enriquecida de la molécula de ácido nucleico diana se basa en un planteamiento de hibridación como el descrito con detalle en la Patente de EE.UU. n° 5.484.702 del 16 de Enero de 1996 y la Patente de EE.UU. n° 5.500.356 del 19 de Marzo de 1996, o en una hibridación mediada por la proteína RecA, como se describe con detalle en la Patente de EE.UU. n° 4.888.274 del 19 de Diciembre de 1989.

En la presente invención se utilizan oligonucleótidos de cambio de molde o "CAPswitch" útiles para la preparación de bancos de cDNA que contienen clones de cDNA de longitud completa. Los oligonucleótidos CAPswitch tienen al menos dos funciones. Una función es la capacidad para interaccionar selectivamente con productos intermedios de longitud completa de transcriptasa inversa-mRNA-cDNA que se generan en el extremo 5' de mRNA de longitud completa después de la síntesis de cDNA de primera cadena. Una segunda función de los oligonucleótidos CAPswitch de la invención objetivo es como un molde eficaz para la transcriptasa inversa a partir de los productos intermedios de longitud completa anteriormente mencionados, que puede permitir la extensión 5' mRNA-terminal (en la mayoría de los casos, dependiente de CAP) del cDNA de longitud completa por la transcriptasa inversa al usar el oligonucleótido CAPswitch como molde. De esta manera, se puede añadir una secuencia complementaria del oligonucleótido CAPswitch al extremo 3' del cDNA de longitud completa.

La estructura o secuencia del oligonucleótido CAPswitch puede ser modificada para obtener una ventaja en cuanto a la unión selectiva a la estructura de CAP del mRNA. Una modificación puede incluir, por ejemplo, la unión covalente de oligonucleótidos CAPswitch a una proteína capaz de unirse a la estructura de CAP del mRNA (véase la Patente de EE.UU. n° 5.219.984).

La invención atañe particularmente a las realizaciones de los métodos anteriores en que el oligonucleótido CAPswitch está representado por la fórmula siguiente:



en que dN representa un desoxirribonucleótido seleccionado entre dAMP, dCMP, dGMP y dTMP; m representa un número entero igual o superior a cero, preferiblemente de 10 a 50; rN representa un ribonucleótido seleccionado entre AMP, CMP, GMP y UMP, siendo preferiblemente GMP; y n representa un número entero igual al menos a uno o superior, preferiblemente de 3 a 7. Dentro del alcance de la presente invención están ciertas modificaciones obvias, y bien conocidas en la técnica, en la estructura del oligonucleótido CAPswitch, tales como la sustitución de 1-10 nucleótidos por nucleótidos aleatorios, compuestos nucleotídicos análogos, o nucleótidos marcados con diferentes grupos haptenos (tales como, por ejemplo, biotina, digoxigenina y fluoresceína), la incorporación de un nucleótido terminador (tal como, por ejemplo, 3'-amino-NMP, 3'-fosfato-NMP y 3'-fluoro-NMP), usando DNA de cadena parcialmente doble que contiene una extensión de una secuencia de oligonucleótido CAPswitch de cadena sencilla 5'-dN₁-dN₂-...-dN_m-rN₁-rN₂...rN_n-3', la incorporación de sitios de restricción, y la incorporación de secuencias promotoras para RNA polimerasa de bacteriófago, que simplifican la purificación y clonación subsiguientes del cDNA pero que aún conservan sustancialmente la misma actividad funcional que un oligonucleótido CAPswitch no modificado, es decir, la extensión mRNA 5'-terminal del cDNA de longitud completa por la transcriptasa inversa usando un oligonucleótido CAPswitch como molde.

En la invención objetivo también se incluyen kits para la construcción de bancos de cDNA; por ejemplo, kits para la construcción de bancos que incluyen los nuevos oligonucleótidos de acuerdo con la invención objetivo para uso en procedimientos de PCR.

Tecnología CAPswitch

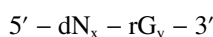
Los métodos y materiales de la presente invención se basan esencialmente en el uso de oligonucleótidos CAPswitch únicos en la síntesis de cDNA. La síntesis del cDNA objetivo puede incluir una operación de síntesis de cDNA de primera cadena a partir de poliA+RNA utilizando transcriptasa inversa, conectada con una síntesis de cDNA de segunda cadena o una multiplicación por PCR en una segunda operación para generar una elevada producción de cDNA ds de longitud completa. Cuando se incluyen en la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA de primera cadena, los oligonucleótidos CAPswitch crean un molde extendido corto. En el curso de la síntesis de cDNA de primera cadena, la enzima transcriptasa inversa se detiene en el extremo 5' del molde de mRNA. El extremo 5' incluye típicamente una estructura de CAP de 7-metilguanosina, presente en los extremos 5' de todos los mRNAs eucarióticos. La actividad de la enzima transferasa terminal añade luego algunos nucleótidos adicionales, principalmente desoxicitidina, al extremo 3' de la cadena de cDNA recién sintetizada. El oligonucleótido CAPswitch, que tiene una secuencia de oligo-(rG) en su extremo 3', se aparea por bases con el tramo de nucleótidos, rico en desoxicitidina, presente en la cadena de cDNA creando un molde extendido. La transcriptasa inversa cambia luego los moldes y continúa la síntesis de cDNA que es complementario del oligonucleótido CAPswitch. El resultante cDNA ss de longitud completa lleva incorporada en su extremo 3' una secuencia que es complementaria tanto del extremo 5' completo del mRNA como de la secuencia del oligonucleótido CAPswitch.

Se identifica aquí una estructura oligonucleotídica (oligonucleótido CAPswitch) que puede proporcionar una eficaz reacción de cambio de molde en el curso de la síntesis de cDNA de primera cadena a partir de poli(A)+RNA utilizando, como dador, mRNA de longitud completa con 5'-caperuza y, como aceptor, un oligonucleótido químicamente sintetizado. Los productos de cDNA quiméricos que tenían una secuencia oligonucleotídica en el extremo 3' del cDNA de longitud completa fueron revelados mediante la multiplicación subsiguiente (por ejemplo, por 5'-RACE) usando una combinación de un cebador génicamente específico (GSP; del inglés, gene-specific primer) y un cebador complementario de una porción del oligonucleótido de cambio de molde. Mediante las secuencias polinucleotídicas siguientes se representa un conjunto de oligonucleótidos para uso en el método de la presente invención, que tienen una secuencia arbitraria en el extremo 5' y una secuencia aleatoria en el extremo 3':

CzR1	5'-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N) ₁₂ -3'	(ID. SEC. n° 1)
CzR2	5'-d[TGTAGCGTGAAGACGACAGAA(N) ₁₁]r(N) ₁ -3'	(ID. SEC. n° 2)
CzR3	5'-d[TGTAGCGTGAAGACGACAGAA(N) ₁₁]-3'	(ID. SEC. n° 3)
CzR4	5'-d[TGTAGCGTGAAGACGACAGAAGGATG(N) ₉]r(N) ₁ -3'	(ID. SEC. n° 4)
Na21-N4	5'-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N) ₄ -3'	(ID. SEC. n° 5)
Na21-N8	5'-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N) ₈ -3'	(ID. SEC. n° 6)
Na21-N12	5'-d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N) ₁₆ -3'	(ID. SEC. n° 7)

en que d() representa una secuencia desoxirribonucleotídica; (N)₁₁ y (N)₉ representan, respectivamente, una secuencia desoxirribonucleotídica aleatoria de 11 ó 9 bases de longitud, de dAMP, dGMP, dCMP y DTTP en cada posición de base; y r(N)₁₋₁₆ representa una secuencia aleatoria de 1 a 16 bases de longitud, de AMP, GMP, CMP y UMP en cada posición de base.

Basándose en la eficacia de la multiplicación de los extremos 5' (5'-RACE) de cuatro cDNAs humanos (α -actina de músculo liso, γ -actina de músculo liso, γ -actina citoesquelética y receptor de transferrina, y RNAs modelo con y sin estructura de cap en el extremo 5') y en el subsiguiente análisis secuencial del producto multiplicado, se han identificado estructuras conservativas en el extremo 3' de un oligonucleótido que puede ser utilizado para generar una reacción de cambio de molde muy eficaz, dependiente de CAP. Un análisis mutacional de regiones conservativas y no conservativas de la secuencia oligonucleotídica (véanse las secuencias de los oligonucleótidos CAPswitch analizados adicionales, ID. SEC. números 19-66) reveló que se alcanzaba la máxima eficacia de cambio de molde dependiente de CAP al utilizar un oligonucleótido CAPswitch quimérico de DNA-RNA básico que tenía una secuencia arbitraria en su extremo 5' y una secuencia de oligo-ribo(G) conservativa en el extremo 3'. Este oligonucleótido se representa mediante la fórmula general:



en que dN representa una secuencia desoxirribonucleotídica arbitraria de 18-21 bases de longitud y rG_y representa una secuencia de oligo-rG de 3-5 bases de longitud. La secuencia de oligo-rG es responsable de la función de cambio de molde principal asociada con el oligonucleótido CAPswitch. La secuencia desoxirribonucleotídica arbitraria puede ser seleccionada para que sea útil para las subsiguientes operaciones de síntesis y clonación de cDNA.

Además, la reacción de cambio de molde es muy eficaz para cDNAs que tienen una secuencia complementaria del extremo 5' del mRNA, en comparación con los cDNAs que fueron prematuramente terminados durante la transcripción inversa de la primera cadena y, por lo tanto, no tienen secuencias complementarias del extremo 5' de la molécula de mRNA. La presencia de la estructura de CAP en el extremo 5' del mRNA no es un requisito necesario para la reacción de cambio de molde, pero la reacción de cambio de molde es muy eficaz para productos de DNA de longitud completa sintetizados sobre un mRNA que tiene la estructura de CAP presente en el extremo 5'.

Dentro del alcance de la presente invención se contemplan modificaciones en la estructura de los oligonucleótidos de cambio de molde. Específicamente, la invención objetivo contempla aquellas modificaciones que pueden afectar a la eficacia del cambio de molde pero en que el oligonucleótido de cambio de molde conserva sustancialmente la misma actividad funcional que los oligonucleótidos de cambio de molde no modificados, es decir, la extensión, dependiente de CAP, de cDNA de longitud completa por la transcriptasa inversa usando el oligonucleótido como molde. Los oligonucleótidos modificados pueden ser utilizados como alternativas a los oligonucleótidos CAPswitch no modificados. Las reglas siguientes resumen aquellas modificaciones que son útiles de acuerdo con la invención objetivo:

- 1a. El uso de secuencias 3'-terminales de oligo-rG más cortas (1-2 bases), la sustitución de uno o varios restos de rG por rA, rC o rU, o la sustitución de oligo-rG por oligo-dG reduce la eficacia de la estructura básica; las secuencias de oligo-rG más largas (7-9 bases) no influyen significativamente en la eficacia del cambio de molde.
 - 1b. La modificación del grupo 3'-OH del resto de ribosa del G 3'-terminal por un grupo amino, biotina, fosfato, fluoro o glicerol puede reducir significativamente el fondo en las subsiguientes operaciones de multiplicación por PCR (operación 3A).
 - 1c. Los cambios en la secuencia de la porción arbitraria de un oligonucleótido de cambio de molde, la sustitución parcial o completa de desoxirribonucleótidos por ribonucleótidos, incluyendo el(los) sitio(s) de restricción, no influyen significativamente en la eficacia del cambio de molde. La utilización de una secuencia arbitraria más larga (aproximadamente 22 a 42 bases) en el extremo 3' del oligonucleótido de cambio de molde reduce la eficacia del cambio de molde, mientras que las secuencias más cortas (aproximadamente 15 a 17 bases) aumentan ligeramente la eficacia del cambio de molde pero hacen que las subsiguientes operaciones de multiplicación por PCR (operaciones 3A y 3C) sean menos eficaces.
 - 1d. Una persona experta en este campo técnico que tenga la ventaja de la descripción actual reconocerá que se pueden realizar fácilmente otras modificaciones en la estructura de los oligonucleótidos de cambio de molde de al presente invención. Estas modificaciones pueden aumentar la eficacia y la especificidad de la reacción de cambio de molde dependiente de CAP. Por ejemplo, utilizando la tecnología de selección de aptámeros (oligonucleótidos aleatorios) (Kenan *et al.*, 1994) es posible hallar las secuencias ribonucleotídicas o desoxirribonucleotídicas de la porción arbitraria del oligonucleótido de cambio de molde que se unen eficazmente a la estructura de CAP de una molécula de mRNA y, por lo tanto, aumentan la eficacia de la reacción de cambio de molde. Se puede alcanzar el mismo resultado mediante la sustitución de nucleótido(s) natural(es) por nucleótidos modificados con objeto de aumentar la afinidad de los oligonucleótidos de cambio de molde que se unen a la estructura de CAP.
- También se pueden construir proteína-oligonucleótidos de cambio de molde quiméricos para que la porción proteínica reconozca la estructura de CAP y se una a ella, los cuales pueden aumentar la eficacia de la reacción de cambio de molde. Estas proteínas o porciones proteínicas que se unen a la caperuza son bien conocidas en la técnica e incluyen preferiblemente anticuerpos contra la estructura de CAP y el factor 4E eucariótico de iniciación (eIF-4E; del inglés, *eukaryotic initiation factor 4E*).

Otra ventaja del uso de los métodos de la presente invención es la elevada flexibilidad de este procedimiento que hace posible utilizar esta nueva tecnología con los procedimientos convencionales para clonación de cDNA bien conocidos en la técnica. Ventajosamente, la invención objetivo permite eliminar la necesidad de los múltiples procedimientos enzimáticos o de purificación utilizados en los procedimientos convencionales. El método objetivo puede proporcionar la adición automática y directa, dependiente de CAP, de una secuencia oligonucleotídica de cambio de molde al extremo 5' de un híbrido de mRNA:cDNA en el curso de la síntesis de cDNA de primera cadena. Además, los métodos y composiciones de al invención objetivo se pueden combinar con procedimientos bien conocidos en la técnica para la síntesis y clonación de cDNA. Resultará evidente a los expertos en la técnica que se pueden variar el orden de algunas de las operaciones individuales, la estructura exacta de los cebadores de CDS, y los vectores utilizados para la construcción del banco de cDNA. La descripción posterior detalla sólo operaciones preferidas que dan lugar a la generación eficaz de cDNA de longitud completa a partir de RNA.

Síntesis de cDNA de primera cadena

Utilizando el método objetivo con procedimientos convencionales, se puede llevar a cabo la síntesis de cDNA de primera cadena usando un complejo hibridado que comprende un cebador para síntesis de cDNA:mRNA como molde para la transcripción inversa. La extensión del cebador puede ser catalizada por la transcriptasa inversa, o

por una DNA polimerasa que posea actividad transcriptasa inversa, en presencia de cantidades adecuadas de otros componentes necesarios para llevar a cabo la reacción, tales como, por ejemplo, los desoxirribonucleósido trifosfatos ATP, CTP, GTP y TTP, Mg^{2+} y un tampón óptimo. Para la síntesis del cDNA de primera cadena, se puede utilizar una diversidad de DNA polimerasas que posean actividad transcriptasa inversa. Los ejemplos de DNA polimerasas que pueden ser utilizadas en los métodos de la presente invención incluyen las DNA polimerasas procedentes de organismos tales como bacterias termófilas y arqueobacterias, retrovirus, levaduras, *Neurospora*, *Drosophila*, primates y roedores. Preferiblemente, la DNA polimerasa se aísla del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV; del inglés, Moloney murine leukemia virus) (Patente de EE.UU. n° 4.943.531) o la transcriptasa inversa de M-MLV que carece de actividad RNasa H (Patente de EE.UU. n° 5.405.776), el virus tipo I de la leucemia humana de células T (HTLV-I; del inglés, human T-cell leukemia virus type I), el virus de la leucemia bovina (BLV; del inglés, bovine leukemia virus), el virus del sarcoma de Rous (RSV; del inglés, Rous sarcoma virus), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o *Thermus aquaticus* (Taq) o *Thermus thermophilus* (Tth) (Patente de EE.UU. n° 5.322.770). Estas DNA polimerasas pueden ser aisladas del propio organismo o, en ciertos casos, ser obtenidas comercialmente. Las DNA polimerasas útiles con la invención objetivo pueden ser también obtenidas de células que expresan genes clonados que codifican la polimerasa. Como material de partida para la síntesis de cDNA, se puede usar poli(A)+RNA o RNA total de levadura y de organismos superiores tales como vegetales y animales.

La operación de síntesis de cDNA de primera cadena del método objetivo puede incluir oligonucleótidos de cambio de molde de al presente invención en la mezcla de reacción, pero estos no son un componente necesario para llevar a cabo la síntesis de cDNA de primera cadena. Los oligonucleótidos de cambio de molde se pueden añadir en el momento de la operación de cambio de molde que sigue a la operación de síntesis de la primera cadena. De esta manera, se entiende que se pueden incluir las moléculas oligonucleotídicas de cambio de molde en la composición de la reacción para la primera cadena (por ejemplo, durante la hibridación del cebador para síntesis de cDNA con el RNA o cuando se pone el RNA en contacto con una enzima que posee actividad transcriptasa inversa), o se pueden añadir los oligonucleótidos en el curso de la reacción para la síntesis de cDNA de primera cadena o tras la compleción de esta reacción.

Dependiendo de la estrategia que se va a emplear para la clonación del cDNA, se pueden utilizar numerosas estructuras de cebadores para síntesis de cDNA para la síntesis de cDNA de primera cadena utilizando poli(A)+RNA como molde y catálisis por la actividad transcriptasa inversa. El cebador para síntesis de cDNA puede ser un oligonucleótido de cadena sencilla, un oligonucleótido de cadena doble que tenga una porción de cadena sencilla [un adaptador de extremo-restricción-cebador o PRE (del inglés, primer-restriction-end), como describen Coleclough *et al.*, 1985], o un cebador de vector, que represente un vector ds con una porción de cadena sencilla (Okayama *et al.*, 1982). En los tres casos, una porción de cadena sencilla del cebador para síntesis de cDNA es responsable de la unión con poli (A)+RNA y del inicio de la síntesis de cDNA de primera cadena. En una realización preferida del método objetivo, para la construcción de bancos de cDNA de longitud completa, un cebador de CDS que contiene una cola de oligo-dT en su extremo 3' se hibrida con la porción de poli(A) del mRNA. Para una rápida multiplicación o clonación de los extremos 5' del cDNA y para la clonación selectiva de genes concretos, el cebador de CDS puede poseer una secuencia aleatoria o una secuencia arbitraria que puede corresponder a una secuencia concreta de un gen diana que se va a clonar.

La invención objetivo atañe particularmente a las realizaciones de los métodos anteriores en que el cebador de CDS se puede hibridar con:

1a. *La cola de poli(A) del poli(A)+RNA.* El cebador para la síntesis de cDNA puede ser seleccionado entre un oligonucleótido de cadena sencilla, cualquier fragmento de DNA de cadena parcialmente doble y cualquier cebador de vector lineal. En una realización preferida, el cebador oligonucleotídico tiene la secuencia: 5'-dN₁-dN₂-...-dN_m-dT_n-dN₁-dN₂-...-dN_p-3' en que m representa un número entero igual o superior a 0, preferiblemente de 0 a 20; n representa un número entero igual o superior a 8, preferiblemente de 8 a 30; p es preferiblemente de 0 a 3; dN representa un desoxirribonucleótido seleccionado entre, o representa una mezcla de, dAMP, dCMP, dGMP y dTMP; y dT representa dTMP. Dentro del alcance de la presente invención están ciertas modificaciones en la estructura del cebador, tales como la sustitución de 1-10 nucleótidos por nucleótidos que contienen diferentes grupos haptenos (biotina, digoxigenina, fluoresceína, etc.), compuestos nucleotídicos análogos, ribonucleótidos o nucleótidos artificiales, y la incorporación de sitios de restricción o de la región promotora para RNA polimerasa de bacteriófago, que simplifican la purificación, utilización y clonación subsiguientes del cDNA pero que aún conservan la función principal del cebador, es decir, la actividad cebadora de la porción de poli(A) del poli(A)+RNA. La utilización de un cebador de DNA de cadena parcialmente doble o de vectores plasmídicos lineales que tienen la secuencia de cola de cadena sencilla 5'-dN₁-dN₂-...-dN_m-dT_n-dN₁-dN₂-...-dN_p-3' anteriormente descrita y que poseen actividad cebadora para la síntesis de cDNA de primera cadena a partir de la porción de poli(A) del poli(A)+RNA, es también considerada una parte de al invención objetivo. Con objeto de simplificar el procedimiento de clonación, se puede fijar el oligonucleótido CAPswitch al otro extremo del cebador del vector. En este caso, el cebador del vector poseerá en un extremo una secuencia que corresponde al cebador de CDS y, en el otro extremo, el oligonucleótido CAPswitch (tecnología de CAPswitch-cebador del vector). La síntesis de cDNA y el cambio automático de molde subsiguientes generarán un producto quimérico de cDNA:vector, el cual puede ser fácilmente clonado como describen Okayama *et al.* (1982).

- 1b. *Porción interna del mRNA que no es poli(A)*. Este(estos) cebador(es) oligonucleotídico(s) tiene(n) la fórmula general $dN_1-dN_2-...dN_q$, en la que dN representa un desoxirribonucleótido seleccionado entre dAMP, dCMP, dGMP y dTMP o representa una mezcla de 2-4 de estas bases; y q representa un número entero igual o superior a 6, preferiblemente de 6 a 50. Estos cebadores pueden tener una secuencia aleatoria, es decir, se pueden hibridar con todos los mRNAs, una secuencia arbitraria, es decir, se pueden hibridar con al menos un mRNA arbitrario, o una secuencia complementaria de al menos un mRNA. Además, la secuencia de este(estos) cebador(es) puede incluir un(os) sitio(s) de restricción o bases modificadas (por ejemplo, biotiniladas) para facilitar el subsiguiente procedimiento de purificación o clonación.

Síntesis de cDNA de segunda cadena y/o multiplicación por PCR

La síntesis de cDNA de primera cadena basada en la tecnología de CAPswitch genera productos intermedios de moléculas híbridas de mRNA:cDNA de longitud completa (o el correspondiente extremo 5' de un fragmento de longitud completa), flanqueados por un cebador de CDS en su extremo 3' y un oligonucleótido CAPswitch en su extremo 5'. Dichos productos intermedios pueden ser fácilmente convertidos en una forma de cDNA ds adecuada para la subsiguiente clonación utilizando procedimientos convencionales. Estos procedimientos son bien conocidos e incluyen:

1. Multiplicación directa del cDNA de longitud completa por combinación de un cebador de PCR que corresponde a CDS y porciones flanqueadoras de CAPswitch de un híbrido de mRNA:cDNA, y cantidades eficaces de otros reactivos bajo las condiciones necesarias para llevar a cabo la PCR. Preferiblemente, las condiciones son las desarrolladas para la multiplicación de secuencias de ácido nucleico largas, y descritas por Cheng [Patente Internacional (1995)] y Barnes (Patente de EE.UU. n° 5.436.149, de 25 de Julio de 1995).
2. Sustitución de la porción de mRNA del híbrido de mRNA:cDNA por un cDNA de segunda cadena, esencialmente del modo descrito por Okayama *et al.* (1982) y Gubler *et al.* (1983). Este proceso acarrea la digestión del RNA con una ribonucleasa tal como RNasa H de *E. coli*, una síntesis reparadora utilizando una DNA polimerasa que tiene las actividades de la DNA polimerasa I, y ligación. El procedimiento depende de la estructura del cebador de CDS utilizado para la síntesis de cDNA de primera cadena. La síntesis de cDNA de segunda cadena puede ser llevada a cabo utilizando como molde un híbrido de mRNA:cDNA o un producto quimérico de mRNA:cDNA:vector usando el cebador del vector para la síntesis de la primera cadena (véase más atrás la tecnología de CAPswitch-cebador del vector). Alternativamente, el híbrido de mRNA:cDNA anteriormente descrito, generado mediante la estrategia del adaptador PRE, puede ser digerido en las secuencias flanqueadoras 5' y 3', que corresponden al adaptador PRE y el oligonucleótido CAPswitch, por al menos una enzima de restricción y ser luego ligado a un vector convencional digerido por la(s) misma(s) enzima(s) de restricción. Se puede(n) usar cual(es)quier enzima(s) de restricción con tal de que no corte(n) dentro del híbrido de mRNA:cDNA.

Clonación en un vector

En el caso de usarse una estrategia de cebador de vector (CAPswitch-cebador del vector) o de adaptador PRE, el cDNA ds generado después de la síntesis de cDNA de segunda cadena está ya insertado en el vector y no se requiere esta operación. Cuando se utiliza un cebador oligonucleotídico de CDS, el cDNA ds preparado en la segunda operación por PCR o por tecnología de sustitución de mRNA puede ser ligado con adaptadores o ser sometido a digestión con enzima(s) de restricción en secuencias que corresponden a porciones flanqueadoras del CDS y el oligonucleótido CAPswitch, generándose de esta forma moléculas de cDNA ds que se ligarán a cualquier vector de clonación convencional (incluyendo un plásmido, cósmido, fago, vector retroviral, etc.) después de ser digeridas con la(s) misma(s) enzima(s) de restricción.

A continuación, las moléculas de DNA recombinante que comprenden un banco de cDNA de longitud completa pueden ser introducidas en huéspedes procarióticos, y opcionalmente en huéspedes eucarióticos, útiles en la clonación de alta frecuencia de cDNA ds de longitud completa y en la expresión de proteínas recombinantes a partir de ellos.

Una vez que se ha completado la clonación de acuerdo con la invención, el(los) clon(es) deseado(s) puede(n) ser detectado(s) mediante una sonda marcada o mediante anticuerpos monoclonales o policlonales preparados contra el producto en un inmunoensayo convencional, o enriquecido(s) en cuanto a la diana deseada mediante un planteamiento de selección por hibridación descrito, por ejemplo, por Li *et al.* en la Patente Internacional WO 95/04745 de 9 de Agosto de 1994.

Sumario

El uso de un oligonucleótido CAPswitch en la síntesis y clonación de cDNA simplifica y mejora significativamente la tecnología para la construcción de bancos de cDNA de longitud completa. Las principales ventajas son las siguientes:

1. El procedimiento en una fase que incluye la síntesis de cDNA de primera cadena y la adición de una secuencia definida al extremo 3' del cDNA reduce significativamente el número de operaciones (de 5-7 a 2-3 operaciones) necesarias en la tecnología convencional para la construcción estándar de bancos de cDNA, basada en PCR. Un número menor de operaciones significa que los nuevos métodos y materiales de al presente invención son más eficaces y más sencillos de utilizar, requieren menos trabajo y son más reproducibles que los métodos convencionales para la construcción de bancos de cDNA.
2. De acuerdo con la presente invención, el mecanismo de cambio de molde dependiente de CAP proporciona una tecnología significativamente más eficaz para sintetizar cDNA de longitud completa y generar bancos de cDNA que contengan sobre todo cDNAs de longitud completa. Los métodos y materiales de la presente invención pueden proporcionar un nuevo método para seleccionar fácilmente los cDNAs de longitud completa que se van a clonar en el banco de cDNA.

Como aquí se usa, la expresión "DNA complementario o cDNA de longitud completa" se define como cDNA(s) o fragmento(s) de cDNA de cadena sencilla (ss) o cadena doble (ds) y longitud completa que contienen la información secuencial completa del(de los) extremo(s) 5' de mRNA(s). El cDNA de longitud completa puede contener la información secuencial completa del extremo 5' de un mRNA particular (diana) o de la población total de poli(A)+RNA utilizada como molde para la síntesis de cDNA de primera cadena.

Como aquí se usa, la expresión "banco de cDNA de longitud completa" se refiere a la población total de cDNAs ss o ds sintetizados a partir de poli(A)+RNA como molde. El banco de cDNA de longitud completa se puede utilizar directamente para diferentes aplicaciones conocidas en la técnica o se puede clonar en cualquier vehículo de clonación recombinante adecuado, y se puede transformar un huésped con el vehículo de clonación.

La expresión "reacción de cambio de molde" se refiere a un proceso de síntesis, dependiente de molde, de la cadena complementaria por una DNA polimerasa usando dos moldes en orden consecutivo y que no están covalentemente unidos entre sí por enlaces fosfodiéster. La cadena complementaria sintetizada será una sola cadena continua, complementaria de ambos moldes. Típicamente, el primer molde es poli(A)+RNA, y el segundo molde es un oligonucleótido de cambio de molde o "CAPswitch".

Como aquí se usa, la expresión "secuencia arbitraria" o "secuencia ancla" se refiere a cualquier secuencia desoxirribonucleotídica, ribonucleotídica o mixta desoxirribo/ribonucleotídica, definida o preseleccionada, que contiene una secuencia particular de nucleótidos naturales o modificados.

Como aquí se usa, la expresión "secuencia aleatoria" se define como una secuencia desoxirribonucleotídica, ribonucleotídica o mixta desoxirribo/ribonucleotídica que contiene cualquier nucleótido natural o modificado en cada posición nucleotídica.

Como aquí se usa, la expresión "cDNA anclado de longitud completa" se define como un cDNA ss de longitud completa que tiene una secuencia arbitraria definida en el extremo 3'.

Como aquí se usa, la expresión "híbrido de mRNA:cDNA" se refiere a un producto después de la síntesis de cDNA de primera cadena catalizada por la transcriptasa inversa utilizando poli(A)+RNA como molde. El "híbrido de mRNA:cDNA" puede ser de longitud completa si la porción de cDNA incluye la secuencia entera de los extremos 5' del mRNA molde.

Como aquí se usa, la expresión "transcriptasa inversa" se define como cualquier DNA polimerasa que posee actividad transcriptasa inversa que puede ser utilizada para la síntesis de cDNA de primera cadena utilizando poli(A)+RNA o RNA total como molde.

Como aquí se usa, se dice que dos secuencias son "complementarias" entre sí si son capaces de hibridarse entre sí para formar una estructura antiparalela de ácido nucleico de doble cadena.

Como aquí se usa, el término "hapteno" se refiere a una molécula que está unida a una molécula de ácido nucleico y puede ser reconocida y unida por otra molécula o "ligando de unión" tal como, por ejemplo, un anticuerpo, estrep-tavidina y biotina, un metal de transición y otros agentes conocidos en la técnica. Los ejemplos de haptenos incluyen un grupo quelante, biotina, fluoresceína, digoxigenina, un antígeno y otros agentes conocidos en la técnica.

Como aquí se usa, la expresión "soporte sólido" se refiere a cualquier sustrato conocido que puede ser utilizado para la inmovilización de un ligando de unión o de secuencias oligonucleotídicas/polinucleotídicas mediante cualquier método conocido.

Como aquí se usa, la expresión "grupo informador" se refiere a cualquier grupo incorporado a cDNA de longitud completa mediante procedimientos de marcación química o enzimática convencionales y que puede ser detectado mediante el uso de técnicas convencionales tales como cuenta de centelleo, autorradiografía, medición de fluorescencia, medición calorimétrica, medición de emisión lumínica y otros medios conocidos en la técnica. Los ejemplos de grupos informadores incluyen radioisótopos, grupos fluorescentes, quimiofluorescentes, quimioluminiscentes y haptenos, y otros grupos conocidos en la técnica.

Como aquí se usa, la expresión “hibridación sustractiva” se refiere a una tecnología que permite la recuperación de una población de cDNA que contiene una representación muy enriquecida de las especies de cDNA que están presentes en una población de cDNA (comprobadora) pero que son menos abundantes o no se encuentran en otra población de cDNA (conductora). Los ejemplos de tecnologías de hibridación sustractiva incluyen la tecnología de

5 Hibridación Sustractiva por Supresión (Chenchik *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.565.340), el análisis de diferencias de representación (Wigler *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.436.142), y la sustracción por captura de conectores [Yang *et al.*, Anal. Biochem. 237: 109-114 (1996)].

Como aquí se usa, la expresión “compuesto nucleotídico análogo” se refiere a un nucleótido que no se encuentra típicamente en el DNA ni el RNA y que posee ciertas características adicionales que permiten mejorar la eficacia de la reacción de cambio de molde o mejorar la utilización del generado cDNA anclado. Por ejemplo, los compuestos nucleotídicos análogos adecuados incluyen una modificación en la base o la cadena principal de azúcar-fosfato, tal como ácido nucleico peptídico, inosina, 5-nitroindol-desoxirribofuranosilo, 5-metildesoxicitosina y 5,6-dihidro-5,6-dihidroxidesoxitimidina. Otros compuestos nucleotídicos análogos serán evidentes para los expertos en la técnica.

15 A continuación se incluyen ejemplos que ilustran procedimientos para llevar la invención a la práctica. Estos ejemplos no deben ser considerados restrictivos. Todos los porcentajes son en peso y todas las proporciones de mezclas de disolventes son en volumen a menos que se indique otra cosa.

20 Ejemplo 1

Método preferido para clonar secuencias 5'-terminales de cDNA de longitud completa basándose en la tecnología CAPswitch

25 La obtención de un cDNA de longitud completa es una de las tareas más importantes, y a menudo una de las más difíciles, a la hora de caracterizar genes. Con los métodos tradicionales para la construcción de bancos de cDNA se producen normalmente fragmentos de cDNA sólo parciales. Para facilitar la recuperación del resto de la secuencia de codificación, se propuso en 1988 (Frohman *et al.*, 1988) un método *in vitro* para la multiplicación rápida de extremos de cDNA (RACE; del inglés, rapid amplification of cDNA ends). A pesar de las diversas modificaciones que se han desarrollado, las tecnologías RACE actuales son complicadas e ineficaces. Los métodos y materiales de al presente invención proporcionan un método que simplifica significativamente y hace más eficaz el procedimiento 5'-RACE. En la Figura 2 se muestra el diagrama de flujo que describe el procedimiento 5'-RACE basado en CAPswitch, y más adelante se describe el protocolo preferido. Dentro del alcance de la presente invención caen ciertas modificaciones obvias en el protocolo, tales como, por ejemplo, la utilización de otras enzimas que poseen actividades enzimáticas similares para la operación de síntesis de la primera cadena y la PCR, la utilización de otras secuencias del cebador de oligo(dT) y el oligonucleótido CAPswitch, y la utilización de un cebador génicamente específico en lugar de un cebador de oligo(dT) para la síntesis de la primera cadena.

40 Operación 1

Procedimiento de síntesis de cDNA de primera cadena-cambio de molde

Se hibridaron 10 picomoles del cebador para la síntesis de cDNA [cebador de oligo-d(T)]

45 CDS1: 5'-d(TCTAGAATTCAGCGGCCGC(T)₃₀VN) - 3' (ID. SEC. n° 8)

(en que V = G o A o C; N = G o A o T o C)

50 y 50 picomoles del oligonucleótido CAPswitch (CSO1):

CSO1: 5'-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGGp)-3' (ID. SEC. n° 9)

(en que p es un grupo 3'-fosfato)

55 con 1 µg de poli(A)+RNA de placenta humana (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, California, EE.UU.) en un volumen de 5 µl de agua desionizada, calentando la mezcla durante 2 minutos a 70°C y enfriando luego sobre hielo durante 2 minutos. Luego se inició la síntesis de cDNA de primera cadena mezclando el cebador hibridado-RNA con 200 unidades de RNasa H de M-MLV-transcriptasa inversa (transcriptasa inversa Superscript II, Life Technologies) en un volumen final de 10 µl que contenía Tris-HCl 50 mM (pH de 8,3 a 22°C), KCl 75 mM; MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM, y dATP, dGTP, dCTP y dTTP, cada uno 1 mM. La mezcla de reacción para síntesis de cDNA de primera cadena-cambio de molde fue incubada a 42°C durante 1,5 horas en una incubadora con aire y fue luego enfriada sobre hielo. También se sintetizó un cDNA de primera cadena utilizando cebadores aleatorios d(N)₆ (500 ng) o el cebador génicamente específico antisentido de la beta-actina humana:

65 ACT1: 5'-d(ACTCGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC)-3' (ID. SEC. n° 10)

ES 2 325 044 T3

o el cebador génicamente específico antisentido del receptor humano de la transferrina:

TFR1: 5'-d(GTCAATGTCCCAAACGTCACCAGAGA)-3' (ID. SEC. nº 11)

en lugar del cebador de oligo-d(T).

La mezcla de reacción fue luego diluida por un factor de 500 mediante la adición de 5 ml de Tricina-KOH 10 mM (pH de 8,5 a 22°C) y EDTA 0,1 mM, incubada a 94°C durante 1,5 minutos, enfriada sobre hielo y guardada a -20°C.

Operación 2

5'- RACE

Se llevó a cabo la multiplicación por PCR utilizando la mezcla de polimerasas Advantage KlenTaq (CLONTECH Laboratories, Inc.). Este kit contiene una mezcla de las DNA polimerasas KlenTaq-1 y DeepVent (New England BioLabs) y el anticuerpo TaqStart (CLONTECH Laboratories, Inc.). El anticuerpo TaqStart proporciona una PCR de inicio automático en caliente. La multiplicación se llevó a cabo en un volumen de 50 μ l que contenía 5 μ l de cDNA de primera cadena diluido, Tricina-KOH 40 mM (pH de 9,2 a 22°C), Mg(OAc)₂ 3,5 mM, KOAc 10 mM, 75 μ g/ml de BSA; 200 μ M de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP, 0,2 μ M de cada uno del cebador CAPswitch (CSP1): 5'-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)-3' (ID. SEC. nº 12) y el cebador génicamente específico (GSP1 para la beta-actina o el receptor de transferrina), y 1 μ l de la mezcla de polimerasas KlenTaq 50x. Los parámetros térmicos de las reacciones PCR fueron los siguientes: 1 minuto a 94°C seguido de 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 5 minutos; luego 5 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 5 minutos; y luego 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 68°C durante 5 minutos; seguidos de una extensión final de 10 minutos a 68°C. Los productos de la PCR fueron examinados en geles de agarosa al 1,2%/EtBr en tampón TBE 1x. Como marcador de tamaños de DNA se utilizó una Escalera de DNA de 1 kb (Life Technologies).

Las reacciones de 5'-RACE del cDNA tanto de la beta-actina humana como del receptor de transferrina humana no generan una sola banda que corresponde al tamaño esperado del producto multiplicado de 5'-RACE de longitud completa. La clonación y el análisis de secuencia subsiguientes de 18 clones de 5'-RACE aleatoriamente escogidos confirman su identidad con fragmentos 5'-terminales de la beta-actina y del receptor de transferrina. Además, secuencias 5'-terminales del producto multiplicado de 5'-RACE corresponden exactamente a secuencias de mRNAs de longitud completa de la beta-actina y el receptor de transferrina, seguidas de secuencias que corresponden al oligonucleótido CAPswitch. Este ejemplo ilustra que se puede utilizar eficazmente la 5'-RACE de CAPswitch no sólo para la multiplicación de secuencias 5'-terminales de longitud completa de cDNAs sino también para el mapeo exacto de sitios de inicio de la transcripción.

Ejemplo 2

Tecnología basada en PCR de CAPswitch para la construcción de bancos de cDNA de longitud completa

Los métodos y materiales de la presente invención pueden ser usados eficazmente para la construcción de bancos de cDNA utilizando 10-100 ng de RNA total como molde. Para purificar esta pequeña cantidad de RNA total a partir de 10-50 mg de células o tejidos "difíciles", tales como tejidos de biopsias humanas, microorganismos patógenos, tejidos en diferentes fases de desarrollo, etc., se puede utilizar cualquier procedimiento convencional bien conocido en la técnica. En el diagrama de flujo de la Figura 3 se muestra la operación principal de este procedimiento. Resultará evidente a los expertos en la técnica que se pueden variar ciertas operaciones individuales no esenciales, la estructura del cebador de CDS, el oligonucleótido CAPswitch y los adaptadores mostrados en la Figura 3 sin que cambie la eficacia del procedimiento global. Por ejemplo, en lugar de la operación de ligación del adaptador (operación 3), el cDNA ds generado por PCR puede ser sometido a digestión mediante endonucleasa(s) de restricción de corte raro, en secuencias que corresponden a porciones flanqueadoras del CDS y del oligonucleótido CAPswitch, y ser clonado directamente en el vector. Además, para la clonación y la generación de bancos de cDNA de longitud completa por CAPswitch, se pueden utilizar otros procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica para la clonación directa del producto de PCR, tales como el vector de clonación TA, la ligación de extremos romos, y similares. Cualesquiera de dichas variaciones en el protocolo preferido que se basen en la utilización de métodos y materiales de la invención objetivo están dentro del alcance de la invención.

Operación 1

Síntesis de la primera cadena - cambio de molde

Se hibridaron 10 picomoles del cebador CDS1 [cebador de oligo-d(T)] para la síntesis de cDNA:

5'-d(TCTAGAATTCAGCGGCCGC(T)₃₀VN) - 3' (ID. SEC. nº 8)

(en que V = G o A o C; N = G o A o T o C)

y 10 picomoles del oligonucleótido CAPswitch (CSO2):

CSO2: 5'-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG)-3' (ID. SEC. n° 13)

con 100 ng de RNA total de músculo esquelético humano (CLONTECH Laboratories, Inc.) en un volumen de 5 µl de agua desionizada, calentando la mezcla durante 2 minutos a 70°C y enfriando luego sobre hielo durante 2 minutos. Luego se inició la síntesis de cDNA de primera cadena mezclando el cebador hibridado-RNA con 200 unidades de RNasa H de M-MLV-transcriptasa inversa (transcriptasa inversa Superscript II, Life Technologies) en un volumen final de 10 µl que contenía Tris-HCl 50 mM (pH de 8,3 a 22°C), KCl 75 mM; MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM, y dATP, dGTP, dCTP y dTTP, cada uno 1 mM. La mezcla de reacción para síntesis de cDNA de primera cadena-cambio de molde fue incubada a 42°C durante 1,5 horas en una incubadora con aire y fue luego enfriada sobre hielo.

Operación 2

Generación de cDNA de longitud completa por PCR

Se llevó a cabo la multiplicación del cDNA de longitud completa por PCR usando la mezcla de polimerasas Advantage KlenTaq (CLONTECH Laboratories, Inc.). La multiplicación se llevó a cabo en un volumen de 100 µl que contenía 2 µl de cDNA de primera cadena, Tricina-KOH 40 mM (pH de 9,2 a 22°C), Mg(OAc)₂ 3,5 mM, KOAc 10 mM, 75 µg/ml de BSA; 200 µM de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP, 0,2 µM de cada uno del cebador CAPswitch (CSP1) y el cebador CDS1, y 1 ml de la mezcla de polimerasas KlenTaq. Los parámetros térmicos de las reacciones PCR fueron los siguientes: 1 minuto a 95°C seguido de 20-22 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 68°C durante 5 minutos; seguidos de una extensión final de 10 minutos a 68°C. Los productos de la PCR fueron examinados en geles de agarosa al 1,2%/EtBr en tampón TBE 1x. Como marcador de tamaños de DNA se utilizó una Escalera de DNA de 1 kb (Life Technologies).

Operación 3

Ligación del adaptador

Los 50 µl del cDNA ds generado en la operación de PCR fueron combinados con 2 µl de proteinasa K (2 mg/ml) e incubados a 45°C durante 1 hora, lo que fue seguido de una operación de desnaturalización a 70°C durante 10 minutos. Luego se añadieron 3 µl (15 unidades) de DNA polimerasa de T4 a la mezcla de reacción y se realizó una incubación adicional a 16°C durante 30 minutos. El cDNA ds fue luego precipitado mediante la adición de medio volumen de acetato amónico 4 M (aproximadamente 35 µl) y 3,7 volúmenes de etanol al 95% (aproximadamente 260 µl). Tras revolvimiento con formación de remolinos, se centrifugó inmediatamente el tubo a 14.000 rpm en una microcentrífuga durante 20 minutos. El residuo de centrifugación fue lavado con etanol al 80% sin revolvimiento, centrifugado como antes durante 10 minutos, dejado secar al aire y disuelto en 16 µl de agua desionizada. El cDNA ds fue luego ligado a un adaptador durante la noche a 16°C bajo las condiciones siguientes: 16 µl de disolución de cDNA ds, Tris-HCl 50 mM (pH de 7,8 a 22°C), MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, polietilenglicol (peso molecular de 8000) al 5%, 2 µM de adaptador (Ad1):

Ad1: 5' - d(AATTCGCGGCCGCGTCGAC) - 3' (ID. SEC. n° 14)

3' - d(GCGCCGGCGCAGCTGp) - 5' (ID. SEC. n° 15)

(en que p = un grupo 3'-fosfato) y 1 unidad de DNA ligasa de T4 (Life Technologies, Inc.) en un volumen total de 30 µl. Luego se detuvo la reacción de ligación mediante la adición de 70 µl de EDTA 10 mM. El cDNA ds fue sometido una vez a extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, volumen/volumen) y una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, volumen/volumen) y fue luego precipitado mediante la adición de 10 µl de acetato sódico 3 M y 250 µl de etanol al 95%. Después de revolvimiento con formación de remolinos, se centrifugó inmediatamente el tubo a 14.000 rpm en una microcentrífuga durante 20 minutos. El sedimento de centrifugación fue lavado con etanol al 80% sin revolvimiento, centrifugado como antes durante 10 minutos, dejado secar al aire y disuelto en 20 µl de agua desionizada. El cDNA ds ligado al adaptador fue luego fosforilado a 37°C durante 30 minutos bajo las condiciones siguientes: 20 µl de disolución de cDNA ds ligado a adaptador, Tris-HCl 50 mM (pH de 7,8 a 22°C), MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, y 30 unidades de polinucleótido quinasa de T4 (Epicenter Technology) en un volumen final de 30 µl. Luego se terminó la reacción de fosforilación mediante la adición de 2 µl de EDTA 0,2 M y se inactivó térmicamente la mezcla de reacción a 70°C durante 15 minutos.

Operación 4

Fraccionamiento del cDNA por tamaños y clonación

5 El cDNA ds ligado a adaptador y fosforilado generado en la operación previa fue fraccionado en una columna de 1,2 ml de Sephacryl S500 0 (Pharmacia) para filtración en gel, equilibrada mediante Tris-HCl 10 mM (pH de 7,4), NaCl 30 mM y EDTA 0,5 mM. La distribución de los tamaños del cDNA en las fracciones fue analizada mediante un gel de agarosa al 1,1%/EtBr junto con un marcador de tamaños de DNA de 1 kb (Life Technologies). Las fracciones que correspondían a cDNAs con tamaños superiores a 0,5 kb fueron reunidas (volumen total de 250 μ l) y fueron
 10 precipitadas mediante la adición de 1/10 volúmenes (25 μ l) de acetato sódico 3 M, 1,5 μ l de glucógeno a 20 mg/ml, y 2,5 volúmenes (400 μ l) de etanol al 95%.

Tras revolvimiento con formación de remolinos, se centrifugó inmediatamente el tubo a 14.000 rpm en una microcentrífuga durante 20 minutos. El residuo de centrifugación fue lavado con etanol al 80% sin revolvimiento, centrifugado como antes durante 10 minutos, dejado secar al aire y disuelto en 15 μ l de agua desionizada. El cDNA
 15 ds fue luego ligado al brazo del vector *EcoRI* de *lgt11* (CLONTECH Laboratories, Inc.) durante la noche a 16°C bajo las condiciones siguientes: 5 μ l de disolución de cDNA ds, Tris-HCl 50 mM (pH de 7,8 a 22°C), $MgCl_2$ 10 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, polietilenglicol (peso molecular de 8000) al 5%, 2,5 μ g de brazos *EcoRI* de *lgt11* y 2,5 unidades de DNA ligasa de T4 (Life Technologies) en un volumen total de 25 μ l. La mezcla de ligación fue
 20 luego empaquetada usando protocolos estándares como los descritos en el manual de laboratorio de Sambrook *et al.* (1989).

Con objeto de confirmar la elevada calidad del banco generado al utilizar los métodos y composiciones de la presente invención, se seleccionaron al azar 50 clones de fago recombinantes para la determinación del tamaño del
 25 inserto. La distribución de los tamaños de los insertos estaba en el intervalo de 0,5-4,5 kb, con un máximo de 2,0-3,0 kb que corresponden a la distribución de tamaños de poli(A)+RNA de músculo esquelético en el RNA total utilizado para la construcción de bancos de cDNA. Se secuenciaron los mismos 50 insertos utilizando el kit de secuenciación con DNA polimerasa Delta Tth (CLONTECH Laboratories, Inc.). Diez de las secuencias fueron identificadas en una búsqueda en la base de datos GenBank; son: el receptor de transferrina, la proteína ribosómica L7, la cadena ligera 2
 30 de miosina, la proteína del dominio LIM, el factor 6 de ATPasa, la citocromo C oxidasa, la γ -actina citoesquelética, la α -actina de músculo liso y la γ -actina de músculo liso. Para tres cDNAs, las secuencias de los clones eran más largas que las publicadas en GenBank. Para siete cDNAs, sus secuencias correspondían exactamente con secuencias de mRNA de longitud completa a partir del sitio de caperuza.

35 Estos datos muestran que los métodos y composiciones de la presente invención se pueden utilizar para la construcción de bancos de cDNA, para generar un banco de cDNA de alta calidad con un altísimo nivel de clones de cDNA de longitud completa.

40 Ejemplo 3

Construcción de bancos de cDNA de longitud completa CAPswitch utilizando la estrategia del adaptador PRE-cebador

45 La tecnología CAPswitch puede ser también eficazmente combinada con tecnologías convencionales (no basadas en PCR) estándares bien conocidas en la técnica. Como resultado, los procedimientos convencionales pueden resultar significativamente simplificados y se generará un banco de cDNA de longitud completa en lugar de un banco de fragmentos de cDNA. En este ejemplo, como material de partida para la síntesis de cDNA, se usó poli (A)+RNA. En el diagrama de flujo de la Figura 4 se ilustra la operación principal de la tecnología CAPswitch para
 50 la construcción de bancos de cDNA de longitud completa, basada esencialmente en el procedimiento convencional de adaptador PRE-cebador descrito por Coleclough *et al.* (1985). Resultará evidente a los expertos en la técnica que se pueden variar la elección de enzimas que posean actividades enzimáticas similares, la estructura del cebador de CDS (adaptador PRE-cebador), el oligonucleótido CAPswitch y el vector, y la elección de los sitios de restricción utilizados para la clonación, como se muestra en la Figura 4, sin que cambie la eficacia del procedimiento objetivo.
 55 Una modificación del procedimiento puede ser llevar primero a cabo la síntesis de la segunda cadena (operación 3), seguida por la digestión de restricción (operación 2) y la clonación en un vector (operación 4). Otra modificación puede incluir utilizar el procedimiento de ligación del adaptador, descrito en el Ejemplo 2, en lugar de la digestión de restricción (operación 2). También se puede emplear el uso del cebador del vector en lugar del adaptador PRE-cebador para la síntesis de cDNA de primera cadena (operación 1). En este caso, el cebador del vector puede
 60 tener una secuencia de oligo-d(T) en un extremo para iniciar la síntesis de la primera cadena, y una secuencia oligonucleotídica CAPswitch en el otro extremo para proporcionar el cambio de molde automático después de la compleción de la síntesis de cDNA de primera cadena y longitud completa. Cualesquiera de dichas variaciones en el protocolo preferido en que se usen métodos y materiales de la invención objetivo están dentro del alcance de la invención.

65

ES 2 325 044 T3

Operación 1

Generación de un híbrido de mRNA:cDNA de longitud completa

Se hibridaron 10 picomoles de cebador (CDS3) para la síntesis de cDNA:

5' - d[TCTAGAATTCTCGAGGCGGCCGC(T)₃₀VN] - 3' (ID. SEC. nº 16)

3' - d(AGATCTTAAGAGCTCCGCCGGCG) - 3' (ID. SEC. nº 17)

(en que V = G o A o C; N = G o A o T o C)

y 10 picomoles del oligonucleótido CAPswitch (CSO3):

5'-d(TGCTGCGAGAAGACGACAGAATTCCG)r(GGG)-3' (ID. SEC. nº 18)

con 5 µg de poli(A)+RNA de músculo esquelético humano (CLONTECH Laboratories, Inc.) en un volumen de 12,5 µl de agua desionizada, calentando la mezcla durante 2 minutos a 70°C y enfriando luego sobre hielo durante 2 minutos. Luego se inició la síntesis de cDNA de primera cadena-cambio de molde mezclando el cebador hibridado-RNA con 1000 unidades de RNasa H de M-MLV-transcriptasa inversa (transcriptasa inversa Superscript II, Life Technologies) en un volumen final de 25 µl que contenía Tris-HCl 50 mM (pH de 8,3 a 22°C), KCl 75 mM; MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM, y dATP, dGTP, dCTP y dTTP, cada uno 1 mM. Se incubó la mezcla de reacción para síntesis de cDNA de primera cadena-cambio de molde a 42°C durante 1,5 horas en una incubadora con aire y se detuvo la reacción mediante la adición de 75 µl de glucógeno (150 µg/ml) y EDTA 10 mM. El híbrido de mRNA:cDNA fue sometido una vez a extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, volumen/volumen) y una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, volumen/volumen) y fue luego precipitado mediante la adición de medio volumen de acetato amónico 4 M (aproximadamente 40 µl) y 3,7 volúmenes de etanol al 95% (aproximadamente 300 µl). Después de revolvimiento con formación de remolinos, se centrifugó inmediatamente el tubo a 14.000 rpm en una microcentrífuga durante 20 minutos. El sedimento de centrifugación fue lavado con etanol al 80% sin revolvimiento, centrifugado como antes durante 10 minutos, dejado secar al aire y disuelto en 50 µl de agua desionizada.

Operación 2

Digestión de restricción

El híbrido de mRNA:cDNA generado en la operación 1 fue sometido a digestión para clonación no direccional mediante la endonucleasa de restricción *EcoRI* (*EcoRI* y *NotI* o *EcoRI* y *XhoI* para la clonación direccional) durante 1 hora a 37°C en 100 µl de una mezcla de reacción que contenía Tris-HCl 50 mM (pH de 7,5), NaCl 100 mM; MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM y 50 unidades de la endonucleasa de restricción *EcoRI* (New England BioLabs). Se detuvo luego la reacción mediante la adición de 5 µl de glucógeno (2 mg/ml) y EDTA 0,2 M. El híbrido de mRNA:cDNA con extremos *EcoRI* fue sometido una vez a extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1, volumen/volumen) y una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1, volumen/volumen) y fue luego precipitado mediante la adición de medio volumen de acetato amónico 4 M (aproximadamente 40 µl) y 3,7 volúmenes de etanol al 95% (aproximadamente 300 µl). Después de revolvimiento con formación de remolinos, se centrifugó inmediatamente el tubo a 14.000 rpm en una microcentrífuga durante 20 minutos. El sedimento de centrifugación fue lavado con etanol al 80% sin revolvimiento, centrifugado como antes durante 10 minutos, dejado secar al aire y disuelto en 5 µl de agua desionizada.

Operación 3

Ligación en el vector

El híbrido de mRNA:cDNA sometido a digestión con *EcoRI* fue luego ligado al brazo del vector *EcoRI* de *λgt11* (CLONTECH Laboratories, Inc.) durante la noche a 16°C bajo las condiciones siguientes: 5 µl de disolución de híbrido de mRNA:cDNA, Tris-HCl 50 mM (pH de 7,8 a 22°C), MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM, polietilenglicol (peso molecular de 8000) al 5%, 2,5 µg de brazos *EcoRI* de *λgt11* y 2,5 unidades de DNA ligasa de T4 (Life Technologies) en un volumen total de 20 µl.

Operación 4

Síntesis de cDNA de segunda cadena

5 La síntesis del cDNA de segunda cadena se llevó a cabo en un volumen total de 100 μ l que contenía 20 μ l del híbrido de mRNA:cDNA ligado al vector, Tris-HCl 20 mM (pH de 7,5 a 22°C), KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, MgCl₂ 5 mM, β -NAD 0,15 mM, 50 μ g/ml de BSA, 300 unidades/ml de DNA polimerasa I de *E. coli*, 12 unidades/ml de RNasa H de *E. coli* y 60 unidades/ml de DNA ligasa de *E. coli*. Se incubó la mezcla de reacción a 16°C durante 1,5 horas y se detuvo la reacción mediante la adición de 4 μ l de glucógeno (2 mg/ml) y EDTA 0,2 M. El cDNA ds
 10 fue sometido una vez a extracción con fenol/cloroformo/etanol isoamílico (25:24:1, volumen/volumen) y una vez con cloroformo/etanol isoamílico (24:1, volumen/volumen) y fue luego precipitado mediante la adición de medio volumen de acetato amónico 4 M (aproximadamente 35 μ l) y 3,7 volúmenes de etanol al 95% (aproximadamente 260 μ l). Después de revolvimiento con formación de remolinos, se centrifugó inmediatamente el tubo a 14.000 rpm en una microcentrífuga durante 20 minutos. El sedimento de centrifugación fue lavado con etanol al 80% sin revolvimiento,
 15 centrifugado como antes durante 10 minutos, dejado secar al aire y disuelto en 10 μ l de agua desionizada.

El banco de cDNA de longitud completa fue luego empaquetado usando un protocolo estándar descrito en el manual de laboratorio de Sambrook *et al.* (1989). Con objeto de confirmar la calidad del banco generado mediante los métodos y materiales de la presente invención, se llevaron a cabo los mismos experimentos de control de calidad que
 20 en el Ejemplo 2 para la tecnología basada en PCR. La distribución de tamaños y la clonación de alta eficacia del banco de cDNAs de longitud completa fueron similares en ambos bancos.

Estos datos muestran que los métodos y composiciones de la presente invención se pueden utilizar para la construcción de bancos de cDNA basándose en la estrategia del adaptador PRE-cebador, para generar bancos de cDNA de
 25 alta calidad con un altísimo nivel de clones de cDNA de longitud completa.

Ejemplo 4

30 *Método preferido para la multiplicación de cDNA ds utilizando la tecnología CAPswitch, y uso de este cDNA ds en sustracción de cDNA*

También se utilizaron los métodos y materiales de la invención objetivo para producir cDNA de alta calidad a partir de nanogramos de RNA total o poliA+RNA. En el diagrama de flujo de la Figura 1 (operaciones 1 y 2) se
 35 muestran las operaciones principales de este procedimiento. Resultará evidente a los expertos en la técnica que se pueden realizar ciertas modificaciones en el protocolo preferido, tales como la estructura del cebador de CDS, el oligonucleótido CAPswitch y el momento de adición de los diferentes componentes de reacción, sin que cambie la eficacia del procedimiento global.

40 En una realización del objeto de la invención, el cDNA ds multiplicado mediante métodos y materiales de la presente invención se ha utilizado en combinación con la tecnología de sustracción de cDNA. Cuando se utiliza RNA total para la síntesis de cDNA por métodos convencionales, el RNA ribosómico es transcrito junto con la fracción de poliA+RNA aun cuando la síntesis sea cebada con oligo(dT). Si se utiliza este cDNA en el procedimiento de sustracción de cDNA, el exceso de RNA ribosómico, las impurezas de DNA genómico y la baja concentración de cDNA
 45 correspondiente a la fracción de poliA+RNA dan lugar a una hibridación sustractiva ineficaz. Sin embargo, el cDNA generado al utilizar métodos y materiales de la presente invención puede ser utilizado directamente en el procedimiento de hibridación sustractiva aun cuando se utilice RNA total como material de partida. En una subrealización preferida, se utilizó cDNA ds comprobador y conductor, multiplicado mediante métodos y materiales de la presente invención, en combinación con la tecnología de Hibridación Sustractiva por Supresión (Chenchik *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.565.340). Se pueden emplear otros métodos de hibridación sustractiva, descritos, por ejemplo, por Wiggler *et al.* (Patente de EE.UU. n° 5.436.142), Hampson *et al.* [Nucl. Acids Res. 20: 2899 (1992)], Yang *et al.* [Anal. Biochem. 237: 109-114 (1996)], Balzer *et al.* [Nucl. Acids Res. 22: 2853-2854 (1994)] y otros, utilizando cDNA
 50 ss o ds correspondiente al comprobador y/o el conductor y multiplicado de acuerdo con los métodos de la presente invención.

55

Operación 1

Síntesis de la primera cadena - cambio de molde

60

Se hibridaron 10 picomoles del cebador CDS3 [cebador de oligo-d(T)] para la síntesis de cDNA:



65

ES 2 325 044 T3

y 10 picomoles de oligonucleótido CAPswitch (Na1smG3):

5' - d(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGC)r(GGG) - 3'

(ID. SEC. nº 68)

en dos tubos de ensayo separados con 1 mg de cada RNA total comprobador y conductor (CLONTECH Laboratories, Inc.) en un volumen de 5 ml de agua desionizada, calentando la mezcla durante 2 minutos a 70°C y enfriando luego sobre hielo durante 2 minutos. Luego se inició la síntesis de cDNA de primera cadena mezclando el cebador hibridado-RNA con 200 unidades de RNasa H de M-MLV-transcriptasa inversa (transcriptasa inversa Superscript II, Life Technologies) en un volumen final de 10 ml que contenía Tris-HCl 50 mM (pH de 8,3 a 22°C), KCl 75 mM; MgCl₂ 6 mM, DTT 1 mM, y 1 mM de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP. La mezcla de reacción para la síntesis de cDNA de primera cadena-cambio de molde fue incubada a 42°C durante 1,5 horas en una incubadora con aire y fue luego diluida por adición de 40 ml de tampón TE [Tris 10 mM (pH de 7,6) y EDTA 1 mM] y calentada a 72°C durante 7 minutos.

Operación 2

Multiplicación del cDNA

Se llevó a cabo la multiplicación del cDNA de longitud completa por PCR usando la mezcla de polimerasas Advantage KlenTaq (CLONTECH Laboratories, Inc.). La multiplicación se llevó a cabo en un volumen de 100 ml que contenía 5 ml de cDNA de primera cadena diluido, Tricina-KOH 40 mM (pH de 9,2 a 22°C), Mg(OAc)₂ 3,5 mM, KOAc 10 mM, 75 mg/ml de BSA, 200 mM de cada uno de dATP, dGTP, dCTP y dTTP, 0,2 mM del cebador de PCR (Na1sm):

5' - AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT - 3'

(ID. SEC. nº 69)

y 2 ml de la mezcla de polimerasas KlenTaq. Los parámetros térmicos de las reacciones PCR fueron los siguientes: 1 minuto a 95°C seguido de 17-19 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 68°C durante 5 minutos; seguidos de una extensión final de 10 minutos a 68°C. Los productos de la PCR fueron examinados en geles de agarosa al 1,2%/EtBr en tampón TAE 1x. Como marcador de tamaños de DNA se utilizó una Escalera de DNA de 1 kb (Life Technologies). Se terminó la reacción por adición de 2 ml de EDTA 0,5 M.

Operación 3

Purificación del cDNA

Se añade un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) a los productos de PCR comprobador y conductor combinados de cada uno de los dos tubos de reacción. Se revuelve a fondo con formación de remolinos. Se centrifugan los tubos a 14.000 rpm durante 10 minutos para separar las fases. Se separa la capa superior (acuosa) y se pone en un tubo limpio de 1,5 ml de capacidad. Se añaden 700 ml de n-butanol y se revuelve la mezcla a fondo con formación de remolinos. La extracción con butanol permite concentrar el producto de PCR hasta un volumen de 40-70 ml. Se centrifuga la disolución a temperatura ambiental y 14.000 rpm durante 1 minuto. Se separa y desecha la fase superior (fase orgánica de n-butanol). Si no se termina con un volumen de 40-70 ml, se repite la operación de extracción con butanol, con el mismo volumen de n-butanol. Se invierte varias veces una columna CHROMA SPIN-1000 (CLONTECH Laboratories, Inc.) de 0,75 ml para resuspender completamente la matriz de gel. Se quita la tapa superior de la columna y luego se quita la tapa inferior. Se pone la columna en un tubo de centrifuga de 1,5 ml de capacidad o un tubo de 17 x 100 mm. Se desecha todo tampón de columna que se recoja inmediatamente en el tubo y se añaden 1,5 ml de tampón TNE 1x [Tris-HCl 10 mM (pH de 8,0), NaCl 10 mM y EDTA 0,1 mM]. Se deja que el tampón se filtre a través de la columna por flujo gravitatorio hasta que se pueda ver la superficie de los glóbulos de gel en la matriz de la columna. Se desecha el tampón recogido y se continúa con la purificación. Se aplica cuidadosa y lentamente la muestra al centro de la superficie plana de glóbulos de gel. No hay que dejar que la muestra fluya a lo largo de la pared interna de la columna. Se aplican 25 ml de tampón TNE 1x y se deja que el tampón atraviese completamente la columna. Se aplican 150 ml de tampón TNE 1x y se deja que el tampón atraviese completamente la columna. Se transfiere la columna a un tubo limpio de microcentrifuga de 1,5 ml de capacidad. Se aplican 320 ml de tampón TNE 1x y se recogen como la fracción de cDNA purificada. Para confirmar que el producto de PCR está presente en la fracción de cDNA purificada, se lleva a cabo el análisis en gel de agarosa/EtBr como se describe en la operación 2.

Operación 4

Sustracción de cDNA

Se llevan a cabo una digestión con *RsaI* y una sustracción de cDNA del modo descrito con detalle por Chenchik *et al.* (Patente de EE.UU. nº 5.565.340).

Ha de entenderse que los ejemplos y las realizaciones aquí descritos son solamente con fines ilustrativos.

Referencias

- Kimmel**, A. R., y S. L. **Berger** (1987), "Preparation of cDNA and the generation of cDNA libraries: Overview", *Meth. Enzymol.* 152: 307-316.
- Sonenberg**, N., I. **Ederly** y M. **Altmann**, Patente de EE.UU. nº 5.219.989, concedida el 15 de Junio de 1993.
- Wu**, R., redactor (1987), *Methods in Enzymology*, vol. 152, *Academic Press*, páginas 307-389.
- Gubler**, U., y B. J. **Hoffmann** (1983), *Gene* 25: 253-269.
- Okayma** y **Berg** (1982). *Mol. Cell. Biol.* 2: 161-170.
- Pruitt**, S. C., Solicitud de Patente Internacional nº 89110816.9.
- Ederly**, A., L. L. **Chu**, N. **Sonenberg** y J. **Pelletier** (1995), *Mol. Cell Biol.* 15: 3363-3371.
- Maruyama**, K., y S. **Sugano** (1994), *Gene* 138: 171-174.
- Fromont-Racine**, M., E. B. **Pictet** y T. **Grande** (1993), *Nucl. Acids Res.* 21: 1683-1684.
- Kato**, S., y S. **Sekine**, Publicación de Patente Internacional nº 0.625.572 A1, Solicitud nº 93921061.3 de 22.09.1993; Solicitud Internacional nº PCT/JP93/01359.
- Kato**, S. (1994), *Gene* 150: 243-250.
- Telesnitsky**, A., y S. **Goff** (1993), *Reverse Transcriptase* (redactado por A. M. Skalka y S. P. Goff), Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor*, New York, páginas 49-83.
- Kenan**, D.J., D. E. **Tsai** y J. D. **Keene** (1994), *Trends Biochem. Sci.* 19: 57-64.
- Coleclough** y **Erlitz** (1985), *Gene* 34: 305-314.
- Li**, W.-B., C. **Gruber**, J. **Jessee** y J.-J. **Lin**, Solicitud de Patente Internacional nº PCT/US94/09038, Publicación nº WO 95/04745; fecha de presentación: 9 de Agosto de 1994; fecha de la Publicación: 16 de Febrero de 1994.
- Cheng**, S., Solicitud de Patente Internacional nº 95102141.9; Publicación nº 0.669.401 A2.
- Barnes**, W. M., Patente de EE.UU. nº 5.436.149, concedida el 25 de Julio de 1995.
- Frohman**, M. A., M. K. **Dush** y G. R. **Martin** (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8998-9002.
- Sambrook**, J., E. F. **Fritsch** y T. **Maniatis** (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Cold Spring Harbor*, New York.
- Goff**, S. P., N. **Tanese** y M. J. **Roth**, "Expression of enzymatically active reverse transcriptase", Patente de EE.UU. nº 4.943.531; concedida el 24 de Julio de 1990.
- Kotewics**, M. L., y G. F. **Gerard**, "Cloned genes encoding reverse transcriptase lacking RNase H activity", Patente de EE.UU. nº 5.405.776, concedida el 11 de Abril de 1995.
- Gelfand**, D. H., "Reverse transcription with thermostable DNA polymerases - high temperature reverse transcription", Patente de EE.UU. nº 5.322.770, concedida el 21 de Junio de 1994.
- Li**, W.-B., C. E. **Gruber**, J. A. **Jessee** y J.-J. **Lin**, "Method of nucleic acid sequence selection", Patente de EE.UU. nº 5.500.356, concedida el 19 de Marzo de 1996.
- Ludwig**, L. B., "Method for preselecting recombinant clones containing a specific nucleic acid sequence and subsequent transformation with preselected clones", Patente de EE.UU. nº 5.484.702, concedida el 16 de Enero de 1996.
- Chenchik**, A., L. **Diatchenko**, P. **Siebert**, S. **Lukianov**, K. **Lukianov**, N. **Gurskaya**, V. **Tarabykin** y E. **Sverdlov**, "Method for Suppressing DNA Fragment Amplification During PCR", Patente de EE.UU. nº 5.565.340; fecha de la Patente: 15 de Octubre de 1996.
- Wigler**, M., y N. **Lisitsyn**, "Methods for Producing Probes Capable of Distinguishing Variant Genomic Sequences", Patente de EE.UU. nº 5.436.142; fecha de la Patente: 25 de Julio de 1995.

ES 2 325 044 T3

Hampson, I. N., L. Pope, G. J. Cowling y T. M. Dexter (1992), "Chemical crosslinking subtraction (CCLS): a new method for the generation of subtractive hybridization probes", *Nucl. Acids. Res.* 20: 2899.

5 **Yang, M., y A. J. Sytkowski**, "Cloning Differentially Expressed Genes by Linker Capture Subtraction", *Anal. Biochem.* 237: 109-114.

Balzer, H. J., y H. Baumlein, "An Improved Gene Expression Screen", *Nucl. Acids Res.* 22: 2853-2854.

10 **Keller, G. H., y M. M. Manak**, (1993), "DNA probes: Background, Applications, Procedures", segunda edición (Macmillan Publishers Ltd.), *Stockton Press*, New York.

Rosenberg, M., C. Debouck y D. Bergsma, "Differentially Expressed Genes in Healthy and Diseased Subjects", Patente Internacional nº WO 95/21944; fecha de la Publicación Internacional: 17 de Agosto de 1995.

15 **Radding, C. M., S. M. Honigberg, S. Weissman, B. Rigas, A. A. Welcher y D. C. Ward**, "RecA Nucleoprotein Filament and Methods", Patente de EE.UU. nº 4.888.274; fecha de la Patente: 19 de Diciembre de 1989.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para preparar DNA que sea complementario de una molécula de RNA y un oligonucleótido de cambio de molde, método que comprende las operaciones de:

hibridar un cebador para síntesis de cDNA con dicha molécula de RNA y sintetizar una primera cadena de cDNA con una transcriptasa inversa para formar un producto intermedio de RNA-cDNA;

10 poner dicho producto intermedio de RNA-cDNA en contacto con un oligonucleótido de cambio de molde, en que dicho oligonucleótido de cambio de molde se hibrida con el término de dicho producto intermedio de RNA-cDNA que comprende el extremo 3' de dicha primera cadena de cDNA y el extremo 5' de dicho RNA, dicho oligonucleótido de cambio de molde sirve como molde para la extensión de dicho extremo 3' de dicha primera cadena de cDNA, y dicho oligonucleótido de cambio de molde tiene una preseleccionada secuencia de nucleótidos arbitraria en su extremo 5' y al menos un resto ribonucleotídico en su extremo 3'; y

15 extender dicho extremo 3' de dicha primera cadena de cDNA para producir un DNA que es complementario de dicha molécula de RNA y dicho oligonucleótido de cambio de molde.

20 2. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende además multiplicar dicha primera cadena de cDNA usando un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de al menos una porción de dicha preseleccionada secuencia de nucleótidos de dicho oligonucleótido de cambio de molde.

25 3. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que dicha molécula de RNA tiene una estructura de CAP de 7-metilguanosina fijada al extremo 5' de dicho RNA.

4. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que dicho oligonucleótido de cambio de molde tiene al menos tres restos de riboguanina en su extremo 3'.

30 5. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el grupo 3'-OH de la ribosa de dicho resto de riboguanina comprende un grupo químico seleccionado del grupo que consiste en los grupos amino, biotina, fosfato, glicerol y fluoro.

35 6. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que dicho oligonucleótido de cambio de molde comprende una proteína que se une a la estructura de CAP 5' de dicho RNA.

7. Un método de acuerdo con la Reivindicación 6, en que dicha proteína es seleccionada del grupo que consiste en el factor 4E eucariótico de iniciación y un anticuerpo anti-estructura de CAP.

40 8. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que dicho oligonucleótido de cambio de molde se representa mediante la fórmula:



45 en que

dN representa un desoxirribonucleótido seleccionado del grupo que consiste en dAMP, dCMP, dGMP y dTMP;

50 m representa un número entero igual o superior a 0;

rN representa un ribonucleótido seleccionado entre AMP, CMP, GMP y UMP; y

55 n representa un número entero igual o superior a 1.

9. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que dicho oligonucleótido de cambio de molde es seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 68, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107 y 108.

10. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que dicho cebador para la síntesis de cDNA comprende una secuencia complementaria de al menos un mRNA diana.

65 11. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que dicho cebador para la síntesis de cDNA comprende una secuencia complementaria de la porción de poli(A) de poliA+RNA.

12. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que dicho cebador para la síntesis de cDNA es seleccionado del grupo que consiste en las ID. SEC. números 8, 16, 67, 109, 110 y 111.

13. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, en que dicho cDNA anclado de longitud completa contiene al menos un grupo hapteno y el método comprende además las operaciones de incubar dicho cDNA anclado y haptenilado con el ligando de unión del hapteno de dicho cDNA anclado y haptenilado, estando dicho ligando de unión conjugado con un soporte, y siendo dicha incubación bajo unas condiciones suficientes para permitir que dicha sonda de cDNA anclada y haptenilada llegue a unirse con dicho ligando de unión de dicho soporte; recuperar luego dicho cDNA anclado y haptenilado unido al soporte, de las moléculas no unidas, e incubar dicha sonda de cDNA anclada y haptenilada, unida al soporte, bajo unas condiciones suficientes para que se libere dicho cDNA anclado y haptenilado.

14. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende además la operación de tratar dicho cDNA anclado de longitud completa, generado en la operación (c), bajo unas condiciones bajo las cuales se sintetiza una segunda cadena de cDNA por DNA polimerasa, utilizando la citada cadena de cDNA anclada de longitud completa como molde, generándose de este modo un cDNA ds de longitud completa.

15. Un método de acuerdo con la Reivindicación 1, que comprende además las operaciones de incubar dicho cDNA anclado de longitud completa, generado en la operación (c), con una combinación de cebadores que comprenden una secuencia de nucleótidos que se corresponde con al menos una porción del citado oligonucleótido de cambio de molde y del citado cebador para la síntesis de cDNA, respectivamente, y una cantidad eficaz de otros reactivos necesarios para llevar la PCR a cabo; siendo la incubación bajo unas condiciones suficientes para que se lleve la PCR a cabo, para generar por ello un cDNA ds de longitud completa.

16. Un método de acuerdo con la Reivindicación 15, en que dichos cebadores son seleccionados del grupo que consiste en las ID. SEC. números 10, 11, 12, 17, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82 y 83.

17. Un método de acuerdo con la Reivindicación 15, que comprende además las operaciones de marcar dicho cDNA ds de longitud completa mediante grupos informadores; poner dicho cDNA ds marcado de longitud completa en contacto con los oligonucleótidos/polinucleótidos definidos que corresponden a un conjunto particular de los genes inmovilizados sobre un soporte sólido, bajo unas condiciones suficientes para permitir la formación de patrones de hibridación sobre las superficies causados por la hibridación entre ciertas secuencias polinucleotídicas del citado cDNA ds marcado de longitud completa y ciertos oligonucleótidos/polinucleótidos definidos inmovilizados; y revelar esos patrones citados mediante la detección de dichos grupos informadores.

18. Un método de acuerdo con la Reivindicación 4, en que dicha transcriptasa inversa posee actividad transferasa terminal.

19. Un método de acuerdo con la Reivindicación 18, en que dicho oligonucleótido de cambio de molde se une al extremo 3' de dicha primera cadena de cDNA de dicho molde de RNA-cDNA.

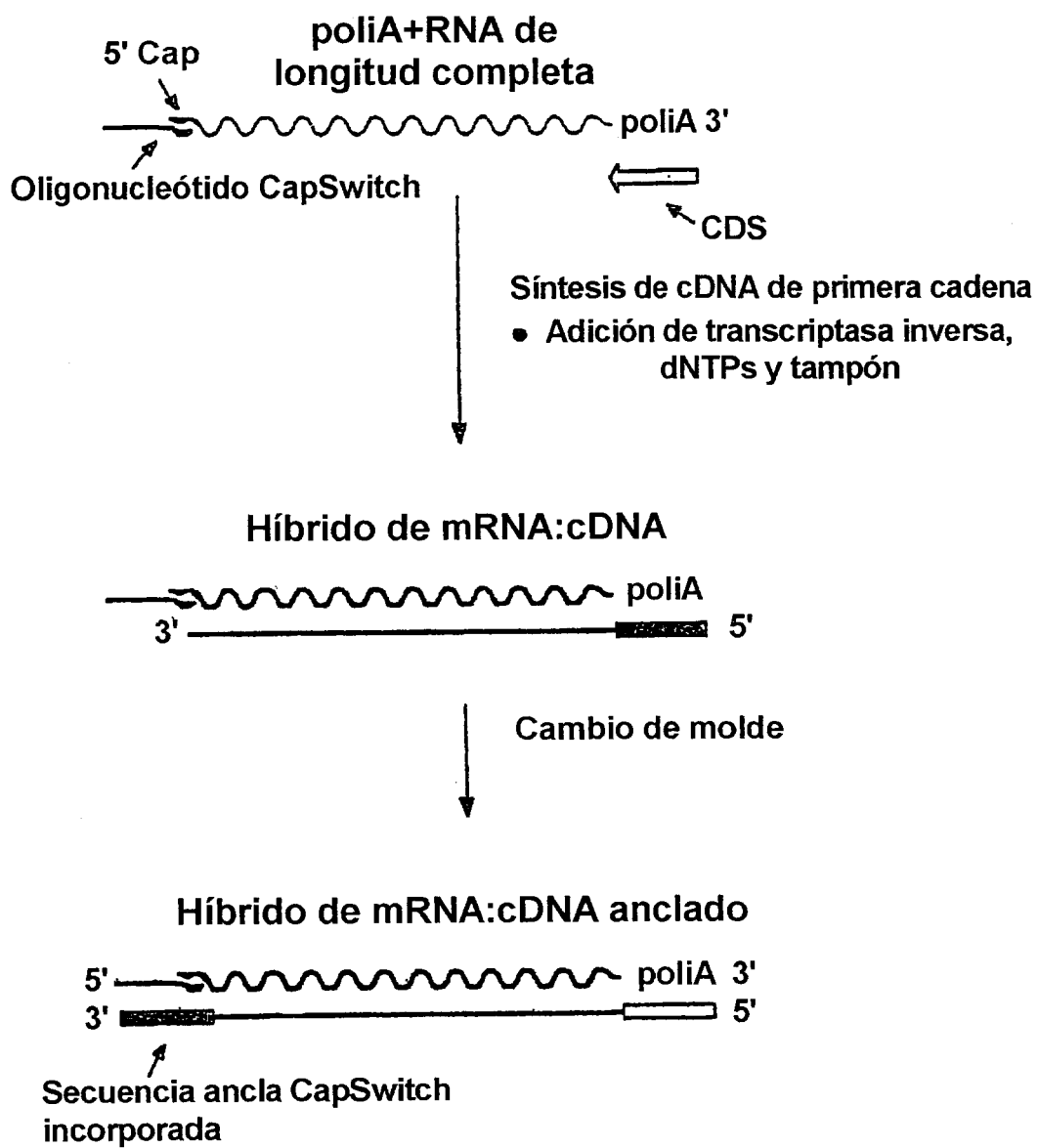


FIG. 1

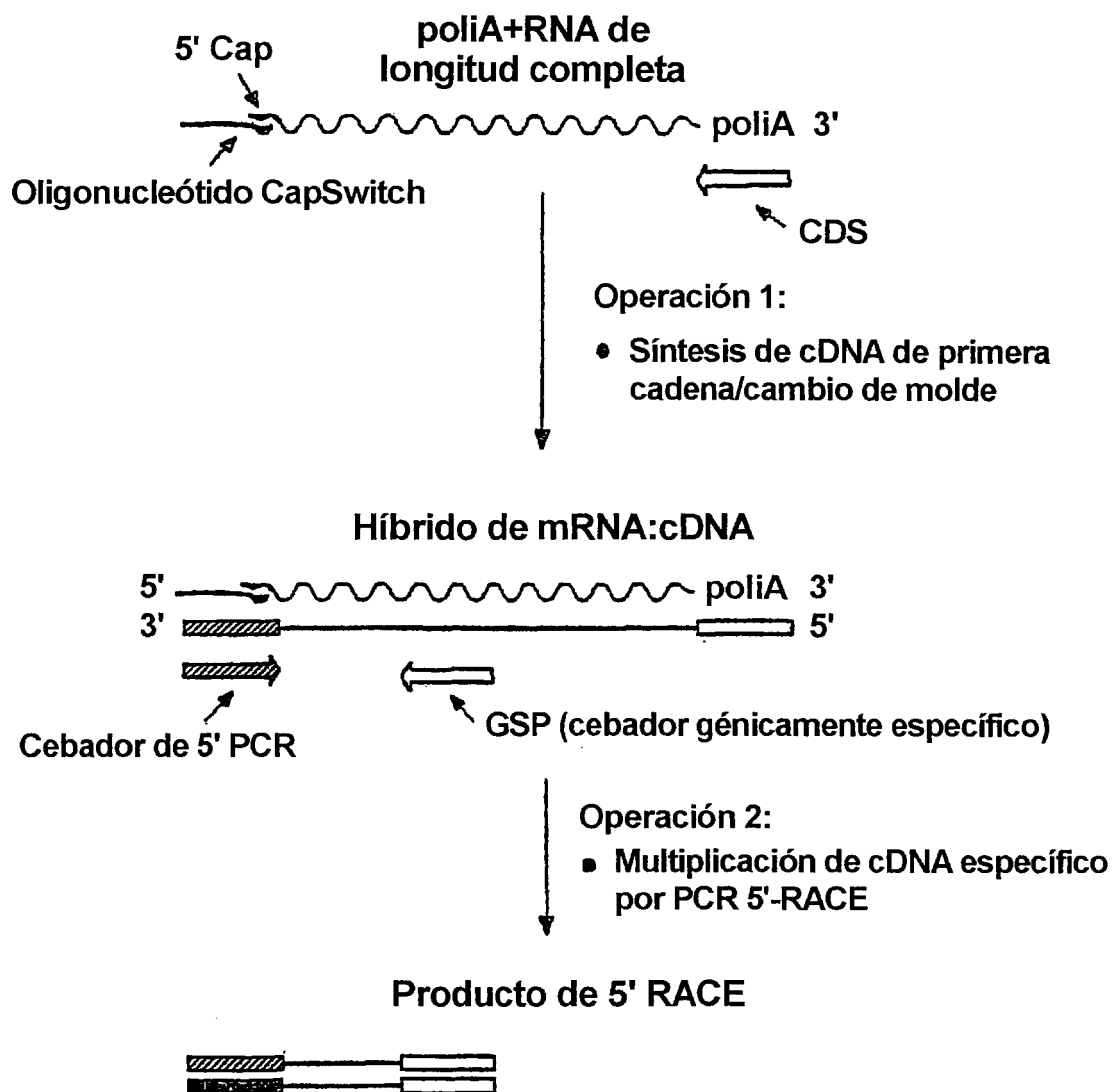


FIG. 2

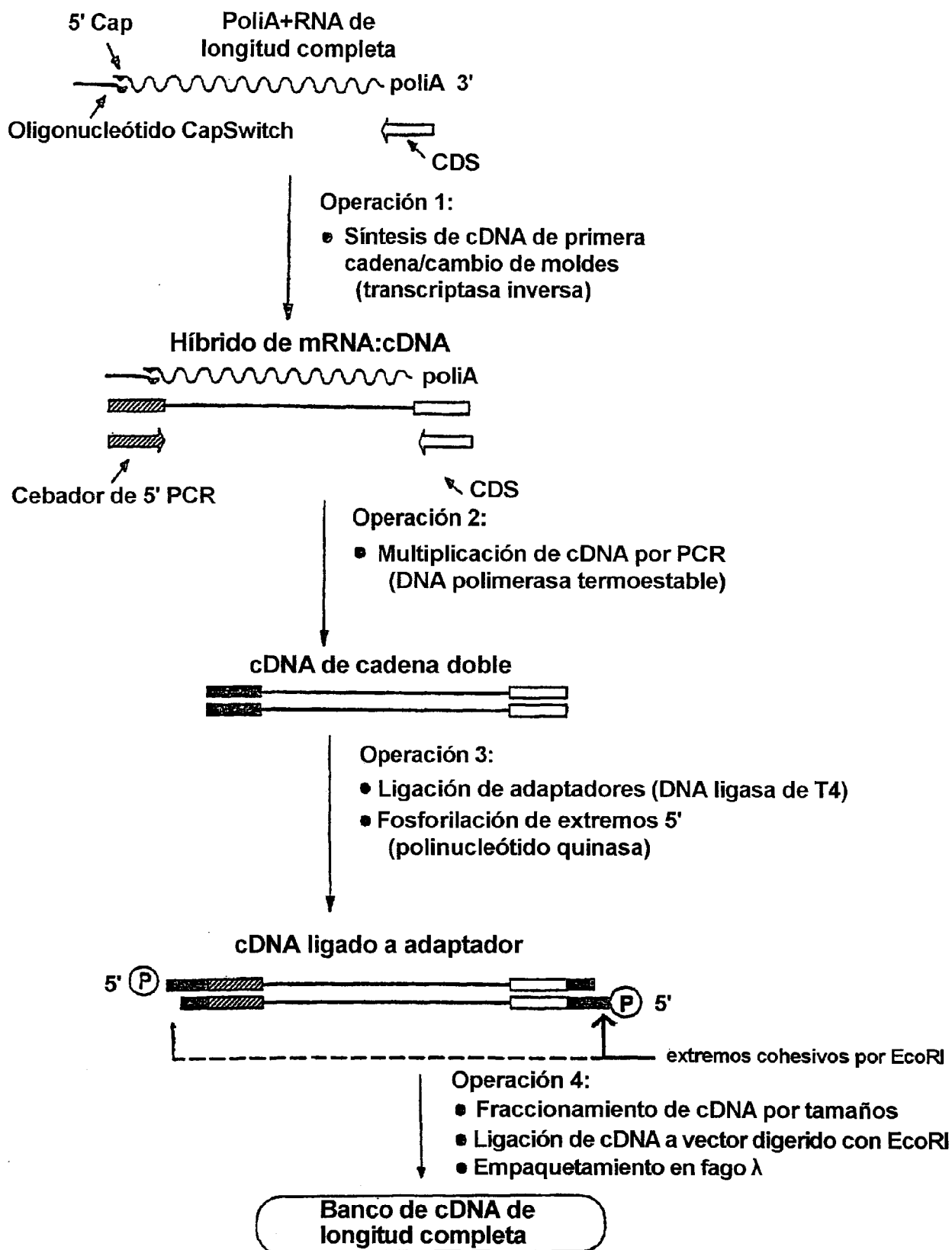


FIG. 3

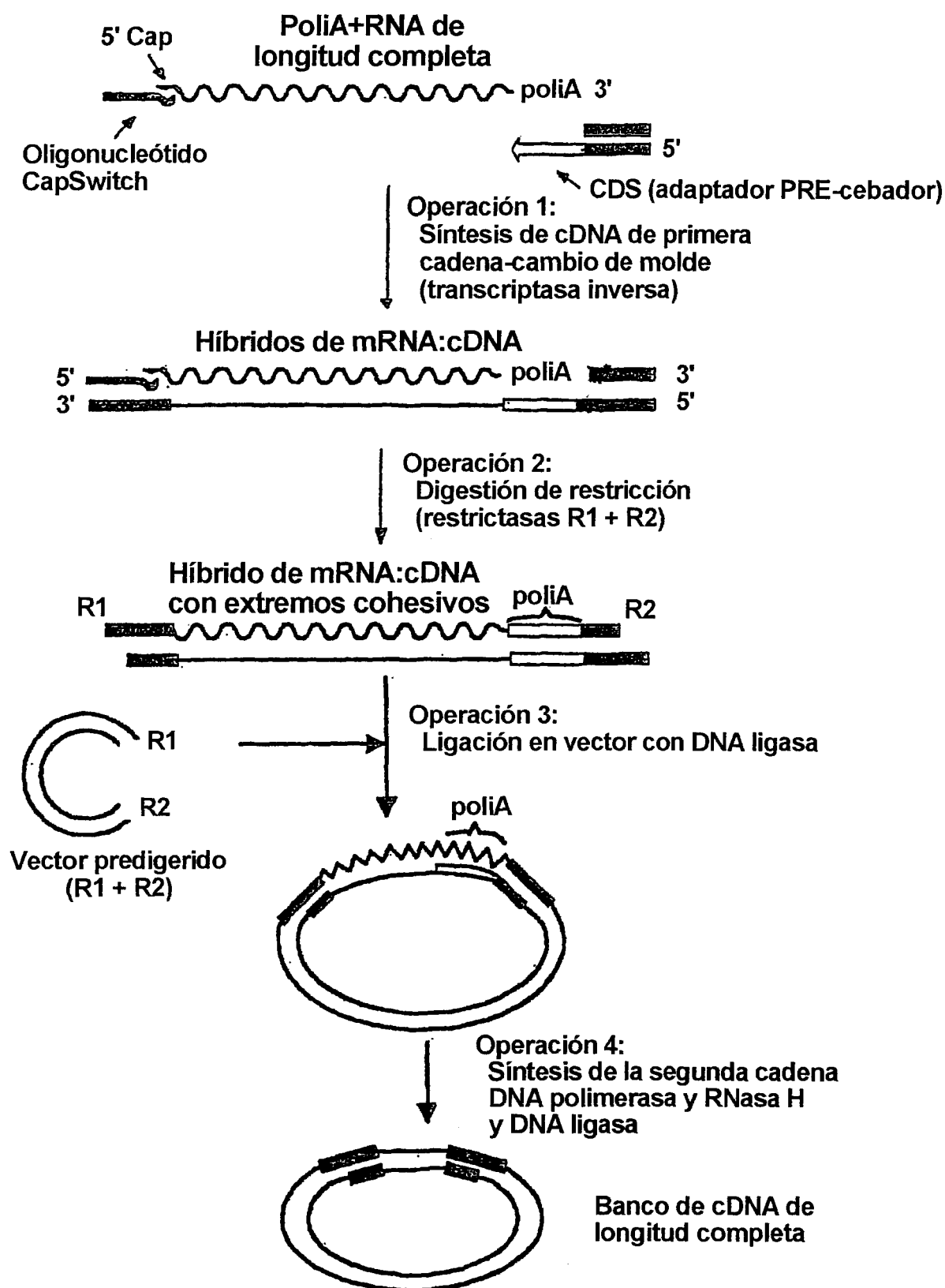


FIG. 4

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

(i) INFORMACIÓN SOBRE EL SOLICITANTE:

Nombre(s) del Solicitante: CLONTECH LABORATORIES, INC.
Dirección; Calle: 1020 East Meadow Circle
Ciudad: Palo Alto
Estado/Provincia: California
País: Estados Unidos
Código postal: 94303
Número de teléfono: (415) 424-8222; Fax: (415) 424-1352

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: MÉTODO PARA CLONACIÓN DE cDNA DE LONGITUD COMPLETA

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 66

(iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:

- (A) DESTINATARIO: Saliwanchik & Saliwanchik
- (B) CALLE: 2421 N. W. 41st. Street, Suite A-1
- (C) CIUDAD: Gainesville
- (D) ESTADO: Florida
- (E) PAÍS: Estados Unidos de América
- (F) CÓDIGO POSTAL: 32606

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENADOR: Compatible con ordenador personal IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn, emisión nº 1.0, versión nº 1.25

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- (C) CLASIFICACIÓN:

(viii) INFORMACIÓN SOBRE EL ABOGADO/AGENTE DE PATENTES:

- (A) NOMBRE: Saliwanchik, David R.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 31,794
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: CL-7

(ix) INFORMACIÓN SOBRE TELECOMUNICACIONES:

- (A) TELÉFONO: (904) 375-8100
- (B) TELEFAX: (904) 372-5800

ES 2 325 044 T3

ID. SEC. nº 1: **CzR1** 5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N)₁₂ - 3'
 ID. SEC. nº 2: **CzR2** 5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA(N)₁₁)r(N)₁ - 3'
 ID. SEC. nº 3: **CzR3** 5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA(N)₁₁) - 3'
 ID. SEC. nº 4: **CzR4** 5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGATG(N)₉)r(N)₁ - 3'
 ID. SEC. nº 5: **Na21-N4** 5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N)₄ - 3'
 ID. SEC. nº 6: **Na21-N8** 5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N)₈ - 3'
 ID. SEC. nº 7: **Na21-N12** 5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N)₁₆ - 3'
 ID. SEC. nº 8: **CDS1:** 5'-d(TCTAGAATTCAGCGGCCGC(T)₃₀VN) - 3'
 (en que V = G o A o C; y N = G o A o T o C)
 ID. SEC. nº 9: **CSO1:** 5'-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGGp)-3'
 (en que p es un grupo 3'-fosfato)
 ID. SEC. nº 10: **ACT1:** 5' -ACTCGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC - 3'
 ID. SEC. nº 11: **TFR1:** 5' - GTCAATGTCCCAAACGTCACCAGAGA - 3'
 ID. SEC. nº 12: **CSP1:** 5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)- 3'
 ID. SEC. nº 13: **CSO2:** 5'-d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 14: **Ad1:** 5' - d(AATTCGCGGCCGCGTCGAC) - 3'
 ID. SEC. nº 15: 3' - d(GCGCCGGCGCAGCTGp) - 5'
 (en que p es un grupo 3'-fosfato)
 ID. SEC. nº 16: **CDS2:** 5'- d(TCTAGAATTCCTCGAGGCGGCCGC(T)₃₀VN) - 3'
 ID. SEC. nº 17: 3'- d(AGATCTTAAGAGCTCCGCCGGCG) - 3'
 (en que V = G o A o C, y N = G o A o T o C)
 ID. SEC. nº 18: **CSO3:** 5'-d(TGCTGCGAGAAGACGACAGAAATTCGG)r(GGG)-3'

Oligonucleótidos CAPswitch adicionales:

	ID. SEC. nº 19:	Na21-G	5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(G) - 3'
5	ID. SEC. nº 20:	Na21-G3	5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GGG) - 3'
	ID. SEC. nº 21:	Na21-N4G3	5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(N ₄ G ₃) - 3'
	ID. SEC. nº 22:	Na21-GCGGCN4G3	5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GCGGCN ₄ G ₃) - 3'
	ID. SEC. nº 23:	Na21-GTAAG3	5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GTAAG ₃) - 3'
	ID. SEC. nº 24:	Na21-GATTG3	5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GATTG ₃) - 3'
10	ID. SEC. nº 25:	Na21-TGTTG3	5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(TGTTG ₃) - 3'
	ID. SEC. nº 26:	Na21-CTAAG3	5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(CTAAG ₃) - 3'
	ID. SEC. nº 27:	Na21-GGTAG3	5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GGTAG ₃) - 3'
	ID. SEC. nº 28:	Na21-G2p	5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GGp) - 3'
	ID. SEC. nº 29:	Na21-G3p	5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GGGp) - 3'
15	ID. SEC. nº 30:	Na21-G5p	5'- d(TGTAGCGTGAAGACGACAGAA)r(GGGGGp) - 3'
	ID. SEC. nº 31:	Na21N-G3	5'- d(TGATGCGAGTAGACGACAGAA)r(GGG) - 3'
	ID. SEC. nº 32:	Na21N-G3p	5'- d(TGATGCGAGTAGACGACAGAA)r(GGGp) - 3'
	ID. SEC. nº 33:	Na21ND-G3p	5'- d(TGATGCGAGTAGACGACAGAA)r(GGGp) - 3'
	ID. SEC. nº 34:	Na21B-G3p	5'- d(TACGATGCGAGTAGACGACAGAA)r(GGGp) - 3'
20	ID. SEC. nº 35:	Na22-G3	5'- d(TGCTGCGAGAAGACGACAGAA)r(GGG) - 3'
	ID. SEC. nº 36:	Na22-G3p	5'- d(TGCTGCGAGAAGACGACAGAA)r(GGGp) - 3'
	ID. SEC. nº 37:	Na22M-G3	5'- d(TTGTCTGGCAGAAAGACGACAGAA)r(GGG) - 3'
	ID. SEC. nº 38:	T7-G	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(G) - 3'
	ID. SEC. nº 39:	T7-G2	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GG) - 3'
25	ID. SEC. nº 40:	T7-G3	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG) - 3'
	ID. SEC. nº 41:	T7-G5	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGGGG) - 3'
	ID. SEC. nº 42:	T7-Gp	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(Gp) - 3'
	ID. SEC. nº 43:	T7-G2p	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGp) - 3'
	ID. SEC. nº 44:	T7-G3p	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGGp) - 3'
	ID. SEC. nº 45:	T7-G5p	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGGGGp) - 3'
30	ID. SEC. nº 46:	T7-GCG	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GCG) - 3'
	ID. SEC. nº 47:	T7-GCG2	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GCGG) - 3'
	ID. SEC. nº 48:	T7-CG	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(CG) - 3'
	ID. SEC. nº 49:	T7-DG	5'- d(CTAATACGACTCACTATA)r(GGGCG) - 3'
	ID. SEC. nº 50:	T7-N9G3	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(N ₉ GGG) - 3'
35	ID. SEC. nº 51:	T7-GCG3	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GCGGG) - 3'
	ID. SEC. nº 52:	T7-SUP1	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGCGCGCGCCCGCCCGG)r(GCG3) - 3'
	ID. SEC. nº 53:	T7-SUP2	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGGTGGTCGACGGCCCGG)r(GCG3) - 3'
	ID. SEC. nº 54:	T7-G3-NH2	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG-NH ₂) - 3'
	ID. SEC. nº 55:	T7-G3-BIO	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG-BIO) - 3'
40	ID. SEC. nº 56:	T7-G3-GLY	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG-GLY) - 3'
(en que NH2, BIO y GLY son, respectivamente, un grupo amino, biotina y glicerol en la posición 3' del resto de ribosa)			
	ID. SEC. nº 57:	T7-GAG3p	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GAGGGp) - 3'
45	ID. SEC. nº 58:	T7-GTG3p	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GTGGGp) - 3'
	ID. SEC. nº 59:	T7-GGAG2p	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGAGGp) - 3'
	ID. SEC. nº 60:	T7-GGTG2p	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GGTGGp) - 3'
	ID. SEC. nº 61:	T7-GACG2p	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GACGGp) - 3'
	ID. SEC. nº 62:	T7-GATG2p	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GATGGp) - 3'
	ID. SEC. nº 63:	T7-GTTG2p	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GTTGGp) - 3'
50	ID. SEC. nº 64:	T7-GAGTGp	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GAGTGp) - 3'
	ID. SEC. nº 65:	T7M-GGAG3p	5'- d(TCCTAATACGACTCACTATA)r(GGAGGGp) - 3'
	ID. SEC. nº 66:	T7-GAG3p	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC)r(GAGGGp) - 3'
55	ID. SEC. nº 67:	CDS3	5'- d(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTAC(T) ₃₀) - 3'
	ID. SEC. nº 68:	Na1smG3	5'- d(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGC)r(GGG) - 3'
	ID. SEC. nº 69:	Na1sm	5'- d(AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT) - 3'
60	ID. SEC. nº 70:	Na21-Bio	5'- d(Bio-TGTAGCGTGAAGACGACAGAA) - 3'
	ID. SEC. nº 71:	T7N	5'- d(CTAATACGACTCACTATAGGGC) - 3'
	ID. SEC. nº 72:	EXT7	5'- d(TGCCATCCTAATACGACTCACTA) - 3'
	ID. SEC. nº 73:	T7MFok	5'- d(CTAATACGACTCACGGATGGGC) - 3'
65			

ID. SEC. nº 74: Na21N 5'-d(TGATGCGAGTAGACGACAGAA)-3'
 ID. SEC. nº 75: Na22 5'-d(TGCTGCGAGAAGACGACAGAA)-3'
 ID. SEC. nº 76: Na22M 5'-d(TTGCTGGCAGAAGACGACAGA)-3'
 ID. SEC. nº 77: Na21B 5'-d(TACGATGCGAGTAGACGACAGAA)-3'
 ID. SEC. nº 78: Fr1 5'-d(TGACCAGTGAGCAGAGTGACGA)-3'
 ID. SEC. nº 79: T3 5'-d(CCATCCAATTAACCTCACTAAAGGGC)-3'
 ID. SEC. nº 80: Na1M 5'-d(AAGCAGAGGCAACAACGCAGA)-3'
 ID. SEC. nº 81: T7M2 5'-d(ACAAGACGAAGCACAAGAGGGC)-3'
 ID. SEC. nº 82: Na1M 5'-d(AAGCAGAGGCAACAACGCAGA)-3'
 ID. SEC. nº 83: T7T 5'-d(TTCCGCTTGTCTGCTGGGC)-3'
 ID. SEC. nº 84: RT7AS4 5'-d(CGTGCGGCCGCTTCGAG-NH₂)-3'
 ID. SEC. nº 85: 3BPAS 5'-d(GAGCGGCCGACAG-NH₂)-3'
 ID. SEC. nº 86: RT7-G3 5'-r(CTAATACGACTCACTATAGGGCGGG)-3'
 ID. SEC. nº 87: RT7Fok-G3 5'-r(CTAATACGACTCACTATAGGGCGGGATGGG)-3'
 ID. SEC. nº 88: RT7In3 5'-r(CTAATACGACTCACTATAGGGC)d(III)-3'
 ID. SEC. nº 89: RT7Un3 5'-r(CTAATACGACTCACTATAGGGC)d(UUU)-3' (en que I y U son
 fosfato de inosina y de desoxirribofuranosil-5-nitroindol, respectivamente);
 ID. SEC. nº 90: Na1Sup2M 5'-(AAGCAGAGGCAACAACGCAGAGAGGGCAGCAGGCAGC)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 91: RT7NS2M
 5'-(AGACGAAGCACAAGAGGGCAGCAGCGGCCGACGGCG)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 92: RT7NSM-F 5'-(ATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGACGGCG)r(GGG-F)-3'
 (en que F es un grupo fluoro en la posición 3' del resto de ribosa);
 ID. SEC. nº 93: Na1SMG3-F 5'-(AAGCAGAGTGCTAACCAACGCAGAGTACGC)r(GGG-F)-3'
 ID. SEC. nº 94: T7-G3F 5'-(ATACGACTCACTATAGGGC)r(GGG-F)-3'
 ID. SEC. nº 95: T7-GCG3F 5'-(ATACGACTCACTATAGGGC)r(GCGGG-F)-3'
 ID. SEC. nº 96: T3-G3 5'-(ATTAACCTCACTAAAGGGC)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 97: T3-NSM
 5'-(ATTAACCTCACTAAAGGGCTCGAGCGGCCGACGGCG)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 98: Na1SM-GCG3 5'-d(AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC)r(GCGGG)-3'
 ID. SEC. nº 99: Na1-GCG3 5'-d(AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT)r(GCGGG)-3'
 ID. SEC. nº 100: Na1Sup1 5'-d(AAGCAGTGGTAAACAACGCAGAGTGGGCAGCAGGCA)r(GCGGG)-3'
 ID. SEC. nº 101: Na1M-G3 5'-d(AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGC)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 102: Na1SMG3 5'-(AAGCAGTGGTAAACAACGCAGAGTACGC)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 103: Na1Sup1M 5'-d(AAGCAGTGGTAAACAACGCAGAGTGGGCAGCAGCCAGC)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 104: RT7NSM 5'-d(ATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGACGGCG)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 105: RT7NS2
 5'-d(ATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGCG)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 106: RT7Sup4
 5'-d(ATACGACTCACTATAGGGCTCGGTCCGGCAGGCACGGCG)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 107: 3BP-NSMT
 5'-d(TTCCGCTTGTCTGCTGGGCTCGTGCGGCCGCTCGGCG)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 108: RT7-NS3M
 5'-d(AGACGAAGCACAAGAGGGCAGCAGCGGCCGACGGCG)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 109: Fr-T30NN 5'-d(TGACCAGTGAGCAGAGTGACGAGTAC(T)₃₀VN)-3'
 ID. SEC. nº 110: T7-T30NN 5'-d(CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC(T)₃₀VN)-3'
 ID. SEC. nº 111: Bio-T7-T30NN 5'-d(Bio-AATACGACTCACTATAGGGC(T)₃₀VN)-3'
 ID. SEC. nº 112: 5'-d(TGCTGCGGAAGACGACAGAA)r(GGG)-3'
 ID. SEC. nº 113: 5'-d(TGCTGCGGAAGACGACAGAA)-3'
 ID. SEC. nº 114: 5'-d(AATTCGAGCGGCCGC(T)₃₀VN)-3'
 (en que V = A, G o C; y en que N = A, G, C o T).