



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 314 093**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02765682 .6**

96 Fecha de presentación : **19.09.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1448793**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

54 Título: **Cebador para el control de la reasociación y sus usos.**

30 Prioridad: **08.12.2001 WO PCT/KR01/02133**
01.05.2002 WO PCT/KR02/00816

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2009

73 Titular/es: **Seegene, Inc.**
2th Fl., Myungji Bldg.
142-21, Samsung-dong, Kangnam-gu
135-090 Seoul, KR

72 Inventor/es: **Chun, Jong-Yoon**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 314 093 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

Cebador para el control de la reasociación y sus usos.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un cebador para el control de la reasociación y a sus aplicaciones. Más particularmente, la presente invención se refiere a un cebador para el control de la reasociación para mejorar la especificidad de la reasociación en la amplificación de ácidos nucleicos y sus aplicaciones a todos los sectores de la tecnología implicada en la amplificación de ácidos nucleicos.

Descripción de la técnica relacionada

La amplificación de ácidos nucleicos es un procedimiento crucial para una amplia diversidad de métodos en biología molecular, de manera que se han propuesto diversos métodos de amplificación. Por ejemplo, Miller, H.I. *et al.* (documento WO 89/06700) describen una amplificación de las secuencias de ácidos nucleicos basada en la hibridación de una secuencia de promotor/cebador a un ADN de cadena sencilla ("ssDNA" - siglas en inglés) diana, seguido de la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Otros procesos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos incluyen sistemas de amplificación basados en la transcripción (Kwoh, D. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:1173 (1989); y Gingeras, T.R. *et al.*, documento WO 88/10315).

También son conocidos sistemas basados en el ligamiento de dos o más oligonucleótidos en presencia de ácidos nucleicos que tienen la secuencia del "di-oligonucleótido" resultante, amplificando con ello el di-oligonucleótido (Wu, D.Y. *et al.*, *Genomics* 4:560 (1989)), que se denominan "Reacción en Cadena por Ligamiento" (LCR - siglas en inglés).

Davey, C. *et al.* (solicitud de patente europea, n° de publicación 329.822) describen un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos, que implica sintetizar cíclicamente ARN de cadena sencilla ("ssRNA" - siglas en inglés), ssDNA y ADN de doble cadena (dsDNA - siglas en inglés). El ssRNA es un primer molde para un primer oligonucleótido, el cual es alargado por transcriptasa inversa (ADN polimerasa ARN-dependiente). Luego, el ARN se separa del dúplex ADN-ARN resultante mediante la acción de ribonucleasa H. El ssDNA resultante es un segundo molde para un segundo cebador, el cual incluye también las secuencias de un promotor de ARN polimerasa. Este cebador se extiende luego mediante ADN polimerasa, dando como resultado una molécula de ADN de doble cadena ("dsDNA"), que tiene una secuencia idéntica a la del ARN original entre los cebadores y que tiene, adicionalmente, en un extremo, una secuencia del promotor. Esta secuencia del promotor se puede utilizar mediante la apropiada ARN polimerasa para producir muchas copias de ARN del ADN. Estas copias pueden volver a entrar en el ciclo, conduciendo a una amplificación muy rápida.

El procedimiento, más predominante, para la amplificación de ácidos nucleicos, conocido como reacción en cadena de la polimerasa (a la que se alude en lo que sigue como una "PCR" - siglas en inglés), se basa en ciclos repetidos de desnaturalización de ADN de doble cadena, seguido de una reasociación del cebador de oligonucleótidos al molde de ADN, y la extensión del cebador mediante una ADN polimerasa (Mullis *et al.*, pat. de EE.UU. n°s 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159; Saiki *et al.*, 1985). Los cebadores de oligonucleótidos utilizados en la PCR están diseñados para reasociarse a cadenas opuestas del ADN, y están situados de manera que el producto de extensión, catalizado por la ADN polimerasa, puede servir como la cadena del molde para el otro cebador. El procedimiento de amplificación por PCR da como resultado un incremento exponencial de fragmentos discretos de ADN, cuya longitud está definido por los extremos 5' de los cebadores de oligonucleótidos.

El éxito en las amplificaciones de ácidos nucleicos, en particular la amplificación por PCR, depende de la especificidad con la que un cebador se reasocia solamente a sus secuencias diana (y no diana) y, por lo tanto, es importante para optimizar esta interacción molecular. El que un cebador se pueda reasociar solamente a su complemento perfecto o también a secuencias que tiene uno o más desapareamientos depende, críticamente, de la temperatura de reasociación. En general, cuanto más alta sea la temperatura de reasociación, se podrá lograr una reasociación más específica del cebador a su molde perfectamente apareado y, así, a una mayor probabilidad de sólo una amplificación de la secuencia diana. Cuanto más baja sea la temperatura, se podrán tolerar más desapareamientos entre el molde y el cebador, conduciendo a una amplificación incrementada de secuencias no diana. El ajuste de la temperatura de reasociación puede alterar la especificidad del apareamiento entre el molde y el cebador. Por ejemplo, si no existe producto, la temperatura puede ser demasiado alta y se puede disminuir. Si existen bajo control productos en los que sólo está presente un cebador, esto indica que el cebador sencillo se está reasociando a más de una región del molde. En este caso, debería aumentarse la temperatura de reasociación. Al considerar un efecto de este tipo de la temperatura de reasociación sobre la especificidad de reasociación del cebador, sigue existiendo una fuerte necesidad de un sistema de un cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la temperatura de reasociación para reforzar la especificidad de reasociación del cebador, independientemente del diseño del cebador.

Además de la temperatura de reasociación, se deberían considerar varios "parámetros de búsqueda del cebador", tales como la longitud del cebador, contenido GC (guanina y citosina) y longitud del producto de la PCR (Dieffenbach *et al.*, 1995), para la especificidad de reasociación del cebador. Si se empleaba un cebador, el cual satisface todos

los parámetros, se especificaría la reasociación del cebador, dando como resultado un refuerzo significativo de la especificidad de reasociación del cebador durante la amplificación del ADN diana y la ausencia de problemas, tales como antecedentes y productos no específicos que surgen de cebadores utilizados en los experimentos. Es usual que cebadores bien diseñados pueden ayudar a evitar una reasociación no específica y antecedentes, así como distinguir

entre ADNcs o moldes genómicos en ARN-PCR.

Se han desarrollado muchas propuestas para mejorar la especificidad de reasociación del cebador y, por lo tanto, logran la amplificación del producto deseado. Ejemplos son “touchdown” PCR (programa de termociclación aplicado a la PCR) (Don *et al.*, 1991), comienzo caliente PCR (D’Aquila *et al.*, 1991), PCR anidada (Mullis y Faloona, 1987) y PCR descontaminante (Ruano *et al.*, 1989). También se informado por otras propuestas alternativas que diversos compuestos “reforzadores” pueden mejorar la especificidad de la PCR. Los compuestos reforzadores incluyen productos químicos que incrementan la temperatura de reasociación efectiva de la reacción, proteínas de unión a ADN y reactivos comercialmente disponibles. Sin embargo, no existe aditivo “mágico” alguno que asegure el éxito en cada PCR, y es muy tedioso testar diferentes aditivos bajo diferentes condiciones tales como temperatura de reasociación. A pesar de que estas propuestas han contribuido a la mejora de la especificidad para la reasociación del cebador en algunos casos, no han accedido fundamentalmente a una solución del problema que surge de cebadores utilizados en la amplificación por PCR, tales como productos no específicos y antecedentes elevados.

En muchos casos, la secuencia del cebador no necesita ser un complemento perfecto para la secuencia del molde. La región del cebador que debería ser perfectamente apareada al molde es el extremo 3’, ya que este extremo es la región del cebador extendido por la ADN polimerasa y, por lo tanto, es el más importante para asegurar la especificidad de la reasociación a la secuencia diana correcta. El extremo 5’ del cebador es menos importante para determinar la especificidad de la reasociación a la secuencia diana y se puede modificar para que lleve una secuencia adicional, tales como sitios de restricción y secuencias de promotor que no son complementarios al molde (McPherson y Moller, 2000). Esta noción está adaptada al diseño de los cebadores para el control de la reasociación de esta invención, según se describe más abajo.

Se han utilizado ampliamente técnicas basadas en la PCR, no sólo para la amplificación de una secuencia de ADN diana, sino también para aplicaciones o métodos científicos en los sectores de búsqueda biológica y médica tales como PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR - siglas en inglés), PCR de expresión diferencial) DD-PCR - siglas en inglés), clonación por PCR de genes conocidos o desconocidos, amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE - siglas en inglés) y análisis genómico basado en PCR (McPherson y Moller, 2000). Lo que sigue son solamente aplicaciones de la PCR.

Técnicas diseñadas para identificar genes que son regulados diferencialmente por parte de células bajo diversas condiciones fisiológicas o experimentales (por ejemplo, diferenciación, carcinogénesis, tratamiento farmacológico) se han convertido cruciales en la biología moderna. Un método de este tipo para el rastreo de diferencias en la expresión de genes entre diversos tipos de células o entre diferentes fases del desarrollo de las células con la disponibilidad de PCR se conoce como PCR de expresión diferencial (DD-PCR), descrita por Liang y Pardee en 1992. Este método utiliza combinaciones de cebadores 10-meros arbitrarios con cebadores de ADNc anclados y genera fragmentos cuyo origen es principalmente de la cola poli(A) y se extienden aproximadamente 50-600 nucleótidos situados más arriba. Al combinar cebadores oligo(dT) anclados en 3’ y cebadores arbitrarios cortos en 5’, se amplifican los subconjuntos del transcriptoma, los fragmentos de ADNc resultantes se separan generalmente sobre gel de poliacrilamida desnaturizante y se visualiza por autorradiografía.

A pesar de que este método es sencillo y rápido y sólo requiere pequeñas cantidades de ARN total, existe un cierto número de desventajas en los métodos de DD-PCR convencionales. Los modelos de bandeo diferencial son, a menudo, deficientemente reproducibles debido al uso de cebador arbitrario corto, de manera que muchos laboratorios han tenido dificultades para obtener resultados reproducibles con estos métodos. Se ha demostrado que al menos el 40% de las bandas expresadas diferencialmente no es reproducible entre experimentos, incluso en manos bien entrenadas (Bauer *et al.*, 1994). Además, el modelo de expresión diferencial no puede, a menudo, ser reproducible en borrones Northern, y el porcentaje de estos falsos positivos puede elevarse hasta el 99% (Sompayrac *et al.*, 1995). Como una modificación utilizada para un alternativa, el uso de cebadores aleatorios más largos, p. ej. de 20 bases de longitud, no resuelve satisfactoriamente el problema de la reproducibilidad (Ito *et al.*, 1994). Existen otros factores responsables de la reproducibilidad, relativamente baja, de DD-PCR, tal como una cantidad insuficiente de material de partida y una concentración muy baja de dNTP (2-5 μ M), empleado para preparar los diferentes modelos de bandeo (Matz y Lukyanow, 1998). También es difícil detectar transcritos raros con estos métodos (Matz y Lukyanow, 1998). Además, debido a que los fragmentos de ADNc obtenidos por DD-PCR son cortos (típicamente 100-500 pb) y corresponden al extremo 3’ del gen que representa principalmente la región 3’ no traducida, habitualmente no contienen una porción grande en la región codificadora. Por lo tanto, se necesita el complejo rastreo de ADNc de longitud completa, a menos que se obtenga una homología significativa de secuencias, información sobre la clasificación de genes y la predicción de la función (Matz y Lukyanow, 1998).

Los métodos de *expresión diferencial* utilizan, generalmente, técnicas de detección radiactivas, utilizando geles de poliacrilamida desnaturizantes. La detección radiactiva de los productos de reacción limita el uso de esta técnica a laboratorios con el equipo apropiado. Tiempos de exposición relativamente largos y problemas con el aislamiento de bandas interesantes de los geles de poliacrilamida son inconvenientes adicionales de la técnica de *expresión diferencial*. A pesar de que recientemente se han descrito métodos de *expresión diferencial* no radiactivos modificados, que

incluyen la tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997), el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996) y geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Rompf y Kahl, 1997; Jefferies *et al.*, 1998; Gromova *et al.*, 1999), estos métodos han tenido sólo un éxito limitado. Si los productos de reacción podrían ser simplemente detectados sobre gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y los resultados eran reproducibles y fiables, aumentarían grandemente la velocidad del análisis por DD-PCR y evitarían el uso de la radiactividad.

Otra propuesta basada en PCR, denominada expresión diferencial fijada como objetivo utiliza un cebador de oligonucleótidos que dirige la amplificación de miembros de la familia de multigenes con dominios de proteínas conservados. Las familias de genes son grupos de genes que, a menudo, se caracterizan funcionalmente por un tipo particular de función asumida por los productos génicos en una célula y que estructuralmente tienen una o más regiones conservadas (dominios) en común. Ejemplos de familias de genes incluyen la caja MADS y la familia homogénea, así como familias de factores de transcripción adicionales. Las familias de genes de ciclina, citoquina y globina son ejemplos de interés médico. La Base de datos Prosite proporciona una lista de proteínas que tienen dominios y motivos de secuencias en común. El oligonucleótido utilizado en la PCR puede ser un cebador específico que se utiliza a una temperatura de reasociación baja o, como es más a menudo el caso, una mezcla de cebadores degenerada para uso a rigurosidades mayores (Stone y Wharton, 1994). Sin embargo, las amplificaciones utilizando cebadores degenerados pueden ser, a veces, problemáticas y pueden requerir una optimización. Es importante mantener la temperatura de reasociación lo más elevada posible para evitar una amplificación extensiva no específica, y una buena regla general es utilizar una temperatura de partida de 55°C. En general, es difícil mantener esta regla, ya que cebadores degenerados deberían diseñarse sobre la base de secuencias de aminoácidos o secuencias de dominio conservado en calidad de una condición previa. Con el fin de generar una relación satisfactoria entre cebador degenerado y temperaturas de reasociación en esta propuesta, se requiere utilizar un cebador para el control de la reasociación que pueda tolerar la alternancia de temperatura de reasociación, en particular una temperatura particularmente elevada, tal como 68°C, independientemente del diseño del cebador.

Todavía otra técnica basada en PCR es PCR cebada arbitrariamente (AP-PCR - siglas en inglés) para la huella de ARN. Una gran solidez de métodos de AP-PCR es su simplicidad (Welsh y McClelland, 1991; Williams *et al.*, 1990). La AP-PCR utiliza un cebador sencillo o un par de cebadores, en donde los cebadores son 10-meros ó 18-meros en calidad de cebador más largo. Este método se ha utilizado previamente para proporcionar huellas de ADN de líneas de células híbridas (Ledbetter *et al.*, 1990) y regiones genómicas particulares (Welsh y McClelland, 1991; Williams *et al.*, 1990). Proporciona una herramienta muy útil para el análisis del genoma en bacterias, hongos y estudios de identificación y de población de plantas, en que los materiales aislados individuales se pueden comparar rápidamente. Por ejemplo, se pueden utilizar en forma de una herramienta para identificar organismos patógenos o la aparición de cepas particulares o patotipos. Comúnmente, la AP-PCR utiliza un cebador sencillo para iniciar la síntesis de ADN de regiones de un molde, en que el cebador se aparea de modo imperfecto. Con el fin de que esto funcione, los ciclos iniciales se han de realizar a baja rigurosidad (37-50°C), normalmente para los primeros cinco ciclos, lo que permite una reasociación del cebador a sitios imperfectos a lo largo del genoma. Luego se incrementa la rigurosidad (55°C) como para la amplificación estándar por PCR y se deja que la reacción prosiga durante 30-35 ciclos adicionales. La AP-PCR no se recomienda para uso en aplicaciones tales como prueba de paternidad en que se demandan resultados inequívocos, ya que se producen ocasionalmente productos no parentales. A pesar de que se han desarrollado propuestas de AP-PCR alternativas, incluida la AP-PCR anidada, (McClelland *et al.*, 1993; Ralph *et al.*, 1993), sigue siendo de principal preocupación el tema de la reproducibilidad. Una preocupación es que el modelo puede variar de día a día o de laboratorio a laboratorio (véase, p. ej., Meunier y Grimont, 1993).

Todavía otra aplicación basada en PCR es la tecnología RACE (amplificación rápida del extremo de ADNc - siglas en inglés). RACE es un proceso para la amplificación de regiones de ADNc que corresponden al extremo 5' ó 3' de ARNm (Frohman *et al.*, 1988) y se ha utilizado para aislar con éxito transcritos raros. El cebador específico para genes se puede derivar de datos de la secuencia de un ADNc parcial, exón genómico o péptido. En 3' RACE, la cola poliA de moléculas de ARNm se explota como un sitio de cebado para la amplificación por PCR. Los ARNms se convierten en ADNcs utilizando transcriptasa inversa y un cebador oligo-dT, tal como se conoce en la técnica. Los ADNcs generados se pueden luego amplificar directamente por PCR utilizando un cebador específico para genes y un cebador que se reasocia a la región poliA.

El mismo principio que 3' RACE se aplica al 5' RACE, pero no existe la cola poliA. Así, 5' RACE se prepara marcando el extremo 5' de un ADNc por medio de métodos diferentes (Fromont-Racine *et al.*, 1993; Schaefer, 1995; Franz *et al.*, 1999). La mayoría de las propuestas para la 5' RACE, tales como adición de cola homopolímera y adición de cola anclada por ligamiento requieren un conjunto de reacciones enzimáticas después de la compleción de la síntesis de ADNc de la primera cadena (Schaefer, 1995). Cada etapa enzimática tiene el potencial de introducir fallos y de destruir la integridad del ADNc. Recientemente, se ha introducido una alternativa, la denominada propuesta CapFinder (Chenchik *et al.*, 1998; Chenchik *et al.* pat. de EE.UU. n°s 5.962.271 y 5.962.272). La técnica se basa en funciones duales de las transcriptasas inversas: una es la actividad de transferasa terminal para añadir nucleótidos sin molde al extremo 3' de un ADNc y la otra es la actividad de conexión del molde para conmutar un molde a un segundo molde. Esta propiedad se utiliza durante el ciclo vital del retrovirus (Clark, 1988; Kulpa *et al.*, 1997). La transcriptasa inversa (RT - siglas en inglés) del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV) añade, a menudo, tres a cuatro residuos de citosina derivados de no molde al extremo 3' de ADNcs recientemente sintetizados en presencia de magnesio o alto contenido en magnesio (Schmidt y Moeller, 1999). Esta propuesta permite la amplificación de ADNcs de longitud

completa, ya que la RT de M-MLV añade residuos C preferentemente al ADNc si ARNm completo (con casquetes) sirve como molde.

Sin embargo, la propuesta CapFinder para los experimentos 5' RACE no podía estar exenta de problemas de antecedente, tal como la difusión de ADN que surge de la contaminación del CapFinder y los cebadores oligo-dT, que se utilizan en la síntesis de ADNc (Chenchik *et al.*, 1998). Incluso cantidades residuales de estos cebadores dan como resultado un antecedente alto, ya que, de manera ideal, ambos encajan en todos los ADNcs presentes en la mezcla de reacción. Además, 3'-RACE y la amplificación del ADNc de longitud completa tienen los mismos problemas de fondo debido a la contaminación de cebadores utilizados para la síntesis de ADNc en la cual generan productos no específicos en la reacción PCR (Chenchik *et al.*, 1998). Se han introducido recientemente nuevas propuestas para superar los problemas anteriores. Una propuesta es la PCR de eliminación (step-out PCR) para suprimir productos de PCR indeseados (Matz *et al.*, 1999), pero se ha indicado que esta propuesta sigue dejando una mancha de ADN más que un ADN sencillo (Schramm *et al.*, 2000). Otra propuesta que se ha introducido más recientemente es utilizar la síntesis de ADNc en fase sólida y procesos para separar todos los contaminantes utilizados en la síntesis de ADNc (Schramm *et al.*, 2000), pero el inconveniente principal de esta técnica es que es costosa y larga al requerir la síntesis de ADNc en fase sólida y procesos ulteriores. Por lo tanto, se requieren estrategias más eficaces, simples, rápidas y no costosas para eliminar por completo los problemas que surgen de la contaminación de los cebadores, tales como el cebador oligo-dT o CapFinder utilizados para la síntesis de ADNc.

Además de las tecnologías RACE, en las actuales tecnologías para la construcción de genotecas de ADNc, los extremos 5' de los genes tienden a estar sub-representados en poblaciones de ADNc, en especial en los casos en los que se utiliza un cebador poli(dT) durante la síntesis de la primera cadena del ADNc y se limita el material de partida. A pesar de que se ha desarrollado un cierto número de diferentes propuestas para superar este problema, la mayoría adolecen de limitaciones comunes que producen ADNcs de longitud completa o ADNcs enriquecidos en 5' con un cierto número de problemas inherentes. Estas propuestas son complejas o costosas y largas al requerir múltiples etapas enzimáticas y/o no son pronunciadamente sensibles (Carninci, *et al.*, 1997; Suzuki *et al.*, 1997; Guegler *et al.*, pat. de EE.UU. n°s 6.083.727 y 6.326.175; Hayashizaki, pat. de EE.UU. n° 6.143.528). Por lo tanto, existe un interés continuo en el desarrollo de métodos mejorados para generar ADNcs de longitud completa o enriquecidos en 5', en particular con el material de partida limitado.

La PCR multiplex es otra variante de PCR, en la cual se puede amplificar simultáneamente más de una secuencia diana con más de un par de cebadores en la misma reacción. Desde su primera descripción en 1988 (Chamberlain *et al.*, 1988), este método ha sido aplicado con éxito en muchos sectores del testado de ADN, incluidos análisis de la delección de genes (Anónimo, 1992; Henegaria, *et al.*, 1994), análisis de mutaciones y polimorfismos (Shuber *et al.*, 1993; Mutirangura, *et al.*, 1993), análisis cuantitativo (Zimmermann *et al.*, 1996) y detección de ARN (Zou *et al.*, 1998). En el campo de las enfermedades infecciosas, la técnica ha demostrado ser un método valioso para la identificación de virus, bacterias, hongos y/o parásitos.

Sin embargo, los resultados obtenidos con una PCR multiplex se ven, frecuentemente, complicados por los artefactos del proceso de amplificación. Éstos incluyen resultados "falsos-negativos" debidos al fallo de la reacción y resultados "falsos-positivos", tales como la amplificación de productos falsos, que puede ser provocada por la reasociación de los cebadores a secuencias que están relacionadas, pero que son distintas de las secuencias de reconocimiento verdaderas. Para uso en la PCR multiplex, debería diseñarse un cebador de manera que sus cinéticas de hibridación predichas son similares a los de otros cebadores utilizados en la reacción multiplex de la muestra. Mientras que la temperatura de reasociación y las concentraciones de los cebadores se pueden calcular en cierta medida, generalmente las condiciones han de determinarse empíricamente para cada reacción multiplex. Dado que la posibilidad del cebado no específico aumenta con cada par de cebadores adicional, las condiciones deben modificarse según sea necesario a medida que se añadan conjuntos individuales de cebadores. Además de ello, los artefactos que resultan de la competencia por los recursos (p. ej. agotamiento de cebadores) aumentan en la PCR multiplex, dado que con cada ciclo aumentan las diferencias en los rendimientos de fragmentos desigualmente amplificados. Así, la optimización de las condiciones de la reacción para la PCR multiplex pueden convertirse en laboriosas y largas. Dado que las diferentes PCRs multiplex pueden tener condiciones de reacción únicas, puede hacerse muy costoso el desarrollo de nuevos tests diagnósticos.

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de cebadores que permitan diseñar y llevar a cabo reacciones PCR multiplex sin elaborar etapas de optimización, independientemente de las propiedades potencialmente divergentes de los diferentes cebadores utilizados. Además, existe la necesidad en la técnica de cebadores que permitan reacciones PCR multiplex que, bajo las mismas condiciones de reacción, producen simultáneamente cantidades equivalentes de cada uno de muchos productos de amplificación.

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs - siglas en inglés), las variaciones genéticas más comunes encontradas en el genoma humano, son importantes marcadores para identificar loci asociados a la enfermedad y para estudios fármaco-genéticos (Landegren *et al.*, 1998; Roses, 2000). SNPs aparecen en el genoma humano con una media de una vez cada 1000 pb y totalizando > 3 millones. Se ha utilizado una diversidad para detectar SNPs. Sin embargo, uno de los cuellos de botella claves es la amplificación de ADN. Ensayos más actuales incluyen una etapa que produce muchas copias de un segmento corto del ADN de muestra que abarca cada SNP diana. Esta amplificación es habitualmente necesaria, ya que a partir de muestras clínicas típicas se pueden recolectar solamente pequeñas cantidades de ADN. También, la amplificación mejora la relación señal-a-ruido de los ensayos, aumentando la fiabilidad de la detección.

La mayoría de las técnicas de detección del genotipo logran esta amplificación utilizando una PCR. De modo más importante, la especificidad de la amplificación por PCR es crítica en la aplicación de la PCR en la detección del genotipo de SNP. Por lo tanto, sería beneficioso que estén disponibles métodos para mejorar la especificidad de la PCR y se apliquen al desarrollo del ensayo para la detección del genotipo de SNP. También sería beneficioso que este tipo de métodos sean capaces de proporcionar análisis múltiples en un solo ensayo (ensayos multiplex).

Tal como se ha descrito antes, todos estos métodos y técnicas que implican la amplificación de ácidos nucleicos, en particular la amplificación por PCR, no podrían estar completamente libres de las limitaciones y problemas que resultan de la no especificidad de cebadores utilizados en cada método, tales como falsos-positivos, reproducibilidad deficiente, antecedentes altos, etcétera, a pesar de que se han introducido continuamente propuestas mejoradas a cada método. Por lo tanto, existe una necesidad de un nuevo cebador para mejorar la especificidad de la reasociación y de métodos, que pueden dar origen a resultados verdaderos.

A lo largo de esta solicitud se hace referencia a diversas patentes y publicaciones y se proporcionan citas entre paréntesis.

Sumario de la invención

Intentando resolver los problemas de un cebador convencional de este tipo y diversos métodos que implican una amplificación de ácidos nucleicos, el autor de la presente invención ha desarrollado un nuevo cebador para el control de la reasociación que pueda permitir la amplificación de ácidos nucleicos con una especificidad mucho más alta y sus aplicaciones ilimitadas en todos los sectores de la tecnología basada en la amplificación de ácidos nucleicos.

Por consiguiente, es un objeto de esta invención proporcionar un cebador para el control de la reasociación para mejorar la especificidad de reasociación en la amplificación de ácidos nucleicos.

Es otro objeto de esta invención proporcionar un método para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos a partir de un ADN o una mezcla de ácido nucleicos como molde.

Es todavía otro objeto de esta invención proporcionar un método para amplificar selectivamente una secuencia de ácidos nucleicos diana a partir de un ADN o una mezcla de ácido nucleicos como molde.

Es un objeto adicional de esta invención proporcionar un método para amplificar selectivamente una secuencia de ácidos nucleicos diana a partir de un ARNm.

Es todavía un objeto adicional de esta invención proporcionar un método para detectar ADN complementario ARNm expresado diferencialmente en dos o más muestras de ácidos nucleicos.

Es otro objeto de esta invención proporcionar un método para amplificar rápidamente un fragmento de ADNc diana que comprende una región de ADNc correspondiente a la región del extremo 3' de un ARNm.

Es todavía otro objeto de esta invención proporcionar un método para amplificar rápidamente un fragmento de ADNc diana que comprende una región de ADNc correspondiente a la región del extremo 5' de un ARNm.

Es un objeto adicional de esta invención proporcionar un método para amplificar una población de ADNcs de doble cadena, de longitud completa, complementarios a ARNms.

Es todavía un objeto adicional de esta invención proporcionar un método para amplificar ADNcs de doble cadena, enriquecidos en 5', complementarios a ARNms.

Es otro objeto de esta invención proporcionar un método para amplificar más de una secuencia de nucleótidos diana simultáneamente.

Es todavía otro objeto de esta invención proporcionar un método para producir una huella de ADN de ADNg.

Es todavía otro objeto de esta invención proporcionar un método para producir una huella de ARN de una muestra de ARNm.

Es un objeto adicional de esta invención proporcionar un método para identificar un segmento de homología conservada en una familia de multigenes.

Es todavía un objeto adicional de esta invención proporcionar un método para identificar una variación de nucleótidos en un ácido nucleico diana.

Es otro objeto de esta invención proporcionar un método para la mutagénesis en un ácido nucleico diana.

Es todavía un objeto adicional de esta invención proporcionar un kit que comprende un cebador para el control de la reasociación.

Es un objeto adicional de esta invención proporcionar kits para una diversidad de métodos que implican la amplificación de ácidos nucleicos.

5 Es todavía un objeto adicional de esta invención proporcionar un uso de un cebador para el control de la reasociación para un procedimiento que implica la amplificación de ácidos nucleicos.

Otros objetos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue, tomada en unión con las reivindicaciones y los dibujos anejos.

10 Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1A y 1B muestran representaciones esquemáticas para amplificar selectivamente un ácido nucleico diana de un ADN de doble cadena (1A) o ARm (1B), utilizando el ACP de la presente invención.

15 Las Figs. 2A y 2B muestran representaciones esquemáticas para identificar genes diferencialmente expresados, utilizando el ACP de la presente invención.

La Fig. 3 muestra una representación esquemática para amplificar un fragmento de ADNc diana que comprende la región del extremo 3' de ARNm, utilizando el ACP de la presente invención.

20 Las Figs. 4A y 4B muestran representaciones esquemáticas para amplificar un fragmento de ADNc diana que comprende la región del extremo 5' correspondiente al extremo 5' de ARNm, utilizando el ACP de la presente invención. El cebador oligo dT (4A) o aleatorio (4B) se utiliza como un cebador de la síntesis de ADNc de la primera cadena.

25 La Fig. 5 muestra una representación esquemática para amplificar moléculas de ADNc de longitud completa, complementarias a las moléculas de ARNm, utilizando el ACP de la presente invención.

30 La Fig. 6 muestra una representación esquemática para amplificar moléculas de ADNc enriquecidas en 5', complementarias a las moléculas de ARNm que comprenden la información en el extremo 5', utilizando el ACP de la presente invención.

La Fig. 7A muestra una representación esquemática para detectar un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), utilizando el ACP de la presente invención.

35 La Fig. 7B muestra otra representación esquemática para detectar un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), utilizando el ACP de la presente invención.

40 La Fig. 8 es una fotografía en gel de agarosa para mostrar el efecto de un grupo desoxiinosina situado entre las porciones extremas 3' y 5' de ACP. El ADNc se amplificó utilizando ARN total aislado de tejidos de concepto en E4.5 (pistas 1 y 4), E11.5 (pistas 2 y 5) y E18.5 (pistas 3 y 6), con un conjunto de los dT₁₀-JYC2 (SEQ ID N° 29) y ACP10 (pistas 1-3)(SEQ ID N° 13) y un conjunto de los dT₁₀-ACP1 (SEQ ID N° 30) y ACP10 (pistas 4-6), respectivamente.

45 La Fig. 9 es una fotografía en gel de agarosa para mostrar el efecto de residuos desoxiinosina situados entre las porciones extremas 3' y 5' de ACP en asociación con la alteración del número de desoxiinosina durante la PCR. Las pistas 0, 2, 4, 6 y 8 representan el número de residuos desoxiinosina, respectivamente.

50 La Fig. 10A es una fotografía en gel de agarosa para mostrar los resultados de amplificaciones por PCR en dos fases para *Esx1*, utilizando un conjunto de cebadores EsxN7 y EsxC6 (pista 1) y un conjunto de cebadores EsxN7-ACP y EsxC6-ACP (pista 2).

La Fig. 10B es una fotografía en gel de agarosa para mostrar los resultados de amplificaciones por PCR en dos fases para *Esx1*, utilizando EsxN1 (pista 1), EsxC2 (pista 2), un conjunto de EsxN1-ACP y EsxC2 (pista 3), y un conjunto de EsxN1-ACP y EsxC2-ACP (pista 4).

55 La Fig. 10C es una fotografía en gel de agarosa para mostrar los resultados de amplificaciones por PCR en dos fases para EsxN3 y EsxC5 (pistas 1 y 2) y un conjunto de EsxN3-ACP y EsxC5-ACP (pista 3).

60 La Fig. 10D es una fotografía en gel de agarosa para mostrar los resultados de amplificaciones por PCR en dos fases, continuas, para *Esx1*, utilizando el cebador EsxN1 (pista 1), EsxC2 (pista 2), un par de EsxN1 y EsxC2 (pista 3), y un par de EsxN1-ACP y EsxC2-ACP (pista 4).

65 La Fig. 11A es una fotografía en geles de agarosa para mostrar ejemplos del ACP utilizado para detectar ARNms diferencialmente expresados durante el desarrollo embrionario, utilizando diferentes fases de tejidos de concepto de ratón. Los ADNcs se amplificaron utilizando ARN total aislado de tejidos de concepto en E4.5 (pista 1), E11.5 (pista 2) y E18.5 (pista 3), con un conjunto de ACP3 (SEQ ID N° 3) y dT₁₀-ACP1. Las bandas indicadas por flechas representan los fragmentos de ADNc amplificados a partir de ARNms diferencialmente expresados. Los números de las flechas indican los fragmentos de ADNc utilizados como sondas en el análisis del bórro Northern de la Fig. 13.

La Fig. 11B es una fotografía en geles de agarosa para mostrar ejemplos del ACP utilizado para detectar ARNms diferencialmente expresados durante el desarrollo embrionario, utilizando diferentes fases de tejidos de concepto de ratón. Los ADNcs se amplificaron utilizando ARN total aislado de tejidos de concepto en E4.5 (pistas 1-2 y 7-8), E11.5 (pistas 3-4 y 9-10) y E18.5 (pistas 5-6 y 11-12), con un conjunto de ACP5 (SEQ ID N° 5) y dT₁₀-ACP1 (las

La Fig. 11C es una fotografía en gel de agarosa para mostrar los productos de ADNc amplificado, obtenidos a partir de diferentes fases de tejidos de concepto de ratón (E4.5: pistas 1 y 2; E11.5: pistas 3 y 4; E18.5: pistas 5 y 6), utilizando un conjunto de cebadores ACP10 y dT₁₀-ACP.

La Fig. 11D es una fotografía en gel de agarosa para mostrar los productos de ADNc amplificado, obtenidos a partir de diferentes fases de muestras de concepto de ratón (E4.5: pistas 1 y 2; E11.5: pistas 3 y 4; E18.5: pistas 5 y 6), utilizando un conjunto de cebadores ACP14 y dT₁₀-ACP1.

La Fig. 12A es una fotografía en gel de agarosa para mostrar los productos de ADNc amplificado, obtenidos a partir de diferentes fases de muestras de concepto de ratón (E4.5: pista 1; E11.5: pista 2; E18.5: pista 3) mediante amplificación por PCR en dos fases y de una parada, utilizando un conjunto de cebadores ACP10 y JYC5-T₁₅-ACP.

La Fig. 12B es una fotografía en gel de agarosa para mostrar los productos de ADNc amplificado, obtenidos a partir de diferentes fases de muestras de concepto de ratón (E4.5: pista 1; E11.5: pista 2; E18.5: pista 3) mediante amplificación por PCR en dos fases y continua, utilizando un conjunto de cebadores ACP10 y JYC5-T₁₅-ACP.

La Fig. 13 muestra el análisis del borrón Northern de seis fragmentos de ADNc amplificados a partir de ARNms diferencialmente expresados durante el desarrollo embrionario. Los seis fragmentos marcados con ³²P, indicados por flechas en la Fig. 11, se utilizaron como sondas para el análisis del borrón Northern. Las flechas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 son DEG1 (Fig. 13A), DEG3 (Fig. 13B), DEG2 (Fig. 13C), DEG8 (Fig. 13D), DEG5 (Fig. 13E) y DEG7 (Fig. 13F), respectivamente, en donde los resultados del análisis de la secuencia de DEG se muestran en la Tabla 1. DEG2 (SEQ ID N° 31) y DEG5 (SEQ ID N° 32) se han destapado como nuevos genes (Tabla 2). Los paneles de control (la parte inferior de cada panel) muestra a cada uno de los geles antes de la transferencia, teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo luz UV, demostrando niveles similares de ARNr 18S y 28S en calidad de un control de carga.

La Fig. 14 muestra los modelos de expresión de un nuevo gen, DEG5, en una fase completa de concepto de ratón. El análisis del borrón Northern se realizó utilizando el fragmento de ADNc de DEG5 radiomarcado en calidad de una sonda. El ARN total (20 µg/pista) se preparó a partir de conceptos de ratones en los tiempos de gestación según se indica. El panel de control en la parte inferior muestra un gel antes de la transferencia.

La Fig. 15 es una fotografía en gel de agarosa para mostrar la diferencia entre la 3'-RACE convencional (pista 1) y la 3'-RACE basada en ACP (pista 2) con respecto a 3'-RACE beta-actina.

La Fig. 16 es una fotografía en gel de agarosa para mostrar la diferencia entre métodos CapFinder y métodos basados en ACP para JunB de ratón (pistas 1 y 2) y la 5'-RACE beta-actina (pistas 3 y 4), utilizando el cebador convencional (pistas 1 y 3) y ACP (pistas 2 y 4), respectivamente.

La Fig. 17 es una fotografía en gel de agarosa para mostrar la diferencia entre métodos CapFinder y métodos basados en ACP para 5'-RACE PLP-C alfa de ratón, utilizando el cebador convencional (pista 1) y ACP (pistas 2, 3 y 4), respectivamente.

La Fig. 18 muestra los resultados de análisis Northern virtual mediante los métodos CapFinder o métodos basados en ACP para la amplificación de ADNc de GAPDH de longitud completa de ratón.

La Fig. 19 muestra fotografías en gel de agarosa para mostrar los resultados de huellas genómicas de 7 manchas de ratón, utilizando dos conjuntos diferentes de ACPs arbitrarios.

La Fig. 20 muestra fotografías en gel de agarosa para mostrar los productos amplificados de PCR multiplex por los métodos convencionales (A) o métodos basados en ACP (B) para la amplificación de tres ácidos nucleicos diana.

La Fig. 21 muestra fotografías en gel de agarosa para mostrar los productos amplificados de PCR multiplex por los métodos convencionales (A) o métodos basados en ACP (B y C) para la amplificación de cuatro ácidos nucleicos diana. La multiplex basada en ACP se realizó mediante amplificación por PCR en dos fases de una parada (B) o continua (C).

La Fig. 22 muestra una fotografía en gel de agarosa para mostrar los resultados de la amplificación específica para alelos para un SNP en el exón 4 del gen TP53 humano utilizando ACP.

La Fig. 23 muestra seis fotografías en gel de agarosa que muestran los resultados de amplificaciones específicas para alelos para seis SNPs adicionales, cada uno de ellos presente en diferentes genes, tales como el receptor beta-2 adrenérgico (ADRB2) (A), receptor 5 de quimioquina (motivo c-c) (CCR5)(B), receptor de interleucina-13 (C), molécula-1 de la adhesión de leucocitos (LAM-1) (D), receptor 3 de taquiquinina (TACR3) (E) e interleucina-1, beta (IL1B) (F).

Descripción detallada de esta invención

La presente invención se dirige, en general, a (a) un cebador para el control de la reasociación para la especificidad de la amplificación de ácidos nucleicos y (b) a sus aplicaciones. El cebador para el control de la reasociación de esta invención (al que se alude en lo que sigue como "ACP") permite controlar la reasociación de un cebador en unión con la temperatura de reasociación, de modo que se puede mejorar significativamente la especificidad de la amplificación de ácidos nucleicos (en particular la PCR). El principio del ACP se basa en la composición de un cebador de oligonucleótidos con porciones distintas en los extremos 3' y 5', separadas por al menos tres bases universales o bases no discriminatorias. El autor de esta invención ha descubierto que el grupo de bases universales o bases no discriminatorias, situado entre las porciones en los extremos 3' y 5' actúa como un regulador para el control de la reasociación del cebador a un ácido nucleico molde asociado con la temperatura de reasociación durante la amplificación de ácidos nucleicos. La presencia de un grupo residual de bases universales o no discriminatorias situado entre las porciones en los extremos 3' y 5' interrumpe la reasociación de la porción en el extremo 5', así como limita la reasociación del cebador a la porción en el extremo 3' a determinadas temperaturas de reasociación, lo que resulta en una mejora drástica de la especificidad de la reasociación. Se diseña un grupo de bases universales situado entre las porciones en los extremos 3' y 5' de ACP para definir cada porción. Por estos motivos, el ACP es fundamentalmente diferente de los cebadores convencionales en términos de la función para mejorar la especificidad de la reasociación bajo condiciones de rigurosidad particulares durante la amplificación de ácidos nucleicos.

El ACP de esta invención es significativamente eficaz y ampliamente accesible a aplicaciones basadas en la amplificación de ácidos nucleicos. También, por parte del ACP se pueden resolver fundamentalmente diversos problemas relacionados con la especificidad de la reasociación del cebador en las técnicas de PCR convencionales. Los beneficios principales a obtener del uso del ACP durante la amplificación de ácidos nucleicos (en particular la PCR) son como sigue:

(a) dado que la presencia de un grupo residual de base universal situado entre las porciones en los extremos 3' y 5' restringe la porción de reasociación del cebador a la porción en el extremo 3' en condiciones tales que la porción en el extremo 3' se reasocia al molde, se puede controlar con precisión la secuencia de reasociación de un cebador, lo que hace posible diseñar un cebador con un número deseado de secuencias de reasociación. Es particularmente útil cuando se ha de limitar una porción de reasociación de un cebador (p. ej., detección del genotipo de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), rastreo de microdisposición de ADN y detección de genes diferencialmente expresados);

(b) dado que la presencia de un grupo residual de base universal situado entre las porciones en los extremos 3' y 5' interrumpe la reasociación de la porción en el extremo 5' al molde en condiciones tales que la porción en el extremo 3' se reasocia al molde, finalmente la porción en el extremo 5' no implicada en la reasociación proporciona la porción en el extremo 3' con una especificidad de la reasociación del cebador;

(c) la especificidad de la reasociación del cebador es muy sensible, lo suficiente como para detectar un desapareamiento de una sola base. Así, es particularmente útil para la identificación de una variación de un nucleótido en un ácido nucleico diana, incluidos, por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido y mutaciones puntuales;

(d) el ACP es capaz de proporcionar un cebador con una alta tolerancia en los "parámetros de búsqueda del cebador" para el diseño del cebador, tales como longitud del cebador, temperatura de reasociación, contenido GC y longitud del producto de PCR;

(e) el sistema ACP proporciona amplificaciones por PCR en dos fases que permiten que los productos sean excluidos de una amplificación no específica;

(f) aumenta la eficacia de una amplificación por PCR, lo que hace más fácil detectar ARNms raros; y

(g) aumenta la reproducibilidad, lo que ahorra una gran cantidad de tiempo y coste.

Principio del ACP

En un aspecto de esta invención se proporciona un cebador para el control de la reasociación para mejorar la especificidad de la reasociación en la amplificación de ácidos nucleicos, que comprende: (a) una porción en el extremo 3' que tiene una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a un sitio en un ácido nucleico molde para hibridarse con la misma; (b) una porción en el extremo 5' que tiene una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada, esencialmente no complementaria a sitio alguno en dicho ácido nucleico molde; y (c) una porción de regulador situada entre dicha porción en el extremo 3' y dicha porción en el extremo 5' que comprende al menos tres bases universales contiguas o análogos de bases no discriminatorias, en donde dicha porción de regulador tiene una

T_m inferior a dicha porción en el extremo 3' y dicha porción en el extremo 5', y en donde dicha porción de regulador es capaz de regular una porción de reasociación de dicho cebador en asociación con la temperatura de reasociación.

El principio del ACP se basa en la composición de un cebador de oligonucleótidos que tiene porciones en los extremos 3' y 5' distintas separadas por una porción de regulador que comprende al menos tres bases universales o bases no discriminatorias y el efecto de la porción de regulador en las porciones en los extremos 3' y 5' en el cebador de oligonucleótidos. La presencia de la porción de regulador que comprende al menos tres bases universales o bases no discriminatorias entre las porciones en los extremos 3' y 5' del ACP actúa como un factor principal que es el responsable de la mejora de la especificidad de reasociación del cebador.

El término "molde" se refiere a ácido nucleico. La expresión "ácido nucleico" es un polímero desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma de cadena sencilla o doble, incluidos análogos conocidos de nucleótidos naturales, a menos que se indique de otro modo. Por lo tanto, el ACP de esta invención se puede emplear en la amplificación de ácidos nucleicos utilizando como molde ADNg, ADNc o ARNm de cadena sencilla o doble. El término "porción" utilizado en esta memoria en unión con el cebador de esta invención se refiere a una secuencia de nucleótidos separada por una porción de regulador. La expresión "porción en el extremo 3'" o "porción en el extremo 5'" se refiere a una secuencia de nucleótidos en el extremo 3' o el extremo 5' del cebador de esta invención, respectivamente, que está separada por la porción de regulador.

El término "cebador", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un oligonucleótido, ya sea que aparece de forma natural o se produce de forma sintética, que es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis del producto de extensión del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico (molde), es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización, tal como ADN polimerasa, y a una temperatura y pH adecuados. El cebador es, preferiblemente, de cadena sencilla para lograr una eficiencia máxima en la amplificación. De preferencia, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador de esta invención puede estar constituido por dNMP que aparece de forma natural (es decir, sAMP, dGM, dCMP y dTMP), nucleótido modificado o nucleótido no natural. El cebador también puede incluir ribonucleótidos. El cebador debe ser lo suficientemente largo con el fin de cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. La longitud exacta de los cebadores dependerá de muchos factores, incluidas la temperatura, aplicación y la fuente del cebador. El término "reasociación" o "cebado", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la aposición de un oligodesoxinucleótido o ácido nucleico a un ácido nucleico molde, en que dicha aposición permite que la polimerasa polimerice nucleótidos en una molécula de ácido nucleico que es complementaria al ácido nucleico molde o a una porción del mismo.

La porción en el extremo 3' del ACP tiene una secuencia de nucleótidos esencialmente complementaria a un sitio de una molécula de ácido nucleico molde. La expresión "esencialmente complementaria", en referencia al cebador, se utiliza en esta memoria para dar a entender que el cebador es lo suficientemente complementario para hibridarse a una secuencia de ácidos nucleicos molde bajo las condiciones de reasociación designadas, de manera que el cebador reasociado puede ser extendido por la polimerasa para formar una copia complementaria del molde. Por lo tanto, esta expresión tiene un significado diferente de "perfectamente complementaria" o expresiones relacionadas de la misma. Se apreciará que la porción en el extremo 3' de ACP puede tener uno o más desapareamientos al molde en una medida tal que el ACP puede servir como cebador. Lo más preferiblemente, la porción en el extremo 3' del ACP tiene una secuencia de nucleótidos perfectamente complementaria a un sitio en un molde, es decir sin desapareamientos.

La porción en el extremo 3' del ACP puede tener una amplia diversidad de secuencias de nucleótidos, dependiendo de sus aplicaciones, así como de la secuencia del molde. Por ejemplo, en los casos en los que el ACP se aplica al procedimiento que implica una transcripción inversa, tal como PCR de expresión diferencial, RACE, amplificación de ADNc de longitud completa, toma de huellas, identificación de un segmento de homología conservada y similares, su porción en el extremo 3' puede tener la secuencia de nucleótidos que se hibrida a la cola de poliadenosina (poli A) de un ARNm, de preferencia al menos 8 nucleótidos de desoxitimidina, más preferiblemente al menos 10 nucleótidos de desoxitimidina y, lo más preferiblemente, al menos 10 nucleótidos de desoxitimidina contiguos. Para el procedimiento que implica una transcripción inversa, tal como antes, en una realización la porción en el extremo 3' de ACP tiene al menos 10 nucleótidos de desoxitimidina contiguos con 3'-V en su extremo 3'; en que V se selecciona del grupo que consiste en desoxiadenosina, desoxicitidina y desoxiguanosina, en otra realización, al menos 10 nucleótidos de desoxitimidina contiguos con 3'-NV en su extremo 3'; en que V se selecciona del grupo que consiste en desoxiadenosina, desoxicitidina y desoxiguanosina y N se selecciona del grupo que consiste en desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxicitidina y desoxiguanosina.

Además, en los casos en los que el ACP se emplea en la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana, su porción en el extremo 3' comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente complementaria a una secuencia diana; en la PCR de expresión diferencial, una secuencia arbitraria, esencialmente complementaria a un sitio en un ADNc de un ARNm; en RACE, una secuencia específica para genes esencialmente complementaria a un sitio en un ADNc de un ARNm; en la amplificación de ADNcs enriquecidos en 5', una secuencia arbitraria de al menos seis nucleótidos, esencialmente complementaria a sitios en ARNms; en la identificación de un segmento de homología conservada, una secuencia de nucleótidos, esencialmente complementaria a una secuencia consenso encontrada en una familia de genes o una secuencia degenerada, seleccionada de una pluralidad de combinaciones de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos predeterminada; en la identificación de una variación de nucleótidos (p. ej. sitio alélico) en un ácido nucleico diana, una secuencia de nucleótidos que comprende un nucleótido complementario

al nucleótido correspondiente de una variación de nucleótidos; y en la mutagénesis, una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un desapareamiento de un nucleótido a un ácido nucleico diana.

El término secuencia de nucleótidos “arbitraria” se utiliza en esta memoria para dar a entender la secuencia de nucleótidos que se elige sin conocer la secuencia de los ácidos nucleicos diana a amplificar. El término no debería confundirse con “aleatorio” en referencia al cebador que connota un cebador constituido por una población aleatoria de cebadores, cada uno de secuencia diferente y aleatoria. El término secuencia “degenerada”, en unión con el ACP para la identificación de segmentos de homología conservada, se refiere a la secuencia de nucleótidos que se deduce de la secuencia de aminoácidos, de manera que la secuencia degenerada puede formar una agrupación de las secuencias de nucleótidos procedentes de una secuencia de aminoácidos, debido a la degeneración del código genético.

De acuerdo con una realización preferida del ACP, la secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada de la porción en el extremo 5' es esencialmente no complementaria a sitio alguno en el ácido nucleico molde.

De acuerdo con una realización preferida, el cebador para el control de la reasociación de esta invención se puede representar por la fórmula (1) de 5'-X_p-Y_q-Z_r-3', en donde X_p representa la porción en el extremo 5' que tiene la secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada, esencialmente no complementaria a sitio alguno en el ácido nucleico molde; Y_q representa la porción de regulador que comprende al menos un análogo de base universal o base no discriminatoria; Z_r representa la porción en el extremo 3' que tiene una secuencia de nucleótidos, esencialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde; en donde p, q y r representan el número de nucleótidos; y en donde X, Y y Z es desoxirribonucleótido o ribonucleótido.

La porción de regulador que comprende al menos un análogo de base universal o de base no discriminatoria es la responsable de la función principal del ACP en asociación con la alteración de la temperatura de reasociación durante la amplificación del ácido nucleico. La expresión “análogo de base universal o de base no discriminatoria”, utilizada en esta memoria, se refiere a una capaz de formar pares de bases con cada una de las bases de ADN/ARN naturales con una pequeña discriminación entre ellas.

Es ampliamente conocido que los nucleótidos en algunas posiciones ambiguas de cebadores degenerados han sido reemplazados por base universal o un análogo no discriminatorio tal como desoxiinosina (Obtsuka *et al.*, 1985; Sakanari *et al.*, 1989); 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol (Nichols *et al.*, 1994) y 5-nitroindol (Loakes y Brown, 1994) para resolver los problemas de diseño asociados con los cebadores degenerados, debido a que tales bases universales son capaces de un apareamiento de bases no específico con las cuatro bases convencionales. Sin embargo, no ha habido informe alguno de que esta base universal o análogo no discriminatorio, tal como desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol y 5-nitroindol se utilice para incrementar la especificidad de la reasociación del cebador durante la PCR. Además, el documento WO 93/05175 describe que análogos de bases degeneradas con una fórmula específica podrían utilizarse en cebadores para la PCR; sin embargo, no sugiere que los análogos de bases degeneradas puedan contribuir a la mejora en la especificidad de la reasociación de cebadores.

La presencia de una base universal tal como desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol y 5-nitroindol en un cebador genera bajas temperaturas de reasociación debido a sus débiles interacciones en la unión a hidrógeno en el apareamiento de bases. Como extensión de esta teoría, el autor de esta invención ha inducido que la presencia de las bases universales contiguas entre el extremo 3' y el extremo 5' de un cebador podría generar una región que tiene una temperatura de fusión más baja, forma un límite con cada una de las porciones en los extremos 3' y 5' del cebador, y afectan a la reasociación de cada porción, respectivamente. Esta teoría proporciona la base de los cebadores para el control de la reasociación de esta invención.

El ACP contiene al menos 3 residuos de base universal o análogo de base no discriminatoria entre las secuencias de las porciones extremas 3' y 5'. De manera ventajosa, los residuos de base universal entre las secuencias de las porciones extremas 3' y 5' pueden tener una longitud de hasta 15 residuos. De acuerdo con una realización, el ACP contiene 2-15 residuos de base universal o análogo de base no discriminatoria. Más preferiblemente, las bases universales entre las secuencias de las porciones extremas 3' y 5' son de una longitud de aproximadamente 15 residuos.

Con referencia al número óptimo de residuos de base universal, es decir, 5 residuos, se prefiere el número mínimo de residuos de base universal entre las secuencias de las porciones extremas 3' y 5' del ACP, con el fin de interrumpir la reasociación de la porción en el extremo 5' al molde durante la amplificación de ácidos nucleicos a una determinada temperatura de reasociación. Es muy probable que la longitud de bases universales en la secuencia (8-10 bases) no constituya una diferencia significativa en su propia función en el ACP.

El uso de residuos de base universal entre las secuencias de las porciones extremas 3' y 5' se considera un rasgo clave en la presente invención, debido a que provee a cada porción (extremos 3' y 5') de una especificidad de reasociación distinta en asociación con una temperatura de reasociación durante la amplificación de ácidos nucleicos, p. ej. la PCR.

De acuerdo con una realización preferida, la base universal o análogo de base no discriminatoria en la porción regular incluye desoxiinosina, inosina, 7-deaza-2'-desoxiinosina, 2-aza-2'-desoxiinosina, 2'-OMe inosina, 2'-F inosina, desoxi 3-nitropirrol, 3-nitropirrol, 2'-OMe 3-nitropirrol, 2'-F 3-nitropirrol, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol, desoxi 5-nitroindol, 5-nitroindol, 2'-OMe nitroindol, 2'-F nitroindol, desoxi 4-nitrobencimidazol, 4-

nitrobencimidazol, desoxi 4-aminobencimidazol, 4-aminobencimidazol, desoxi nebularina, 2'-F nebularina, 2'-F 4-nitrobencimidazol, PNA-5-nitroindol, PNA-nebularina, PNA-inosina, PNA-4-nitrobencimidazol, PNA-3-nitropirrol, morfolino-5-nitroindol, morfolino-nebularina, morfolino-inosina, morfolino-4-nitrobencimidazol, morfolino-3-nitropirrol, fosforoamidato-5-nitroindol, fosforoamidato-nebularina, fosforoamidato-inosina, fosforoamidato-4-nitrobencimidazol, fosforoamidato-3-nitropirrol, 2'-0-metoxietil inosina, 2'-0-metoxietil nebularina, 2'-0-metoxietil 5-nitroindol, 2'-0-metoxietil 4-nitrobencimidazol, 2'-0-metoxietil 3-nitropirrol y sus combinaciones, pero no limitada a ellos. Más preferiblemente, la base universal o análogo de base no discriminatoria es desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol ó 5-nitroindol. lo más preferiblemente desoxiinosina.

La longitud preferida de un cebador de oligonucleótidos, tal como se utiliza en esta memoria, se determina a partir de la especificidad deseada de la reasociación y del número de oligonucleótidos que tengan la especificidad deseada, requeridos para hibridarse al molde. Por ejemplo, un cebador de oligonucleótidos de 20 nucleótidos es más específico que un cebador de oligonucleótidos de 10 nucleótidos, debido a que la adición de cada nucleótido a un oligonucleótido aumenta la temperatura de reasociación del cebador al molde.

Las longitudes de las secuencias de las porciones en los extremos 3' y 5' del ACP pueden variar y dependen, en parte, de cada aplicación que utilice ACP. En una realización preferida, la porción del extremo 3' del ACP es de al menos 6 nucleótidos de longitud, lo que se considera un requisito de longitud mínimo para la reasociación del cebador. Más preferiblemente, la secuencia de la porción en el extremo 3' es de 10 a 25 nucleótidos y puede ser de hasta 60 nucleótidos de longitud. En otra realización, la porción en el extremo 3' del ACP puede incluir ribonucleótidos, así como desoxirribonucleótidos.

En otra realización preferida, la porción en el extremo 5' del ACP contiene al menos 15 nucleótidos de longitud, lo que se considera un requisito de longitud mínimo para la reasociación en condiciones de elevada rigurosidad. Preferiblemente, la secuencia de la porción en el extremo 5' puede ser de hasta 60 nucleótidos de longitud. Más preferiblemente, la secuencia de la porción en el extremo 5' es de 6 a 50 nucleótidos, lo más preferiblemente de 20 a 25 nucleótidos de longitud. El ACP completo es de 35 a 50 nucleótidos de longitud, y puede ser de hasta de 100 nucleótidos de longitud.

La porción en el extremo 5' del ACP tiene una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada, esencialmente no complementaria a sitio alguno en el ácido nucleico molde, y esta secuencia de nucleótidos puede servir como un sitio de cebado para la amplificación subsiguiente. La expresión secuencia de nucleótidos "arbitraria preseleccionada", utilizada en esta memoria, se refiere a cualquier secuencia de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos mixta preseleccionada que contiene una secuencia particular de nucleótidos naturales o modificados. En alguna realización, la secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada de la porción en el extremo 5' puede estar constituida por una secuencia de cebadores universal, tal como la secuencia de promotor T3, la secuencia de promotor T7, la secuencia de promotor SP6 y la secuencia universal directa o inversa M13. Al utilizar una secuencia arbitraria más larga (aproximadamente 25 a 60 bases) en la porción en el extremo 5' se reduce la eficacia de ACP, pero secuencias más cortas (aproximadamente 15 a 17 bases) reducen la eficacia de la reasociación a elevadas condiciones de rigurosidad del ACP. También es un rasgo clave de la presente invención utilizar una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada en la porción en el extremo 5' del ACP como sitio de cebado para la subsiguiente amplificación.

De acuerdo con una realización de la presente invención, se pueden hacer algunas modificaciones en la porción en el extremo 5' del ACP, a menos que las modificaciones abolen las ventajas del ACP, es decir una mejora en la especificidad de la reasociación. Por ejemplo, la porción en el extremo 5' puede comprender una secuencia o secuencias reconocidas por una o más endonucleasas de restricción, lo que hace factible clonar el producto amplificado en un vector adecuado. Además, la porción en el extremo 5' puede comprender al menos un nucleótido con un marcador para la detección o el aislamiento de producto amplificado. Marcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a fluoróforos, cromóforos, agentes quimioluminiscentes, partículas magnéticas, radioisótopos, marcadores de masa, partículas densas de electrones, enzimas, cofactores, sustratos para enzimas y haptenos que tienen participantes en la unión específicos, p. ej. un anticuerpo, estreptavidina, biotina, digoxigenina y un grupo quelante. La porción en el extremo 5' también comprende una región de promotor de ARN polimerasa de bacteriófago.

De acuerdo con la realización preferida de esta invención, el ACP se aplica a la PCR. Más preferiblemente, la PCR se realiza bajo una primera y una segunda temperaturas de reasociación, es decir bajo condiciones rigurosas diferentes. La primera temperatura de reasociación puede ser igual o inferior a la segunda temperatura de reasociación y, preferiblemente la segunda temperatura de reasociación es más alta que la primera temperatura de reasociación. En el procedimiento PCR realizado bajo dos temperaturas de reasociación diferentes, es decir PCR en dos fases, el extremo 3' del ACP está implicado en la reasociación a la primera temperatura de reasociación, y el extremo 5' del ACP incorporado en el producto amplificado de la primera fase de amplificación sirve como sitio de cebado a la segunda temperatura de reasociación. En este caso, las ventajas del ACP se demostrarán de acuerdo con las siguientes suposiciones:

(1) dado que una porción de regulador del ACP está constituida por al menos tres bases universales o análogos no discriminatorios, que tiene una T_m inferior que la otra porción en el ACP debido a sus débiles interacciones en la unión a hidrógeno en el apareamiento de bases, la porción de regulador del ACP no es favorable para la reasociación al ácido nucleico molde bajo las condiciones de que la porción en el extremo 3' del ACP se reasocia a un sitio del molde a una primera temperatura de reasociación. Por consiguiente, la presencia de una porción de regulador que comprende

ES 2 314 093 T3

al menos una base universal o análogo no discriminatorio entre las porciones en los extremos 3' y 5' del ACP limita la porción de reasociación del cebador a la porción en el extremo 3' a la primera temperatura de reasociación;

(2) la porción en el extremo 5', que no está implicada en la reasociación bajo la primera temperatura de reasociación mantiene problemática la reasociación de la porción en el extremo 3' al molde;

(3) así, la resistencia en la que ocurre la reasociación específica de la secuencia de la porción en el extremo 3' es relativamente mayor que la resistencia en la que ocurre la reasociación no específica, bajo la primera temperatura de reasociación, lo que resulta en la mejora de la especificidad de reasociación del cebador en la porción del extremo 3';

(4) en los casos en los que la porción en el extremo 5' comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada, la porción sirve como un sitio de cebado a una segunda temperatura de reasociación, que es de condiciones de alta rigurosidad y que, también, debería ser más alta que la primera temperatura de reasociación, para la subsiguiente amplificación de producto de reacción generado a partir de la reasociación y extensión de la secuencia de la porción en el extremo 3'; y

(5) por consiguiente, sólo el producto de reacción generado a partir de la reasociación y extensión de la secuencia de la porción en el extremo 3' se puede amplificar próximo al óptimo teórico de un incremento doble de producto para cada ciclo de la PCR bajo la segunda temperatura de reasociación.

Por lo tanto, la porción en el extremo 3' del ACP actúa solamente como sitio de reasociación al molde a la primera temperatura de reasociación y la porción en el extremo 5' del ACP se utiliza como un sitio de cebado a la segunda temperatura de reasociación para la subsiguiente amplificación del producto generado al contactar y extender la porción en el extremo 3' del ACP al molde.

Se puede apreciar que el ACP de la presente invención es muy útil en una diversidad de métodos de amplificación de ácidos nucleicos basados en el cebador, incluidos los métodos de Miller, H.I. (documento WO 89/06700) y Davey, C. *et al.* (documento EP 329.822), reacción cadena de la ligasa (LCR, Wu, D.Y. *et al.*, *Genomics* 4:560 (1989)), reacción en cadena de la polimerasa ligasa (Barany, PCR Methods and Applic., 1:5-16 (1991)), Gap-LCR (documento WO 90/01069), reacción en cadena de reparación (documento EP 439.182), 3SR (Kwoh *et al.*, PNAS, USA, 86:1173 (1989)) y NASBA (pat. de EE.UU. n° 5.130.238), pero no limitados a los mismos.

En otro aspecto de esta invención, se proporciona un kit que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores para el control de la reasociación de acuerdo con la presente invención. De acuerdo con una realización de esta invención, este kit comprende, además, un cebador o par de cebadores con una secuencia de nucleótidos que corresponde a la porción en el extremo 5' del ACP; en el caso de que la porción en el extremo 5' comprenda una secuencia de cebador universal, es más preferido que el kit comprenda los cebadores universales. Los presentes kits pueden incluir, opcionalmente, los reactivos requeridos para llevar a cabo reacciones PCR, tales como tampones, ADN polimerasa, cofactores de ADN polimerasa y desoxirribonucleótido-5'-trifosfatos. Opcionalmente, los kits pueden también incluir diversas moléculas de nucleótidos, transcriptasa inversa, diversos tampones y reactivos y anticuerpos que inhiben la actividad de la ADN polimerasa. Los kits también pueden incluir reactivos necesarios para llevar a cabo reacciones de control positivas y negativas. Cantidades óptimas de reactivos a utilizar en una reacción dada se pueden determinar fácilmente por parte del experto con los beneficios de la presente descripción. Típicamente, los kits están destinados a contener en envases o compartimientos separados los constituyentes antes descritos.

El ACP de la presente invención se puede aplicar a una diversidad de tecnologías basadas en la amplificación de ácidos nucleicos. Ejemplos representativos para demostrar el efecto del ACP son:

- I. Aplicación para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos;
- II. Aplicación para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos diana;
- III. Aplicación a una amplificación de ADN multiplex;
- IV. Aplicación a la identificación de genes diferencialmente expresados;
- V. Aplicación a la amplificación rápida de extremos de ADNcs (RACE);
- VI. Aplicación para amplificar ADNc de longitud completa;
- VII. Aplicación para amplificar ADNc enriquecido en 5';
- VIII. Aplicación para la obtención de huellas de ADN o ARN;
- IX. Aplicación para la identificación de segmentos de homología conservada en familias multigenes;
- X. Aplicación para la identificación de una variación en la secuencia de nucleótidos;

XI. Aplicación a la mutagénesis; y

XII. Otras aplicaciones.

5

I. Aplicaciones para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos (diana)

10 Todavía en otra realización de esta invención se proporciona un método para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos, que comprende llevar a cabo una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs antes descritos. Preferiblemente, el cebador de acuerdo con la estructura del ACP es uno que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante esencialmente complementaria a una región de la secuencia de ácidos nucleicos para hibridarse con ella.

15 En una realización específica de este método, se proporciona un método que utiliza una amplificación en dos fases para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos, que comprende:

20 (a) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de la secuencia de ácidos nucleicos a una primera temperatura de reasociación, que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando el par de cebadores de uno cualquiera de los ACPs antes descritos, teniendo cada uno en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante esencialmente complementaria a una región de la secuencia de ácidos nucleicos para hibridarse con la misma, bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a la región de la secuencia de ácidos nucleicos, con lo que se genera el producto de amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos;

25 y

30 (b) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase del producto de amplificación generado en la etapa (a) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando el mismo par de cebadores que el utilizado en la etapa (a) o utilizando un par de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada que corresponde a cada porción en el extremo 5' de los cebadores utilizados en la etapa (a), bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a los extremos 3' y 5' del producto de amplificación, respectivamente, con lo que se re-amplifica el producto de amplificación.

35 En los casos en los que el método se aplica a la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana, el primer par utilizado tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante esencialmente complementaria a una región de la secuencia de ácidos nucleicos diana para hibridarse con la misma. Por lo tanto, en un aspecto adicional de esta invención, se proporciona un método para amplificar selectivamente una secuencia de ácidos nucleicos diana a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos, en el que el método comprende llevar a cabo una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva del ACP antes descrito. Preferiblemente, el cebador de acuerdo con la estructura del ACP es uno que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante esencialmente complementaria a una región de la secuencia de ácidos nucleicos diana para hibridarse con la misma.

45 En una realización específica de este método se proporciona un método que utiliza la amplificación en dos fases para amplificar selectivamente una secuencia de ácidos nucleicos diana a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos, que comprende:

50 (a) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de la secuencia de ácidos nucleicos diana a una primera temperatura de reasociación, que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando el par de cebadores de uno cualquiera de los ACPs antes descritos, teniendo cada uno en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante esencialmente complementaria a una región de la secuencia de ácidos nucleicos diana para hibridarse con la misma, bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a su región de la secuencia de ácidos nucleicos diana, con lo que se genera el producto de amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana;

55 y

60 (b) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase del producto de amplificación generado en la etapa (a) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando los mismos cebadores que los utilizados en la etapa (a) o utilizando un par de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada que corresponde a cada porción en el extremo 5' de los cebadores utilizados en la etapa (a), bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a los extremos 3' y 5' del producto de amplificación, respectivamente, con lo que se re-amplifica el producto de amplificación.

65 En los casos en los que el molde para la amplificación es ARNm, se requiere la producción de ADNc antes de la amplificación. Por lo tanto, todavía en un aspecto adicional de esta invención, se proporciona un método para amplificar selectivamente una secuencia de ácidos nucleicos diana a partir de un ARNm, en donde el método comprende transcribir inversamente el ARNm y llevar a cabo una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado

porque al menos un cebador se deriva del ACP antes descrito. Preferiblemente, el cebador de acuerdo con la estructura del ACP es uno que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante esencialmente complementaria a una región de la secuencia de ácidos nucleicos diana para hibridarse con la misma.

En una realización específica de esta invención, se proporciona un método que utiliza la amplificación en dos fases para amplificar selectivamente una secuencia de ácido nucleicos diana a partir de un ARNm, que comprende:

(a) poner en contacto el ARNm con un cebador de oligonucleótido dT que se hibrida a la cola poliA del ARNm bajo condiciones suficientes para que ocurra una síntesis del ácido desoxirribonucleico enzimática, impulsada por el molde;

(b) transcribir inversamente el ARNm al que se hibrida el cebador de oligonucleótido dT para producir una la primera cadena de ADN que es complementaria al ARNm al que se hibrida el cebador de oligonucleótido dT;

(c) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de la secuencia de ácidos nucleicos procedente de la primera cadena de ADN obtenida de la etapa (b) a una primera temperatura de reasociación, que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando el par de cebadores del ACP antes descrito que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante esencialmente complementaria a una región de la secuencia de ácidos nucleicos para hibridarse con la misma, bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a su secuencia de nucleótidos diana, con lo que se genera el producto de amplificación de la secuencia de nucleótidos diana; y

(d) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase del producto de amplificación generado en la etapa (c) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando los mismos cebadores que el utilizado en la etapa (c) o utilizando un par de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada que corresponde a cada porción en el extremo 5' de los cebadores utilizados en la etapa (c), bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a los extremos 3' y 5' del producto de amplificación, respectivamente, con lo que se re-amplifica el producto de amplificación.

Dado que los métodos de amplificación de esta invención emplean el ACP de esta invención, se omiten las descripciones comunes entre ellos, con el fin de evitar la complejidad de esta especificación que conduce a una multiplicidad indebida.

Esta aplicación de utilizar el ACP de la presente invención puede proporcionar un método mejorado para amplificar selectivamente una secuencia de ácidos nucleicos diana a partir de un ácido nucleico o una mezcla de ácidos nucleicos (ADN o ARNm), llevando a cabo amplificaciones de ácidos nucleicos, preferiblemente, la PCR. Dado que el efecto del ACP proporciona los cebadores convencionales con una especificidad para la reasociación del cebador independientemente de "parámetros de búsqueda del cebador" para el diseño del cebador, tal como longitud del cebador, temperatura de reasociación, contenido GC y longitud del producto, se recomienda particularmente el uso del ACP cuando los cebadores convencionales utilizados para amplificar un fragmento de ácido nucleico diana son demasiado sensibles a parámetros de este tipo para generar productos de amplificación de ácidos nucleicos específicos.

En la Fig. 1A se ilustra una representación esquemática para amplificar selectivamente un ácido nucleico diana de ADN de doble cadena utilizando un nuevo sistema de ACP según se describe antes. La Fig. 1B ilustra una representación esquemática para amplificar selectivamente un ácido nucleico diana de ARNm utilizando un nuevo sistema de ACP. Haciendo referencia a las Figs. 1A y 1B, se describirán con más detalle los presentes métodos.

Los presentes métodos para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos se pueden llevar a cabo de acuerdo con diversas amplificaciones de ácidos nucleicos basadas en el cebador conocidas en la técnica. Preferiblemente, los métodos se llevan a cabo de acuerdo con las amplificaciones en dos fases desarrolladas por el autor de la invención, más preferiblemente la amplificación se realiza mediante reacción en cadena de la polimerasa conocida en la técnica y, lo más preferiblemente, el método de PCR de principio caliente.

Los métodos de la presente invención para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos se puede utilizar para amplificar cualquier molécula de ácido nucleico deseada. Moléculas de este tipo pueden ser ADN o ARN. La molécula puede estar en forma de doble cadena o de cadena sencilla, de preferencia de doble cadena. En los casos en los que el ácido nucleico como material de partida es de doble cadena, se prefiere convertir las dos cadenas en una forma de cadena sencilla o parcialmente de cadena sencilla. Métodos conocidos para separar cadenas incluyen, pero no se limitan a calentamiento, tratamiento con álcalis, formamida, urea y glicoxal, métodos enzimáticos (p.ej. acción de helicasa) y proteínas de unión. Por ejemplo, la separación de las cadenas se puede conseguir mediante calentamiento a una temperatura que oscila entre 80°C y 105°C. Métodos generales para lograr este tratamiento se proporcionan por Joseph Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001).

En los casos en los que se emplea ARNm como material de partida para la amplificación, es necesaria una etapa de transcripción inversa antes de la amplificación, detalles de la misma se encuentran en Joseph Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001);

y Noonan, K.F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16:10366 (1988)). Para la transcripción inversa se utiliza un cebador de oligonucleótido dT hibridable a la coli poliA de ARNm. El cebador de oligonucleótido dT está constituido por dTMPs, uno o más de los cuales puede ser reemplazado por otros dNMPs, siempre que el cebador dT pueda servir como cebador. La transcripción inversa se puede hacer con una transcriptasa inversa que tiene actividad RNasa H. Si se usa una enzima que tiene actividad RNasa H, puede ser posible omitir una etapa de digestión de RNasa H separada, al elegir con cuidado las condiciones de la reacción.

Los presentes métodos no requieren que las moléculas a amplificar tengan alguna secuencia o longitud particular. En particular, las moléculas que se pueden amplificar incluyen cualquier ácido nucleico procariótico, eucariótico (por ejemplo protozoos y parásitos, hongos, levaduras, plantas superiores, animales inferiores y superiores, incluidos mamíferos y seres humanos) o viral (por ejemplo virus Herpes, VIH, virus de la influenza, virus Epstein-Barr, virus de la hepatitis, virus de la polio, etc.) que se producen en la naturaleza o viroide. La molécula de ácido nucleico también puede ser cualquier molécula de ácido nucleico que haya sido o que pueda ser sintetizada químicamente. Así, la secuencia de ácidos nucleicos puede o puede no encontrarse en la naturaleza.

El ACP utilizado para la presente invención se hibrida o reasocia a una región en el molde, de modo que se forma la estructura de doble cadena. Condiciones de la hibridación de ácidos nucleicos, adecuadas para formar estructuras de doble cadena de este tipo, se describen por Joseph Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) y Haymes, B.D. *et al.*, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985). La secuencia de la porción en el extremo 3' del ACP no necesita exhibir una complementariedad precisa, sino que sólo necesita ser esencialmente complementaria en la secuencia para ser capaz de formar una estructura de doble cadena estable. Así, son permisibles desviaciones de la complementariedad completa, siempre que dichas desviaciones no sean suficientes para excluir una hibridación para formar una estructura de doble cadena. La hibridación del ACP a una región en el ácido nucleico molde es un requisito previo para su polimerización dependiente del molde con polimerasas. Factores (véase Joseph Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001); y Haymes, B.D. *et al.*, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985) que afectan al apareamiento de las bases del ACP a sus ácidos nucleicos complementarios afectan subsiguientemente a la eficacia del cebado. La composición de los nucleótidos del ACP puede afectar a la temperatura a la que es óptima la reasociación y, por lo tanto, puede afectar a su eficacia de cebado.

Se puede utilizar una diversidad de ADN polimerasas en la etapa de amplificación de los presentes métodos, que incluye el fragmento "Klenow" de la ADN polimerasa I de *E. coli*, una ADN polimerasa, una ADN polimerasa termoestable y una ADN polimerasa del bacteriófago T7. Preferiblemente, la polimerasa es una ADN polimerasa termoestable, tal como la que se puede obtener de una diversidad de especies bacterianas, incluidas *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* y *Pyrococcus furiosus* (Pfu). Muchas de estas polimerasas se pueden aislar de la propia bacteria o se pueden obtener comercialmente. La polimerasa a utilizar con la presente invención también se puede obtener de células que expresan altos niveles de los genes clonados que codifican la polimerasa. Cuando se está realizando una reacción de polimerización, es preferible proporcionar en exceso los componentes requeridos para una reacción de este tipo en el recipiente de reacción. Exceso con referencia a componentes de la reacción de amplificación se refiere a una cantidad de cada componente, de manera que la capacidad de conseguir la amplificación deseada no está esencialmente limitada por la concentración de ese componente. Es deseable proporcionar a la mezcla de reacción una cantidad de cofactores requeridos, tales como Mg^{2+} , y dATP, dCTP, dGTP y dTTP en cantidad suficiente para soportar el grado de amplificación deseado.

Todas las enzimas utilizadas en esta reacción de amplificación pueden ser activas bajo las mismas condiciones de la reacción. De hecho, existen tampones en los que todas las enzimas están próximas a sus condiciones de reacción óptimas. Por lo tanto, el procedimiento de amplificación de la presente invención se puede hacer en un volumen de reacción sencillo sin cambio alguno en las condiciones, tal como la adición de reaccionantes.

Se entendería que las porciones en los extremos 5' de un conjunto de ACPs utilizado en la etapa de la amplificación en primera fase pudieran comprender secuencias idénticas o diferentes; si son idénticas, se utilizará un cebador correspondiente a la secuencia de la porción en el extremo 5' en la etapa de la amplificación en segunda fase, mientras que si son diferentes, se utilizarán dos cebadores, cada uno de ellos correspondiente a la secuencia de cada porción en el extremo 5' de ACPs, en la etapa de la amplificación en segunda fase.

La presente invención incluye un procedimiento alternativo para amplificar selectivamente un fragmento de ácido nucleico diana a partir de un ácido nucleico o una mezcla utilizando un ACP, en el que se puede utilizar un conjunto de cebadores que comprende un ACP y un cebador convencional en la primera etapa de amplificación, en lugar de un conjunto de ACPs. La expresión "cebador convencional", utilizada en esta memoria, se refiere a cualquier cebador con una estructura diferente de ACP, en especial en términos de la presencia de la porción de regulador que contiene una base universal. En este caso, el cebador convencional se añade solamente en la primera etapa de la amplificación con el ACP, y sólo un cebador arbitrario preseleccionado, correspondiente a la secuencia de la porción en el extremo 5' del ACP, se añade en la segunda etapa de amplificación. En una realización preferida, el procedimiento alternativo se puede utilizar cuando cada porción 3' de un par de ACPs a utilizar en la primera etapa de amplificación tiene una temperatura de fusión (T_m) diferente. " T_m " se refiere a la temperatura a la que la mitad de los cebadores está reasociado a la región diana.

Dos etapas de amplificación de los presentes métodos (en el caso de la amplificación a partir de ARNm, incluida la transcripción inversa) están separadas solamente en el tiempo. La amplificación en primera fase debería ser seguida por la amplificación en segunda fase. Se debe entender que la mezcla de reacción de la amplificación en primera fase podría incluir los cebadores correspondientes a la porción en el extremo 5' que se utilizará para la reasociación a las secuencias de las porciones en los extremos 5' de los ACPs en la amplificación en segunda fase, lo que significa que los cebadores correspondientes a la porción en el extremo 5' se pueden añadir a la mezcla de reacción en el momento o después de la etapa de amplificación en primera fase.

Como un procedimiento alternativo, en la etapa de amplificación en segunda fase las secuencias completas de los ACPs utilizadas en la etapa de amplificación en primera fase, en lugar de los cebadores correspondientes a las porciones en el extremo 5' de los ACPs se pueden utilizar como cebadores a las condiciones de alta rigurosidad para re-amplificar el producto generado de la etapa de amplificación en primera fase, en donde los extremos 3' y 5' del producto procedente de la etapa de amplificación en primera fase que se genera de la reasociación y extensión de la secuencia de la porción en el extremo 3' del conjunto de ACPs al ácido nucleico molde en las condiciones de alta rigurosidad comprenden la secuencia o secuencia complementaria de ACP y también sirven como sitios de apareamiento perfectos al conjunto de ACP. En este sentido, se prefiere este procedimiento alternativo, ya que no necesita añadir adicionalmente los cebadores correspondientes a las porciones en el extremo 5' de los ACPs a la mezcla de reacción en el momento de o después de la etapa de amplificación en primera fase. La Fig. 1A también ilustra una representación esquemática para amplificar selectivamente un ácido nucleico diana por medio del procedimiento alternativo antes reseñado.

La reasociación o la hibridación en los presentes métodos se realiza en condiciones rigurosas que permiten una unión específica entre una secuencia de nucleótidos y ACP. Condiciones rigurosas de este tipo para la reasociación serán dependientes de la secuencia y variarán en función de parámetros medioambientales. En los presentes métodos la amplificación en segunda fase se realiza generalmente bajo condiciones más rigurosas que la amplificación en primera fase.

En una realización preferida, la primera temperatura de reasociación oscila entre aproximadamente 30°C y 68°C para la etapa de amplificación en primera fase, más preferiblemente entre 40°C y 65°C. Se prefiere que la segunda temperatura de reasociación oscila entre aproximadamente 50°C y 72°C para la etapa de amplificación en segunda fase. De acuerdo con una realización más preferida, la primera temperatura de reasociación es igual o inferior a la segunda temperatura de reasociación. La longitud o temperatura de fusión (T_m) de la secuencia de la porción en el extremo 3' de ACP determinará la temperatura de reasociación para la amplificación en primera fase. Por ejemplo, en el caso de que el ACP comprenda 10 nucleótidos arbitrarios en la porción en el extremo 3', preferiblemente la temperatura de reasociación será entre aproximadamente 45°C y 55°C para la amplificación en primera fase.

De acuerdo con los presentes métodos, la amplificación en primera fase bajo condiciones de baja rigurosidad se llevan a cabo durante al menos 2 ciclos de reasociación, extensión y desnaturalización para mejorar la especificidad de la reasociación del cebador durante la amplificación en primera fase y, a través de los subsiguientes ciclos, la amplificación en segunda fase prosigue más eficazmente bajo condiciones de alta rigurosidad. La amplificación en primera fase se puede llevar a cabo durante hasta 30 ciclos. En una realización preferida, la amplificación en primera fase se lleva a cabo durante 2 ciclos. En otra realización, la amplificación en segunda fase bajo condiciones de alta rigurosidad se lleva a cabo durante al menos un ciclo (de preferencia, al menos 5 ciclos) y durante hasta 45 ciclos para amplificar el producto en la primera fase. En una realización más preferida, la amplificación en segunda fase se lleva a cabo durante 25-35 ciclos. Condiciones de alta y baja rigurosidad se pueden determinar fácilmente a partir de lo convencional conocido en la técnica. "Ciclo" se refiere al procedimiento que resulta en la producción de una copia de ácido nucleico diana. Un ciclo incluye una etapa de desnaturalización, una etapa de reasociación y una etapa de extensión.

En la realización más preferida, la amplificación se realiza de acuerdo con la PCR que se describe en las pat. de EE.UU. n°s 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159.

De acuerdo con una realización preferida, cuando se lleva a cabo la amplificación en primera fase, la porción en el extremo 3' del par de cebadores del ACP está implicada en la reasociación a la primera temperatura de reasociación y cuando se lleva a cabo la amplificación en segunda fase, la porción en el extremo 5' del par de cebadores sirve como un sitio de cebado. Una alteración de este tipo de la porción para implicarse en la reasociación se atribuye al propio ACP, en particular a la porción de regulador del ACP. En los presentes métodos, la porción de regulador del ACP es capaz de restringir la porción de reasociación del ACP a su porción en el extremo 3' a la primera temperatura de reasociación, responsable de mejorar la especificidad para una secuencia diana.

Los presentes métodos se pueden combinar con muchos otros procedimientos conocidos en la técnica para lograr un objetivo específico. Por ejemplo, el aislamiento (o purificación) de producto amplificado puede seguir a la amplificación en segunda fase. Esto se puede lograr mediante electroforesis en gel, cromatografía en columna, cromatografía de afinidad o hibridación. Además, el producto amplificado de esta invención se puede insertar en un vehículo adecuado para la clonación. Además, el producto amplificado de esta invención se puede expresar en un adecuado vector de expresión que alberga al hospedante. Con el fin de expresar el producto amplificado, se preparará un vector de expresión que lleve el producto amplificado bajo el control de u operativamente enlazado a un promotor. El promotor se origina a partir del vector propiamente dicho o la porción extrema del producto amplificado, que puede corresponder

a la porción en el extremo 5' del ACP. Están disponibles muchas técnicas convencionales para construir vectores de expresión que contienen el producto amplificado y secuencias de transcripción/traducción/control con el fin de conseguir la expresión de proteínas o péptidos en una diversidad de sistemas de expresión del hospedante. El promotor utilizado para el hospedante procariótico incluye, pero no se limita al promotor *pLA*, el promotor *trp*, el promotor *lac* y el promotor T7. El promotor utilizado para hospedantes eucarióticos incluye, pero no se limita al promotor de metalotioneína, promotor tardío de adenovirus, promotor 7.5K de virus vacuna y los promotores derivados de polio-
 5 *ma*, adenovirus 2, virus de simio 40 y citomegalovirus. Determinados ejemplos de hospedantes procarióticos son *E. coli*, *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias tales como *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, y diversas especies de *Pseudomonas*. Además de microorganismos, también se pueden utilizar como hospedantes cultivos de
 10 células derivadas de organismos pluricelulares. En principio, es factible cualquier cultivo celular, ya sea un cultivo de vertebrados o de invertebrados. Además de células de mamíferos, éstas incluyen sistemas de células de insectos infestados con vectores de expresión recombinantes (p. ej. baculovirus) y sistemas de células vegetales infestados con vectores de expresión recombinantes (p. ej. virus del mosaico de la coliflor, virus del mosaico del tabaco) o transfor-
 15 mados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej. plásmido Ti) que contienen una o más secuencias codificadoras. El polipéptido expresado a partir del producto amplificado se puede purificar, generalmente, con una diversidad de propósitos de acuerdo con el método conocido en la técnica.

En otro aspecto de esta invención, se proporciona un kit para la amplificación de ácidos nucleicos de la presente invención descritos previamente, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores
 20 para el control de la reasociación antes indicado.

Todavía en otro aspecto de esta invención, se proporciona un kit para la amplificación selectiva de una secuencia de ácidos nucleicos diana a partir de ADN descrito previamente, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores para el control de la reasociación antes indicado.
 25

En un aspecto adicional de esta invención se proporciona un kit para la amplificación selectiva de una secuencia de ácidos nucleicos diana a partir de ARNm descrito previamente, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores para el control de la reasociación antes indicado.

De acuerdo con una realización de esta invención, estos kits comprenden, además, un cebador o un par de cebadores, teniendo cada uno de los cuales una secuencia de nucleótidos correspondiente a la porción en el extremo 5' del ACP; en el caso de que la porción en el extremo 5' comprende una secuencia del cebador universal, es más preferible que el kit comprenda los cebadores universales. Los presentes kits pueden incluir, opcionalmente, los reactivos requeridos para realizar reacciones PCR tales como tampones, ADN polimerasa, cofactores de ADN polimerasa y de-
 35 soxirribonucleótido-5'-trifosfatos. Opcionalmente, los kits también pueden incluir diversas moléculas de polipéptidos, transcriptasa inversa, diversos tampones y reactivos, y anticuerpos que inhiben la actividad de la ADN polimerasa. Los kits también pueden incluir reactivos necesarios para realizar reacciones de control positivo y negativo. Por parte del experto se pueden determinar fácilmente las cantidades óptimas de reactivos a utilizar en una reacción dada con los beneficios de la actual descripción. Típicamente, los kits están destinados a contener en envases o compartimientos
 40 separados los constituyentes antes descritos.

II. Aplicación a la amplificación de ADN multiplex

Esta aplicación utilizando ACP de la presente invención también puede proporcionar un método mejorado para
 45 amplificar más de una secuencia diana utilizando más de un par de cebadores en la misma reacción. En general, es extremadamente difícil establecer condiciones de PCR para amplificar más de 10 dianas en paralelo, ya que se requiere una reacción PCR óptima para amplificar incluso un locus específico sin sub-productos inespecíficos algunos, de modo que los investigadores que han logrado la PCR multiplex han tenido que trabajar duro para optimizar sus sistemas. Dado que la reasociación necesita tener lugar a una temperatura lo suficientemente elevada para permitir que ocurran
 50 perfectos apareamientos de ADN-ADN en la reacción, el ACP de la presente invención es ideal para la optimización de la amplificación de ADN multiplex debido a su función de mejorar la especificidad de la amplificación. "PCR multiplex", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la amplificación simultánea de dianas de ADN multiplex en una sola mezcla de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Todavía en otro aspecto de esta invención se proporciona un método para amplificar más de una secuencia de nucleótidos diana, utilizando más de un par de cebadores en la misma reacción, en el que el método comprende realizar una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs antes descritos. Preferiblemente, el cebador de acuerdo con la estructura del ACP es uno que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante esencialmente complementaria a una región de la
 60 secuencia de ácidos nucleicos diana para hibridarse con la misma.

En una realización específica de esta invención se proporciona el método de utilizar amplificaciones en dos fases, que comprende:

(a) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de más de una secuencia de nucleótidos diana a una primera temperatura de reasociación, que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando los pares de cebadores de uno cualquiera de los ACPs anteriores, en los que su porción en el extremo 3' cada uno de los pares de cebadores tiene una secuencia de nucleótidos hibridante esencialmente

complementaria a una región de la secuencia de ácidos nucleicos diana para hibridarse con la misma, bajo condiciones en las que cada uno de los pares de cebadores se reasocia a su secuencia de nucleótidos diana, con lo que se generan los productos de amplificación de secuencias de nucleótidos diana; y

- 5 (b) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase de los productos de amplificación generados en la etapa (a) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando los mismos pares de cebadores que los utilizados en la etapa (a) o utilizando pares de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada que corresponde a cada porción en el extremo 5' de los pares de cebadores
10 utilizados en la etapa (a), bajo condiciones en las que cada par de cebadores se reasocia a las secuencias de los extremos 3' y 5' de los productos de amplificación generados a partir de la etapa (a), respectivamente, con lo que se re-amplifica productos de amplificación en la misma reacción.

Dado que esta aplicación utilizando el ACP de esta invención se lleva a cabo de acuerdo con los presentes métodos para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos previamente comentados, excepto el utilizar más de una
15 secuencia de ácidos nucleicos diana y pares de cebadores, se omiten las descripciones comunes entre ellos con el fin de evitar la complejidad de esta memoria descriptiva que conduzca a una multiplicidad excesiva.

Por ejemplo, la composición y estructura del ACP utilizado y las condiciones para la amplificación son comunes
20 entre este procedimiento y los presentes métodos para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos previamente comentadas.

En una realización preferida, los productos amplificados procedentes de cada una de las secuencias de nucleótidos diana son de tamaño diferente para análisis subsiguientes.

De acuerdo con una realización preferida, los productos de amplificación de las secuencias de nucleótidos diana multiplex se pueden analizar a través de la separación por tamaños. La comparación a través de la separación por
25 tamaños se realiza utilizando una diversidad de métodos conocidos en la técnica, tal como electroforesis a través de una matriz de gel de poliacrilamida o matriz de gel de agarosa y la secuenciación de nucleótidos. La secuenciación de nucleótidos se puede llevar a cabo rápidamente con un secuenciador automático disponible de diversos fabricantes.

Tal como se ejemplifica en el Ejemplo que figura más abajo, el ACP de esta invención permite que los productos amplificados finales estén exentos de problemas de fondo, así como de no especificidad que surge de los cebadores
30 convencionales utilizados en métodos de amplificación de ácidos nucleicos multiplex conocidos en la técnica.

La ventaja de la amplificación multiplex es que se pueden analizar en la misma reacción numerosas enfermedades o alteraciones específicas en las secuencias de nucleótidos (p. ej. polimorfismo de un solo nucleótido o mutación
35 puntual).

El número de análisis que se puede realizar simultáneamente es ilimitado, pero el límite superior es probablemente de aproximadamente 20 y es probable que dependa de la diferencia de tamaños requerida para la resolución y los
40 métodos que estén disponibles para resolver el producto amplificado.

En otro aspecto de esta invención, se proporciona un kit para amplificar más de una secuencia de nucleótidos diana simultáneamente en la misma reacción, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de
45 cebadores para el control de la reasociación antes descrito. De acuerdo con una realización de esta invención, estos kits comprenden, además, un cebador o un par de cebadores que tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la porción en el extremo 5' del ACP; en el caso de que la porción en el extremo 5' comprenda una secuencia del cebador universal, es más preferible que el kit comprenda los cebadores universales. Los presentes kits pueden
50 incluir, opcionalmente, los reactivos requeridos para realizar reacciones PCR tales como tampones, ADN polimerasa, cofactores de ADN polimerasa y desoxirribonucleótido-5'-trifosfatos. Opcionalmente, los kits también pueden incluir diversas moléculas de polipéptidos, transcriptasa inversa, diversos tampones y reactivos, y anticuerpos que inhiben la actividad de la ADN polimerasa. Los kits también pueden incluir reactivos necesarios para realizar reacciones de control positivo y negativo. Por parte del experto se pueden determinar fácilmente las cantidades óptimas de reactivos
55 a utilizar en una reacción dada con los beneficios de la actual descripción. Típicamente, los kits están destinados a contener en envases o compartimientos separados los constituyentes antes descritos.

El método y el kit de la presente invención se pueden aplicar al diagnóstico de enfermedades genéticas e infecciosas, determinación del sexo, análisis de enlaces genéticos y estudios forensicos.

60 III. Aplicación a la identificación de genes expresados diferencialmente

Esta aplicación utilizando ACP de la presente invención también puede proporcionar un método mejorado para detectar y clonar ADNcs complementarios a ARNm expresados diferencialmente en dos o más muestras de ácidos
65 nucleicos.

Todavía en otro aspecto de esta invención se proporciona un método para detectar ADN complementario a ARNm expresado diferencialmente en dos o más muestras de ácidos nucleicos, en donde el método comprende transcribir

de forma inversa el ARNm y realizar una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs descritos anteriormente. Preferiblemente, el cebador de acuerdo con la estructura del ACP es uno que tenga en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante (preferiblemente secuencia arbitraria) esencialmente complementaria a una región de cadenas de ADNcs generadas a partir de transcripción inversa.

En una realización específica de esta invención, se proporciona el método que utiliza amplificaciones en dos fases, que comprende:

(a) proporcionar una primera muestra de ácidos nucleicos que representa una primera población de transcritos de ARNm y una segunda muestra de ácidos nucleicos que representa una segunda población de transcritos de ARNm;

(b) poner en contacto, por separado, cada una de la primera muestra de ácidos nucleicos y la segunda muestra de ácidos nucleicos con un primer cebador de uno cualquiera de los ACPs antes descritos, en que la porción en el extremo 3' del primer cebador comprende una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a un primer sitio en el ARNm expresado diferencialmente para hibridarse con el mismo, bajo condiciones suficientes para que ocurra la síntesis de ácidos desoxirribonucleicos enzimática, impulsada por el molde;

(c) transcribir de forma inversa el ARNm expresado diferencialmente al que se hibrida el primer cebador para producir una primera población de primeras cadenas de ADNc que son complementarias al ARNm expresado diferencialmente en la primera muestra de ácidos nucleicos a la que se hibrida el primer cebador, y una segunda población de primeras cadenas de ADNc que son complementarias al ARNm expresado diferencialmente en la segunda muestra de ácidos nucleicos a la que se hibrida el primer cebador;

(d) purificar y cuantificar cada una de las primera y segunda poblaciones de primeras cadenas de ADNc;

(e) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de cada una de las primera y segunda poblaciones de primeras cadenas de ADNc obtenida de la etapa (d) a una primera temperatura de reasociación, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un segundo cebador de cualquiera de los ACPs antes descritos que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante esencialmente complementaria a un segundo sitio en la primera y segunda poblaciones de primeras cadenas de ADNc, bajo condiciones en las que el segundo cebador se reasocia al segundo sitio en cada población de las primeras cadenas de ADNc, con lo que se generan las primera y segunda poblaciones de segundas cadenas de ADNc;

(f) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase de cada segunda cadena de ADNc generada en la etapa (e) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando los mismos primero y segundo cebadores que los utilizados en las etapas (b) y (c), respectivamente, o utilizando un par de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada que corresponde a cada porción en el extremo 5' de los primero y segundo cebadores utilizados en las etapas (b) y (c), respectivamente, bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a las secuencias en los extremos 3' y 5' de cada la segunda cadena de ADNc, respectivamente, con lo que se generan productos de amplificación de las segundas cadenas de ADNc, y

(g) comparar la presencia o nivel de productos de amplificación individuales en las primera y segunda poblaciones de productos de amplificación obtenidos de la etapa (f).

Dado que esta aplicación utilizando el ACP de esta invención emplea los presentes métodos para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos previamente comentadas, se omiten las descripciones comunes entre ellas, con el fin de evitar la complejidad de esta especificación que conduce a una multiplicidad indebida.

En la Fig. 2A se ilustra una representación esquemática para identificar genes expresados diferencialmente utilizando un nuevo ACP.

En el presente método, la muestra de ácidos nucleicos que representa una población de transcritos de ARNm se puede obtener de una diversidad de materiales biológicos. En general, la primera muestra de ácidos nucleicos comprende ARNm expresado en una primera célula y la segunda muestra de ácidos nucleicos comprende ARNm expresado en una segunda célula. En particular, la primera muestra de ácidos nucleicos comprende ARNm expresado en una primera célula en una primera fase de desarrollo y la segunda muestra de ácidos nucleicos comprende ARNm expresado en una primera célula en una segunda fase de desarrollo. Además, la primera muestra de ácidos nucleicos comprende ARNm expresado en una célula tumorigénica, y la segunda muestra de ácidos nucleicos comprende ARNm expresado en una célula normal.

Las etapas (e) y (f) de la presente solicitud pueden ocurrir en un solo tubo utilizando la misma mezcla de reacción, excepto para los cebadores, lo que significa que las etapas (e) y (f) están separadas solamente en el tiempo. Se entendería que los cebadores correspondientes a la porción en el extremo 5' puedan añadirse a la mezcla de reacción en el momento de o después de la síntesis de la segunda cadena de ADNc. En una realización preferida, los cebadores correspondientes a la porción en el extremo 5' se añaden a la mezcla de reacción después de haberse completado la etapa (e), seguido de la subsiguiente amplificación por PCR de las segundas cadenas de ADNc.

Se entendería también que las secuencias en la porción extrema 5' de los primero y segundos ACPs utilizados en las etapas (b) y (e), respectivamente, puedan ser secuencias idénticas o diferentes; si son idénticas, se utilizará en la etapa (f) un cebador correspondiente a la secuencia de la porción en el extremo 5', mientras que si son diferentes, se utilizarán en la etapa (f) dos cebadores, cada uno de ellos correspondiente a la secuencia de cada una de las porciones en el extremo 5' de ACPs. En una realización preferida, las secuencias de las porciones en el extremo 5' de los primero y segundo ACPs utilizados en las etapas (b) y (e) son diferentes y, así, en la etapa (f) se utilizan dos cebadores, cada uno correspondiente a la secuencia de cada una de las porciones en el extremo 5' de ACPs.

Como un procedimiento alternativo, se pueden utilizar como cebadores en la etapa (f) las secuencias completas de los primero y segundo ACPs utilizados en las etapas (b) y (e), respectivamente, en lugar de los cebadores correspondientes a las porciones en el extremo 5' de los ACPs, a las condiciones de alta rigurosidad para amplificar cada una de las segundas cadenas de ADN obtenidas en la etapa (e), en donde los extremos 3' y 5' de las segundas cadenas de ADN, que inicialmente se sintetizan utilizando el segundo ACP, comprenden la secuencia del primer ACP y la secuencia complementaria del segundo ACP, respectivamente, y también sirven como sitios de apareamiento perfectos a los primero y segundo ACPs. En este sentido, se prefiere este procedimiento alternativo, no existe la necesidad de añadir los cebadores correspondientes a las porciones en el extremo 5' de los ACPs a la mezcla de reacción en el momento de o después de la reacción PCR en primera fase. La Fig. 2B ilustra una representación esquemática para identificar genes expresados diferencialmente mediante el procedimiento alternativo reseñado anteriormente.

El método de la presente solicitud para detectar diferencias en la expresión de genes usa sólo un cebador para la síntesis de ADN (el primer ACP) para que reaccione con ARNm, a diferencia de la PCR de expresión diferencial que requiere múltiples cebadores de anclaje para la síntesis de ADNc. En el método de expresión diferencial original, esbozado por Liang y Pardee en 1992, se han introducido doce cebadores de anclaje. Los cebadores de anclaje, por ejemplo que tienen una secuencia de T_{12MN3} , en que M es A, C o G y N es A, C, G o T, producían doce poblaciones de ADNc separadas. Recientemente, se han propuesto cebadores de anclaje modificados para alterar el número de nucleótidos, tales como uno o tres en lugar de dos en el extremo 3' que se pueden hibridar a una secuencia que está situada inmediatamente en la posición 5' a la cola poliA de ARNms, o extendiendo nucleótidos adicionales en el extremo 5', al tiempo que conservan la cola oligo $(dT)_{9-12} MN$, dando como resultado al menos 21 nucleótidos de longitud (Villeponteau *et al.*, 1996, Combates *et al.*, 2000).

La presente invención concierne a las realizaciones del ACP utilizado en este método para la identificación de genes expresados diferencialmente, en donde el primer ACP utilizado en la etapa (b) se representa por la siguiente fórmula general (2): $5'-dX_p-dY_q-dT_r-3'$, en donde dX es uno de los cuatro desoxirribonucleótidos A, C, G o T; dY es una porción de regulador que comprende bases universales responsables de la función principal del ACP asociado con la alteración de la temperatura de reasociación durante la PCR; dT es un desoxirribonucleótido T; p, q y r representan un número entero, respectivamente; dX_p representa la porción en el extremo 5' y contiene una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada; dY_q contiene al menos 2 bases universales; dT_r representa la porción en el extremo 3'; la secuencia de nucleótidos de la porción en el extremo 3' debería tener una T_m inferior a la de la porción en el extremo 5'. La fórmula (2) sigue básicamente la norma de la fórmula (1). La porción en el extremo 3' de la fórmula (2) consiste en las secuencias capaces de reasociarse a la cola poli A de ARNm y sirve como un cebador para la síntesis de ADNc para la transcripción inversa de ARNm.

En una realización preferida, la porción en el extremo 3' del primer ACP utilizado en la etapa (b) contiene al menos 6 nucleótidos T de longitud, lo cual se considera un requisito mínimo de longitud para la reasociación del cebador. Más preferiblemente, la secuencia de la porción en el extremo 3' es de 10 a 20 nucleótidos T y puede ser de hasta 30 nucleótidos T de longitud. Lo más preferiblemente, la secuencia de la porción en el extremo 3' es de aproximadamente 15 nucleótidos T de longitud. Este cebador se denomina cebador para el control de la reasociación dT₁₅ (dT₁₅-ACP). En una realización preferida, el primer cebador tiene la fórmula general de $5'-dX_{15-30}-dY_{2-10}-dT_{10-20}-3'$, en donde dX representa un desoxirribonucleótido y comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada, no esencialmente complementaria a las primera y segunda poblaciones de ARNms; dY representa la porción de regulador que comprende 2-10 bases universales o análogos de bases no discriminatorias; y dT representa un desoxirribonucleótido contiguo, capaz de reasociarse al primer sitio en las primera y segunda poblaciones de ARNms.

En una realización, la porción en el extremo 3' del primer ACP utilizado en la etapa (b) puede contener al menos un nucleótido adicional en el extremo 3' que puede hibridarse a una secuencia de ARNm que está situada inmediatamente más arriba de la cola poliA. Los nucleótidos adicionales en el extremo 3' del primer ACP pueden ser de hasta 3 de longitud. Por ejemplo, dT puede comprender, adicionalmente, 3'-V en su extremo 3'; en que V es uno seleccionado del grupo que consiste en desoxiadenosina, desoxicitidina y desoxiguanosina. Además, dT puede comprender, adicionalmente, 3'-NV en su extremo 3'; en que V es uno seleccionado del grupo que consiste en desoxiadenosina, desoxicitidina y desoxiguanosina, y N es uno seleccionado del grupo que consiste en desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxicitidina y desoxiguanosina. Lo más preferiblemente, la secuencia de la porción en el extremo 3' del primer ACP utilizado en la etapa (b) contienen dT₁₅ solamente.

En una realización preferida, el primer ACP entero es de aproximadamente 40-45 nucleótidos de longitud y comprende dT₁₅ de la porción en el extremo 3', dX_{20-25} de la porción en el extremo 5' y dY₅ entre las porciones en los extremos 3' y 5'. El primer ACP entero puede ser de hasta 100 nucleótidos de longitud. El primer cebador se ejemplifica por las SEQ ID N°s: 30, 39, 57 y 61-63.

El primer ACP descrito en esta memoria se hibrida a la cola poli A del ARNm, que está presente en todos los ARNms, excepto en una pequeña minoría de ARNms. El uso del primer ACP utilizado en esta invención da como resultado sólo una reacción y produce sólo una población de ADNc, en contraposición a al menos 3 a 64 poblaciones de ADNc separadas, generadas por los cebadores de anclaje convencionales de la técnica de expresión diferencial. Esto aumenta grandemente la eficacia del método al generar una agrupación esencialmente estándar de ADNc de cadena sencilla a partir de cada una de las poblaciones de ARNm experimentales.

En la etapa (d), las agrupaciones estándares de ADNc sintetizadas por el primer ACP deberían purificarse y después cuantificarse por técnicas bien conocidas por un experto ordinario en la técnica, tal como espectrofotometría. Esta etapa es necesaria para controlar con precisión sus aportaciones a la etapa de amplificación y luego comparar los productos amplificados finales entre dos o más muestras. Preferiblemente, se mide la cantidad de ADNc producido en este punto del método. Es más preferible que esta determinación se haga utilizando espectroscopía ultravioleta, a pesar de que para uso para estos propósitos es aceptable para los expertos ordinarios en la técnica cualquier proceso estándar conocido para cuantificar ADNc. Cuando se utiliza el proceso de espectroscopía UV, se utiliza ventajosamente una absorbancia de aproximadamente 260 nm de luz UV. Por lo tanto, midiendo la cantidad de ADNc en esta etapa, se puede estandarizar la cantidad de ADNc entre muestras en la reacción de amplificación siguiente.

Después de la síntesis de las primeras cadenas de ADNc utilizando el primer ACP, las segundas cadenas de ADNc se sintetizan utilizando el segundo promotor ACP bajo condiciones de baja rigurosidad, mediante al menos un ciclo que comprende desnaturalización, reasociación y extensión del cebador, en donde las primeras cadenas de ADNc se utilizan como moldes.

La segunda ACP sigue básicamente la regla de la fórmula (1) y su porción en el extremo 3' comprende una corta secuencia arbitraria, que preferiblemente tiene una T_m inferior a la de la porción en el extremo 5'. Este cebador se denomina un cebador para el control de la reasociación arbitrario (AR-ACP - siglas en inglés). En una realización preferida, la porción en el extremo 3' del segundo ACP puede tener de 8 a 15 nucleótidos de longitud. Lo más preferiblemente, la porción en el extremo 3' del segundo ACP contiene aproximadamente 10 nucleótidos de longitud.

De acuerdo con una realización preferida, el segundo ACP tiene la fórmula general de 5'-dX₁₅₋₃₀-dY₂₋₁₀-dZ₆₋₁₅-3', en donde dX representa un desoxirribonucleótido y comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada, no esencialmente complementaria a las primera y segunda poblaciones de las primeras cadenas de ADNc; dY representa la porción de regulador que comprende 2-10 bases universales o análogos de bases no discriminatorias; dZ representa una secuencia de nucleótidos arbitraria hibridante, capaz de reasociarse al segundo sitio en las primera y segunda poblaciones de cadenas de ADN. Más preferiblemente, el segundo ACP entero es de aproximadamente 40-45 nucleótidos de longitud que comprende dZ₁₀ de la porción en el extremo 3', dX₂₀₋₂₅ en la porción en el extremo 5' y dY₅ entre las porciones en los extremos 3' y 5'. El segundo ACP entero puede ser de hasta 100 nucleótidos de longitud. El segundo cebador se ejemplifica por las SEQ ID N°s: 1-9, 13-18 y 20-23.

El segundo ACP descrito en esta memoria es diferente de un denominado cebador arbitrario largo, tal como se utiliza en la técnica de expresión diferencial modificada conocida. Por ejemplo, los cebadores arbitrarios convencionales largos, según se describe por Villeponteau *et al.* (1996) y Daichenko *et al.* (1996), que son de al menos 21 a 25 nucleótidos de longitud, están constituidos solamente por nucleótidos arbitrarios en las secuencias enteras. Estos cebadores arbitrarios largos convencionales se hibridarán de una manera no predecible a la baja temperatura de reasociación (aproximadamente 40°C) que se requiere para lograr un cebado arbitrario en el ciclo temprano de la PCR, de manera que es imposible diseñar racionalmente un conjunto representativo de cebadores. Además de ello, muchas de las bandas representan el mismo ARNm, debido a la "pegajosidad" de los cebadores largos cuando se utilizan bajo una rigurosidad baja de este tipo.

Las ventajas del presente método para detectar genes expresados diferencialmente se atribuyen predominantemente al uso del segundo ACP. Dado que el segundo ACP está diseñado para limitar la reasociación del segundo ACP a su secuencia de la porción en el extremo 3', en asociación con la temperatura de reasociación, la reasociación resultante se producirá de una manera predecible, de modo que es posible diseñar racionalmente un conjunto representativo de cebadores. Además, el uso del segundo ACP permite evitar problemas falsos positivos causados por la "pegajosidad" de los cebadores largos convencionales bajo las condiciones de baja rigurosidad tal como se utilizan en la técnica de expresión diferencial previa.

La temperatura de reasociación utilizada para la síntesis de las segundas cadenas de ADN en condiciones de baja rigurosidad utilizada en la etapa (e) es de preferencia aproximadamente entre 40°C y 65°C, más preferiblemente aproximadamente entre 45°C y 55°C y, lo más preferiblemente, de aproximadamente 50°C. Sin embargo, a diferencia de la expresión diferencial, que utiliza temperaturas de reasociación entre 35°C y 45°C, la temperatura de reasociación de condiciones de baja rigurosidad utilizada en la presente solicitud es relativamente más alta que la utilizada en las técnicas de expresión diferencial clásicas o reforzadas conocidas con cebadores arbitrarios.

Otros rasgos únicos y significativos de la presente solicitud para detectar genes expresados diferencialmente consisten en empujar solamente las segundas cadenas de ADN inicialmente sintetizadas de la subsiguiente amplificación, en donde los extremos 3' y 5' de las segundas cadenas de ADN que han sido inicialmente sintetizadas utilizando el segundo ACP comprenden la secuencia complementaria del primer ACP y la secuencia del segundo ACP, respectivamente, y, así, las secuencias enteras de los primero y segundo ACPs o solamente sus secuencias de la porción en

el extremo 5' de los primero y segundo ACPs, o solamente sus secuencias en la porción extrema 5' de los primero y segundo ACPs se utilizan como secuencias de cebadores 3' y 5' para la amplificación de las segundas cadenas de ADN.

Dado que el ACP en la presente solicitud conduce a la amplificación de productos específicos, puede ser posible eliminar fundamentalmente la causa de los problemas principales de cuello de botella, tales como productos falsos y una deficiente reproducibilidad, lo que resulta en una reasociación no específica de los cebadores arbitrarios convencionales y dT a las primera y la segunda cadenas de ADN, así como a productos amplificados durante la PCR en los métodos de expresión diferencial conocidos.

En una realización preferida, la síntesis de segundas cadenas de ADN en la etapa (e) se lleva a cabo mediante al menos 1 ciclo de amplificación bajo condiciones de baja rigurosidad para lograr un cebado arbitrario y, a través de los subsiguientes ciclos, la amplificación prosigue más eficazmente para la amplificación de las segundas cadenas de ADN resultantes bajo condiciones de alta rigurosidad utilizadas en la etapa (f). Lo más preferiblemente, la síntesis de segundas cadenas de ADN en la etapa (e) se lleva a cabo mediante un ciclo de amplificación en condiciones de baja rigurosidad.

En una realización preferida, las amplificaciones de las segundas cadenas de ADN resultantes, sintetizadas en la etapa (e) se lleva a cabo bajo condiciones de alta rigurosidad utilizando las secuencias completas de los primero y segundo ACPs utilizados en las etapas (b) y (e), respectivamente, como secuencias de cebador, en donde los extremos 3' y 5' de las segundas cadenas de ADN resultantes proporcionan sitios de apareamiento perfectos a los primero y segundo ACPs. Sin embargo, es interesante que los primero y segundo ACPs no estén implicados en alguna otra reasociación al ácido nucleico molde, excepto la reasociación y extensión de los extremos 3' y 5' de las segundas cadenas de ADN como una unidad de reacción a una condición de alta rigurosidad de este tipo, debido a que sus porciones en el extremo 3' requieren una temperatura de reasociación baja y las condiciones de alta rigurosidad no las permite reasociar sitio alguno del molde, excepto los extremos 3' y 5' de las segundas cadenas de ADN. Por consiguiente, debido a esta función de ACP, que es capaz de reasociarse selectivamente al molde en asociación con la temperatura de reasociación, los productos amplificados pueden estar exentos de problemas de la alta tasa falsa positiva, deficiente reproducibilidad y posible sub-representación de fracciones menores de ARNm en el análisis que son el problema principal de la expresión diferencial conocida. En este sentido, existe una diferencia significativa entre el presente método y los métodos de expresión diferencial convencionales, a pesar del hecho de que son comunes para utilizar los mismos cebadores para condiciones de alta rigurosidad, así como para condiciones de rigurosidad baja.

En una realización preferida, la temperatura de reasociación de la amplificación para condiciones de alta rigurosidad utilizadas en la etapa (f) es de preferencia de aproximadamente entre 55°C y 72°C. Lo más preferiblemente, la temperatura de reasociación utilizada para las condiciones de alta rigurosidad es de aproximadamente 65-68°C.

En una realización preferida, la amplificación en condiciones de alta rigurosidad utilizadas en la etapa (f) se lleva a cabo durante al menos 10 ciclos y hasta 50 ciclos para amplificar las segundas cadenas de ADN resultantes, sintetizadas por la etapa (e) durante la PCR. Lo más preferiblemente, la amplificación por PCR se lleva a cabo durante 40-45 ciclos.

El ADNc de la segunda cadena se sintetiza preferiblemente por la PCR, más preferiblemente por el método de comienzo caliente PCR, en el que el proceso es para establecer las reacciones completas sin la ADN polimerasa e incubar los tubos en el ciclador térmico para completar la etapa de desnaturalización inicial a >90°C. Luego, al tiempo que se mantienen los tubos a una temperatura superior a 70°C, se puede pipetear a la reacción la cantidad apropiada de ADN polimerasa. En una realización preferida, la adición de los cebadores para la amplificación en segunda fase a la mezcla de reacción después de la reacción completa de la síntesis de ADNc de la segunda cadena también se lleva a cabo bajo una temperatura de desnaturalización tal como >90°C. Luego, al tiempo que se mantienen los tubos a una temperatura superior a aproximadamente 90°C, se puede pipetear a la reacción la cantidad apropiada de cebadores para la amplificación en segunda fase.

Un ejemplo de la síntesis de la segunda cadena de ADN y la subsiguiente amplificación de las segundas cadenas de ADN resultantes en un solo tubo utilizando la secuencia arbitraria preseleccionada de las porciones en el extremo 5' de los primero y segundo ACPs se realiza bajo las siguientes condiciones: las segundas cadenas de ADN se sintetizan bajo condiciones de baja rigurosidad mediante un ciclo de la amplificación en primera fase, que comprende reasociación, extensión y reacción de desnaturalización; la mezcla de reacción que contiene el ADNc de la primera cadena, tampón de reacción PCR (p. ej. disponible de Roche), dNTP y el segundo ACP se precalienta a aproximadamente 94°C, al tiempo que se mantiene el tubo que contiene la mezcla de reacción a aproximadamente 94°C se añade Taq polimerasa (p. ej. disponible de Roche) a la mezcla de reacción, las reacciones PCR son como sigue: un ciclo a 94°C durante 1 min, 50°C durante 3 min y 72°C durante 1 min; seguido de la desnaturalización del producto de amplificación a 94°C; después de la reacción completa de la síntesis de la segunda cadena de ADN en la etapa (e), se añaden a la mezcla de reacción cebador arbitrario preseleccionado en 5' y cebador arbitrario preseleccionado en 3', y después la amplificación en segunda fase se realiza como sigue: 40 ciclos de 94°C durante 40 s, 68°C durante 40 s y 72°C durante 40s; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

Un ejemplo alternativo de la síntesis de la segunda cadena de ADN y la subsiguiente amplificación de las segundas cadenas de ADN resultantes en un solo tubo utilizando las secuencias completas de los primero y segundo ACPs utilizados en las etapas (b) y (e), respectivamente, en lugar de las secuencias arbitrarias preseleccionadas de las porciones

en el extremo 5' de los primero y segundo ACPs se realiza bajo las siguientes condiciones: las segundas cadenas de ADN se sintetizan bajo condiciones de baja rigurosidad mediante un ciclo de la amplificación en primera fase, que comprende reasociación, extensión y reacción de desnaturalización; la mezcla de reacción que contiene el ADNc de la primera cadena, tampón de reacción PCR (p. ej. disponible de Roche), dNTP, el primer ACP (dT₁₅-ACP) y el segundo ACP (AR-ACP) se precalienta a aproximadamente 94°C, al tiempo que se mantiene el tubo que contiene la mezcla de reacción a aproximadamente 94°C se añade Taq polimerasa (p. ej. disponible de Roche) a la mezcla de reacción; las reacciones PCR son como sigue: un ciclo a 94°C durante 1 min, 50°C durante 3 min y 72°C durante 1 min; seguido de la amplificación por PCR en segunda fase, que comprende reasociación, extensión y reacción de desnaturalización; las reacciones PCR son como sigue: un ciclo a 94°C durante 40 s, 65°C durante 40 s y 72°C durante 40s; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

Debe observarse que se utiliza una concentración apropiada de ACP arbitrario (el segundo ACP) para sintetizar los ADNcs de la segunda cadena mediante un ciclo de la amplificación en primera fase. Si la cantidad del segundo ACP utilizado en la etapa (e) es demasiado pequeña, los productos amplificados resultantes no son reproducibles. En contraposición, la cantidad en exceso del segundo ACP utilizado en la etapa (e) genera fondos tales como la difusión de ADN durante la PCR. En una realización preferida, la concentración del segundo ACP utilizado en la etapa (e) es aproximadamente entre 0,1 μ M y 1,0 μ M. Lo más preferiblemente, la concentración del segundo ACP así como del primer ACP es aproximadamente entre 0,2 μ M. En una realización preferida, la concentración de los cebadores utilizados en la etapa (f) es aproximadamente entre 0,1 μ M y 1 μ M, lo más preferiblemente aproximadamente 0,4 μ M.

Otro rasgo significativo de la presente aplicación a la identificación de diferencias en la expresión de genes es el uso de una alta temperatura de reasociación en un método. La alta temperatura de reasociación utilizada en la etapa (f) aumenta la especificidad de la reasociación del cebador durante la PCR, lo que resulta en la eliminación por completo de productos falsos positivos y en el incremento de la reproducibilidad. La exención de positivos falsos, que es uno de los cuellos de botella principales que quedan para la técnica previa de expresión diferencial es especialmente importante en la etapa de rastreo para la verificación de los fragmentos de ADNc identificados por la expresión diferencial.

La etapa de comparar la presencia o el nivel de productos de amplificación obtenidos en la etapa (f) se puede realizar de acuerdo con diversos métodos conocidos en la técnica. En una realización preferida, cada una de las primera y segunda poblaciones de productos de amplificación de la etapa (f) se resuelven mediante electroforesis para identificar ARNms diferencialmente expresados. Más preferiblemente, los fragmentos de ADNc de PCR resultantes se detectan sobre un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Otro rasgo prominente de esta presente aplicación es el uso de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para identificar ARNms diferencialmente expresados. En general, los métodos de expresión diferencial usan técnicas de detección radiactivas utilizando geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Sin embargo, de acuerdo con el presente método, la cantidad importante de los fragmentos de ADNc amplificados, obtenidos a través de amplificaciones en dos fases, permite utilizar un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para identificar los ADNcs amplificados, lo que resulta en el incremento de la velocidad y en la evitación del uso de radiactividad.

Alternativamente, los fragmentos de ADNc resultantes también se pueden detectar sobre un gel de poliacrilamida desnaturalizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como la tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994); Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

En otra realización, puede ser útil para fines de diagnóstico utilizar un sistema automático tal como un secuenciador de ADN automático con cualquier marcador distinto de los ACPs para detectar o analizar los productos amplificados (Bauer *et al.*, 1993).

Considerando los rasgos del ACP en esta presente aplicación, el presente método para detectar y clonar genes diferencialmente expresados difiere fundamentalmente de las técnicas de expresión diferencial previas según se describe antes.

En conclusión, el uso del ACP en este método hace posible permitir la amplificación de solamente segundas cadenas de ADN y el uso de la cantidad suficiente de materiales de partida, así como la alta concentración de dNTP, dando como resultado los siguientes beneficios: a) el aumento de la especificidad de reasociación del cebador, b) la eliminación del problema de falsos positivos que requiere el subsiguiente trabajo complejo de verificar positivos verdaderos, c) la mejora de la fiabilidad y reproducibilidad, d) la detección de SRNms raros, e) la generación de productos de la PCR de larga distancia, que oscilan entre un tamaño de 150 pb y 2,0 kb, f) el permiso del uso de gel de agarosa teñido con bromuro de etidio para detectar productos, g) el incremento de la velocidad de análisis, h) en particular, no requiriendo que el método sea realizado por manos bien entrenadas, e i) el permiso del diseño racional de un conjunto representativo de cebadores.

En un aspecto adicional de esta invención, se proporciona un kit para detectar ADN complementario a ARNm diferencialmente expresado, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores para el control de la reasociación antes descrito (el primer y segundo cebadores). De acuerdo con una realización de esta invención, estos kits comprenden, además, un cebador o un par de cebadores que tienen una secuencia de

nucleótidos correspondiente a la porción en el extremo 5' de los ACPs; en el caso de que la porción en el extremo 5' comprenda una secuencia de cebadores universales, es más preferido que el kit comprenda los cebadores universales. Los presentes kits pueden incluir, opcionalmente, los reactivos requeridos para realizar reacciones PCR tales como tampones, ADN polimerasa, cofactores de ADN polimerasa y desoxirribonucleótido-5'-trifosfatos. Opcionalmente, los kits pueden también incluir diversas moléculas de polinucleótidos, transcriptasa inversa, diversos tampones y reactivos y anticuerpos que inhiben la actividad de la ADN polimerasa. Los kits también pueden incluir reactivos necesarios para llevar a cabo reacciones de control positivas y negativas. Cantidades óptimas de reactivos a utilizar en una reacción dada se pueden determinar fácilmente por parte del experto con los beneficios de la presente descripción. Típicamente, los kits están destinados a contener en envases o compartimientos separados los constituyentes antes descritos.

IV. Aplicación a la amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE)

La aplicación utilizando el ACP de la presente invención puede proporcionar un método mejorado para amplificar rápidamente extremos de ADNc, las denominadas tecnologías RACE. Para ser específicos, el ACP de la presente aplicación está destinado a las tecnologías RACE relacionadas con cualquiera de los extremos 3' y 5', y elimina los problemas de fondo que resultan de los cebadores utilizados en las tecnologías RACE convencionales.

Todavía en otro aspecto de esta invención, se proporciona un método para amplificar rápidamente un fragmento de ADNc diana que comprende una región de ADNc correspondiente a la región del extremo 3' de un ARNm, en el que el método comprende transcribir a la inversa dicho ARNm y realizar una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs antes descritos. Preferiblemente, el cebador de acuerdo con la estructura del ACP es uno que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia de nucleótidos hibridante, específica para genes, esencialmente complementaria a un sitio en ADNc generado a partir de la transcripción inversa y/o uno que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a colas poli A de los ARNms.

En una realización específica de esta invención, se proporciona un método que utiliza amplificaciones en dos fases, que comprende:

(a) poner en contacto ARNms con un primer cebador de uno cualquiera de los ACP antes descritos, en que la porción en el extremo 3' del cebador comprende una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a colas poli A de los ARNms para hibridarse con ellos, bajo condiciones suficientes para que ocurra una síntesis de ácidos desoxirribonucleicos enzimática, impulsada por el molde;

(b) transcribir inversamente los ARNms a los que se hibrida el primer cebador para producir una población de primeras cadenas de ADNc que son complementarias a los ARNms a los que se hibrida el primer cebador;

(c) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de las primeras cadenas de ADNc a una primera temperatura de reasociación, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un segundo cebador de uno cualquiera de los ACPs antes descritos que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia de nucleótidos hibridante, específica para genes, esencialmente complementaria a un sitio en una de las primeras cadenas de ADNc para hibridarse con las mismas, bajo condiciones en las que el segundo cebador se reasocia a un sitio específico para genes en una de las primeras cadenas de ADNc, con lo que se genera una segunda secuencia de ADNc específica para genes; y

(d) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase de la segunda cadena de ADNc específica para genes generada en la etapa (c) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando los mismos primero y segundo cebadores que los utilizados en las etapas (a) y (c), respectivamente, o utilizando un par de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada que corresponde a cada porción en el extremo 5' de los primero y segundo cebadores utilizados en las etapas (a) y (c), bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a las secuencias de los extremos 3' y 5' de una la segunda cadena de ADNc específica para genes, respectivamente, con lo que se genera un producto de amplificación de una cadena de ADNc específica para genes.

Dado que esta aplicación utilizando el ACP de esta invención emplea el presente método para la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos previamente comentada, se omiten las descripciones comunes entre ellos, con el fin de evitar la complejidad de esta especificación que conduce a una multiplicidad indebida.

En la Fig. 3 se ilustra una representación esquemática para amplificar un fragmento de ADNc diana que comprende una región en el extremo 3' correspondiente al extremo 3' de ARNm utilizando un nuevo sistema de ACP, denominado 3' RACE basado en ACP.

Las etapas (c) y (d) de la presente aplicación pueden ocurrir en un solo tubo utilizando la misma mezcla de reacción, excepto los cebadores, lo que significa que las etapas (c) y (d) están separadas solamente en el tiempo. Debe entenderse que los cebadores correspondientes a la porción en el extremo 5' podrían añadirse a la mezcla de reacción en el momento de o después de la síntesis de la segunda cadena de ADNc. En una realización preferida, los cebadores

correspondientes a la porción en el extremo 5' se añaden a la mezcla de reacción justo después de haberse completado la etapa (2), seguido de la subsiguiente amplificación de segundas cadenas de ADNc.

Como un procedimiento alternativo, en la etapa (d) las secuencias completas de los primero y segundo ACPs, en lugar de los cebadores correspondientes a las porciones en el extremo 5' de los primero y segundo ACPs se pueden utilizar como cebadores 3' y 5' para amplificar el ADNc de la segunda cadena obtenido en la etapa (c), en donde los extremos 3' y 5' del ADNc de la segunda cadena, que inicialmente se sintetizan utilizando el segundo ACP, comprenden la secuencia complementaria del primer ACP y la secuencia del segundo ACP, respectivamente, y también sirven como sitios de apareamiento perfectos a los primero y segundo ACPs. La Fig. 3 ilustra también una representación esquemática para amplificar un fragmento de ADNc diana que comprende una región en el extremo 3' correspondiente al extremo 3' de ARNm mediante el procedimiento alternativo antes reseñado.

Uno de los rasgos importantes de la presente invención para la 3'-RACE es que el primer ACP que comprende la secuencia de nucleótidos esencialmente complementaria a la cola poli A de ARNm se utiliza como un cebador de la síntesis de ADNc y luego los ADNcs resultantes se utilizan directamente como moldes para la subsiguiente amplificación sin etapas de purificación adicionales algunas para separar el cebador de la síntesis de ADNc.

La reasociación del primer ACP a los moldes se interrumpirá subsiguientemente por el efecto de la porción de regulación en las porciones en los extremos 3' y 5' del ACP bajo condiciones de rigurosidad relativamente baja, según se describe en el principio de ACP. Como resultado, la presente aplicación a 3'-RACE simplifica los métodos RACE convencionales reduciendo la etapa de purificación y, también, el ACP utilizado en la presente aplicación no implica los problemas de fondo, debido a que la reasociación de la porción en el extremo 3' se especifica por la presencia de la porción de regulador situada entre las porciones en los extremos 3' y 5' en los ACPs, mientras que los cebadores de la síntesis de ADNc convencionales, tales como cebadores oligo-dT para la 3'-RACE generan fondos durante la PCR, que son productos no específicos. De acuerdo con una realización preferida, la fórmula del primer ACP para la síntesis de ADNc puede ser idéntica a la fórmula (2).

Cuando un cebador específico para genes se utiliza como cebador 5', la primera amplificación de un fragmento de ADNc diana que contiene una secuencia en el extremo 3' en la etapa (c) se lleva a cabo de acuerdo con métodos de PCR convencionales tal como se conocen en la técnica. La expresión "específica para genes", con referencia a la secuencia utilizada en esta memoria, se refiere a una secuencia parcial de un gen específico o un complemento del mismo que ha sido generalmente conocido o está disponible para un experto en la técnica. Por lo tanto, el cebador específico para genes significa uno que comprende la secuencia específica para genes.

La segunda cadena de ADNc generada se amplifica mediante la amplificación en segunda fase que se utiliza en la aplicación de la presente invención para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos diana de arriba. Dado que el ACP descrito en esta invención puede generar una T_m estable en un cebador y también puede tolerar "parámetros de búsqueda del cebador" para el diseño del cebador, tal como longitud del cebador, temperatura de reasociación, contenido GC y longitud del producto de PCR, es útil cuando las secuencias de cebadores específicos para genes tienen una T_m baja o son demasiado sensibles a parámetros de este tipo para generar productos específicos.

En otro aspecto de esta invención, se proporciona un método para amplificar rápidamente un fragmento de ADN diana que comprende una región de ADNc correspondiente a la región en el extremo 5' de un ARNm, en el que el método comprende transcribir a la inversa el ARNm y realizar una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs descritos arriba. Preferiblemente, el cebador de acuerdo con la estructura de ACP es uno que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia de nucleótidos hibridante, específica para genes, esencialmente complementaria a un sitio en el ADNc generado a partir de transcripción inversa.

En una realización específica de esta invención, se proporciona el método que utiliza amplificaciones en dos fases, que comprende:

(a) poner en contacto ARNms con un cebador de oligonucleótidos dT o cebador aleatorio como un cebador de la síntesis de ADNc bajo condiciones suficientes para que ocurra una síntesis del ácido desoxirribonucleico enzimática, impulsada por el molde, en que el cebador de la síntesis de ADNc comprende una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a una región de un ARNm para hibridarse con el mismo;

(b) transcribir inversamente los ARNms, utilizando una transcriptasa inversa, a los que se hibrida el cebador de la síntesis de ADNc para producir una población de primeras cadenas de ADNc que son complementarias a los ARNms a los que se hibrida el cebador de la síntesis de ADNc, con lo que se generan intermedios de ARNm-ADNc;

(c) permitir que residuos citosina sean añadidos como cola en los extremos 3' de las primeras cadenas de ADNc en forma de los intermedios de ARNm-ADNc mediante la reacción de transferasa terminal de la transcriptasa inversa;

(d) poner en contacto las colas de citosina en los extremos 3' de las primeras cadenas de ADNc generadas a partir de la etapa (c) con un oligonucleótido que comprende una porción en el extremo 3' y una porción en el extremo 5' separadas por un grupo de bases universales o análogos de bases no discriminatorias, en donde la porción en el extremo 3' comprende al menos tres residuos guanina en su extremo 3' para hibridarse con las colas de citosina en los

ES 2 314 093 T3

extremos 3' de las primeras cadenas de ADNc y la porción en el extremo 5' comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada, en condiciones en las que la porción en el extremo 3' del oligonucleótido se hibrida a las colas de citosina;

5 (e) extender los extremos 3' con colas de las primeras cadenas de ADNc para generar una secuencia adicional, complementaria al oligonucleótido utilizando transcriptasa inversa, en que el oligonucleótido sirve como un molde en la reacción de extensión, con lo que se extienden primeras cadenas de ADNc de longitud completa;

10 (f) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de las primeras cadenas de ADNc obtenidas de la etapa (e) a una primera temperatura de reasociación, que comprende (i) y (ii) como sigue:

15 (i) al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un primer cebador que comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente complementaria a las secuencias en el extremo 3' de las primeras cadenas de ADNc de longitud completa, en condiciones en las que el primer cebador se reasocia a los extremos 3' de las primeras cadenas de ADNc de longitud completa, con lo que se generan segundas cadenas de ADNc de longitud completa;

20 (ii) al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un segundo cebador de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante, específica para genes, esencialmente complementaria a una región en una de las segundas cadenas de ADNc de longitud completa para hibridarse con las mismas, en condiciones en las que el segundo cebador se reasocia a un sitio específico para genes en una de las segundas cadenas de ADNc de longitud completa, con lo que se genera una cadena de ADNc específica para genes;

25 (g) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase de la cadena de ADNc específica para genes a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando los mismos primer y segundo cebadores que los utilizados en las etapas (f)-(i) y (f)-(ii), respectivamente, o utilizando un par de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a cada porción en el extremo 5' de los primero y segundo
30 cebadores tal como se utilizan en las etapas (f)-(i) y (f)-(ii), respectivamente, bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a las secuencias en los extremos 3' y 5' de una cadena de ADNc específica para genes, respectivamente, con lo que se genera un producto de amplificación de una cadena de ADNc específica para genes.

35 Las representaciones esquemáticas para amplificar un fragmento de ADNc diana que comprende una región en el extremo 5' correspondiente al extremo 5' de ARNm utilizando un nuevo sistema de ACP, denominado 5'-RACE basado en ACP, se ilustra en las Figs. 4A (utilizando cebador de oligonucleótido dT) y 4B (utilizando un cebador aleatorio).

40 Las descripciones del cebador de oligonucleótido dT utilizado en la etapa (a) son idénticas a las utilizadas en el presente método de amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos diana a partir de un ARNm. Alternativamente, cuando el tamaño de un ARm diana es tan grande que la transcriptasa inversa cae antes de alcanzar las secuencias 5' completas, el cebador aleatorio se utiliza como cebador de la síntesis de ADNc.

45 De acuerdo con una realización preferida, la etapa (c), que permite incorporar como cola residuos citosina, se realiza en presencia de un ion manganeso.

50 Las etapas (f) y (g) de la presente aplicación puede ocurrir en un solo tubo utilizando la misma mezcla de reacción, excepto los cebadores, lo que significa que las etapas (f) y (g) están separadas solamente en el tiempo. Se entendería que el o los cebadores utilizados en cada etapa (f) y (g) puedan añadirse a la mezcla de reacción en el momento de o después de la síntesis de cada etapa. En una realización preferida, el o los cebadores añadidos a la mezcla de reacción después de haberse completado cada etapa, seguido de la subsiguiente amplificación por PCR de las segundas cadenas de ADNc.

55 Cuando se utiliza un cebador específico para genes como cebador 5', la amplificación de un fragmento de ADNc diana que contiene una secuencia en el extremo 5' en la etapa (f) se lleva a cabo bajo condiciones de alta rigurosidad de acuerdo con métodos de PCR convencionales, tal como se conoce en la técnica.

60 En una realización preferida, un fragmento de ADNc diana que contiene una secuencia en el extremo 5' en la etapa (f) se amplifica utilizando un segundo ACP que comprende una secuencia específica para genes en la porción en el extremo 3', mediante amplificaciones por PCR en dos fases que se utilizan en la aplicación de la presente invención para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos diana de antes. Dado que el ACP descrito en esta invención puede generar una T_m estable en un cebador y tolerar "parámetros de búsqueda del cebador", tal como el diseño del cebador, que comprende longitud del cebador, temperatura de reasociación, contenido GC y longitud del producto de PCR, es particularmente útil cuando las secuencias de cebadores específicos para genes tienen una T_m
65 baja o son demasiado sensibles a parámetros de este tipo para generar productos específicos. La fórmula del segundo ACP es idéntica a la fórmula (1), en la que la porción en el extremo 3' contiene una secuencia específica para genes.

El oligonucleótido para la etapa (d) es similar al cebador CapFinder (Chenchik *et al.*, 1998; Chenchik *et al.*, pat. de EE.UU. n°s 5.962.271 y 5.962.272) en el sentido de que ambos comprenden al menos tres residuos guanina en su extremo 3' y los usa como un cebador para conmutar un molde para la extensión en el extremo 3' de la primera cadena de ADNc mediante transcriptasa inversa, mientras que son claramente diferentes uno de otro en términos de la función de una conmutación en el control de la reasociación del cebador a un ácido nucleico molde asociado con una temperatura de reasociación durante la PCR. El cebador CapFinder no comprende grupo de residuo de base universal alguno que es el responsable de regular la reasociación del cebador en ACP, de modo que el método PCR CapFinder para 5'-RACE (Chenchik *et al.*, 1998) no puede estar exenta de un alto fondo, tal como difusión de ADN que surge de la contaminación de los cebadores, tales como los cebadores CapFinder y oligo-dT utilizados en la síntesis de ADNc durante la PCR. Por otro lado, el grupo de residuo de base universal del primer ACP juega un papel clave en la regulación de la reasociación del cebador, de modo que el presente método no proporciona causa alguna para los problemas de fondo durante la subsiguiente amplificación por PCR; este es un rasgo clave de la aplicación de ACP a 5'-RACE.

Además, cuando el ACP de la presente invención se utiliza en la tecnología 5'-RACE, no es necesario efectuar el procedimiento de separación física tal como la síntesis de ADNc en fase sólida y procesos que han sido introducidos como un método alternativo para separar todos los contaminantes utilizados en la síntesis de ADNc (Schramm *et al.*, 2000).

En una realización preferida, el oligonucleótido para formar uno o más pares de bases con la cola citosina para 5'-RACE que tiene una estructura similar a ACP, en donde el oligonucleótido se representa por la fórmula general (3): 5'-dX₁₅₋₃₀-dY₂₋₁₀-dZ₁₋₁₀-3', en donde dX representa un desoxirribonucleótido y comprende una secuencia arbitraria preseleccionada; dY representa una porción de regulador que comprende 2-10 bases universales o análogos de bases no discriminatorias; dZ representa un desoxirribonucleótido y comprende una secuencia arbitraria preseleccionada; y G₃₋₅ representa tres a cinco guaninas.

Lo más preferiblemente, la secuencia de la porción en el extremo 3' dZ es de aproximadamente 2-3 nucleótidos de longitud. Además, en una realización, la porción en el extremo 5' dX puede incluir una secuencia que es reconocida por una endonucleasa de restricción.

El G₃₋₅ puede ser tres a cinco riboguaninas o desoxiguaninas, o una combinación de riboguanina y desoxirriboguanina. En una realización más preferida, el G₃₋₅ comprende dos riboguaninas y una desoxirriboguanina (r(G)₂-d(G)-3'), lo más preferiblemente tres riboguaninas.

Cuando el cebador específico para genes en la etapa (f) se utiliza como cebador 3' para 5'-RACE, un fragmento de ADNc diana que contiene una secuencia en el extremo 5' se amplifica bajo las condiciones de alta rigurosidad, por métodos de PCR convencionales, tal como se conocen en la técnica.

En una realización preferida, un fragmento de ADNc diana que contiene una secuencia en el extremo 5' se amplifica utilizando un segundo ACP que comprende una secuencia específica para genes en la porción en el extremo 3', mediante amplificaciones en dos fases que se realiza en la aplicación para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos diana en la presente invención. Dado que el ACP descrito en esta invención puede proporcionar una T_m estable en un cebador y también tolerar "parámetros de búsqueda del cebador" para el diseño del cebador, tal como longitud del cebador, temperatura de reasociación, contenido GC y longitud del producto de PCR, es útil cuando las secuencias de cebadores específicos para genes tienen una T_m baja o son demasiado sensibles a parámetros de este tipo para generar productos específicos. La fórmula del segundo ACP es idéntica a la fórmula (1), en la que la porción en el extremo 3' contiene una secuencia específica para genes.

El uso de ACP en la tecnología RACE simplifica y mejora significativamente las tecnologías RACE convencionales con respecto a la amplificación de extremos de ADNcs según se describe arriba. El rasgo vital del presente método es estar exento de los problemas de fondo que surgen de los cebadores utilizados en métodos RACE convencionales. Por consiguiente, este método descrito en esta memoria puede ser más eficaz, más fácil, menos complejo y más reproducible que métodos RACE convencionales.

Todavía en otro aspecto de esta invención se proporciona un kit para amplificar rápidamente un fragmento de ADNc diana que comprende una región en el extremo 3' de ARNm, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores para el control de la reasociación previamente descritos (incluidos el primer y segundo cebadores). De acuerdo con una realización de esta invención, este kit comprende, además, un cebador o par de cebadores con una secuencia de nucleótidos que corresponde a la porción en el extremo 5' de los ACPs; en el caso de que la porción en el extremo 5' comprenda una secuencia de cebador universal, es más preferido que el kit comprenda los cebadores universales. Los presentes kits pueden incluir, opcionalmente, los reactivos requeridos para llevar a cabo reacciones PCR, tales como tampones, ADN polimerasa, cofactores de ADN polimerasa y desoxirribonucleótido-5'-trifosfatos. Opcionalmente, los kits pueden también incluir diversas moléculas de nucleótidos, transcriptasa inversa, diversos tampones y reactivos y anticuerpos que inhiben la actividad de la ADN polimerasa. Los kits también pueden incluir reactivos necesarios para llevar a cabo reacciones de control positivas y negativas. Cantidades óptimas de reactivos a utilizar en una reacción dada se pueden determinar fácilmente por parte del experto con los beneficios de la presente descripción. Típicamente, los kits están destinados a contener en envases o compartimientos separados los constituyentes antes descritos.

En un aspecto adicional de esta invención se proporciona un kit para amplificar rápidamente un fragmento de ADNc diana que comprende una región en el extremo 5' de ARNm, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores para el control de la reasociación previamente descritos (incluidos el cebador de oligonucleótidos dT y el cebador aleatorio para la síntesis de ADNc, el oligonucleótido para formar uno o más pares de bases con la cola citosina, el primer cebador y el segundo cebador). De acuerdo con una realización de esta invención, estos kits comprenden, además, un par de cebadores, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a cada una de las porciones en el extremo 5' del primer y segundo cebadores tal como se utilizan en las etapas (f)-(i) y (f)-(ii); en el caso de que la porción en el extremo 5' comprenda una secuencia de cebador universal, es más preferido que el kit comprenda los cebadores universales.

V. Aplicación a la amplificación de ADNc de longitud completa

En un aspecto adicional de esta invención, se proporciona un método para amplificar una población de ADNcs de doble cadena, de longitud completa, complementarios a ARNms, en el que el método comprende transcribir a la inversa el ARNm y realizar una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs descritos arriba. Preferiblemente, el cebador que tiene la estructura de ACP es uno que tiene una secuencia de nucleótidos esencialmente complementaria a colas poli A de ARNms.

En una realización específica de esta invención se proporciona un método que comprende:

(a) poner en contacto los ARNms con un primer cebador de uno cualquiera de los ACPs descritos arriba, en que la porción en el extremo 3' del primer cebador tiene una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a colas poli A de los ARNms para hibridarse con los mismos, bajo condiciones suficientes para que ocurra una síntesis del ácido desoxirribonucleico enzimática, impulsada por el molde;

(b) transcribir inversamente los ARNms, utilizando una transcriptasa inversa, a los que se hibrida el primer cebador para producir la población de primeras cadenas de ADNc que son complementarias a los ARNms a los que se hibrida el cebador, con lo que se generan intermedios de ARNm-ADNc;

(c) permitir que residuos citosina sean añadidos como cola en los extremos 3' de las primeras cadenas de ADNc en forma de los intermedios de ARNm-ADNc mediante la reacción de transferasa terminal de la transcriptasa inversa;

(d) poner en contacto las colas de citosina en los extremos 3' de las primeras cadenas de ADNc generadas a partir de la etapa (c) con un oligonucleótido que comprende una porción en el extremo 3' y una porción en el extremo 5' separadas por un grupo de bases universales o análogos de bases no discriminatorias, en donde la porción en el extremo 3' comprende al menos tres residuos guanina en su extremo 3' para hibridarse con las colas de citosina en los extremos 3' de las primeras cadenas de ADNc y la porción en el extremo 5' comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada, en condiciones en las que la porción en el extremo 3' del oligonucleótido se hibrida a las colas de citosina;

(e) extender los extremos 3' con colas de las primeras cadenas de ADNc para generar una secuencia adicional, complementaria al oligonucleótido utilizando transcriptasa inversa, en que el oligonucleótido sirve como un molde en la reacción de extensión, con lo que se extienden primeras cadenas de ADNc de longitud completa; y

(f) llevar a cabo una amplificación de las primeras cadenas de ADNc de longitud completa generadas a partir de la etapa (e), que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un par de cebadores, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente al mismo primer cebador y oligonucleótido que los utilizados en las etapas (a) y (d), respectivamente, o un par de cebadores, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos correspondiente a cada una de las porciones en los extremos 5' del primer cebador y oligonucleótido que los utilizados en las etapas (a) y (d), respectivamente, en condiciones en que cada cebador se reasocia a las secuencias de los extremos 3' y 5' de las primeras cadenas de ADNc de longitud completa, respectivamente, con lo que se generan productos de amplificación de cadenas de ADNc de longitud completa, complementarias a los ARNms.

Dado que esta aplicación utilizando el ACP de esta invención emplea, en principio, los presentes métodos para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos previamente comentados, se omiten las descripciones comunes entre ellos, con el fin de evitar la complejidad de esta especificación que conduce a una multiplicidad indebida. Además, el ACP arriba descrito, en el que la porción en el extremo 3' tiene una secuencia de nucleótidos hibridante esencialmente complementaria a colas poli A es, en principio, idéntico al primer cebador para el presente método para 3'-RACE. Además, el oligonucleótido para formar uno o más pares de bases con la cola citosina y el par de cebadores utilizado en la etapa (f) son, en principio, idénticos a los de 5'-RACE de esta invención comentada arriba.

En la Fig. 5 se ilustra una representación esquemática para amplificar moléculas de ADNc de longitud completa de la presente invención.

El uso de ACP simplifica y mejora significativamente las tecnologías convencionales con respecto a la amplificación de ADNcs de longitud completa. El rasgo vital del presente método es estar exento de los problemas de fondo

que surgen de los cebadores utilizados en métodos convencionales. Por consiguiente, este método descrito en esta memoria puede ser más eficaz, más fácil, menos complejo y más reproducible que métodos convencionales.

Todavía en un aspecto adicional de esta invención se proporciona un kit para amplificar un ADNc de doble cadena, de longitud completa, complementarios a ARNm, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores para el control de la reasociación arriba descritos (incluidos el cebador de oligonucleótidos dT, el oligonucleótido para formar uno o más pares de bases con la cola citosina, el o los cebadores utilizados en la etapa (f)). De acuerdo con una realización de esta invención, estos kits comprenden, además, un par de cebadores, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a cada una de las porciones en el extremo 5' del cebador y oligonucleótido utilizado en las etapas (a) y (d), respectivamente; en el caso de que la porción en el extremo 5' comprenda una secuencia de cebador universal, es más preferido que el kit comprenda los cebadores universales. Los presentes kits pueden incluir, opcionalmente, los reactivos requeridos para llevar a cabo reacciones PCR, tales como tampones, ADN polimerasa, cofactores de ADN polimerasa y desoxirribonucleótido-5'-trifosfatos. Opcionalmente, los kits pueden también incluir diversas moléculas de polinucleótidos, transcriptasa inversa, diversos tampones y reactivos y anticuerpos que inhiben la actividad de la ADN polimerasa. Los kits también pueden incluir reactivos necesarios para llevar a cabo reacciones de control positivas y negativas. Cantidades óptimas de reactivos a utilizar en una reacción dada se pueden determinar fácilmente por parte del experto con los beneficios de la presente descripción. Típicamente, los kits están destinados a contener en envases o compartimientos separados los constituyentes antes descritos.

VI. Aplicación a la amplificación de ADNc enriquecido en 5'

En otro aspecto de esta invención, se proporciona un método para amplificar una población de ADNcs de doble cadena, enriquecidos en 5', que comprenden regiones de ADNc que corresponden a las regiones en el extremo 5' de ARNm, en el que el método comprende transcribir a la inversa el ARNm y realizar una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs descritos arriba. Preferiblemente, el cebador que tiene la estructura de ACP, utilizado para la síntesis de ADNc, es uno que tiene en su porción en el extremo 3' al menos seis secuencias de nucleótidos aleatorias.

En una realización específica de esta invención se proporciona el método que comprende:

(a) poner en contacto los ARNm con un primer cebador de uno cualquiera de los ACPs descritos arriba, en condiciones suficientes para que ocurra una síntesis del ácido desoxirribonucleico enzimática, impulsada por el molde, en donde la porción en el extremo 3' del primer cebador tiene al menos seis secuencias de nucleótidos aleatorias;

(b) realizar las etapas (b)-(e) del método para amplificar una población de ADNcs de doble cadena, de longitud completa, con lo que se extienden primeras cadenas de ADNc enriquecidas en 5';

(c) llevar a cabo una amplificación de las primeras cadenas de ADNc enriquecidas en 5' generadas a partir de la etapa (b), que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un par de cebadores, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a cada una de las porciones en el extremo 5' del cebador y oligonucleótido utilizados en las etapas (a) y (b), respectivamente, en condiciones en las que cada uno de los cebadores se reasocia a las secuencias en los extremos 3' y 5' de las primeras cadenas de ADNc enriquecidas en 5', con lo que se generan productos de amplificación de las cadenas de ADNc enriquecidas en 5'.

Dado que esta aplicación utilizando el ACP de esta invención emplea, en principio, los presentes métodos para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos previamente comentados, se omiten las descripciones comunes entre ellos, con el fin de evitar la complejidad de esta especificación que conduce a una multiplicidad indebida. Además, el oligonucleótido para formar uno o más pares de bases con la cola citosina y el par de cebadores utilizado en la etapa (c) son, en principio, idénticos a los de 5'-RACE de esta invención comentada arriba.

En la Fig. 6 se ilustra una representación esquemática para amplificar ADNcs de doble cadena, enriquecidos en 5', complementarios a ARNm.

ADNcs enriquecidos en 5'' se refiere a una porción importante de los constituyentes del ADNc que contienen la información en la secuencia de nucleótidos del extremo 5' de los ARNm, de los que se derivan los ADNcs.

La fórmula del primer cebador es idéntica a la fórmula (1), en la que la porción en el extremo 3' comprende una secuencia de nucleótidos aleatoria. En una realización preferida, la porción en el extremo 3' del primer cebador utilizado en la etapa (a) contiene al menos seis desoxirribonucleótidos aleatorios. En una realización preferida, la porción en el extremo 5' del primer cebador utilizado en la etapa (a) puede incluir que es reconocida por una endonucleasa de restricción.

Los métodos convencionales requieren más etapas para amplificar moléculas de ADNc enriquecidas en 5', complementarias a las moléculas de ARNm, que el presente método, debido a que los métodos convencionales utilizan los cebadores convencionales que no tienen la función de controlar la reasociación del cebador. En contraposición,

este presente método es, de manera considerable, una propuesta simple y eficaz debido a la función de regular la reasociación del cebador generada por el efecto de un grupo residual de base universal en el ACP.

Todavía en otro aspecto de esta invención se proporciona un kit para amplificar ADNcs de doble cadena, enriquecidos en 5', complementarios a ARNm, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores para el control de la reasociación arriba descritos (el primer cebador, el oligonucleótido para formar uno o más pares de bases con la cola citosina). De acuerdo con una realización de esta invención, estos kits comprenden, además, un par de cebadores, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a cada una de las porciones en el extremo 5' del cebador y oligonucleótido utilizado en las etapas (a) y (b), respectivamente; en el caso de que la porción en el extremo 5' comprenda una secuencia de cebador universal, es más preferido que el kit comprenda los cebadores universales. Los presentes kits pueden incluir, opcionalmente, los reactivos requeridos para llevar a cabo reacciones PCR, tales como tampones, ADN polimerasa, cofactores de ADN polimerasa y desoxirribonucleótido-5'-trifosfatos. Opcionalmente, los kits pueden también incluir diversas moléculas de polinucleótidos, transcriptasa inversa, diversos tampones y reactivos y anticuerpos que inhiben la actividad de la ADN polimerasa. Los kits también pueden incluir reactivos necesarios para llevar a cabo reacciones de control positivas y negativas. Cantidades óptimas de reactivos a utilizar en una reacción dada se pueden determinar fácilmente por parte del experto con los beneficios de la presente descripción. Típicamente, los kits están destinados a contener en envases o compartimientos separados los constituyentes antes descritos.

VII. Aplicación a las huellas de ADN o ARN

Esta aplicación utilizando el ACP de la presente invención puede proporcionar un método mejorado para detectar polimorfismos en ADN genómico (huella de ADN) o para detectar la expresión diferencial de genes en ARNm (huella de ARN).

En un aspecto adicional de esta invención se proporciona un método para producir una huella de ADN de ADNg, en el que el método comprende realizar una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs arriba descritos. Preferiblemente, el cebador que tiene la estructura de ACP es uno que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia de nucleótidos arbitraria, esencialmente complementaria a sitios en el ADNg.

En una realización específica de esta invención se proporciona el método que utiliza amplificaciones en dos fases, que comprende:

(a) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de la huella de ADN, que es un conjunto de segmentos discretos de ADN, característicos del genoma, a partir de un ADNg a una primera temperatura de reasociación, que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando el cebador o el par de cebadores de uno cualquiera de los ACPs antes descritos, en donde cada cebador tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia de nucleótidos arbitraria, esencialmente complementaria a sitios en el ADNg para hibridarse con el mismo, bajo condiciones en las que el cebador o el par de cebadores se reasocia al ADNg, con lo que se produce el conjunto de segmentos discretos de ADN caracterizados como una huella de ADN; y

(b) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase del conjunto de segmentos discretos de ADN, generados a partir de la etapa (a) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando el mismo cebador o par de cebadores que los utilizados en la etapa (a) o utilizando un cebador o un par de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a cada porción en el extremo 5' del cebador o del par de cebadores utilizados en la etapa (a), bajo condiciones en las que el cebador o cada uno de los pares de cebadores se reasocia a las secuencias en los extremos 3' y 5' del conjunto de segmentos discretos de ADN, generados a partir de la etapa (a), respectivamente, con lo que se re-amplifica el conjunto de segmentos discretos de ADN.

Todavía en un aspecto adicional de esta invención se proporciona un método para producir una huella de ARN de una muestra de ARNm, en el que el método comprende transcribir a la inversa y realizar una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs. Preferiblemente, el cebador de acuerdo con la estructura de ACP es uno que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia de nucleótidos arbitraria, esencialmente complementaria a sitios en las cadenas de ADNc generadas a partir de transcripción inversa y/o que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia de nucleótidos arbitraria, esencialmente complementaria a colas poli A de los ARNms.

En una realización específica de esta invención se proporciona un método que utiliza amplificaciones en dos fases, que comprende:

(a) poner en contacto la muestra de ARNm con un primer cebador de uno cualquiera de los ACPs arriba descritos, en el que el primer cebador tiene una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a colas poli A de la muestra de ARNm para hibridarse con las mismas, en condiciones suficientes para que ocurra una síntesis del ácido desoxirribonucleico enzimática, impulsada por el molde;

(b) transcribir inversamente la muestra de ARNm a la que se hibrida el primer cebador para producir una población de primeras cadenas de ADNc que son complementarias a la muestra de ARNm a la que se hibrida el primer cebador;

(c) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de la población de primeras cadenas de ADNc generadas a partir de la etapa (b) a una primera temperatura de reasociación, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un segundo cebador o par de cebadores de uno cualquiera de los ACPs antes descritos, en donde cada cebador tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia de nucleótidos arbitraria, esencialmente complementaria a sitios en las primeras cadenas de ADNc para hibridarse con la misma, en condiciones en las que el cebador o par de cebadores se reasocia a la muestra de ARNm, con lo que se produce un conjunto de segmentos discretos de ADNc caracterizados como una huella de ARN; y

(d) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase del conjunto de segmentos discretos de ADN, generados a partir de la etapa (c) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando el mismo cebador o par de cebadores que los utilizados en la etapa (c) o utilizando un cebador o un par de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a cada porción en el extremo 5' del cebador o del par de cebadores utilizados en la etapa (c), bajo condiciones en las que el cebador o cada uno de los pares de cebadores se reasocia a las secuencias en los extremos 3' y 5' del conjunto de segmentos discretos de ADN, generados a partir de la etapa (c), respectivamente, con lo que se re-amplifica el conjunto de segmentos discretos de ADN.

Dado que esta aplicación utilizando el ACP de esta invención emplea, en principio, los presentes métodos para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos previamente comentados, se omiten las descripciones comunes entre ellos, con el fin de evitar la complejidad de esta especificación que conduce a una multiplicidad indebida. Además, la huella de ARN sigue, en principio, el presente método para detectar ADN complementario a ARNm expresado diferencialmente.

La expresión "ADN genómico", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una población de ADN que comprende el conjunto completo de genes presentes en una especie preseleccionada. Al conjunto completo de genes en una especie se le alude también como genoma. El término "huella" de ADN o ARN, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un conjunto de amplificaciones discretas de ADN, características de un genoma o un conjunto de segmentos discretos de ADNc, característicos de una muestra de ARNm, respectivamente.

En las huellas por PCR previas, cebadas arbitrariamente, denominadas AP-PCR, se han utilizado cebadores arbitrarios cortos o largos en condiciones de no rigurosidad para las amplificaciones tempranas de 2-5 ciclos, debido a que se requiere una baja temperatura de reasociación para lograr un cebado arbitrario, de manera que una porción importante de fragmentos aislados todavía no es reproducible, a pesar de que la amplificación eficaz prosigue en los ciclos siguientes en condiciones de alta rigurosidad.

En contraposición a AP-PCR, la PCR basada en ACP para la huella aumenta la especificidad de la reasociación del cebador durante la PCR debido a la función de un grupo residual de base universal situado entre las porciones en los extremos 3' y 5' de ACP, en donde el grupo residual de base universal restringe el sitio de reasociación a la porción en el extremo 3' del ACP y permite también que esta porción en el extremo 3' se reasocie a una temperatura de reasociación relativamente alta. Así, la PCR basada en ACP para la huella elimina por completo productos falsos positivos y aumenta significativamente la reproducibilidad.

En una realización preferida, el ACP contiene una secuencia arbitraria en la porción en el extremo 3' con al menos 6 nucleótidos de longitud. Más preferiblemente, la porción en el extremo 3' contiene 8-15 nucleótidos de longitud, lo más preferiblemente aproximadamente 10 nucleótidos de longitud.

Se puede utilizar un ACP sencillo o un par de ACPs para detectar polimorfismos en huellas de ADN. Preferiblemente, se utiliza un par de ACPs para la huella de ADN, debido a que un par de ACPs produce más productos que lo hace un ACP arbitrario sencillo.

Un ejemplo de la huella de ADN utilizando ACP se efectúa mediante amplificaciones por PCR en dos fases en las condiciones siguientes: se realizan reacciones de amplificación en condiciones de baja rigurosidad mediante dos ciclos de la PCR en primera fase, que comprende reasociación, extensión y reacción de desnaturalización; se precalienta la mezcla de reacción que contiene ADN genómico, tampón de reacción PCR. $MgCl_2$, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y un par de ACPs, se añade Taq polimerasa a la mezcla de reacción; se realizan las reacciones PCR, seguido de la desnaturalización del producto de amplificación; después de la reacción completa de la PCR en primera fase, el cebador JYC4 arbitrario preseleccionado, correspondiente a la porción en el extremo 5' de los ACPs se añade a la mezcla de reacción y después se efectúa una amplificación por PCR en segunda fase.

Debe señalarse que se utiliza una concentración apropiada de ACP para producir la huella de ADN. Si la cantidad de ACP es demasiado baja, los productos de la PCR amplificados resultantes no son reproducibles. En contraposición, la cantidad en exceso del ACP genera fondos tal como una difusión de ADN durante la PCR. En una realización preferida, la concentración del ACP es aproximadamente entre 0,1 μM y 2 μM . Lo más preferiblemente, la concentración del ACP es aproximadamente 1,4 μM .

En una realización preferida, la concentración del cebador correspondiente a la porción en el extremo 5' de los ACPs es aproximadamente entre 0,1 μ M y 2 μ M, lo más preferiblemente, aproximadamente 0,8 μ M.

Las muestras de ADN genómico y de ARNm se pueden obtener de una diversidad de plantas, animales (ser humano) y microbios y de diferentes organismos individuales.

Los productos amplificados se pueden analizar mediante electroforesis en gel. En una realización, los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como la tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997), y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Todavía en un aspecto adicional de esta invención se proporciona un kit para producir una huella de ADN mediante el uso de ADNg o ARNm, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores para el control de la reasociación arriba descrito. Las descripciones de los kits para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos y para detectar ADN complementario a ARNm expresado diferencialmente de esta invención se pueden aplicar al presente kit.

VIII. Aplicación a la identificación de segmentos de homología conservada en familias de multigenes

Esta aplicación utilizando ACP de la presente invención también puede proporcionar un método mejorado para la identificación de segmentos de homología conservada en familias de multigenes.

En otro aspecto de esta invención se proporciona un método para identificar segmentos de homología conservada en una familia de multigenes a partir de una muestra de ARNm, en el que el método comprende transcribir a la inversa y realizar una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs descritos arriba. Preferiblemente, el cebador con la estructura de ACP es uno que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una secuencia consenso de un segmento de homología conservada en cadenas de ADNc generadas a partir de transcripción inversa y/o que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a colas poli A de los ARNm.

En una realización específica de esta invención se proporciona el método que utiliza amplificaciones en dos fases, que comprende:

(a) poner en contacto la muestra de ARNm con un primer cebador de una cualquiera de las reivindicaciones 1-29, en el que el primer cebador tiene una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a colas poli A de la muestra de ARNm para hibridarse con las mismas, en condiciones suficientes para que ocurra una síntesis del ácido desoxirribonucleico enzimática, impulsada por el molde;

(b) transcribir inversamente la muestra de ARNm a la que se hibrida el primer cebador para producir una población de primeras cadenas de ADNc que son complementarias a la muestra de ARNm a la que se hibrida el primer cebador;

(c) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de la población de primeras cadenas de ADNc generadas a partir de la etapa (b) a una primera temperatura de reasociación, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturización, utilizando un segundo cebador o par de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25, teniendo cada cebador en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una secuencia consenso o una secuencia degenerada que codifica una secuencia de aminoácidos de un segmento de homología conservada en las primeras cadenas de ADNc para hibridarse con la misma, en condiciones en las que el segundo cebador se reasocia a la secuencia consenso, con lo que se generan segmentos de ADNc en el extremo 3' que tienen la secuencia consenso o la secuencia degenerada; y

(d) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase de los segmentos de ADNc en el extremo 3', generados a partir de la etapa (c) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturización, utilizando el mismo primer y segundo cebadores que los utilizados en las etapas (a) y (c) o utilizando un par de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a cada porción en el extremo 5' del primer y segundo cebadores utilizados en las etapas (a) y (c), bajo condiciones en las que cada uno de los cebadores se reasocia a las secuencias en los extremos 3' y 5' de los segmentos de ADNc en el extremo 3', respectivamente, con lo que se amplifican segmentos de ADNc de homología conservados en el extremo 3'.

La realización específica sigue, en principio, el presente método para 3'-RACE como se ha comentado previamente, excepto por el segundo cebador utilizado.

En otra realización específica de esta invención se proporciona el método de utilizar amplificaciones en dos fases, que comprende:

(a) realizar las etapas (a)-(e) del método para amplificar una población de ADNc de doble cadena, de longitud completa, con lo que se generan cadenas de ADNc de longitud completa;

(b) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de las primeras cadenas de ADNc, de longitud completa, obtenidas de la etapa (a) a una primera temperatura de reasociación, que comprende las etapas de:

(i) al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un primer cebador que comprende una secuencia de nucleótidos esencialmente complementaria a las secuencias en el extremo 3' de las primeras cadenas de ADNc de longitud completa, en condiciones en las que el primer cebador se reasocia a las primeras cadenas de ADNc de longitud completa, en condiciones en las que el primer cebador se reasocia a los extremos 3' de las primeras cadenas de ADNc de longitud completa, con lo que se generan segundas cadenas de ADNc de longitud completa; y

(ii) al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un segundo cebador de una cualquiera de las reivindicaciones 1-25 que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una secuencia consenso o una secuencia degenerada que codifica una secuencia de aminoácidos de un segmento de homología conservada en las segundas cadenas de ADNc de longitud completa para hibridarse con las mismas, en condiciones en las que el segundo cebador se reasocia a la secuencia consenso o una secuencia degenerada de segundas cadenas de ADNc de longitud completa, con lo que se generan segmentos de ADNc en el extremo 5' que tienen la secuencia consenso o la secuencia degenerada; y

(c) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase de los segmentos de ADNc en el extremo 5' generados a partir de la etapa (b) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando los mismos primer y segundo cebadores que los utilizados en las etapas (b)-(i) y (b)-(ii), respectivamente, o utilizando un par de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a cada porción en el extremo 5' de los primero y segundo cebadores utilizados en las etapas (b)-(i) y (b)-(ii), respectivamente, bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a las secuencias en los extremos 3' y 5' de los segmentos de ADNc en el extremo 5', respectivamente, con lo que se amplifican los segmentos de ADNc de homología conservada en el extremo 5'.

Esta realización específica sigue, en principio, el presente método para 5'-RACE como se ha comentado previamente, excepto por el segundo cebador utilizado.

En un aspecto adicional de esta invención se proporciona un método para identificar segmentos de homología conservada en una familia de multigenes a partir de ADNg, en el que el método comprende realizar una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs arriba descritos. Preferiblemente, el cebador que tiene la estructura de ACP es uno que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una secuencia consenso o una secuencia degenerada que codifica una secuencia de aminoácidos de un segmento de homología conservada en el ADNg.

En una realización específica de esta invención se proporciona el método que utiliza amplificaciones en dos fases, que comprende:

(a) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de los segmentos de homología conservada a partir del ADNg a una primera temperatura de reasociación, que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando el cebador o el par de cebadores de uno cualquiera de los ACPs antes descritos, en donde cada cebador tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una secuencia consenso o una secuencia degenerada que codifica una secuencia de aminoácidos de un segmento de homología conservada en el ADNg para hibridarse con el mismo, bajo condiciones en las que el cebador o el par de cebadores se reasocia a la secuencia consenso o la secuencia degenerada de ADNg, con lo que se generan segmentos de ADN genómico que tienen la secuencia consenso o la secuencia degenerada; y

(b) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase de los segmentos de ADN genómico generados a partir de la etapa (a) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando el mismo cebador o par de cebadores que los utilizados en la etapa (a) o utilizando un cebador o un par de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a cada porción en el extremo 5' del cebador o del par de cebadores utilizados en la etapa (a), bajo condiciones en las que el cebador o cada uno de los pares de cebadores se reasocia a las secuencias en los extremos 3' y 5' de los segmentos de ADN genómico, generados a partir de la etapa (a), respectivamente, con lo que se re-amplifican segmentos genómicos de homología conservada.

El presente método sigue, en principio, el presente método para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos diana a partir de un ADN como se ha comentado previamente, excepto por el segundo cebador utilizado.

Dado que esta aplicación utilizando el ACP de esta invención emplea, en principio, los presentes métodos para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos previamente comentados, se omiten las descripciones comunes

entre ellos con el fin de evitar la complejidad de esta memoria descriptiva que conduzca a una multiplicidad excesiva. Además, en los casos en los que se utilice un ARNm como material de partida, los presentes métodos para 3'- ó 5'-RACE se aplican, en principio, a los presentes métodos para la identificación de segmentos de homología conservada en familias de multigenes.

La fórmula del ACP para la identificación de segmentos de homología conservada en familias de multigenes es idéntica a la fórmula (1), en la que la porción en el extremo 3' de ACP tiene una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una secuencia consenso en una familia de genes o una secuencia degenerada que codifica una secuencia de aminoácidos de una homología conservada.

Existen dos propuestas principales para diseñar un cebador degenerado: (a) utilizando datos de una secuencia peptídica obtenidos de una proteína purificada; y (b) utilizando datos de una secuencia de proteína consenso a partir de alineaciones de familias de genes. Si los ortólogos del gen de interés han sido clonados a partir de otros organismos, o si el gen es un miembro de una familia de genes, será posible generar alineaciones de la secuencia de la proteína.

Éstas pueden revelar regiones apropiadas para el diseño de cebadores degenerados, por ejemplo a partir de una secuencia consenso de regiones muy conservadas. Las amplificaciones utilizando cebadores degenerados pueden ser problemáticas, a veces, y pueden requerir de una optimización. El primer parámetro es la temperatura de reasociación. Es importante mantener la temperatura de reasociación lo más alta posible para evitar una extensa amplificación no específica, y una buena regla general es utilizar 55°C como temperatura de partida. En general, es difícil mantener esta regla, ya que deberían diseñarse cebadores degenerados, en base a secuencias de aminoácidos, como una condición previa. Sin embargo, el ACP de la presente invención no tiene que satisfacer este requisito, ya que permite una elevada temperatura de reasociación, tal como 65°C, en la amplificación por PCR de segunda fase, independientemente del diseño del cebador.

De acuerdo con una realización preferida, el segundo cebador es una agrupación de cebadores, cada uno de los cuales comprende una secuencia degenerada, seleccionada de una pluralidad de los nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de la secuencia consenso.

La expresión "región conservada" y, más específicamente, "región conservada de un gen en una familia de multigenes", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un segmento de una secuencia de nucleótidos de un gen o secuencia de aminoácidos de una proteína que es significativamente similar entre miembros de familias de genes. El grado de similitud puede variar. En algunos casos, las regiones conservadas serán idénticas entre los miembros de la familia. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos puede variar significativamente, pero sigue codificando segmentos de aminoácidos que están conservados entre miembros de la familia. La expresión "secuencia consenso", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a las bases que con más frecuencia se encuentran en cualquier posición dada, cuando se compara un gran número de secuencias de nucleótidos similares.

Alternativamente, los presentes métodos para la identificación de segmentos de homología conservada también se pueden combinar con aquellos para detectar ARNms expresados diferencialmente.

Todavía en un aspecto de esta invención se proporciona un kit para identificar un segmento de homología conservada en una familia de multigenes mediante el uso de ARNm o ADNg, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores para el control de la reasociación arriba descritos. Las descripciones de los kits para la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos, se puede aplicar 3'-RACE y 5'-RACE de esta invención al presente kit.

IX. Aplicación a la identificación de una variación de nucleótido

Esta aplicación, utilizando el sistema ACP de la presente invención también puede proporcionar un método mejorado para identificar una variación de nucleótido en un ácido nucleico diana.

En otro aspecto de esta invención se proporciona un método para identificar una variación de nucleótido en un ácido nucleico diana, en el que el método comprende realizar una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs descritos arriba. Preferiblemente, el cebador que tiene la estructura de ACP es (a) un primer cebador que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante sustancial complementaria a una secuencia preseleccionada en un primer sitio de un ácido nucleico diana, en donde cada uno del primer cebador y el primer sitio comprende una posición de interrogación correspondiente a la variación de nucleótido, y/o (b) un segundo cebador que tiene una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una secuencia preseleccionada en un segundo sitio del ácido nucleico diana.

En una realización específica de esta invención se proporciona el método que utiliza amplificaciones en dos fases, que comprende:

(a) llevar a cabo una amplificación en una primera fase para producir una la primera cadena de ADNc, complementaria al ácido nucleico diana que incluye la variación de nucleótido a una primera temperatura de reasociación, que comprende comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización,

utilizando un primer cebador de uno cualquiera de los ACPs arriba descritos que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una secuencia preseleccionada en un primer sitio del ácido nucleico diana para hibridarse con el mismo, en donde cada uno del primer cebador y el primer sitio comprende una posición de interrogación correspondiente a la variación de nucleótido, en donde se genera la primera cadena de ADN complementaria al ácido nucleico diana que incluye la variación de nucleótido cuando la posición de interrogación es ocupada por el nucleótido complementario del primer cebador a su correspondiente nucleótido del primer sitio; y

(b) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase de la primera cadena de ADN generada de la etapa (a) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende las etapas de:

- (i) al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un segundo cebador de uno cualquiera de los ACPs arriba descritos que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una secuencia preseleccionada en un segundo sitio del ácido nucleico diana para hibridarse con el mismo, en condiciones en las que el segundo cebador se reasocia al segundo sitio del ácido nucleico diana, con lo que se genera una la segunda cadena de ADN, complementaria a la primera cadena de ADN que incluye la variación de nucleótido; y
- (ii) al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando el primer y segundo cebadores que los utilizados en las etapas (a) y (b)-(i) o un par de cebadores, teniendo cada uno una secuencia hibridante complementaria o correspondiente a los extremos 3' y 5' de la segunda cadena de ADN generada a partir de la etapa (b)-(i) para hibridarse con la misma, en condiciones en las cada cebador se reasocia a las secuencias de los extremos 3' y 5' de la segunda cadena de ADN, respectivamente, con lo que se amplifica la segunda cadena de ADN que comprende el primer y segundo sitios del ácido nucleico diana en sus extremos 3' y 5', de modo que se genera un segmento corto de nucleótido diana, correspondiente a la segunda cadena de ADN que contiene la variación de nucleótido.

Dado que esta aplicación utilizando el ACP de esta invención emplea, en principio, los presentes métodos para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos previamente comentadas, se omiten las descripciones comunes entre ellas, con el fin de evitar la complejidad de esta especificación que conduce a una multiplicidad indebida.

En la Fig. 7A se ilustra una representación esquemática de esta realización específica para determinar el genotipo del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) utilizando el nuevo ACP.

La fórmula de ACP para la detección de una variación de nucleótido es idéntica a la fórmula (1), en la que la porción en el extremo 3' comprende una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una secuencia preseleccionada en un sitio del ácido nucleico para hibridarse con el mismo que contiene la variación de nucleótido, en donde el nucleótido correspondiente a la variación en la molécula y su nucleótido complementario del ACP ocupan una posición de interrogación. El procedimiento para esta aplicación se lleva a cabo mediante amplificaciones por PCR en dos fases utilizando el ADN genómico obtenido de muestras, tales como sangre del paciente o un segmento corto del ADN de muestra que incluye una variación de nucleótido diana. La muestra de nucleótido de interés se puede obtener de ácido nucleico humano y un organismo que puede provocar una enfermedad infecciosa.

El método que utiliza amplificaciones por PCR en dos fases para detectar el genotipo del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) sigue básicamente el procedimiento utilizado para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos diana usando ADN genómico como material de partida. Además, el procedimiento para la amplificación de ADN multiplex se puede adaptar a esta aplicación.

Para utilizar un segmento corto del ADN de muestra que incluye una variación de nucleótido diana como material de partida para el procedimiento anterior, es preferible que el segmento corto diana se preamplifique antes de la etapa (a) utilizando un par de cebadores en el que cada uno tiene una secuencia hibridante, esencialmente complementaria al ADN de muestra para hibridarse con el mismo. Además, más de un segmento de nucleótido diana, cada uno de los cuales incluye un SNP, se puede preparar mediante la amplificación de ADN multiplex según se describe en la Aplicación II a utilizar como material de partida en la presente invención para el rastreo de SNP múltiples.

El primer ACP utilizado en la etapa (a) para la detección de una base polimórfica es un ACP específico para alelos, que contiene una posición de interrogación dentro de su porción en el extremo 3' ocupada por un nucleótido complementario al correspondiente nucleótido de la variación de nucleótido en un ácido nucleico diana. Preferiblemente, la posición de interrogación del primer cebador está en el medio de su porción en el extremo 3'. En una realización más preferida, la posición de interrogación del ACP específico para alelos está dentro de aproximadamente 10 bases del nucleótido en el extremo 3'. Más ventajosamente, la posición de interrogación del ACP específico para alelos está dentro de aproximadamente 6 bases del nucleótido en el extremo 3'. En otra realización preferida, la posición de interrogación del ACP específico para alelos está situado dentro de las posiciones 4 y 6 desde el nucleótido en el extremo 3'. Lo más preferiblemente, la posición de interrogación del ACP específico para alelos está situado en la posición 5 desde el nucleótido en el extremo 3'. La expresión "nucleótido en el extremo 3'", utilizada en esta memoria, se refiere a un nucleótido que está situado en el extremo 3' de ACP.

ES 2 314 093 T3

En otra realización, la porción en el extremo 3' del ACP específico para alelos utilizado en la etapa (a) contiene al menos 6 nucleótidos de longitud, que es un requisito mínimo de longitud para la reasociación del cebador. Preferiblemente, la secuencia de la porción en el extremo 3' es de aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, incluida una posición de interrogación.

En una realización, al menos un desapareamiento artificial también se puede colocar en la porción en el extremo 3' de ACP utilizando una base universal o un análogo no discriminatorio que se une con hidrógeno mínimamente con todas las cuatro bases sin interrupción estérica del duplex de ADN. A pesar de que la posición del desapareamiento artificial puede variar en función de diseños experimentales, se prefiere que el nucleótido del desapareamiento sea sustancialmente adyacente a la posición de interrogación del primer cebador.

En una realización preferida, el primer o segundo cebadores comprenden al menos un nucleótido con un marcador para la detección o el aislamiento.

De acuerdo con una realización preferida, la primera cadena de ADN que incluye la variación de nucleótido en la etapa (a) se genera mediante un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización. Se prefiere que la segunda cadena de ADN incluida la variación de nucleótido en la etapa (b)-(i) se genera mediante un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización. Preferiblemente, la segunda cadena de ADN incluida la variación de nucleótido en la etapa (b)-(ii) se amplifica mediante al menos 5 ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización.

En otra realización específica de esta invención que utiliza un fragmento de cadena corta de ADN, amplificado, que contiene la variación de nucleótido se proporcione el método que utiliza dos amplificaciones individuales de una primera y una segunda amplificaciones, en que la segunda amplificación se realiza utilizando amplificaciones en dos fases, que comprende:

(a) realizar la primera amplificación para producir un fragmento corto de cadena de ADN, amplificado, que contiene la variación de nucleótido entre sus extremos que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un par de cebadores, comprendiendo cada uno de los cebadores una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una secuencia preseleccionada en un sitio del ácido nucleico diana, en condiciones tales que la variación de nucleótido está situada entre las secuencias preseleccionadas, en que al menos un cebador del conjunto de cebadores es uno cualquiera de los ACPs arriba descritos que tienen en su porción en el extremo 3' la secuencia hibridante, con lo que se amplifica el fragmento corto de la cadena de ADN que contiene la variación de nucleótido entre sus extremos;

(b) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de la segunda amplificación para producir una la primera cadena de ADN, complementaria al fragmento corto de la cadena de ADN, incluida la variación de nucleótido, a una primera temperatura de reasociación, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un primer cebador de uno cualquiera de los ACPs antes descritos, teniendo en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una secuencia preseleccionada en un primer sitio del ácido nucleico diana para hibridarse con el mismo, en donde cada uno del primer cebador y el primer sitio comprende una posición de interrogación correspondiente a la variación de nucleótido, en donde la primera cadena de ADN complementaria al ácido nucleico diana, incluida la variación de nucleótido, es ocupada por el nucleótido complementario del primer cebador a su correspondiente nucleótido del primer sitio; y

(c) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase de la segunda amplificación de la primera cadena de ADN, generada a partir de la etapa (a) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un par de cebadores, en el que entre el par de cebadores uno es el mismo que el cebador de uno cualquiera de los ACPs utilizados en la etapa (a) y el otro es el mismo que el primer cebador utilizado en la etapa (b), o un par de cebadores cada uno de los cuales tiene una secuencia hibridante complementaria o correspondiente a los extremos 3' y 5' de la primera cadena de ADN generada a partir de la etapa (b) para hibridarse con la misma, bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a las secuencias en los extremos 3' y 5' de la primera cadena de ADN, respectivamente, con lo que se amplifica la primera cadena de ADN, de manera que se genera un segmento corto de nucleótido diana correspondiente a la primera cadena de ADN que contiene la variación de nucleótido.

En la Fig. 7B se ilustra una representación esquemática de otra realización específica para determinar el genotipo del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) utilizando el nuevo ACP. Dado que esta realización específica se lleva a cabo de una manera similar a la realización anterior, se omiten las descripciones comunes entre ellas, con el fin de evitar la complejidad de esta especificación que conduce a una multiplicidad indebida.

El presente método se puede aplicar a una diversidad de variaciones de nucleótidos, incluidos el polimorfismo de un solo nucleótido y una mutación puntual (sustitución, delección e inserción).

Los productos amplificados se pueden analizar mediante electroforesis en gel. En una realización, los productos de PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturalizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como la tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el

uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994); Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Los productos amplificados generados por amplificación de ADN multiplex para el rastreo de SNP múltiples se pueden comparar a través de la separación por tamaño de los productos. La comparación a través de la separación por tamaño se efectúa también mediante electroforesis a través de una matriz en gel de agarosa o una matriz de gel de poliacrilamida o la secuenciación. Los productos también se pueden detectar mediante el uso de cebadores de oligonucleótidos marcados por fluorescencia para análisis automáticos.

La expresión “posición de interrogación”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la localización de una base de nucleótido específica de interés con un ácido nucleico diana. Por ejemplo, en el análisis de SNPs, la “posición de interrogación” en el ácido nucleico diana está en la posición que sería diferente de la tipo salvaje. La posición de interrogación también incluye la localización de una secuencia de nucleótidos de un cebador que es complementaria a una posición de interrogación del ácido nucleico diana. La posición de interrogación del ácido nucleico diana es opuesta a la posición de interrogación del cebador, cuando el cebador se hibrida con el ácido nucleico diana.

El término “polimorfismo”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la presencia de dos o más secuencias genómicas alternativas o alelos entre diferentes genomas o individuos. “Polimórfico” se refiere a la condición en la que dos o más variantes de una secuencia genómica específica se puede encontrar en una población. Un “sitio polimórfico” es el lugar en el que ocurre la variación. Un *polimorfismo de un solo nucleótido*, o SNP, es una variante de pares de bases sencilla, típicamente la sustitución de un nucleótido por otro nucleótido en el sitio polimórfico. La delección de un solo nucleótido o inserción de un nucleótido sencillo, también da lugar a polimorfismos de un solo nucleótido. Típicamente, entre diferentes genomas o entre diferentes individuos el sitio polimórfico puede ser ocupado por dos nucleótidos diferentes. El término “alelo”, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un miembro específico de una colección de variantes de secuencias que se producen en la naturaleza (detectable dentro de una población de individuos) a un lugar o marcador genómico específico.

Todavía en otro aspecto de esta invención se proporciona un kit para identificar una variación de nucleótido en un ácido nucleico diana, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores para el control de la reasociación (incluidos los primero y segundo cebadores) arriba descritos. Las descripciones de los kits para la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos de esta invención se puede aplicar al presente kit.

X. Aplicación a la mutagénesis

Esta aplicación utilizando el ACP de la presente invención también puede proporcionar un método mejorado para la mutagénesis. La PCR basada en ACP proporciona una excelente herramienta para la mutagénesis, que incluye delección, o inserción de secuencias, la alteración de uno o unos pocos nucleótidos específicos, y la mutación aleatoria de la secuencia de nucleótidos.

En un aspecto adicional de esta invención, se proporciona un método para la mutagénesis en un ácido nucleico diana, que comprende realizar una reacción de amplificación utilizando cebadores, caracterizado porque al menos un cebador se deriva de uno cualquiera de los ACPs descritos arriba. Preferiblemente, el cebador que tiene la estructura de ACP es uno que tiene en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una región de la secuencia del ácido nucleico diana, en donde la secuencia hibridante tiene una secuencia de nucleótidos responsable de la mutagénesis.

En una realización específica de esta invención se proporciona un método que utiliza amplificaciones en dos fases, que comprende:

(a) realizar una amplificación en primera fase de la secuencia de ácido nucleico a una primera temperatura de reasociación que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando un par de cebadores de uno cualquiera de los ACPs descritos arriba, teniendo cada uno en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una región de la secuencia del ácido nucleico diana para hibridarse con el mismo, en donde la secuencia hibridante tiene al menos un nucleótido desapareado para generar una mutación dirigida al sitio, en condiciones en las que el cebador o el par de cebadores se reasocia a su secuencia de nucleótidos diana, con lo que se genera un producto de amplificación que contiene la mutación dirigida al sitio; y

(b) llevar a cabo una amplificación en una segunda del producto de amplificación generado a partir de la etapa (a) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando los mismos cebadores que los utilizados en la etapa (a) o un par de cebadores, cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada correspondiente a cada porción en el extremo 5' de los cebadores utilizados en la etapa (a), en condiciones en las que cada cebador se reasocia a los extremos 3' y 5' del producto de amplificación, respectivamente, con lo que se re-amplifica el producto de amplificación que contiene un sitio de mutación dirigida al sitio.

Esta realización específica se refiere a la mutagénesis dirigida al sitio.

Dado que esta aplicación utilizando el ACP de esta invención emplea, en principio, los presentes métodos para la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos previamente comentada, se omiten las descripciones comunes entre ellos, con el fin de evitar la complejidad de esta especificación que conduce a una multiplicidad indebida.

- 5 La fórmula del ACP para la mutagénesis por PCR es idéntica a la fórmula (1), en la que la porción en el extremo 3' comprende una secuencia para la mutagénesis dirigida al sitio o para la mutación aleatoria.

- 10 Todavía en un aspecto adicional de esta invención se proporciona un kit para la mutagénesis en un ácido nucleico diana, que comprende el cebador para el control de la reasociación o el conjunto de cebadores para el control de la reasociación arriba descritos. Las descripciones de los kits para la amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos de esta invención se puede aplicar al presente kit.

XI. Otras aplicaciones

- 15 El ACP de la presente invención también puede ser útil en una diversidad de procesos que implican amplificaciones de ácidos nucleicos, en particular la PCR. Por ejemplo, los procedimientos incluyen una amplificación de ADN cebada por oligonucleótidos mixtos, PCR de largo intervalo, PCR lineal, PCR inversa, PCR cuantitativa, PCR touchdown, secuenciación, PCR *in situ*, vectorette PCR y PCR entrelazada asimétrica térmica. Los procesos generales para estos métodos se pueden encontrar en Joseph Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001) y M.J. McPherson, *et al.*, *PCR*, Editorial Springer New York Inc., N.Y. (2000).

- 20 Por lo tanto, la presente invención abarca todos los usos del cebador de acuerdo con ACP para el procedimiento que implica amplificación de ácidos nucleicos, en particular PCR.

- 25 El ACP de esta invención es significativamente eficaz y es ampliamente accesible a aplicaciones basadas en la amplificación de ácido nucleicos. También diversos problemas relacionados con la especificidad de la reasociación del cebador que persistían en las técnicas previas de amplificación de ácidos nucleicos se pueden resolver fundamentalmente mediante el ACP y los métodos de la presente invención. Los beneficios principales a obtener del uso del ACP durante la amplificación de ácidos nucleicos son como sigue:

- 30 (a) dado que la presencia de una porción de regulador situada entre las porciones en los extremos 3' y 5' restringe la porción de reasociación del cebador a la porción en el extremo 3', en condiciones tales que la porción en el extremo 3' se reasocia al molde, la secuencia de reasociación de un cebador se puede controlar con precisión, lo que hace posible diseñar un cebador capaz de tener solamente un número deseado de la secuencia reasociada (o posible para diseñar un cebador capaz de controlar una porción de reasociación del mismo). Es particularmente útil cuando se ha de limitar una porción de reasociación de un cebador (p. ej. detección del genotipo de SNP, rastreo de la microdisposición de ADN, y detección de genes expresados diferencialmente);

- 40 (b) dado que la presencia de una porción de regulador situada entre las porciones en los extremos 3' y 5' interrumpe la reasociación de la porción en el extremo 5' al molde en condiciones tales que la porción en el extremo 3' se reasocia al molde, finalmente la porción en el extremo 5' no implicada en la reasociación proporciona la porción en el extremo 3' con una especificidad de la reasociación del cebador;

- 45 (c) la especificidad de la reasociación del cebador es muy sensible, lo suficiente como para detectar incluso un desapareamiento de una única base. Es particularmente útil para la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs);

- 50 (d) el ACP es capaz de proporcionar un cebador con una alta tolerancia en "parámetros de búsqueda del cebador" para el diseño del cebador, tal como longitud del cebador, temperatura de reasociación, contenido GC y longitud del producto de la PCR;

- 55 (e) el ACP proporciona amplificaciones de ácidos nucleicos en dos fases que permiten que los productos amplificados sean excluidos de una amplificación no específica;

- (f) se incrementa la eficacia de la amplificación de ácidos nucleicos, lo cual hace más fácil detectar ARNm raros; y

- 60 (g) se incrementa la reproducibilidad de la amplificación de ácidos nucleicos, lo que ahorra una gran cantidad de tiempo y de costes.

- Dado que la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos, tal como la PCR, ha influido sobre el sector biotecnológico, el uso de ACP altera fundamentalmente los principios de los actuales métodos de amplificación de ácidos nucleicos existentes, tal como se ha mencionado antes, exhibiendo una aplicabilidad ilimitada y los han elevado de categoría de una vez. En consecuencia, el ACP y sus diversas aplicaciones descritas en esta memoria proporcionan un punto de inflexión para abrir una nueva era biotecnológica desde la introducción de la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos.

Los siguientes ejemplos específicos pretenden ser ilustrativos de la invención y no deberían ser interpretados como limitantes del alcance de la invención según se define por las reivindicaciones anejas.

Ejemplos

En la descripción experimental que sigue, se emplean las siguientes abreviaturas: M (molar), mM (milimolar), μ M (micromolar), g (gramo), μ g (microgramos), ng (nanogramos), l (litros), ml (mililitros), μ l (microlitros), °C (grados Centígrados); Promega (Promega Co., Madison, EE.UU.); Clontech (CLONTECH Laboratories, Palo Alto, EE.UU.); Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania); QIAGEN (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania).

Los cebadores utilizados en la presente invención se muestran en la Tabla 1.

Ejemplo 1

Evaluación del efecto de la base universal en el ACP

El efecto de los residuos de base universal, situados entre las porciones en los extremos 3' y 5' de ACP se evaluó mediante RT-PCR utilizando tejidos de concepto de ratón.

ARN total se aisló de los conceptos enteros de la raza ICR de ratón en los días de 4,5, 11,5 y 18,5 durante el periodo de gestación, utilizando Tri-reagent (Sigma) o el método de LiCl/urea (Hogan *et al.*, 1994) tal como se ha descrito previamente (Chun *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2000). Se realizaron dos experimentos individuales de amplificaciones de ADNc utilizando ACP para examinar el efecto de la base universal, en particular residuos desoxiinosina situados entre las porciones en los extremos 3' y 5' de ACP como sigue: A. El efecto de residuos desoxiinosina situados entre las porciones en los extremos 3' y 5' de ACP en comparación con ACP y el cebador convencional que no contiene un grupo desoxiinosina; B. El efecto de residuos desoxiinosina situados entre las porciones en los extremos 3' y 5' de ACP en asociación con la alteración del número de desoxiinosinas.

Estos experimentos se efectuaron en base a los siguientes supuestos:

(i) la presencia de residuos de base universal, que tienen una T_m menor que otras porciones en el ACP debido a sus interacciones más débiles en la unión a hidrógeno en el apareamiento de bases, no estarían implicados en la reasociación al ácido nucleico molde bajo las condiciones de que la porción en el extremo 3' de ACP se reasocia a un sitio del molde a una primera temperatura de reasociación.

(ii) la presencia de al menos un residuo de base universal entre las porciones en los extremos 3' y 5' de ACP sería capaz de interrumpir la reasociación de la porción en el extremo 5' y restringir una porción de reasociación del cebador al extremo 3'.

(iii) la porción en el extremo 3' actuaría solamente como una porción de reasociación al molde durante la PCR.

(iv) la porción en el extremo 3' de dT₁₀-ACP, que es dT₁₀ que comprende 10 nucleótidos T también tiene una T_m demasiado bajo para unir el ácido nucleico molde.

(v) por consiguiente, el dT₁₀-ACP no produce productos de PCR algunos bajo una alta temperatura de reasociación.

A. *El efecto de residuos desoxiinosina situados entre las porciones en los extremos 3' y 5' de ACP en comparación con ACP, no conteniendo el cebador un grupo desoxiinosina*

(a) Síntesis de la primera cadena de ADNc

dT₁₀-JYC2 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTT-3' (SEQ ID N°: 29) o dT₁₀-ACP1 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTTTT-3' (SEQ ID N°: 30) se utilizó como un cebador de la síntesis de ADNc.

Tres microgramos de ARN total y 2 μ l de dT₁₀-JYC2 10 μ M o dT₁₀-ACP1 10 μ M se combinaron en un volumen final de 20 μ l. La disolución se calentó a 65°C durante 10 minutos, se apagaron sobre hielo y se microcentrifugaron para recoger el disolvente en el fondo. Los siguientes componentes se añadieron secuencialmente al cebador/molde reasociado sobre hielo: 0,5 μ l (40 unidades/ μ l) del inhibidor de ribonucleasa RNasin (Promega), 4 μ l de tampón de reacción 5x (Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 50 mM; Promega), 5 μ l de 2 mM de cada uno de la mezcla de desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTT) y 1 μ l de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV) (200 unidades/ μ l; Promega). Los 20 μ l de la mezcla de reacción se incubaron a 37°C durante 90 min, se microcentrifugaron y se dispusieron sobre hielo durante 2 min. La reacción se detuvo mediante incubación a 94°C durante 2 min.

ES 2 314 093 T3

(b) Amplificación de ADNc utilizando ACPs

Se utilizó el dT₁₀-ACP1 para examinar el efecto de un grupo desoxigenasa situado entre las porciones en los extremos 3' y 5' durante la PCR. El dT₁₀-JYC2 que no contiene un grupo desoxiinosina se utilizó como un control.

El ACP10 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACC-3' (SEQ ID N° 13) se utilizó como cebador 5' para este experimento.

La amplificación por PCR se efectuó en un volumen de 50 µl que contenía 50 ng del ADNc de la primera cadena, 5 µl de tampón 10 x PCR, 1 µl de 5'-cebador 10 µM (ACP10), 1 µl de 3'-cebador 10 µM (dT₁₀-JYC2 o dT₁₀-ACP1), 3 µl de MgCl₂ 25 mM, 5 µl de dNTP 2 mM, 0,5 µl de Taq polimerasa (5 unidades/µl). Las reacciones PCR se efectuaron bajo las siguientes condiciones: 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 54°C durante 1 min y 72°C durante 1 min; seguido de una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, seguido de tinción con bromuro de etidio.

Como resultado, la Fig. 8 muestra que el dT₁₀-ACP1 que contiene un grupo desoxiinosina no producía casi producto alguno (pistas 4-6), mientras que el dT₁₀-JYC2 que no contiene grupo desoxiinosina alguno producía una pluralidad de productos de ADNc amplificados (pistas 1-3). Consistente con el supuesto de los autores de la invención, los resultados indican claramente que el grupo desoxiinosina situado entre las porciones en los extremos 3' y 5' del dT₁₀-ACP1 al ADNc molde bajo una elevada temperatura de reasociación, dando como resultado producto alguno tal como se establece en el supuesto anterior.

B. El efecto de residuos desoxiinosina situados entre las porciones en los extremos 3' y 5' de ACP en asociación con la alteración del número de desoxiinosina

(a) Síntesis de la primera cadena de ADNc

El ADNc de la primera cadena se sintetizó a partir del ARN total de conceptos de ratón utilizando dT₁₀-JYC2 como cebador de la síntesis de ADNc como antes.

(b) Amplificación de ADNc utilizando ACPs

Este experimento utilizó cuatro ACPs, cada uno de los cuales comprende diferentes números de residuos desoxiinosina para examinar el efecto de residuos desoxiinosina situados entre las porciones en los extremos 3' y 5' en asociación con la alteración del número de desoxiinosinas, bajo condiciones de rigurosidad particulares.

ACP16 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIGCCATCGACC-3' (SEQ ID N° 20);

ACP17 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACC-3' (SEQ ID N° 21);

ACP18 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIIIGCCATCGACC-3' (SEQ ID N° 22);

ACP19 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIIIIIGCCATCGACC-3' (SEQ ID N° 23); y

CRP2I0 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATGCCATCGACC-3' (SEQ ID N° 19),

que no contiene un grupo desoxiinosina se utilizó como un control.

El ADNc de la primera cadena resultante, generado de la etapa (A), que comprende la secuencia arbitraria pre-seleccionada del dT₁₀-ACP en su extremo 5', se utilizó como molde y el cebador JYC2 5'-GCTTGACTACGA-TAACTGTGCGA-3' (SEQ ID N° 10), correspondiente a la porción en el extremo 5' del dT₁₀-ACP se utilizó como 3'-cebador.

La amplificación por PCR se efectuó en un volumen de 50 µl que contenía 50 ng del ADNc de la primera cadena, 5 µl de tampón 10 x PCR, 1 µl de 5'-cebador 10 µM (ACP16, 17, 18, 19 o CRP2I0), 1 µl de 3'-cebador 10 µM (JYC2), 3 µl de MgCl₂ 25 mM, 5 µl de dNTP 2 mM, 0,5 µl de Taq polimerasa (5 unidades/µl). Las reacciones PCR estaban constituidas por: 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 1 min, 57°C durante 1 min y 72°C durante 1 min; seguido de una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, seguido de tinción con bromuro de etidio.

Como resultado, la Fig. 9 muestra que el CRP2I0 que no contiene residuos desoxiinosina producía una pluralidad de productos de ADNc amplificados, mientras que los ACPs que contienen al menos dos residuos desoxiinosina generaban la reducción significativa de productos de ADNc amplificados e, incluso más, el ACP que contenía ocho residuos desoxiinosina no producía casi producto alguno. Consistente con el supuesto de los autores de la invención,

ES 2 314 093 T3

los resultados indican claramente que la reasociación de la porción en el extremo 3' de ACP al molde podría separarse de la porción en 5', ya que un grupo de residuos desoxiinosina contiguos separa la reasociación de las porciones en los extremos 3' y 5', bajo condiciones de alta rigurosidad debido a la propiedad de desoxiinosina tal como su interacción más débil de la unión de hidrógeno en el apareamiento de bases.

Ejemplo 2

Método para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos diana utilizando ACP

El ACP de la presente invención se empleó para amplificar secuencias de nucleótidos diana de ADNc del gen homeobox *Esx1* específico para placenta de ratón. Se describen en esta memoria el procedimiento y los resultados para la amplificación de las secuencias de nucleótidos diana de ADNc de *Esx1* utilizando ACPs. Como material de partida se utilizó ARN total (3 μ g) obtenido de placenta de 18,5 días de edad de ratón. Se prepararon ADNcs de la primera cadena bajo las mismas condiciones que las utilizadas en la síntesis de ADNc del Ejemplo 1, excepto que se utilizó oligo-dT₁₅ como cebador en la síntesis de ADNc de la primera cadena.

Oligo-dT₁₅ 5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3' (SEQ ID N°: 54)

Los ADNcs de la primera cadena resultante se utilizaron como moldes para amplificar fragmentos de ADNc diana de *Esx1* utilizando ACPs. Estos experimentos efectuaron amplificaciones por PCR en dos fases, que es un rasgo único de la presente invención.

Los cebadores convencionales de *Esx1* utilizados en el Ejemplo son:

EsxN7 5'-GCCGGTTGCAGAAGCACC-3' (SEQ ID N° 44);

EsxC6 5'-GAACCATGTTTCTGAATGCC-3' (SEQ ID N° 45);

EsxN1 5'-GAATCTGAAACAACCTTTCTA-3' (SEQ ID N° 48);

EsxC2 5'-GATGCATGGGACGAGGCACC-3' (SEQ ID N° 49);

EsxN3 5'-CGCCGCAACCCCTGCCCCGCA-3' (SEQ ID N° 51); y

EsxC5 5'-GATGCATGGGACGAGGCA-3' (SEQ ID N° 52).

Tres conjuntos de cebadores, EsxN7 y EsxC6, EsxN1 y EsxC2, y EsxN3 y EsxC5 se utilizaron en el Ejemplo, debido a que son conocidos como los conjuntos de cebadores que generan altos fondos, así como productos no específicos en métodos de PCR convencionales, como se conoce en la técnica.

De acuerdo con sistemas de PCR de una sola diana, deberían elegirse cebadores con temperaturas de fusión (T_m) similares. Sin embargo, un conjunto de cebadores de EsxN1 (T_m 50,7°C) y EsxC2 (T_m 71,9°C) muestra aproximadamente 20°C de diferentes temperaturas de fusión entre ellos, y un conjunto de cebadores de EsxN3 (T_m 86,9°C) y EsxC5 (T_m 66,2°C) tiene ambos altas temperaturas de fusión. También se selecciona un conjunto de cebadores de EsxN7 (T_m 68,2°C) y EsxC6 (T_m 61,2°C), que tiene una temperatura de fusión relativamente similar para observar el efecto de ACP.

El ACP de la presente invención se aplicó a estos tres conjuntos de cebadores convencionales para demostrar si el sistema de ACP puede superar los problemas principales que surgen de estos conjuntos de cebadores convencionales, tales como el fondo y productos no específicos.

Los siguientes ACPs comprenden las secuencias de los cebadores convencionales anteriores en sus porciones en el extremo 3' y se utilizaron como cebadores específicos para genes *Esx1* para la amplificación por PCR en primera fase:

EsxN7-ACP cebador 5' 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGCCGGTTGCAGAAGCACC-3' (SEQ ID N°: 46);

EsxC6-ACP cebador 3' 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGAACCATGTTTCTGAATGCC-3' (SEQ ID N°: 47);

EsxN1-ACP cebador 5' 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGAATCTGAAACAACCTTTCTA-3' (SEQ ID N°: 50);

EsxC2-ACP cebador 3' 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGATGCATGGGACGAGGCACC-3' (SEQ ID N°: 55);

EsxN3-ACP cebador 5' 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCGCTTCATIIIIICGCCGCAACCCCTGCCCCGCA-3'
(SEQ ID N°: 53);

EsxC5-ACP cebador 3' 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGATGCATGGGACGAGGCA-3'
(SEQ ID N°: 56).

Las secuencias de la porción en el extremo 5' de los ACPs se sirvieron como secuencias de cebadores arbitrarios preseleccionados solamente para la amplificación por PCR en segunda fase: JYC2 y JYC4 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT-3' (SEQ ID N°: 12).

Durante la amplificación por PCR en primera fase, el conjunto de cebadores de EsxN7-ACP y EsxC6-ACP se utilizaron como cebadores 5' y 3', respectivamente, para generar el fragmento de 520 pb de ADNc de *Esx1*, el conjunto de cebadores de EsxN1-ACP y EsxC2-ACP se utilizaron como cebadores 5' y 3', respectivamente, para generar el fragmento de 784 pb de ADNc de *Esx1* y el conjunto de cebadores de EsxN3-ACP y EsxC5-ACP se utilizaron como cebadores 5' y 3', respectivamente, para generar el fragmento de 483 pb de ADNc de *Esx1*.

Durante la amplificación por PCR en segunda fase, JYC4 y JYC2 se utilizaron como cebadores 5' y 3' arbitrarios preseleccionados, respectivamente (Protocolo A). Como una alternativa, las secuencias completas de los ACPs, en lugar de los cebadores arbitrarios preseleccionados, tales como JYC4 y JYC2, se pueden utilizar como cebadores 5' y 3' para la amplificación por PCR en segunda fase en las condiciones de alta rigurosidad. En este caso, no es necesario añadir los cebadores arbitrarios preseleccionados a la mezcla de reacción en el momento de o después de la reacción por PCR en primera fase (Protocolo B).

Protocolo A

Amplificación por PCR en dos fases y una parada

(A) Amplificación por PCR en primera fase

La amplificación por PCR en primera fase se efectuó por el método de PCR de inicio caliente en el que el proceso es para crear las reacciones completas sin la ADN polimerasa e incubar los tubos en el ciclador térmico para completar la etapa de desnaturalización inicial a >90°C. Después, al tiempo que se mantienen los tubos a una temperatura por encima de 70°C, se puede pipetear en la reacción la cantidad apropiada de ADN polimerasa.

La amplificación por PCR en primera fase se efectuó mediante dos ciclos de PCR que consistía en la reacción de reasociación, extensión y desnaturalización, la mezcla de reacción en un volumen de 49,5 µl que contenía 50 ng del ADNc de la primera cadena, 5 µl de tampón de reacción 10 x PCR (Promega), 5 µl de MgCl₂ 25 mM, 5 µl de dNTP (2 mM en cada caso de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,35 µl de ACP (1 µM) y 1,35 µl de 3' ACP (1 µM) se precalienta a 94°C, al tiempo que se mantiene el tubo que contiene la mezcla de reacción a 94°C, 0,5 µl de Taq polimerasa (5 unidades/µl) se añade a la mezcla de reacción; las reacciones PCR comprendían dos ciclos de 94°C durante 40 s, 60°C durante 40 s, 60°C durante 40 s y 72°C durante 40 s; seguido de desnaturalizar el producto de amplificación a 94°C.

(B) Amplificación por PCR en segunda fase

El producto de ADNc resultante, generado mediante la amplificación por PCR en primera fase utilizando ACPs específicos para genes *Esx1*, se amplificó después por la siguiente amplificación por PCR en segunda fase bajo una mayor temperatura de reasociación. Después de completarse la amplificación por PCR en primera fase, se añadieron en cada caso 1 µl de cebadores arbitrarios preseleccionados 10 µM, JYC4 y JYC2, a la mezcla de reacción obtenida de la amplificación por PCR en primera fase, bajo una temperatura de desnaturalización tal como 94°C. La reacción PCR en segunda fase era como sigue: 35 ciclos a 94°C durante 40 s, 68°C durante 40 s y 72°C durante 40 s; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se detectaron mediante tinción con bromuro de etidio. Los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturalizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsén *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Tal como se muestra en las Figs. 10A-C, las amplificaciones por PCR en segunda fase y de una parada para *Esx1* utilizando cada uno de los conjuntos de cebadores de EsxN7-ACP y EsxC6-ACP, EsxN1-ACP y EsxC2-ACP, y EsxN3-ACP y EsxC5-ACP generaba una única banda que corresponde al tamaño esperado, 520 pb (Fig. 10A, pista 2), 784 pb (Fig. 10B, pista 4) y 483 pb (Fig. 10C, pista 3) de fragmentos de ADNc de *Esx1*, respectivamente. La subsiguiente clonación y análisis de la secuencia de los clones confirman que la banda es fragmentos de ADNc de *Esx1*. En contraposición, los conjuntos de cebadores convencionales, que contienen las secuencias correspondientes sólo a las porciones en el extremo 3' de cada uno de los conjuntos de ACPs, proporcionaban productos no específicos, así como altos fondos tal como una difusión de ADN (Fig. 10A, pista 1; Fig. 10B, pista 3; Fig. 10C, pistas 1 y 2). Dado

que los productos de la PCR utilizando un conjunto de ACPs comprenden las secuencias arbitrarias preseleccionadas en sus extremos 5' y 3', se encontraron secuencias de 54 pb adicionales, correspondientes a las secuencias arbitrarias preseleccionadas y residuos desoxiinosina.

La Fig. 10A muestra los productos de ADNc amplificados, generados por los siguientes conjuntos de cebadores de EsxN7 y EsxC6 (pista 1), y un conjunto de EsxN7-ACP y EsxC6-ACP (pista 2). Las reacciones PCR utilizando el conjunto de cebadores convencionales de EsxN7 y EsxC6 eran como sigue: 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 40 s, 60°C durante 40 s y 72°C durante 40 s; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

La Fig. 10B muestra los productos de ADNc amplificados, generados por un único cebador o un conjunto de cebadores, como sigue: los cebadores EsxN1 y EsxC2 se utilizaron en las pistas 1 y 2, respectivamente; una combinación de EsxN1-ACP y cebador convencional EsxC2 se utilizó en la pista 3; dos ACPs, EsxN1-ACP y EsxC2-ACP, se utilizaron en la pista 4. Cuando un conjunto de cebadores convencionales, EsxN1 y EsxC2, se utilizó bajo una elevada temperatura de reasociación de 60°C, no se producía producto diana específico alguno. Cuando se utilizó un conjunto de cebadores que comprendía un ACP, EsxN1-ACP, y un cebador convencional de EsxC2, se amplificaron un producto específico para la diana, así como productos no específicos debido a la unión no específica del cebador convencional EsxC2 (pista 3). Sin embargo, cuando se utilizó un conjunto de ACPs, solamente se amplificó un único producto específico para la diana (pista 4), lo cual indica que el ACP de la presente invención proporciona cebadores con tolerancia al "parámetro de diseño del cebador" relacionado con las temperaturas de fusión de cebadores generales solicitados para sistemas de PCR de una única diana.

La Fig. 10C muestra los productos de ADNc amplificados, generados al utilizar los siguientes conjuntos de cebadores: un conjunto de EsxN3 y EsxC5 se utilizó en las pistas 1 y 2 y un conjunto de EsxN3-ACP y EsxC5-ACP se utilizó en la pista 3. Las reacciones PCR utilizando el conjunto de cebadores convencionales de EsxN3 y EsxC5 eran como sigue: 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 40 s, 58°C durante 40 s y 72°C durante 40 s; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C (pista 1). El conjunto de cebadores convencionales también se comparó con el conjunto de ACPs realizando las mismas amplificaciones por PCR en dos fases que las utilizadas en el ACP, de manera que su temperatura de reasociación aumentaba de 60°C a 68°C (pista 2). Estos resultados también indican que, a pesar de que se utilizan los cebadores convencionales, incluidos los que tienen una elevada T_m , en la misma amplificación por PCR en dos fases, no podrían estar exentos de problemas de productos no específicos y de fondo, mientras que el ACP de la presente invención puede superar problemas de este tipo que surgen de estos cebadores convencionales.

Protocolo B

Amplificaciones por PCR en dos fases, continuas

Alternativamente, para la amplificación por PCR en segunda fase en las condiciones de alta rigurosidad se pueden utilizar las secuencias completas de los ACPs en lugar de los cebadores arbitrarios preseleccionados, tales como JYC4 y JYC2. En este caso, no es necesario añadir los cebadores arbitrarios preseleccionados a la mezcla de reacción en el momento de o después de la reacción PCR en primera fase.

El procedimiento de las amplificaciones por PCR en dos fases, continuas es básicamente idéntico al Protocolo A, excepto que los ACPs, 1 μ l de 5' ACP (10 μ M) y 1 μ l de 3' ACP (10 μ M) se añaden en la amplificación por PCR en primera fase, y la amplificación por PCR en segunda fase sigue inmediatamente a la amplificación por PCR en primera fase sin demora alguna, debido a que no existe etapa de añadir cebadores arbitrarios preseleccionados.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se detectaron mediante tinción con bromuro de etidio. Los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

La Fig. 10D muestra los productos de ADNc amplificados, generados por las amplificaciones por PCR en dos fases, continuas, utilizando el siguiente único cebador o un par de cebadores; los cebadores EsxN1 y EsxC2 se utilizaron en las pistas 1 y 2, respectivamente; un par de EsxN1 y EsxC2 se utilizó en la pista 3; y un par de EsxN1-ACP y EsxC2-ACP se utilizó en la pista 4. Cuando se utilizó un conjunto de cebadores convencionales, EsxN1 y EsxC2, no se producía producto diana específico alguno. Sin embargo, cuando se utilizó un conjunto de ACPs en amplificaciones por PCR en dos fases, continuas, sólo se amplificó un producto específico para la diana (pista 4), lo cual es consistente con los resultados de amplificaciones por PCR en dos fases, de una parada (Fig. 10B).

Estos ejemplos ilustran que el ACP permite que los productos estén exentos de los problemas de fondo, así como de la no especificidad que surgen de los cebadores convencionales utilizados en los métodos de PCR como se describen en la técnica. También se puede entender que el ACP permite la generación de productos específicos, independientemente del diseño de cebadores específicos para genes.

Ejemplo 3

Identificación y caracterización de ARNms expresados diferencialmente durante el desarrollo embrionario de ratón utilizando ACP

El ACP de la presente invención se ha empleado para detectar ARNms expresados diferencialmente en desarrollos embrionarios. Específicamente, en esta memoria se describen tres procesos diferentes y los resultados utilizando diferentes fases de ARNs totales de concepto como materiales de partida. Los cebadores utilizados en la presente invención se muestran en la Tabla 1.

A1. Proceso 1

Etapa (1)

Síntesis de ADNc de la primera cadena

Los ADNcs de la primera cadena se prepararon en las mismas condiciones a las utilizadas en la síntesis de ADNc del Ejemplo 1, utilizando el dT₁₀-ACP1 o JYC5-T₁₅-ACP como un cebador de la síntesis de ADNc. Los ADNcs resultantes se purifican o mediante una columna spin (kit de purificación por PCR, QIAGEN) para separar cebadores, dNTP, y los reactivos anteriores. Es necesario realizar la etapa de purificación antes que la determinación de la concentración de los ADNcs, utilizando la espectroscopia UV a una absorbancia de 260 nm. Se utilizó la misma cantidad de ADNcs para cada muestra para comparar sus patrones de amplificación utilizando el sistema de ACP descrito en esta memoria.

Etapa (2)

Amplificación de PCR en primera fase utilizando ACP

Se utilizaron los siguientes ACPs como ACPs arbitrarios (AR-ACP) para la primera amplificación por PCR:

ACP3	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACS-3'	(SEQ ID N°:3);
ACP5	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIAGGCGATGCS-3'	(SEQ ID N°:5);
ACP8	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIICTCCGATGCS-3'	(SEQ ID N°:8);
ACP10	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACC-3'	(SEQ ID N°:13);
ACP13	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIAGGCGATGCG-3'	(SEQ ID N°:16); y
ACP14	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIICTCCGATGCC-3'	(SEQ ID N°:17).

Las secuencias de las porciones en el extremo 5' del dT₁₀-ACP1 y AR-ACP) sirven como secuencias de cebadores arbitrarios preseleccionados solamente para la segunda amplificación por PCR. Los cebadores arbitrarios preseleccionados son JYC2 y JYC4.

Los ADNcs de la primera cadena producidos a partir de la etapa (1) se amplificaron mediante la siguiente amplificación por PCR en primera fase utilizando uno de los AR-ACP) (ACP3, ACP5, ACP8, ACP10, ACP13 o ACP14) y el dT₁₀-ACP1 como cebadores 5' y 3', respectivamente. La amplificación por PCR en primera fase se efectuó en un volumen de 50 µl que contenía 50 ng de ADNc de la primera cadena, 5 µl de tampón de reacción 10 x PCR (Promega), 3 µl de MgCl₂ 25 mM, 5 µl de dNTP (0,2 mM en cada caso dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 5 µl de cebador 5' (1 µM), 5 µl de cebador 3' (1 µM) y 0,5 µl de Taq polimerasa (5 unidades/µl; Promega). Las reacciones PCR eran como sigue: 5 min a 94°C, seguido de 20 ciclos de 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min y 72°C durante 1 min; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

El ciclo de la amplificación por PCR en primera fase se puede variar en función de los tipos de muestras. Por ejemplo, se utilizaron los 20 ciclos de la primera amplificación por PCR para muestras de concepto de ratón.

ES 2 314 093 T3

Etapa (3)

Amplificación por PCR en segunda fase utilizando cebadores arbitrarios preseleccionados correspondientes a secuencias de la porción en el extremo 5' de ACPs

5 Los productos de ADNc amplificados, producidos a partir de la etapa (2), se re-amplifican mediante la siguiente amplificación por PCR en segunda fase utilizando dos cebadores arbitrarios preseleccionados, JYC4 y JYC2, correspondiendo cada uno de ellos a las secuencias de la porción en el extremo 5' de AR-ACP y dT₁₀-ACP1, respectivamente. La amplificación por PCR en segunda fase se efectuó en un volumen de 50 µl que contenía 5 µl de los productos de
10 ADNc amplificados (50 µl), 5 µl de tampón de reacción 10 x PCR (Promega), 3 µl de MgCl₂ 25 mM, 5 µl de dNTP 2 mM, 1 µl de cebador 5' (10 µM), 1 µl de cebador 3' (10 µM) y 0,5 µl de Taq polimerasa (5 unidades/µl). Las reacciones PCR eran como sigue: 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 65°C durante 1 min y 72°C durante 1 min; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

15 A2. Proceso 2

El proceso alternativo comprende las siguientes etapas de;

20 (a) proporcionar una primera muestra de ácidos nucleicos que representa una primera población de transcritos de ARNm y una segunda muestra de ácidos nucleicos que representa una segunda población de transcritos de ARNm;

(b) poner en contacto cada una de la primera muestra de ácidos nucleicos y la segunda muestra de ácidos nucleicos con un primer ACP, en donde el primer ACP tiene una secuencia hibridante, esencialmente complementaria a una
25 región de las primera y segunda poblaciones de transcritos de ARNm, para hibridarse con los mismos;

(c) transcribir a la inversa el ARNm al que se hibrida el primer ACP para producir una primera población de cadenas de ADN que son complementarias a los ARNms en la primera muestra de ácidos nucleicos a la que se hibrida el primer ACP, y una segunda población cadenas de ADN que son complementarias a los ARNms en la segunda
30 muestra de ácidos nucleicos a la que se hibrida el primer ACP;

(d) purificar y cuantificar las cadenas de ADN complementarias, producidas como resultado de la etapa de transcripción inversa (c);

35 (e) sintetizar una la segunda cadena de ADN complementaria a cada una de las primera y segunda poblaciones de cadenas de ADN utilizando un segundo ACP bajo condiciones de baja rigurosidad, mediante al menos un ciclo de PCR que comprende desnaturalización, reasociación y extensión del cebador, en donde el segundo ACP tiene una secuencia hibridante esencialmente complementaria a las primera y segunda poblaciones de cadenas de ADN;

40 (f) amplificar cada una de las segundas cadenas de ADN obtenidas de la etapa (e) en condiciones de alta rigurosidad, mediante al menos un ciclo de PCR que comprende desnaturalización, reasociación y extensión del cebador para generar una primera y segunda poblaciones de productos de amplificación utilizando dos cebadores arbitrarios preseleccionados, cada uno de los cuales comprende una secuencia correspondiente a cada una de las porciones en el extremo 5' de los primero y segundo cebadores para el control de la reasociación; y

45 (g) comparar la cantidad de productos de amplificación individuales en las primera y segunda poblaciones de productos de amplificación.

Los ADNcs de la primera cadena se sintetizan utilizando JYC5-T₁₅-ACP 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGA
50 TTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (SEQ ID N° 61).

La secuencia de la porción en el extremo 5' de JYC5-T₁₅-ACP sirve como una secuencia de cebador arbitraria preseleccionada en 3' a utilizar únicamente para la segunda fase de la amplificación por PCR:

55 JYC5 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGAT-3' (SEQ ID N°: 60).

Etapa (1)

60 Síntesis de ADNc de la primera cadena

1. Combinar 3 µg de ARN total y 2 µl de JYC5-T₁₅-ACP 10 µM en un tubo de microcentrífuga estéril de 0,2 ml.

65 2. Añadir H₂O estéril hasta un volumen final de 9,5 µl. Mezclar el contenido y centrifugar el tubo brevemente en una microcentrífuga.

3. Incubar el tubo a 80°C durante 3 minutos o utilizar un termociclador para los mismos fines.

ES 2 314 093 T3

4. Enfriar el tubo sobre hielo durante 2 minutos. Centrifugar el contenido del tubo brevemente en una microcentrífuga.

5. Al mismo tubo de reacción añadir los siguientes reactivos: 4 μ l de tampón 5x first strand (Promega), 5 μ l de dNTP (2 mM en cada caso de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 μ l de inhibidor de Rnasas (40 unidades/ μ l, Promega) y 1 μ l de transcriptasa inversa M-MLV (200U/ μ l).

6. Mezclar y centrifugar el tubo brevemente en una microcentrífuga.

10 7. Incubar el tubo a 42°C durante 90 min.

8. Incubar el tubo a 94°C durante 2 minutos para terminar la síntesis de la primera cadena.

15 9. Colocar el tubo en hielo durante 2 min.

10. Purificar los ADNcs resultantes mediante una columna spin (kit de purificación por PCR, QIAGEN) para separar cebadores, dNTP, y los reactivos anteriores.

20 11. Seguidamente, medir la concentración de los ADNcs utilizando la espectroscopia UV a una absorbancia de 260 nm.

12. Procesar hasta la etapa 2.

25 Etapa (2)

Síntesis de ADNc de la segunda cadena utilizando ACP

30 Se utilizó la misma cantidad de ADNcs de cada muestra para la comparación de de sus patrones de amplificación utilizando los ACPs descritos en esta memoria. El ADNc de la segunda cadena se sintetizó utilizando ACP10 arbitrario por el método de PCR de inicio caliente, en que el proceso consiste en establecer las reacciones completas sin la ADN polimerasa e incubar los tubos en el ciclador térmico para completar la etapa de desnaturalización inicial a >90°C. Después, al tiempo que se mantienen los tubos a una temperatura por encima de 90°C, se puede pipetear a la reacción la cantidad apropiada de ADN polimerasa.

35 1. Combinar los siguientes reactivos en un tubo de microcentrífuga estéril de 0,2 ml: 49,5 μ l del volumen total que contiene 1 μ l de ADNc de la primera cadena (50 ng/ μ l) preparado en la etapa 1, 5 μ l de tampón de 10 x PCR (Roche), 5 μ l de dNTP 2 mM, 1 μ l de ACP arbitrario 10 μ M (cebador 5') y 37,5 μ l de dH₂O estéril.

40 2. Mezclar el contenido y centrifugar el tubo brevemente en una microcentrífuga.

3. Colocar el tubo en el ciclador térmico precalentado a 94°C.

45 4. Añadir los 0,5 μ l de Taq polimerasa (5 unidades/ μ l; Roche) a la reacción, al tiempo que se mantiene el tubo a una temperatura de 94°C.

5. Efectuar la reacción PCR bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 94°C durante 5 min, 50°C durante 3 min y 72°C durante 1 min; seguido de la desnaturalización del primer producto de amplificación a 94°C.

50 Etapa (3)

Amplificación por PCR de los ADNcs de la segunda cadena utilizando cebadores arbitrarios preseleccionados correspondientes a secuencias de la porción en el extremo 5' de ACPs

55 1. Después de completar la amplificación por PCR en primera fase, al tiempo que se mantienen los tubos a una temperatura superior a 94°C, añadir 2 μ l de JYC4 10 μ M y 2 μ l de JYC5 10 μ M, en que cada uno corresponde a las secuencias de las porciones en el extremo 5' de los dos ACPs 5' y 3', respectivamente, a la mezcla de reacción utilizada en la etapa (2).

60 2. Efectuar reacciones PCR en segunda fase bajo las siguientes condiciones: 40 ciclos de 94°C durante 40 s, 68°C durante 40 s y 72°C durante 40 s; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

A3. Proceso 3

65 Como un procedimiento alternativo, en la etapa (f) del Proceso 2, se pueden utilizar como cebadores 3' y 5' , respectivamente, las secuencias completas de los primero y segundo ACPs utilizados en las etapas (b) y (c) del Proceso 2, en lugar de las secuencias arbitrarias preseleccionadas de las porciones en los extremos 5' de los primero y segundo

ACPs, a las condiciones de alta rigurosidad para amplificar cada una de las segundas cadenas de ADN obtenidas de la etapa (e) del Proceso 2, en donde los extremos 3' y 5' de las segundas cadenas de ADN, que inicialmente fueron sintetizadas utilizando el segundo ACP, comprenden la secuencia del primer ACP y la secuencia complementaria del segundo ACP, respectivamente, y también sirven como sitios de apareamiento perfectos a los primero y segundo ACPs. En este caso, no es necesario añadir los cebadores arbitrarios preseleccionados a la mezcla de reacción en el momento de o después de la reacción PCR en primera fase.

Etapa (1)

Síntesis de ADNc de la primera cadena

Los ADNcs de la primera cadena se prepararon bajo las mismas condiciones que las utilizadas en la síntesis de ADNc del Proceso 2, utilizando el JYC5-T₁₅-ACP como un cebador de la síntesis de ADNc.

Etapa (2)

Síntesis y amplificación de ADNc de la segunda cadena utilizando PCR en dos fases, continua

Se utilizó la misma cantidad de ADNcs de cada muestra para la comparación de de sus patrones de amplificación utilizando los ACPs descritos en esta memoria. El ADNc de la segunda cadena se sintetizó utilizando ACP10 arbitrario por el método de PCR de inicio caliente, en que el proceso consiste en establecer las reacciones completas sin la ADN polimerasa e incubar los tubos en el ciclador térmico para completar la etapa de desnaturalización inicial a >90°C. Después, al tiempo que se mantienen los tubos a una temperatura por encima de 90°C, se puede pipetear a la reacción la cantidad apropiada de ADN polimerasa.

1. Combinar los siguientes reactivos en un tubo de microcentrífuga estéril de 0,2 ml: 49,5 µl del volumen total que contiene 1 µl de ADNc de la primera cadena (50 ng/µl) preparado en la etapa 1, 5 µl de tampón de 10 x PCR (Roche), 5 µl de dNTP 2 mM, 1 µl de ACP10 arbitrario 10 µM (cebador 5'), 1 µl de JYC5-T₁₅-ACP 10 µM (cebador 3') y 36,5 µl de dH₂O estéril.

2. Mezclar el contenido y centrifugar el tubo brevemente en una microcentrífuga.

3. Colocar el tubo en el ciclador térmico precalentado a 94°C.

4. Añadir los 0,5 µl de Taq polimerasa (5 unidades/µl; Roche) a la reacción, al tiempo que se mantiene el tubo a una temperatura de 94°C.

5. Efectuar la reacción PCR bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 94°C durante 1 min, 50°C durante 3 min y 72°C durante 1 min; seguido de 40 ciclos de 94°C durante 40 s, 65°C durante 40 s y 72°C durante 40 s; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

B. Separación de productos de la PCR amplificados mediante análisis de la electroforesis y recuperación de las bandas expresadas diferencialmente

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se detectaron mediante tinción con bromuro de etidio. Se seleccionaron varias bandas principales expresadas diferencialmente durante el desarrollo embrionario (E4.5, E11.5 y E18.5), se escindieron y se extrajeron de los geles utilizando el kit GENE-CLEAN II (BIO 101). Los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturalizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tales como tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

C. Re-amplificación de las bandas recuperadas

Las bandas obtenidas de la etapa B se re-amplificaron utilizando los mismos cebadores arbitrarios preseleccionados y condiciones de la PCR que los utilizados en los Procesos 1, 2, 3.

D. Clonación y secuenciación de los fragmentos re-amplificados

Cada uno de los fragmentos amplificados se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega) y se secuenció con el analizador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Biosystem), utilizando el kit secuenciador del ciclo BigDye Terminator (Perkin Elmer). El análisis de la secuencia asistido por ordenador se llevó a cabo utilizando el programa de búsqueda BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

E. *Análisis Northern*

Veinte microgramos de ARN total procedente de tejidos concepto se resolvieron sobre geles de agarosa al 1% que contenían formaldehído, se transfirieron a membranas de nilón (Hybond-N, Amersham, EE.UU.) y se hibridaron con un producto de la PCR subclonado y marcado con ³²P en solución QuikHyb (Stratagene, EE.UU.) durante una noche a 58°C, tal como se ha descrito previamente (Chun *et al.*, 1999; Hwang *et al.*, 2000). Los borrones se lavaron a 65°C dos veces durante 20 min en 2 x SSC, SDS al 0,1%, dos veces durante 20 min en 1 x SSC, SDS al 0,1% y dos veces durante 20 min en 0,1 x SSC, SDS al 0,1%. Las membranas se expusieron a una película Kodak X-Qmat XK-1 con una pantalla intensificadora Fuji a -80°C.

Las Figs. 11A-D muestran los productos de ADNc amplificados, en donde muestras de concepto de ratón, obtenidas de diferentes fases, se amplificaron mediante el Proceso 1, utilizando los conjuntos de cebadores como sigue: un conjunto de ACP3 y dT₁₀-ACP1 para las pistas 1-3 de la Fig. 11A; un conjunto de ACP5 y dT₁₀-ACP1 para las pistas 1-6 de la Fig. 11B y un conjunto de ACP8 y dT₁₀-ACP1 para las pistas 7-12 de la Fig. 10B, respectivamente. La Fig. 11B también muestra resultados adicionales de los productos de ADNc amplificados, generados al utilizar otros conjuntos de ACP. Las Figs. 11C-D muestran los productos amplificados, generados al utilizar dos conjuntos de cebadores del ACP10 y dT₁₀-ACP1 (Fig. 11C) y ACP14 y dT₁₀-ACP1 (Fig. 11D), respectivamente. Se obtuvieron muchas bandas expresadas diferencialmente en una fase específica, se subclonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega) y se secuenciaron. El análisis de las secuencias revela que todos los clones son genes conocidos, excepto dos nuevos genes (Tabla 2). Los patrones de expresión se confirmaron mediante análisis del borrón Northern utilizando el borrón de la fase de concepto de ratón (Seegene, Inc., Seoul, Corea).

La Fig. 12A muestra los productos de ADNc amplificados, en donde muestras de concepto de ratón (E4.5: pista 1; E11.5: pista 2; E18.5: pista 3), obtenidas de diferentes fases se amplificaron mediante el Proceso 2 utilizando un conjunto de ACP10 y JYC5-dT₁₅-ACP. Se obtuvieron muchas bandas expresadas diferencialmente en una fase específica, se subclonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega) y se secuenciaron. El análisis de las secuencias revela que se obtuvieron clones son genes conocidos, excepto uno, DEG 2 (Tabla 2). Los patrones de expresión se confirmaron mediante análisis del borrón Northern utilizando el borrón de la fase de concepto de ratón (Seegene, Inc., Seoul, Corea).

La Fig. 12B muestra los productos de ADNc amplificados, en donde muestras de concepto de ratón en las diferentes fases (E4.5: pista 3; E11.5: pista 4; E18.5: pista 5) se amplificaron mediante amplificaciones por PCR en dos fases, continuas, utilizando un conjunto de ACP10 y JYC5-dT₁₅-ACP, tal como se menciona antes en el Proceso 3. Cuando se utilizó un conjunto de ACP10 y JYC5-dT₁₅-ACP (pistas 3-5), las bandas resultantes eran idénticas a las bandas que se obtuvieron mediante el Proceso 2 que comprenden amplificaciones por PCR en dos fases, de una parada (Fig. 12A). Sin embargo, no se generaron productos algunos cuando se utilizó un único cebador, ACP10 (pista 1) o JYC5-dT₁₅-ACP (pista 2), lo que indica que los productos amplificados se generaron solamente cuando se utilizaron tanto ACP10 como JYC5-dT₁₅-ACP como un conjunto para sus uniones específicas.

La Fig. 13 muestra los resultados de la hibridación por borrón Northern para representar seis clones diferentes utilizando DEG1 (A; flecha 1 de las Fig. 10A, Fig. 11 y Fig. 12), DEG2 (C), DEG3 (B; flecha 2 de las Fig. 10A, Fig. 11 y Fig. 12), DEG5 (E), DEG7 (F) y DEG8 (D; flecha 4 de las Fig. 10A, Fig. 11 y Fig. 12) como sondas. La sonda DEG1 se hibridó también a la isoforma alternativa de tropomiosina 2 (flecha 1' de las Fig. 11 y Fig. 12), que se descubrió mediante la presente invención. Consistente con los resultados del análisis en gel de agarosa, el análisis del borrón Northern demostró que los patrones de expresión de los clones son idénticos a las bandas originales en los geles de agarosa, indicando que todos los clones son productos positivos verdaderos. Así, el ACP produce solamente productos positivos sin positivos falsos algunos, lo que significa que el ACP elimina el problema de falsos positivos.

La Fig. 14 muestra los resultados de la hibridación por el borrón Northern para la expresión de DEG5 durante el desarrollo embrionario de ratón, lo que resultó como un nuevo gen mediante el análisis de la secuencia, muestra interesantes patrones de expresión: después de fuerte expresión aparecida en la fase de embarazo temprano (E4.5), su expresión se redujo gradualmente en las fases centrales y aumentó gradualmente de nuevo en la fase de desarrollo tardío (E17.5 y E18.5).

Estos resultados indican que el método utilizando ACP para aislar genes expresados diferencialmente proporciona solamente productos reales de la PCR y elimina por completo productos falsos positivos. La exención de falsos positivos, que han sido un cuello de botella principal que permanece para la técnica de expresión diferencial previa permite evitar el subsiguiente trabajo complejo requerido para la verificación de los fragmentos de ADNc identificados por expresión diferencial.

Ejemplo 5

Método para la amplificación rápida de extremos 3' de ADNc (3'-RACE) utilizando ACP

Los presentes ejemplos comparan la 3'-RACE basada en ACP y la 3'-RACE convencional con el fin de demostrar si el ACP de la presente invención puede excluir problemas de fondo de este tipo que surgen de cebadores oligo-dT convencionales utilizados en la síntesis de ADNc.

En la 3'-RACE convencional, se explota la cola poli(A) de moléculas de ARNm como un sitio de cebado para la amplificación por PCR y, así, el cebador oligo-dT se utiliza como un cebador 3' para la 3'-RACE convencional. En contraposición, el ACP de la presente invención utiliza la cola poli(A) de ARNm como un sitio de cebado sólo para la síntesis de ADNc, pero no para la subsiguiente amplificación por PCR.

ADNcs de la primera cadena de ratón se prepararon bajo las mismas condiciones que las utilizadas en la síntesis de ADNc del Ejemplo 1, utilizando oligo VdT₁₅-ACP 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTTTTTTTTV-3' (SEQ ID N°: 57) (V es A, C o G) en forma de un cebador de la síntesis de ADNc y luego se utilizaron directamente como moldes para la subsiguiente amplificación por PCR sin la etapa de purificación para la separación del cebador de la síntesis de ADNc.

Para la 3'-RACE convencional, los ADNcs de la primera cadena se sintetizaron utilizando el siguiente cebador para la síntesis de ADNc:

CDS III/3' 5'-ATTCTAGAGGCCGAGCGGCCGACATG-(dT)₃₀-VN-3' (SEQ ID N°: 35) (V es A, C o G; y N es A, C, T o G).

Este cebador de la síntesis de ADNc, CDS III/3', se utilizó como el cebador 3' para la subsiguiente amplificación por PCR.

La amplificación por PCR se efectuó en un volumen de 50 µl que contenía 50 ng de ADNc de la primera cadena, 5 µl de tampón 10 x PCR (Promega), 1 µl de un cebador 5' específico para genes (10 µM), 1 µl de un cebador 3' arbitrario preseleccionado JYC2 (10 µM) o CDS III/3' (10 µM) 3 µl de MgCl₂ 25 mM, 5 µl de dNTP y 0,5 µl de Taq polimerasa (5 unidades/µl; Promega). Las reacciones PCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 65°C durante 1 min y 72°C durante 1 min; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, seguido de tinción con bromuro de etidio. Los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

La Fig. 15 muestra los resultados de 3'-RACE basada en beta-actina. La 3'-RACE convencional (pista 1) se comparó con 3'-RACE basada en ACP (pista 2). El método 3'-RACE convencional no proporcionaba productos no específicos algunos, así como fondo de difusión de ADN, mientras que la 3'-RACE basada en ACP producía solamente una única banda, que es el tamaño esperado de 348 pb. Estos resultados indican que la 3'-RACE basada en ACP puede excluir los problemas de fondo tales como la difusión de ADN y productos no específicos.

Ejemplo 6

Método para la rápida amplificación del extremo 5' (5'-RACE) y ADNcs de longitud completa utilizando ACP

El ACP de la presente invención también se utilizó para amplificar los extremos 5' de fragmentos de ADNc. Los ADNcs de la primera cadena se sintetizaron utilizando oligo VdT₁₅-ACP o dN₆-ACP aleatorio:

Oligo VdT₁₅-ACP 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTTTTTTTTV-3' (SEQ ID N°: 57), en donde V puede ser A, C o G;

dN₆-ACP aleatorio 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIINNNNNN-3' (SEQ ID N°: 58), en donde N puede ser A, C, G o T.

Después de la síntesis completa de las secuencias de ADNc de la primera cadena, presentes en forma de intermedios de ARNm-ADNc, residuos citosina se disponen como colas en el extremo 3' de las secuencias de ADNc de la primera cadena mediante la reacción con transferasa terminal de la transcriptasa inversa en presencia de manganeso. Los extremos 3' de los ADNcs de la primera cadena se extendieron utilizando el ACP de extensión del extremo 3' del ADNc de la primera cadena (rG3-ACP, rG2-ACP o dG3-ACP) y luego se utilizó directamente como moldes para la subsiguiente amplificación por PCR sin una etapa de purificación para la separación del ACP de extensión del extremo 3' del ADNc de la primera cadena, así como el cebador de la síntesis de ADNc.

Las secuencias de los ACPs de extensión del extremo 3' del ADNc de la primera cadena son:

rG3-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCGCTTCATIIIIIGGr(GGG)-3' (SEQ ID N°: 36);

rG2-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCGCTTCATIIIIIGGr(GG)-dG-3' (SEQ ID N°: 37);

rG1-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCGCTTCATIIIIIGGr(G)-d(GG)-3' (SEQ ID N°: 59); o

ES 2 314 093 T3

dG3-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCGCTTCATIIIIIGGd(GGG)-3' (SEQ ID N°: 38)

(en donde r y d representan ribonucleótido y desoxirribonucleótido, respectivamente).

5

A. Etapa (1)

Síntesis de ADNc de la primera cadena, de longitud completa

10

Protocolo A

Síntesis de ADNc de la primera cadena utilizando el ACP de la presente invención

15 1. Combinar lo siguiente en un tubo de microcentrífuga estéril de 0,2 ml: 3 µg de ARN total y 2 µl de oligo VdT₁₅-ACP 10 µM o dN₆-ACP aleatorio.

2. Añadir H₂O estéril hasta un volumen final de 10 µl. Mezclar el contenido y centrifugar el tubo brevemente en una microcentrífuga.

20 3. Incubar el tubo en un baño de agua a 65°C durante 15 minutos o utilizar un termociclador para los mismos fines.

4. Enfriar el tubo sobre hielo durante al menos 2 minutos. Centrifugar el contenido del tubo brevemente en una microcentrífuga.

25 5. Al mismo tubo de reacción añadir los siguientes reactivos: 4 µl de tampón 5x first strand (Invitrogen), 1 µl de DTT 0,1 M, 2 µl de dNTP (10 mM en cada caso de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,4 µl de MnCl₂ 100 mM y 0,5 µl de inhibidor de RNasa (40 unidades/µl, Promega).

6. Mezclar el contenido y centrifugar el tubo brevemente en una microcentrífuga.

30

7. Incubar el tubo a 42°C durante 2 minutos en una incubadora o termociclador.

8. Añadir 1 µl de transcriptasa inversa SuperScript II (200 unidades/µl; Invitrogen).

35 9. Incubar el tubo a 42°C durante 1 hora en una incubadora o un termociclador.

10. Añadir 1 µl de ACP de extensión del extremo 3' de ADNc de la primera cadena (rG3-ACP, rG2-ACP o dG3-ACP).

40 11. Añadir 0,3 µl de transcriptasa inversa SuperScript II (200 unidades/µl; Invitrogen).

12. Incubar el tubo a 42°C durante 30 minutos en una incubadora o un termociclador.

45 13. Incubar el tubo a 70°C durante 15 minutos en una incubadora o un termociclador para terminar la síntesis de la primera cadena.

14. Colocar el tubo en hielo o se puede almacenar a -20°C.

50

Protocolo B

Síntesis de ADN de la primera cadena, de longitud completa, por el método CapFinder

Se utilizan los siguientes cebadores en el método CapFinder (Clontech):

55

SMART IVTM oligonucleótido 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACGGCCCr(GGG)-3' (SEQ ID N°: 33); y

5' cebador PCR 5'-AAGCAGTGGTATCAACHIGCAGAGT-3' (SEQ ID N°: 34) y cebador para PCR CDS III/3'.

60

1. Combinar lo siguiente en un tubo de microcentrífuga estéril de 0,2 ml: 3 µg de ARN total, 1 µl de cebador para PCR CDS III/3' 10 µM (Clontech) y 1 µl de oligonucleótido SMART IV 10 µM (Clontech).

65 2. Añadir H₂O estéril hasta un volumen final de 5 µl. Mezclar el contenido y centrifugar el tubo brevemente en una microcentrífuga.

3. Incubar el tubo a 72°C durante 2 minutos.

ES 2 314 093 T3

4. Enfriar el tubo sobre hielo durante 2 minutos. Centrifugar el contenido del tubo brevemente en una microcentrífuga.

5. Al mismo tubo de reacción añadir los siguientes reactivos: 10 μ l de un volumen total que contiene 0,2 μ l de tampón 5x first strand (Clontech), 1 μ l de DTT 20 mM, 1 μ l de dNTP (10 mM en cada caso de dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y 1 μ l de transcriptasa inversa PowerScript (Clontech).

6. Mezclar el contenido y centrifugar el tubo brevemente en una microcentrífuga.

7. Incubar el tubo a 42°C durante 1 hora.

8. Colocar el tubo en hielo o se puede almacenar a -20°C.

B. Amplificación por PCR

Protocolo C

Amplificación de un fragmento de ADNc en el extremo 5', diana, utilizando un sistema de ACP o un método 5'-RACE convencional

El presente ejemplo compara la actual tecnología CapFinder 5'-RACE y el método 5' RACE basado en ACP, en donde la actual tecnología CapFinder 5'-RACE no podría excluir el alto fondo debido a la cantidad residual de cebadores durante el procedimiento. Con el fin de demostrar si el ACP de la presente invención puede eliminar problemas de fondo de este tipo que surgen de cebadores tales como el cebador CapFinder, el oligonucleótido SMART IV (Clontech) y el cebador de la síntesis de ADNc, el cebador para PCR CDS III/3' (Clontech), utilizados en la síntesis de ADNc, se efectuaron en las mismas condiciones tanto la 5'-RACE basada en ACP como la 5'-RACE basada en CapFinder para la amplificación de los extremos 5' de ADNcs de JunB y beta-actina. El ARNm de JunB de ratón es un transcrito relativamente raro en el ARN de placenta de ratón de 18,5 días de edad, mientras que la beta-actina de ratón es relativamente abundante.

1. Combinar los siguientes reactivos en un tubo de microcentrífuga estéril de 0,2 ml: 50 μ l del volumen total que contiene 1 μ l de ADNc de la primera cadena preparado a partir del Protocolo A o B, 5 μ l de tampón de 10 x PCR (Promega), 5 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 5 μ l de dNTP 2 mM, 1 μ l de cebador 5'-RACE específico para genes 10 μ M, 1 μ l de cebador JYC2 o 5' PCR 10 μ M, 0,5 μ l de Taq polimerasa (5 unidades/ μ l; Promega) y 31,5 μ l de dH_2O estéril.

2. Mezclar el contenido y centrifugar el tubo brevemente en una microcentrífuga.

3. Realizar una reacción PCR bajo las siguientes condiciones: 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 58°C durante 40 segundos y 72°C durante 1 min 30 s, seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

4. Analizar los productos amplificados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, seguido de tinción con bromuro de etidio.

Los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturalizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Tal como se muestra en la Fig. 16, los métodos CapFinder para 5'-RACE de JunB y beta-actina de ratón, utilizando un cebador 5' PCR (Clontech) y el cebador específico para genes producían altos fondos, tales como difusión de ADN (pistas 1 y 3) según se describe por muchos investigadores (Chenchik *et al.*, 1998; Matz *et al.*, 1999; Schramm *et al.*, 2000), mientras que la 5'-RACE basada en ACP de la presente invención generaba solamente una única banda que corresponde a cada uno de los fragmentos de ADNc en el extremo 5' JunB de ratón (pista 2) o beta-actina de ratón (pista 4) del tamaño esperado de 155 pb ó 319 pb, respectivamente. Estos ejemplos ilustran que el ACP se puede utilizar, fundamentalmente, para eliminar problemas de fondo que surgen de la contaminación de los cebadores utilizados durante la síntesis de ADNc, sin la etapa de purificación para la separación de cebadores utilizados en la síntesis de ADNc.

La Fig. 17 también muestra que el ACP de la presente invención permite que no se formen los productos no específicos, que se generan por el método CapFinder (pista 1). El ADNc de la primera cadena se sintetizó por el método CapFinder (pista 1) o el método ACP (pistas 2, 3 y 4) y luego se utilizó directamente como molde en la subsiguiente amplificación por PCR para la proteína PLP-C alfa 5'-RACE, similar a prolactina de ratón. El cebador de 5'-RACE específico para PLP-C alfa es: PLP-C alfa 5'-GAGAGGATAGTTTCAGGGAC-3' (SEQ ID N°: 40). Los ACPs de extensión del extremo 3' de ADNc de la primera cadena, que comprenden tres riboguaninas (rG3-ACP: pista 2), tres desoxirriboguaninas (dG3-ACP; pista 4) o una combinación de dos riboguaninas y una desoxirriboguanina (rG2-ACP;

ES 2 314 093 T3

pista 3) en el extremo 3', generaban ADNcs de extremo 5', de manera que una única banda, que corresponde al tamaño esperado de 506 pb del fragmento de ADNc en el extremo 5' de PLP-C alfa de ratón, se producía a partir de la PCR basada en ACP para 5'-RACE de PLP-C alfa.

5

Protocolo D

Amplificación de fragmentos enriquecidos en 5' utilizando ACP

10 Los ADNcs de la primera cadena se sintetizan utilizando dN₆-ACP aleatorio en el Protocolo A. La amplificación por PCR se realizó por el método PCR de inicio caliente, en el que el proceso consiste en establecer las reacciones completas sin la ADN polimerasa e incubar los tubos en el ciclador térmico para completar la etapa de desnaturalización inicial a >90°C. Después, al tiempo que se mantienen los tubos a una temperatura por encima de 70°C, se puede pipetear en la reacción la cantidad apropiada de ADN polimerasa.

15

1. Combinar los siguientes reactivos en un tubo de microcentrífuga estéril de 0,2 ml: 49,5 µl del volumen total que contiene 1 µl de ADNc de la primera cadena preparado a partir de dN₆-ACP aleatorio en el Protocolo A, 5 µl de tampón de 10 x PCR (Promega), 5 µl de MgCl₂ 25 mM, 5 µl de dNTP 2 mM, 1 µl de JYC2 10 µM (cebador 3'), 1 µl de JYC4 10 µM (cebador 5') y 31,5 µl de dH₂O estéril.

20

2. Mezclar el contenido y centrifugar el tubo brevemente en una microcentrífuga.

3. Colocar el tubo en un ciclador térmico precalentado a 94°C.

25

4. Añadir los 0,5 µl de Taq polimerasa (5 unidades/µl; Promega) a la reacción, al tiempo que se mantiene el tubo a la temperatura de 94°C.

30

5. Realizar una reacción PCR bajo las siguientes condiciones: 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 68°C durante 40 segundos y 72°C durante 1 min 30 s; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

6. Analizar los productos amplificados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, seguido de tinción con bromuro de etidio.

35

Los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturalizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

40

Protocolo E

Amplificación de ADNcs enriquecidos, de longitud completa, utilizando ACP

45

Los ADNcs de la primera cadena se sintetizan utilizando oligo VdT₁₅-ACP en el Protocolo A. La amplificación por PCR se realizó por el método PCR de inicio caliente como en el Protocolo D.

50

1. Combinar los siguientes reactivos en un tubo de microcentrífuga estéril de 0,2 ml: 49,5 µl del volumen total que contiene 1 µl de ADNc de la primera cadena preparado a partir de oligo VdT₁₅-ACP en el Protocolo A, 5 µl de tampón de 10 x PCR (Promega), 5 µl de MgCl₂ 25 mM, 5 µl de dNTP 2 mM, 1 µl de JYC2 10 µM (cebador 3'), 1 µl de JYC4 10 µM (cebador 5') y 31,5 µl de dH₂O estéril.

55

2. Mezclar el contenido y centrifugar el tubo brevemente en una microcentrífuga.

3. Colocar el tubo en un ciclador térmico precalentado a 94°C.

60

4. Añadir los 0,5 µl de Taq polimerasa (5 unidades/µl; Promega, Madison, EE.UU.) a la reacción, al tiempo que se mantiene el tubo a la temperatura de 94°C.

5. Realizar una reacción PCR bajo las siguientes condiciones: 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 68°C durante 40 segundos y 72°C durante 1 min 30 s; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

65

6. Analizar los productos amplificados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, seguido de tinción con bromuro de etidio.

Los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturalizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Para evaluar la eficacia del método utilizando ACP en la amplificación de los ADNcs de longitud completa, los ADNcs de longitud completa, amplificados por los procesos anteriores del método ACP o el actual método CapFinder se transfirieron a una membrana Hybond-N (Amersham/United States Biochemical). El ADNc de gliceraldehídos-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH - siglas en inglés) de ratón se marcó con [alfa-³²P]dCTP utilizando un kit de marcaje alaeatorio (Roche Diagnostics Co., Indianapolis, EE.UU.) y se utilizó como una sonda.

Tal como se muestra en la Fig. 18, la sonda de ADNc de GAPDH detectó una única banda que corresponde al tamaño esperado de 1,3 kb de ADNc de GAPDH de longitud completa. Como era de esperar, las señales de los productos de la PCR generados por el método ACP anterior (pista 2) eran varias veces más intensas que las generadas por el método CapFinder (pista 1). Este ejemplo ilustra que el método ACP de la presente invención amplifica de una manera mucho más eficaz ADNcs de longitud completa que lo hace el método CapFinder.

Ejemplo 7

Toma de huellas genómica utilizando la PCR cebada arbitrariamente basada en ACP

El ACP de la presente invención se ha empleado para detectar polimorfismos en el ratón. Los ADNs genómicos de las razas de ratón C57BL/6J, CBA, BALB/cJ, NOR, SPRETUS, PANCEVO y ratón Korean Wild se utilizaron como materiales de partida. ADN genómico se preparó a partir del hígado de ratones utilizando el kit de tejidos QIAamp Tissue (QIAGEN, Hilden, Alemania). Los ACPs arbitrarios utilizados en la presente invención son:

ACP101 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCGGAGGATC-3' (SEQ ID N°: 64);
 ACP109 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICTGCAGGACG-3' (SEQ ID N°: 65); y
 ACP116 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICGGAGCATCC-3' (SEQ ID N°: 66).

Para la toma de huellas genómica de ratón se utilizó un conjunto de ACPs arbitrarios, ACP101 y ACP109 (Fig. 19A), o ACP101 y ACP116 (Fig. 19B). La amplificación por PCR se realizó mediante PCR de inicio caliente según se describe en el Ejemplo 2. La toma de huellas genómica utilizando ACP se efectúa mediante dos fases de amplificaciones por PCR, bajo las siguientes condiciones: las reacciones de amplificación se realizan bajo condiciones de baja rigurosidad mediante dos ciclos de la PCR en primera fase que comprende reasociación, extensión y reacción de desnaturalización; la mezcla de reacción en el volumen final de 49,5 μ l que contenía 50 ng del ADN genómico, 5 μ l de tampón de reacción 10 x PCR (Promega), 5 μ l de MgCl₂ 25 mM, 5 μ l de dNTP (2 mM en cada caso de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), en cada caso 7 μ l de un par de ACPs (cada uno 10 μ M) se precalienta a 94°C, al tiempo que se mantiene el tubo que contiene la mezcla de reacción a 94°C, 0,5 μ l de Taq polimerasa (5 unidades/ μ l) se añade a la mezcla de reacción; las reacciones PCR son como sigue: dos ciclos de 94°C durante 40 s, 52°C durante 3 min y 72°C durante 1 min; seguido de desnaturalizar el producto de amplificación a 94°C; después de la reacción completa de la PCR en primera fase, se añaden a la mezcla de reacción 4 μ l del cebador arbitrario preseleccionado JYC4 (10 μ M) correspondiente a la porción en el extremo 5' de los ACPs, y después la amplificación en segunda fase se realiza como sigue: 40 ciclos de 94°C durante 40 s, 68°C durante 40 s y 72°C durante 40 s; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

Los productos de la amplificación se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, el cual se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió. Los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturalizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

La Fig. 19 muestra los resultados de un experimento, en el cual se utilizó un par de ACPs arbitrarios para amplificar segmentos de ADN genómico a partir de una diversidad de razas de ratón. Para examinar la reproducibilidad de la toma de huellas genómica, se duplicó la toma de huellas de cada raza de ratón utilizando dos conjuntos diferentes de ACPs. La amplificación por PCR basada en ACP producía varios segmentos de ADN a partir de cada uno de los conjuntos de cebadores y los resultados eran reproducibles. Los polimorfismos eran evidentes entre las razas de ratones, indicando que las razas de ratones se pueden distinguir a través de polimorfismos en las tomas de huellas genómicas generadas por la PCR cebada arbitrariamente y basada en ACP. Así, el ACP de la presente invención es útil para detectar polimorfismos y construir mapas genéticos.

ES 2 314 093 T3

Ejemplo 8

PCR multiplex utilizando la PCR basada en ACP

5 Para demostrar la aplicación del ACP en la PCR multiplex, las porciones que contenían polimorfismos de un solo nucleótido de la molécula de adhesión de leucocitos humanos I (ELAM1) y genes p53 (TP53) humanos se amplificaron con cebadores convencionales o ACP. El procedimiento y los resultados para la amplificación por PCR multiplex utilizando ACPs se describen en esta memoria. El molde de ADN se obtuvo de placenta humana.

10 Los cebadores convencionales para el exón 3 de ELAM1 (155 pb) utilizados en el Ejemplo son:

ELAM1N1 5'-TTGCACACTGTTGATTCTAA-3' (SEQ ID N°: 67); y

15 ELAM1C1 5'-TTATTGATGGTCTCTACACA-3' (SEQ ID N°: 68).

Los cebadores convencionales para el exón 10 de ELAM1 (287 pb) utilizados en el Ejemplo son:

20 ELAM1N2 5'-CCACTGAGTCCAACATTC-3' (SEQ ID N°: 69); y

ELAM1N2 5'-CTGAAACACTTCCCACAC-3' (SEQ ID N°: 70).

25 Los cebadores convencionales para el exón 4 de TP53 (349 pb) utilizados en el Ejemplo son:

P53N1 5'-CCTCTGACTGCTCTTTTCAC-3' (SEQ ID N°: 71); y

30 P53C1 5'-ATTGAAGTCTCATGGAAGCC-3' (SEQ ID N°: 72).

35 Los cebadores convencionales para los exones 7-8 de TP53 (750 pb) utilizados en el Ejemplo son:

P53N2 5'-YGCTTGCCACAGGTCTC-3' (SEQ ID N°: 73); y

40 P53C2 5'-GCAGTGCTAGGAAAGAGG-3' (SEQ ID N°: 74).

Estos cebadores convencionales, utilizados en el Ejemplo, son conocidos como los cebadores que generan productos no específicos en métodos de PCR multiplex convencionales, tal como se conoce en la técnica.

45 Las porciones en el extremo 3' de los ACPs comprenden las secuencias de los cebadores convencionales anteriores como sigue y, así, el tamaño de los ACPs es 26 pb ó 27 pb mayor que el de los cebadores convencionales:

ELAM1N1-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITGACACTGTTGATTCTAA-3' (SEQ ID N°: 75);

50 ELAM1C1-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIITATTGATGGTCTCTACAC-3' (SEQ ID N°: 76);

ELAM1N2-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCACTGAGTCCAACATTC-3' (SEQ ID N°: 77);

55 ELAM1C2-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIICTGAAACACTTCCCACAAC-3' (SEQ ID N°: 78);

P53N1-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCTCTGACTGCTCTTTTCAC-3' (SEQ ID N°: 79);

60 P53C1-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIATTGAAGTCTCTCATGGAAGCC-3' (SEQ ID N°: 80);

P53N2-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITGCTTGCCACAGGTCTC-3' (SEQ ID N°: 81);

65 P53C2-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIIGCAGTGCTAGGAAAGAGG-3' (SEQ ID N°: 82).

ES 2 314 093 T3

Las secuencias de las porciones en el extremo 5' de los ACPs comprenden y sirven como secuencias de cebadores arbitrarias preseleccionadas solamente para la amplificación por PCR en segunda fase:

JYC3 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGA-3' (SEQ ID N°: 11) y

JYC4 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT-3' (SEQ ID N°: 12).

Las amplificaciones por PCR multiplex se efectuaron mediante amplificaciones por PCR en dos fases, de una parada o continuas, lo cual es un rasgo único de la presente invención. La amplificación por PCR se realizó por el método de PCR de inicio caliente según se describe en el Ejemplo 2.

Protocolo A

Amplificaciones por PCR en dos fases, de una parada

(A) Amplificación por PCR en primera fase

La amplificación por PCR en primera fase se efectuó mediante dos ciclos de PCR que comprendían reasociación, extensión y reacción de desnaturalización; la mezcla de reacción en el volumen final de 49,5 μ l que contenía 50 ng del ADN genómico humano, 8 μ l de tampón de reacción 10 x PCR (Promega), 7 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 5 μ l de dNTP (2 mM en cada caso de dATP, dCTP, dGTP, dTTP), en cada caso 0,5 μ l de cada uno de los conjuntos de 5' ACP (10 μ M) y 3' ACP (10 μ M) se precalienta a 94°C, al tiempo que se mantiene el tubo que contiene la mezcla de reacción a 94°C, 0,5 μ l de Taq polimerasa (5 unidades/ μ l; Promega) se añade a la mezcla de reacción; las reacciones PCR son como sigue: dos ciclos de 94°C durante 40 s, 60°C durante 40 s y 72°C durante 40 s; seguido de desnaturalizar el producto de amplificación a 94°C.

(B) Amplificación por PCR en segunda fase

Los productos resultantes, generados por la amplificación por PCR en primera fase utilizando múltiples conjuntos de los ACPs, se amplificaron luego mediante la siguiente amplificación por PCR en segunda fase bajo una alta temperatura de reasociación. Después de completar la amplificación por PCR en primera fase, en cada caso 2 μ l de cebadores arbitrarios preseleccionados 10 μ M, JYC3 y JYC4, se añadieron a la mezcla de reacción obtenida de la amplificación por PCR en primera fase, bajo una temperatura de desnaturalización tal como 94°C. La reacción PCR en segunda fase era como sigue: 40 ciclos de 94°C durante 40 s, 68°C durante 40 s y 72°C durante 1 min; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, y se detectaron tiñendo con bromuro de etidio. Los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturalizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Las Figs. 20 y 21 muestran los resultados de experimentos en los que se utilizaron tres o cuatro conjuntos de cebadores para amplificar segmentos múltiples de ADN genómico en una reacción. Los conjuntos de cebadores convencionales generaban productos no específicos, así como productos diana específicos a partir de tres conjuntos (Fig. 20A) o cuatro conjuntos (Fig. 21A) de cebadores. En contraposición, los tres conjuntos (Fig. 20B) o cuatro conjuntos (Fig. 21B) de ACPs proporcionaban solamente productos diana multiplex. Así, el ACP de la presente invención se puede utilizar para la aplicación de la PCR multiplex.

Protocolo B

Amplificaciones por PCR en dos fases, continuas

Alternativamente, como cebadores para la amplificación por PCR en segunda fase en las condiciones de alta rigurosidad se pueden utilizar las secuencias completas de cada uno de los conjuntos de ACPs en lugar de los cebadores arbitrarios preseleccionados, tales como JYC4 y JYC2. En este caso, no es necesario añadir los cebadores arbitrarios preseleccionados a la mezcla de reacción en el momento de o después de la reacción PCR en primera fase.

El procedimiento de las amplificaciones por PCR en dos fases, continuas es básicamente idéntico al Protocolo A, excepto que la amplificación por PCR en segunda fase sigue inmediatamente a la amplificación por PCR en primera fase sin demora alguna, debido a que no existe etapa de añadir cebadores arbitrarios preseleccionados y a que la concentración de cada uno de los conjuntos de ACPs, en cada caso 1 μ l de 5' ACP (10 μ M) y 3' ACP (10 μ M), se añade a la amplificación por PCR en primera fase.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se detectaron mediante tinción con bromuro de etidio. Los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Consistente con los resultados de amplificaciones por PCR en dos fases, de una parada, (Fig. 21B), las amplificaciones por PCR en dos fases, continuas, también proporcionaban sólo productos específicos multiplex diana (Fig. 21C). Estos ejemplos ilustran que el ACP permite que los productos estén exentos de los problemas de fondo, así como de la no especificidad que surge de los cebadores convencionales utilizados en métodos de PCR multiplex tal como se conoce en la técnica.

Ejemplo 9

Identificación de segmentos de homología conservada en familias de multigenes utilizando ACP

El ACP de la presente invención se aplicó para detectar y clonar segmentos de homología conservada en familias de multigenes. En el presente ejemplo, se diseñaron cebadores degenerados para detectar secuencias homeobox. Los genes homeobox se caracterizan por una secuencia de nucleótidos conservada de 180 pb, conocida como la homeobox, que codifica un homeodominio de unión a ADN de 60 aa (aminoácidos). Para aislar genes homeobox implicados en el desarrollo embrionario de ratón se utilizó, como material de partida, ARN total obtenido de tres fases diferentes del desarrollo del concepto, conceptos de ratones de 4,5, 11,5 y 18,5 días de edad. Se prepararon ADNcs de primera cadena en las mismas condiciones que las utilizadas en la síntesis de ADNc del Ejemplo 3, en donde se utilizó JYC5-T₁₅-ACP como el cebador de la síntesis de ADNc de primera cadena.

Los siguientes ACPs comprenden las secuencias degeneradas para la secuencia homeobox en sus porciones en el extremo 3' y se utilizaron como cebadores específicos para homeobox, degenerados, para la amplificación por PCR en primera fase:

JYC2-HD1 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTGTGGTT-3' (SEQ ID N°: 83);

JYC2-HD2 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTCTGGTT-3' (SEQ ID N°: 84); y

JYC2-HD3 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTTTGGTT-3' (SEQ ID N°: 85).

La amplificación por PCR se realizó mediante el método PCR de inicio caliente según se describe en el Ejemplo 2 y se efectuó mediante amplificaciones por PCR en dos fases, de una parada o continuas. Lo siguiente es un ejemplo del procedimiento de amplificaciones por PCR en dos fases, de una parada.

1. Combinar los siguientes reactivos en un tubo de microcentrífuga estéril de 0,2 ml: 49,5 μ l del volumen total que contiene 1 μ l de ADNc de la primera cadena (50 ng/ μ l), 5 μ l de tampón de 10 x PCR (Roche), 5 μ l de dNTP 2 mM, 1 μ l de uno de JYC2-HD1, JYC2-HD2 o JYC2-HD3 10 μ M (cebador 5'), 1 μ l de JYC5-T₁₅-ACP 10 μ M (cebador 3') y 36,5 μ l de dH₂O estéril.

2. Mezclar el contenido y centrifugar el tubo brevemente en una microcentrífuga.

3. Colocar el tubo en un ciclador térmico precalentado a 94°C.

4. Añadir 0,5 μ l de Taq polimerasa (5 unidades/ μ l; Roche) a la reacción, al tiempo que se mantiene el tubo a la temperatura de 94°C.

5. Realizar una reacción PCR bajo las siguientes condiciones: un ciclo de 94°C durante 1 min, 52°C durante 3 min y 72°C durante 1 min; seguido de 40 ciclos de 94°C durante 40 s, 65°C durante 40 s y 72°C durante 40 s; y seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se detectaron mediante tinción con bromuro de etidio. Los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

Se obtuvieron muchas bandas expresadas diferencialmente en una fase específica, se subclonaron en el vector pGEM-T Easy (Promega) y se secuenciaron. El borrón Northern o el análisis por RT-PCR demuestra que los clones son idénticos a los resultados de los patrones de expresión observados por la electroforesis. Estos resultados indican

que el método utilizando el ACP de la presente invención para aislar segmentos de homología conservada en familias de multigenes proporciona solamente productos de PCR reales. La exención de falsos positivos, que es un cuello de botella principal que permanece en las técnicas previas basadas en PCR para aislar segmentos de homología conservada en familias de multigenes permite evitar el subsiguiente trabajo complejo requerido para la verificación de los fragmentos de ADNc amplificados.

Ejemplo 10

Detección del genotipo de polimorfismos de un solo nucleótido utilizando PCR basada en ACP

Para demostrar la aplicación de ACP en la detección del genotipo de polimorfismos de un solo nucleótido, una porción que contenía un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) del gen p53 (TP53) humano se amplificó con un cebador convencional o ACP. El procedimiento y los resultados para la detección del genotipo de SNP utilizando ACPs se describen en esta memoria. Se obtuvieron moldes de ADN a partir de muestras de sangre humana que tienen un SNP en el exón 4 del gen TP53. Este polimorfismo se expresa como una sustitución Arg → Pro en la posición de aminoácido 72, reemplazando C por G. Una secuencia de 349 nt (nucleótidos) entre los nucleótidos 11991 y 12339 del gen TP53 se amplificó a partir de cada tipo de molde mediante un conjunto de los siguientes cebadores:

P53N 5'CCTCTGACTGCTCTTTTCAC-3' (SEQ ID N°: 86) y
P53C-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIATTGAAGTCTCATGGAGCC-3' (SEQ ID N°: 87).

Los productos amplificados que contenían el SNP entre sus extremos se utilizaron como moldes para detectar el SNP, utilizando ACPs específicos para alelos, como sigue:

P53N1A-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIICCCCGCGTGG-3' (SEQ ID N°: 88),
P53N1B-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIICCCCCCGTGG-3' (SEQ ID N°: 89),
P53N2A-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIICCCCGCGTG-3' (SEQ ID N°: 90),
P53N2B-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIICCCCCCGTG-3' (SEQ ID N°: 91),
P53N3A-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIICCCCGCGT-3' (SEQ ID N°: 92),
P53N3B-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIICCCCCCGT-3' (SEQ ID N°: 93),
P53N4A-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCCGCG-3' (SEQ ID N°: 94),
P53N4B-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCCCCG-3' (SEQ ID N°: 95),
P53N5A-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCCG-3' (SEQ ID N°: 96) y
P53N5B-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCTCCCCC-3' (SEQ ID N°: 97).

La base polimórfica está subrayada en la porción en el extremo 3' de cada uno de los ACPs específicos para alelos y se considera a la posición de la base polimórfica una posición de interrogación. La posición de interrogación está situada en varias posiciones diferentes desde el extremo 3' de ACPs específicos para alelos, con el fin de determinar la posición más crítica en la especificidad de reasociación para detectar el SNP.

Los ACPs específicos para alelos se utilizaron como cebadores 5'. P53C-ACP y uno de P53N1A-ACP, P53N2A-ACP, P53N3A-ACP, P53N4A-ACP y P53N5A-ACP se utilizaron para la detección del genotipo A de tipo salvaje. P53C-ACP y uno de P53N1B-ACP, P53N2B-ACP, P53N3B-ACP, P53N4B-ACP y P53N5B-ACP se utilizaron para la detección del genotipo B de tipo variante. Las secuencias de la porción en el extremo 5' de los ACPs servían como secuencias de cebadores arbitrarias preseleccionadas para la amplificación por PCR en segunda fase:

JYC3 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGA-3' (SEQ ID N°: 11) y
JYC4 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCAT-3' (SEQ ID N°: 12).

(A) Amplificación por PCR en primera fase

La amplificación por PCR en primera fase se efectuó mediante un ciclo de PCR que consistía en reasociación, extensión y reacción de desnaturalización; la mezcla de reacción en un volumen final de 49,5 μ l que contenía 1 μ l del segmento genómico diana amplificado que contenía el SNP en el exón 4 del gen TP53, 5 μ l de tampón de reacción 10 x PCR (Promega), 5 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 5 μ l de dNTP (2 mM en cada caso de dATP, dCTP, dGTP, dTTP) y 1 μ l de uno de los ACPs específicos para alelos (10 μ M) se precalienta a 94°C, al tiempo que se mantiene el tubo que contiene la mezcla de reacción a 94°C, 0,5 μ l de Taq polimerasa (5 unidades/ μ l; Promega) se añade a la mezcla de reacción; para los ACPs específicos para alelos que tienen 10 nucleótidos en su porción en el extremo 3', las reacciones PCR son como sigue: un ciclo de 94°C durante 40 s, 55°C durante 40 s y 72°C durante 40 s; seguido de desnaturalizar el producto de amplificación a 94°C; para los ACPs específicos para alelos que tienen 8 nucleótidos en su porción en el extremo 3', las reacciones PCR son como sigue: un ciclo de 94°C durante 40 s, 55°C durante 40 s y 72°C durante 40 s; seguido de desnaturalizar el producto de amplificación a 94°C. El producto resultante es una primera cadena de ADN, complementaria al segmento genómico diana.

(B) Amplificación por PCR en segunda fase

El producto resultante, generado por la amplificación por PCR en primera fase, se amplificó luego mediante la siguiente amplificación por PCR en segunda fase bajo una temperatura de reasociación mayor que la primera temperatura de reasociación. Después de completar la amplificación por PCR en primera fase, 1 μ l de cebador arbitrario preseleccionado 10 μ M, JYC3, se añadió a la mezcla de reacción obtenida de la amplificación por PCR en primera fase, bajo una temperatura de desnaturalización tal como 94°C. La reacción PCR en segunda fase era como sigue: 30 ciclos de 94°C durante 40 s, 68°C durante 40 s y 72°C durante 40 s; seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C.

Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%, y se detectaron tiñendo con bromuro de etidio. Los productos de la PCR resultantes también se pueden detectar en un gel de poliacrilamida desnaturalizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radiactivos tal como tinción con plata (Gottschlich *et al.*, 1997; Kociok *et al.*, 1998), el uso de oligonucleótidos marcados por fluorescencia (Bauer *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1994; Luehrsén *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997) y el uso de cebadores biotinilados (Korn *et al.*, 1992; Tagle *et al.*, 1993; Rosok *et al.*, 1996).

La Fig. 22 muestra los resultados de la amplificación específica para alelos utilizando ACP. El par de ACPs específicos para A de tipo salvaje (P53N2A-ACP y P53C-ACP) generaba un producto diana específico, solamente a partir de las muestras con detección del genotipo homocigótico A de tipo salvaje (pista 1) o heterocigótico (pista 3), pero no a partir de las muestras con detección del genotipo homocigótico B de tipo variante (pista 5). El par de ACPs específicos para B de tipo variante (P53N2B-ACP y P53C-ACP) generaba un producto diana específico, solamente a partir de las muestras con detección del genotipo homocigótico B de tipo variante (pista 6) o heterocigótico (pista 4), pero no a partir de las muestras con detección del genotipo homocigótico A de tipo salvaje (pista 2). Estos resultados indican que el ACP de la presente invención se puede aplicar, como un método fácil y económico, para detectar el genotipo de SNPs, ya que en esta propuesta no se requiere el uso de una sonda de ADN fluorescente ni el post-tratamiento por PCR. Los ACPs específicos para alelos, cada uno de los cuales tiene una posición de interrogación en su porción en el extremo 3', mostraron una mejora de la especificidad de la reasociación. Además, cuando el ACP específica para alelos tiene una posición de interrogación en la posición 5 desde el extremo 3' (p. ej. P53N2A-ACP y P53N2B-ACP), se alcanza de la forma más crítica la especificidad de la reasociación.

Con el fin de verificar si la posición 5 desde el extremo 3' real del ACP específico para alelos es el más apropiado para la posición de interrogación, se efectuaron seis experimentos adicionales utilizando el mismo procedimiento que el utilizado en la Fig. 22. Se obtuvieron moldes de ADN a partir de muestras de sangre humana que tienen un SNP. Se amplificaron seis fragmentos genómicos cortos que contenían SNPs utilizando cada uno de los conjuntos de cebador diferentes como sigue:

730N	5'-ATTCTGATGGTGTGGATTGTG-3' (SEQ ID N°: 98) y
SM703C	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIACCCTGGAGTAGACGAAGA-3' (SEQ ID N°: 99) para el receptor beta-2 adrenérgico (ADRB2),
028N	5'-CCTTCTGTGCTTGATGCTTTT-3' (SEQ ID N°: 102) y
SM028C	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIICAGGAAGGATGAGCATTTAG-3' (SEQ ID N°: 103) para el receptor de quimioquina 5 (motivo c-c) (CCR5),
695N	5'-AGAAAAACAGAGGCAGCTT-3' (SEQ ID N°: 106) y
SM695N	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIAGCACAAACCAAGACACAGT-3' (SEQ ID N°: 107) para el receptor de interleucina 13,
679N	5'-CTAGCTGCAAGTGACATCTCT-3' (SEQ ID N°: 110) y

ES 2 314 093 T3

- SM679C 5'-TCACAGAGTATCCAAGCGIIIIICAGTAAGAAGCCAGGAGAG-3' (SEQ ID N°: 111) para la molécula de adhesión de leucocitos (LAM-1),
- 832N 5'-TTTTGGGTGGAGGCTAACAT-3' (SEQ ID N°: 114) y
- 5 SM832C 5'-TCACAGAAGTATGCCAGCGAIIIIAACGATGCAGACACCACCA-3' (SEQ ID N°: 115) para el receptor de taquiquinina 3 (TACR3) y
- 880N 5'-CTTCCACCAATACTCTTTTCC-3' (SEQ ID N°: 118) y
- 10 SM880C 5'-TCACAGAAGTATGCCAGCGAIIIIIGCATACACACAAGAGGCAGA-3' (SEQ ID N°: 119) para interleucina 1, beta (IL 1B).
- 15 Los productos amplificados que contenían el SNP entre sus extremos se utilizaron como moldes para detectar los SNPs, en donde se aplicaron ACPs específicos para alelos, como sigue:
- SM703-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGTACAGGGC-3' (SEQ ID N°: 100) y
- 20 SM703-B 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGTACCGGGC-3' (SEQ ID N°: 101) para el receptor beta-2 adrenérgico (ADRB2),
- SM028-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCAAACCAA-3' (SEQ ID N°: 104) y
- 25 SM028-B 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCAAACCAA-3' (SEQ ID N°: 105) para el receptor de quimioquina 5 (motivo c-c) (CCR5),
- SM695-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCATTTAGG-3' (SEQ ID N°: 108) y
- 30 SM695-B 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCATGTAGG-3' (SEQ ID N°: 109) para el receptor de interleucina 13,
- SM679-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCAGAAACTTT-3' (SEQ ID N°: 112) y
- 35 SM679-B 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCAGAACCTTT-3' (SEQ ID N°: 113) para la molécula de adhesión de leucocitos (LAM-1),
- SM832-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGACTGGTAAA-3' (SEQ ID N°: 116) y
- 40 SM832-B 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGACTGATAAA-3' (SEQ ID N°: 117) para el receptor de taquiquinina 3 (TACR3) y
- SM880-A 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIAAAGCCATAA-3' (SEQ ID N°: 120) y
- 45 SM880-B 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIAAAGCTATAA-3' (SEQ ID N°: 121) para interleucina 1, beta (IL 1B).

La Fig. 23 muestra los resultados de amplificaciones específicas para alelos para seis SNPs adicionales, cada uno de ellos presente en un gen diferente tal como el receptor beta-2 adrenérgico (ADRB2) (A), el receptor de quimioquina 5 (motivo c-c) (CCR5) (B), el receptor de interleucina 13 (C), la molécula de adhesión de leucocitos (LAM-1) (D), el receptor de taquiquinina 3 (TACR3) (E) e interleucina 1, beta (IL 1B) (F). Consistente con los resultados de la Fig. 22, la especificidad de reasociación se alcanza de manera crítica cuando el ACP específico para alelos tiene una posición de interrogación en la posición 5 desde el extremo 3'. El par de ACPs específicos para A de tipo salvaje generaba un producto diana específico, solamente a partir de las muestras con detección del genotipo homocigótico A de tipo salvaje (pista 1) o heterocigótico (pista 3), pero no a partir de las muestras con detección del genotipo homocigótico B de tipo variante (pista 5). El par de ACPs específicos para B de tipo variante generaba un producto diana específico, solamente a partir de las muestras con detección del genotipo homocigótico B de tipo variante (pista 6) o heterocigótico (pista 4), pero no a partir de las muestras con detección del genotipo homocigótico A de tipo salvaje (pista 2).

Habiendo descrito una realización preferida de la presente invención, ha de entenderse que variantes y modificaciones de la misma que caen dentro del espíritu de la invención pueden resultar evidentes para los expertos en esta técnica, y el alcance de esta invención se ha de determinar por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

TABLA 1

5	SEQ ID		
	Nº	Designación	Información de la secuencia
	1	ACP1	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIICAGGAGTGG-3'
10	2	ACP2	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGGCGACGATS-3'
	3	ACP3	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACS-3'
15	4	ACP4	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIAGATGCCCGW-3'
	5	ACP5	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIAGGCGATGCS-3'
	6	ACP6	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIITCTCCCGGTS-3'
20	7	ACP7	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIETTGTGGCGGS-3'
	8	ACP8	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIICTCCGATGCS-3'
25	9	ACP9	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIICCTGCGGGTW-3'
	10	JYC2	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGA-3'
30	11	JYC3	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGA-3'
	12	JYC4	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCAT-3'
35	13	ACP10	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACC-3'
	14	ACP11	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACG-3'
	15	ACP12	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIAGGCGATGCC-3'
40	16	ACP13	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIAGGCGATGCG-3'
	17	ACP14	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIICTCCGATGCC-3'
45	18	ACP15	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIICTCCGATGCG-3'
	19	CRP2I0	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATGCCATCGACC-3'
50	20	ACP16	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIGCCATCGACC-3'
	21	ACP17	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGCCATCGACC-3'
	22	ACP18	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIIIGCCATCGACC-3'
55	23	ACP19	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIIIIIGCCATCGACC-3'
	24	dT-JYC3	5'-CACAGAAGTATGCCAAGCGACTCGAGTTTTTTTTTT TTTTT-3'
60	25	dT-JYC2	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTTTTTT-3'
	26	JYC2-T13C	5'-CTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTTTTC-3'
65	27	JYC2-T13G	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTTTTG-3'

ES 2 314 093 T3

TABLA 1 (continuación)

5	28	JYC2-T13A	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTTTAA-3'
	29	dT ₁₀ -JYC2	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGATTTTTTTTTTT-3'
	30	dT ₁₀ -ACP1	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTTTT-3'
10	31	DEG 2	GCCATCGACCCGTTTCTCTAGCCCCATCTTCATGTGT TTTAATGAGATGATATTAATTCATTACATTCATGGAT AATATGTCCCTGAGTACATTCTAATCTAGATTAACT TCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
15			
20	32	DEG 5	AGGCGATGCGGGCTGTACTCTGGGTGGCTGCCACAGT CTCATGAGAAACCAAGGGCAAAGGACCAAGGAAAAG GGTCTCAGGCCCTAAAGCAGTGGCTTTCAACCATCCTAA TGTTGTGACCTTTTAATACAGTTCCTCATGTTGTG TGACCCCCCAACCATAAAAATGATTTTTGTTTCTACTTC AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
25			
30	33	SMART IV	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTACG GCCr(GGG)-3'
35	34	5' PCR Primer	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'
	35	CDS III/3'	5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG-(dT) ₃₀ VN-3'
40			
	36	rG3-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGr(GGG)-3'
	37	rG2-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGr(GG)d(G)-3'
45	38	dG3-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGGd(GGG)-3'
	39	Oligo dT ₁₈ -ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTTTT TTTTTTTTT-3'
50			
	40	PLP-Ca	5'-GAGAGGATAGTTTCAGGGAC-3'
	41	JunB3	5'-CTCCGTGGTACGCCTGCTTTCTC-3'
55	42	β -actin 1	5'-TCGTCACCCACATAGGAGTC-3'
	43	β -actin 2	5'-CTAAGAGGAGGATGGTCGC-3'
60	44	EsxN7	5'-GCCGGTTGCAGAGCACC-3'
	45	EsxC6	5'-GAACCATGTTTCTGAATGCC-3'
65	46	EsxN7-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGCCGGT TGCAGAGCACC-3'

ES 2 314 093 T3

TABLA 1 (continuación)

5	47	EsxC6-ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGAACCAT GTTTCTGAATGCC-3'
	48	EsxN1	5'-GAATCTGAAACAACTTTCTA-3'
10	49	EsxC2	5'-GATGCATGGGACGAGGCACC-3'
	50	EsxN1-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGAATCT GAAACAACTTTCTA-3'
15	51	EsxN3	5'-CGCCGCACCCCTGCCCGCA-3'
	52	EsxC5	5'-GATGCATGGGACGAGGCA-3'
20	53	EsxN3-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICGCCGC ACCCCTGCCCGCA-3'
25	54	Oligo-dT ₁₅	5'-TTTTTTTTTTTTTTT-3'
	55	EsxC2-ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGATGCA TGGGACGAGGCACC-3'
30	56	EsxC5-ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGATGCA TGGGACGAGGCA-3'
35	57	OligoVdT ₁₅ -ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIITTTTTT TTTTTTTTTV-3'
40	58	dN ₆ -ACP	5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIINNNNNN-3'
	59	rG1-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIIGGr(G)d(GG)-3'
45	60	JYC5	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGAT-3'
	61	JYC5-T ₁₅ -ACP	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIITTTTTT TTTTTTTTT-3'
50	62	JYC5-T ₁₅ V-ACP	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIITTTTTT TTTTTTTTTV-3'
55	63	JYC5-T ₁₅ VN-ACP	5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIIIITTTTTT TTTTTTTTTVN-3'
60	64	ACP101	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICCGGAGGATC-3'
	65	ACP109	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICTGCAGGACG-3'
	66	ACP116	5'-GTCTACCAGGCATTGCTTCATIIIIICGGAGCATCC-3'
65	67	ELAM1N1	5'-TTGCACACTGTTGATTCTAA-3'
	68	ELAM1C1	5'-TTATTGATGGTCTCTACACA-3'

ES 2 314 093 T3

TABLA 1 (continuación)

69	ELAM1N2	5'-CCACTGAGTCCAACATTC-3'
5	70	ELAM1C2 5'-CTGAAACACTTCCCACAC-3'
	71	P53N1 5'-CCTCTGACTGCTCTTTTCAC-3'
10	72	P53C1 5'-ATTGAAGTCTCATGGAAGCC-3'
	73	P53N2 5'-TGCTTGCCACAGGTCTC-3'
	74	P53C2 5'-GCAGTGCTAGGAAAGAGG-3'
15	75	ELAM1N1-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITGCACACTGT TGATTCTAA-3'
20	76	ELAM1C1-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIITATTGATGGT CTCTACACA-3'
25	77	ELAM1N2-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCACTGAGTCC AACATTC-3'
	78	ELAM1C2-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIICTGAAACACTT CCCACAC-3'
30		
	79	P53N1-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIICCTCTGACTGC TCTTTTCAC-3'
35		
	80	P53C1-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIATTGAAGTCTC ATGGAAGCC-3'
40		
	81	P53N2-ACP 5'-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIITGCTTGCCACA GGTCTC-3'
45		
	82	P53C2-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIIGCAGTGCTAGG AAAGAGG-3'
50		
	83	JYC2-HD1 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTGTG GTT-3'
55		
	84	JYC2-HD2 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTCTG GTT-3'
	85	JYC2-HD3 5'-GCTTGACTACGATACTGTGCGAIIIIIGTNCRRGTTTG GTT-3'
60		
	86	P53N 5'-CCTCTGACTGCTCTTTTCAC-3'
65	87	P53C-ACP 5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIATTGAAGTCTC ATGGAAGCC-3'

ES 2 314 093 T3

TABLA 1 (continuación)

5	88	P53N1A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIICCCC <u>G</u> CGTGG-3'
	89	P53N1B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIICCCC <u>C</u> CGTGG-3'
	90	P53N2A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIITCCCC <u>G</u> CGTGG-3'
10	91	P53N2B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIITCCCC <u>C</u> CGTGG-3'
	92	P53N3A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIICTCCCC <u>G</u> CGT-3'
15	93	P53N3B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIICTCCCC <u>C</u> CGT-3'
	94	P53N4A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC <u>G</u> CG-3'
	95	P53N4B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC <u>C</u> CG-3'
20	96	P53N5A-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC <u>G</u> -3'
	97	P53N5B-ACP	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGCTCCCC <u>C</u> -3'
25	98	703N	5'-ATTCTGATGGTGTGGATTGTG-3'
	99	SM703C	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIAACCTGGAGTAG ACGAAGA-3'
30	100	SM703-A	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGGTAC <u>A</u> GGGC-3'
	101	SM703-B	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIIGGTAC <u>C</u> GGGC-3'
35	102	028N	5'-OCTTCTGTGCTTGATGCTTTT-3'
	103	SM028C	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIICAGGAAGGATGA GCATTTAG-3'
40	104	SM028-A	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIITCCAA <u>A</u> CCAA-3'
	105	SM028-B	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIITCCAA <u>C</u> CCAA-3'
45	106	695N	5'-AGAAAAACCAGAGGCAGCTT-3'
	107	SM695C	5'-TCACAGAAGTATGCCAAGCGAIIIIAGCACAAACCAA AGACACAGT-3'
50	108	SM695-A	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIICCATTTT <u>T</u> AGG-3'
	109	SM695-B	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIICCATTT <u>G</u> TAGG-3'
55	110	679N	5'-CTAGCTGCAAGTGACATCTCT-3'
	111	SM679C	5'-TCACAGAGTATCCAAGCGIIIIITCAGTAAGAAG CCAGGAGAG-3'
60	112	SM679-A	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIICCAGAA <u>A</u> CTTT-3'
	113	SM679-B	5'-GTCTACCAGGCATTTCGCTTCATIIIIICCAGAA <u>C</u> CTTT-3'
65	114	832N	5'-TTTTGGGTGGAGGCTAACAT-3'

ES 2 314 093 T3

TABLA 1 (continuación)

115	SM832C	5' - TCACAGAAGTATGCCAGCGAIIIIIAACGATGCAG ACACCAACA -3'
116	SM832-A	5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGACTGGTAAA -3'
117	SM832-B	5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIGACTGATAAA -3'
118	880N	5' - CTTCCACCAATACTCTTTTCC -3'
119	SM880C	5' - TCACAGAAGTATGCCAGCGAIIIIIGCATAACACACA AGAGGCAGA -3'
120	SM880-A	5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIAAGCCATAA -3'
121	SM880-B	5' - GTCTACCAGGCATTCGCTTCATIIIIIAAGCTATAA -3'

S = G o C

W = A o T

V = A, G o C

N = A, G, C o T

I es desoxiinosina

r es ribosa

d es desoxirribosa

TABLA 2

Fragmentos de ADNc expresados diferencialmente clonados mediante el ACP de la presente invención

Nomenclatura	Identidad	Homología
DEG 1	Tropomiosina 2 (beta)	Ratón 92%
DEG 2	Nuevo	Nuevo
DEG 3	Proteína hipotética (gen Tes)	Ratón 99%
DEG 4	Proteasa - 6	Ratón 92%
DEG 5	Nuevo	Nuevo
DEG 6	Citocromo c oxidasa, subunidad Vb	Ratón 99%
DEG7	Hidroxilacil-coenzima A deshidrogenasa (Hadh)	Ratón 98%
DEG 8	Troponina T2, cardiaca (Tnnt2)	Ratón 94%
DEG 9	Proteína del motivo de unión a ARN, cromosoma X	Ratón 96%
DEG 10	Peroxirredoxina 6 (Prdx 6)	Ratón 89%
DEG 11	ADN de embrión de 11 días ó 13 días	Ratón 98%

Referencias

Anónimo (1992) Diagnosis of Duchenne and Baker muscular dystrophies by polymerase chain reaction. A multi-center study. *JAMA* 267, 2609-2615.

Bauer, D., Muller, H., Reich, J., Ahrenkiel, V., Warthoe, P., Strauss, M. (1993) Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Res.* 21, 4272-4280.

Bauer, D., Warthoe, P., Rohde, M., Struss, M. (1994) PCR Methods & App: Manual Supplement, pp. S97-S108. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, NY.

Carninci, P., Westover, A., Nishiyama, Y., Ohsumi, T., Itoh, M., Nagaoka, S., Sasaki, N., Okazaki, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y. (1997) High efficiency selection of full-length cDNA by improved biotinylated cap trapper. *DNA Res.* 4, 61-66.

Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., Caskey, C.T. (1988) Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification, *Nucleic Acids Res.* 16, 11141-11156.

Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Li, R., Hill, J., Siebert, P. (1998) Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by Smart™ PCR In Siebert, P. and Larrick, J. (eds), *Gene Cloning and analysis by RT-PCR. Biotechniques Books, Natick, MA*, pp. 305-319.

Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Siebert, P. Methods and compositions for generating full-length cDNA having arbitrary nucleotide sequence at the 3'-end. U.S. Pat No. 5,962,271. Date of Patent: Oct. 5, 1999.

Chenchik, A., Zhu, Y., Diatchenko, L., Siebert, P. Methods and compositions for full-length cDNA cloning using a template-switching oligonucleotide. U.S. Pat. No. 5,962,272. Date of Patent Oct 5, 1999.

Chun, J.Y., Han, Y.J., Ahn, K.Y. (1999) Pso homeobox gene is X-linked and specifically expressed in trophoblast cells of mouse placenta. *Dev. Dyn.* 216, 257-266

Clark, J.M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by prokaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16, 9677-9686.

Combates, N., Pardinas, JR., Parimoo, S., Prouty, S.M., Stenn, K.S. Technique for differential display. U.S. Pat. No. 6,045,998. Date of Patent: Apr. 4, 2000.

D'Aquila, R.T., Bechtel, L.J., Videler, J.A., Eron, J.J., Gorczyca, P., Kaplan, J.C. (1991) Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Res.*, 19, 3749.

Diachenko, L.B., Ledesma, J., Chenchik, A.A., Siebert, P.D. (1996) Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219, 824-828.

Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M.J., Dveksler, G.S. (1995) General concepts for PCR primer design. PCR primer. a Laboratory Manual., pp. 133-142, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.

Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S. (1991) "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.*, 19, 4008.

Franz, O., Bruchhaus, I., Roeder, T. (1999) Verification of differential gene transcription using virtual northern blotting. *Nucleic Acids Res.*, 27, 1-3.

Frohman, M.A., Dush, M.X., Martin, G.R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 8998-9002.

Fromont-Racine, M., Bertrand, E., Pictet, R., Grange, T. (1993) A highly sensitive method for mapping the 5' termini of mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 21, 1683-1684.

Gottschlich, S., Goeoegh, t., Folz, B.J., Lippert, B.M., Werner, J.A. (1997) Optimized differential display and reamplification parameters for silver staining. *Res. Commun. Mol. Path. Pharm.* 97, 237-240.

Gromova, I., Gromov, P., Celis, J.E. (1999) Identification of true differentially expressed mRNAs in a pair of human bladder transitional cell carcinomas using an improved differential display procedure. *Electrophoresis* 20, 241-248.

Guegler, K., Tan, R., Rose, M.J. Methods and compositions for producing 5' enriched cDNA libraries. U.S. Pat. No. 6,083,727. Date of Patent Jul. 4, 2000.

- Guegler, K., Tan, R., Rose, M.J. Methods and compositions for producing full length cDNA libraries. U.S. Pat No. 6,326,175. Date of Patent Dec. 4, 2001.
- Hogan, B., Bedding, R., Costantini, F., Lacy, E. (1994) Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Hwang, I.T., Lee, Y.H., Moon, B.C., Ahn, K.Y., Lee, S.W., Chun, J.Y. (2000) Identification and characterization of a new member of the placental prolactin-like protein-C (PLP-C) subfamily, PLP-C β . *Endocrinology* 141, 3343-3352.
- Hayashizaki, Y. Method for forming full length cDNA libraries. U.S. Pat. No. 6,143,528. Date of Patent: Nov. 7, 2000.
- Henegariu, O., Hirschmann, P., Killian, K., Kirch, S., Lengauer, C., Maiwald, R., Mielke, K., Vogt, P. (1994) Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnostic for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Andrologia*, 26, 97-106.
- Ito, T., Kito, K., Adati, N., Mitsui, Y., Hagiwara, H., Sakaki, Y. (1994) Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS Lett.* 351, 231-236.
- Jefferies, D., Botman, M. F., Lester, D., Whitehead, C. C., Thorp, B. H. (1998) Cloning differentially regulated genes from chondrocytes using agarose gel differential display. *Biochim. Biophys. Acta* 1396, 237-241.
- Kociok, N., Unfried, K., Eser, P., Krott, R., Schraermeyer, U., Heimann, K. (1998) The nonradioisotopic representation of differentially expressed mRNA by a combination of RNA fingerprinting and differential display. *Mol. Biotechnol.* 9, 25-33.
- Korn, B., Sedlacek, Z., Manca, A., Kioschis, P., Konecki, D., Lehrach, H., Poutska, A. (1992) A strategy for the selection of transcribed sequences in the Xq28 region. *Hum. Mol. Genet.* 1, 235-242.
- Kulpa, D., Topping, R., Telesnitsky, A. (1997) Determination of the site of first strand transfer during Moloney murine leukemia virus reverse transcription and identification of strand transfer-associated reverse transcriptase errors. *EMBO J.* 16, 856-865.
- Landegren, U., Nilsson, M., Kwok, P.-Y. (1998) Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res.* 8, 769-776.
- Liang, P., Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Ledbetter, S.A., Nelson, D.L., Warren, S.T., Ledbetter, D.H. (1990) Rapid isolation of DNA probes within specific chromosome regions by interspersed repetitive sequence polymerase chain reaction. *Genomics* 6, 475-481.
- Loakes, D., Brown, D.M. (1994) 5-Nitroindole as an universal base analog. *Nucleic Acids Res.* 22, 4039-4043.
- Loakes, D. The applications of universal DNA base analogues. *Nucleic Acids Res.* 29, 2437-2447.
- Luehrsen, K.R., Marr, L.L., Van Der Knaap, E., Cumberledge, S. (1997) Analysis of differential display RT-PCR products using fluorescent primers and Genescan software. *BioTechniques* 22, 168-174.
- Matz, M.V., Lukyanov, S.A. (1998) Different strategies of differential display: areas of application. *Nucleic Acids Res.* 26, 5537-5543.
- Matz, M., Shagin, D., Bogdanova, E., Britanova, O., Lukyanov, S., Diatchenko, L., Chenchik, A. (1999) Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res.* 27, 1558-1560.
- McClelland, M., Chada, K., Welsh, J., Ralph, D. (1993). Arbitrary primed PCR fingerprinting of RNA applied to mapping differentially expressed genes. In *Symposium on DNA fingerprinting State of the science*, November, 1992 (ed. S.D. Pena et al.). Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- McPherson, M.J., Moller, S.G. (2000) *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, NY.
- Meunier, J.R., Grumont, P.A.D. (1993) Factors affecting reproducibility of amplified polymorphic DNA fingerprints. *Res. Microbiol.* 144, 373-379.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 335-350.

Mullis, K.B., Erlich, H.A., Arnheim, N., Horn, G.T., Saiki, R.K., Scharf, S.J. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. U.S. Pat. No. 4,683,195. Date of Patent Jul. 28, 1987.

Mullis, K.B. Process for amplifying nucleic acid sequences. U.S. Pat. No. 4,683,202. Date of Patent Jul. 28, 1987.

Mullis, K.B., Erlich, H.A., Arnheim, N., Horn, G.T., Saiki, R.K., Scharf, S.J. Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences. US. Pat No. 4,800,159. Date of Patent Jan. 24, 1989.

Mutirangura, A., Greenberg, F., Butler, M.G., Malcolm, S., Nicholls, R.D., Chakravarti, A., Ledbetter, D.H. (1993) Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region (15q11-q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 143-151.

Nichols, R., Andrews, P.C., Ahang, P., Bergstrom, D.E. (1994) A universal nucleoside for use at ambiguous sites in DNA primers. *Nature* 369, 492-493.

Ohtsuka, E., Matsuka, S., Ikehara M., Takahashi, Y., Matsubara K. (1985) An alternative approach to deoxyoligonucleotides as hybridization probes by insertion of deoxyinosine at ambiguous codon positions. *J. Biol. Chem.* 260, 2605-2608.

Ralph, D., Welsh, J., McClelland, M. (1993) RNA fingerprinting using arbitrary primed PCR identifies differentially regulated RNAs in Mink lung (Mv1Lu) cells growth arrested by TGF- β . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 10710-10714.

Rompf, R., Kahl, G. (1997) mRNA differential display in agarose gels. *BioTechniques* 23, 28-32.

Roses, A.D. (2000) Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature*, 405, 857-865.

Rosok, O., Odeberg, J., Rode, M., Stokke, T., Funderud, S., Smeland, E. (1996) solid-phase method for differentially display of genes expressed in hematopoietic stem cells. *BioTechniques* 21, 114-121.

Ruano, G., Fenton, W., Kidd, K.K. (1989) Biphasic amplification of very dilute DNA samples via "booster PCR". *Nucleic Acids Res.* 17, 5407.

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.

Sakanari, J.A., Staunton, C.E., Eakin, A.E., Craik, C.S. (1989) Serine proteases from nematode and protozoan parasites: Isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 4863-4867.

Schaefer, B.C. (1995) Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: New strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal. Biochem.* 227, 255-273.

Schmidt W.M., Mueller, M.W. (1999) CapSelect A highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 27, e31.

Schramm, G., Bruchhaus, I., Roeder, T. (2000) A simple and reliable 5'-RACE approach. *Nucleic Acids Res.* 28, e96.

Shuber, A.P., Skoletsky, J., Stern, R., Handelin, B.L. (1993) Efficient 12 mutation testing in the CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. *Hum. Mol. Genet.*, 2, 153-158.

Smith, N.R., Aldersley, M., Li, A., High, A.S., Moynihan, T.P., Markham, A.F., Robinson, P.A. (1997) Automated differential display using a fluorescently labeled universal primer. *BioTechniques* 23, 274-279.

Sompayrac, L., Jane, S., Burn, T.C., Tene, D.G., Danna, K.J. (1995) Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res.* 23, 4738-4739.

Stone, B., Wharton, W. (1994) Targeted RNA fingerprinting: the cloning of differentially-expressed cDNA fragments enriched for members of the zinc finger gene family. *Nucleic Acids Res.* 22, 2612-2618.

Suzuki, Y., Yoshitomo-Nakagawa, K., Maruyama, K., Suyama, A., Sugano, S. (1997) Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library. *Gene* 200, 149-156.

Tagle, D.A., Swaroop, M., Lovett, M., Collins, F.S. (1993) Magnetic bead capture of expressed sequences encoded within large genomic segments. *Nature* 361, 751-753.

ES 2 314 093 T3

Villeponteau, B., Feng, J., Funk W., Linskens, M.H.K. Method and kit for enhanced differential display. U.S. Pat No. 5,580,726. Date of Patent: Dec. 3, 1996.

Welsh, J., McClelland, M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-7218.

Welsh, J., McClelland, M. (1991) Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucleic Acids Res.* 19, 5275-5279.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalki, J.A., Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18,6531-6535.

Zimmermann, K., Schogl, D., Plaimauer, B., Mannhalter, J.W. (1996) Quantitative multiplex competitive PCR of HIV-1 DNA in a single reaction tube. *BioTechniques* 21, 480-484.

Zou, S., Stanfield, C., Bridge, J. (1998) Identification of new influenza B virus variants by multiplex reverse transcription-PCR and the heteroduplex mobility assay. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1544-1548.

REIVINDICACIONES

1. Un cebador para el control de la reasociación para mejorar la especificidad de la reasociación en la amplificación de ácidos nucleicos, que comprende: (a) una porción en el extremo 3' que tiene una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a un sitio en un ácido nucleico molde para hibridarse con el mismo; (b) una porción en el extremo 5' que tiene una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada, esencialmente no complementaria a sitio alguno en dicho ácido nucleico molde; y (c) comprendiendo una porción de regulador situada entre dicha porción en el extremo 3' y dicha porción en el extremo 5' al menos tres bases universales contiguas o análogos de bases no discriminatorias, en donde dicha porción de regulador tiene una T_m menor que dicha porción en el extremo 3' y dicha porción en el extremo 5', y en donde dicha porción de regulador es capaz de regular una porción de reasociación de dicho cebador en asociación con la temperatura de reasociación.

2. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho cebador para el control de la reasociación tiene una fórmula general de $5'-X_p-Y_q-Z_r-3'$, en donde X_p representa dicha porción en el extremo 5' que tiene dicha secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada, esencialmente no complementaria a sitio alguno en el ácido nucleico molde; Y_q representa dicha porción de regulador que comprende al menos tres bases universales contiguas o análogos de bases no discriminatorias; Z_r representa dicha porción en el extremo 3' que tiene una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde para hibridarse con el mismo; en donde p, q y r representan el número de nucleótidos; y en donde X, Y y Z es desoxirribonucleótido o ribonucleótido.

3. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha base universal o análogo de base no discriminatoria es capaz de formar pares de bases con cada una de las bases de ADN/ARN naturales.

4. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha base universal o análogo de base no discriminatoria se selecciona del grupo que consiste en desoxiinosina, inosina, 7-deaza-2'-desoxiinosina, 2-aza-2'-desoxiinosina, 2'-OMe inosina, 2'-F inosina, desoxi 3-nitropirrol, 3-nitropirrol, 2'-OMe 3-nitropirrol, 2'-F 3-nitropirrol, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol, desoxi 5-nitroindol, 5-nitroindol, 2'-OMe nitroindol, 2'-F nitroindol, desoxi 4-nitrobencimidazol, 4-nitrobencimidazol, desoxi 4-aminobencimidazol, 4-aminobencimidazol, desoxi nebularina, 2'-F nebularina, 2'-F 4-nitrobencimidazol, PNA-5-nitroindol, PNA-nebularina, PNA-inosina, PNA-4-nitrobencimidazol, PNA-3-nitropirrol, morfolino-5-nitroindol, morfolino-nebularina, morfolino-inosina, morfolino-4-nitrobencimidazol, morfolino-3-nitropirrol, fosforoamidato-5-nitroindol, fosforoamidato-nebularina, fosforoamidato-inosina, fosforoamidato-4-nitrobencimidazol, fosforoamidato-3-nitropirrol, 2'-O-metoxietil inosina, 2'-O-metoxietil nebularina, 2'-O-metoxietil 5-nitroindol, 2'-O-metoxietil 4-nitrobencimidazol, 2'-O-metoxietil 3-nitropirrol y sus combinaciones.

5. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicha base universal o análogo de base no discriminatoria es desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol ó 5-nitroindol.

6. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho desoxirribonucleótido es dNMP que aparece de forma natural, nucleótido modificado y nucleótido no natural.

7. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde p representa un número entero de 15 a 60.

8. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde q representa un número entero de 3 a 15.

9. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde r representa un número entero de 6 a 50.

10. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde p es un número entero de 15 a 60, q es un número entero de 3 a 15 y r es un número entero de 6 a 30.

11. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde X_p comprende una secuencia de cebador universal.

12. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde X_p incluye una secuencia o secuencias reconocidas por una endonucleasa de restricción o endonucleasas de restricción.

13. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde X_p comprende al menos un nucleótido con un marcador para la detección o el aislamiento.

14. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde Z_r es una secuencia de nucleótidos que se hibrida a la cola de polidenosina (poliA) de un ARNm.

15. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 14, en donde Z_r comprende al menos 10 nucleótidos de desoxitimidina contiguos.

5 16. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 14, en donde Z_r comprende al menos 10 nucleótidos de desoxitimidina contiguos que tiene 3'-V en su extremo 3'; en que V es uno seleccionado del grupo que consiste en desoxiadenosina, desoxicitidina y desoxiguanosina.

10 17. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 14, en donde Z_r comprende al menos 10 nucleótidos de desoxitimidina contiguos que tiene 3'-NV en su extremo 3'; en que V es uno seleccionado del grupo que consiste en desoxiadenosina, desoxicitidina y desoxiguanosina, y N es uno seleccionado del grupo que consiste en desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxicitidina y desoxiguanosina.

15 18. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde Z_r es una secuencia de nucleótidos esencialmente complementaria a una secuencia diana en el ácido nucleico molde.

19. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde Z_r es una secuencia de nucleótidos aleatoria.

20 20. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde Z_r es una secuencia de nucleótidos esencialmente complementaria a una secuencia consenso encontrada en una familia de genes.

21. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde Z_r es una secuencia de nucleótidos degenerada, seleccionada de una pluralidad de combinaciones de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos predeterminada.

25 22. El cebador para el control de la reasociación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde Z_r comprende al menos un ribonucleótido.

30 23. Un kit que comprende el cebador o el conjunto de cebadores de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-22.

35 24. El kit de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el kit comprende, además, un cebador o un par de cebadores que tienen una secuencia de nucleótidos correspondiente a dicha porción en el extremo 5' de dicho cebador para el control de la reasociación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-22.

40 25. Un método para amplificar selectivamente una secuencia de ácidos nucleicos diana a partir de un ADN o una mezcla de ácidos nucleicos, en el que dicho método comprende llevar a cabo una reacción de amplificación utilizando cebadores, **caracterizado** porque al menos un cebador se deriva del ACP de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

26. El método de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicho método se realiza utilizando amplificaciones en dos fases, que comprende:

45 (a) llevar a cabo una amplificación en una primera fase de dicha secuencia de ácidos nucleicos diana a una primera temperatura de reasociación, que comprende al menos dos ciclos de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando el par de cebadores de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, teniendo cada uno en su porción en el extremo 3' una secuencia hibridante esencialmente complementaria a una región de dicha secuencia de ácidos nucleicos diana para hibridarse con la misma, bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a su secuencia de ácidos nucleicos diana, con lo que se genera el producto de amplificación de dicha secuencia de ácidos nucleicos diana; y

50 (b) llevar a cabo una amplificación en una segunda fase de dicho producto de amplificación generado en la etapa (a) a una segunda temperatura de reasociación, que es en condiciones de alta rigurosidad, que comprende al menos un ciclo de reasociación del cebador, extensión del cebador y desnaturalización, utilizando los mismos cebadores que los utilizados en la etapa (a) o utilizando un par de cebadores cada uno de los cuales comprende una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada que corresponde a cada porción en el extremo 5' de dichos cebadores utilizados en la etapa (a), bajo condiciones en las que cada cebador se reasocia a los extremos 3' y 5' de dicho producto de amplificación, respectivamente, con lo que se re-amplifica dicho producto de amplificación.

60 27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en el que dicho par de cebadores utilizados en dicha amplificación en primera fase es una combinación de un cebador para el control de la reasociación seleccionado de los cebadores de las reivindicaciones 1-13 y un cebador convencional.

65 28. Uso de bases universales o análogos de bases no discriminatorias para la fabricación de un cebador para el control de la reasociación con especificidad de la reasociación mejorada en la amplificación de ácidos nucleicos, en donde el cebador para el control de la reasociación comprende: (a) una porción en el extremo 3' que tiene una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a un sitio en un ácido nucleico molde para hibridarse con el mismo; (b) una porción en el extremo 5' que tiene una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada; y (c)

comprendiendo una porción de regulador situada entre dicha porción en el extremo 3' y dicha porción en el extremo 5' al menos tres bases universales contiguas o análogos de bases no discriminatorias, en donde dicha porción de regulador tiene una T_m menor que dicha porción en el extremo 3' y dicha porción en el extremo 5', y en donde dicha porción de regulador es capaz de regular una porción de reasociación de dicho cebador en asociación con la temperatura de reasociación.

29. El uso de acuerdo con la reivindicación 28, en donde dicho cebador para el control de la reasociación tiene una fórmula general de 5'-X_p-Y_q-Z_r-3', en donde X_p representa dicha porción en el extremo 5' que tiene dicha secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada, esencialmente no complementaria a sitio alguno en el ácido nucleico molde; Y_q representa dicha porción de regulador que comprende al menos tres bases universales contiguas o análogos de bases no discriminatorias; Z_r representa dicha porción en el extremo 3' que tiene una secuencia de nucleótidos hibridante, esencialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde para hibridarse con el mismo; en donde p, q y r representan el número de nucleótidos; y en donde X, Y y Z es desoxirribonucleótido o ribonucleótido.

30. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicha base universal o análogo de base no discriminatoria es capaz de formar pares de bases con cada una de las bases de ADN/ARN naturales.

31. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicha base universal o análogo de base no discriminatoria se selecciona del grupo que consiste en desoxiinosina, inosina, 7-deaza-2'-desoxiinosina, 2-aza-2'-desoxiinosina, 2'-OMe inosina, 2'-F inosina, desoxi 3-nitropirrol, 3-nitropirrol, 2'-OMe 3-nitropirrol, 2'-F 3-nitropirrol, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol, desoxi 5-nitroindol, 5-nitroindol, 2'-OMe nitroindol, 2'-F nitroindol, desoxi 4-nitrobencimidazol, 4-nitrobencimidazol, desoxi 4-aminobencimidazol, 4-aminobencimidazol, desoxi nebularina, 2'-F nebularina, 2'-F 4-nitrobencimidazol, PNA-5-nitroindol, PNA-nebularina, PNA-inosina, PNA-4-nitrobencimidazol, PNA-3-nitropirrol, morfolino-5-nitroindol, morfolino-nebularina, morfolino-inosina, morfolino-4-nitrobencimidazol, morfolino-3-nitropirrol, fosforoamidato-5-nitroindol, fosforoamidato-nebularina, fosforoamidato-inosina, fosforoamidato-4-nitrobencimidazol, fosforoamidato-3-nitropirrol, 2'-O-metoxietil inosina, 2'-O-metoxietil nebularina, 2'-O-metoxietil 5-nitroindol, 2'-O-metoxietil 4-nitrobencimidazol, 2'-O-metoxietil 3-nitropirrol y sus combinaciones.

32. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicha base universal o análogo de base no discriminatoria es desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol ó 5-nitroindol.

33. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde dicho desoxirribonucleótido es dNMP que aparece de forma natural, nucleótido modificado y nucleótido no natural.

34. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde p representa un número entero de 15 a 60.

35. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde q representa un número entero de 3 a 15.

36. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde r representa un número entero de 6 a 50.

37. El uso de acuerdo con la reivindicación 29, en donde p es un número entero de 15 a 60, q es un número entero de 3 a 15 y r es un número entero de 6 a 30.

FIG. 1A

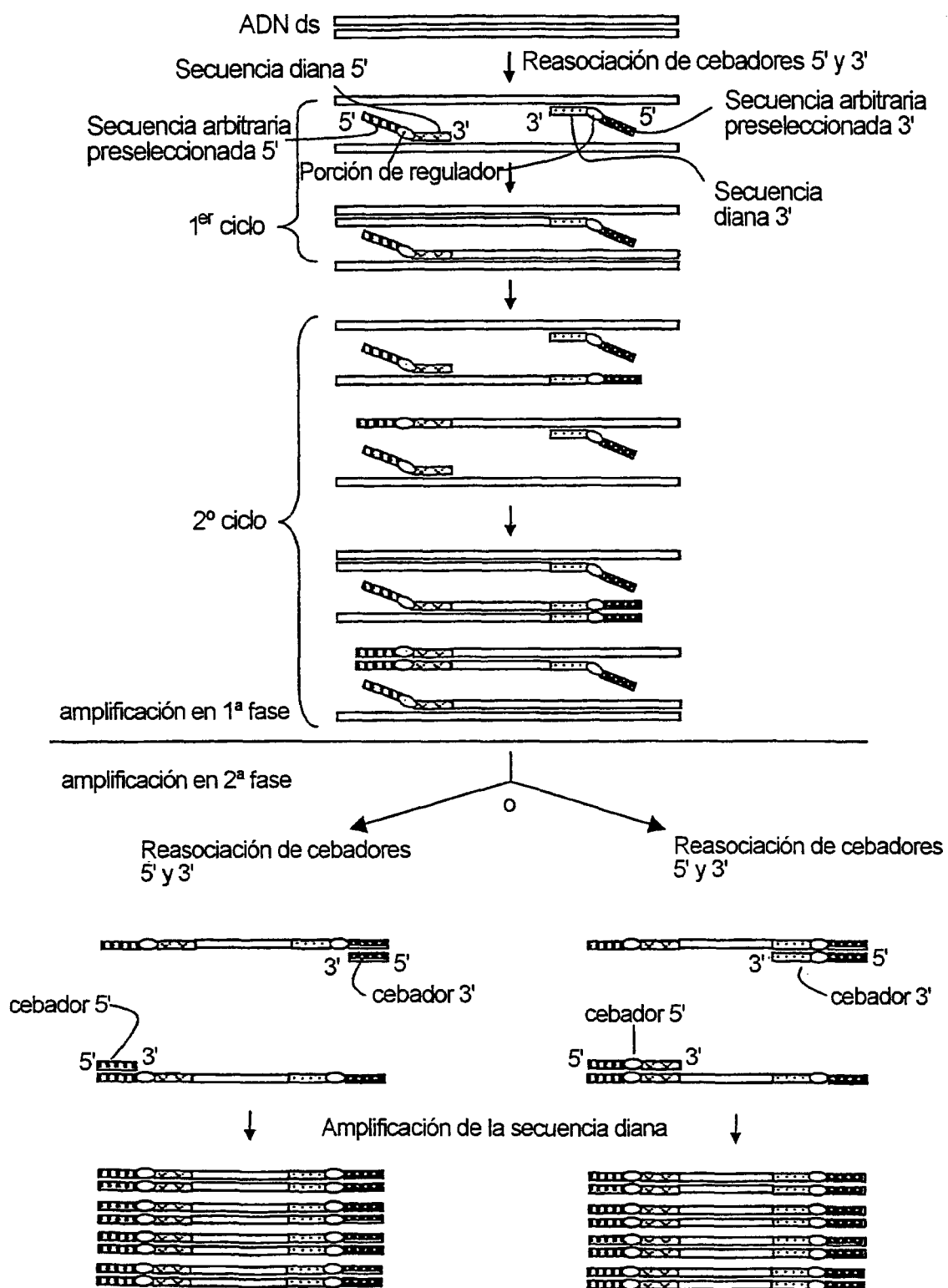


FIG. 1B

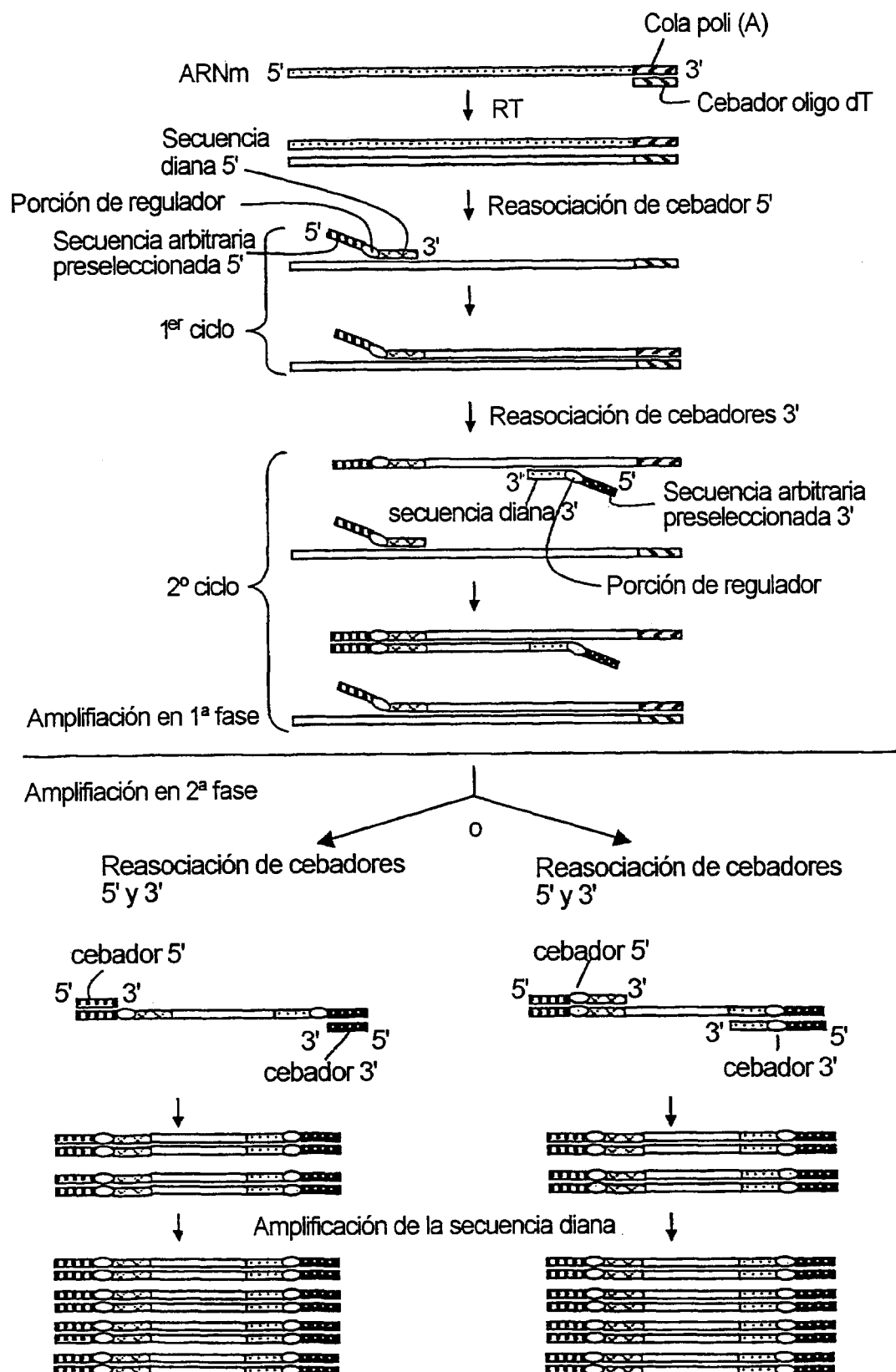


FIG. 2A

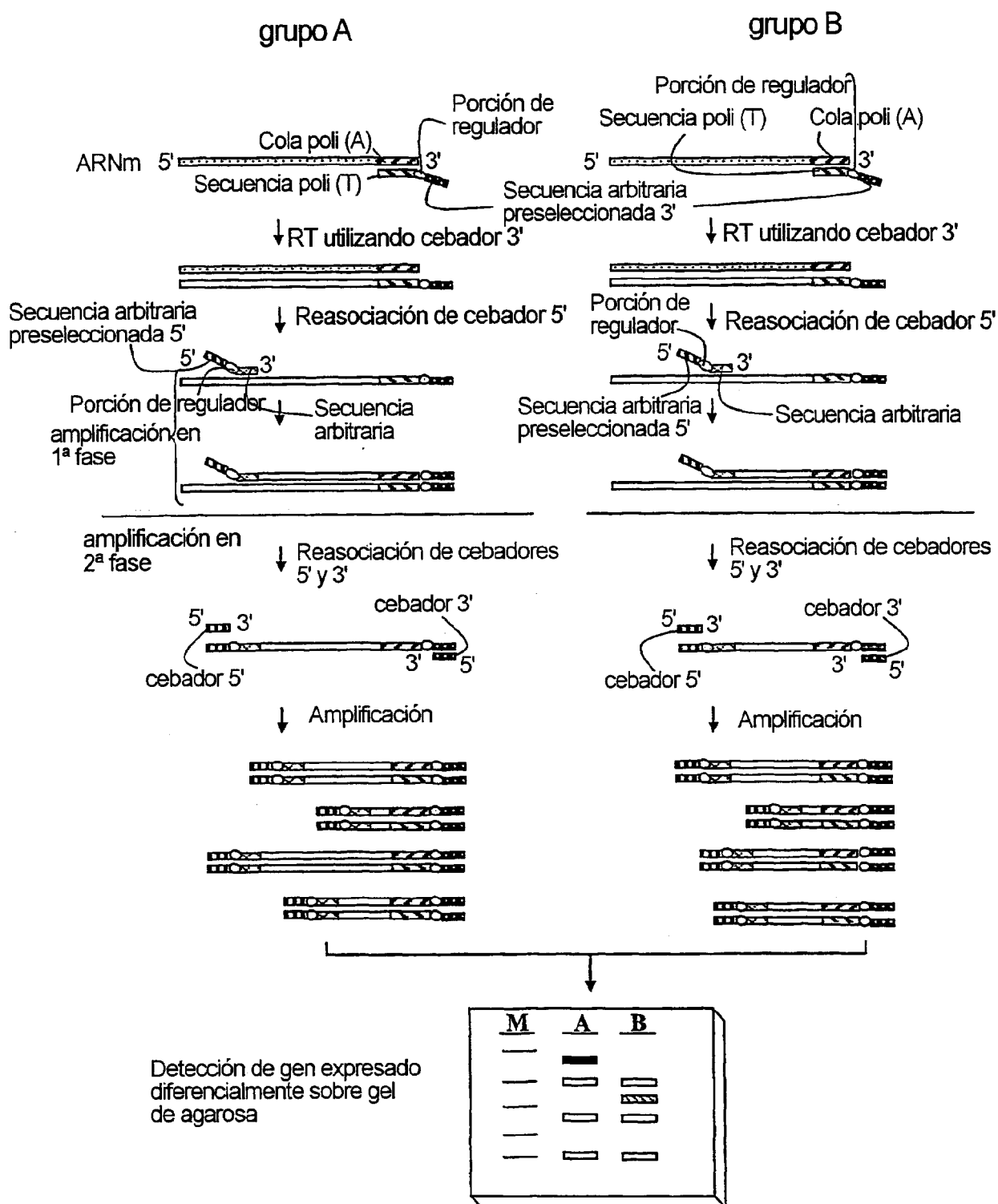


FIG. 2B

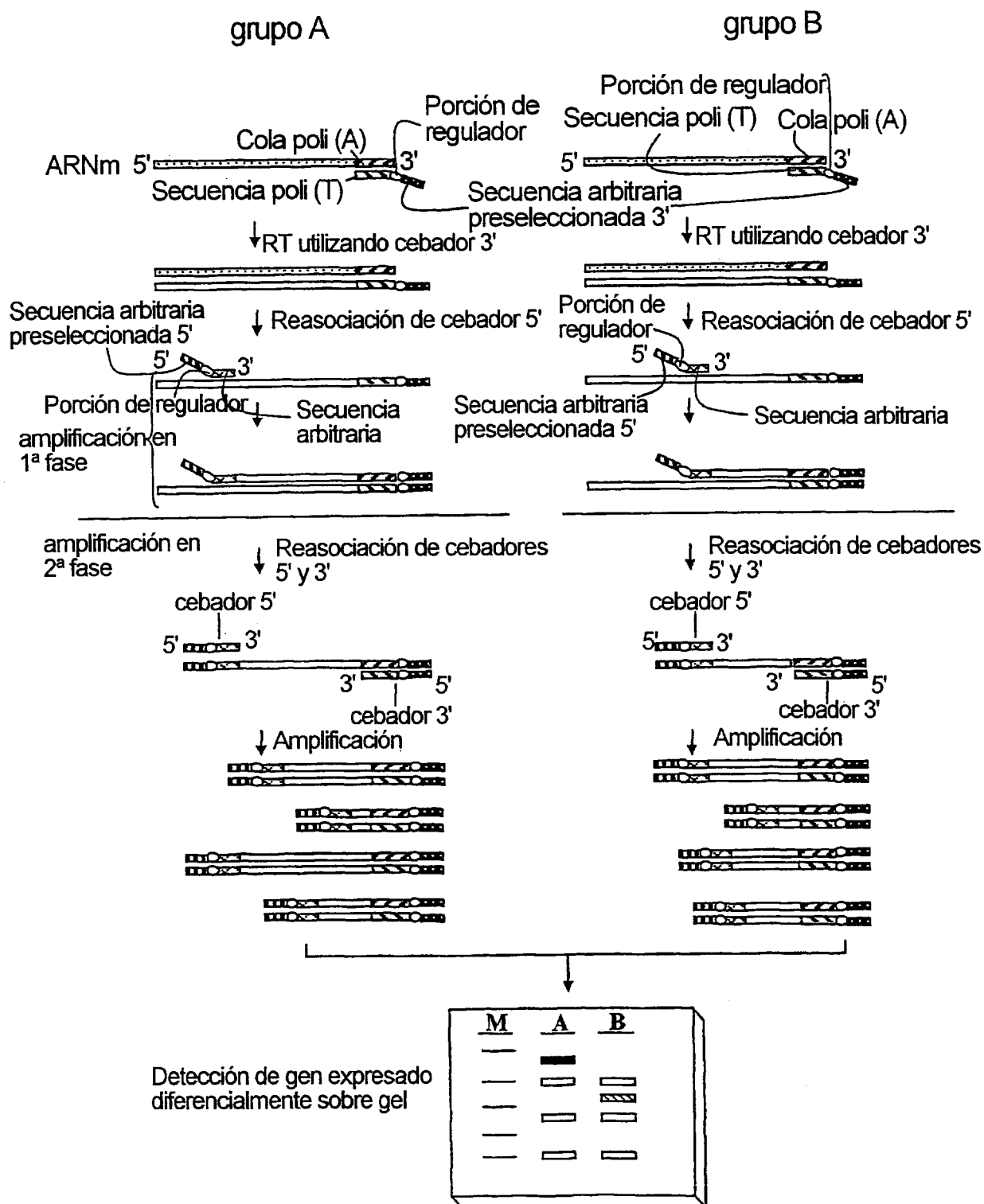


FIG. 3

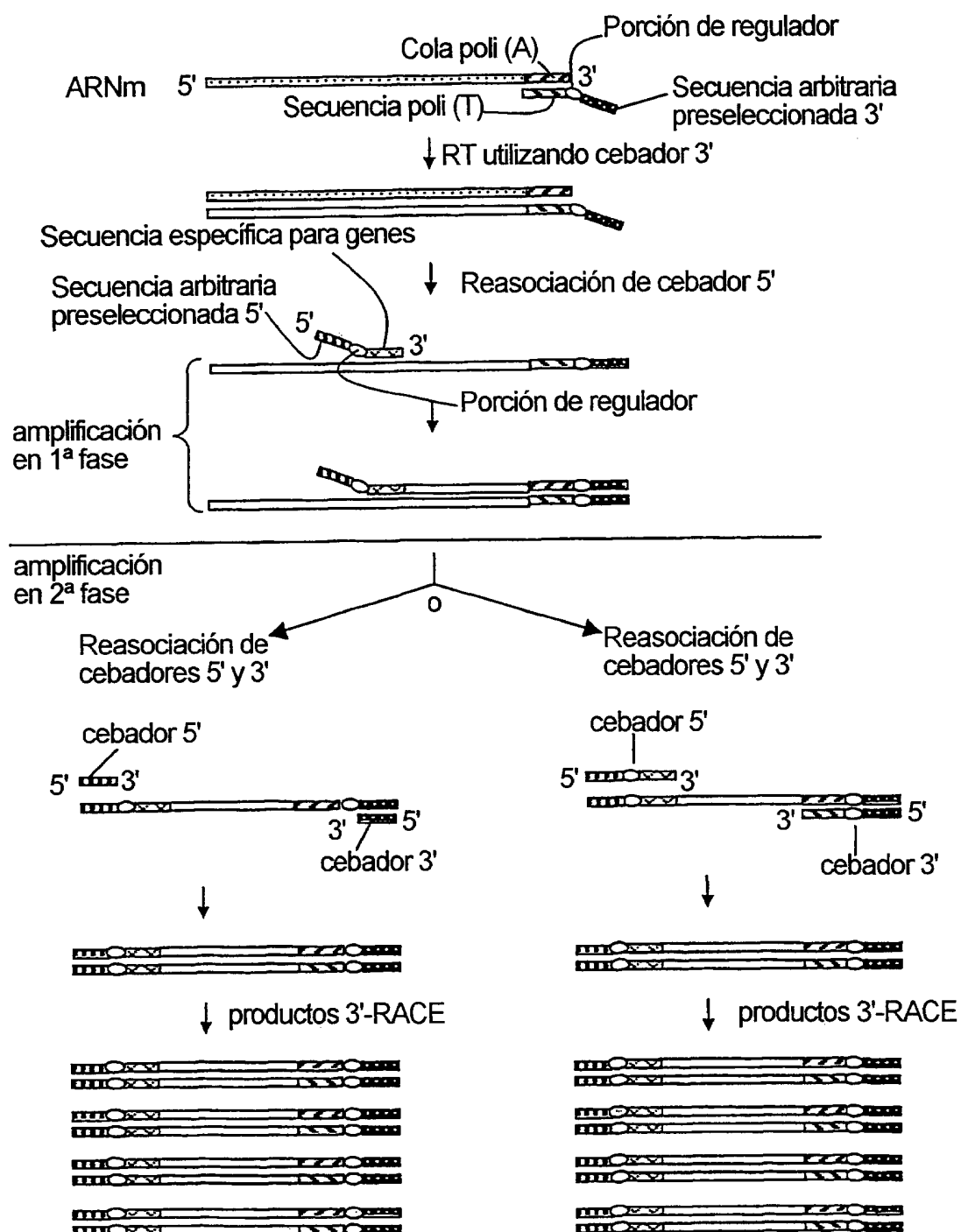


FIG. 4A

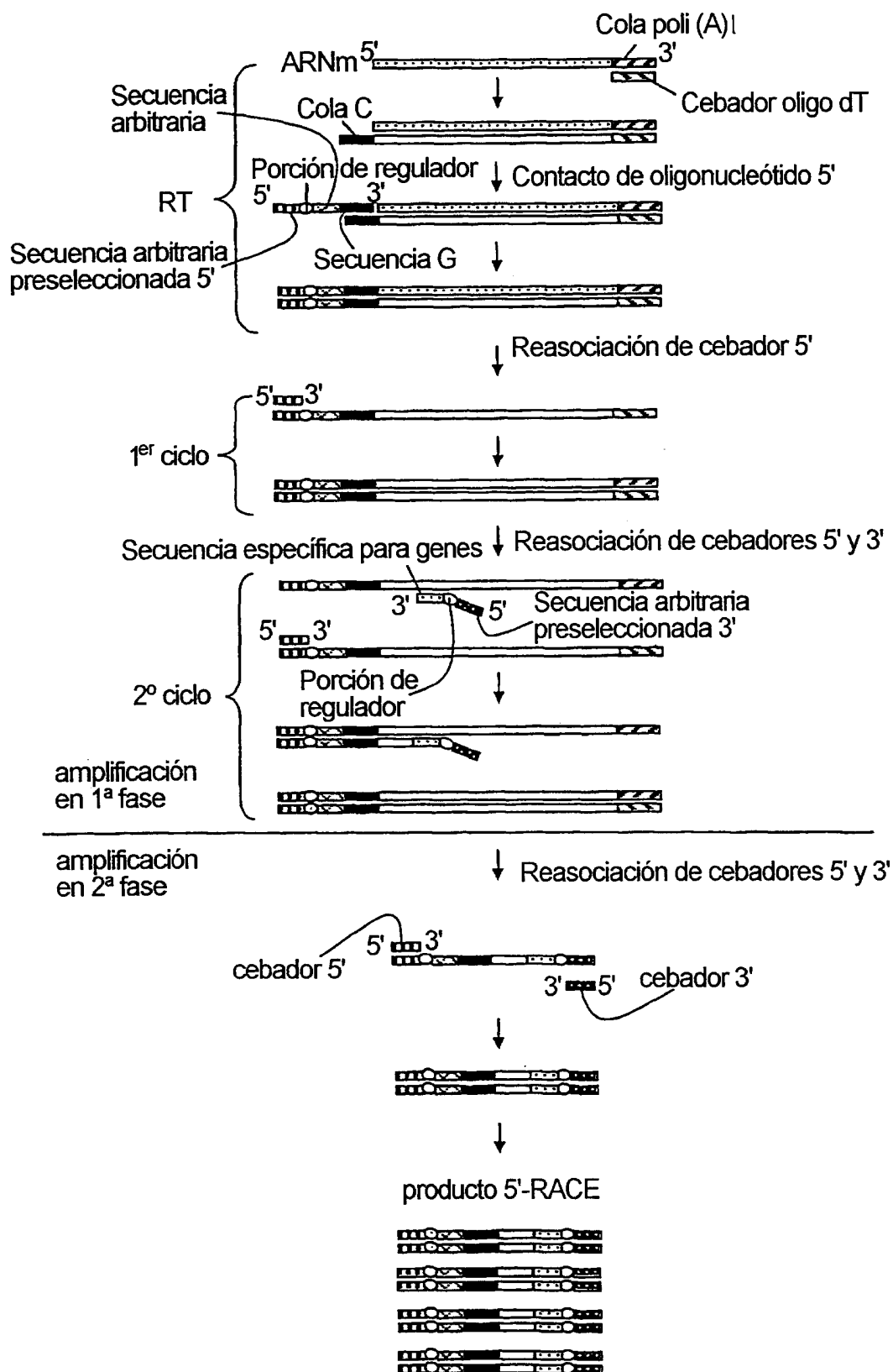


FIG. 4B

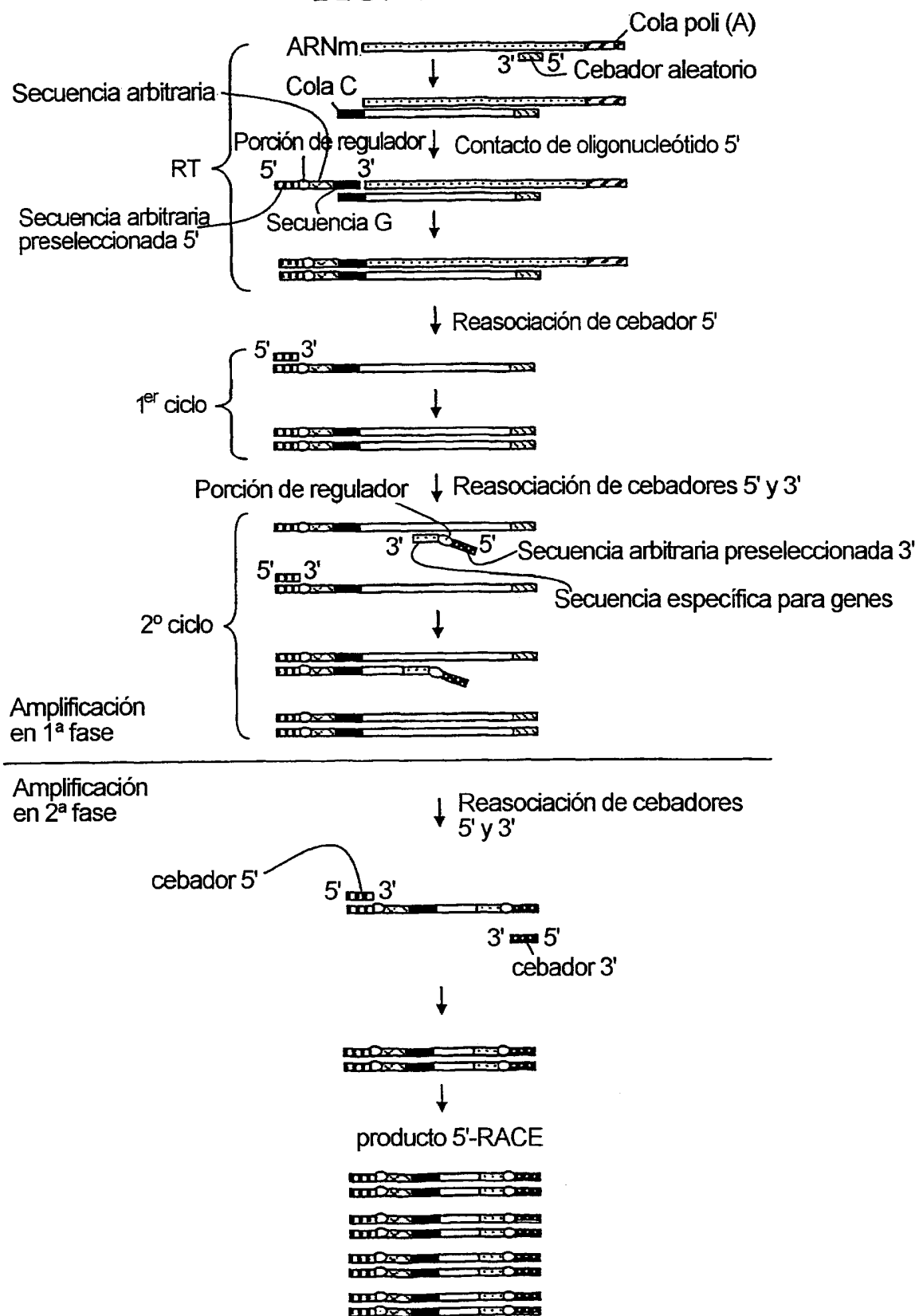


FIG. 5

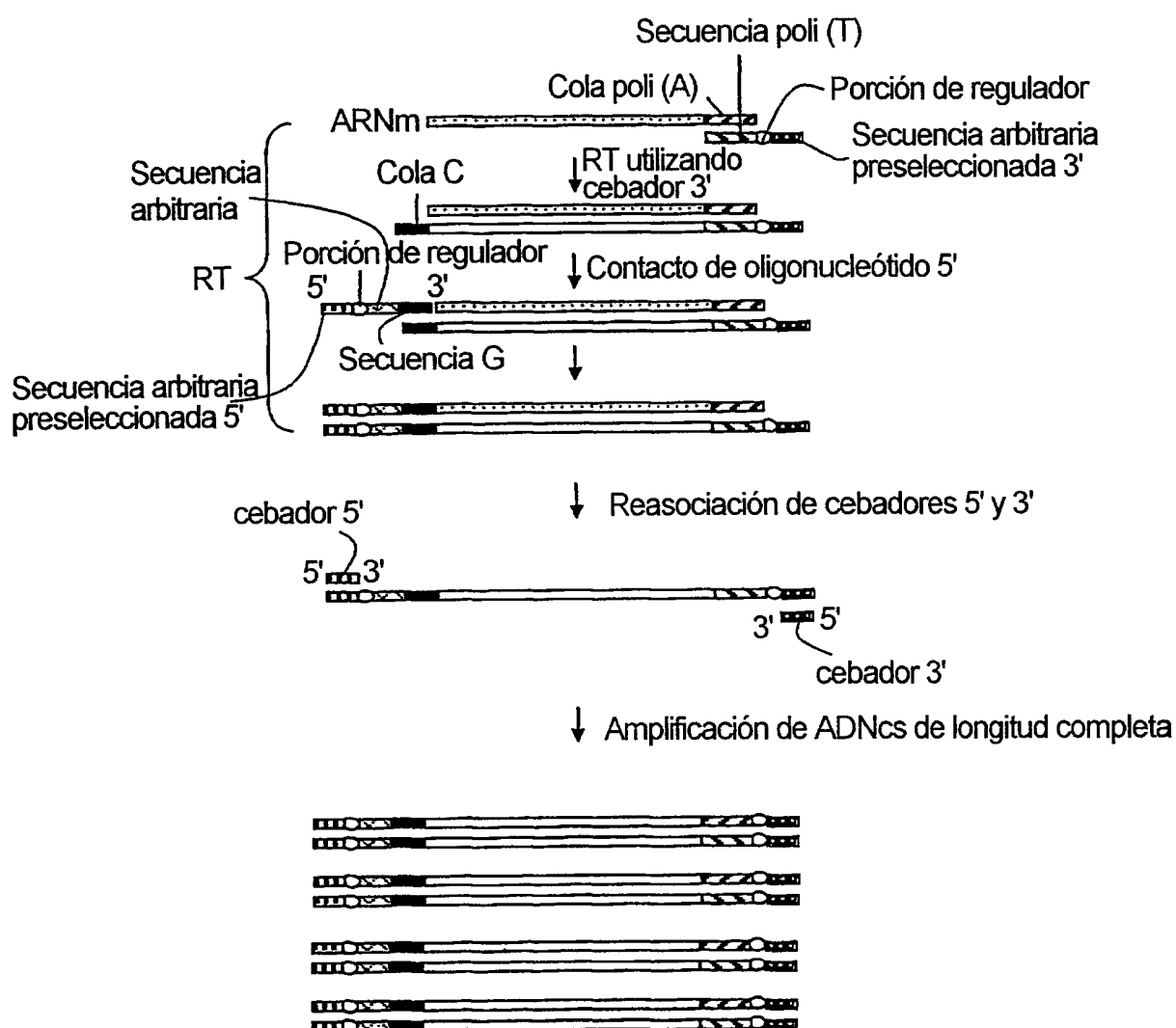


FIG. 6

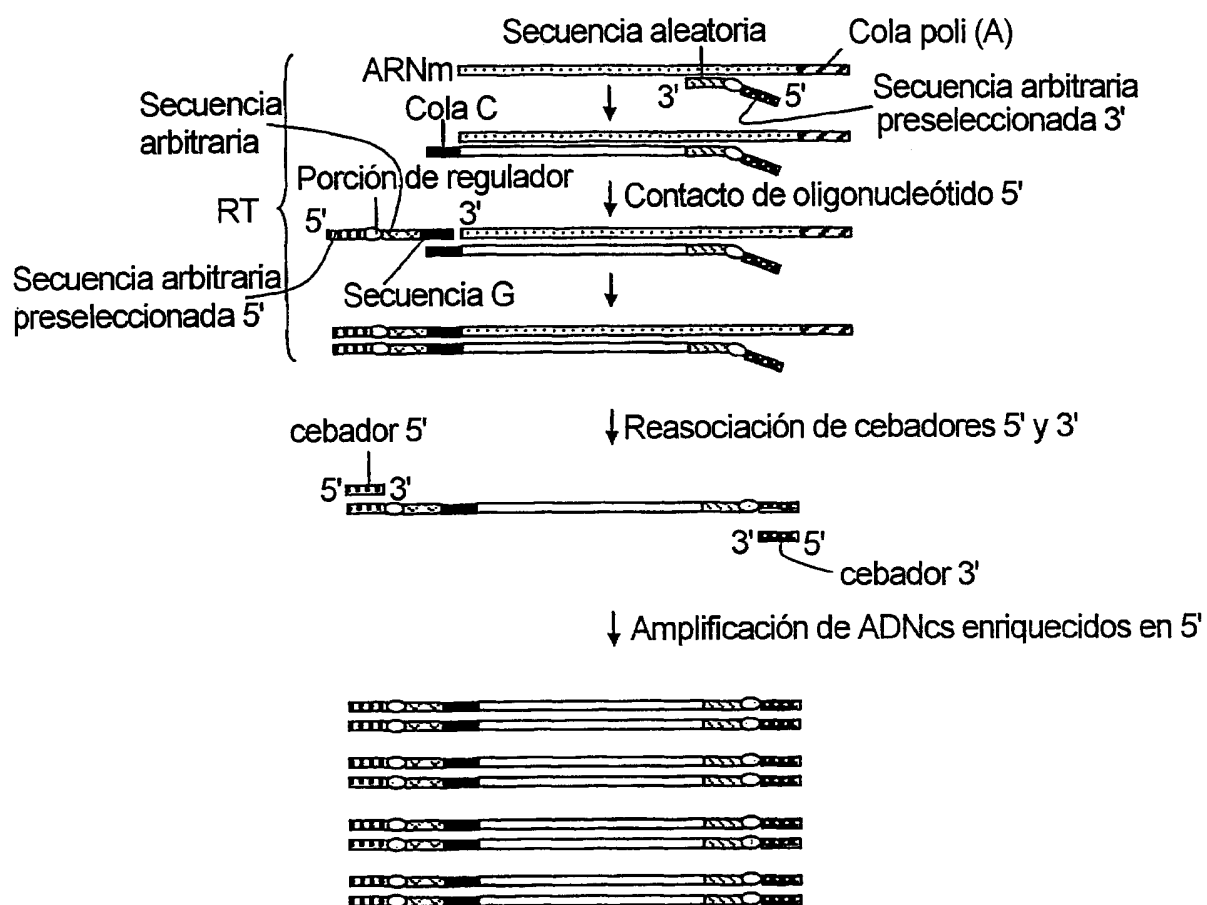


FIG. 7A

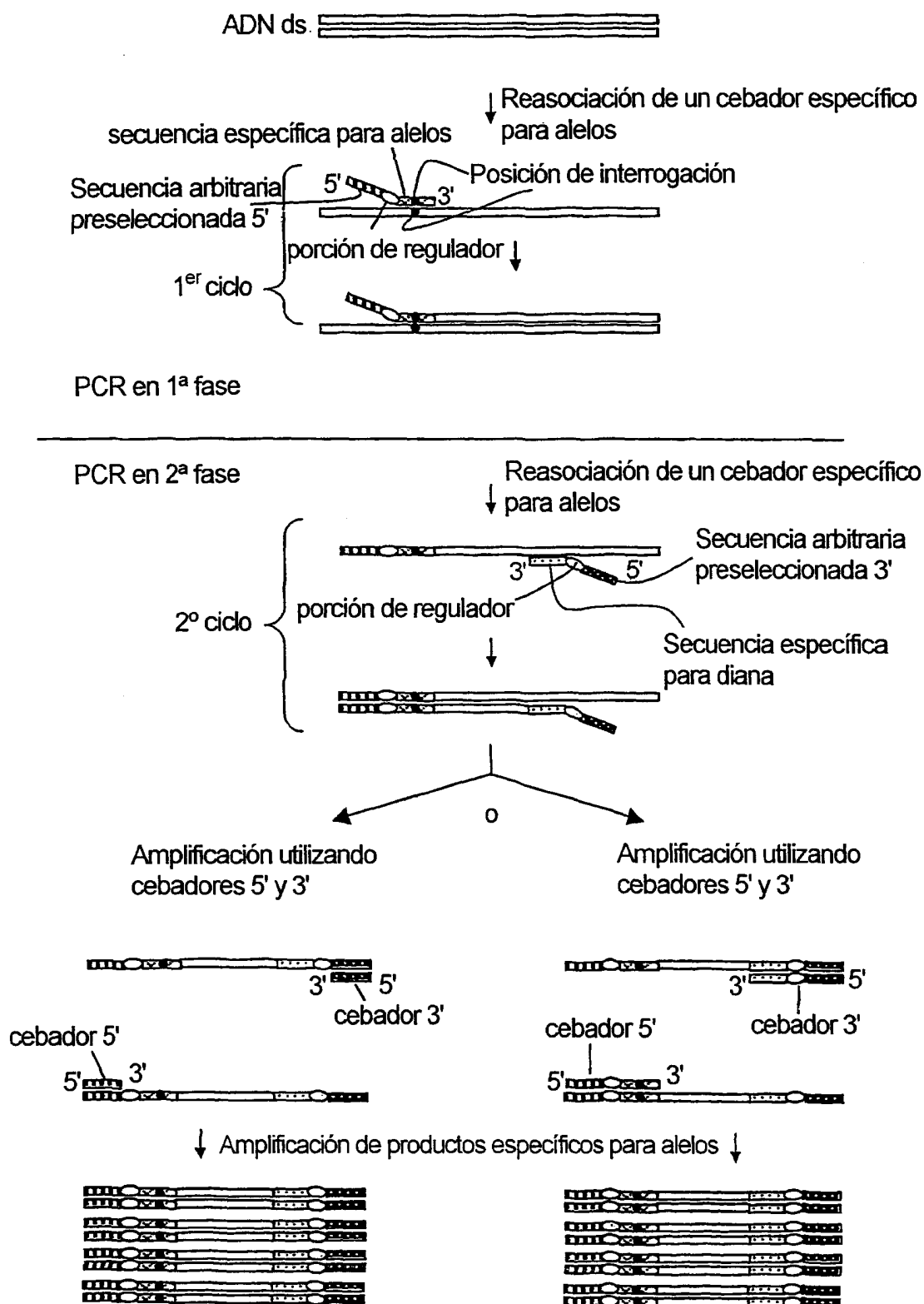


FIG. 7B

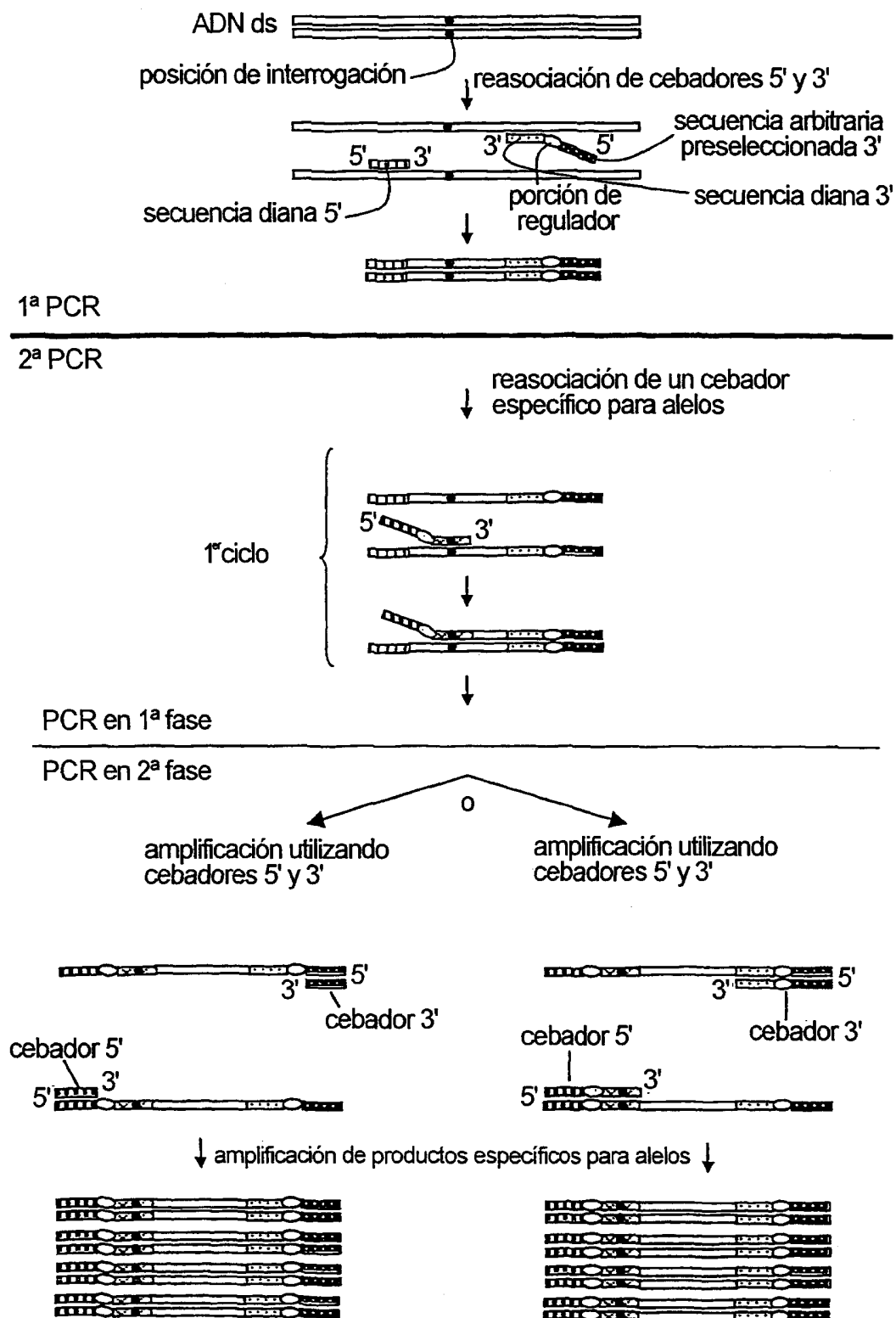


FIG. 8

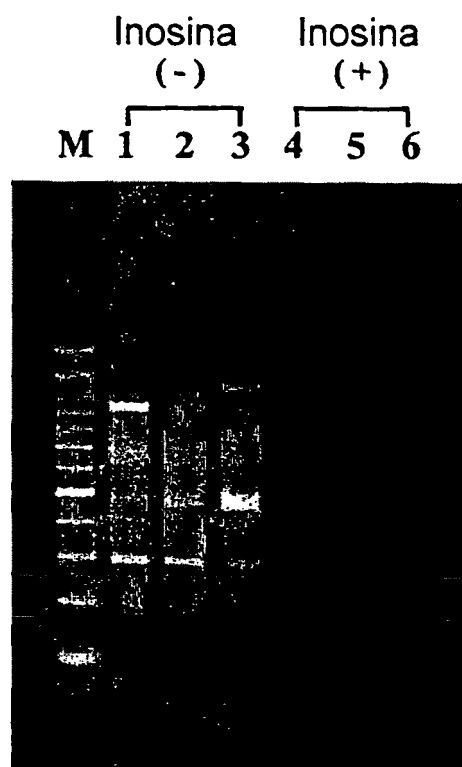


FIG. 9

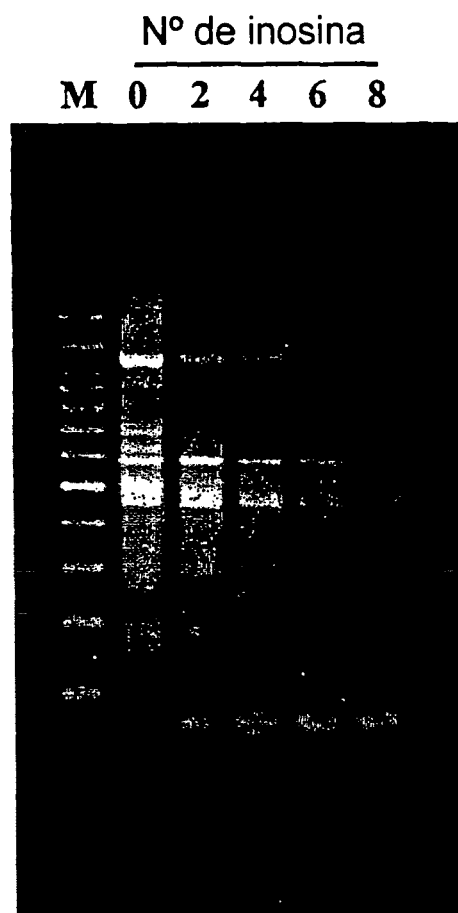


FIG. 10A



FIG. 10B

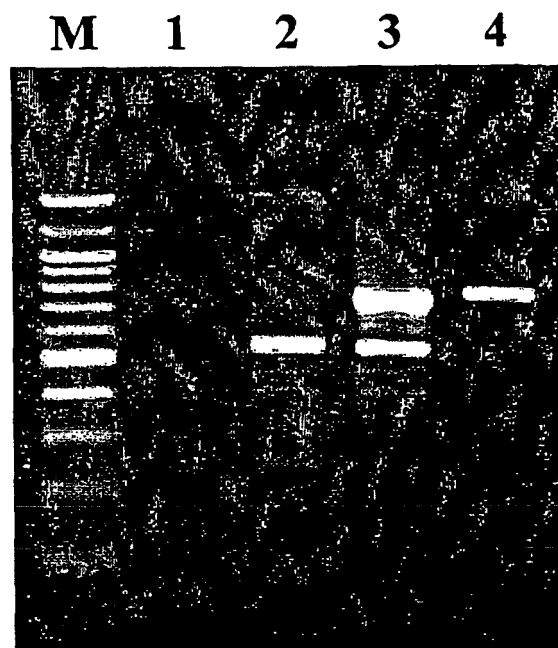


FIG. 10C

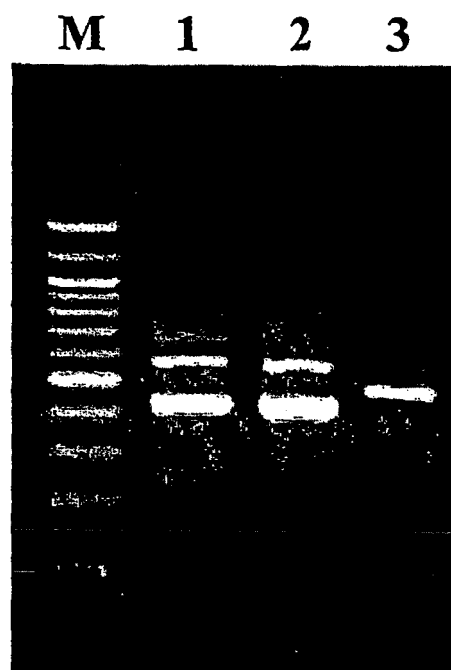


FIG. 10D

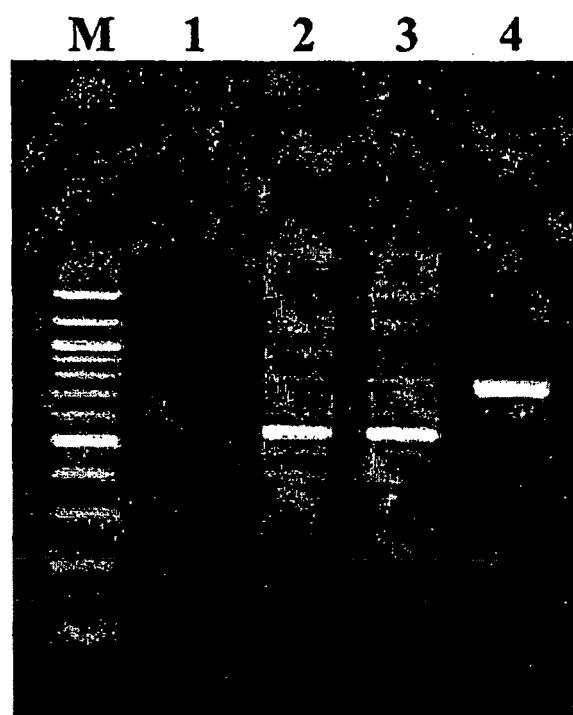


FIG. 11A

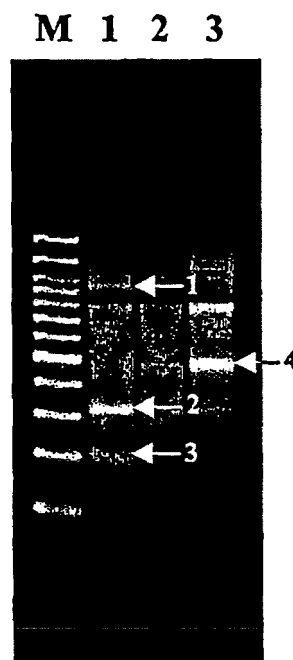


FIG. 11B

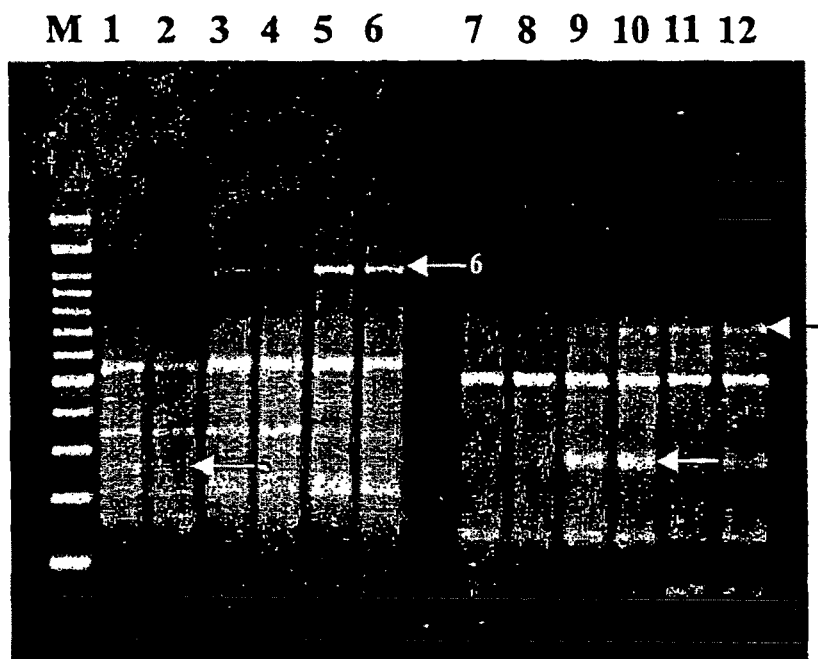


FIG. 11C

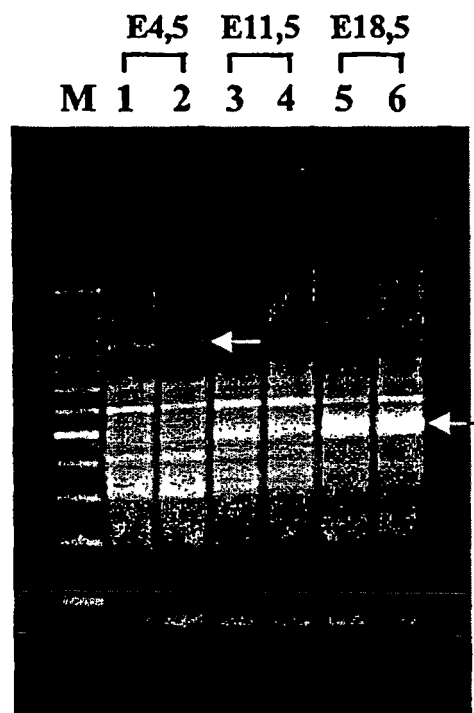


FIG. 11D

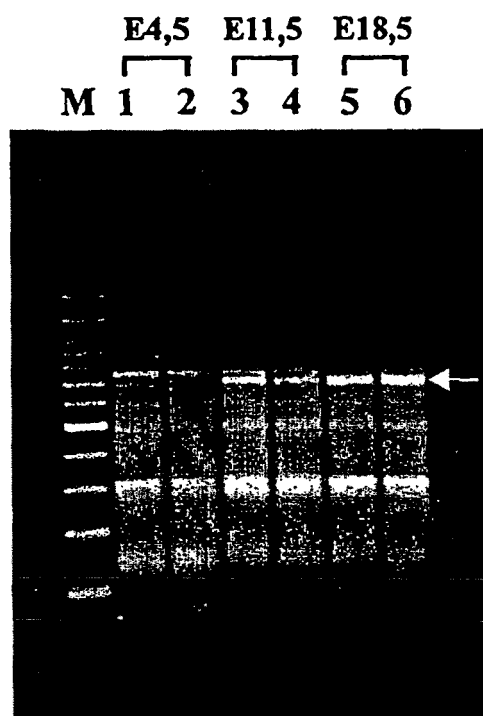


FIG. 12A

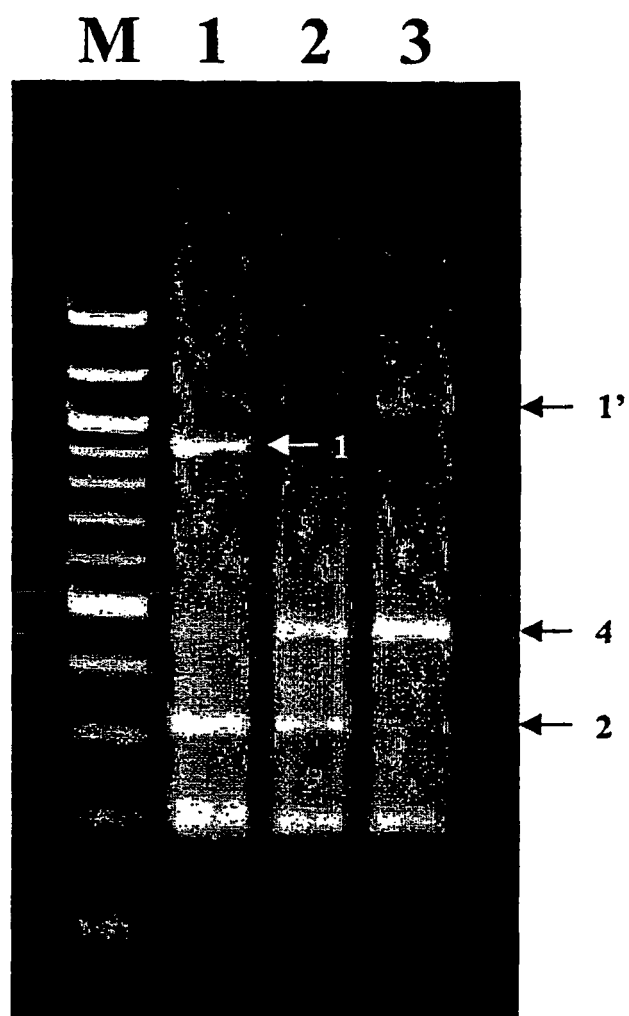


FIG. 12B

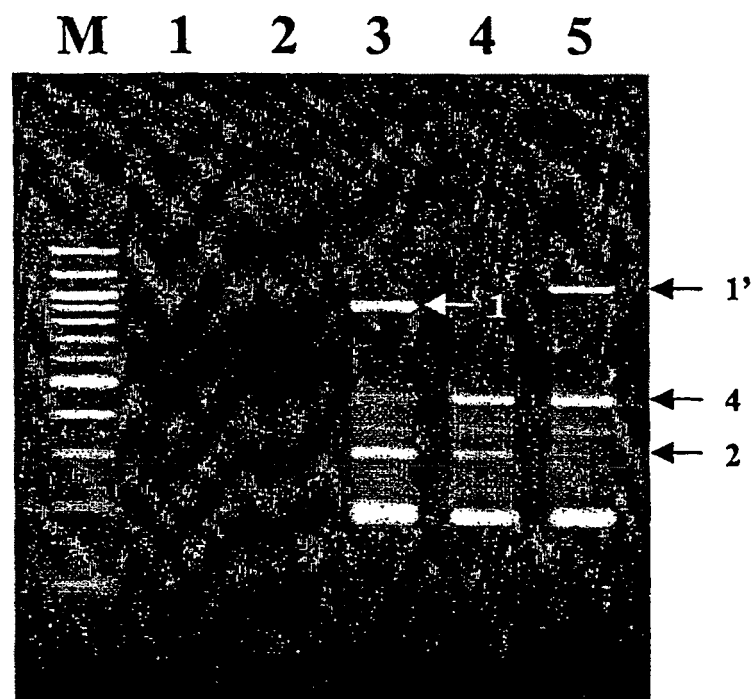


FIG. 13

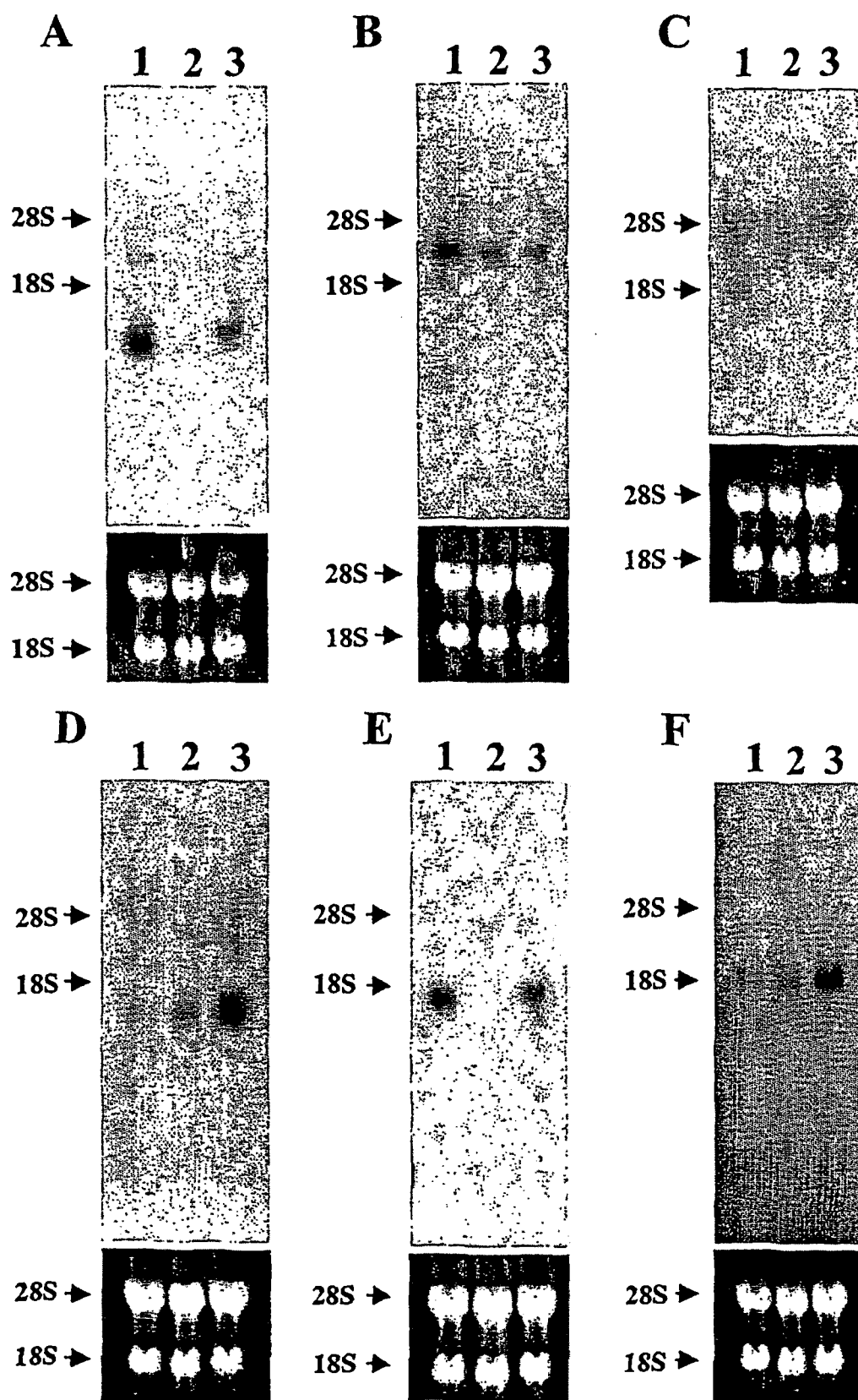


FIG. 14

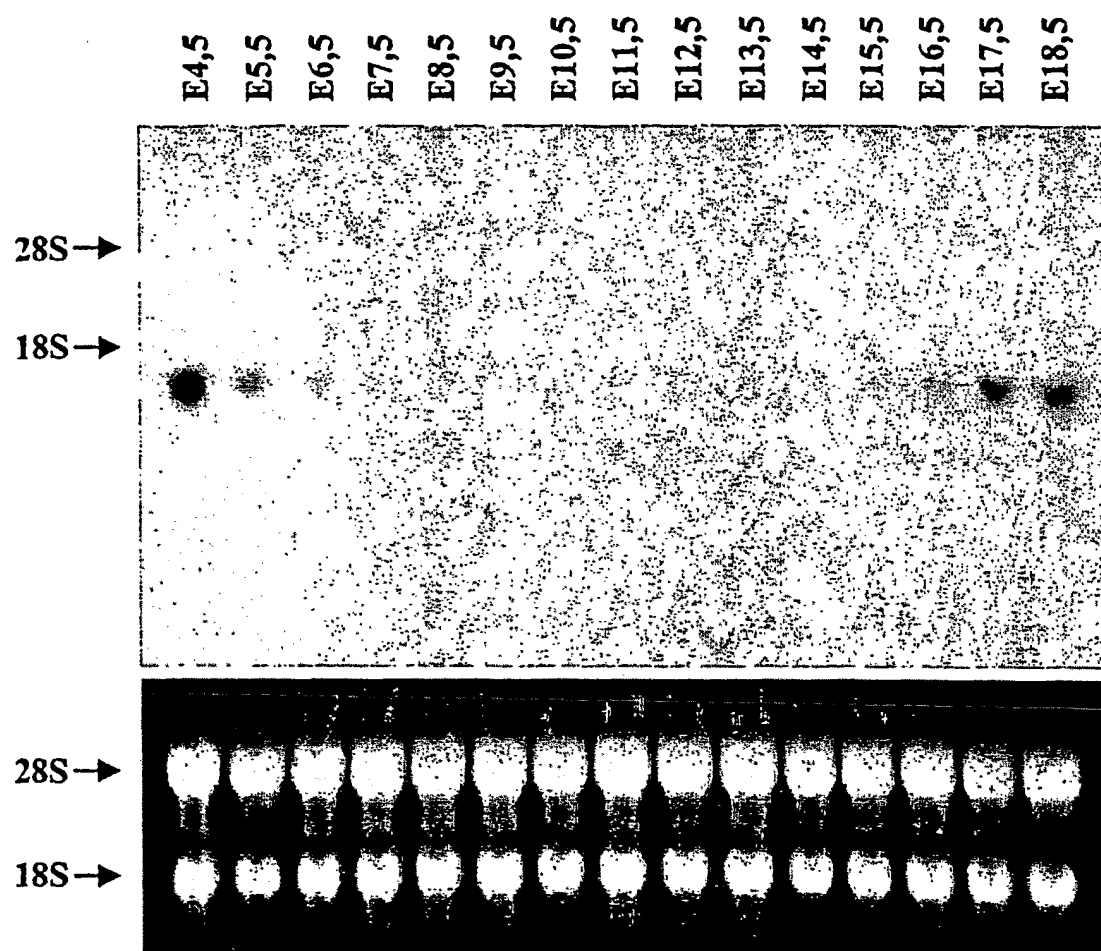


FIG. 15

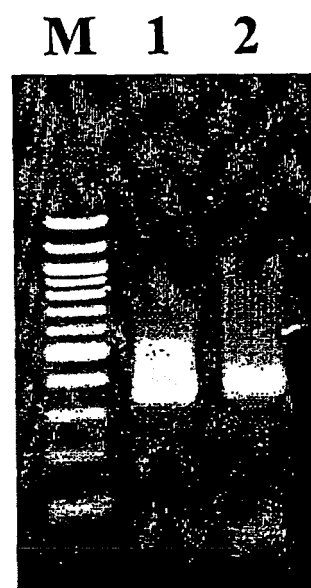


FIG. 16

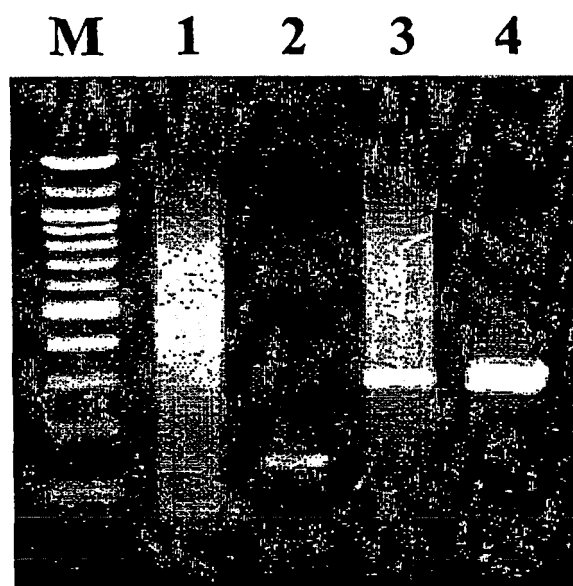


FIG. 17

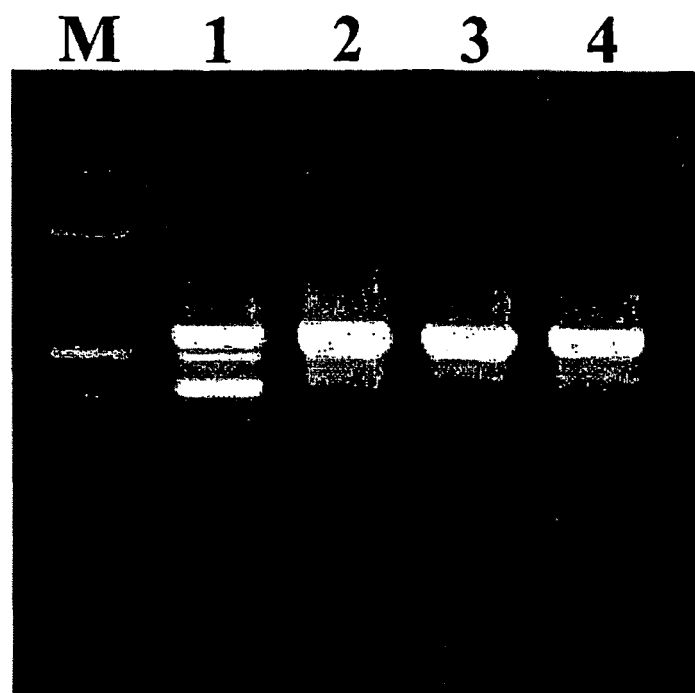


FIG. 18



FIG. 19

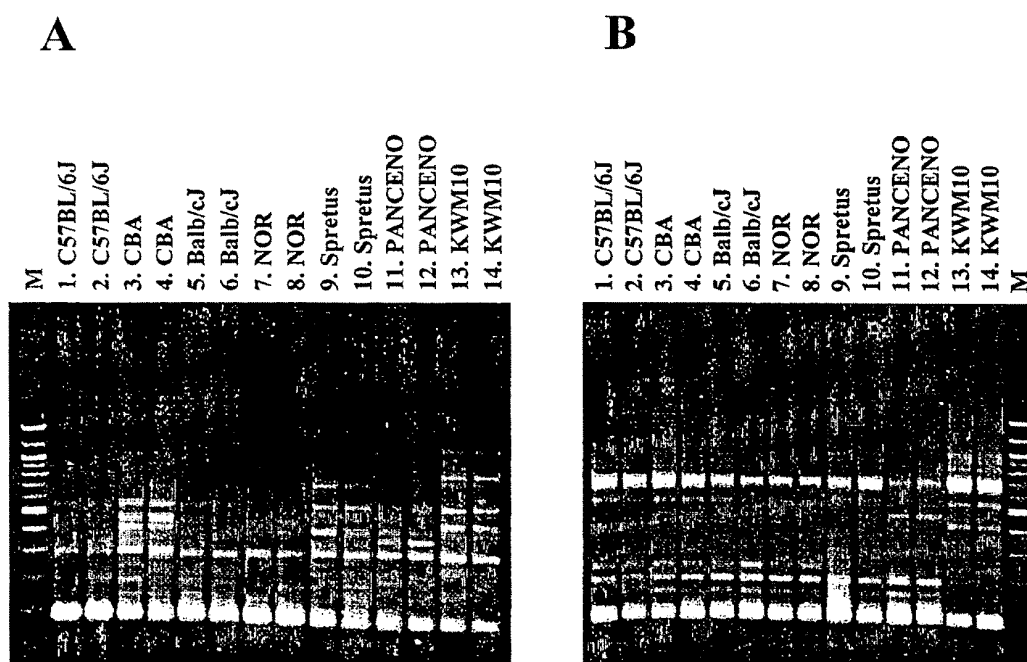


FIG. 20

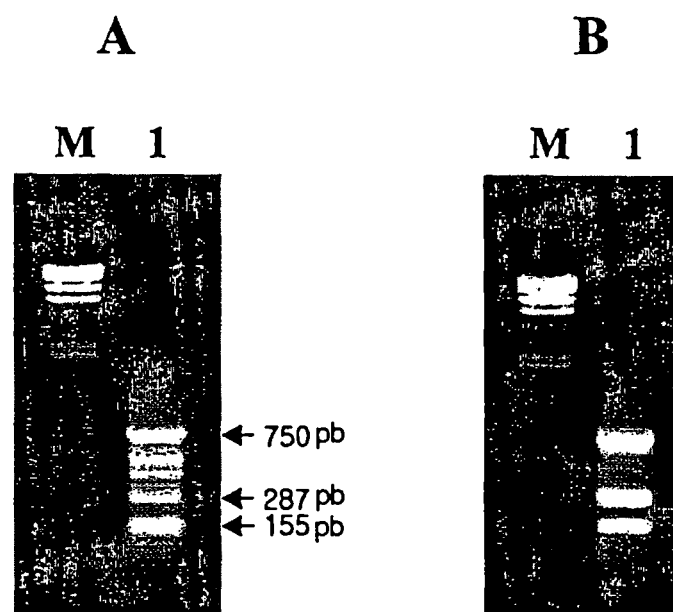


FIG. 21

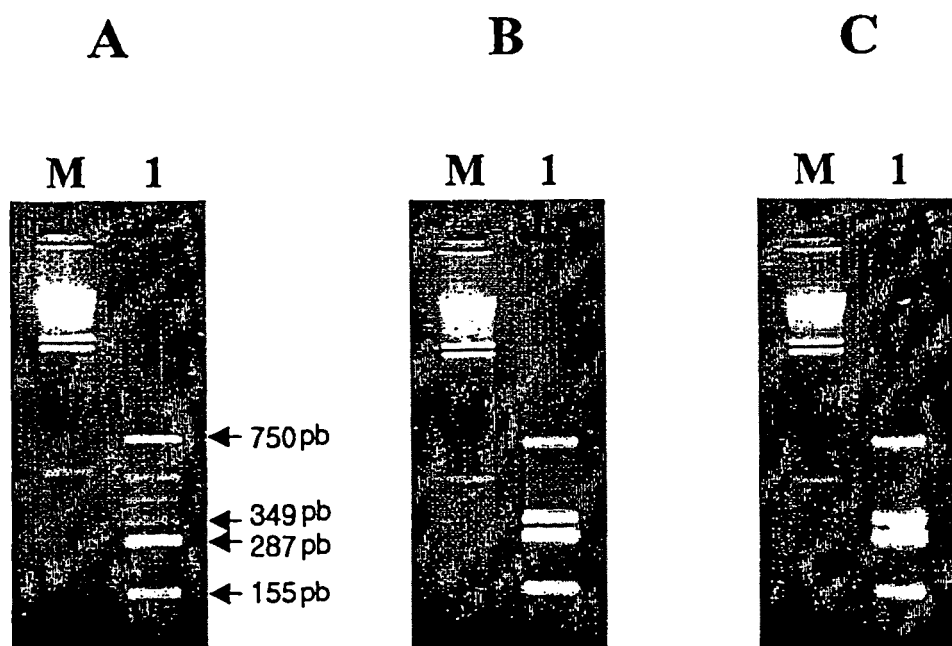


FIG. 22

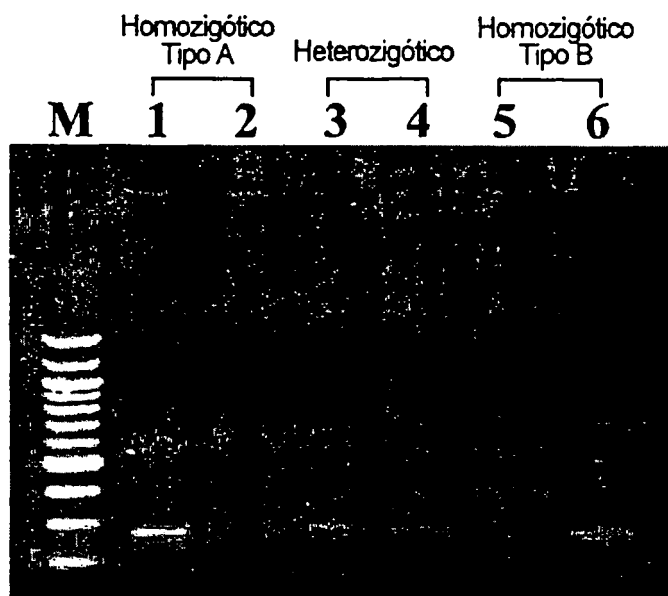
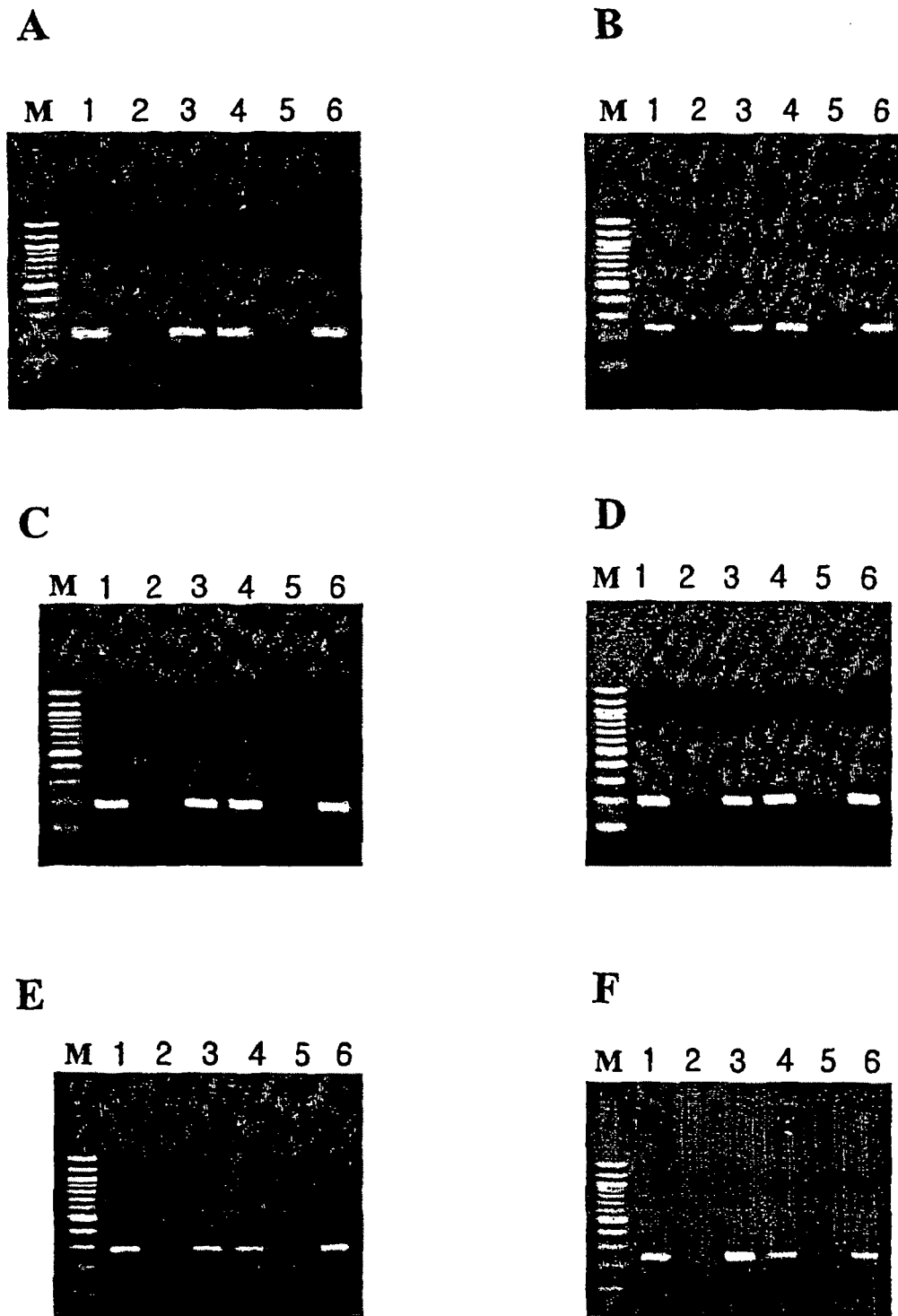


FIG. 23



ES 2 314 093 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

5 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 121

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 36 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
15 (D) TOPOLOGÍA: lineal
(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

20 (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP1:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICAG GAGTGG

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 37 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
35 (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), S = G o C

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP2:

40 GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGGC GACGATS

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 3:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
50 (C) TIPO DE CADENA; sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), S = G o C

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP3:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGCC ATCGACS

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 65 (A) LONGITUD: 37 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla

ES 2 314 093 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), W = A o T

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP4:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIAGA TGCCCGW

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), S = G o C

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP5:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIAGG CGATGCS

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), S = G o C

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP6:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIITCT CCCGGTS

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), S = G o C

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP7:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIITTG TGGCGGS

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 314 093 T3

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), S = G o C

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP8:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIICTC CGATGCS

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), W = A o T

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP9:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICCT GCGGGTW

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC2:

GCTTGACTAC GATACTGTGC GA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC3:

TCACAGAAGT ATGCCAAGCG A

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 12:

ES 2 314 093 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC4:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC AT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP10:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGCC ATCGACC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP11:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGCC ATCGACG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP12:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIAGG CGATGCC

ES 2 314 093 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP13:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIAGG CGATGCG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP14:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICTC CGATGCC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP15:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICTC CGATGCG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

ES 2 314 093 T3

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: CRP2I0:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATGCCATCGA CC

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 34 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP16:

20

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIGCCATC GACC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 21:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

35

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP17:

40

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIGCCA TCGACC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

45

(A) LONGITUD: 38 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

50

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP18:

55

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGC CATCGACC

60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

65

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 314 093 T3

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP19:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIII GCCATCGACC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 41 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: dT-JYC3:

CACAGAAGTA TGCCAAGCGA CTCGAGTTTT TTTTTTTTTT T

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: dT-JYC2:

GCTTGACTAC GATACTGTGC GATTTTTTTTT TTTTTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 35 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC2-T13C:

CTTGACTACG ATACTGTGCG ATTTTTTTTTT TTTC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 314 093 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC2-T13G:

5 GCTTGACTAC GATACTGTGC GATTTTTTTTT TTTTGTG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 28:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

20 (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC2-T13A:

GCTTGACTAC GATACTGTGC GATTTTTTTTT TTTTTA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 29:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

35 (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: dT₁₀-JYC2:

GCTTGACTAC GATACTGTGC GATTTTTTTTT TT

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

45 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: dT₁₀-ACP1:

55 GCTTGACTAC GATACTGTGC GAIHHITTT TTTTTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 31:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 130 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

65 (C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 314 093 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: DEG2:

GCCATCGACC CGTTCTCTA GCCCCATCTT CATGTGTTTT AATGAGATGA
TATTAATTCA TTACATTCAT GGATAATATG TCCCTGAGTA CATTCTAATC
TAGATTTAAC TTCAAAAAAA AAAAAAAAAA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 208 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: DEG5:

AGGCGATGCG GGCTGTACTC TGGGTGGCTG CCACAGTCTC ATGGAAACC
AAGGGCAAAG GACCAAGGAA AAGGGTCTCA GGCCCCTAAA GCAGTGCTT
TCAACCATCC TAATGTTGTG ACAGTTCCTC ATGTTGTGTG ACCCCCCAAC
CATAAAATGA TTTTGTTC TACTTCAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 39 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: r = ribosa

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SMART IV:

AAGCAGTGGT ATCAACGCAG AGTGGCCATT ACGCCr (GGG)

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: cebador 5' PCR:

AAGCAGTGGT ATCAACGCAG AGT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 35:

ES 2 314 093 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 59 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: d = desoxirribosa, V = A, G o C, N = A, G, C o T

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: CDS III/3':

ATTCTAGAGG CCGAGGCGGC CGACATG-(dT)₃₀ VN

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), r = ribosa

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: rG3-ACP:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGGr (G GG)

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), r = ribosa, d = desoxirribosa

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: rG2-ACP:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGGr (G G) d (G)

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), d = desoxirribosa

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: dG3-ACP:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGGd (G GG)

ES 2 314 093 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: oligo-dT₁₈-ACP;

GCTTGACTAC GATACTGTGC GAIHHITTT TTTTTTTTTT TTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: PLP-C α :

GAGAGGATAG TTTCAGGGAC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JunB3:

CTCCGTGGTA CGCCTGCTTT CTC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: β -actina 1:

TCGTCACCCA CATAGGAGTC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 19 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: β -actina 2:

15 CTAAGAGGAG GATGGTCGC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 17 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 25 (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: EsxN7:

30 GCCGGTTGCA GACCACC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 40 (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: EsxC6:

45 GAACCATGTT TCTGAATGCC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 46:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 44 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: EsxN7-ACP:

65 GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIGCC GGTTGCAGAG CACC

ES 2 314 093 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 47:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 47 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: EsxC6-ACP:

GCTTGACTAC GATACTGTGC GAIIIIIGAA CCATGTTCT GAATGCC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 48:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: EsxN1:

GAATCTGAAA CAACTTTCTA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 49:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: EsxC2:

GATGCATGGG ACGAGGCACC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 50:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 47 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: EsxN1-ACP:

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGAA TCTGAAACAA CTTTCTA

ES 2 314 093 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 51:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 19 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: EsxN3:

15 CGCCGACCC CTGCCCCGA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 52:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 18 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: EsxC5:

30 GATGCATGGG ACGAGGCA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 53:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 46 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
40 (C) TIPO DE CADENA; sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: EsxN3-ACP:

50 GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICGC CGCACCCCTG CCCGCA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 54:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 15 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: oligo-dT₁₅;

65 TTTTTTTTTT TTTT

ES 2 314 093 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 55:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 47 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: EsxC2-ACP:

GCTTGACTAC GATACTGTGC GAIIIIIGAT GCATGGGACG AGGCACC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 56:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: EsxC5-ACP:

GCTTGACTAC GATACTGTGC GAIIIIIGAT GCATGGGACG AGGCA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 57:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 43 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), V = A, G o C

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: oligoVdT₁₅-ACP;

GCTTGACTAC GATACTGTGC GAIIIITTT TTTTTTTTTT TTV

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 58:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 33 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), N = A, G, T o C

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

ES 2 314 093 T3

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: dN₆-ACP;

GCTTGACTAC GATACTGTGC GAIIIIINNN NNN

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 59:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), r = ribosa, d = desoxirribosa

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: rG1-ACP:

20

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGGr (G) d (GG)

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 60:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

35

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC5;

CTGTGAATGC TGCGACTACG AT

40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 61:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 42 pares de bases

45

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

50

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC5-T₁₅-ACP;

55

CTGGAATGC TGCGACTACG ATIIIIITTT TTTTTTTTTT TT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 62:

60

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 43 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

65

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), V = A, G o C

ES 2 314 093 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC5-T₁₅V-ACP;

5 CTGTGAATGC TGCGACTACG ATIIIIITTT TTTTITTTTTT TTV

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 63:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), V = A, G o C

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

20 (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC5-T₁₅VN-ACP;

CTGTGAATGC TGCGACTACG ATIIIIITTT TTTTITTTTTT TTVN

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 64:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP101;

40 GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICCG GAGGATC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 65:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

50 (C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP109;

60 GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIICTG CAGGACG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 66:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

65 (A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 314 093 T3

- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

5

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ACP116;

10

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICGG AGCATCC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 67:

15

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

20

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ELAM1N1;

25

TTGCACACTG TTGATTCTAA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 68:

30

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ELAM1C1;

40

TTATTGATGG TCTCTACACA

45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 69:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

50

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ELAM1N2;

55

CCACTGAGTC CAACATTC

60

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 70:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico

65

ES 2 314 093 T3

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ELAM1C2;

CTGAAACACT TCCCACAC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 71:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N1;

CCTCTGACTG CTCTTTTCAC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 72:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53C1;

ATTGAAGTCT CATGGAAGCC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 73:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N2;

TGCTTGCCAC AGGTCTC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 74:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

ES 2 314 093 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53C2;

GCAGTGCTAG GAAAGAGG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 75:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 47 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ELAM1N1-ACP;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIITG CACACTGTTG ATTCTAA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 76:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ELAM1C1-ACP;

TCACAGAAGT ATGCCAAGCG AIIIIITAT TGATGGTCTC TACACA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 77:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ELAM1N2-ACP;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICCA CTGAGTCCAA CATTC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 78:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 44 pares de bases

ES 2 314 093 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ELAM1C2-ACP;

TCACAGAAGT ATGCCAAGCG ATIIIICTGA AACACTTCCC ACAC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 79:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 47 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N1-ACP;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIICTCTGACTGCTC TTTTCAC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 80:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 46 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53C1-ACP;

TCACAGAAGT ATGCCAAGCG AIIIIATTG AAGTCTCATG GAAGCC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 81:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 44 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N2-ACP;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIITGC TTGCCACAGG TCTC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 82:

ES 2 314 093 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 44 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53C2-ACP;

TCACAGAAGT ATGCCAAGCG AIIIIIGCAC TGCTAGGAAA GAGG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 83:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 41 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), N = A, G, T o C R = A o G

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC2-HD1;

GCTTGACTAC GATACTGTGC GAIIIIIGTN CRRGTGTGGT T

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 84:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 41 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), N = A, G, T o C R = A o G

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC2-HD2;

GCTTGACTAC GATACTGTGC GAIIIIIGTN CRRGTCTGGT T

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 85:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 41 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI), N = A, G, T o C R = A o G

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: JYC2-HD3;

ES 2 314 093 T3

GCTTGACTAC GATACTGTGC GAIIIIIGTN CRRGTTTGGT T

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 86:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N;

CCTCTGACTG CTCTTTTCAC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 87:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53C-ACP;

TCACAGAAGT ATGCCAAGCG AIIIIATTG AAGTCTCATG GAAGCC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 88:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N1A-ACP;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC AIIIIICC CGCGTGG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 89:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

ES 2 314 093 T3

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N1B-ACP;
GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICCC CCCGTGG

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 90:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- 10 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 15 (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

20 (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N2A-ACP;
GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIITCC CGCGTG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 91:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 30 (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N2B-ACP;
GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIITCC CCCCGTG

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 92:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- 45 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 50 (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

55 (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N3A-ACP;
GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICTC CCCGCGT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 93:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 65 (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

ES 2 314 093 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N3B-ACP;

5 GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICTC CCCCCGT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 94:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 37 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
15 (D) TOPOLOGÍA: lineal
(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

20 (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N4A-ACP;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGCT CCCCGCG

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 95:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
30 (B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N4B-ACP;

40 GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGCT CCCCCCCG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 96:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 35 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
50 (D) TOPOLOGÍA: lineal
(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

55 (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N5A-ACP;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGCT CCCCG

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 97:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 35 pares de bases
65 (B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 314 093 T3

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: P53N5B-ACP;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGCT CCCCC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 98:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: 703N;

ATTCTGATGG TGTGATTGT G

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 99:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM703C;

TCACAGAAGT ATGCCAAGCG AIIIIACCC TGGAGTAGAC GAAGA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 100:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM703-A;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGGT ACAGGGC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 101:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

ES 2 314 093 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM703-B;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGGT ACCGGGC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 102:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: 028N;

CCTTCTGTGC TTGATGCTTT T

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 103:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 46 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM028C;

TCACAGAAGT ATGCCAAGCG AIIIIICAGG AAGGATGAGC ATTTAG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 104:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA; sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM028-A;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIITCC AAACCAA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 105:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

ES 2 314 093 T3

- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM028-B;
GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIITCC AACCCAA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 106:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 20 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA; sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: 695N;

AGAAAAACCA GAGGCAGCTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 107:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 47 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA; sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM695C;

TCACAGAAGT ATGCCAAGCG AIIIIAGCA CAACCAAAG ACACAGT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 108:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 37 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA; sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
 - (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM695-A;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICCA TTTTAGG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 109:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 - (A) LONGITUD: 37 pares de bases

ES 2 314 093 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM695-B;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICCA TTGTAGG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 110:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: 679N;

CTAGCTGCAA GTGACATCTC T

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 111:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 43 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM679C;

TCACAGAGTA TCCAAGCGII IITCAGTAA GAAGCCAGGA GAG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 112:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM679-A;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICCA GAACTTT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 113:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 314 093 T3

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM679-B;
GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIICCA GACCTTT
- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 114:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: 832N;
TTTTGGGTGG AGGCTAACAT
- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 115:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 44 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM832C;
TCACAGAAGT ATGCCAGCGA IIIIIAACGA TGCAGACACC ACCA
- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 116:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 37 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)
- (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM832-A;
GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGAC TGGTAAA
- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 117:

ES 2 314 093 T3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM832-B;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIGAC TGATAAA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 118:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: 880N;

CTTCCACCAA TACTCTTTTC C

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 119:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM880C;

TCACAGAAGT ATGCCAGCGA IIIIIGCATA CACACAAGAG GCAGA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID Nº: 120:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA; sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM880-A;

GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIAAA GCCATAA

ES 2 314 093 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID N°: 121:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 37 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) TIPO DE CADENA; sencilla
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal
(D) OTRA INFORMACIÓN: I = desoxiinosina (dI)

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (sintético)

15 (iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SM880-B;
GTCTACCAGG CATTCGCTTC ATIIIIIAAA GCTATAA

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65