(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 718 482**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/6827 (2008.01)
C12Q 1/6844 (2008.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2005 E 10180482 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.01.2019 EP 2336361**

(54) Título: **Kit para amplificación de recombinasa polimerasa**

(30) Prioridad:

01.06.2004 US 576148 P
01.06.2004 US 576162 P
01.09.2004 US 931916
26.10.2004 US 622291 P
02.12.2004 US 632746 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2019

(73) Titular/es:

ALERE SAN DIEGO, INC. (100.0%)
9975 Summers Ridge Road
San Diego, CA 92121, US

(72) Inventor/es:

PIEPENBURG, OLAF;
WILLIAMS, COLIN H.;
ARMES, NIALL y
STEMPLE, DEREK L.

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

Kit para amplificación de recombinasa polimerasa

Antecedentes de la invención

La capacidad de amplificar ADN se encuentra en el corazón de la investigación médica y biológica moderna. Esto se debe a que la mayoría de las técnicas de biología molecular se basan en muestras que contienen muchas moléculas idénticas para aumentar la sensibilidad de un ensayo o para preparar suficiente material para su posterior procesamiento. Entre las diversas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más común debido a su sensibilidad y eficiencia en la amplificación de secuencias cortas de ácidos nucleicos.

Aunque la PCR es de gran utilidad, también está limitada de varias maneras. La primera limitación de la PCR es que se basa en múltiples ciclos de fusión térmica (desnaturalización) a altas temperaturas, seguida de hibridación y elongación a una temperatura reducida. Para maximizar la eficiencia y minimizar el ruido, se requiere un control complejo de la temperatura de múltiples reacciones. Esto requiere el uso de un bloque de calentamiento/enfriamiento rápido controlable por termociclizador hecho con material exótico (por ejemplo, bloques de plata chapados en oro), o un mecanismo robótico para mover muestras entre zonas con temperatura controlada. Debido a la alta temperatura requerida para fundir el ADN en condiciones salinas fisiológicas, la tecnología de PCR requiere la adición de polimerasa nueva por ciclo o el uso de polimerasas termoestables. El método de agregar polimerasa nueva no se ha automatizado y, por lo tanto, requiere mucho trabajo y es propenso a errores (por ejemplo, contaminación, caída de tubos, errores de etiquetado). Además, la necesidad de agregar enzimas y mezclar cada reacción individualmente presenta serios inconvenientes que tienen una adaptación limitada de los métodos de PCR de adición de enzimas a pequeña escala.

En comparación con los métodos que implican la adición de polimerasa fresca, el uso de polimerasas termoestables en la PCR es el más practicado. Este método adolece del hecho de que las polimerasas termoestables se encuentran en un número limitado de organismos, y los mecanismos de replicación utilizados por los organismos termofílicos son poco conocidos. El repertorio disponible de polimerasas termoestables está limitado a enzimas polimerasas de polipéptidos individuales involucradas en la reparación del ADN y/o la síntesis de cadenas de retardo. La reparación del ADN y/o las polimerasas de cadena retrasada son malas opciones para la amplificación del ADN porque exhiben una capacidad de procesamiento deficiente (síntesis distributiva). En parte como consecuencia del uso de polimerasas de cadena de reparación y/o retardo (por ejemplo, polimerasas Taq, Pfu, Vent), y debido a la formación de estructuras inhibitorias de ácidos nucleicos secundarios o terciarios después de la fusión térmica, los protocolos actuales de PCR no amplifican fácilmente las secuencias más largas que varios miles de pares de bases. La síntesis confiable (y la amplificación) de plantillas más largas se basará en polimerasas y complejos enzimáticos auxiliares que exhiben colectivamente niveles mucho más altos de capacidad de procesamiento, desplazamiento de la cadena y resolución de la estructura secundaria, además de limitar la formación de estructuras inhibitorias de ácido nucleico de orden superior que pueden formarse al enfriar el ADN desnaturalizado por calor.

Una segunda limitación de la PCR es que se basa en la hibridación de la solución entre oligonucleótidos (cebadores de la PCR) y ADN de plantilla desnaturalizado (es decir, el ADN por amplificar) en un entorno acuoso. Para ser efectivas, las reacciones de PCR se realizan en poco tiempo porque las polimerasas termoestables tienen una actividad que disminuye rápidamente a las temperaturas de PCR. Además, para una hibridación efectiva en poco tiempo, una característica crítica para un cambio rápido es necesario realizar la PCR en un ambiente con altas concentraciones de oligonucleótidos. La alta concentración de oligonucleótidos también garantiza una rápida interacción de las secuencias diana con los oligonucleótidos en competencia con la cadena complementaria desnaturalizada por calor todavía presente en la solución. Las altas concentraciones de cebadores de oligonucleótidos pueden causar problemas, particularmente cuando el número de copias de la secuencia diana es bajo y está presente en una mezcla compleja de moléculas de ADN. Este sería el caso, por ejemplo, en una PCR de un genoma para determinar el polimorfismo genético en un locus.

Un problema con el uso de altas concentraciones de oligonucleótidos es que mejora el grado de cebado falso en secuencias solo parcialmente coincidentes en la mezcla de ADN complejo. El cebado falso se refiere a la hibridación de un cebador a un ADN de plantilla en la PCR incluso cuando la secuencia del cebador no es completamente complementaria al ácido nucleico de la plantilla, lo que puede conducir a una amplificación no específica de ácidos nucleicos. El ruido, debido al cebado falso, aumenta con la concentración de oligonucleótido y la complejidad del ADN de partida total. Además, la posibilidad de cebado falso aumenta a medida que disminuye el número de copias de las secuencias de destino. Cuando las condiciones para un cebado falso son favorables (es decir, alta concentración de oligonucleótidos, alta complejidad, bajo número de copias), las secuencias amplificadas errantes pueden convertirse en un producto de reacción dominante. Por consiguiente, puede ser difícil identificar condiciones y oligonucleótidos para la amplificación limpia de secuencias diana de un ADN de muestra sin un exceso de fondo de cebado falso. Por lo tanto, una desventaja adicional del uso de la PCR es el éxito limitado en la amplificación limpia de ADN diana raros de mezclas de secuencias complejas.

Una solución a los problemas de especificidad y al problema de fusión de la plantilla en los que incurre la PCR es emplear métodos que se basen en las propiedades biológicas de la proteína recombinante RecA bacteriana, o sus parientes procariotas y eucariotas. Estas proteínas recubren el ADN de cadena sencilla (ADNss) para formar filamentos, que luego escanean el ADN de doble cadena (ADNds) en busca de regiones de homología de secuencia. Cuando se localizan secuencias homólogas, la cadena de filamentos de la nucleoproteína invade el ADNds creando un híbrido corto y una burbuja de cadena desplazada conocida como Bucle D. El extremo 3' libre de la cadena de filamentos en el bucle D se puede extender mediante ADN polimerasas para sintetizar una nueva cadena complementaria. La cadena complementaria desplaza la cadena originalmente emparejada a medida que se alarga. Al utilizar pares de oligonucleótidos de una manera similar a la utilizada en la PCR, debería ser posible amplificar secuencias de ADN diana de manera análoga, pero sin ningún requisito de fusión térmica (termociclizado). Esto tiene la ventaja de permitir el uso de polimerasas lábiles al calor previamente inutilizables en la PCR, y aumentar la fidelidad y la sensibilidad mediante el escaneo de la plantilla y la invasión de cadenas en lugar de la hibridación.

Aunque el uso de RecA y sus homólogos para la amplificación *in vitro* de ácidos nucleicos se ha descrito previamente (Patente de los Estados Unidos 5,223,414 de Zarling et al., denominada en este documento "Zarling"), el método y los resultados son limitados. El método de Zarling tiene fallas críticas que limitan su capacidad para lograr una amplificación exponencial del ADN de doble cadena. La falla del método de Zarling para lograr una amplificación exponencial puede deberse a su especificación para el uso de ATPγS en lugar de ATP. El método de Zarling impulsa el uso de ATPγS, en lugar de ATP, en el ensamblaje de filamentos de nucleoproteínas RecA porque da como resultado una estructura de filamento RecA/ADNss más estable. Normalmente, los filamentos se ensamblan en una dirección de 5' a 3' y se desmontan espontáneamente en la misma dirección de 5' a 3', ya que la RecA hidroliza el ATP. Este proceso es dinámico, ya que el ensamblaje y el desensamblaje se producen al mismo tiempo y la cantidad de filamentos ensamblados se encuentra en equilibrio. Si se usa el análogo de ATP no hidrolizable, ATPγS, se inhibe la hidrólisis del ATPγS y el desensamblaje de 5' a 3' de los filamentos. La gran estabilidad de los filamentos de RecA/ATPγS, tanto antes como después del intercambio de cadenas, aunque es útil en el método de selección (es decir, el método de Zarling) es perjudicial y poco práctico para la amplificación de ADN.

En el método de Zarling, la proteína RecA involucrada en la invasión de la cadena seguirá asociada con la porción de doble cadena del material intercambiado después del intercambio de la cadena. Esta interacción se produce porque el dúplex recién formado está enlazado en el sitio de alta afinidad de RecA. La cadena desplazada ocupa un sitio diferente de baja afinidad, a menos que esté unida a otra proteína de unión a ADN de cadena sencilla (SSB), como la SSB de E. coli. Si se hubiera utilizado el ATP para generar la estructura de intercambio, podría ocurrir un desensamblaje espontáneo de 5' a 3', aunque el complejo de intercambio puede ser bastante estable y puede requerir factores adicionales para estimular el desensamblaje dependiente de ATP. Independientemente de si es espontáneo o estimulado, en presencia de ATPγS, el desensamble de 5' a 3' del filamento RecA se inhibe (Paulus, B.F. and Bryant, F.R. (1997). Biochemistry 36, 7832-8; Rosselli, W. and Stasiak, A. (1990). J Mol Biol 216, 335-52; Shan, Q. et al., (1997). J Mol Biol 265, 519-40).

Estos complejos de RecA/ADNds son precisamente los sitios a los que se dirigen los complejos de cebadores de RecA/ ADNss utilizados para iniciar las siguientes rondas de invasión y síntesis. De hecho, con la RecA unida, el intermedio puede no ser accesible a la polimerasa, y ciertamente los ADNds ya no pueden ser invadidos por complejos de cebadores RecA/ADNss y, por lo tanto, no son amplificables desde este punto. Una síntesis adicional de estas plantillas podría ocurrir si se inicia en el otro extremo de la plantilla, que está libre de RecA, y esto podría eventualmente conducir al desplazamiento físico de la RecA vinculada. Sin embargo, no está claro si muchas polimerasas pueden desplazar a RecA de esta manera. Además, el sitio de iniciación para esa ronda sintética ahora estará "bloqueado" en su lugar. En tal situación, la amplificación es solo lineal con el tiempo y generará predominantemente productos de amplificación de ADN de cadena sencilla.

Por lo tanto, el método de Zarling descrito, en el mejor de los casos, es probable que genere poco más que pequeñas cantidades de copias de ADNss de cada plantilla. La amplificación lineal potencialmente dada por el método de Zarling solo se producirá en presencia de SSB, ya que la cadena desplazada continuará uniéndose al segundo sitio de interacción en RecA, y no se liberará ADN de cadena sencilla (Mazin, A.V. and Kowalczykowski, S.C. (1998). EMBO J 17, 1161-8). Esto probablemente explica por qué el método de Zarling observó fragmentos de migración más rápidos adicionales cuando incluyeron SSB. Estos fragmentos adicionales fueron probablemente fragmentos de una sola cadena desplazados. Por lo tanto, en el método de Zarling, en el mejor de los casos, solo se producirá una amplificación lineal de ADN de cadena sencilla. Existe, por lo tanto, una necesidad en la técnica de un método mejorado de amplificación de ADN dependiente de recombinasa.

Esta invención utiliza dos nuevas estrategias de amplificación que evitan cualquier requisito de fusión térmica de ADN o componentes termoestables. Estas estrategias también superan las ineficiencias del método de Zarling. Al igual que con la estrategia de Zarling, estos métodos se basan en las propiedades biológicas de la proteína RecA bacteriana, o sus parientes procariotas y eucariotas, en particular, la proteína uvsX del fago T4. Sin embargo, a diferencia del método de Zarling, estos métodos están diseñados para lograr una amplificación exponencial del ADNds. Logran esto al permitir una rápida regeneración de secuencias dirigibles en el ácido nucleico diana en presencia de filamentos dinámicos de recombinasa/ADN, en lugar de filamentos no dinámicos cargados de ATP-γ-S, y en un entorno que concomitantemente logra mantener una alta actividad de recombinación. Además, y de manera crítica, mientras que el concepto de alargamiento de los intermedios de recombinación se ha visitado anteriormente en concepto y práctica

limitada, tanto en el método de Zarling como en el laboratorio de Alberts (Formosa and Alberts, 1996; Morrical and Alberts, 1990; Morrical, Wong and Alberts 1991) y en otros lugares (Salinas, Jiang and Kodadek, 1995; Morel, Cherney, Ehrlich and Cassuto, 1997; Solicitud de Patente Internacional WO 02/086167, Benkovic and Salinas), ninguna de las descripciones hasta la fecha enseña un método práctico para permitir una amplificación exponencial del ADN con sensibilidad exquisita y específica con una capacidad de amplificación de hasta 10 a la potencia de 12 veces. Esto se debe a que establecer este entorno necesario que soporta una alta actividad de recombinasa/filamento, pero en presencia de grandes cantidades de las proteínas de unión a ADN de una sola cadena necesarias en un entorno *in vitro* ha resultado ser un gran desafío, y este entorno depende completamente de una estricta combinación de componentes. Esto incluye, de manera más crítica e inesperada, agentes de aglomeración muy específicos que alteran el comportamiento del sistema *in vitro* de una manera notable y esencialmente impredecible. Esta alteración notable y en gran medida impredecible del comportamiento del sistema con agentes específicos que ocupan volumen presumiblemente refleja su capacidad para generar cinéticas de tipo fractal, efectos de separación de fase u otras propiedades adicionales en el sistema bioquímico. Al identificar dichas condiciones precisas para permitir la amplificación rápida y altamente geométrica del ADN, así como las condiciones para impulsar una alta actividad de recombinación dinámica y persistente *in vitro* para otros usos, esta invención permite una nueva generación de técnicas moleculares *in vitro*. Nos referimos al método de amplificación descrito realizado bajo estas condiciones habilitadoras como Amplificación de Recombinasa polimerasa (RPA). Prevemos en el presente documento métodos adicionales basados en este entorno de recombinación dinámica, persistente y de alta actividad, que probablemente se pondrá en práctica a su debido tiempo. Esta especificación permite esta nueva generación de métodos y debe contrastarse con la circunstancia actual en la que, a pesar de décadas de investigación, ninguna otra aplicación ampliamente utilizada de recombinasas para tecnología *in vitro* ha aparecido aparte de un número muy limitado dependiente del uso de ATP-γ-S. El documento WO 03/072805 describe métodos llevados a cabo en ausencia de los agentes de aglomeración muy específicos mencionados anteriormente.

En esta especificación, se avanza más allá y se demuestra que las reacciones RPA se pueden integrar completamente con la detección dinámica de productos de reacción. Esto valida que las reacciones de RPA alcancen dos criterios generales para el análisis en tiempo real. Primero, un sensor bioquímico, como la detección de un colorante como SYBR verde o la 'tercera' sonda, es compatible con el entorno de reacción RPA. Dicha compatibilidad no es una suposición trivial porque RPA emplea cantidades saturadas de proteínas de unión a ADN, que podrían interferir con el comportamiento de unión de colorante o sonda. A la inversa, la unión de los colorantes o sondas a los ácidos nucleicos podría haber interferido con la actividad de las proteínas de unión al ADN. En segundo lugar, para ser empleado en aplicaciones cuantitativas en tiempo real, RPA tendría que demostrar la amplificación exponencial del ADN del ADN objetivo en un rango significativo de cantidades iniciales de la plantilla, y ser capaz de mantener la amplificación exponencial hasta concentraciones fácilmente dentro del rango de detección del sistema sensor general.

También en esta especificación, se revelan métodos para controlar y potencialmente sincronizar aspectos de las reacciones de RPA. En las configuraciones actuales de RPA no hay una separación temporal entre las fases de segmentación del ADN y la síntesis del ADN. Para RPA, es difícil asegurar que todas las reacciones en RPA se inicien exactamente en el mismo momento a menos que se suministre un reactivo limitante de la velocidad a todas las muestras simultáneamente, o que las reacciones se ensamblen a una temperatura no permisiva. Se sugieren métodos mediante los cuales se pueden iniciar reacciones RPA, y se pueden regular "rondas" individuales de actividad de cebado, limitando la invasión a estallidos cortos bien espaciados. Tales métodos para limitar la actividad de la recombinasa a explosiones limitadas cortas podrían mejorar la amplificación. Una forma de controlar la invasión de ADN en RPA puede ser regulando la concentración de ATP libre. En ausencia de suficiente ATP, o un exceso de ADP, los filamentos de recombinasa/ADN se desmontan y la recombinación se detiene. El ATP enjaulado no admite la carga de recA, pero posteriormente el material no enjaulado sí lo hace [Butler BC, Hanchett RH, Rafailov H, MacDonald G (2002) Investigando cambios estructurales inducidos por la unión de nucleótidos a RecA usando la diferencia FTIR. Biophys J 82(4): 2198-2210]. Por lo tanto, el uso de análogos de ATP enjaulados en reacciones de RPA, que pueden desprotegerse en pulsos de luz permitiendo así ráfagas de actividad de recombinasa, debería ser un medio eficaz para controlar la fase de invasión de una reacción de RPA. Alternativamente, la concentración de ATP podría controlarse cíclicamente mediante métodos alternativos, como la adición periódica de ATP a la reacción desde una fuente externa, o estableciendo un oscilador bioquímico capaz de generar aumentos periódicos de ATP en la reacción.

En esta especificación se amplía el conocimiento de cómo lograr una carga ideal de recombinasa/ADNss en virtud del diseño de secuencia 5', y se amplía el repertorio de contextos en los que se puede emplear este entorno de recombinación dinámica estable y clave además de las reacciones de amplificación de ADN. Se describen cómo esta composición única se puede usar para reemplazar los pasos de hibridación clásica en cualquier proceso que de otro modo requeriría fusión térmica o química, u otro método de dúplex, en una variedad de aplicaciones moleculares. En particular, el uso de entornos de recombinación dinámica estables en presencia de oligonucleótidos sintéticos será útil en combinación con otros sistemas enzimáticos distintos a los sistemas de polimerasa descritos anteriormente, debido a la falta de necesidad de fusión térmica o química, y la capacidad concomitante de emplear una gama más amplia de enzimas y evitar equipos de ciclos térmicos.

Resumen de la invención

Un método de amplificación de ADN, denominado RPA, comprende los siguientes pasos. Primero, un agente de recombinasa se pone en contacto con un primer y un segundo cebador de ácido nucleico para formar un primer y un

segundo cebador de nucleoproteínas. En segundo lugar, el primer y segundo cebadores de nucleoproteínas se ponen en contacto con una secuencia diana de doble cadena para formar una primera estructura de doble cadena en una primera parte de dicha primera cadena y forman una estructura de doble cadena en una segunda parte de dicha segunda cadena de manera que los extremos 3' de dicho primer cebador de ácido nucleico y dicho segundo cebador de ácido nucleico están orientados uno hacia el otro en una molécula de ADN de plantilla dada. En tercer lugar, el extremo 3' de dichos primer y segundo cebadores de nucleoproteínas se extienden mediante ADN polimerasas para generar primero y segundo ácidos nucleicos de doble cadena, y primera y segunda cadenas desplazadas de ácido nucleico. Finalmente, los pasos segundo y tercero se repiten hasta que se alcanza el grado de amplificación deseado.

También se describe un método de RPA anidadas. En un RPA anidada, una primera región de ácido nucleico se amplifica por RPA para formar una primera región amplificada. Luego, una segunda región de ácido nucleico que está completamente dentro de la primera región amplificada se amplifica utilizando RPA para formar una segunda región amplificada. Este proceso se puede repetir tantas veces como sea necesario. Por ejemplo, una tercera región de ácido nucleico, que está completamente dentro de la segunda región, puede amplificarse desde la segunda región amplificada por RPA. Además de la una, dos y tres rondas de RPA discutidas anteriormente, la divulgación contempla al menos 4, y preferiblemente al menos 5 rondas de RPA anidadas también.

También se describen métodos para detectar un genotipo usando RPA. Este método es útil para la genotipificación, para detectar una condición normal o enferma, una predisposición o la falta de una disposición para una enfermedad. Además, se puede utilizar RPA para detectar la presencia de un genoma, como, por ejemplo, un genoma de un patógeno. En este uso, el método es útil para el diagnóstico y detección.

La divulgación también detalla la naturaleza y las concentraciones de recombinasas, proteínas de unión de cadena sencilla, polimerasas y nucleótidos necesarios para establecer una reacción de amplificación efectiva. La divulgación proporciona además una habilitación detallada sobre la naturaleza del ADN objetivo, la longitud y la composición de los oligonucleótidos dirigidos, y la longitud óptima entre los oligonucleótidos para la amplificación en diversas condiciones. La divulgación proporciona la inclusión de componentes adicionales, o el uso de componentes modificados, que contribuyen al establecimiento de un sistema de amplificación por recombinación-polimerasa que es sensible, robusto y con propiedades óptimas de señal a ruido. En particular, se demuestra el uso de más de una especie de recombinasa, y se detalla la utilidad de los análogos diseñados y modificados de las recombinasas uvsX de E. coli recA y bacteriófago T4, de las polimerasas que incluyen el fragmento Klenow ADN polimerasa I de E. coli, polimerasa Bst, polimerasa Phi-29, Bacillus subtilis Pol I (Bsu), así como las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla de E. coli y T4 (la proteína gp32.

Se demuestra la utilidad de las formas de gp32 con cooperatividad alterada y/o propiedades de asimilación de cadenas. También se muestra el uso de la proteína T4 uvsY, y más particularmente de los agentes de aglomeración molecular, especialmente el compuesto PEG (también conocido como Carbowax 20M), para ayudar a establecer un entorno de reacción óptimo. Además, la presente divulgación detalla los efectos y el posible uso de otras enzimas involucradas en el metabolismo del ADN, incluidas las toposiomerasas, helicasas y nucleasas, para mejorar el comportamiento de la amplificación. La presente divulgación también incluye el uso de condiciones optimizadas para la invasión/extensión repetida de un cebador dirigido a una plantilla superenrollada o lineal para generar una amplificación lineal, y el uso de este método para la secuenciación de ADN. La presente divulgación también describe el uso de una recombinasa en la detección de un producto amplificado específico de una reacción dirigiendo los oligonucleótidos marcados de alguna manera a la especie de producto específica y midiendo un cambio en la apariencia o propiedad de los reactivos como consecuencia.

Esta divulgación también proporciona datos y métodos para mejorar la implementación del método RPA, en particular para aplicaciones de diagnóstico. El cuidadoso diseño de la longitud del oligonucleótido, la composición de la base y el uso de residuos de azúcar de la columna vertebral modificados sustentan las estrategias para las pruebas de alta sensibilidad y especificidad. También se describen métodos para combinar oligonucleótidos con distintas actividades como filamentos de nucleoproteínas para mejorar las relaciones de señal a ruido. También se describen métodos de detección de productos que evitan la electroforesis en gel, en algunos casos empleando oligonucleótidos específicos "terceros". Se divulga la constitución de un liofilizado activo que puede almacenarse a temperatura ambiente durante al menos 10 días y retenemos la actividad de amplificación cuando se reconstituye solo con muestra regulada.

También se describen datos de habilitación que permiten el uso del método RPA en aplicaciones cuantitativas en tiempo real. Se muestra que las diluciones apropiadas de los colorantes de unión a ácido nucleico fluorescentes SYBR verde o SYBR dorado son compatibles con las reacciones RPA y permiten el monitorización de la acumulación de productos. Los productos continúan acumulándose de manera aparentemente exponencial durante un tiempo suficiente para permitir la cuantificación después de que se alcancen los niveles de detección de umbral. Se muestra experimentalmente que el uso de este método RPA es cuantitativo en al menos cuatro o cinco órdenes de magnitud de la cantidad de plantilla inicial. El inicio simultáneo de muchas reacciones paralelas se logra estableciendo mezclas de reacción en hielo y luego cambiando simultáneamente las muestras a temperaturas de reacción (33-39°C). Alternativamente, las reacciones de RPA paralelas podrían iniciarse simultáneamente por otros medios, como la eliminación de residuos de ATP o los cebadores de oligonucleótidos enjaulados. Se detallan otros métodos de monitorización en tiempo real específicos del producto que pueden ser compatibles con el sistema RPA. También se describen la composición general de un dispositivo RPA en tiempo real compuesto por componentes de estado sólido

de baja potencia que podrían permitir una implementación portátil barata en contextos de laboratorio y diferentes de laboratorio.

También se describen métodos para controlar las reacciones de RPA, lo que se logra controlando la presencia de los cofactores de nucleósido trifosfato de soporte necesarios, como el ATP, durante períodos limitados durante la reacción. Si se utilizan trifosfatos de nucleótidos enjaulados químicamente, pueden generarse pulsos de ATP libre mediante iluminación con un estallido de luz definido correspondiente a la longitud de onda no segmentada del grupo de fotoprotección. El ATP liberado permitirá entonces la unión de las proteínas recombinasas al ADN de cadena sencilla (ADNss), y la posterior búsqueda de homología y la actividad de intercambio de cadenas de los complejos recombinasa- ADNss. Alternativamente, se puede añadir periódicamente ATP a la reacción. Con el tiempo, la concentración de ATP disminuirá como consecuencia de la hidrólisis, ya sea por hidrólisis por recombinasa o por hidrólisis por otros componentes de reacción específicamente agregados para hidrolizar el exceso de ATP y ADP. En consecuencia, después de un período de tiempo definido por la disminución en la concentración de ATP y/o un aumento en la concentración de ADP, las moléculas de recombinasa dejarán de funcionar y se disociarán del ADN. Los impulsos de luz subsiguientes en la longitud de onda sin jaulas se pueden administrar para liberar ATP nuevo, o se puede agregar ATP nuevo para reiniciar la actividad de recombinasa. De esta manera, se habilita una serie de periodos controlados de búsqueda de homología y cebado para que la iniciación del alargamiento se pueda realizar en fases.

Como un segundo método para controlar la fase de invasión de las reacciones de RPA, se describe un método para separar la actividad conducida por un cebador del otro. Este método utiliza la invasión mediada por recombinasa en un sitio diana del cebador y la finalización de la síntesis a partir de ese cebador. Esto generará un ADN desplazado de una sola cadena, que luego se puede usar como plantilla para un segundo cebador enfrentado que se modifica y, por lo tanto, es incapaz de soportar el inicio de la síntesis mediado por recombinasa. Esto evitará posiblemente conflictos que surjan a través de la colisión de polimerasas.

También se describen métodos para evaluar la naturaleza polimórfica de los productos amplificados sin una necesidad de fraccionamiento por tamaño. Se permite que los productos de la reacción de amplificación formen híbridos dúplex con sondas inmovilizadas de carácter inicialmente de cadena sencilla o de doble cadena mediante la acción de recombinasas y/o proteínas de unión a ADN de cadena sencilla y otras moléculas accesorias. Se describen métodos para desestabilizar los híbridos imperfectos formados entre los productos y las sondas, que se producen en un entorno dinámico de acción de la recombinasa y respaldan la actividad de una amplia variedad de componentes enzimáticos adicionales. Los híbridos productivos son detectados por uno de los muchos métodos estándar utilizados para revelar la presencia o ausencia de una interacción molecular.

Esta descripción también describe la combinación de las condiciones *in vitro* determinadas que soportan un entorno estable de recombinación dinámica persistente con otras actividades enzimáticas, permitiendo así que la invasión de la cadena y el emparejamiento entre ADNss y dúplex ocurran continuamente y en presencia de otras enzimas metabólicas, especialmente aquellas enzimas no termofílicas que serían necesarias en los métodos convencionales, así como otros procesos que no son equivalentes, o alcanzables, en un sistema que emplea la fusión térmica o química. También se describen hallazgos que mejoran el diseño de oligonucleótidos para permitir una alta actividad en sistemas de recombinación dinámica estables en virtud de incluir secuencias optimizadas dentro, y particularmente en el extremo 5' de las secuencias deseadas.

Otras realizaciones, objetos, aspectos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una representación esquemática de RecA/Carga de cebador.

Las Figuras 2A-2B representan un esquema de los pasos siguientes, que se muestran en los paneles (A) y (B), de la Amplificación de la Recombinasa polimerasa de Cadena Guía (IsRPA).

Las Figuras 3A-3D representan un esquema de los pasos siguientes, que se muestran en los paneles (A), (B), (C) y (D), de la Amplificación de la polimerasa recombinada de cadena guía y de retardo.

La Figura 4 muestra un ejemplo de cebadores anidados elegidos para RPA anidadas.

La Figura 5 representa ejemplos de ácidos nucleicos de plantilla de doble cadena adecuados.

Las Figuras 6A-6B representan en los paneles (a) y (b) las diversas orientaciones de los pares de cebadores RPA en la hibridación con el ácido nucleico diana.

Las figuras 7A-7C en los paneles (A), (B) y (C) representan una representación esquemática de una reacción de RPA en progreso.

Las Figuras 8A-8C representan (A) ejemplos de cebadores de doble cadena; (B) cebadores de doble cadena después del alargamiento y después del fusionamiento del segundo miembro de un par de cebadores; (C) después de la elongación del segundo miembro de un par de cebadores con la cadena no invasora desplazada.

La Figura 9 representa una investigación sobre la naturaleza de las dianas de ADN de doble cadena y los oligonucleótidos dirigidos. Los experimentos que utilizan plantillas superenrolladas o ADN lineales sugieren que recA cataliza la formación de intermedios capaces de soportar la elongación de la polimerasa más fácilmente en el ADN superenrollado o en los extremos del ADN linealizado. Se muestra el oligonucleótido Tester3bio (SEQ ID NO: 66).

La figura 10 representa la síntesis en retroceso. La síntesis en retroceso ocurre cuando un oligonucleótido dirigido recubierto con recA que posee un saliente 5' invade un extremo de ADN dúplex en presencia de una polimerasa adecuada y dNTPs. Esta nueva región dúplex es estable a la posterior migración de ramificaciones y puede utilizarse como plataforma para otras actividades. El avance, que es el alargamiento del oligonucleótido invasor, también puede ocurrir.

La figura 11 muestra los usos de la síntesis en retroceso. La síntesis en retroceso puede ser útil porque genera una estructura resistente a la migración de ramificación que se puede usar para una aplicación diferente a la del oligonucleótido normal. Aquí se muestran algunos ejemplos que incluyen la introducción de un sitio diana de enzima de corte, la introducción de un promotor de la ARN polimerasa y la generación lineal de fragmentos de ADNbc cortos a través de sucesivos eventos de invasión/síntesis/escisión.

La Figura 12 muestra que las proteínas de unión de cadena sencilla facilitan la invasión de recombinasa y la extensión del cebador. Tanto E. coli SSB como T4 gp32 con una etiqueta His N-terminal (gp32(N)) estimulan la invasión/elongación mediada por recA en una plantilla de ADN lineal.

La Figura 13 muestra el requisito de una longitud de oligonucleótido mínima o saliente para la invasión y el alargamiento durante la selección final de las plantillas lineales. Cuando el oligonucleótido invasor se dirige a los extremos de una plantilla linealizada, se necesita una longitud mínima de oligonucleótido, o se necesita un saliente para que ocurra la invasión/elongación.

La figura 14 muestra articulaciones paranémicas y pletonémicas. Descripción esquemática de la formación de articulaciones paranémicas y plectonémicas por eventos de recombinación que involucran extremos de ADN o secuencias incrustadas.

La figura 15 muestra el efecto de los agentes de aglomeración. Los agentes de aglomeración pueden alterar el comportamiento de reacción. En presencia de polietilenglicoles, gp32(N) y recA recombinasa, se pueden estimular múltiples eventos de invasión en plantillas individuales sin el requisito de un saliente de 5' en el oligonucleótido de direccionamiento.

La Figura 16 muestra la amplificación dirigida a un extremo utilizando una cadena RPA guía. Amplificación de un ADN diana utilizando oligonucleótidos dirigidos al extremo, proteína recA(C) y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E. coli.

La figura 17 muestra el RPA de la cadena principal y los límites de la capacidad de procesamiento de Klenow. Amplificación limitada de un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases cuando solo se utilizan 0.5 fmoles de la plantilla de inicio con la proteína recA, gp32(N) y el fragmento Klenow de E. coli. La fuerte acumulación de productos más cortos sugiere que la pobre capacidad de procesamiento de Klenow (10-50 nucleótidos) puede subyacer en la dependencia de la concentración de la reacción de la plantilla.

La Figura 18 representa la dependencia del espaciado de los cebadores RPA. Hay una longitud óptima de interoligonucleótidos para RPA cuando se utiliza el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E. coli. Se muestran las secuencias de la plantilla (SEQ ID NO: 67) y del saliente EcoRI (SEQ ID NO: 68).

La Figura 19 muestra productos RPA que son en gran parte de doble cadena. La reacción de RPA puede generar productos de ADN de doble cadena como lo demuestra la electroforesis en gel de agarosa y la escisión de enzimas de restricción.

La Figura 20 representa la actividad de un mutante de truncamiento C-terminal recA. La proteína recA mutante con una eliminación del péptido ácido C-terminal (recA(C)delta) puede promover el intercambio y la extensión de la cadena en un ensayo de ejecución de plantilla lineal.

La Figura 21 representa proteínas gp32 modificadas. Se muestra una representación esquemática de las proteínas del bacteriófago T4 gp32 utilizadas en este estudio y la posición de diversas modificaciones y mutaciones.

La Figura 22 representa la actividad de la proteína gp32. Las proteínas gp32 modificadas muestran una variedad de actividades en los ensayos lineales de invasión/ejecución.

La figura 23 muestra la invasión y extensión usando uvsX. La proteína uvsX modificada con una etiqueta His C terminal (uvsX(C)), o una eliminación adicional del péptido ácido C-terminal, estimula la invasión/extensión en un ensayo lineal de plantilla lineal.

La Figura 24 muestra la RPA utilizando uvsX(C). La recombinasa modificada uvsX(C) puede soportar la amplificación de ADN en presencia de gp32(N), el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E. coli y el polietilenglicol (PEG).

La Figura 25 muestra gp32 de tipo salvaje versus modificado. La versión modificada de gp32, gp32(C) es cualitativamente diferente de la gp32 sin etiquetar de tipo salvaje.

La Figura 26 muestra la titulación de gp32 y el efecto de uvsY. La titulación de gp32 revela un requisito para una cantidad mínima de gp32, y un requisito para la proteína uvsY(N) cuando se emplea gp32 sin etiquetar.

La figura 27 muestra factores que afectan la velocidad de reacción y el ruido. Se muestra una representación esquemática de los factores que afectan el comportamiento de la reacción, en particular la velocidad de reacción y el ruido. Se sugieren los efectos e interacciones previstos de gp32, uvsX, UvsY y PEG, con la conclusión de que debe alcanzarse un equilibrio óptimo entre la velocidad de reacción y el ruido.

La figura 28 muestra los efectos de PEG. El PEG puede reducir la longitud promedio de los productos lineales de invasión/ejecución en un experimento de ejecución lineal mediado por uvsX en presencia de gp32(C).

La figura 29 representa la invasión dirigida al final del ADN. Se muestra un esquema que describe los posibles resultados de los eventos de invasión dirigida al final.

La figura 30 muestra la RPA en una muestra compleja. La amplificación de dianas de ADN específicas del ADN genómico humano.

La Figura 31 representa la sensibilidad de la RPA. La sensibilidad de la amplificación de dianas de ADN específicas del ADN genómico humano.

La Figura 32 muestra la sensibilidad de RPA y los artefactos independientes de la plantilla. La sensibilidad de la amplificación de dianas de ADN específicas del ADN genómico humano y la existencia de artefactos de cebador independientes de la plantilla en competencia.

La figura 33 muestra cómo pueden surgir artefactos de cebador. Se muestra una representación esquemática del posible mecanismo por el cual pueden surgir artefactos de cebador.

La figura 34 representa la supresión de artefactos de cebador. En el esquema se muestran los métodos para suprimir los artefactos de cebador.

La Figura 35 muestra el uso de oligonucleótidos en horquilla para estimular el autocebado de las cadenas desplazadas. Se muestra un diagrama esquemático de una amplificación que utiliza oligonucleótidos de horquilla autocomplementarios deliberadamente para estimular el autocebado de las cadenas desplazadas.

La Figura 36 muestra las condiciones que permiten una amplificación sin ruido altamente eficiente de fuentes de ADN complejas. La sensibilidad de la amplificación de dianas de ADN específicas del ADN genómico humano en condiciones optimizadas que reducen o eliminan artefactos de cebador.

La Figura 37 representa una representación esquemática del método RPA como se muestra en (A), (B) y (C).

La Figura 38 muestra (A) marcadores STR de dos individuos (1 y 2, padre e hijo) amplificados con pares de cebadores para siete marcadores independientes que utilizan condiciones RPA C4; (B) Titulación de los componentes de la reacción para determinar las concentraciones que apoyan la amplificación *in vitro*.

La Figura 39 muestra (A) Límites de tamaño de las reacciones de RPA; (B) Eficiencias de alargamiento de secuencias integradas o finales; (C) Sensibilidad de las reacciones de RPA; (D) ADN humano del número de copia indicado amplificado con los cebadores ApoB4 y Apo300 generando un fragmento de 300 pb en condiciones C2; (E, F) ADN humano de individuos individuales amplificados con los cebadores D18S51 5' y 3'. Las condiciones empleadas fueron C2 en (E) y C4 en (F).

La Figura 40 muestra la especificidad de las reacciones de RPA para: (A) los cebadores BsA3 y BsB3, que amplifican un fragmento de 380 pb en condiciones C3. Un asterisco indica la posición del producto de reacción esperado, y una flecha indica la posición del ADN genómico; (B, C) Oligonucleótidos Apo600bio y Apo300rev que generan un fragmento de 345 pb en condiciones C4; (D) Mezclas de componentes de reacción ensamblados en ausencia de los componentes indicados, PEG y regulador. Se indican los cebadores utilizados. El ADN objetivo era ADN genómico masculino humano a 150 copias /µl; (E) Oligonucleótidos que se dirigen a tres loci independientes en ADN genómico humano incubados con pares de cebadores superpuestos de 25, 28 o 32 bases, según se indique.

Figura 41 Ruido del cebador en el número de copia objetivo bajo. Se muestran las consecuencias de reducir la densidad de copia inicial de un objetivo en una reacción RPA típica.

Figura 42 Selección de cebadores óptimos combinando una selección de cebadores directos e inversos candidatos y probando el resultado a densidades de copia de inicio muy bajas.

Figura 43 Consideración teórica de cómo se inicia el ruido del cebador.

Figura 44 Estrategias de mejora de oligonucleótidos - resumen de tres esquemas generales.

Figura 45 Consecuencias de reducir la longitud del cebador: los cebadores cortos dan menos producto, pero aún pueden retener la actividad a menos de 30 residuos.

Figura 46 Los ácidos nucleicos bloqueados pueden funcionar en RPA y exhibir diferencias significativas en la acumulación de producto, la acumulación de ruido y el requisito de concentración de polimerasa.

Figura 47 La adición de estiramientos homopoliméricos a los extremos 5' de los cebadores puede alterar la actividad de las nucleoproteínas.

Figura 48 La betaína reduce los niveles de producto y ruido.

Figura 49 Estrategias de combinación en las que se combinan filamentos de nucleoproteínas con actividades diferenciales.

Figura 50 Formatos de detección que incorporan un 'tercer' cebador para el enriquecimiento del producto.

Figura 51 Captura de cuentas I. Esquema de la estrategia experimental en la que una tercera sonda enriquece los productos bona fide derivados del objetivo.

Figura 52 Captura de cuentas II. Resultados experimentales que demuestran que un filamento de nucleoproteínas de baja actividad inmovilizado en un soporte sólido puede participar como tercer cebador y separar los amplicones objetivo del ruido del cebador.

Figura 53 La trehalosa estabiliza los liofilizados para permitir que todos los componentes, excepto la muestra regulada, permanezcan activos durante al menos 10 días a temperatura ambiente.

Figura 54 Colorantes de unión al surco menor SYBR verde y SYBR dorado pueden incluirse en las reacciones RPA y detectarán la acumulación de productos de reacción de ADN.

Figura 55 El uso del colorante SYBR verde para la evaluación cuantitativa del número de copias del ADN genómico de Bacillus subtilis puede realizarse en cuatro órdenes de magnitud.

Figura 56 Mediante la evaluación cuantitativa del colorante SYBR verde del número de copias del ADN genómico de Bacillus subtilis se puede realizar en al menos cinco órdenes de magnitud.

Figura 57 RPA cuantitativo en tiempo real responde de manera excelente a la titulación del ADN genómico humano.

Figura 58 La presencia de burbujas de una sola cadena en una sonda imperfecta: los híbridos objetivo conducen a una mejora de la ruptura dúplex general en un entorno de recombinación dinámica.

Figura 59 La hibridación de los amplicones a una serie de sondas de polimorfismo de longitud potencial en un entorno de recombinación dinámica conduce al enriquecimiento de híbridos de coincidencia perfecta o casi perfecta en comparación con la hibridación clásica o el entorno de recombinación no dinámica.

La Figura 60 RPA de transcripción inversa de un solo tubo (RT-RPA) muestra una alta sensibilidad sin una optimización significativa

La Figura 61 dUTP puede incluirse en las reacciones de RPA para reemplazar total o parcialmente el dTTP, lo que proporciona un mecanismo para desarrollar un control efectivo de la contaminación.

Figura 62 Una estrategia para controlar la contaminación por arrastre en reacciones RPA.

Figura 63 Formato de un ensayo de RPA independiente para determinar la presencia de un ácido nucleico específico que comprende una bolsa de amplificación desechable y una tira de flujo lateral para detectar una amplificación exitosa.

Figura 64 La compatibilidad de RPA con lisados crudos de sangre humana indica la posibilidad de que se puedan evitar preparaciones de muestras sofisticadas para muchas muestras.

Figura 65 Utilidad del análisis de RPA en tiempo real para optimizar el entorno de reacción; concentraciones de sal y PEG.

Figura 66 Utilidad del análisis de RPA en tiempo real para optimizar el entorno de reacción; concentraciones de magnesio.

Figura 67 Las secuencias de cebadores afectan el comportamiento de la tasa de amplificación - el análisis preliminar sugiere que los cebadores 'rápidos' pueden asociarse con un bajo contenido de G y un alto contenido de C o C/T.

Figura 68 Utilidad del análisis de RPA en tiempo real para optimizar el ambiente de reacción; las secuencias 5' heterólogas adjuntas a los oligonucleótidos influyen en el comportamiento de la reacción.

Figura 69 Utilidad del análisis de RPA en tiempo real para optimizar el entorno de reacción; las secuencias 5' heterólogas agregadas a los oligonucleótidos influyen en el comportamiento de la reacción; no todas las secuencias 5' ricas en pirimidina conducen a un comportamiento cinético excelente.

Figura 70 Utilidad del análisis de RPA en tiempo real para optimizar el entorno de reacción; las secuencias 5' heterólogas adjuntas a los oligonucleótidos influyen en el comportamiento de la reacción, no todas las secuencias 5' ricas en pirimidina conducen a un comportamiento cinético excelente.

Figura 71 Se pueden emplear las llamadas 'terceras sondas' para monitorizar las reacciones de RPA y aumentar la especificidad. Enzimas candidatas para procesar dúplex específicos que contienen el objetivo y la sonda.

Figura 72 Las enzimas que reconocen características anormales como las distorsiones de hélice y las bases dañadas/sitios abásicos se pueden emplear para procesar híbridos de sonda/objetivo.

Figura 73 Las sondas fluorescentes demuestran propiedades significativamente diferentes en el entorno RPA en comparación con los entornos estándar utilizados en otras reacciones de amplificación.

Figura 74 Una sonda que contiene un residuo de tetrahidrofuranilo cortada y extendida de manera eficiente en un entorno RPA que contiene el objetivo amplificado, la enzima Nfo de E. coli y la polimerasa.

Figura 75 Una sonda que contiene un residuo de tetrahidrofuranilo, cortada y extendida de manera eficiente, rápida y específicamente en un entorno RPA que contiene el objetivo amplificado, la enzima Nfo de E. coli y las polimerasas.

Figura 76 Ejemplos de diseño de sondas para estudios de RPA en tiempo real utilizando la enzima Nc de E. coli.

Descripción detallada de la invención

La presente descripción proporciona la amplificación de la polimerasa con recombinasa (RPA), un método para la amplificación de polímeros de ácidos nucleicos diana. También proporciona un entorno *in vitro* general en donde la alta actividad de recombinasa se mantiene en un entorno de recombinación altamente dinámico, soportado por ATP. Uno de los beneficios de RPA es que puede realizarse sin la necesidad de fusión térmica de las plantillas de doble cadena. Por lo tanto, también se elimina la necesidad de termociclizadores costosos. La presente divulgación describe dos estrategias relacionadas mediante las cuales RPA puede configurarse para permitir la amplificación exponencial de los polímeros de ácidos nucleicos diana.

Amplificación de la recombinasa polimerasa de cadena principal (IsRPA)

En la cadena principal, la amplificación de la polimerasa con recombinasa (IsRPA), de cadena sencilla o parcialmente de cadena sencilla, los cebadores de ácido nucleico se dirigen a secuencias homólogas de doble cadena o parcialmente de doble cadena que utilizan agentes de recombinasa, que formarían estructuras de Bucle D. Los cebadores de cadena sencilla invasores, que forman parte de los bucles D, se utilizan para iniciar reacciones de síntesis de polimerasa. Una sola especie de cebador amplificará una secuencia de ácido nucleico diana a través de múltiples rondas de invasión de doble cadena seguida de síntesis. Si se utilizan dos cebadores opuestos, se puede lograr la amplificación de un fragmento (la secuencia de destino). LsRPA se describen brevemente en las Figuras 1 y 2.

La secuencia diana por amplificar, en cualquiera de los métodos, es preferiblemente un ADN de doble cadena. Sin embargo, los métodos descritos en el presente documento no se limitan a ADN de doble cadena, ya que un experto en la materia puede convertir otras moléculas de ácido nucleico, como un ADN o ARN de cadena sencilla, en un ADN de doble cadena utilizando métodos conocidos. El ADN diana de doble cadena adecuado puede ser un ADN genómico o un ADNc. Un RPA puede amplificar un ácido nucleico diana al menos 10 veces, preferiblemente al menos 100 veces, más preferiblemente al menos 1000 veces, incluso más preferiblemente al menos 10 000 veces, y lo más preferiblemente al menos 1 000 000 veces.

La secuencia diana se amplifica con la ayuda de agentes de recombinasa. Un agente de recombinasa es una enzima que puede recubrir el ADN de cadena sencilla (ADNss) para formar filamentos, que luego pueden escanear el ADN de doble cadena (ADNds) en busca de regiones de homología de secuencia. Cuando se localizan secuencias

homólogas, la cadena de filamentos de nucleoproteínas (que comprende el agente de recombinasa) invade el ADNds creando un híbrido corto y una burbuja de cadena desplazada conocida como Bucle D. Los agentes de recombinasa adecuados incluyen la proteína RecA de E. coli, la proteína uvsX T4 o cualquier proteína homóloga o complejo proteico de cualquier phyla. Los homólogos de RecA eucarióticos se denominan generalmente Rad51 después del primer miembro de este grupo en identificarse. Se pueden utilizar otros agentes de recombinasa no homólogos en lugar de RecA, por ejemplo, como RecT o RecO. Los agentes de recombinasa generalmente requieren la presencia de ATP, ATPγS u otros nucleósidos trifosfatos y sus análogos. Se prefiere que los agentes de recombinasa se utilicen en un entorno de reacción en donde la regeneración de los sitios de orientación pueda ocurrir poco después de una ronda de síntesis estimulada por el Bucle D. Los eventos de recombinación completados que involucran el desensamblaje de recombinasa evitarán un estancamiento de la amplificación o una amplificación lineal muy ineficiente de ADNSs causada por la síntesis de un solo lado oscilante de un extremo al otro.

Naturalmente, cualquier derivado y análogo funcional del agente de recombinasa anterior también puede funcionar como un agente de recombinasa y estos derivados y análogos también se contemplan como realizaciones de la invención. Por ejemplo, se puede usar un pequeño péptido de recA, que se ha demostrado que retiene algunos aspectos de las propiedades de recombinación de recA. Este péptido comprende los residuos 193 a 212 de recA de E. coli y puede mediar el emparejamiento de oligos de cadena sencilla (Oleg N. Voloshin, Lijang Wang, R. Daniel Camerini-Otero, Homologous DNA pairing Promoted by a 20-amino Acid Peptide Derived from RecA. Science Vol.272 10 de mayo de 1996).

Dado que el uso de ATPγS da como resultado la formación de complejos estables Agente de recombinasa/ADNds que probablemente son incompatibles con una amplificación eficiente, es preferible usar ATP y enzimas auxiliares para cargar y mantener los complejos de cebador Agente de recombinasa/ADNss. Alternativamente, las limitaciones del uso de ATPγS pueden superarse mediante el uso de componentes de reacción adicionales capaces de eliminar recA unido a ATPγS de complejos de intercambio. Este papel puede ser jugado por helicasas como el complejo RuvA/RuvB.

Los términos "polímero de ácido nucleico" o "ácidos nucleicos" tal como se usan en esta descripción pueden interpretarse ampliamente e incluyen ADN y ARN, así como otras moléculas de tipo ácido nucleico que se hibridan, como las que tienen esqueletos sustituidos, por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos de esqueleto morfolino, ácidos nucleicos bloqueados u otros ácidos nucleicos con bases modificadas y azúcares.

Estructuralmente similares al ARN, los monómeros de LNA son compuestos bicíclicos que llevan un enlazador de metileno que conecta el oxígeno 2' del anillo de azúcar del nucleótido a su carbono 4'. Los polímeros LNA obedecen las reglas estándar de apareamiento de bases, pero sus propiedades físicas los hacen adecuados para aplicaciones de discriminación de desajuste. Los LNA están disponibles en Exiqon (Dinamarca) o Proligo (Estados Unidos, Colorado).

En un método para realizar una RPA, el método comprende dos pasos. En el primer paso, los siguientes reactivos se combinan en una reacción: (1) al menos una recombinasa; (2) al menos una proteína de unión a ADN de cadena sencilla; (3) al menos una ADN polimerasa; (4) dNTPs o una mezcla de dNTPs y ddNTPs; (5) un agente de aglomeración; (6) un regulador; (7) un agente reductor; (8) ATP o ATP análogo; (9) al menos una proteína de carga de recombinasa; (10) un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador; y (11) una molécula de ácido nucleico diana. En el segundo paso, los reactivos se incuban hasta lograr el grado de amplificación deseado.

La recombinasa puede ser uvsX, recA o una combinación de ambas. La recombinasa también puede comprender una eliminación C terminal de residuos ácidos para mejorar su actividad. Aunque se puede usar cualquier concentración de recombinasa descrita en la especificación, las concentraciones de recombinasa preferidas pueden estar, por ejemplo, en el intervalo de 0.2 a 12 µM. 0.2-1 µM, 1-4 µM, 4-6 µM y 6-12 µM.

La proteína de unión a ADN de cadena sencilla puede ser la E. coli SSB o la T4 gp32 o un derivado o una combinación de estas proteínas. El derivado de gp32 puede incluir, al menos, gp32(N), gp32(C), gp32(C) K3A, gp32(C) R4Q, gp32(C)R4T, gp32K3A, gp32R4Q, gp32R4T y una combinación de los mismos (véase figuras 13). La proteína de unión al ADN puede estar presente en una concentración de entre 1 µM y 30 µM.

La ADN polimerasa puede ser una polimerasa eucariota. Ejemplos de polimerasas eucariotas incluyen pol-α, pol-β, pol-δ, pol-ε y derivados y combinaciones de los mismos. Ejemplos de polimerasa procariota incluyen E. coli ADN polimerasa I Fragmento Klenow, bacteriófago T4 gp43 ADN polimerasa, Bacillus stearothermophilus polimerasa I fragmento grande, Phi-29 ADN polimerasa, T7 ADN polimerasa, Bacillus subtilis Pol I, E. coli ADN polimerasa I, E. coli ADN polimerasa II, ADN polimerasa III de E. coli, ADN polimerasa IV de E. coli, ADN polimerasa V de E. coli y derivados y combinaciones de los mismos. En un caso preferido, la ADN polimerasa está en una concentración de entre 10000 unidades/ml a 10 unidades/ml, tal como entre 5000 unidades/ml a 500 unidades/ml. En otra realización preferida, la ADN polimerasa carece de actividad exonucleasa 3'-5'. En otra realización preferida, la ADN polimerasa contiene propiedades de desplazamiento de cadena.

Se entiende que cualquiera de las proteínas mencionadas en la invención incluye también su derivado. Estas proteínas incluyen al menos lo siguiente: recombinasas, polimerasa, proteína de carga de recombinasa, proteína de unión a

ADN de cadena sencilla, agentes accesorios, agente estabilizador de filamentos de nucleoproteína RecA/ADNss y similares. El derivado de estas proteínas incluye, al menos, una proteína de fusión que comprende una etiqueta del término C, una etiqueta del término N o etiquetas del extremo C y N. Ejemplos no limitantes de etiquetas de secuencia adecuadas incluyen 6-histidina (6X-His; HHHHHH; SEQ ID NO: 69), epítopo c-myc (EQKLISEEDL; SEQ ID NO: 70), octapéptido FLAG® (DYKDDDDK; SEQ ID NO: 71), proteína C (EDQVDPRLIDGK; SEQ ID NO: 72), Tag-100 (EETARFQPGYRS; SEQ ID NO: 73), epítopo V5 (GKPIPNPLLGLDST; SEQ ID NO: 74), VSV-G (YTDIEMNRLGK, SEQ ID NO: 74). 75), Xpress (DLYDDDDK; SEQ ID NO: 76) y hemaglutinina (YPYDVPDYA; SEQ ID NO: 77). Ejemplos no limitantes de etiquetas de proteínas adecuadas incluyen β-galactosidasa, tiorredoxina, tiorredoxina de parche His, dominio de unión a IgG, dominio de unión a inteína-quitina, gen T7 10, glutatión-S-transferasa (GST), proteína verde fluorescente (GFP), y la proteína de unión a la maltosa (MBP). Los expertos en la técnica entenderán que las etiquetas de secuencia y las etiquetas de proteínas se pueden usar indistintamente, por ejemplo, con fines de purificación y/o identificación. En consecuencia, como se usa en este documento, los términos "etiqueta His" y "etiqueta hexahistidina" abarcan todas las etiquetas de secuencia y etiquetas de proteínas adecuadas como se conoce en la técnica y se indica en este párrafo.

Los dNTP incluyen, por ejemplo, dATP, dGTP, dCTP y dTTP. En la cadena anterior y rezagada, también se pueden incluir RPA, ATP, GTP, CTP y UTP para la síntesis de cebadores de ARN. Además, los ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddGTP y ddGTP) se pueden usar para generar escalas de fragmentos. El dNTP se puede usar a una concentración de entre 1 µM y 200 µM de cada especie de NTP. Se puede usar una mezcla de dNTP y ddNTP con concentraciones de ddNTP de 1/100 a 1/1000 de la del dNTP (1 µM a 200 µM).

Los agentes de aglomeración utilizados en RPA incluyen polietilenglicol (PEG), dextrano y ficoll. El agente de aglomeración puede estar en una concentración de entre el 1% y el 12% en volumen o del 1% al 12% en peso de la reacción. Si bien todos los PEG son útiles, los PEG preferidos incluyen PEG1450, PEG3000, PEG8000, PEG10000, peso molecular del compuesto de PEG de 15000 a 20,000 (también conocido como Carbowax 20M), y una combinación de los mismos.

La solución reguladora en una RPA puede ser un regulador Tris-HCl, un regulador Tris-Acetato, o una combinación de los mismos. Los reguladores pueden estar presentes en una concentración de entre 10 y 100 mM. El pH regulado puede estar entre 6.5 y 9.0. El regulador puede contener además iones de Mg (por ejemplo, en forma de acetato de Mg) a una concentración de 1 a 100 mM, siendo preferida una concentración de entre 5 a 15 mM. Una concentración de Mg preferida es 10 mM (concentración de Mg o concentración de acetato de Mg).

Los agentes reductores para uso incluyen DTT. La concentración de DTT puede estar entre 1 mM y 10 mM.

El ATP o el análogo de ATP puede ser cualquiera de ATP, ATP-γ-S, ATP-β-S, ddATP o una combinación de los mismos. Una concentración de análogo de ATP o ATP preferida es entre 1 y 10 mM. La proteína de carga de recombinasa puede incluir, por ejemplo, T4uvsY, E. coli recO, E. coli recR y derivados y combinaciones de estas proteínas. Una concentración preferida de estas proteínas es entre 0.2 y 8 µM.

Los cebadores usados pueden estar hechos de ADN, ARN, ANP, LNA, ácido nucleico de la cadena principal de morfolino, ácido nucleico de la cadena principal de fosforotiorato y una combinación de los mismos. Las combinaciones de los mismos en esto pueden referirse a moléculas de ácido nucleico individuales que pueden contener una o más de una base conectada a una o más de otra base. La concentración preferida de estas moléculas puede estar en el rango de entre 25 nM y 1000 nM. En una realización preferida, los cebadores pueden contener un enlace no fosfato entre las dos bases en su extremo 3' y es resistente a la actividad de nucleasa 3' a 5'. En otra realización, los cebadores pueden contener un ácido nucleico bloqueado en su base final 3' o penúltima base 3'. Por ejemplo, en un ácido nucleico de la secuencia 5'-AGT-3', la T es la base definitiva de 3' y la G es la penúltima base de 3'. Los cebadores pueden tener al menos 20 bases de longitud o al menos 30 bases de longitud. En un caso preferido, los cebadores tienen entre 20 y 50 bases de longitud. En otro ejemplo preferido, los cebadores tienen entre 20 y 40 bases de longitud, tal como entre 30 y 40 bases de longitud.

Los cebadores pueden contener una secuencia 5' adicional que no es complementaria del ácido nucleico diana. Esta secuencia 5' puede contener, por ejemplo, un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción. Los cebadores pueden ser parcialmente de doble cadena con un extremo 3' de cadena sencilla.

Además, cualquier ácido nucleico de cualquiera de los métodos puede marcarse con un marcador detectable. Una etiqueta detectable incluye, por ejemplo, un fluorocromo, una enzima, un inactivador de fluorescencia, un inhibidor de enzima, una etiqueta radioactiva y una combinación de los mismos.

El ácido nucleico diana puede ser de cadena sencilla o de doble cadena. Se sabe que los ácidos nucleicos de cadena sencilla se convertirían en ácidos nucleicos de doble cadena en los métodos de la especificación. El ácido nucleico diana puede ser superenrollado o lineal. La secuencia por amplificar (ácido nucleico diana) puede estar entre otras secuencias. La secuencia por amplificar también puede estar en un extremo de un ácido nucleico lineal. En una realización, el ácido nucleico diana es lineal y no está conectado a ácidos nucleicos no diana. En otras palabras, cuando el ácido nucleico diana es lineal, puede estar en cualquiera de los siguientes formatos:

1. [ácido nucleico no diana]-[ácido nucleico diana]-[ácido nucleico no diana]

2. [ácido nucleico no diana]-[ácido nucleico diana]

3. [ácido nucleico diana]-[ácido nucleico no diana]

4. [ácido nucleico diana]

Debe observarse que la disposición anterior pretende representar tanto ácidos nucleicos de cadena sencilla como ácidos nucleicos de doble cadena. “1” se puede describir como una molécula de ácido nucleico diana que es lineal con dos extremos y en la que ambos extremos están unidos a una molécula de ácido nucleico no diana. “2” se puede describir como una molécula de ácido nucleico diana que es lineal con dos extremos y en la que un extremo está unido a una molécula de ácido nucleico no diana. “3” se puede describir como una molécula de ácido nucleico diana que es una molécula de ácido nucleico lineal (sin ácido nucleico no diana).

En otra realización, el ácido nucleico diana puede ser un ácido nucleico de cadena sencilla que se convierte en un ácido nucleico de doble cadena mediante una polimerasa o un ácido nucleico de doble cadena desnaturalizado por la acción del tratamiento térmico o químico.

El ácido nucleico diana puede ser de cualquier concentración, tal como menos de 10000 copias, menos de 1000 copias, menos de 100 copias, menos de 10 copias o 1 copia en una reacción. Un volumen de reacción puede ser 5 µl, 10 µl, 20 µl, 30 µl, 50 µl, 75 µl, 100 µl, 300 µl, 1 ml, 3 ml, 10 ml, 30 ml, 50 ml o 100 ml.

La reacción puede incubarse entre 5 minutos y 16 horas, tal como entre 15 minutos y 3 horas o entre 30 minutos y 2 horas. La incubación se puede realizar hasta que se alcance un grado de amplificación deseado. El grado de amplificación deseado puede ser de 10 veces, 100 veces, 1000 veces, 10000 veces, 100.000 veces o 1000000 veces. La temperatura de incubación puede estar entre 20°C y 50°C, entre 20°C y 40°C, tal como entre 20°C y 30°C. Una ventaja de los métodos es que la temperatura no es crítica y el control preciso, aunque es preferible, no es absolutamente necesario. Por ejemplo, en un entorno de campo, es suficiente mantener el RPA a temperatura ambiente o cerca de la temperatura corporal (35°C a 38°C) colocando la muestra en una grieta corporal. Además, el RPA se puede realizar sin la fusión inducida por la temperatura del ácido nucleico plantilla.

En otro ejemplo de la especificación, RPA comprende además agentes accesorios. Estos agentes accesorios incluyen helicasa, topoisomerasa, resolvasa y una combinación de los mismos que poseen actividades de desenrollado, relajación y resolución, respectivamente, sobre el ADN. Los agentes accesorios también pueden incluir RuvA, RuvB, RuvC, RecG, PriA, PriB, PriC, DnaT, DnaB, DnaC, DnaG, DnaX, complejo de núcleo de polimerasa, ADN ligasa y una pinza deslizante y una combinación de los mismos. La reivindicación de deslizamiento puede ser la pinza deslizante de dímero β de E. coli, la pinza deslizante de PCNA eucariota o la pinza deslizante de T4 gp45 y una combinación de las mismas. Los agentes accesorios pueden incluir, además, el complejo de holoenzima ADN polimerasa III que consiste en una pinza β, un cargador de pinza DnaX y el complejo núcleo de polimerasa. Estos últimos agentes accesorios permitirían el desempeño de RPA guía y retrasado.

En otro caso, el RPA se puede realizar en presencia de un agente estabilizador de filamentos de nucleoproteína RecA/ADNss. Ejemplos de dicha estabilización incluyen RecR, RecO, RecF y una combinación de los mismos. Estos agentes estabilizantes pueden estar presentes en una concentración de entre 0.01 µM y 20 µM. Otros ejemplos de agentes estabilizadores incluyen la proteína T4 uvsY que estabiliza los complejos nucleoproteiun uvsX/ADNss.

Otros componentes de RPA incluyen un sistema para la regeneración de ATP (convertir ADP en ATP). Dicho sistema puede ser, por ejemplo, fosfocreatina y creatina quinasa.

La reacción RPA también puede incluir un sistema para regenerar ADP a partir de AMP y para convertir pirofosfato en fosfato (pirofosfato).

En un caso preferido, la reacción de RPA como se enumera anteriormente se realiza con componentes de E. coli completamente utilizando recA, SSB, recO, recR y polimerasa de E. coli.

En otro caso preferido, la reacción de RPA se realiza con componentes de T4 usando uvsX, gp32, uvxY y T4 polimerasa.

En una realización preferida, la RPA se puede realizar combinando los siguientes reactivos: (1) una recombinasa uvsX a una concentración de entre 0.2 a 12 µM; (2) una proteína de unión a ADN de cadena sencilla gp32 a una concentración entre 1 y 30 µM; (3) un fragmento grande de ADN polimerasa I de Bacillus subtilis (Bsu polimerasa) a una concentración entre 500 y 5000 unidades por ml; (4) Dntp o una mezcla de Dntp y ddNTP a una concentración entre 1-300 µM; (5) polietilenglicol en una concentración de entre el 1% y el 12% en peso o en volumen; (6) regulador de trisacetato en una concentración de entre 1 Mm y 60 Mm; (7) DTT a una concentración de entre 1 Mm y 10 Mm; (8) ATP en una concentración de entre 1 Mm y 10 Mm; (9) uvsY a una concentración de entre 0.2 µM a 8 µM; (10) un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador, en donde dichos cebadores están en una concentración de entre 50 Nm y 1 µM; y (11) una molécula de ácido nucleico diana de al menos una copia. Una vez ensamblada la reacción, se incuba hasta lograr el grado deseado de amplificación. Esto ocurre generalmente dentro de 2 horas, preferiblemente dentro de 1 hora, tal como, por ejemplo, en 50 minutos.

Una ventaja de la invención es que los reactivos para RPA, con la posible excepción del agente de aglomeración y el regulador, pueden secarse por congelación (es decir, liofilizarse) antes de su uso. Los reactivos liofilizados ofrecen la ventaja de no requerir refrigeración para mantener la actividad. Por ejemplo, un tubo de reactivos RPA se puede almacenar a temperatura ambiente. Esta ventaja es especialmente útil en condiciones de campo donde el acceso a la refrigeración es limitado.

En un caso, los reactivos RPA se pueden liofilizar sobre el fondo de un tubo, o sobre una perla (u otro tipo de soporte sólido). Para realizar una reacción de RPA, los reactivos se reconstituyen en una solución reguladora y con un reactivo de aglomeración, o simplemente una solución regulada o agua, dependiendo de la composición de los reactivos liofilizados. Luego se agrega un ácido nucleico diana, o una muestra que se sospecha que contiene un ácido nucleico diana. El líquido de reconstitución también puede contener la muestra de ADN. La reacción reconstituida se incuba durante un período de tiempo y se detecta el ácido nucleico amplificado, si está presente.

La detección se puede realizar utilizando cualquier método, como, por ejemplo, el uso de electroforesis en un gel de agarosa o PAGE seguido de tinción con bromuro de etidio.

En cualquiera de las realizaciones de la invención, los reactivos que se pueden liofilizar antes del uso incluirían, al menos, la recombinasa, la proteína de unión a ADN de cadena sencilla, la ADN polimerasa, los Dntp o la mezcla de Dntp y ddNTP, el agente reductor, el ATP o el análogo de ATP, la proteína de carga de recombinasa y el primer cebador y, opcionalmente, un segundo cebador o una combinación de cualquiera de estos.

En una realización preferida, los reactivos se ensamblan combinando los reactivos de manera que cuando se reconstituyan, tendrán las siguientes concentraciones: (1) una recombinasa uvsX a una concentración de entre 0.2 y 12 µM; (2) una proteína de unión a ADN de cadena sencilla gp32 a una concentración entre 1 y 30 µM; (3) una T4 gp43 ADN polimerasa o Bsu polimerasa en una concentración entre 500 y 5000 unidades por ml; (4) Dntp o una mezcla de Dntp y ddNTP a una concentración entre 1-300 µM; (5) DTT a una concentración de entre 1 Mm -10 Mm; (6) ATP en una concentración de entre 1 Mm – 10 Mm; (7) uvsY a una concentración de entre 0.2 µM -8 µM. Opcionalmente, se puede agregar un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador donde su concentración estaría entre 50 Nm y 1 µM cuando se reconstituya. Los reactivos se liofilizan antes de su uso. Agentes estabilizantes como el azúcar trehalosa pueden incluirse en la mezcla liofilizada, por ejemplo, de 20 Mm a 200 Mm y lo más óptimo de 40 Mm a 80 Mm en la reacción reconstituida, para mejorar el rendimiento de liofilización y la vida útil. Si se desea, los reactivos liofilizados se pueden almacenar durante 1 día, 1 semana, 1 mes o 1 año o más antes de su uso.

En uso, los reactivos se reconstituyen con regulador (a) regulador de trisacetato en una concentración de entre 1 Mm y 60 Mm; y (b) polietilenglicol en una concentración de entre 1% y 12% en peso o en volumen, o (c) con agua. Si los cebadores no se agregaron antes de la liofilización, se pueden agregar en esta etapa. Finalmente, se agrega un ácido nucleico diana o una muestra sospechosa de contener un ácido nucleico diana para comenzar la reacción. El ácido nucleico diana o muestra, puede estar contenido dentro del regulador de reconstitución como consecuencia de etapas de extracción o procesamiento anteriores. La reacción se incuba hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado.

Cualquiera de las condiciones de reacción RPA discutidas en cualquier parte de esta especificación se puede liofilizar. Por ejemplo, los siguientes reactivos se pueden ensamblar combinando cada reactivo de modo que cuando se reconstituyan, tengan las siguientes concentraciones: (1) 100-200 ng/µl de uvsX recombinasa; (2) 600 ng/µl de gp32; (3) 20 ng/µl de polimerasa Bsu o polimerasa T4; (4) Dntp 200 µM; (5) DTT 1 Mm (6) ATP 3 Mm o un análogo de ATP; (7) 16 ng/µl a 60 ng/µl uvsY; (8) 50 Nm a 300 Nm de un primer cebador y 50 Nm a 300 Nm de un segundo cebador; (9) acetato de potasio 80 Mm; (10) acetato de magnesio 10 Mm; (11) fosfocreatina 20 Mm; (12) 50 ng/µl a 100 ng/µl de creatina quinasa. Los reactivos se pueden liofilizar sobre el fondo de un tubo o en un pozo de un contenedor de múltiples pozos. El reactivo se puede secar o unir a un soporte sólido móvil, como una perla o una tira, o un pozo.

En uso, el tubo con el reactivo se puede reconstituir con (1) regulador de trisacetato en una concentración de 1 Mm a 60 Mm y polietilenglicol a una concentración de entre el 1% al 12% en peso o en volumen. Si los reactivos se secaron o se unieron a un soporte sólido móvil, el soporte se puede colocar en un tubo y reconstituir. Como se discutió anteriormente, los cebadores pueden secarse como parte del reactivo o agregarse después de la reconstitución. Finalmente, se agrega un ácido nucleico diana o una muestra sospechosa de contener un ácido nucleico diana para comenzar la reacción. La reacción se incuba hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado.

Como otro ejemplo, los siguientes reactivos se pueden ensamblar combinando cada reactivo de modo que cuando se reconstituyan, tengan las siguientes concentraciones: (1) 100-200 ng/µl de uvsX recombinasa; (2) 300-1000 ng/µl de gp32; (3) 10-50 ng/µl de polimerasa Bsu o polimerasa T4; (4) 50-500 µM dNTPs; (5) DTT de 0.1 a 10 Mm; (6) ATP 3 Mm o un análogo de ATP; (7) 16 ng/µl a 60 ng/µl uvsY; (8) 50 Nm a 1000 Nm de un primer cebador y 50 Nm a 1000 Nm de un segundo cebador; (9) acetato de potasio de 40 Mm a 160 Mm; (10) acetato de magnesio de 5 Mm a 20 Mm; (11) fosfocreatina de 10 Mm a 40 Mm; (12) 50 ng/µl a 200 ng/µl de creatina quinasa. Estos reactivos son liofilizados y almacenados. En uso, los reactivos se reconstituyen con regulador de trisacetato en una concentración de entre 1 Mm y 60 Mm y polietilenglicol en una concentración de entre 1% a 12% en peso o en volumen. Los cebadores, artículo 8 anterior, se pueden omitir antes del secado por congelación y agregarse después de la reconstitución. Para iniciar el

RPA, se agrega un ácido nucleico diana o una muestra sospechosa de contener un ácido nucleico diana. La reacción se incuba hasta que se alcanza un grado de amplificación deseado.

La invención como se especifica en las reivindicaciones comprende un kit para realizar RPA. El kit puede comprender cualquiera de los reactivos descritos anteriormente para RPA en las concentraciones descritas anteriormente. Los reactivos del kit pueden liofilizarse. Por ejemplo, el kit puede contener (1) 100-200 ng/µl de uvsX recombinasa; (2) 300 ng/µl a 1000 ng/µl de gp32; (3) 10 ng/µl a 50 ng/µl de polimerasa Bsu o polimerasa T4; (4) Dntp de 50 µM a 500 µM; (5) DTT de 0.1 a 10 Mm; (6) ATP de 1 Mm a 5 Mm o un análogo de ATP; (7) 16 ng/µl a 60 ng/µl uvsY; (8) 50 Nm a 1000 Nm de un primer cebador y 50 Nm a 1000 Nm de un segundo cebador (opcional); (9) acetato de potasio de 40 Mm a 160 Mm; (10) acetato de magnesio de 5 Mm a 20 Mm; (11) fosfocreatina de 10 Mm a 40 Mm; (12) 50 ng/µl a 200 ng/µl de creatina quinasa.

En un caso preferido, RPA se realiza con varias enzimas auxiliares que pueden promover el desensamblaje eficiente de los complejos de agente de recombinasa/ADNds después del inicio de la síntesis de ADN. Estas enzimas auxiliares incluyen aquellas que son capaces de estimular el desensamblaje de 3' a 5' y las que son capaces de soportar el desensamblaje de 5' a 3'.

Las enzimas auxiliares incluyen varias polimerasas que pueden desplazar a RecA en la dirección 3' a 5' y pueden estimular el desensamble de 3' a 5' de los complejos de recombinasa-agente/ADNds (Pham et al., 2001). Estas ADN polimerasas incluyen E. coli PolV y polimerasa homóloga de otras especies. Normalmente en la vida de E. coli, el desplazamiento de RecA en la dirección 3' a 5' se produce como parte de la síntesis dirigida a la lesión SOS en concierto con SSB, pinzas deslizantes y ADN polimerasa. La polimerasa esencial para esta actividad en E. coli es PolV, un miembro de la superfamilia de polimerasas recientemente descubierta que incluye UmuC, DinB, Rad30 y Rev1, cuya función *in vivo* es copiar plantillas de lesiones de ADN. Fundamental para RPA, el desensamblaje *in vitro* de 3' a 5' de filamentos RecA no puede ser catalizado por PolI, PolIII o PolIV solo. Solo PolV, en concierto con SSB, tiene actividad de desensamble RecA/ADNds de 3' a 5' independiente de ATP. En efecto, PolV empuja y elimina RecA de ADN en una dirección de 3' a 5' por delante de la polimerasa (Pham et al., 2001; Tang et al., 2000). La inclusión de PolV o un homólogo funcional puede mejorar la eficiencia de la amplificación.

Otras enzimas auxiliares incluyen una clase de enzimas llamadas helicasas que pueden usarse para promover el desensamblaje de RecA de ADNds. Estos promueven el desensamblaje en las direcciones 5' a 3' y 3' a 5'. Las helicasas son componentes esenciales del proceso de recombinación *in vivo* y funcionan para mover los puntos de ramificación de los intermedios de recombinación de un lugar a otro, para separar cadenas y desensamblar y reciclar componentes unidos al ADN. Después de que se haya producido la primera ronda de invasión/síntesis en RPA, dos nuevos dúplex de ADN están "marcados" por la presencia de RecA unida sobre el sitio al que los cebadores deben unirse para rondas adicionales de síntesis. En tal situación, el ADNds tiende a ocupar el sitio de alta afinidad en RecA, u homólogos, hasta que se desplaza activamente, ya sea por disociación dependiente de la hidrólisis de ATP en la dirección 5' a 3', que puede ser limitante, o por disociación de 3' a 5' por algún otro proceso activo. Un complejo de helicasa ideal para estimular el desensamblaje de RecA a partir de intermedios consiste en las proteínas de E. coli RuvA y RuvB. El complejo RuvAB promueve la migración de la ramificación y disocia la proteína RecA, lo que permite que la RecA se recicle (Adams et al., 1994). Normalmente, el complejo RuvAB está dirigido a intermedios de recombinación, en particular a estructuras de unión de Holliday. A medida que funciona, el complejo RuvAB rodea el ADN y obliga a RecA a partir del ADN en una translocación impulsada por ATP (Cromie y Leach, 2000; Eggleston and West, 2000). Esta actividad de disociación de RecA se ha demostrado utilizando un ADNds superenrollado unido a RecA, que ni siquiera posee uniones Holliday (Adams et al., PNAS 1994). El complejo RuvAB puede reconocer estructuras ramificadas dentro del ADN recubierto con RecA. La incorporación de RuvAB en la mezcla de RPA promoverá la disociación de RecA de ADNds luego del intercambio y desplazamiento de cadenas, permitiendo una síntesis renovada de la plantilla duplicada del mismo sitio. Además, el complejo RuvAB puede actuar en concierto con RuvC, que finalmente corta y resuelve las uniones de Holliday. Con la adición de RuvC a la mezcla de reacción RPA, se pueden resolver estructuras complicadas como las uniones de Holliday formadas en los sitios de invasión. La actividad de la solvasa, tal como la proporcionada por RuvC, es particularmente importante cuando los oligonucleótidos dirigidos son parcialmente de doble cadena. En tales situaciones, la migración de la ramificación inversa puede generar uniones Holliday, que luego pueden ser resueltas por el complejo RuvABC, para generar productos de amplificación separados limpios.

Todavía otras enzimas auxiliares incluyen la proteína RecG de E. coli. RecG puede estimular el desensamblaje de estructuras de ramas. *In vivo*, esta proteína funciona para revertir las horquillas de replicación en los sitios de daño del ADN al desenrollar tanto las cadenas guía como las de retardo, lo que hace que la horquilla de replicación vuelva a generar una unión de 4 vías (Cox et al., 2000; Dillingham and Kowalczykowski, 2001; Singleton et al., 2001). *In vivo*, tales uniones funcionan como sustratos para el cambio de cadena para permitir la derivación de la lesión. La RecG *in vitro* se unirá a los bucles D, y conducirá a una disminución en las estructuras del bucle D al impulsar la migración de la ramificación inversa. RecG prefiere una unión con elementos de doble cadena en cada lado, por lo tanto, los oligonucleótidos de direccionamiento de doble cadena, homólogos al sitio de direccionamiento en ambas regiones de cadena sencilla y doble cadena, serían ideales. Esto estimularía la migración de la ramificación inversa y la formación de una unión de Holliday, que puede ser resuelta por el complejo RuvABC. *In vivo* RecG y RuvAB pueden competir para dar diferentes resultados de recombinación, ya que la migración de la ramificación se dirigirá en ambas

direcciones (McGlynn and Lloyd, 1999; McGlynn et al., 2000). En ambos casos, las proteínas se dirigen al ADN de la unión recubierto con RecA y se desmontan de forma activa.

Otras enzimas auxiliares útiles en una mezcla de reacción de RPA son aquellas que permiten la generación continua de filamentos de nucleoproteínas RecA en presencia de ATP y SSB. Con el fin de permitir la eliminación de RecA en los momentos apropiados, se prefiere usar ATP en lugar de ATPγS en una reacción de RPA. Desafortunadamente, los filamentos de RecA/ADNss formados con ATP se despolimerizan espontáneamente en la dirección 5' a 3', y en presencia de SSB, como se requiere aquí, la repolimerización no se producirá a velocidades significativas. La solución a este problema es el uso de las proteínas RecO, RecR y posiblemente RecF. Alternativamente, la proteína uvsY puede emplearse para estabilizar los filamentos de nucleoproteínas uvsX de T4 de una manera similar. En presencia de SSB y ATP, los filamentos RecA/ADNss se disocian (Bork et al., 2001; Webb et al., 1995; Webb et al., 1997; Webb et al., 1999). Si se incuba RecA/ADNss en presencia de proteínas RecO y RecR, no se produce esta disociación. De hecho, la proteína RecR permanece asociada con el filamento y estabiliza la estructura indefinidamente. Incluso si ADNss está unido por SSB, en presencia de RecR y RecO, los filamentos de RecA pueden reensamblarse desplazando SSB. En el sistema de fagos T4 se atribuyen propiedades similares a la proteína uvsY. Por lo tanto, es posible obviar el uso de ATPγS, si es necesario, utilizando ATP en presencia de RecO y RecR para mantener la integridad del filamento RecA/ADNss, o uvsY para mantener la integridad del filamento uvsX/ADNss. La proteína RecF interactúa con el sistema RecO y RecR de una manera aparentemente opuesta. RecF compite con RecR que tiende a impulsar el desensamblaje de filamento *in vitro*. Es probable que los tres componentes *in vivo* funcionen juntos para controlar la generación de estructuras invasoras, mientras que limitan la extensión del recubrimiento de RecA de ADNss. En otro ejemplo preferido, RecF se incluye en las reacciones de RPA a una concentración apropiada para volver a capitular la dinámica de los procesos *in vivo*. Además, RecF puede facilitar la disociación de los intermedios recubiertos con RecA después de que haya ocurrido la invasión.

Como se describe, el uso de ATP en lugar de ATPγS, y/o el uso de polimerasas y helicasas de desplazamiento (por ejemplo, el complejo RuvA/RuvB), RecO, RecR y RecF, o alternativamente la T4 uvsX recombinasa con la proteína uvsY, debe permitir una amplificación exponencial del ADN de doble cadena mediante la regeneración continua de los sitios de orientación. Este método, sin embargo, sigue respondiendo a las diferencias en la rata de iniciación que pueden ocurrir en los dos sitios de objetivos opuestos. Tales diferencias pueden conducir a una disminución en la eficiencia de la amplificación, y a la producción de algunos ADN de cadena sencilla. El método de PCR evita en gran medida estas complicaciones porque los ciclos de temperatura conducen a una síntesis coordinada desde ambos lados. En otro caso, puede inducirse una situación análoga a la condición de PCR que se acaba de describir utilizando mutantes sensibles a la temperatura (ts) de RecA que no son funcionales a 42°C, pero funcionan a temperaturas más bajas en el rango de 25 a 37°C (Alexseyev et al., 1996; Hickson et al., 1981). En este caso, la síntesis de cualquiera de los extremos se puede sincronizar mediante un descenso periódico a la temperatura permisiva y luego elevar la reacción a una temperatura no permisiva para la función de la proteína RecA mutante, pero permisiva para los otros componentes. Al realizar RPA con mutantes tsRecA en combinación con ciclos de temperaturas de reacción, se puede controlar el número de moléculas de ADN producidas. Si bien esto requerirá algún mecanismo para proporcionar ciclos de temperatura, las temperaturas están muy por debajo de las que requerirían el uso de proteínas derivadas de termófilos. De hecho, un simple dispositivo de ciclo de temperatura de baja potencia basado en agentes químicos o portátil puede ser suficiente para controlar dichos ciclos de reacción.

La RPA, como todos los otros métodos actuales de amplificación de ácido nucleico, emplea polimerasas para generar copias de moléculas de ácido nucleico de plantilla. Es una necesidad de la mayoría de las polimerasas de ácido nucleico que la incorporación requiera un resto 3'-hidroxilo libre en el azúcar terminal de un corto tramo de ácido nucleico de doble cadena adyacente al sitio de nueva síntesis. Este tramo de ácido nucleico de doble cadena se forma típicamente en una plantilla mediante una breve secuencia complementaria, llamada cebador, que sirve como un sitio de inicio para la reacción de síntesis de la polimerasa. En algunos casos, se puede utilizar una modificación 3', tal como un sulfhidrilo, para cebar la reacción de síntesis. El ácido nucleico cebador, que está emparejado en base con la plantilla y extendido por la polimerasa, puede ser ARN o ADN. *In vivo* durante la replicación del ADN genómico, las secuencias de cebadores de ARN se sintetizan de novo en el ADN de plantilla por enzimas de primasa. Normalmente, para las reacciones *in vitro*, el cebador se suministra como un ADN de cadena sencilla corto (a menudo sintetizado químicamente) (o ADN o ARN modificado), y generalmente se conoce como un cebador oligonucleotídico. El cebador es a menudo de una secuencia específica, aunque también se pueden usar cebadores aleatorios. El cebador está dirigido a secuencias complementarias en virtud de su capacidad específica de apareamiento de bases. La formación de híbridos entre el cebador oligonucleotídico y el ácido nucleico diana se forma típicamente mediante la incubación de los dos en solución en condiciones de sal, Ph y temperatura que permiten el fusionamiento espontáneo.

En el caso de la PCR, el cebador oligonucleotídico suele presentar un gran exceso por dos razones principales. Primero, la alta concentración conducirá al fusionamiento rápido. Segundo, a medida que la reacción avanza a través de rondas de fusión, fusionamiento y extensión, el cebador se consume y se vuelve limitante. Los ácidos nucleicos dirigidos a la PCR a menudo tienen inicialmente un carácter de doble cadena y, de lo contrario, se vuelven de doble cadena después del primer ciclo sintético. Estas moléculas de doble cadena no pueden fusionar nuevos oligonucleótidos a temperatura y condiciones de solventes apropiadas para la actividad catalítica y la estabilidad de la mayoría de las proteínas procariotas y eucariotas. Por consiguiente, para permitir los ciclos de amplificación, la plantilla original y las cadenas recién sintetizadas deben separarse primero antes de que se pueda realizar el fusionamiento nuevamente. En la práctica esto se consigue mediante fusión térmica. Para la PCR, se requieren temperaturas de al

menos 80°C para la fusión térmica de la mayoría de las moléculas de ácido nucleico de doble cadena de longitudes superiores a 100 pares de bases. En la mayoría de los protocolos de PCR, se aplica una temperatura de 90 a 100°C para fundir el ADN. Tales temperaturas permiten que solo se usen enzimas termoestables raras. Estas polimerasas se derivan típicamente de procariotas termófilas.

La ventaja de la RPA es que permite la formación de tramos cortos de ácidos nucleicos de doble cadena que contienen un 3'-OH libre para la extensión a partir de plantillas de doble cadena sin fusión térmica. Esto se logra utilizando la proteína RecA de E. coli (o un pariente de RecA de otros filos, incluida la proteína T4 uvsX). En presencia de ATP, Datp, ddATP, UTP, ATPγS, y posiblemente otros tipos de trifosfatos de nucleósidos y sus análogos, RecA o uvsX formarán un filamento de nucleoproteínas alrededor del ADN de cadena sencilla. Este filamento luego escaneará el ADN de doble cadena. Cuando se localizan secuencias homólogas, la recombinasa catalizará una reacción de invasión de la cadena y el emparejamiento del oligonucleótido con la cadena homóloga del ADN diana. La cadena de emparejamiento original se desplaza por la invasión de la cadena dejando una burbuja de ADN de cadena única en la región.

La proteína RecA se puede obtener de fuentes comerciales. Alternativamente, se puede purificar de acuerdo con los protocolos estándar, por ejemplo (Cox et al., 1981; Kuramitsu et al., 1981). Los homólogos de RecA se han purificado a partir de organismos termofílicos que incluyen Thermococcus kodakaraensis (Rashid et al., 2001), Thermotoga 17arítima (Wetmur et al., 1994), Aquifex pyrophilus (Wetmur et al., 1994), Pyrococcus furiosus (Komori et al., 2000), Thermus aquaticus (Wetmur et al., 1994), Pyrobaculum islandicum (Spies et al., 2000) y Thermus thermophilus (Kato y Kuramitsu, 1993). RecA también se ha purificado de otros procariotas, por ejemplo, Salmonella typhimurium (Pierre and Paoletti, 1983), Bacillus subtilis (Lovett and Roberts, 1985), Streptococcus pneumoniae (Steffen and Bryant, 2000), Bacteroides fragilis (Goodman et al., 1987), Proteus mirabilis (West et al., 1983), Rhizobium meliloti (Better and Helinski, 1983), Pseudomonas aeruginosa (Kurumizaka et al., 1994), de eucariotas, por ejemplo, Saccharomyces cerevisiae (Heyer and Kolodner, 1989), Ustilago maydis (Bennett and Holloman, 2001), incluidos los vertebrados, poe ejemplo, Rad51 humano (Baumann et al., 1997) y Xenopus laevis (Maeshima et al., 1996), así como plantas que incluyen brócoli (Tissier et al., 1995). Aquí también se muestra que la E. coli recA y la proteína T4 uvsX pueden purificarse a partir de cultivos de sobreexpresión usando una etiqueta de hexahistidina en el extremo C, y permanecen biológicamente activas. Esto es de gran utilidad para la producción de proteína recombinante.

Para mayor claridad de la descripción, el método de amplificación de la Recombinasa-Polimerasa de cadena guía (lsRPA) se puede dividir en cuatro fases.

1) Direccionamiento de secuencia

La RPA se inicia dirigiendo las secuencias utilizando oligonucleótidos sintéticos recubiertos con RecA, o un homólogo funcional como la proteína uvsX T4. Con el fin de permitir la amplificación exponencial, se emplearían dos de estos oligonucleótidos sintéticos de manera tal que sus extremos 3' libres estén orientados uno hacia el otro. Los filamentos de nucleoproteínas que comprenden estos oligonucleótidos y la proteína recombinasa identificarán las dianas en el ADN complejo de forma rápida y específica. Una vez dirigidos, la proteína recombinasa cataliza el intercambio de cadenas de manera que se forman estructuras Bucle D. Puede ser necesario usar ATP en lugar de ATPγS en el procedimiento para una amplificación eficiente. Si se usa ATP, RecO, RecR y/o RecF, las moléculas pueden resultar esenciales para una amplificación eficiente, o proteína uvsY si se emplea la recombinasa uvsX.

2) Iniciación de la síntesis de ADN.

Los ADN polimerasas detectarán y se unirán al híbrido entre los oligonucleótidos invasores y la plantilla de ADN e iniciarán la síntesis de ADN a partir del 3'-hidroxilo libre expuesto en el híbrido. La exposición de este 3'-hidroxilo, y la posterior síntesis de ADN, probablemente requerirá el desensamblaje de la proteína recombinasa del híbrido de doble cadena formado por el intercambio de cadenas. Para lograr este desensamblaje probablemente será necesario emplear ATP, que puede soportar el desensamblaje espontáneo de la recombinasa de los complejos de invasión. Además, el desensamblaje se puede estimular/mejorar mediante el uso de otras proteínas contenidas en la mezcla de reacción, como RuvA, RuvB, RuvC, recG, otras helicasas u otros componentes estimulantes, que pueden actuar para eliminar la recombinasa del producto de intercambio de cadena.

3) Síntesis de ADN por desplazamiento de cadena y separación de replicón.

Puesto que las ADN polimerasas sintetizan copias complementarias de ADN de plantilla usando los 3'-hidroxilos libres de los oligonucleótidos invasores, o sus productos parcialmente extendidos, las polimerasas desplazan ADN de cadena sencilla, que pueden estar recubiertos con proteínas de unión de cadena única (SSB) Incluido en la reacción. En una configuración ideal, la invasión de oligonucleótidos en ambos extremos de la secuencia del ácido nucleico diana ocurrirá en marcos de tiempo similares, de manera que dos polimerasas en el mismo ácido nucleico de la plantilla progresarán inicialmente una hacia la otra. Cuando estos complejos que se extienden se encuentran, la plantilla original simplemente se desintegra, y las polimerasas continuarán sintetizándose sin la necesidad de desplazamiento de la cadena, ahora copiando la plantilla de ADNss unida a SSB. Debido al impedimento estérico, las polimerasas pueden disociarse temporalmente de la plantilla cuando las polimerasas se encuentran para permitir la separación de las dos cadenas de la plantilla.

4) Finalización de la síntesis y reinvasión.

Una vez que las cadenas de la plantilla se han separado, las polimerasas pueden completar la extensión hasta el final de la plantilla (o más allá de la secuencia que actúa como segundo sitio, enfrentado, de orientación si la plantilla inicial es más larga que el producto deseado). Para permitir la amplificación exponencial, es necesario que los nuevos productos sean dirigidos y replicados de manera similar a las plantillas originales, es decir, desde ambos extremos específicos. El sitio dirigido recién sintetizado estará disponible de forma gratuita para dirigirse a filamentos de recombinasa/oligonucleótido. El sitio utilizado inicialmente para cebar la síntesis también debería haberse liberado como consecuencia del uso de condiciones en la reacción que favorecen el desensamblaje de la recombinasa de los productos de intercambio de cadena. Si la reinvasión en este último sitio se produce en menos tiempo del que tarda la polimerasa en sintetizar más allá del segundo sitio de orientación, cebarse en ese segundo sitio y regresar al primer sitio, entonces el ADN de cadena sencilla no será el producto principal y se producirá amplificación exponencial. Tener múltiples complejos sintéticos que operan en la misma plantilla aumenta la posibilidad de que se puedan lograr tiempos de amplificación muy cortos.

Amplificación de la Recombinasa-Polimerasa (RPA) mediante la síntesis simultánea de cadenas avanzadas y de retardo

En nuestra descripción de (cadena principal RPA) lsRPA se detalla un sistema de múltiples componentes con la capacidad de regenerar secuencias de direccionamiento permitiendo así la amplificación exponencial de ADN de doble cadena. A diferencia del método de Zarling, lsRPA evita la producción lineal de ADN de cadena sencilla. Existe otro método para resolver este problema que evita completamente la posibilidad de productos de una sola cadena y un requisito para la iniciación final simultánea. Este método implica necesariamente una mezcla de reacción más compleja. Sin embargo, todos los componentes requeridos ahora se comprenden bien y deben poder ensamblarse en un solo sistema. Este sistema recapitulará los eventos que ocurren durante el ciclo de replicación normal de las células para permitir la síntesis de la cadena de avance y retardo acoplados. Este método, RPA de cadena inicial/rezagada se describe brevemente en las Figuras 1 y 3.

Durante la replicación normal *in vivo*, el ADN de doble cadena se separa simultáneamente en 2 cadenas y ambas se copian para dar 2 nuevas moléculas de ADN de doble cadena por una máquina de replicación. Esta 'máquina' acopla la síntesis de la cadena principal de 5' a 3' convencional con la síntesis de la cadena retrasada, en la que los cebadores de ARN cortos se sintetizan en ácidos nucleicos de la plantilla mediante enzimas primasa. Durante la síntesis de las cadenas de retardo, se producen fragmentos cortos de ADN, llamados fragmentos de Okazaki, que se ligan entre sí para formar cadenas continuas que se retrasan. Esta síntesis simultánea de Cadena Guía/cadena es responsable de la duplicación de todo el genoma de los organismos procariotas y eucarióticos por igual. Los componentes esenciales de este sistema han sido identificados y caracterizados bioquímicamente. Los componentes se pueden ensamblar *in vitro* para lograr una amplificación más eficiente de lo posible utilizando solo la síntesis de la cadena principal.

Los componentes esenciales de la "máquina" de replicación ahora están bien caracterizados para E. coli y ciertos otros organismos como el fago T4. Esta máquina comprende la holoenzima PolIII (Glover and McHenry, 2001; Kelman and O'Donnell, 1995) y el primosoma (Benkovic et al., 2001; Marians, 1999). La holoenzima PolIII se compone de diez componentes polipeptídicos. Cada holoenzima contiene dos estructuras centrales orientadas asimétricamente, cada una de las cuales consta de una polimerasa (subunidad α) y dos componentes centrales adicionales la subunidad ε, que posee una actividad de exonucleasa de 3 'a 5', y la subunidad. Además del complejo del núcleo, otro conjunto de polipéptidos proporciona a la holoenzima con capacidad de procesamiento y se acopla la síntesis de la cadena anterior y posterior. La pinza deslizante de dímero β rodea la plantilla de ADN que fija el complejo a la plantilla con una afinidad extremadamente alta. La pinza deslizante cargada en el ADN por el cargador de pinza DnaX que comprende las subunidades polipeptídicas $\tau_2\gamma\delta\delta'\chi\psi$.

Para mayor claridad de la descripción, el método RPA se puede dividir en cuatro fases. En realidad, todas las fases ocurrirán simultáneamente en una sola reacción.

1) Segmentación de secuencia

La RPA se inicia dirigiendo secuencias usando oligonucleótidos sintéticos recubiertos con RecA, o T4 uvsX, o un homólogo funcional. Tales filamentos de nucleoproteínas identificarán las dianas en el ADN complejo de forma rápida y específica. Una vez dirigida, la proteína RecA o uvsX cataliza el intercambio de cadenas de manera que se forma una estructura de Bucle D. Puede ser necesario usar ATP en lugar de ATPγS en el procedimiento para una amplificación eficiente. Sin embargo, el enlace de la síntesis de cadenas guía y de retardo puede obviar el requisito de una extracción de recombinasa muy rápida después del inicio de la síntesis. Si se usa ATP, puede ser necesario emplear RecO, RecR y RecF con la recombinasa recA bacteriana, o las T4 uvsY, las proteínas pueden ser esenciales para una amplificación eficiente con la proteína T4 uvsX.

2) Ensamblaje de primosoma

Los primosomas se pueden ensamblar en Bucles D. Normalmente, en E. coli, las estructuras de bucle D están formadas por RecA como parte del mecanismo para rescatar el ADN dañado *in vivo*, o durante otras formas de recombinación. El propósito de la acción combinada del intercambio de cadenas mediado por RecA y el ensamblaje

de primosomas es generar un horquilla de replicación. Una horquilla de replicación es la estructura de nucleoproteínas que comprende las cadenas de ADN de plantilla separadas y el replisoma. El replisoma consiste en el complejo de holoenzima polimerasa, el primosoma y otros componentes necesarios para replicar simultáneamente ambas cadenas de ADN de plantilla. Los primosomas proporcionan tanto el desenrollado del ADN como las funciones de cebado del fragmento de Okazaki necesarias para la progresión de la horquilla de replicación. Se produce un ensamblaje de primosomas similar en los intermedios de recombinación en el fago T4 dirigido por la proteína gp59 y gp41.

El ensamblaje de Primosoma ha sido estudiado intensamente a través del análisis genético y bioquímico en E. coli. El conjunto mínimo de polipéptidos requerido para este proceso es bien conocido y existe como componentes purificados. Las proteínas de ensamblaje primosoma son PriA, PriB, PriC, DnaT, DnaC, DnaB y DnaG. Se ha demostrado que estas proteínas son suficientes para ensamblar un complejo de primosomas en el ADN del bacteriófago ΦX174 *in vitro* (Kornberg and Baker, 1992; Marians, 1992). PriA se une al sitio de ensamblaje del primosoma (PAS) en el cromosoma ΦX174. Luego, PriB, DnaT y PriC se unen secuencialmente al complejo PriA-DNA. PriB parece estabilizar PriA en el PAS y facilitar la unión de DnaT (Liu et al., 1996). PriC solo se requiere parcialmente para la reacción de ensamblaje completo. La omisión de PriC en la reacción reducirá el cebado de 3 a 4 veces (Ng and Marians, 1996a; Ng and Marians, 1996b). La función de PriC en la bacteria es genéticamente redundante para PriB. DnaC luego carga DnaB en el complejo de una manera dependiente de ATP. Este complejo PriABC-DnaBT es capaz de translocarse a lo largo del cromosoma. La DnaG primasa puede interactuar transitoriamente con el complejo para sintetizar los cebadores de ARN.

Durante la replicación en E. coli, DnaB y DnaG funcionan como helicasa y primasa respectivamente. Estos dos componentes se requieren continuamente en asociación con la holoenzima PolIII para sintetizar cebadores para los fragmentos de Okazaki. Por lo tanto, DnaB y DnaG son los componentes centrales del primosoma móvil asociado con la horquilla de replicación. Los otros componentes del primosoma descritos son esenciales para el ensamblaje del primosoma en el ADN y para asociar una polimerasa dimérica. Las proteínas de ensamblaje de primosomas son necesarias para el restablecimiento de las horquillas de replicación en los intermedios de recombinación formados por RecA y el intercambio de cadenas. PriA puede iniciar el ensamblaje de un replisoma, competente para la síntesis de ADN, en intermedios de recombinación. Es posible apuntar Bucles D *in vitro* con una mezcla de PriA, PriB y DnaT, que son competentes para incorporar DnaB y DnaC. Una vez que se ha formado un primosoma en el Bucle D, todo lo que queda para iniciar la replicación es cargar un complejo de holoenzima en el sitio. Alternativamente, en el sistema del fago T4, la proteína cargadora de helicasa gp59 recluta y ensambla la helicasa replicativa gp41 en estructuras de bucle D.

3) Ensamblaje de horquillas e iniciación de síntesis de ADN.

Las horquillas de replicación se ensamblarán en el sitio del ensamblaje del primosoma. En E. coli, la presencia de un extremo 3' libre en la cadena invasora del bucle D estimula el complejo del cargador de pinzas DnaX detallado anteriormente para ensamblar un dímero β en este sitio para que actúe como una pinza deslizante. La holoenzima y las 2 unidades centrales están unidas entre sí por la subunidad τ del andamio. La subunidad τ también tiene superficies de interacción para el dímero β, para el cargador de pinzas y para el componente helicasa DnaB del primosoma. Estas interacciones múltiples son necesarias para coordinar la síntesis de las dos cadenas, tanto las anteriores como las de retardo, utilizando los 2 complejos de polimerasa de núcleo asimétricamente unidos. En el fago T4, las proteínas gp59/41 con las proteínas uvsY y gp32, y con otros componentes coordinan el ensamblaje de la pinza deslizante gp45 ayudada por las proteínas gp44 y gp62 inician el ensamblaje replisoma.

En E. coli, la primasa primosomal, DnaG, sintetiza un cebador de ARN corto en la plantilla de ADN de la cadena rezagada desenrollada. En presencia de la holoenzima, el cargador de pinzas reconoce el dúplex de ARN/ADN y carga una segunda pinza de dímero β en este sitio. La presencia de un primosoma activo y la interacción de la subunidad τ con DnaB son fundamentales para garantizar la síntesis simultánea de la cadena de guía/retardo. Sin esta interacción, la polimerasa se alejará del sitio del primosoma sin acoplamiento.

Ahora está montada una horquilla de replicación. La síntesis de las dos cadenas, tanto la guía como la de retardo, se producirá simultáneamente, y la helicasa DnaB separará las cadenas de la plantilla por delante de la holoenzima que se aproxima. El núcleo de holoenzima de cadena retrasada generará fragmentos de Okazaki de 1 a 2 kilobases de longitud. Una vez que la cadena polimerasa retrasada encuentra el cebador de ARN anterior, se disocia de la pinza β y se inicia la síntesis desde una pinza recién ensamblada cargada en la vecindad de la parte frontal de la cadena principal. Se reutilizará el mismo núcleo de holoenzima de cadena retrasada, ya que está físicamente atado al núcleo de cadena principal.

Hay una interacción dinámica entre las pinzas de dímero β, las subunidades de núcleo y los cargadores de pinza. Sus afinidades pueden cambiar dependiendo de las circunstancias físicas. El dímero β que ha sido "abandonado" al final de los fragmentos de Okazaki se puede reciclar mediante la eliminación activa mediante cargadores de pinza, o un exceso de la subunidad δ que pueda estar presente.

Los cebadores de ARN en los extremos de los fragmentos de Okazaki se eliminan mediante la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la ADN polimerasa I. El ADN ligasa se une luego a los fragmentos de Okazaki formando una cadena continua.

4) Reunión de horquilla y terminación.

En RPA, la replicación se inicia en dos sitios distantes y las horquillas de replicación están orientadas una hacia la otra. A medida que las horquillas de replicación convergen, las dos cadenas originales de la plantilla se disociarán una de la otra a medida que se separan completamente por detrás y por delante de cada horquilla. El núcleo de la cadena principal de cada horquilla completará la síntesis, los cebadores de ARN restantes se procesarán y los productos finales serán dos moléculas de doble cadena. Se puede razonablemente esperar amplificar los ADN del orden de varias megabases (Mb) con este método. En esta divulgación, megabase también abarca pares de megabases. Con base en la velocidad de síntesis conocida de la holoenzima PolIII, se puede esperar que las horquillas de replicación procedan a una velocidad de aproximadamente 1 Mb/1000 segundos, es decir, aproximadamente de 15 a 20 minutos por ciclo para un fragmento de 1 Mb.

La consideración final es el mecanismo por el cual se logrará una rápida amplificación exponencial del ADN. La clave de este proceso será permitir una reinvasión eficiente de los sitios de focalización mediante el uso de mezclas de helicasas, resolvasas y las proteínas RecO, RecR y RecF. Bajo condiciones apropiadas, la reinvasión y el ensamblaje de primosomas deberían ser posibles poco después de que una holoenzima se haya alejado del lugar de ensamblaje de la horquilla. Las invasiones continuas no deberían presentar problemas, ya que el ADN simplemente se ramificará en muchos puntos. Cada rama se resolverá naturalmente cuando encuentre la horquilla que se aproxima. En estas condiciones, puede ser posible lograr una amplificación enorme en tiempos similares al tiempo necesario para replicar el ADN solo una vez. Sin embargo, puede ser crítico limitar las concentraciones de oligonucleótidos dirigidos para evitar el agotamiento de los nucleótidos antes de completar la síntesis.

Además del complejo de holoenzimas, la máquina de replicación emplea otro complejo conocido como el primosoma, que sintetiza la cadena retrasada y mueve la horquilla de replicación hacia adelante. El complejo de primosomas comprende una helicasa codificada por DnaB y una primasa codificada por DnaG. Finalmente, además de las proteínas de la holoenzima y el primosoma, la replicación requiere la actividad de la proteína de unión al ADN de cadena sencilla (SSB), la ADN polimerasa I de E. coli y la ADN ligasa. Estos dos últimos componentes son necesarios para procesar los fragmentos de Okazaki.

RPA anidada

En otro caso, la amplificación de RPA se puede realizar en un proceso al que se hace referencia aquí como "RPA anidada". Una dificultad para detectar una secuencia rara es que puede haber una alta proporción de secuencia no objetivo a objetivo. La capacidad de un RPA para discriminar entre el ADN objetivo y el no objetivo y amplificar solo las secuencias objetivo es un aspecto clave de la sensibilidad mejorada. La discriminación entre no diana y diana es un reflejo de la especificidad de los cebadores y las condiciones de reacción. Cuanto más específica es una reacción, mayor es la cantidad relativa de la secuencia objetivo específica que se produce y más fácil es detectar ese producto. Un aumento en la especificidad puede, por lo tanto, aumentar la sensibilidad también.

La necesidad de mejorar la sensibilidad y la especificidad se puede abordar mediante el uso de RPA anidada. El RPA anidada implica un primer RPA de una primera región de ADN. Luego, la mezcla de reacción se diluye, por ejemplo, en 10, 20, 30, 40, 50, 75 o 100 veces o más para reducir la concentración del primer par de cebadores, y se introduce un segundo par de cebadores en la mezcla de reacción y RPA repitió. De acuerdo con un método, el segundo par de cebadores está diseñado para ser interno al primer par de cebadores para amplificar una subsecuencia del primer producto RPA. El método aumenta la amplificación específica, es decir, reduce los productos de amplificación de fondo no específicos y, por lo tanto, aumenta la sensibilidad. Dichos productos de amplificación no específicos, aunque surgen en virtud de una homología parcial fortuita con los cebadores flanqueantes, es poco probable que también tengan una homología suficiente con los cebadores anidados para continuar amplificando. La detección y la especificidad de RPA se pueden mejorar aún más marcando uno o ambos del segundo par de cebadores de modo que solo se detecten cebadores amplificados con uno o ambos del segundo par de cebadores.

La RPA anidada no se limita al uso de dos conjuntos de cebadores. Naturalmente, se pueden usar más conjuntos de cebadores para aumentar la especificidad o la sensibilidad. Por lo tanto, se pueden usar tres, cuatro o cinco pares de cebadores. Además, los diferentes conjuntos de cebadores, como otro ejemplo de la especificación, pueden compartir cebadores comunes como se ilustra en la Figura 4.

En la Figura 4, los conjuntos de cebadores están diseñados para ser usados secuencialmente. Por ejemplo, un primer RPA se realiza con el conjunto de cebadores 1, un segundo RPA utilizando el producto amplificado del primer RPA se realiza con un conjunto de cebadores 2, un tercer RPA utilizando el producto amplificado del segundo RPA se realiza con un conjunto de cebadores 3, un cuarto RPA usando la secuencia amplificada del tercer RPA se realiza con un conjunto de cebadores 4, y finalmente, un quinto RPA se realiza usando el producto amplificado del cuarto RPA con un conjunto de cebadores 5. En este caso, el conjunto de cebadores 1, 2 y 3, comparten un cebador-cebador común (a). El cebador 3,4 y 5 comparten un cebador-cebador común (b).

La RPA anidada se puede realizar utilizando cualquiera de los dos métodos de RPA descritos, así como una combinación de los dos métodos en cualquier orden particular. Es decir, la RPA se puede realizar únicamente mediante

la RPA de la cadena principal, únicamente mediante la RPA de la cadena anterior y retrasada, o una combinación de la RPA de la cadena principal y la RPA de la cadena principal y la retrasada en cualquier orden particular.

Un beneficio de cualquiera de los métodos de RPA descritos en este documento es el tamaño del producto amplificado. Si bien los métodos actuales de amplificación, como la PCR, están limitados a un límite superior de aproximadamente 10 Kb, los métodos RPA son capaces de amplificar regiones de ácidos nucleicos de hasta cientos de megabases. Para el RPA de la cadena anterior/rezagada, los tamaños de una secuencia de destino por amplificar pueden ser cientos de megabases, como, por ejemplo, menos de 500 megabases, menos de 300 megabases, menos de 100 megabases, menos de 70 megabases, menos de 50 megabases, menos de 25 megabases, menos de 10 megabases, menos de 5 megabases, menos de 2 megabases, menos de una megabase, menos de 500 kb, menos de 200 kb, menos de 100 kb, menos de 50 kb, menos de 25 kb, o menos de 10 kb, menos de 5 kb, menos de 2 kb, menos de 1 kb. Para lsRPA, los tamaños de una secuencia de destino pueden estar en el rango de megabases, tales como, menos de 5 megabases, menos de 2 megabases, menos de una megabase, menos de 500 kb, menos de 200 kb, menos de 100 kb, menos de 50 kb, menos de 25 kb, o menos de 10 kb, menos de 5 kb, menos de 2 kb, menos de 1 kb.

Consideraciones generales para reconstituir y permitir reacciones de amplificación mediadas por recombinasa

Tanto lsRPA como RPA guía/de retardo se basan en el uso similar de las proteínas recombinasas para dirigir los cebadores oligonucleotídicos, sin embargo, difieren en el modo en que se forman los nuevos dúplex hijas durante la amplificación. En el RPA de guía/retardo se establece una horquilla de replicación completa que sintetiza simultáneamente los hilos de avance y retardo para que se formen dos nuevos dúplex de forma concomitante. En la Cadena Guía RPA (lsRPA), solo se produce la síntesis de la cadena principal, de modo que la síntesis genera un dúplex y un ADN de cadena sencilla desplazado como productos.

En RPA, la síntesis de ADN iniciada después del intercambio de la cadena se realiza mediante una polimerasa. Durante la extensión de la cadena recién sintetizada, la polimerasa debe poder desplazar la cadena saliente, ya sea sola o en combinación con una helicasa capaz de mediar el desplazamiento de la cadena saliente. La extensión del cebador invasor finalmente da como resultado la liberación de la cadena saliente como un ADN de cadena sencilla. Para garantizar que se produzca la amplificación geométrica, y que la reacción produzca una gran mayoría de ADN de doble cadena, es necesario que este ADN de cadena sencilla desplazado sirva como plantilla para la síntesis de ADN desde la dirección opuesta. Esta es una consideración central para la amplificación usando lsRPA. Otras dos consideraciones centrales son las especies de polimerasa utilizadas y la existencia de un sistema estable, dinámico, recombinasa que funciona de manera eficiente en la presencia de niveles de saturación de proteínas de unión de cadena sencilla. Estas consideraciones son importantes tanto para el RPA e lsRPA guía/ retardo.

A) Asegurar la generación de ADN de doble cadena a partir de la cadena desplazada

La generación de la segunda cadena de ADN en lsRPA se puede lograr de una de varias maneras:

1) El ADN de cadena sencilla desplazado puede hibridarse simplemente con la cadena complementaria que se ha desplazado de la invasión y extensión de un segundo oligonucleótido de orientación "enfrentado". Alternativamente, el ADN de cadena sencilla desplazado puede hibridar directamente con el segundo oligonucleótido "enfrentado". Dichos eventos de hibridación pueden ocurrir espontáneamente, o pueden estar mediados por las actividades de asimilación de la cadena de las proteínas de unión al ADN, como las recombinasas o las proteínas de unión al ADN de cadena sencilla. Después de la hibridación, una polimerasa se extenderá desde el extremo 3' libre para generar un producto de doble cadena. Téngase en cuenta que para que esto ocurra de manera eficiente, el entorno de reacción debe permitir la hibridación de ADN de cadena sencilla complementarios, una situación que no siempre es compatible con los otros aspectos de la reacción de RPA. En algunas circunstancias, se podría usar un oligonucleótido de hibridación con un esqueleto modificado, incapaz de interactuar con la mayoría de las proteínas de unión al ADN.

2) Si la síntesis de desplazamiento de cadena comienza simultáneamente desde el cebador oligonucleotídico opuesto en la misma plantilla, los dos complejos de replicación convergentes se encontrarán en algún lugar en el medio de la plantilla. Siempre que estos complejos convergentes puedan pasar unos a otros, las cadenas de la plantilla se separarán y cada complejo completará la replicación copiando una plantilla de una sola cadena en lugar de una doble cadena, sin necesidad de desplazar más la cadena.

3) Si la cadena saliente posee la capacidad de formar una horquilla, entonces puede ocurrir una síntesis de la segunda cadena autocebadora. Esta actividad resultaría en un dúplex covalentemente vinculado con una horquilla en un extremo, que podría convertirse en un objetivo para futuras reacciones de invasión/extensión. Esta situación no es ideal para muchas aplicaciones, ya que generará productos con longitudes y estructuras variables. Sin embargo, esto puede ser aceptable para los análisis de detección, como algunas pruebas de diagnóstico. Además, puede ser posible diseñar cebadores tales que después de las primeras rondas de invasión/extensión, la mayoría de las cadenas salientes son capaces de autocebarse. Este modo de formación de ADN dúplex puede ser muy eficiente.

Cuál de estos tres procesos generales domina en una reacción de lsRPA dependerá de muchos factores. Los factores más importantes son la distancia que separa los dos cebadores oligonucleótidos en el objetivo, la rata de invasión y la secuencia de los oligonucleótidos y la plantilla.

En el segundo formato general de RPA, RPA guía/de retardo, se evita la generación de ADN de cadena sencilla sustancial al establecer una horquilla de replicación completa en el sitio de invasión. Una horquilla de replicación completa permite la copia simultánea de los filamentos iniciales y los retrasados (lo que sería equivalente a la cadena saliente). El RPA guía/retardo es elegante al evitar la generación de ADN de cadena sencilla, sin embargo, se requiere un número mayor de proteínas distintas para generar las horquillas de replicación completas. Sin embargo, la mayoría de los aspectos de la optimización de las reacciones de RPA se aplican tanto a lsRPA como a RPA de guía/retardo.

B) Elección del sistema de polimerasa o polimerasa/helicasa.

El método lsRPA es similar en algunos aspectos a la PCR. Ambos procesos utilizan pares de cebadores oligonucleotídicos orientados con extremos 3' apuntados entre sí en el ADN objetivo y ambos métodos logran una amplificación geométrica mediante el uso de productos de reacción como objetivos para las siguientes rondas de síntesis de ADN. Hay, sin embargo, diferencias fundamentales en las configuraciones de reacción. Por ejemplo, en RPA, el ADN objetivo es de doble cadena antes de la síntesis, mientras que en la PCR es de cadena sencilla después de la separación térmica de las cadenas. En RPA, la síntesis de ADN debe utilizar necesariamente ADN polimerasas o complejos de polimerasa capaces de desplazar la cadena. Además, debido a que las cadenas parcialmente copiadas están asociadas físicamente con las cadenas desplazadas a través de la plantilla, existe el riesgo de que, si la polimerasa se disocia temporalmente de la plantilla, el extremo 3' de la nueva cadena, y eventualmente la nueva cadena, se perderá por la acción de migración de la ramificación u otro fenómeno conocido como migración de burbuja. Esto sugiere que las polimerasas idealmente capaces de procesamiento se utilizarán para las reacciones de RPA. También es importante tener en cuenta que, si los complejos de replicación convergentes no pueden pasar fácilmente unos a otros sin la disociación de la polimerasa, entonces algunas polimerasas capaces de procesamiento pueden inhibir la reacción de RPA en algunas plantillas. En resumen, la elección ideal de la polimerasa dependerá del formato exacto y el objetivo de la reacción RPA particular, en particular el tamaño del producto por amplificar.

C) Establecimiento de una actividad de recombinasa activa persistente estable en un entorno con supresión de ruido

Una tercera consideración es cómo establecer una actividad de recombinasa estable, pero dinámica, mientras se silencia el ruido generado por el fusionamiento de cebadores aberrante visto a bajas temperaturas. Esto significa establecer un entorno de reacción que equilibre varios requisitos aparentemente incompatibles. Para que la RPA sea eficaz, las proteínas deben permanecer activas mientras se ensamblan en los filamentos de oligonucleótidos/recombinasas en busca de ADN de doble cadena objetivo. Estos complejos también deben desmontarse después de completar los intercambios de cadenas para permitir la síntesis de ADN. Esto debe suceder en un entorno rico en proteínas de ADN de cadena sencilla. Estas proteínas son necesarias para estimular la recombinación y la síntesis de ADN mientras previenen el comportamiento aberrante de los oligonucleótidos mediante la fusión de estructuras secundarias. Fundamentalmente, las recombinasas y las proteínas de unión de cadena sencilla compiten por la unión a oligonucleótidos. Mientras que las proteínas de unión a una sola cadena son necesarias para permitir un desplazamiento eficiente de la cadena durante la síntesis, suprimen la actividad de recombinación porque tienen una mayor afinidad por el ADN de una sola cadena y se unen con más cooperatividad que las recombinasas.

El establecimiento de un entorno de reacción de recombinasa/replicación funcional requiere cofactores de nucleótidos. RecA, y otras recombinasas, requieren cofactores de nucleótidos, como el ATP, para ensamblar los filamentos en el ADN de cadena sencilla, realizar búsquedas de homología y completar el intercambio de cadenas. Se supone que los análogos no hidrolizables, como el ATP-γ-S, serían incompatibles con RPA porque la estabilidad extremadamente alta del intermedio de ADN/recA de 3 cadenas formado en presencia de ATP-γ-S evitaría la reinvasión en el cebador objetivos y por lo tanto evitaría la amplificación eficiente. Incluso pueden evitar cualquier acceso útil de la polimerasa al intermedio de recombinación. Los intentos anteriores de amplificar el ADN utilizando E. coli recA (Zarling et al.) probablemente se vieron limitados por el ATP-γ-S en las reacciones descritas.

El requisito de ATP en la reacción y el hecho de que los complejos de recombinasa se formarán y desensamblarán dinámicamente introducen complejidades adicionales, principalmente debido a las interacciones complejas y la competencia entre los componentes de reacción clave. En particular, las proteínas de unión de cadena sencilla, como las proteínas de unión de cadena sencilla de E. coli, como la proteína gp32 del fago T4 o E. coli, son necesarias para estimular la recombinación por recA y homólogos, debido a su capacidad para recolectar cadena saliente, y para fundir estructuras secundarias en ADN de una sola cadena mejorando así la carga de recombinasa. En RPA es probable que las proteínas de unión de cadena sencilla estimulen aún más la síntesis de ADN uniéndose y estabilizando la cadena de ADN desplazada, evitando la migración de la ramificación indeseables.

A pesar del claro requerimiento de proteínas de unión de cadena sencilla, estas proteínas generalmente tienen una afinidad considerablemente mayor por el ADN de cadena sencilla que las recombinasas como recA o uvsX, y pueden inhibir la nucleación de filamentos de recombinasa/ADN. Además, como los filamentos formados en presencia de ATP sufren un desensamblaje dependiente del extremo (Bork, Cox and Inman J Biol Chem. 2001, 7 de diciembre; 276(49): 45740-3), es probable que dichos filamentos se saturen rápidamente con proteínas de unión trenzadas e inactivadas poco después del inicio de la reacción. Por lo tanto, las condiciones de RPA eficientes que evitan la inactivación de los componentes de reacción son clave para establecer una amplificación robusta.

Se ha predicho una composición de reacción potencialmente estable utilizando la proteína recA de E. coli en presencia de ATP y la proteína de unión de cadena sencilla de E. coli SSB, o la proteína T4 uvsX en presencia de gp32. Se sugiere que la presencia de proteínas recO, recR y posiblemente recF (Bork, Cox and Inman EMBO J. 2001, 17 de diciembre; 20(24): 7313-22), podría conducir a un entorno en donde se estabilizaron los filamentos recA precargados, y en la que recA podría nuclearse exitosamente en oligonucleótidos unidos a SSB. Se ha descrito un sistema de carga de recombinasa similar en otros organismos, incluido el sistema de recombinación/replicación/reparación del bacteriófago T4. La T4 recombinasa uvsX puede cargarse en el ADN de una sola cadena recubierto con la proteína de unión al ADN de una sola cadena T4 gp32 por la acción de un tercer componente, la proteína uvsY (Morrical and Alberts J Biol Chem. 1990 Sep 5; 265(25): 15096-103). Es interesante que una función principal de este sistema de recombinación *in vivo* es permitir la síntesis de ADN dependiente de la recombinación mediante el ensamblaje de componentes de replicación en intermedios de recombinación como los Bucles D (Formosa and Alberts Cell. 1986, 5 de diciembre; 47(5): 793-806). Este proceso es similar a lo que debería suceder en RPA impulsado por Bucles D creados por la invasión de oligonucleótidos sintéticos. Además de las interacciones entre los tres componentes uvsX, uvsY y gp32, también hay interacciones entre estos componentes y la maquinaria de replicación, como la polimerasa, el cargador de pinzas, la primasa/helicasa y la dda helicasa (Reddy, Weitzel and Von Hippel, Proc. Natl Acad Sci U S A. 1993 15 de abril; 90(8): 3211-5., Hacker and Alberts, J. Biol Chem. 1992 15 de octubre; 267(29): 20674-81). En conjunto, estos hechos sugieren que los componentes de la maquinaria de recombinación/replicación de T4 quizás sean incluso más ideales para RPA que los equivalentes de E. coli.

Además del uso de proteínas de carga de recombinasa, como recO y recR, o uvsY, hay otras formas de crear un equilibrio adecuado entre la actividad de recombinasa y la actividad de las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla. El comportamiento de unión y/o cooperatividad del ADN de las recombinasas y las proteínas de unión al ADN de cadena sencilla se pueden modular mediante mutación. Además, las recombinasas de diferentes fuentes tienen propiedades distintas (Eggler, Lusetti and Cox, J Biol Chem. 2003, 2 de mayo; 278(18): 16389-96. Epub, 20 de febrero de 2003, Villemain et al., J. Biol Chem. 2000 Oct 6; 275(40): 31496-504). Esto sugiere que se podría explorar una gama de actividades de proteína de unión a ADN de recombinasa y de cadena sencilla. El uso de proteínas mutadas o proteínas de diferentes especies, en un conjunto de experimentos de optimización podría conducir a la identificación de una proporción óptima de la recombinasa competidora y las actividades de unión de cadena sencilla. En última instancia, las actividades se equilibrarían de tal manera que la asociación/disociación de ADN para las dos especies de unión al ADN permita una actividad de recombinasa suficiente junto con una actividad suficiente de fusión del ADN, actividad de la proteína de unión al ADN de cadena sencilla para realizar también sus funciones necesarias. Además, la reducción del ruido debida a la compresión incorrecta se puede lograr mediante la optimización de parámetros tales como el diseño de la secuencia de oligonucleótidos, el regulador de reacción, el uso de oligonucleótidos parcialmente modificados, el uso de oligonucleótidos dúplex parciales o la adición de otros componentes de reacción específicos detallados a continuación.

Aquí se proporcionan los resultados de los experimentos que validan el método RPA. En particular, se proporciona una descripción y demostración de composiciones de reacción capaces de soportar la amplificación de ADN. Se demuestra que se pueden usar oligonucleótidos sintéticos relativamente cortos para dirigirse a secuencias específicas y apoyar el inicio de la síntesis de ADN. Se describen los requisitos para tipos y concentraciones particulares de ciertas recombinasas, proteínas de unión de cadena sencilla, ATP y concentraciones de oligonucleótidos. Además, se describen la optimización y la modulación del entorno de reacción, que admite un sistema de recombinación activo y dinámico con un comportamiento de velocidad deseado, mediante la inclusión de agentes de aglomeración (como polietilenglicoles), factores de carga de recombinasa y/o proteínas mutadas con actividades bioquímicas alteradas. Se establece que en presencia de polimerasas distributivas al menos (por ejemplo, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E. coli), hay mejoras sustanciales en la eficiencia de la amplificación cuando se optimiza la distancia entre los sitios de cebado de la amplificación. Se establece que debe emplearse un equilibrio entre la actividad de la exonucleasa de la polimerasa y los agentes protectores de oligonucleótidos para evitar la degradación no específica de los cebadores oligonucleotídicos. Se muestra que la amplificación de secuencias incrustadas dentro de sustratos de ADN lineales (o relajadas) es relativamente ineficiente (al menos con polimerasas muy distributivas como Klenow), mientras que las reacciones de amplificación dirigidas hacia los extremos de los sustratos de ADN lineales son las más efectivas. Se proporcionan métodos para preparar ADN objetivo para amplificarlo más eficazmente en una reacción de lsRPA, incluidos los métodos de fusión térmica o química o la digestión con enzimas de restricción. También se proporciona evidencia de que la naturaleza de la proteína de unión de cadena sencilla es crítica para establecer reacciones de RPA eficientes y proporciona una justificación para esto. Además, se sugieren mejoras y nuevos métodos para reducir el ruido y optimizar las reacciones de amplificación realizadas a temperaturas relativamente bajas o ambientales mediante el uso de oligonucleótidos de doble cadena parcial u oligonucleótidos que carecen total o parcialmente de un esqueleto de fosfato. También se proporciona evidencia de que otras enzimas y proteínas involucradas en el metabolismo del ADN pueden influir en las reacciones de RPA, y algunas pueden configurarse para mejorar la eficacia y especificidad de la reacción. Estas incluyen topoisomerasas, que pueden relajar los intermedios de recombinación/replicación y pueden ayudar en la selección de secuencias incrustadas, así como helicasas como la T4 dda helicasa o T4 gp41 que pueden mejorar el inicio de la polimerasa y la eficiencia de alargamiento, particularmente si se usan polimerasas que no se desplazan. Finalmente, se muestra que las helicasas priA y ruvA/B tienen actividades que podrían utilizarse para optimizar la eficiencia de la amplificación.

Selección de reactivos RPA y parámetros de reacción.

Los detalles de RPA de la cadena principal, RPA de la cadena anterior y posterior, y RPA anidada se enumeraron anteriormente. Esta sección describirá la selección de reactivos y parámetros para cualquiera de los tres métodos mencionados anteriormente.

Un beneficio de la RPA es que el producto amplificado de la RPA es un ADN de doble cadena que podría usarse para otros procedimientos de biología molecular. Por lo tanto, RPA se puede combinar con otros métodos en biología molecular. Por ejemplo, el material de partida para RPA puede ser un fragmento amplificado por PCR. Alternativamente, el producto de un RPA se puede usar para la PCR.

Si es necesario, los productos de RPA en cualquiera de los métodos pueden ser purificados. Por ejemplo, en el método de RPA anidada, el producto amplificado puede purificarse después de cada paso de RPA antes de un paso de RPA posterior. Los métodos de purificación de ácidos nucleicos son conocidos en la técnica e incluirían, al menos, extracción con fenol, precipitación con ácido nucleico (por ejemplo, con sal y etanol), cromatografía en columna (por ejemplo, exclusión de tamaño, columna iónica, columna de afinidad y similares) o cualquier combinación de estas técnicas.

Como se discutió, los cebadores usados en RPA pueden ser "de doble cadena" o "capaces de formar estructuras de doble cadena". Estos términos se refieren a las moléculas de ADN que existen en una condición de doble cadena en una solución de reacción tal como una solución de reacción RPA o una solución de reacción de PCR. La composición de una solución de PCR es conocida. La composición de una reacción RPA se enumera en esta sección de descripción detallada y en los Ejemplos.

Los cebadores pueden tener una región de cadena sencilla para la hibridación con el ADN diana en presencia de un agente de recombinasa. La región de cadena sencilla puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10 bases, aproximadamente 15 bases, aproximadamente 20 bases, aproximadamente 25 bases, aproximadamente 30 bases, aproximadamente 40 bases y aproximadamente 50 bases. Se pueden usar incluso regiones más largas, como aproximadamente 75 bases, aproximadamente 100 bases, aproximadamente 150 bases o más, pero no es necesario. La elección de las regiones de cadena sencilla dependerá de la complejidad del ácido nucleico de partida, por lo que, por ejemplo, un genoma humano puede requerir un cebador más largo, mientras que un plásmido puede requerir un cebador mucho más corto.

Las dos cadenas de ácido nucleico en un ADN de doble cadena no necesitan ser completamente complementarias. Por ejemplo, la región de doble cadena de un ADN de doble cadena puede diferir hasta en un 1% en secuencia. Es decir, la secuencia de dos cadenas de ácido nucleico puede diferir en una base en cien bases y aún existiría en una condición de doble cadena en solución. Los ácidos nucleicos con una diferencia del 1% en su secuencia complementaria se contemplan como doble ADN trenzado para los fines de esta divulgación.

Además, el ácido nucleico diana (es decir, el ácido nucleico por amplificar por los métodos de RPA descritos en este documento) puede ser parcialmente de doble cadena y parcialmente de cadena sencilla. Por ejemplo, el ácido nucleico en cualquiera de la configuración de la Figura 5 sería adecuado como un ácido nucleico diana. Como se discutió, el ácido nucleico diana puede ser ARN. El ARN puede convertirse en ADNc de doble cadena utilizando métodos conocidos y el ADNc de doble cadena se puede usar como el ácido nucleico diana. Como se muestra en la Figura 5, el ácido nucleico plantilla puede tener cualquier combinación de extremos seleccionados entre los extremos salientes 3', salientes 5' o extremos romos.

El método IsRPA comprende al menos los siguientes pasos. Primero, un agente de recombinasa se pone en contacto con dos cebadores de ácido nucleico (referidos aquí como primer y segundo cebador) para formar dos cebadores nucleoproteínicos (referidos aquí como primer cebador nucleoproteínico y un segundo cebador nucleoproteínico).

En segundo lugar, el primer y segundo cebadores de nucleoproteínas se ponen en contacto con el ácido nucleico plantilla para formar una estructura de doble cadena en una primera parte de la primera cadena y una segunda estructura de doble cadena en una segunda parte de la segunda cadena. Los dos cebadores están diseñados de manera que cuando se hibridan, se apuntan entre sí como se ilustra en la Figura 6A. Alternativamente, el cebador 1 y el cebador 2 pueden hibridar diferentes ácidos nucleicos diana como se ilustra en la Figura 6B.

En tercer lugar, los cebadores de nucleoproteína se extienden en sus extremos 3' para generar un primer y un segundo ácido nucleico de doble cadena (Figura 7A). Cuando los cebadores se hibridan con diferentes ácidos nucleicos diana, la elongación de los cebadores generará cadenas desplazadas (Figura 7B). En este caso, las dos cadenas desplazadas que resultan del alargamiento del cebador pueden hibridar y formar un nuevo ácido nucleico plantilla de doble cadena (Figura 7C).

Los pasos dos y tres se repiten hasta que se alcanza el grado de amplificación deseado. El proceso es un proceso dinámico en donde se permite que la hibridación del cebador con el ácido nucleico diana y la elongación procedan continuamente. Una ventaja de este método es que la amplificación se realiza de forma continua sin necesidad de ciclos de temperatura o adición de enzimas después del inicio de la reacción.

En un caso, los pasos dos y tres se repiten al menos 5 veces. Preferiblemente, se repite al menos 10 veces. Más preferiblemente, se repite al menos 20 veces, tal como al menos 30 veces. Más preferiblemente, los dos pasos se

repiten al menos 50 veces. Para repeticiones múltiples de la etapa de amplificación (por ejemplo, las etapas 2 y 3), una RPA como se describe en este documento se inicia preferiblemente con un cebador a la ración de ácido nucleico diana de al menos 100 a 1, preferiblemente al menos 300 a 1, y lo más preferiblemente al menos 1000 a 1. Es decir, hay al menos 100, 300 o 1000 copias del cebador por copia de un ácido nucleico diana.

En un paso opcional, después de una ronda de amplificación suficiente, se pueden agregar componentes adicionales a la reacción después de un período de tiempo para mejorar la eficiencia de la amplificación general. En un caso, los componentes adicionales pueden ser uno o más de los siguientes: agentes de recombinasa, uno o más cebadores, polimerasa y uno o más de los agentes adicionales (analizados en una sección separada a continuación).

En un caso preferido, se utiliza una pequeña fracción de una primera reacción de RPA como suministro de ADN de plantilla para rondas posteriores de amplificación de RPA. En este método, se realiza una primera reacción de amplificación de RPA en un ácido nucleico diana. Después de la primera reacción de RPA, se utiliza una pequeña fracción de la reacción total como sustituto del ácido nucleico diana para una ronda posterior de reacción de RPA. La fracción puede ser, por ejemplo, menos de aproximadamente el 10% de la primera reacción. Preferiblemente, la fracción puede ser inferior a aproximadamente el 5% de la primera reacción. Más preferiblemente, la fracción puede ser inferior al 2% de la primera reacción. Más preferiblemente, la fracción puede ser inferior al 1% de la reacción inicial.

El cebador usado en RPA es preferiblemente ADN aunque el PNA y el ARN también son adecuados para usar como cebadores. Se observa que, de hecho, en la replicación del ADN, los ADN polimerasas alargan el ADN genómico de los cebadores de ARN.

Los oligonucleótidos sintéticos pueden servir como cebadores de ADN y pueden usarse como sustratos para la formación de filamentos de nucleoproteínas con RecA o sus homólogos. Secuencias tan cortas como 15 nucleótidos son capaces de dirigirse al ADN de doble cadena (Hsieh et al., 1992). Dichos oligonucleótidos se pueden sintetizar de acuerdo con la química estándar de fosforoamidato, o de otra manera. Las bases modificadas y/o las químicas de la columna vertebral del enlazador pueden ser deseables y funcionales en algunos casos. Además, los oligonucleótidos pueden modificarse en sus extremos, ya sea 5' o 3', con grupos que sirven para varios propósitos, por ejemplo, grupos fluorescentes, inactivadores, grupos (de bloqueo) protectores (reversibles o no), etiquetas magnéticas, proteínas, etc. En algunos casos, los oligonucleótidos de cadena sencilla se pueden usar para la invasión de cadenas, en otros solo se pueden usar ácidos nucleicos parcialmente de cadena sencilla, el tramo 5' de secuencia de un ácido nucleico invasor que ya está hibridado a un oligonucleótido. En otro caso, los cebadores pueden comprender una región 5' que no es homóloga al ácido nucleico diana. Debe observarse que los procesos de la invención deberían ser funcionales incluso si los cebadores no son completamente complementarios al ácido nucleico diana. Los cebadores pueden ser no complementarios al tener secuencias adicionales en su extremo 5'. Estas secuencias adicionales pueden ser, por ejemplo, la secuencia para un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción o la secuencia que es complementaria a un cebador de secuenciación. El sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción puede ser útil para la posterior escisión de la secuencia amplificada. También se contempla el uso de endonucleasa de restricción que escinde el ácido nucleico fuera del sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción. La secuencia que es complementaria para un cebador de secuenciación puede permitir una secuenciación rápida del ADN del producto amplificado utilizando cebadores disponibles comercialmente o aparatos de secuenciación disponibles comercialmente.

La formación de filamentos de nucleoproteína se puede realizar por incubación del cebador (oligonucleótidos) con proteína RecA o sus homólogos en presencia de ATP, y proteínas auxiliares como RecO, RecR y RecF, o uvsY en el caso de proteínas T4. Cuando se incuba a 37°C en regulador RecA (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5, $MgCl_2$ 10 mM, ATP 2 mM, DTT 2 mM y 100 µg/ml de albúmina de suero bovino), RecA formará filamentos helicoidales en ssADN con 6 protómeros por turno. El ADN se encuentra dentro del interior de la proteína hélice. En presencia de ADNds, el filamento de nucleoproteínas RecA/ADNss puede escanear el ADN a velocidades de al menos 107 pb por hora. El modo de escaneo no está claro, pero es a una velocidad ($>10^3$ pb por segundo) que puede implicar solo los pocos pares de bases iniciales a los que se puede acceder fácilmente a lo largo de una cara del surco principal. La unión exitosa puede resultar en una transición a un intermediario de triple hélice, que luego es seguida por la invasión de la cadena y el desplazamiento para formar un Bucle D. Dichas moléculas conjuntas pueden formarse en condiciones similares a las descritas anteriormente para la formación de filamentos helicoidales y, por lo tanto, en presencia de ADNss, el ADNds homólogo, RecA, ATP, proteínas auxiliares y condiciones adecuadas de regulador y temperatura, las moléculas conjuntas se formarán espontáneamente. Si se usa ATP, el ensamblaje es reversible y alcanzará el equilibrio, pero los filamentos RecA/ADNss se pueden estabilizar, incluso en presencia de SSB, por las proteínas auxiliares RecO y RecR. Alternativamente, la proteína T4 uvsX puede estabilizarse en presencia de la proteína uvsY. En el caso de las proteínas termoestables, la temperatura de incubación puede ser mayor. Si se requiere un suministro renovable de ATP, se puede incluir un sistema de regeneración de ATP estándar en la reacción.

Las ADN polimerasas pueden usar el 3'-hidroxilo libre de la cadena invasora para catalizar la síntesis de ADN mediante la incorporación de nuevos nucleótidos. Varias polimerasas pueden usar el 3'-hidroxilo de la cadena invasora para catalizar la síntesis y desplazar simultáneamente la otra cadena a medida que se produce la síntesis. Por ejemplo, la E. coli polimerasa II o III se puede usar para extender los bucles D invadidos (Morel et al., 1997). Además, se puede usar la E. coli polimerasa normalmente utilizada en mutaciones dirigidas a la lesión SOS en E. coli (Pham et al., 2001). Todas estas polimerasas pueden convertirse en altamente capaces de procesamiento a través de sus interacciones y

cooperación con la pinza del dímero β, así como con la proteína de unión al ADN de cadena sencilla (SSB) y otros componentes. También se pueden usar otras polimerasas de procariotas, virus y eucariotas para extender la cadena invasora.

En otro caso, el cebador puede ser parcialmente de doble cadena, parcialmente de cadena sencilla y con al menos un saliente 3' de cadena sencilla. En este caso, el cebador puede comprender una cadena invasora y una cadena no invasora como se muestra en la Figura 8A. En este caso, después de que la cadena invasora se hibride con el ADN diana y se alargue, sirve como un ácido nucleico diana para un segundo cebador como se muestra en la Figura 8B. La elongación del segundo cebador desplazaría la cadena no invasora como se muestra en la Figura 8C. En este caso, a medida que se amplifica el ácido nucleico diana, la cadena no invasora del cebador 1 se desplaza. Si tanto el cebador uno como el cebador dos son cebadores parcialmente de doble cadena, entonces las cadenas no invasoras tanto del cebador uno como del cebador dos se acumularán en la solución a medida que se amplifique el ácido nucleico diana.

En un caso, al menos dos de los cebadores en una reacción RPA son parcialmente de doble cadena y parcialmente de cadena sencilla, cada uno generado por la hibridación de una cadena invasora y una cadena de oligonucleótidos no invasores, que poseen secuencias suficientemente complementarias que formar una región de doble cadena. Preferiblemente, las dos cadenas de oligonucleótidos son suficientemente complementarias sobre la región relevante para que puedan formar una estructura de doble cadena en condiciones de reacción de RPA.

En un caso, los cebadores, incluidos los cebadores de cadena sencilla y parcialmente de doble cadena, se marcan con un marcador detectable. Cabe señalar que un detenedor de fluorescencia también se considera una etiqueta detectable. Por ejemplo, el detenedor de fluorescencia puede ponerse en contacto con un colorante fluorescente y se detecta la cantidad de detención. La etiqueta detectable debe ser tal que no interfiera con una reacción de elongación. Cuando el cebador es parcialmente de doble cadena con una cadena invasora y una cadena no invasora, el marcador detectable debe unirse de tal manera que no interfiera con la reacción de elongación de la cadena invasora. La cadena no invasora de un cebador parcialmente de doble cadena no es alargada, por lo que no hay limitaciones en el etiquetado de la cadena no invasora, con la única excepción de que la etiqueta en la cadena no invasora no debe interferir con la reacción de elongación de la cadena invasora. Los cebadores etiquetados ofrecen la ventaja de una detección más rápida del producto amplificado. Además, la detección de marcadores no incorporados, es decir, oligonucleótidos marcados que no se han extendido, permitirá el monitorización del estado de la reacción.

La supervisión de una reacción de RPA puede implicar, por ejemplo, eliminar una fracción de una reacción de RPA, aislar la fracción no incorporada y detectar el cebador no incorporado. Dado que el tamaño de un cebador no incorporado puede ser menor que 50 pb, menor que 40 pb, menor que 30 pb o menor que 25 pb, y el tamaño del producto amplificado puede ser mayor que 1Kb, mayor que 2 Kb, mayor que 5 Kb, o más de 10 Kb, hay una gran diferencia de tamaño entre el cebador incorporado y el no incorporado. El aislamiento del cebador no incorporado se puede realizar rápidamente usando cromatografía de exclusión por tamaño tal como, por ejemplo, una columna de centrifugación. Si se etiqueta un cebador, se puede realizar un procedimiento de monitorización que comprende una columna de rotación y una medición (por ejemplo, fluorescencia o radioactividad) en menos de un minuto. Otra alternativa para separar los cebadores alargados de los cebadores no alargados implica el uso de PAGE. Por ejemplo, el cebador alargado se puede separar del cebador no alargado mediante electroforesis en gel en menos de 5 minutos. Otra alternativa más para separar cebadores alargados implica el uso de oligonucleótidos inmovilizados. Por ejemplo, los oligonucleótidos homólogos a las secuencias encontradas de forma única dentro de la secuencia de ADN amplificada se pueden usar para capturar ácidos nucleicos producidos por elongación del cebador específicamente. Estos oligonucleótidos de captura pueden inmovilizarse en un chip u otro sustrato. La captura de los oligonucleótidos alargados por los oligonucleótidos de captura puede realizarse mediante métodos mediados por la proteína RecA, o mediante hibridaciones con soluciones tradicionales si es necesario.

En otro caso, un cebador de doble cadena se puede marcar de tal manera que se pueda detectar la separación de las dos cadenas del cebador. Como se discutió anteriormente, después de varias rondas de alargamiento, la cadena invasora y las cadenas no invasoras de un cebador parcialmente de doble cadena se separan. Después de esta separación, la cadena no invasora no participa en la reacción de RPA. Esta característica se puede usar para detectar y monitorizar una reacción de RPA de varias maneras.

En esta solicitud, el marcador detectable puede ser un marcador fluorescente o una enzima y el detenedor del marcador (también denominado inhibidor del marcador) puede ser un inhibidor de la fluorescencia o un inhibidor de la enzima. En estos casos, el marcador se detecta por fluorescencia o inhibición enzimática. La detectabilidad de la etiqueta sería la fluorescencia si se usa una etiqueta fluorescente o la actividad de la enzima si se usa una enzima.

En el primer método, la cadena invasora puede marcarse con una etiqueta y la cadena no invasora puede marcarse con un desactivador de etiquetas detectable. La etiqueta, en la proximidad del detenedor de etiquetas (inhibidor de etiquetas) en el cebador parcialmente de doble cadena, no sería altamente detectable. Después de RPA, la cadena invasora se separaría de la cadena no invasora y, por lo tanto, la etiqueta y el detenedor de etiquetas se separarían. La separación haría que la etiqueta sea más detectable. Por lo tanto, medir los aumentos en la cantidad de etiqueta detectable puede monitorizar las reacciones de RPA.

El segundo método es similar al primer método, excepto que la cadena invasora se modifica con un detenedor de etiquetas, mientras que la cadena no invasora se modifica con una etiqueta. Luego, se permite que RPA continúe con el resultado (igual que el método 1) de la etiqueta que se separa del detenedor de etiquetas. Por lo tanto, la detectabilidad general de la etiqueta aumentaría.

El tercer método implica marcar la cadena no invasora de un cebador de doble cadena con una etiqueta. Además, la cadena no invasora de un segundo cebador de doble cadena se marca con un detenedor de etiquetas. Los dos soportes no invasores están diseñados para ser complementarios entre sí. En esta configuración, la reacción RPA es inicialmente fluorescente. A medida que avanza la reacción de la RPA, las dos cadenas no invasoras se desplazan a la solución y se hibridan entre sí porque están diseñadas para ser complementarias. A medida que se hibridan, la etiqueta y el detenedor de etiquetas se acercan entre sí y la fluorescencia de la reacción disminuye. El progreso de la reacción de RPA se puede medir al monitorizar la disminución en la detectabilidad de la etiqueta.

En un cuarto método, las cadenas no invasoras de un primer y segundo cebadores de doble cadena se marcan con una primera etiqueta y una segunda etiqueta. Los dos hilos no invasores también están diseñados para ser complementarios entre sí. Al igual que en el tercer método, después de RPA, las dos cadenas no invasoras se hibridan entre sí y la proximidad de las dos etiquetas será un reflejo del progreso de la reacción de RPA. La proximidad de las dos etiquetas se puede determinar, por ejemplo, por observación directa o por aislamiento de las cadenas no invasoras. Como se discutió anteriormente, el aislamiento de los cebadores y otros ácidos nucleicos pequeños se puede lograr mediante columnas de exclusión de tamaño (incluidas las columnas de hilado) o mediante electroforesis en gel.

En otro caso, la cadena no invasora de uno o ambos de los cebadores es homóloga a una segunda región de ácido nucleico, de modo que el cebador puede hibridarse con una síntesis de ADN de cebador en la segunda región de ácido nucleico. Usando este método, se puede iniciar una segunda reacción de RPA utilizando la cadena no invasora del cebador de un primer RPA. El producto de la segunda RPA puede ser monitorizado para determinar el progreso de la primera RPA.

En otro caso más, la cadena no invasora es detectada por un biosensor específico para la secuencia de la cadena no invasora. Por ejemplo, el biosensor puede ser una superficie con una secuencia de ácido nucleico complementaria a la cadena no invasora. El biosensor puede monitorizar una característica que resulta de la unión de la cadena no invasora. La característica puede ser una etiqueta detectable.

Los marcadores detectables adecuados para cualquiera de los métodos descritos en el presente documento incluyen enzimas, sustratos enzimáticos, coenzimas, inhibidores de enzimas, marcadores fluorescentes, cromóforos, marcadores luminiscentes, radioisótopos (incluidos los radionucleótidos) y un miembro de un par de unión. Ejemplos más específicos incluyen fluoresceína, ficobiliproteína, tetraetil rodamina y beta-gal. Los pares de unión pueden incluir biotina/avidina, biotina/estreptavidina, antígeno/anticuerpo, ligando/receptor, y análogos y mutantes de los pares de unión.

El agente de recombinasa de la invención puede ser RecA, uvsX, RadA, RadB, Rad 51 o un análogo funcional u homólogo de estas proteínas. Si se desea, la recombinasa puede ser un agente de recombinasa sensible a la temperatura (referido aquí como "ts"). Si se usa una recombinasa ts, la reacción RPA puede iniciarse a una temperatura (la temperatura permisiva) y terminarse a otra temperatura (la temperatura no permisiva). Las combinaciones de temperaturas permisivas pueden ser, por ejemplo, 25°C/30°C, 30°C/37°C, 37°C/42°C y similares. En un caso preferido, la proteína ts es reversible. La actividad de una proteína ts reversible se restaura cuando se cambia de la temperatura no permisiva a la temperatura permisiva.

En un ejemplo preferido, la RPA se realiza en presencia de ATP, un análogo de ATP u otro nucleósido trifosfato. El análogo de ATP puede ser, por ejemplo, ATPγS, dATP, ddATP u otro análogo de nucleósido trifosfato tal como UTP.

Otros reactivos útiles que pueden añadirse a una reacción de RPA incluyen trifosfatos de nucleótidos (es decir, dNTP como dATP, dTTP, dCTP, dGTP y derivados y análogos de los mismos) y una ADN polimerasa. Otros reactivos útiles para RPA anterior/retardo incluyen NTP (ATP, GTP, CTP, UTP y derivados y análogos de los mismos). Una ventaja de la reacción de RPA es que no hay límite en el tipo de polimerasa utilizada. Por ejemplo, se pueden usar polimerasas eucariotas y procariotas. Las polimerasas procariotas incluyen, al menos, E. coli pol I, E. coli pol II, E. coli pol III, E. coli pol IV y E. coli pol V. Las polimerasas eucariotas incluyen, por ejemplo, complejos de polimerasa multiproteína seleccionados de grupo que consiste en pol-α, pol-β, po-δ y po-ε.

En otro caso, el proceso de RPA se realiza en presencia de un componente accesorio para mejorar la capacidad de procesamiento o fidelidad de la polimerasa. Se pueden usar componentes accesorios tanto eucariotas como procariotas. Preferiblemente, el componente accesorio es una proteína accesoria de E. coli. Las proteínas accesorias útiles incluyen proteínas de unión a una sola cadena, helicasa, topoisomerasa y resolvasa. Otras proteínas accesorias útiles incluyen una pinza deslizante seleccionada del grupo que consiste en una pinza deslizante de dímero β de E. coli, una pinza deslizante de PCNA eucariota y una pinza deslizante de T4 gp45. Otros componentes accesorios incluyen un complejo de holoenzima ADN polimerasa III que consiste en β-Clamp, DnaX Clamp Loader y el Polymerase Core Complex. Otros componentes adicionales incluyen RuvA, RuvB, RuvC y RecG. Las propiedades

dotadas por el uso de componentes adicionales probablemente permitirán la amplificación de grandes ADN que no se han abordado con éxito con los métodos actuales, como la PCR.

En otro caso, la RPA se realiza en presencia de agentes utilizados para estabilizar los filamentos de nucleoproteína de recombinasa/ADNss. Por ejemplo, el agente puede ser RecR, RecO, RecF, o una combinación de estas proteínas, o proteína T4 uvsY si se usan componentes T4. Los agentes de aglomeración molecular también pueden emplearse para modular las interacciones bioquímicas de una manera favorable. Otros agentes útiles incluyen PriA, PriB, DnaT, DnaB, DnaC y DnaG.

Un beneficio de la presente invención es que la reacción de RPA se puede realizar a temperaturas reducidas en comparación con una reacción de PCR. Por ejemplo, el proceso RPA se puede realizar entre 20°C y 50°C. Preferiblemente, el proceso de RPA se realiza a menos de 45°C. Más preferiblemente, el proceso de RPA se puede realizar a menos de 40°C. Incluso más preferiblemente, el proceso de RPA se puede realizar a menos de 35°C. Más preferiblemente, el proceso de RPA se puede realizar a menos de 30ºC. Una de las razones por las que el proceso de RPA se puede realizar a estas temperaturas reducidas es porque RPA se puede realizar sin la fusión inducida por la temperatura del ácido nucleico de la plantilla. Además, a diferencia de la PCR, no se requiere un control absoluto de la temperatura y la temperatura puede fluctuar sin afectar negativamente a la RPA. Por ejemplo, la cantidad de fluctuación puede estar en cualquier lugar dentro de las temperaturas especificadas anteriormente. La temperatura necesaria para la fusión del ADN de doble cadena también contribuye a la inactivación prematura de la enzima, una desventaja ausente en los métodos descritos en este documento.

Se puede realizar una RPA para probar las presencias o ausencias de un genotipo. El genotipo probado puede estar asociado con una enfermedad o una predisposición a una enfermedad. Alternativamente, el genotipo puede estar asociado con un fenotipo normal o un fenotipo que confiere una resistencia especial a una enfermedad. El genotipo descrito anteriormente puede ser cualquier variante genética estándar, como una mutación puntual, una eliminación, una inserción, una inversión, una mutación de cambio de marco, un evento de cruce, o la presencia o ausencia de copias múltiples de una secuencia genética (por ejemplo, presencias de minicromosomas).

Un método para detectar un genotipo es detectar la distancia entre un par de cebadores en una reacción RPA. La distancia entre un par de cebadores se refleja en el tamaño de la secuencia amplificada. En ese método, los dos cebadores se seleccionan de manera que abarquen una región objetivo como, por ejemplo, un gen. Luego se realiza una RPA utilizando el par de cebadores y se analiza el producto RPA. El análisis puede implicar determinar el tamaño o la secuencia del producto amplificado. Se conocen métodos para determinar el tamaño de una secuencia de ADN, que incluyen al menos técnicas tales como geles de agarosa, geles PAGE, espectroscopía de masas, geles de campo pulsado, chips de genes, sedimentación de sacarosa y similares. Hay muchos métodos de secuenciación de ADN y sus variantes, como la secuenciación de Sanger que utiliza terminación dideoxi y electroforesis en gel desnaturalizante (Sanger, F., Nichlen, S. and Coulson, AR Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5463-5467 (1977)), secuenciación de Maxam-Gilber mediante escisión química y electroforesis en gel desnaturalizante (Maxam, A.M. and Gilbert, W. Proc Natl Acad Sci USA 74, 560-564 (1977)), pirofosfato de detección de pirosecuenciación (PPi) liberado durante el ADN reacción de polimerasa (Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P. Science 281, 363, 365 (1998)), y secuenciación por hibridación (SBH) usando oligonucleótidos (Lysov, I., Florent'ev, V.L., Khorlin , A.A., Khrapko, K.R. & Shik, V.V. Dokl Akad Nauk SSSR 303, 1508-1511 (1988); Bains W. & Smith G.C.J. Theor. Biol 135, 303-307 (1988); Dmanac, R., Labat, I., Brukner, I. & Crkvenjakov, R. Genomics 4, 114-128 (1989); Khrapko, KR, Lysov, Y, Khorlyn, A.A., Shick, V.V., Florentiev, V.L. and Mirzabekov, AD FEBS Lett 256. 118- 122 (1989); P evzner P. A. J Biomol Struct Dyn 7, 63-73 (1989); Southern, E. M., Maskos, U. & Elder, J. K. Genomics 13, 1008-1017 (1992)).

Un método para detectar un genotipo es usar cebadores que sean específicos para un genotipo en particular. Por ejemplo, un cebador puede ser diseñado para amplificar eficientemente un genotipo, pero ineficientemente o no amplificar otro genotipo en absoluto. En un caso, el cebador puede comprender una secuencia 3' que es complementaria a un genotipo (por ejemplo, un genotipo de enfermedad genética) pero no a otro genotipo (por ejemplo, un genotipo normal).

El genotipo a determinar puede ser indicativo de una enfermedad tal como, por ejemplo, la presencia de un oncogén activado; la presencia del gen para la enfermedad de Huntington o la ausencia de un antioncogén.

Las bases 3' de los cebadores son especialmente importantes para determinar la especificidad y la eficiencia de una reacción de RPA. Un cebador puede diseñarse de modo que la base 3' sea complementaria a un genotipo y no complementaria a otro genotipo. Esto permitirá un RPA eficiente de un genotipo y un RPA ineficiente (si existe) del segundo genotipo. Se observa que el método es efectivo si solo un cebador del par de cebadores puede diferenciar entre diferentes fenotipos (al tener diferentes eficiencias de amplificación). En un caso preferido, ambos cebadores en una reacción RPA pueden diferenciar entre diferentes genotipos. En este ejemplo anterior, los cebadores son complementarios a un genotipo y no son complementarios a un segundo genotipo por una base en su extremo 3'. En un caso preferido, el cebador no es complementario al segundo genotipo por al menos una base en su extremo 3'. Preferiblemente, el cebador no es complementario al segundo genotipo por al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 bases en su extremo 3'. Más preferiblemente, el cebador es completamente no complementario o no puede hibridarse con el segundo genotipo mientras que puede hibridarse con el primer genotipo.

En algunos de los métodos discutidos, la presencia o ausencia de un producto amplificado proporciona la indicación de la presencia o ausencia de un genotipo. En estos casos, la reacción de RPA puede ser monitorizada por los métodos discutidos a lo largo de la especificación.

En un caso preferido, una reacción de RPA para genotipificación amplificará una secuencia independientemente del genotipo del paciente. Sin embargo, el genotipo de un paciente alterará una característica de la secuencia amplificada. Por ejemplo, la secuencia amplificada puede tener un tamaño o secuencia diferente para un genotipo que para otro genotipo. De esa manera, la reacción de RPA contendrá un control interno para indicar que la reacción de amplificación se realizó con éxito. Naturalmente, también se contempla un método de RPA, que incluye uno o más pares adicionales de cebadores como controles para el desempeño de la reacción de RPA.

En otro caso, se puede usar una reacción de RPA para determinar la presencia o ausencias de una molécula de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico puede ser de cualquier organismo. Por ejemplo, la composición microbiana de una muestra puede determinarse utilizando una batería de reacciones de RPA dirigidas al ácido nucleico de diferentes microbios. RPA es especialmente útil para la detección de microbios. En una instancia, los patógenos se seleccionan de virus, bacterias, parásitos y hongos. En otros casos, los patógenos son virus seleccionados de influenza, rubéola, varicela-zóster, hepatitis A, hepatitis B, otros virus de la hepatitis, herpes simple, polio, viruela, virus de inmunodeficiencia humana, vacuna, rabia, Epstein Barr, retrovirus y rinovirus. En otro caso, los patógenos son bacterias seleccionadas de Escherichia coli, Mycobacterium tuberculosis, Salmonella, Chlamydia y Streptococcus. En otro caso más, los patógenos son parásitos seleccionados de Plasmodium, Trypanosoma, Toxoplasma gondii y Onchocerca. Sin embargo, no se pretende que la presente divulgación se limite a los géneros y/o especies específicos enumerados anteriormente.

Aquí se presentan datos que ayudan a definir las condiciones de reacción que permiten una amplificación eficiente del ADN por RPA.

Proteína de unión a ADN de cadena sencilla

Se requieren proteínas de unión a ADN de cadena sencilla para las reacciones de RPA. Estas proteínas se unen al ADN de cadena sencilla, funden la estructura secundaria, facilitan el desplazamiento de las cadenas salientes y suprimen la migración de la ramificación. En RPA se requiere su actividad durante varias fases distintas. Se ha investigado las actividades de dos proteínas de unión a ADN de cadena sencilla, E. coli SSB y bacteriófagos T4 gp32. La T4 gp32 ha demostrado ser la más útil presentes. Además, se ha generado varias formas distintas de esta proteína al incluir etiquetas peptídicas de hexahistidina (His) en los extremos N o C, así como a la investigación de varias mutaciones puntuales descritas anteriormente. Las actividades de las variantes de gp32 se representan esquemáticamente en la Figura 21.

Formas variantes de gp32

La proteína T4 gp32 posee varias características que son de utilidad potencial para las reacciones RPA. Ante todo, la gp32 tiene un sitio de unión a ADN relativamente pequeño (8-10 nucleótidos), muestra propiedades de unión similares en un amplio rango de concentraciones de sal y muestra una alta cooperatividad (ilimitada) entre monómeros (Scheerhagen et al., J. Biomol Struct Dyn. 1986 Apr.; 3 (5): 887-98; Kuil et al., Biophys Chem. 1988 Dec; 32 (2-3): 211-27). En contraste, la proteína SSB de E. coli tiene varios modos distintos de unión al ADN que varían con la concentración de sal, todos los cuales poseen sitios de unión al ADN relativamente grande (32, 56 o 65 nucleótidos) (Ferrari et al., J Mol Biol. 1994, 11 de febrero; 236(1): 106-23) y hay un comportamiento complejo de cooperatividad (Lohman and Ferrari, Annu Rev Biochem. 1994; 63: 527-70). Debido a que el tamaño inicial de la cadena saliente es pequeño cuando se emplean oligonucleótidos sintéticos, razonamos que las propiedades de la proteína gp32 serían óptimas para RPA. Expresamos y purificamos gp32 que posee una etiqueta His N-terminal (gp32 (N)). En experimentos iniciales, se encuentra que gp32 (N) funciona al menos tan bien como la proteína SSB de E. coli, incluso cuando se combina en un sistema heterólogo con la recA recombinasa de E. coli (Figura 12). Este fue un resultado sorprendente, ya que se informa que la gp32 muestra una cooperatividad extremadamente alta entre subunidades monoméricas y parece poco probable que recA pueda competir eficazmente por la unión de oligonucleótidos en su presencia. Sin embargo, cuando se compara el comportamiento de gp32 (N) con gp32 sin etiquetar, se descubrió que las dos proteínas no se comportaban de manera equivalente. Como la etiqueta His N-terminal está directamente adyacente al dominio 'B' de la proteína gp32, que se requiere para la cooperatividad entre monómeros, razonamos que la gp32(N) debe tener una cooperatividad atenuada. Por lo tanto, generamos una proteína gp32 que posee una etiqueta His C-terminal (gp32(C)), así como formas mutantes puntuales de gp32(C) de acuerdo con mutantes publicados previamente que tienen un cambio de lisina a alanina en la posición 3 (K3 a A), o una arginina, ya sea glutamina (R4 a Q) o treonina en la posición 4 (R4 a T) (Figura 21). Estas proteínas mutantes de tres puntos exhiben progresivamente menos cooperatividad (Figura 22) (Villemain, et al. J Biol Chem. 2000 Oct 6; 275 (40): 31496-504). Se probó la capacidad de estas proteínas en dos concentraciones diferentes para soportar las reacciones de invasión/extensión en una plantilla linealizada en combinación con la proteína uvsX T4 del bacteriófago y el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E. coli (Figura 22). En primer lugar, se observa que gp32(C) produce mucho menos producto que otras variantes de gp32 en cualquiera de las dos concentraciones (la Figura 22 se compara con gp32(N)) y que los productos son casi exclusivamente de longitud completa, en contraste con gp32(N). Cuando se comparan estos resultados con los obtenidos con las series alélicas mutantes puntuales, se observa que la proteína gp32(N) se

parece más al perfil obtenido con gp32(C) R4 a T, que se ha reportado como significativamente más atenuada en la cooperatividad. Esto sugiere que la etiqueta His terminal N de gp32(N) interfiere con la función del dominio B de manera similar a las mutaciones puntuales.

Hay varias otras observaciones relevantes. En primer lugar, las proteínas que se cree demuestran la mayor cooperatividad, es decir, gp32(C) >gp32(C)K3A parecen producir menos producto. En segundo lugar, para gp32(C) y gp32(C)K3A, se genera un producto más amplificado cuando se usa menos proteína de unión de cadena sencilla, en contraste con gp32(N) y gp32(C)R4T, que generan más producto en ensayos cuando se utilizan más proteínas. En conjunto, estas observaciones sugieren una explicación. Si la especie gp32 es cada vez más cooperativa, formará filamentos progresivamente más estables en los oligonucleótidos y hará que cada vez sea más difícil la carga de la recombinasa. En consecuencia, cuando se emplean las especies de gp32 más cooperativas, existe una limitación significativa en la disponibilidad de filamentos cargados con recombinasa. Si se eleva la concentración de gp32, la carga de recombinasa se suprime aún más por la actividad de unión al ADN de cadena sencilla de gp32. De acuerdo con esto, a medida que la cooperatividad de la gp32 disminuye progresivamente, aumenta la cantidad de productos amplificados. Esto es consistente con un aumento sustancial en la formación de filamentos recubiertos con recombinasa. Como los monómeros gp32 relativamente poco cooperativos tienen menos probabilidades de recubrir los oligonucleótidos y permitir que la recombinasa, uvsX, se siembre. Se observa que en el caso de gp32(N) y gp32(C)R4T, se genera más producto con un aumento de gp32(N) o gp32(C)R4T en los ensayos de seguimiento de ADN. Esto contrasta los resultados utilizando las variantes más cooperativas de gp32. Una posibilidad es que durante y después de la reacción de intercambio de la cadena gp32 se requiera para estabilizar los intermedios de recombinación y síntesis. Esto puede ocurrir porque la cooperatividad de gp32 está tan atenuada que ya no puede participar en esos aspectos de la reacción, o porque la recombinasa supera a gp32 y detiene la reacción. Los resultados contrastantes de la amplificación frente a los ensayos en ejecución sugieren que la cantidad óptima de cooperatividad puede ser menor que la que poseen las variantes de gp32 más cooperativas. Por lo tanto, para RPA, las variantes de gp32 mutantes, con cooperatividad atenuada, pueden ser las más apropiadas ya que estas permitirán niveles más altos de carga de recombinasa. Sin embargo, la atenuación de la cooperatividad de gp32 debe equilibrarse con el ruido generado por los eventos de cebador erróneos que se pueden encontrar en entornos con menos actividad de gp32.

Finalmente, hay una diferencia sustancial en la cantidad de producto generado en RPA usando 7.5 µg versus 15 µg de gp32(C)K3A. El nivel de 7.5 µg se parece más a los resultados con mutantes más débilmente cooperativos. Lo más probable es que, en algunos casos, durante el curso de la reacción, que se mantuvo a 37°C durante 2 horas, la cantidad de producto de una sola cadena se incremente hasta el punto de que la gp32 ya no sature efectivamente el ADN de una sola cadena en la reacción. En tal situación, ocurrirían dos cosas. Primero, habría un rápido aumento en el número de filamentos de búsqueda de homología que llevaría a un aumento significativo de la rata de invasión. Entonces, la falta de gp32 para estabilizar las cadenas salientes daría lugar a que muchas extensiones parciales no se estabilicen, y posiblemente una mayor tasa de migración de burbujas que separa la nueva cadena de la plantilla. Por lo tanto, muchas más cadenas sintetizadas no alcanzarán su longitud total.

Un modelo de la función gp32 en múltiples reacciones de invasión/extensión

Anteriormente se había señalado que en un sistema heterólogo que involucra recA y gp32(N), se requería que el polietilenglicol permitiera más de un ciclo de invasión y extensión de una plantilla dada. Aquí se describen un modelo para racionalizar estas observaciones y explicar por qué la orientación de los extremos del ADN requiere tipos específicos de proteínas de unión a ADN de cadena sencilla. Está claro que se requiere la actividad de gp32 para estabilizar la cadena saliente durante el proceso de intercambio de la cadena. Si esto no ocurre, la recombinasa desmonta la cadena saliente que se vuelve a hibridar con su cadena complementaria y desplaza al oligonucleótido invasor. Después del intercambio de la cadena, la cadena saliente puede existir en uno de los dos estados, lo que probablemente impone diferentes demandas a la proteína de unión al ADN de cadena sencilla. Estos dos estados surgen como consecuencia de la relación entre el ADN de búsqueda de cadena sencilla y el ADN dúplex. Si el evento de recombinación puede extenderse a un extremo de un ADN dúplex lineal, y es posible que la cadena saliente se elimine completamente de su complemento en un extremo, entonces la cadena saliente no está restringida en un extremo. Bajo esta condición sin restricciones, el nuevo dúplex que involucra la cadena de ADN entrante y su complemento es capaz de rebobinar para formar ADN en forma B. Esto es necesario porque durante la reacción de emparejamiento, los ADN diana están heridos por la actividad del filamento de recombinasa invasora. Las cadenas salientes no restringidas pueden unirse fácilmente a proteínas de unión a ADN de una sola cadena, lo que evitará que se produzca la migración de la ramificación y permita que la cadena invasora se elimine.

Alternativamente, si el evento de recombinación no se extiende hasta el final del dúplex objetivo, como ocurriría si se tratara una secuencia integrada, entonces la cadena saliente está topológicamente restringida porque está unida físicamente a la cadena complementaria corriente arriba y corriente abajo de la región de recombinación. Dichos intermedios son altamente inestables porque el dúplex recién formado no puede rebobinar sin que la cadena saliente también se enrolle a su alrededor. Y dado que la cadena saliente está restringida en ambos extremos, esto es energéticamente inestable, y el nuevo híbrido se coloca bajo una presión considerable. En consecuencia, se exige mucho más la actividad de las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla en este contexto porque existe un impulso sustancial para expulsar la cadena entrante y rebobinar el dúplex original (Figura 6).

En los presentes esfuerzos por establecer condiciones efectivas para la invasión repetida de cadenas y la extensión de dianas de ADN lineal, se ha observado que solo los oligonucleótidos dirigidos a los extremos de las secuencias lineales se extienden fácilmente a la longitud de la plantilla completa, al menos cuando se usa una polimerasa distributiva como el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E. Coli. Se ha encontrado que, en ciertas condiciones, por ejemplo, cuando se utiliza recA con gp32(N) o E. coli SSB, solo puede ocurrir una ronda de invasión y extensión en cada plantilla diana. Estas observaciones pueden entenderse considerando el resultado de los eventos de invasión que ocurren bajo varias circunstancias diferentes que conducen a cadenas salientes completamente liberadas (articulaciones plectonémicas) o intermedios topológicamente limitados (articulaciones paranémicas). Finalmente, se ha identificado ciertas otras condiciones que son permisivas para múltiples rondas de invasión y extensión desde una única plantilla, una situación ideal para la reacción de RPA. Se propone un modelo basado en los presentes propios datos para consolidar estas observaciones, y formamos un marco alrededor del cual se puede diseñar la optimización de la reacción de RPA. Este modelo tiene en cuenta el comportamiento de la proteína gp32 en diferentes entornos de reacción y justifica los comportamientos de gp32 con los efectos de otros componentes de la reacción (Figura 29).

El modelo describe esquemáticamente la naturaleza y el resultado de los eventos de recombinación entre el final de un dúplex objetivo y un oligonucleótido invasor que inicialmente posee un saliente 5' en relación con el objetivo. Esta situación tipifica la circunstancia experimental que se ha estudiado. A pesar de esta situación inicial, todos, excepto el ciclo inicial, involucran a los oligonucleótidos invasores que tienen su extremo 5' en el extremo 5' del ADN dúplex objetivo. Este es el caso porque la cadena complementaria del ADN objetivo posee un extremo 3' que puede extenderse durante la primera ronda para copiar la región saliente del cebador invasor, que se denomina síntesis en retroceso. Los experimentos realizados con la proteína gp32(N) (en ausencia de PEG), sugieren que una vez que el objetivo está al ras en el extremo 5' del oligonucleótido, es decir, después de la primera ronda, los ciclos subsiguientes de invasión/extensión son muy ineficientes o no lo son. ocurren en absoluto Los primeros experimentos mostraron solo una cantidad aproximadamente equimolar de producto corrido para iniciar la plantilla. ¿Cómo ocurre esto?

Se cree que este bloqueo para la reinvasión/extensión surge porque los oligonucleótidos invasores rara vez están completamente cubiertos por la recombinasa. Por lo tanto, el intercambio completo al extremo de descarga 5' de un objetivo también ocurrirá muy raramente y las cadenas salientes correspondientes permanecerán en un estado restringido (Figura 13). El intercambio es inicialmente incompleto y el intermedio es inestable debido a la incapacidad de permitir que el nuevo dúplex se relaje en una hélice de ADN-B en presencia de la cadena saliente topológicamente restringida. Tales intermedios inestables tendrán una tendencia a rebobinar el dúplex original y expulsar la cadena invasora a medida que se desmonta la recombinasa.

Sin embargo, se encuentra que si se incluye un agente de aglomeración como el polietilenglicol en presencia de gp32(N), se produce una invasión/extensión subsiguiente. Una posibilidad es que, en estas condiciones, los intermedios inestables se estabilicen temporalmente con gp32(N), de modo que pueda producirse una elongación. Es posible que el polietilenglicol actúe para rescatar en parte la escasa cooperación de la gp32(N) comprometida, lo que le permite estabilizar estos intermedios por lo demás inestables. Esta conclusión está respaldada por los presentes datos, que muestran que la gp32 con un marcador N-terminal se atenúa cooperativamente, y la capacidad conocida de los agentes de aglomeración para mejorar la efectividad de las interacciones entre las moléculas, lo que en parte compensa la interacción más pobre entre los monómeros. Inicialmente se creía que este experimento podría explicarse mejor sugiriendo que los filamentos recA eran más abundantes en presencia de PEG, como se informó anteriormente en otro lugar (Lavery PE, Kowalczykowski SC. J Biol Chem. 1992, 5 de mayo; 267(13): 9307-14), sin embargo, se sintió que esto no explicaba adecuadamente el cambio observado desde extremo cerrado, solo una ronda de invasión a múltiples rondas productivas de invasión/extensión.

La diferencia entre la estimulación con PEG de los complementos múltiples de longitud completa en las dianas dirigidas hacia el final en comparación con la actividad mucho más pobre en las dianas realmente integradas (Figura 15), sugiere que la estabilización temporal de un intermediario, como se sugirió anteriormente, es insuficiente solo para generar elongación sustancial. Si este fuera el caso de los ensayos en ejecución en objetivos integrados, debería funcionar tan bien en reinvasión en objetivos dirigidos al final, pero este no es el caso (Figura 15). Alternativamente, la diferencia entre las eficiencias puede explicarse suponiendo que gp32 estabiliza temporalmente un intermedio en donde la extensión 5' del oligonucleótido entrante no está emparejado sino libre, y posiblemente recubierto con gp32 dependiendo de la longitud. Siempre que este segmento no cambiado no esté cubierto con gp32, o que gp32 pueda disociarse fácilmente, como sería el caso sin cooperatividad, entonces la porción más 5' del oligonucleótido podría emparejarse a través de una rápida migración de la ramificación (Figura 29, escenario 1). De hecho, hay una diferencia entre las secuencias verdaderamente incrustadas y la reinvasión en los extremos del ADN (Figura 15). Para las dianas incrustadas, la migración de la ramificación secundaria que conduce a la liberación sin restricciones de la cadena saliente nunca puede ocurrir porque los extremos están demasiado distantes.

Por lo tanto, se llegaría a la conclusión de que el pequeño tamaño de unión al ADN y la alta cooperatividad entre subunidades permiten que las proteínas gp32 permitan múltiples reacciones de invasión y extensión al estabilizar las estructuras articulares paranémicas restringidas durante un tiempo suficiente. Hay varios resultados posibles (Figura 29). Ya sea la última pequeña sección del oligonucleótido en el extremo 5' que no se intercambió inicialmente se hibrida a través de un evento de migración de la ramificación, o el desensamblaje de gp32 en la cadena saliente permite que el oligonucleótido invasor/extendido se pierda a través de la migración de la ramificación. Alternativamente, la carga de recombinasa en la cadena saliente y la reinvasión expulsa la cadena entrante (migración

de burbujas). Si ocurre la hibridación a través de la migración de la ramificación, entonces surge una estructura no restringida que puede ser fácilmente estabilizada y extendida. Si se produce el desensamblaje de la gp32 o la migración de la burbuja, existe un riesgo sustancial de que la nueva cadena de extensión se pierda antes de que se extienda completamente. Si una proteína de unión a ADN de cadena sencilla con un sitio de unión grande, como E. coli SSB, o una con poca cooperatividad, como gp32(N), en ausencia de PEG, no se produce una estabilización temporal y se expulsa el oligonucleótido invasor sin ser extendida.

Por consiguiente, con base en este modelo y las conclusiones anteriores sobre la frecuencia de los filamentos cargados con recombinasa en presencia de varias formas g32, se concluyó que debe alcanzarse un equilibrio entre las actividades de las recombinasas y las moléculas gp32 que mejor se adapte a los diversos requerimientos de las reacciones de amplificación. Se pueden resumir las necesidades y los efectos de las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla en diferentes fases de la reacción de RPA de la siguiente manera.

Fase 1

Las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla ayudan a preparar ADN de cadena sencilla para la carga de recombinasa mediante la fusión de la estructura secundaria, de modo que la carga de recombinasa puede ocurrir de manera consistente. Por lo tanto, la actividad de fusión de las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla es deseable y también desempeña un papel en el silenciamiento del fusionamiento no específico de cebadores. Sin embargo, a pesar de esto, los niveles excesivos de proteína y la cooperatividad excesiva pueden reducir significativamente la cantidad de filamentos cargados con recombinasa disponibles para la invasión.

Fase 2

Las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla recogen la cadena saliente y evitan la expulsión espontánea del oligonucleótido entrante a medida que la recombinasa se desmonta. La inestabilidad de las articulaciones paranémicas significa que las invasiones que ocurren en las secuencias integradas, incluido el caso de que los extremos de los oligonucleótidos estén al ras de los extremos dúplex (como ocurriría durante la mayoría de los ciclos de una amplificación), significa que se puede requerir una actividad cooperativa significativa para muchas situaciones. En general, esta fase de la reacción se beneficiará de un excedente de proteínas de unión a ADN de cadena sencilla altamente cooperativas.

Fase 3

Las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla se unen a la cadena desplazada que se forma durante la síntesis de ADN. Como en la fase 2, esta cadena desplazada puede ser no restringida o topológicamente restringida, y estas dos circunstancias imponen diferentes demandas a la proteína de unión a ADN de cadena sencilla.

Fase 4

En cierta configuración de la reacción de RPA, la cadena saliente de cadena sencilla desplazada debe hibridar con un oligonucleótido asociado para permitir la generación posterior de un nuevo dúplex. Muchas proteínas de unión a ADN de cadena sencilla evitan que las cadenas complementarias se fusionen, sin embargo, la proteína T4 gp32 ayuda a fusionar de nuevo el ADN complementario. Por lo tanto, la proteína bacteriófaga T4 gp32 es una proteína ideal para esta fase.

Longitud del oligonucleótido:

Hay poca evidencia publicada que respalde la eficacia con la que las recA u otras recombinasas podrían usarse con los cebadores de oligonucleótidos sintéticos cortos usados para la RPA. Tampoco está claro si se puede generar un ambiente de reacción estable en donde dichos oligonucleótidos de ADN cortos permanezcan cargados activamente con recombinasa. La mayoría de los estudios realizados con recA utilizan sustratos comparativamente grandes, como las formas de cadena sencilla y de doble cadena del genoma del bacteriófago M13 (muchos miles de residuos) como ADN donante y aceptor. Los ensayos experimentales para la actividad recombinasa a menudo consisten en la formación de eventos de recombinación intermedios o completados, medidos por migración electroforética o microscopía electrónica (Harris LD, Griffith J. J Biol Chem. 1987, 5 de julio; 262(19): 9285-92). Se han descrito algunos experimentos utilizando oligonucleótidos cortos. Se ha demostrado que secuencias tan cortas como 15 nucleótidos ensamblan complejos de búsqueda de homología funcionales con recA en presencia del análogo de cofactor no hidrolizable ATP-γ-S, pero las investigaciones que combinan oligonucleótidos cortos y ATP son ambiguas (Hsieh P, Camerini-Otero CS, Camerini-Otero RD. Proc Natl Acad Sci US A. 1992 15 de julio; 89(14): 6492-6). La función de búsqueda de homología de las recombinasas no es necesariamente suficiente para completar el intercambio de cadenas y liberar del complejo de invasión para permitir el acceso de otras proteínas que metabolizan el ADN, como las polimerasas. De hecho, los estudios han demostrado que recA muestra las transiciones entre la baja tasa de hidrólisis de ATP (un indicador útil de la actividad de unión al ADN combinada y la actividad de la recombinasa funcional) y la alta tasa de hidrólisis en longitudes de oligonucleótidos sustancialmente más largas que los 15 nucleótidos requeridos para la búsqueda. Además, el tipo de cofactor de nucleótido parece influir en la duración de las transiciones de hidrólisis (Katz FS, Bryant FR. Biochemistry. 2001 Sep 18; 40(37): 11082-9). También se ha demostrado que el bacteriófago T4 recombinasa uvsX exhibe propiedades variables en oligonucleótidos cortos, y

muestra cierta sensibilidad a la composición de la base (Formosa T, Alberts BM. J Biol Chem. 1986, 5 de mayo; 261(13): 6107-18). A pesar de esto, tanto uvsX como recA son capaces de realizar eventos de recombinación con sustratos de cadena sencilla de aproximadamente 30 pares de bases o más en presencia de nucleótidos hidrolizables como el ATP, lo que sugiere que el uso de oligonucleótidos dirigidos sintéticos tan cortos es razonable (Salinas F, Jiang H, Kodadek T. J Biol Chem. 1995 10 de marzo; 270(10): 5181-6; Formosa T, Alberts BM. J Biol Chem. 1986, 5 de mayo; 261(13): 6107-18).

Un oligonucleótido que contiene 33 residuos de homología con el extremo de una diana de ADN linealizada puede formar un intermedio de emparejamiento capaz de alargamiento por el fragmento Klenow de E. coli (Figura 9). Este experimento y otros demuestran que las longitudes de homología tan cortas como 33 nucleótidos son suficientes para dirigir los filamentos de recombinasa/ADNss a objetivos apropiados en presencia de ATP y para permitir el intercambio completo de cadenas. Se encontraron resultados similares cuando se usa la proteína bacteriófaga T4 uvsX.

Además de un requisito para una longitud mínima de oligonucleótido, puede haber una pérdida progresiva de la eficacia de la invasión/extensión si el oligonucleótido se extiende significativamente más allá de la longitud mínima requerida para la recombinación, al menos cuando se usan polimerasas distributivas. Una posibilidad radica en la naturaleza de los filamentos de recombinasa/ADNss. Los filamentos recubiertos con recombinasas tienen límites variables de 5' a su recubrimiento, ya que las semillas se recombinan al azar y luego extienden el filamento en una dirección de 5'-3', habrá una distribución de 5' extensiones de recubrimiento. Si se recubren menos de aproximadamente 25-30 nucleótidos, entonces puede ocurrir poca recombinación porque no hay filamento de nucleoproteínas suficiente para el intercambio de cadenas. Si se recubre más de esto, es potencialmente beneficioso desde el punto de vista de la recombinación, pero si se agregan más de 10-20 residuos más allá de la longitud mínima requerida para el intercambio, existe la posibilidad de que progresivamente más filamentos activos posean una recombinasa de suficiente la longitud del ADN para permitir el intercambio, pero retiene suficiente ADN no recubierto 5' para que gp32 se una, lo que a través de la unión cooperativa del extremo 5' podría inhibir la fase de migración de la ramificación y evitar que la cadena saliente no esté restringida. De acuerdo con esta noción, se observa que la estimulación de múltiples eventos de invasión fue menos evidente con el oligonucleótido, el cebador de oligonucleótidos más largo Tester1 bio comparado con Tester3 bio (Figura 15). La única diferencia entre estos oligonucleótidos es que el primero tiene 25 nucleótidos adicionales que sobresalen más allá de los 33 residuos iniciales de homología, mientras que el segundo tiene solo 15 residuos adicionales. Independientemente de la explicación, esta observación experimental sostiene que puede existir una longitud máxima óptima.

Hay otras razones para sospechar que oligonucleótidos más cortos serán los mejores para una RPA eficiente. A las temperaturas relativamente bajas utilizadas en las reacciones de RPA, hay un aumento sustancial en las estructuras secundarias estables de los oligonucleótidos, así como una mayor probabilidad de hibridación inadecuada entre pares de cebadores. A pesar de un exceso total de proteínas de unión a ADN de cadena sencilla, la naturaleza dinámica de la reacción sugerida por la inestabilidad de los filamentos de nucleoproteínas formadas con recombinasas en presencia de ATP significa que es probable que haya un ciclo constante de proteínas dentro y fuera de los oligonucleótidos, y una concentración en estado estable de oligonucleótidos no recubiertos, sin protección. En consecuencia, el uso de oligonucleótidos cortos debería reducir la probabilidad de interacciones intra e intermoleculares indeseables.

Los presentes datos indican que la longitud óptima del oligonucleótido está entre 30 nucleótidos y 50 nucleótidos, y que los oligonucleótidos progresivamente más grandes pueden disminuir la velocidad de invasión/extensión. Sin embargo, puede ser deseable extender la longitud del oligonucleótido para acomodar una región dúplex en la región 3' o 5' del oligonucleótido de búsqueda. Por lo tanto, en un caso, la longitud del cebador preferida está entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 bases. Ejemplos de tamaños de cebadores que se ajustan a al menos uno de estos criterios incluyen cebadores de entre 30 a 45 bases, entre 30 a 40 bases, entre 30 a 35 bases, entre 35 a 40 bases, entre 40 a 45 bases y entre 45 a 50 bases. Aunque se prefieren los tamaños de cebadores mencionados anteriormente, también es posible y se prevé una recombinasa y/o una proteína de unión de cadena sencilla con una longitud de cebador óptima de menos de 30 bases.

Composición, secuencia y carácter de cadena sencilla/dúplex de oligonucleótidos:

1) Composición y secuencia:

El software para diseñar oligonucleótidos para uso en reacciones de síntesis de ADN *in vitro* está bien establecido, particularmente para uso en PCR. Las consideraciones para el método RPA son similares e incluyen la optimización de la temperatura de fusión del oligonucleótido, evitar la formación de horquilla dentro de un oligonucleótido y la selección frente a la complementariedad con otros oligonucleótidos presentes en una reacción dada. Como la RPA se realiza a temperaturas relativamente bajas, tales consideraciones son potencialmente más importantes. Se ha observado la acumulación de productos de cebadores extendidos en las reacciones de RPA, que aparentemente son independientes de la plantilla y dependen de la combinación de los cebadores utilizados. Los tamaños de los productos aberrantes generados sugieren que son dímeros de cebadores, o la consecuencia del autocebado de un solo oligonucleótido. Estos artefactos de cebador indeseables son bien conocidos para otros métodos tales como la PCR. Por lo tanto, es importante diseñar pares de cebadores de oligonucleótidos para evitar reacciones secundarias indeseables. Se ha observado que los oligonucleótidos capaces de formar horquillas pueden autocebarse erróneamente en una reacción RPA.

Además de optimizar el diseño de la secuencia de oligonucleótidos, existen métodos adicionales para reducir o eliminar la formación de dímeros de cebadores. Se ha observado que el ruido de reacción puede reducirse significativamente utilizando polimerasas que carezcan de actividad exonucleasa 3'-5'. Esto sugiere que los oligonucleótidos pueden acortarse debido a la actividad exonucleasa 3'-5' de las polimerasas. En consecuencia, la actividad de edición de exonucleasa 3'-5', la pirofosforesis o cualquier otra actividad de edición similar puede ser una fuente de ruido. Además de usar polimerasas que carecen de actividad exonucleasa y la eliminación de pirofosfato con pirofosfatasa, el uso de oligonucleótidos sintéticos con un esqueleto no hidrolizable en el enlace final y/o penúltimo puede ser beneficioso para reducir el ruido de reacción. Se podrían seleccionar esqueletos alternativos de la considerable gama de químicas disponibles, tales como fosforotiorato, morfolino, ácido nucleico bloqueado o ácido nucleico peptídico.

2) Carácter de cadena sencilla/dúplex:

La disuasión de la extensión aberrante de los extremos del oligonucleótido 3' también se puede lograr diseñando e incluyendo oligonucleótidos competidores cortos que pueden competir eficazmente por la formación de híbridos con la región 3' de los oligonucleótidos de direccionamiento. Tal método podría ser configurado de diversas maneras.

1) Se podría emplear un oligonucleótido independiente corto que comprenda un complemento perfecto para la mayoría de los residuos 3' del oligonucleótido dirigido. Este oligonucleótido sería lo suficientemente largo como para que a la temperatura de reacción sea probable que forme un híbrido con el oligonucleótido dirigido de manera moderadamente eficiente. Esto podría tener entre 6 y 15 residuos de longitud. El oligonucleótido corto no se podrá extender al tener un grupo bloqueador en su extremo 3', como un azúcar didesoxi u otro grupo bloqueador 3'. Este oligonucleótido también puede requerir un enlace no fosfato en el enlace principal y/o penúltimo para evitar la eliminación de bases en la dirección 3' a 5' mediante actividades de edición. Aunque una gran proporción de oligonucleótidos diana no recubiertos de proteínas pueden formar dúplex con este corto oligonucleótido, esto no debería disminuir significativamente la velocidad y la eficiencia de la reacción de RPA. En primer lugar, debido a que a la baja temperatura de la reacción de RPA es probable que haya un equilibrio entre los oligonucleótidos hibridados y no hibridados, siempre habrá un conjunto de oligonucleótidos dirigidos libres fundidos disponibles. Como el oligonucleótido es un mejor competidor que otras secuencias aleatorias en la reacción, será favorecido contra otras interacciones transitorias. En segundo lugar, las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla tales como recA, uvsX, gp32 y E. coli SSB, tienden a fundir el ADN dúplex y, por lo tanto, incluso si los híbridos son relativamente estables a la temperatura de reacción cuando no hay proteínas unidas, cuando se unen a parte de una sola cadena del oligonucleótido y se extienden cooperativamente a la región del dúplex, es probable que aumenten su fusión, por lo que el estado dúplex tenderá a existir solo en los oligonucleótidos desnudos. Finalmente, las recombinasas tienen la capacidad de extender el intercambio de cadenas iniciado entre una región de ADN de cadena sencilla y un objetivo dúplex en regiones en las que ambos ADN son dúplex. Esto parece ser una actividad de migración de la ramificación dependiente de ATP. En conjunto, estas consideraciones sugieren que la región dúplex corta no debe reducir significativamente la velocidad de la reacción de RPA, sino que actúa para suprimir la formación de dímeros de cebadores u otros artefactos generados a partir de oligonucleótidos no recubiertos de proteínas al ser un mejor competidor para la unión a región 3' del cebador de direccionamiento que otras secuencias de oligonucleótidos disponibles en la reacción. Si se usan polimerasas deficientes en exonucleasas, puede ser óptimo diseñar este oligonucleótido para que tenga el emparejamiento de la mayoría de sus 5' con el penúltimo, en lugar del último nucleótido de 3', ya que muchas polimerasas tienden a agregar una base adicional a un extremo perfectamente romo.

2) En un segundo método, el oligonucleótido dirigido posee un saliente 5' no presente en el ADN objetivo inicial, y este saliente es el complemento inverso exacto de la secuencia al extremo 3' del mismo oligonucleótido dirigido, tal vez con la mayoría de la base 3' no está emparejada (Figura 35 parte D). La longitud de este oligonucleótido complementario debe ser relativamente corta, pero lo suficientemente larga como para ser un competidor mucho mejor que otras secuencias de oligonucleótidos presentes en la reacción. Por ejemplo, entre 6 y 10 nucleótidos podría ser óptimo. Como se describe para la primera aproximación, esta disposición probablemente conduzca a que cualquier oligonucleótido no recubierto forme estructuras de horquilla para ellos mucho más eficientemente que a cualquier otra secuencia. Como el diseño colocará la base 3', o penúltima base 3', del oligonucleótido en un entorno perfecto de emparejamiento de bases, pero en el extremo 5' del oligonucleótido dirigido, no se puede extender, aparte de la adición del único residuo a menudo catalizado por muchas polimerasas si el final es romo. En este contexto, puede estar bien dejar intacta la actividad de edición de las polimerasas. Tales oligonucleótidos que forman una horquilla pueden suprimir la actividad errónea de los oligonucleótidos desnudos sin disuadir la actividad de los filamentos cargados de proteínas. Sin embargo, hay algunas consideraciones importantes para adoptar este método. En primer lugar, si la carga de recombinasa se inicia directamente en el oligonucleótido desnudo parcialmente dúplex sin la fusión inicial de la sección dúplex, la recombinasa puede no extenderse tan cerca del extremo 5' del oligonucleótido de direccionamiento como podría ser óptimo. En segundo lugar, a medida que la reacción de amplificación continúa más allá de la primera ronda, habrá un desplazamiento activo de los productos generados a partir de rondas previas de síntesis y, si se produce un desplazamiento completo, el extremo 3' de una cadena desplazada, que es complementaria de las secuencias inmediatamente adyacentes, puede ser capaz de hacer una horquilla y autocebarse rápidamente. Un evento de autocebado tan rápido resultaría en la síntesis de ADN y la formación de un nuevo ADN de doble cadena con ambas cadenas unidas por una horquilla en un extremo. Esto podría ser un sustrato para rondas adicionales de invasión/síntesis y dar como resultado la formación de productos parecidos a dímeros y posiblemente productos más complejos (véase figura 35). Se anticipa que esta situación puede ser perfectamente aceptable para

las pruebas de diagnóstico. Como todas las secuencias amplificadas dependen de la presencia de ADN diana fidedigno y contendrán las secuencias interoligonucleotídicas únicas, y como el evento de autocebado puede diseñarse para funcionar de manera eficiente, entonces esto puede ser un formato ideal para los ensayos de diagnóstico. Ya se ha experimentado la generación de un fragmento de ADN amplificado mayor a la unidad que aparentemente se genera a partir de objetivos específicos y sospechamos que este mecanismo puede operar en ausencia de un diseño de oligonucleótido específico. Se ha descrito una actividad similar, aunque en este caso la actividad se inició de una manera totalmente diferente utilizando un único ADN de una sola cadena muy grande (Morrical SW, Wong ML, Alberts BM. J Biol Chem. 1991, 25 de julio; 266(21): 14031-8).

3.) En un método final, se emplearían oligonucleótidos cortos separados con extremos 3' bloqueados como se describe en el método 1. En este caso, sin embargo, un enlace se diseña entre el extremo 5' del oligonucleótido dirigido y el 5' o 3' final del oligonucleótido competidor corto (Figura 35 partes B y C), este método es similar al método 1, excepto que al unir el oligonucleótido competidor en la proximidad cercana del oligonucleótido de direccionamiento se asegura una competencia eficiente de este oligonucleótido con cualquier otra secuencia en la reacción.

Selección de la polimerasa:

Hay muchos ADN polimerasas que podrían usarse para RPA. Sin embargo, hay una serie de criterios que deben considerarse al diseñar el formato RPA óptimo para una aplicación determinada. Se ha identificado varias polimerasas diferentes con actividad en las reacciones de RPA, y se ha deducido qué propiedades confieren ventajas específicas para diferentes circunstancias. Una conclusión interesante es que las polimerasas de sistemas heterólogos pueden usarse de manera efectiva. Se discuten a continuación las actividades de polimerasa más relevantes para RPA.

Capacidad de procesamiento de la polimerasa

La capacidad de procesamiento de la polimerasa se mide como el número típico de eventos de incorporación catalizados en cada interacción individual con una plantilla de ADN. Muchas de las enzimas polimerasas utilizadas en las aplicaciones de biología molecular no son altamente capaces de procesamiento, a menudo porque son análogos funcionales de la ADN polimerasa I de E. coli, cuya función principal es la reparación del ADN y el procesamiento del fragmento Okazaki. La capacidad de procesamiento es una consideración más crítica para RPA que para PCR. Debido a que RPA utiliza una plantilla de doble cadena, las polimerasas distributivas producirán cadenas parcialmente copiadas que poseen una articulación, que podría ser expulsada por la migración de la ramificación. Además, existe evidencia que sugiere que la migración de burbujas puede ocurrir en una variedad de configuraciones de RPA. En la migración de la burbuja, las cadenas parentales de la plantilla de ADN se vuelven a hibridar poco después del complejo de replicación, lo que lleva a la expulsión de la nueva cadena sintetizada, que se libera como un ADN de cadena sencilla en lugar de la cadena saliente del evento de recombinación original. Esta rehibridación se ha descrito previamente en el sistema de síntesis de ADN/recombinación T4 y se cree que involucra el recubrimiento de la cadena saliente con la recombinasa uvsX y la reinvasión posterior. Alternativamente, en presencia de una proteína de unión a ADN de cadena sencilla no cooperativa, los monómeros pueden perderse progresivamente desde un extremo de la cadena saliente y pueden conducir a una migración progresiva de la ramificación en una dirección 5'-3', persiguiendo el complejo de replicación.

Por lo tanto, si la polimerasa se disocia prematuramente de la plantilla, la migración de la burbuja o la migración de la ramificación puede hacer que la nueva cadena sintetizada se separe de la plantilla como una única cadena incompleta. Esto podría ser catastrófico para las reacciones de RPA, porque si tales productos truncados son demasiado cortos para formar híbridos productivos con productos similares generados desde el lado opuesto, estos productos cortos no deseados se acumularán linealmente. La proteína de unión a ADN de cadena sencilla T4 gp32 puede aliviar la migración de ramificaciones no deseables. Sin embargo, RPA insta, cuando sea posible, el uso de polimerasas relativamente capaces de procesamiento, o complejos de polimerasa, para amplificar de manera eficiente fragmentos de ADN más grandes. Se sabe que varias polimerasas simples utilizadas en la actualidad, como la ADN polimerasa Phi-29, la ADN polimerasa Bst y la ADN polimerasa T7 en complejo con tiorredoxina son procesales. Sin embargo, no todas las clases conocidas de polimerasas relativamente capaces de procesamiento pueden poseer las propiedades adicionales combinadas adecuadas para RPA; la polimerasa Phi-29 no ha sido capaz de soportar amplificaciones geométricas de RPA hasta la fecha, posiblemente debido a una incapacidad para cargar eficientemente sobre los intermedios de recombinación. La ADN polimerasa de T7 carece de suficiente actividad de desplazamiento de cadena para ser eficaz. En contraste, supusimos que las enzimas Pol I relacionadas de Bacilli, como Bacillus subtilis PolI (Bsu), probablemente demostrarían características óptimas en virtud de compartir con la polimerasa Bst relativa capacidad de procesamiento y exonucleasa estado negativo, pero conservando la solubilidad óptima y perfiles de actividad a temperaturas en el rango de 30-37°C. Además, se podrían usar complejos de replicación de múltiples subunidades que incorporan pinzas deslizantes, como las del bacteriófago T4, E. coli, y otros, sin embargo, reunir todos estos componentes en reacciones *in vitro* efectivas que mantienen la excelente señal: ruido y propiedades cinéticas de la corriente. Las reacciones de RPA siguen siendo un reto. Purificamos la Polimerasa I de B. subtilis que está relacionada con la Bst polimerasa. Esta polimerasa se sobreproduce y purifica fácilmente a partir de E. coli con una etiqueta de hexhistidina N-terminal, y parece poseer los atributos bioquímicos ideales para RPA.

Finalmente, hay algunas situaciones donde una polimerasa distributiva puede ser más apropiada para RPA. Debido a que, en muchas configuraciones, la síntesis de ADN se inicia desde extremos opuestos y los complejos de replicación

se mueven uno hacia el otro, existe la posibilidad de una colisión entre complejos que resulta en un estancamiento en donde ninguno de los dos progresa. Esto requiere que una polimerasa se disocie temporalmente de la plantilla o que las polimerasas utilizadas puedan pasar entre sí de manera efectiva sin disociación. Como consecuencia de los requisitos variables para una polimerasa ideal para RPA, se sugiere que la evidencia experimental será la mejor guía, y hasta la fecha esto implica que las enzimas de la clase Pol I de las eubacterias, en particular de los bacilos, muestran actualmente las mejores propiedades.

Actividad en la exonucleasa 3'-5' asociada con la ADN polimerasa:

Muchas ADN polimerasas poseen actividad exonucleasa 3'-5', y algunas también poseen actividad exonucleasa 5'-3', lo que probablemente sea indeseable en RPA ya que da como resultado la digestión de una cadena de ADN progresivamente a medida que la polimerasa avanza, en lugar del desplazamiento. La exonucleasa 3'-5' tiene ventajas potenciales, así como sus obvias desventajas. Por un lado, la actividad de exonucleasa 3'-5' aumenta la fidelidad de la reacción de replicación, y también puede prevenir el bloqueo de las polimerasas en los puntos de incorporación incorrecta. La amplificación de alta fidelidad es deseable para muchas aplicaciones de ADN. La actividad de la exonucleasa 3'-5' también puede ser apropiada para la amplificación de fragmentos de ADN más grandes, donde el bloqueo debido a una mala incorporación podría inhibir la amplificación efectiva.

A pesar de estas claras ventajas de la actividad de exonucleasa 3'-5' hay algunas desventajas. Se ha observado que los oligonucleótidos libres pueden someterse a una degradación dependiente del extremo cuando se emplean polimerasas que poseen exonucleasa 3'-5'. Esto puede ser suprimido en gran medida usando cantidades saturadas de proteína gp32 relativamente cooperativa con algunas polimerasas como el fragmento Klenow, pero con enzimas que poseen exonucleasas agresivas como la ADN polimerasa T4 o ADN polimerasa Phi-29, la gp32 parece ser insuficiente y los oligonucleótidos parecen estar completamente degradados. Estos datos sostienen que es ventajoso limitar al menos hasta cierto punto la eficacia de una actividad de exonucleasa en la reacción.

Se ha encontrado que la actividad de exonucleasa 3'-5' de algunas polimerasas puede contribuir sustancialmente al ruido en la reacción. A las temperaturas relativamente bajas utilizadas en las reacciones de RPA, existe una tendencia significativa a que las moléculas de ADN de cadena sencilla no recubiertas formen híbridos inapropiados, con baja complementariedad, con otros ADN en la reacción. Tales híbridos cebarán la ADN polimerasas alargamiento. Para que se produzca la extensión, la última base o dos deben emparejarse correctamente con su complemento. Si bien los segmentos que se complementan mal dentro o entre los oligonucleótidos pueden formar híbridos débiles a bajas temperaturas, estos raramente se combinarán con una buena combinación híbrida en el extremo 3'. En cualquier caso, en presencia de una actividad de exonucleasa 3'-5', la mayoría de las bases no pareadas se extirparán hasta que se forme un extremo 3' correctamente emparejado, como ocurre normalmente cuando la polimerasa inserta una base incorrecta. Los presentes datos sugieren que las cadenas parcialmente extendidas que han sido desplazadas por la migración de la ramificación o la migración de la burbuja pueden plegarse sobre sí mismas dejando un extremo 3' no pareado, que se recorta, lo que promueve un alargamiento de la polimerasa inadecuado. Por lo tanto, existen buenas razones para limitar o eliminar las actividades exonucleasas de las polimerasas utilizadas en RPA. Hay otros métodos para inhibir la degradación del oligonucleótido que también se pueden usar.

Acceso a los extremos 3'

El intermedio de recombinación formado después de la invasión debe ser accesible a la ADN polimerasa. La estructura cerca del extremo 3' del oligonucleótido dirigido no es equivalente al extremo 3' de un oligonucleótido hibridado con el ADN de otra cadena, que es la situación en la PCR. En su lugar, la cadena saliente, que se hibrida con la cadena de la plantilla inmediatamente o poco después del extremo 3' del oligonucleótido invasor puede bloquear la carga de la polimerasa. Además, el hecho de que la cadena saliente esté restringida o no, puede afectar la capacidad de ciertas polimerasas para cargar con éxito. Si una polimerasa en particular puede funcionar eficazmente en estas situaciones debe abordarse experimentalmente. Se encuentra que el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E. coli, así como la ADN polimerasa Bst purificada a partir de Bacillus stearothermophilus, pueden cargar y extender dichos intermedios de recombinación. Helicasas como la T4 dda helicasa y T4 gp41 helicasa también pueden funcionar para procesar intermedios de recombinación y separar la plantilla y las cadenas salientes corriente abajo del evento de intercambio permitiendo el uso de otras polimerasas, pero estas helicasas también pueden interferir con otros aspectos de RPA (véase abajo). Finalmente, puede ser beneficioso usar mezclas de polimerasas, que actúan de manera sinérgica en la reacción de RPA, por ejemplo, una polimerasa eficaz para acceder a los extremos 3' de los intermedios de recombinación, y la otra que posee actividad sintética procesadora, de cadena desplazada.

Interacciones del componente cooperativo

Se ha demostrado que los componentes enzimáticos de sistemas heterólogos se pueden combinar entre sí de manera efectiva en diversos formatos RPA. Por ejemplo, tanto el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de E. coli, la ADN polimerasa Bst de Bacillus stearothermophilus, como el fragmento grande de la polimerasa I de Bacillus subtilis, pueden extender los productos de recombinación generados con la recombinasa uvsX del bacteriófago T4 en presencia de proteína del bacteriófago T4 gp32. Esto sugiere que la clase de polimerasas similares a E. coli Pol I son generalmente efectivas en las reacciones de RPA, y esto puede reflejar sus propiedades distintivas como enzimas que desplazan cadenas, combinadas con el acceso a intermediarios de recombinación necesarios para sus

actividades de reparación. Además, es incierto que el alargamiento de los intermedios de recombinación pueda ser mediado fácilmente por polimerasas de grupos estructurales muy diferentes. A pesar de las indicaciones iniciales de los intermedios de recombinación dirigidos al final estabilizados por la síntesis en retroceso, no se ha podido dirigir las reacciones de RPA utilizando la polimerasa Phi-29, y esto puede reflejar que esta enzima no puede cargarse fácilmente en los intermedios de recombinación. Puede haber efectos sinérgicos adicionales cuando las proteínas del mismo organismo se emplean juntas. Por ejemplo, se sabe que existen interacciones físicas entre los componentes del bacteriófago T4, como uvsY y uvsX, así como gp32. Esto podría extenderse a otros componentes, por ejemplo, la polimerasa T4 interactúa funcionalmente con la helicasa gp41 y físicamente con gp32 (Formosa and Alberts PNAS 80, 2442-2446, 1983). Sin embargo, a pesar del atractivo aparente de usar componentes del mismo organismo para mejorar la eficiencia de la RPA, se ha encontrado que una helicasa empleada para la síntesis de ADN en proceso por la polimerasa T4 puede no combinarse fácilmente con el entorno RPA efectivo como se establece aquí. Los primeros experimentos sugirieron que la inclusión de helicasa T4 dda puede interrumpir el recubrimiento de los oligonucleótidos en el entorno RPA y provocar un ruido excesivo del cebador que previene las reacciones sensibles de RPA. Esto es consistente con un informe publicado anteriormente [JBC. 1991 25 de mayo; 266(15): 9712-8. Inhibition of protein-mediated homologous pairing by a DNA helicasa. Kodadek T.]

Resolución de colisiones complejas de replicación.

En algunos formatos de RPA, como cuando se desea un producto grande de ADN, una polimerasa de proceso sería la opción óptima. Sin embargo, bajo estas condiciones, existe una probabilidad significativa de que los complejos de replicación converjan entre sí en la misma plantilla. Existe el peligro de que los complejos de replicación se bloqueen cabeza a cabeza para que ninguno de los dos pueda pasar. Las más útiles en esta situación son las polimerasas que son tanto procesables como capaces de resolver colisiones como se ha demostrado para la ADN polimerasa Phi29 (Elias-Arnanz M, Salas M. EMBO J. 1997 Sep 15; 16(18): 5775-83). Alternativamente, un buen equilibrio, pero crítico, de un nivel ideal de capacidad de procesamiento para permitir ejecuciones replicativas útiles combinadas con una capacidad distributiva para disociar con bastante frecuencia puede resolver este problema.

Recombinasas

Se ha analizado tanto la proteína recA de E. coli como la proteína uvsX T4 del bacteriófago en experimentos de RPA. Ambas proteínas comparten una homología de secuencia de proteínas limitada y se cree que han evolucionado a partir de un progenitor común. Los estudios cristalográficos y de microscopía electrónica de los filamentos de nucleoproteínas de estas proteínas, que muestran una estructura de filamentos conservada, en términos del paso de las hélices formadas en los estados enlazados tanto de ATP como de ADP, sugieren una notable similitud en su mecanismo de acción. Además, todos los procariotas poseen proteínas altamente homólogas a recA, lo que sugiere que las actividades principales de las recombinasas se han conservado a lo largo de la evolución. Por lo tanto, lo que se aprende de una recombinasa se puede aplicar o sustituir por otra.

Sin embargo, además de sus similitudes, existen diferencias entre recA y uvsX relevantes para RPA y como componentes adicionales de la maquinaria de recombinación/replicación se utilizan en las reacciones RPA. Las interacciones proteína-proteína específicas del organismo pueden tener un efecto significativo en la eficacia de la reacción. La tasa de hidrólisis de nucleótidos de uvsX es 10-20 veces más alta que la de recA, lo que sugiere que podría realizar reacciones de recombinación a una tasa acelerada (Formosa T, Alberts BM. J Biol Chem. 1986, may 5; 261(13): 6107-18.). Un aumento en la tasa de hidrólisis podría ser beneficioso para las reacciones de RPA de varias maneras.

1) La rotación más dinámica de uvsX en los oligonucleótidos podría aumentar la regeneración general de los filamentos de nucleoproteínas, lo que lleva a una cobertura casi completa de la recombinasa hasta el extremo más 5' de los oligonucleótidos invasores.

2) La finalización y el desensamblaje más rápidos de la recombinasa de los eventos de recombinación exitosos permitirán un acceso a la polimerasa más eficiente.

3) Una recombinasa más activa producirá un filamento de nucleoproteínas más flexible.

Otra diferencia importante entre uvsX y recA es que uvsX hidroliza ATP a ADP más fosfato, y a AMP más pirofosfato, mientras que recA y otras recombinasas no lo hacen (Formosa T, Alberts BM. J Biol Chem. 1986 May 5; 261(13): 6107-18). Se desconoce el significado biológico de esta diferencia, pero la actividad podría afectar la eficiencia de la RPA. Por ejemplo, el paso de los filamentos de nucleoproteína formados con ATP y ADP es diferente y la hidrólisis de ATP a ADP está asociada con la flexibilidad general del filamento. Puede ser que los uvsX unidos a AMP puedan adoptar un tono diferente y posean una flexibilidad distinta.

El bacteriófago T4 recombinase uvsX estimula un modo de desplazamiento de ADN después de la síntesis conocida como migración de burbujas. En la migración de burbujas, uvsX se ensambla en la cadena saliente y media una reinvasión de la cadena saliente, desplazando así la cadena recién sintetizada. Este modo puede tener importancia biológica porque al desplazar la cadena recién sintetizada, la longitud de la región con restricción topológica es limitada. Este proceso no se ha descrito para recA, aunque puede ocurrir. No obstante, varios aspectos de la migración de burbujas sugieren diferencias reales entre uvsX y recA. Por ejemplo, el modelo de migración de burbujas sugiere

que es posible que el ADN unido a uvsX se extienda hasta el final del ADN invasor o parcialmente extendido, pero que las polimerasas aún puedan acceder a esta estructura para el alargamiento (Formosa T, Alberts BM. Cell. 1986 Dec 5; 47(5): 793-806). Esto ciertamente no se ha observado para recA, y si hay alguna evidencia que pueda ser lo contrario (Xu L, Marians KJ. J Biol Chem. 2002 Apr 19; 277(16): 14321-8). No está claro cómo los filamentos uvsX y recA son similares en sus capacidades respectivas para promover la carga de polimerasa en los extremos 3' con o sin disociación de recombinasa. Se ha encontrado diferencias entre uvsX(C) y recA(C) que concuerdan con la noción de que sus diferencias pueden afectar la eficiencia de la RPA. Al contrario de los presentes hallazgos con recA, uvsX puede mediar múltiples invasiones a un objetivo de estructura final incluso cuando se utiliza gp32 etiquetado en el extremo N en ausencia de polietilenglicol (Figura 23). Por lo tanto, uvsX puede ser más óptimo para su uso en RPA.

El bacteriófago T4 uvsX recombinasa tiene una interacción bien caracterizada con su proteína de carga uvsY asociada. A pesar de los informes que sugieren que E. coli recO y recR pueden ser análogos funcionales de uvsY, no se ha observado una mejora significativa para las reacciones de RPA. Esto puede deberse a problemas con las presentes preparaciones de proteínas o al uso de la gp32 heteróloga en lugar de la SSB de E. coli.

Finalmente, es probable que uvsX se comporte mejor con gp32, lo que nos parece una proteína de unión a ADN de cadena sencilla óptima, porque han evolucionado para funcionar en concierto y pueden tener interacciones relevantes. De hecho, uvsX y otros componentes de la maquinaria de replicación dependiente de la recombinación del bacteriófago T4, como la helicasa dda, tienen interacciones conocidas proteína-proteína que pueden ser útiles para establecer una reacción RPA óptima (Hacker KJ, Alberts BM. J Biol Chem. 1992, october 15; 267(29): 20674-81).

A pesar de las ventajas aparentes de uvsX para RPA, hay características de recA de E. coli que pueden ser útiles. Se ha informado de que los filamentos de nucleoproteínas recA son más estables, lo que podría ser útil en algunas circunstancias. La menor tasa de hidrólisis de ATP ejerce menos presión en el establecimiento de un sistema de regeneración de ATP duradero, y la falta de generación de AMP y pirofosfato evita la necesidad de regenerar y limpiar estos productos secundarios. También puede darse el caso de que otros homólogos recA posean actividades que sean óptimas o RPA.

Establecimiento de un sistema dinámico de recombinación:

Para hacer que la RPA sea robusta, es crítico configurar la reacción para proporcionar un número suficiente de filamentos de recombinasa/ADN activos, recubiertos y con búsqueda de homología. Además, después de completar la búsqueda de homología, los filamentos deben desmontarse de manera eficiente, o procesarse de otro modo, para permitir la carga de ADN polimerasa y otros componentes. También es esencial que esté presente una cantidad suficiente de proteína de unión a ADN de cadena sencilla tanto para facilitar la fusión del oligonucleótido como para recoger las cadenas salientes desplazadas. Y, finalmente, los requisitos de RPA robustos requerirán la síntesis de ADN de desplazamiento de cadena de proceso. Detrás de estos requisitos se encuentra una competencia entre dos, la recombinasa y la proteína de unión a ADN de cadena sencilla.

Es ampliamente conocido que los filamentos de ADN cargados con recombinasa son inestables en presencia de proteínas de unión a ADN de cadena sencilla. Junto con el hallazgo de que la hidrólisis del cofactor de nucleótido no es estrictamente necesaria para la búsqueda de homología, condujo al uso de análogos de nucleótidos no hidrolizables de nucleótidos como ATP-γ-S, para cargar recA en los filamentos y producir complejos de búsqueda de homología estables. Un método de amplificación mediado por recA que utiliza ATP-γ-S se ha descrito (Zarling, et al.), Sin embargo, no se ha utilizado ampliamente. Anteriormente se identificó una falla en el método, que ahora se puede observar en los presentes resultados experimentales. El Zarling, et al. el método probablemente falla porque los filamentos cargados con recombinasa deben ser dinámicos y capaces de desensamblarse, así como otros eventos dependientes de la hidrólisis del ATP para completar el intercambio de cadenas y permitir la carga de otros componentes de ADN polimerasa en el extremo 3' del oligonucleótido invasor. El uso de ATP-γ-S, así como otras modificaciones, como la eliminación de secuencias ácidas del término C de las recombinasas, conduce a una constante alta afinidad general por el ADN que probablemente evita el intercambio de cadenas y la disociación del complejo de invasión. Por lo tanto, los filamentos recA cargados con ATP-γ-S se bloquean efectivamente en el sitio diana en el evento de recombinación durante un tiempo anormalmente largo. En consecuencia, los análogos de nucleótidos no hidrolizables generalmente no son permisivos para la replicación y amplificación mediada por recombinasa. En su lugar, debe emplearse ATP u otros nucleótidos hidrolizables capaces de soportar la carga de recombinasa. En el ATP, las recombinasas se asocian y se disocian constantemente del oligonucleótido y compiten con las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla. Se ha abordado el problema que plantea esta competencia de dos maneras generales; primero, incluyendo una proteína de carga de recombinasa específica para uvsX, la proteína uvsY, y luego modulando el comportamiento cooperativo de gp32, y las recombinasas uvsX y recA, por mutación y/o inclusión de agentes de aglomeración. Sin embargo, es posible que se incluyan cantidades limitadas de análogos no hidrolizables tales como ATP-γ-S, o de análogos no fosforilables tales como ADP-β-S, para modular la actividad global de carga/descarga de la recombinasa.

Componentes de reacción adicionales

Varios componentes de reacción específicos tienen una influencia significativa en la eficacia de la reacción de RPA.

Polietilenglicol

Los polietilenglicoles (PEG) tienen un efecto profundo en la síntesis de recombinación/ADN. En primer lugar, se encuentra que los PEG influyen en el número de ciclos múltiples de invasión/extensión que ocurren, por ejemplo, cuando recA se combina con gp32(N). También se ha encontrado que los PEG estimulan las reacciones de amplificación configuradas de varias maneras diferentes (Figura 15, Ejemplo 3). También sabemos que, en algunas configuraciones, los PEG alteran la distribución de la longitud de los productos formados (Figura 28). En resumen, los polietilenglicoles y, presumiblemente, otros agentes de aglomeración similares pueden afectar la cooperatividad de gp32 y las recombinasas, afectar la capacidad de procesamiento de la polimerasa y afectar la tasa de hibridación y el comportamiento de los oligonucleótidos en solución. Pueden impregnar entornos similares a las células al dividir en fases los reactivos y/o provocar el desarrollo de cinéticas de tipo fractal. Además, la longitud de la cadena del polietilenglicol parece ser crítica. Se encuentra que, de los analizados, los PEG de peso molecular promedio 1450 y 15-20000 ("compuesto" de PEG) producen los mejores resultados. Los PEG para ayudar a la función gp32, particularmente las variantes de gp32 con cooperatividad atenuada, se han detallado anteriormente. También es probable que el PEG aumente la estabilidad de los filamentos cargados con recombinasa y el aumento de la persistencia puede aumentar la eficacia de la RPA. Lo más importante es que se ha sido completamente incapaces de establecer condiciones de amplificación capaces de amplificar de trazas de muestra a niveles detectables sin emplear polietilenglicoles (mal con PEG 1450, muy eficientemente con compuesto de PEG). Presumiblemente, otros agentes también pueden estimular las reacciones de RPA, sin embargo, este efecto fue evidente en experimentos preliminares con alcohol polivinílico. Por lo tanto, las características específicas de los polietilenglicoles y, más particularmente, las variantes específicas de los PEG, pueden ser esenciales.

De qué manera el compuesto de PEG (carbowax 20M) logra un efecto estimulante tan significativo es un misterio. Los modelos cinéticos de la manera en que la exclusión de volumen puede afectar las tasas de reacción pondrían un énfasis significativo en los pesos moleculares de los sustratos y enzimas en estudio en comparación con el componente de aglomeración. Sin embargo, el siguiente agente más efectivo que se probó, el PEG 1450, también fue el más pequeño y la estimulación con polietilenglicoles intermedios entre el PEG1450 y el compuesto de PEG fue menos eficaz. En consecuencia, sospechamos que las propiedades adicionales a la longitud promedio de la cadena son críticas para los efectos de estos agentes. Por ejemplo, pueden ocurrir transiciones de fase específicas a temperaturas variables para diferentes PEG. También se sabe que los grupos de alcohol de los PEG pueden conducir a interacciones adicionales, como las proteínas, o que influyen en el ambiente iónico. Se notó (datos no mostrados) que la adición de un 5% de compuesto de PEG (mientras se desarrolla un pH por debajo de 7.0 durante el almacenamiento a temperatura ambiente) a las soluciones reguladas con Tris usadas en RPA causa un aumento agudo en el pH.

Como consecuencia, actualmente no existe una forma de fórmula para determinar qué agentes excluyentes de volumen tendrán las propiedades correctas para estimular entornos de recombinación dinámica de alto nivel, y RPA en particular, excepto a través de la validación experimental.

Componentes del sistema de regeneración de ATP.

Un sistema de regeneración de ATP es crucial para permitir reacciones de recombinación persistentes, ya que las recombinasas tienen una tasa extremadamente alta de hidrólisis de ATP cuando se unen a los ácidos nucleicos. En particular, la proteína uvsX tiene una tasa de hidrólisis 10-20 veces mayor que la recA y puede consumir 200 moléculas de ATP por minuto por monómero. Hay varios sistemas disponibles y habitualmente se ha utilizado el sistema de creatina quinasa/fosfocreatina. Cuando se emplea uvsX, el AMP que se produce debe convertirse en ATP. Se ha utilizado la mioquinasa de pollo, que convierte una molécula de AMP y una de ATP en dos moléculas de ADP. ADP se convierte luego en ATP utilizando el sistema de creatina quinasa/fosfocreatina. La mala regeneración de ATP reducirá la velocidad de reacción y probablemente detendrá la reacción antes de que se acumulen niveles detectables de producto.

Pirofosfatasa

El pirofosfato (PPi) se acumula durante la síntesis de ADN y cuando se emplea uvsX, ya que hidroliza ATP a AMP + PPi. La acumulación de PPi en la reacción puede tener varias consecuencias perjudiciales. Una acumulación significativa de pirofosfato permitirá una tasa inaceptable de pirofosforesis, por lo que la reacción sintética de una polimerasa se revierte y elimina la mayoría de los nucleótidos 3' de las plantillas dúplex. Esto podría llevar a niveles inaceptables de ruido del cebador, o niveles mejorados de autocebado no deseado de las cadenas salientes, ya que las actividades de edición de la polimerasa tienden a recortar los extremos 3' hasta que se revela una región dúplex adecuada para permitir un rápido alargamiento. Además, la acumulación de pirofosfatasa conducirá a la inhibición de la recombinasa y a una ralentización de la reacción sintética de la polimerasa.

Señal mejorada: Ruido por diseño de reacciones RPA.

RPA muestra alta sensibilidad y especificidad. Sin embargo, las muestras que no contienen ninguna diana a menudo generan productos derivados solo de los cebadores. Tales fenómenos no son infrecuentes en otros métodos. Por ejemplo, el método de PCR en última instancia generará productos no específicos, como los llamados 'dímeros de

cebadores'. La RPA es algo propensa a tales artefactos relacionados con los cebadores porque no hay un control del ciclo que permita que los pequeños amplicones logren muchas duplicaciones dentro del período de la incubación. La electroforesis de los productos de reacción permite una fácil separación de la señal y el ruido; sin embargo, en los productos de diagnóstico simples que no son de laboratorio, deben adoptarse otros métodos. Aquí se revelan métodos para hacer que dichas pruebas de diagnóstico que no sean de gel funcionen con una señal adecuada para el ruido y para llevar a cabo fácilmente la detección. También se revela la composición de un liofilizado de reacción que puede almacenarse durante muchos días a temperatura ambiente, un requisito previo para un fácil uso no de laboratorio.

Relación señal/ruido en el sistema RPA

Los sistemas de amplificación de ADN generalmente se enfrentan al hecho de que puede producirse una amplificación del ADN que no se inicia desde el objetivo bona fide. Este 'ruido', particularmente aparente en condiciones de bajo objetivo, puede imponer restricciones en la sensibilidad permitida y métodos para evaluar la amplificación. Si bien las configuraciones iniciales de RPA ofrecen una sensibilidad exquisita, se cree que las propiedades novedosas del sistema basado en recombinasa se prestan a métodos previamente sin explotar para mejorar la especificidad y al desarrollo de un nuevo esquema de detección de productos.

Las reacciones de amplificación de RPA, como la PCR, se establecen generalmente mediante la combinación de dos oligonucleótidos, que flanquean el ADN objetivo deseado. Ocurren eventos de duplicación y, como en la PCR, se produce una amplificación exponencial del ADN, que permite una amplificación de hasta 10^{12} veces para fragmentos de ~150-400 pb.

Cuando se prueban cebadores de 30-35 residuos y son aceptables para algoritmos de diseño estándar, una proporción significativa amplifica el objetivo con alta sensibilidad y especificidad (Figura 41). Por ejemplo, estos cebadores 'buenos' pueden amplificar con éxito las dianas desde concentraciones objetivo iniciales de 2-3 copias por microlitro para generar niveles significativos del amplicón correcto. Sin embargo, por debajo de esta densidad de copia, incluso los cebadores buenos tienden a generar ruido (frotis, escalonamiento y/o tinción de pozo), como se analiza mediante electroforesis en gel de todos los productos de reacción (véase Figura 41), estos productos aparentemente tienen un origen puramente cebador (aunque es probable que el ADN contaminante de E. coli esté presente y en teoría podría estar especificando amplicones espurios altamente ineficientes).

En algunos casos, el ADN diana puede no ser particularmente raro, por ejemplo, si se desea determinar un perfil SNP limitado de un individuo humano y se puede obtener fácilmente una muestra modesta de sangre. Por otro lado, algunas pruebas para detectar patógenos pueden necesitar detectar solo unas pocas copias para que sean de gran utilidad práctica y, en particular, distinguir esta situación claramente de la ausencia total del objetivo.

Los presentes esfuerzos para determinar el nivel y la naturaleza del ruido generado en experimentos de muy bajo número de copias, o no, así como en otros experimentos que investigan la longitud y composición del cebador, han revelado varias observaciones clave, que se cree que ayudarán al desarrollo de sistemas de diagnóstico portátiles altamente sensibles ideales utilizando RPA.

En primer lugar, se ha encontrado que los oligonucleótidos con menos de aproximadamente 30 residuos son menos efectivos en RPA y, en particular, se vuelven menos "ruidosos", lo que no genera ningún ruido visible cuando se reduce a 25-26 (véase Figuras 45 y 52). Sin embargo, los oligonucleótidos más cortos todavía son capaces de, al menos, el alargamiento basado en la hibridación (véase Figura 52), y su "actividad" en los eventos de RPA (mediadas por recombinasa) probablemente no sea cero, en lugar de disminuir progresivamente con el acortamiento (Figura 45). Esto permite cierto grado de ajuste de actividad/ruido.

En segundo lugar, se observa que los cebadores que son idénticos excepto por un pequeño número adicional de residuos en el grado 5' muestran una variabilidad significativa en el ruido (incluso cuando todos son >30 residuos), lo que implica que la naturaleza exacta de la mayoría de los 5' la(s) base(s) juega un papel importante en el mecanismo y la probabilidad de ruido (véase Figuras 42, 45 y 47).

En tercer lugar, los cebadores que poseen un azúcar de ácido nucleico bloqueado (LNA) en el extremo más extremo 3' reducen/eliminan el ruido según lo determinado por electroforesis en gel. También reducen la cantidad de producto ligeramente si solo se emplea uno, y significativamente si ambos se usan a concentraciones de polimerasa "estándar", pero permanecen completamente activos si se aumenta la concentración de polimerasa, y bajo las concentraciones elevadas de polimerasa, el ruido todavía parece suprimido.

Finalmente, el ruido de baja concentración de blanco parece derivar principalmente/únicamente de los cebadores, no del ADN de muestra, y por lo tanto, nos referimos a este ruido como "gimnasia de cebo". Esto queda claro a partir de experimentos en los que la muestra de ADN se reduce a cero. En consecuencia, es posible centrar la atención en los mecanismos limitados por los cuales los cebadores pueden interactuar con y entre sí para encontrar soluciones a este problema. La forma en que puede surgir el ruido se explica en detalle en la siguiente sección. Una conclusión importante de este análisis es que la reducción de la actividad de recombinación/cebado de filamentos de nucleoproteínas puede afectar más gravemente a la generación de ruido del cebador que a la generación de amplicones bona fide.

Análisis de cómo puede originarse el ruido del cebador

A diferencia de la PCR, u otros métodos que implican la hibridación convencional, la dependencia de RPA de la formación de filamentos de nucleoproteínas extendidas que se someten a hidrólisis de ATP como complejos activos de búsqueda de homología probablemente incida en los parámetros que determinan la actividad oligonucleotídica en formas previamente no encontradas para reacciones de amplificación *in vitro*. Se sugiere que la rápida caída de la actividad oligonucleotídica por debajo de 30 residuos descrita anteriormente refleja una desaceleración de la tasa de recombinación, y que lo más probable es que estas observaciones paralelas se realicen en otro lugar sobre la dependencia de la hidrólisis por ATP para la recombinasa recA de E. coli (Bianco PR and Weinstock GM). En particular, se demostró que la longitud y la composición de secuencias cortas influyen en la hidrólisis del ATP. Se requieren aproximadamente 30 residuos o más para la hidrólisis máxima de ATP (moles de ATP por mol de recA unida al ADN) cuando recA se une a oligonucleótidos sintéticos, secuencias más cortas que muestran caídas marcadas en la tasa de hidrólisis hasta que estuvo ausente en aproximadamente 15 residuos. Se conectó la observación del comportamiento de baja amplificación con datos previos sobre la hidrólisis de ATP porque hay una razón clara para pensar que la actividad de recombinación de nucleoproteínas estará influenciada por la tasa de hidrólisis de ATP. En cierto sentido, los oligonucleótidos más lentos que se ha observado son aquellos unidos con ATP-γ-S no hidrolizable en los que la tasa de intercambio completo (formación de articulaciones plectonémicas resueltas) es cercana a cero (Riddles PW and Lehman IR). También se ha demostrado que ATP γ-S envenena efectivamente las reacciones de RPA (Piepenburg et al.). Se sugiere que las altas tasas de hidrólisis de ATP en un filamento de nucleoproteínas respaldan la actividad de los cebadores 'rápidos' y los cebadores 'lentos' de bajas tasas, que difieren principalmente por el número promedio de eventos de recombinación completos terminados en una unidad de tiempo. Interpretada simplemente, la hidrólisis de ATP es necesaria para la actividad dinámica de los filamentos. Los oligonucleótidos con menos de 30 residuos se vuelven más estables y no dinámicos, pareciéndose finalmente al estado bloqueado generado cuando se emplea ATP-γ-S, y son incapaces de completar el intercambio (los oligonucleótidos 'lentos' pueden ubicar secuencias con la misma facilidad, pero no pueden disolverse fácilmente para permitir la terminación y el acceso a la polimerasa).

Una posible diferencia en la dependencia de la actividad del filamento de nucleoproteína para el producto y el ruido bona fide

Para comprender por qué podría haber alguna ventaja en la selección de oligonucleótidos "más lentos" menos activos, hay necesidad de explorar cómo puede surgir el ruido "gimnástico" del cebador. ¿Por qué el oligonucleótido reducido podría reducir el ruido más rápido que la señal específica? A diferencia de la fase geométrica de amplificación que se observa tanto para las dianas bona fide como para los productos de ruido, la fase de formación temprana de las dianas ruidosas a partir de los cebadores de inicio es probablemente más compleja y, presumiblemente, bastante lenta. En la Figura 43, se ha detallado 2 mecanismos generales mediante los cuales los cebadores individuales pueden convertirse en estructuras con la capacidad de amplificación geométrica. Ambas estrategias diagramadas ilustran la formación de amplicones a partir de una sola especie de cebador. En ambos casos, el primer paso implica el autocebado del oligonucleótido mediante la formación de una horquilla corta en el extremo 3'. En la estrategia 1, la horquilla resultante no se amplificará fácilmente en la fase geométrica debido a desajustes significativos. En lugar de convertirse en amplicones de fase geométrica, tendrían que proceder a un paso más parecido al descrito en la estrategia 2. En este caso, al primer evento de autocebado le sigue un segundo que involucra el complemento inverso del extremo 5' del oligonucleótido original. Hay varios comentarios simples de este modelado. Primero es que tienen que ocurrir 2 tipos de eventos; debe haber alargamiento del extremo 3' de un oligonucleótido, y luego una segunda horquilla y extensión 3' similar que involucra el complemento inverso del extremo 5' del oligo original. Téngase en cuenta que la naturaleza muy rara e inestable de los primeros eventos que preceden a la fase geométrica será más fuertemente inhibida si la mayoría de los oligos están recubiertos con un SSB o una recombinasa, que tienen actividades de fusión de ADN cuando se unen a los ADNss. A la inversa, los filamentos dinámicos de recombinasa que se desmontan espontáneamente crean ventanas de tiempo en las que no están recubiertos todos, o partes, de un oligonucleótido. Por lo tanto, esta misma etapa limitante de la velocidad probablemente será sensible a la velocidad de hidrólisis del ATP del cebador, al dinamismo y a la extrapolación de la longitud del oligonucleótido. En consecuencia, el acortamiento de los oligonucleótidos puede ser particularmente efectivo y contener el ruido, lo suficiente para justificar la desaceleración de la velocidad de amplificación del objetivo bona fide para lograrlo.

Estos amplicones de la fase geométrica final son repeticiones invertidas. Esto significa que una invasión/elongación originada en un lado desplazará una cadena que se dobla inmediatamente sobre sí misma para formar una horquilla larga. Esta molécula debe ser dirigida por la acción de recombinasa para volver a convertirse en una similar a la matriz, mientras que las dianas bona fide pueden emplear la hibridación de soluciones adicionalmente. Esto impone una necesidad adicional de que los artefactos de los cebadores en la invasión basada en la recombinasa alcancen la amplificación geométrica y, en consecuencia, probablemente se suprimirán más rápidamente por una menor tasa de recombinación. Además, la presencia de repeticiones internas significa que es probable que surjan rápidamente versiones más grandes y más diversas de estos amplicones, y esto es consistente con el fenotipo común de un frotis, o escalera, que se extiende casi hasta el final por un gel.

Una tercera observación es que el tiempo que se tarda en duplicar una determinada especie de ADN durante la amplificación exponencial será un compuesto de la velocidad de recombinación y el tiempo necesario para sintetizar la plantilla por la polimerasa. Como los productos de ruido del cebador (al menos inicialmente) son muy pequeños, el

tiempo necesario para la síntesis de ADN es muy bajo y, por lo tanto, la limitación de la velocidad del principio puede ser la tasa de recombinación. Por lo tanto, la disminución de la tasa de recombinación de nucleoproteínas, al mismo tiempo que reduce la amplificación en general, afectará más a los amplicones cortos que a los largos, por lo que generalmente se beneficiarán de los amplicones bona fide.

Se establece una base en las observaciones anteriores para idear formas de combinar cebadores de diferente longitud, composición y concentración, para dar reacciones altamente sensibles y específicas.

Diseño del oligonucleótido primario:

Las cuatro observaciones descritas anteriormente se prestan a algunos principios de diseño de oligo sencillos.

Longitud del oligonucleótido

La longitud óptima del cebador puede ser de alrededor de 30 residuos y, en algunos casos, unos pocos residuos más cortos producirán una excelente relación señal/ruido. A medida que disminuye la longitud promedio del cebador, la generación de ruido disminuye y parece ausente cuando se emplean 26-28-meros (Figura 45). Aunque la amplificación del objetivo también disminuye, sospechamos que el ruido disminuye más rápidamente que la señal. En el análisis anterior de cómo puede surgir el ruido, se llegó a la conclusión de que hay varias razones por las que el ruido del cebador podría verse más afectado por la disminución de la tasa de recombinación que los amplicones correctos.

Optimización de secuencia más 5'

Al comparar la actividad de los oligonucleótidos que poseen secuencias idénticas, excepto por la extensión de los residuos más 5', se ha observado que se observa una variación significativa en la ausencia de oligonucleótidos (véase Figuras 42, 45, 47). Una posibilidad es que esto refleje puramente los efectos de la variación de longitud en la actividad de las nucleoproteínas como se describió anteriormente. Esta puede no ser, sin embargo, la única razón por la que los cebadores que se comparan son los 30 residuos o más. Por ejemplo, en la Figura 42, los oligonucleótidos NEST-1 y J1 son idénticos, excepto que J1 contiene varios residuos 5' adicionales. En lugar de ser más ruidoso, este oligonucleótido es menos ruidoso, mientras que se amplifica muy bien. Sobre la base de este y otros casos, se propone otros dos mecanismos probables. Primero, que un oligonucleótido para volverse exponencialmente amplificable puede requerir un evento de cebado por el complemento inverso de las secuencias más 5', este evento depende fundamentalmente de la secuencia exacta de bases en el extremo 5'. Esto significa que la variación de las bases más 5' puede llevar a una variación significativa en la generación de ruido. Segundo, que la composición de bases de incluso las secuencias 5', incluso cuando el oligonucleótido es mayor que 30 bases, puede afectar la actividad de recombinación de los cebadores. La evidencia para respaldar esto proviene de un experimento en donde se agregaron a los cebadores 5tag que consistían en estiramientos homopoliméricos y se observaron las consecuencias. La Figura 47 muestra un experimento en donde una serie de residuos C, o residuos G, se adjuntaron a los oligonucleótidos J1 y K2, y posteriormente se estableció una reacción de amplificación que contenía todos los oligonucleótidos modificados y no modificados solo, o en las posibles combinaciones. Sorprendentemente, estos oligonucleótidos, ya determinados como muy sensibles y específicos, no mejoraron al agregar estos tramos homopoliméricos particulares. En cambio, se observó que, si se añadía una serie de citosinas al extremo 5', esto conducía a un aumento de la producción de productos no específicos cuando se incubaban solos, mientras que un tramo de guanosinas tenía el efecto inverso, lo que hacía que los oligonucleótidos fueran muy silenciosos cuando se los dejaba solos. Además, aparte de la combinación de los oligonucleótidos originales no modificados, el único par que aparentemente generó con éxito un producto correcto fue la combinación de los 2 oligonucleótidos de cola de citosina (es decir, los oligonucleótidos más ruidosos). Una explicación que puede justificar estas observaciones es que un tramo de citosinas en el extremo 5' hace que el consecuente filamento de nucleoproteínas sea más activo, mientras que las guanosinas lo hacen menos. En resumen, la composición de oligonucleótidos, como la longitud, puede afectar el comportamiento de la velocidad, y las secuencias adicionales y no relacionadas en el extremo 5' pueden tener una influencia significativa a este respecto. Se pueden encontrar cebadores óptimos mediante un método racional del diseño de secuencia en 5'. Se podrían probar varias bases diferentes en 5', y las mejores seleccionadas para el empleo. Además, es probable que las etiquetas se puedan colocar en el extremo 5' cuya secuencia no esté relacionada con el objetivo, pero confieren resistencia al cebado de la horquilla en retroajuste del complemento inverso. La determinación de las secuencias óptimas que funcionan en muchos oligonucleótidos puede ser posible. La medición de la velocidad de hidrólisis de ATP de los oligonucleótidos en presencia de componentes de reacción también puede resultar útil en el diseño de pares de cebadores óptimos, y permitir que se creen mezclas de cebadores que compartan el mismo comportamiento de velocidad de amplificación. Al igual que la longitud, estas observaciones y mejoras no serían obvias en otros sistemas porque dependen de las características específicas de un sistema de amplificación impulsado por recombinasa y la bioquímica que lo subyace.

Ácido nucleico bloqueado, ribosa u otras modificaciones al azúcar

Los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) son nucleótidos en los que se ha diseñado un enlace entre los carbonos 2' y 4' del anillo de azúcar de la ribosa. Los oligonucleótidos que contienen dichos azúcares, especialmente en la posición 3', se han utilizado con éxito en los ensayos de PCR y se ha demostrado que mejoran significativamente la discriminación del correcto emparejamiento de bases 3' (véase Vester B. and Wengel J.). Se anticipa que los residuos

de LNA podrían ser tolerados por el sistema RPA siempre que no estuvieran presentes en demasiadas posiciones dentro de los oligonucleótidos. Como se sabe que aumentan la especificidad en las amplificaciones por PCR, podrían mejorar la señal-ruido en el sistema RPA.

Los experimentos anteriores que emplean enlaces de fosforotiorato en la mayoría de las posiciones 3' demostraron ser incapaces de funcionar correctamente en RPA y fueron notablemente más ruidosos (datos no mostrados). Interpretamos esto como un reflejo de que tanto uvsX como gp32, que interactúan con el esqueleto de azúcar-fosfato, no se unen a estos esqueletos, lo que conduce a un comportamiento de reacción muy anómalo. Sin embargo, la unión de gp32 es menos dependiente del azúcar, como lo demuestra su capacidad para unirse al ARN, así como al ADN (aunque con alteración menos cooperatividad) (Kowalczykowski SC, et al.). Por lo tanto, se anticipa que los azúcares de LNA, que retienen un grupo fosfato normal, podrían permanecer funcionales con gp32.

Se ha realizado experimentos en los que se han usado oligonucleótidos que poseen un azúcar de ácido nucleico bloqueado en la posición 3' como máximo en las reacciones de amplificación. Se ha hecho una comparación entre las reacciones con oligonucleótidos idénticos con y sin la modificación del azúcar, y las reacciones que implican un oligonucleótido modificado y uno no modificado. Según el experimento, parece que RPA puede amplificar el ADN cuando uno o ambos oligonucleótidos poseen un residuo de ácido nucleico bloqueado en la posición 3'. En particular, la presencia de un nucleótido LNA en el extremo 3' redujo significativamente la acumulación de producto bajo la concentración de polimerasa "estándar", y al parecer eliminó el ruido asociado. Puede producirse un ruido muy bajo y un producto reducido debido a una frecuencia de recombinación exitosa más baja, un despegue reducido de la polimerasa o una combinación. Cualquiera sea la razón, es razonable con base en los hallazgos de que el uso de ácidos nucleicos bloqueados en uno o ambos cebadores reducirá o eliminará significativamente el ruido, al tiempo que mantiene una tasa de amplificación aceptable para un producto bona fide. Se descubrió que los niveles de producto pueden volver a niveles altos si la concentración de polimerasa aumenta varias veces (de aproximadamente 30-40 ng/µl a 150 ng/µl), pero los niveles de ruido no aumentan a una tasa equivalente.

De manera similar, otros residuos modificados con azúcar pueden mostrar un comportamiento mejorado de señal a ruido cuando están presentes con cierta frecuencia en oligonucleótidos. Por ejemplo, la ribosa, las modificaciones en 2'-O-metilo, los azúcares acíclicos o de otro modo pueden resultar de utilidad.

Métodos que mejoran la señal al ruido mediante la combinación de filamentos de nucleoproteínas con actividades diferenciales.

La capacidad para controlar la velocidad de recombinación y/o elongación de los cebadores en función de su longitud, composición de la base y distribución, y el uso de azúcares modificados (o posiblemente otras modificaciones de la estructura) sugiere mecanismos para diseñar reacciones de amplificación con una señal óptima a las propiedades del ruido. Hay dos formas generales en las que se imaginan estrategias de combinación de oligonucleótidos que se emplearán para beneficiarse. Primero están las estrategias en las que se produce el anidamiento de un solo tubo y, en segundo lugar, el empleo de un oligonucleótido no ruidoso apareado con un oligonucleótido más convencional de tal manera que se formen fácilmente amplicones bona fide, pero los amplicones ruidosos implican solo oligonucleótidos individuales.

Anidamiento de un único tubo

La anidación es el proceso mediante el cual se ha mejorado la sensibilidad y la señal al ruido mediante la realización de una primera amplificación con un par externo de cebadores, y luego se realiza una segunda amplificación con un par interno de cebadores. En su contexto más familiar, este método se ha empleado junto con el método de PCR. En principio, la primera ronda amplifica el objetivo de manera más eficiente que el ADN aleatorio, de modo que después de la primera amplificación, incluso si no estaba lo suficientemente limpia como para proporcionar un amplicón claro contra el fondo, todavía está tan relativamente enriquecida que una segunda amplificación con cebadores internos para primero dar un resultado muy claro y limpio. En la práctica, esto normalmente se basa en realizar una amplificación, luego remover una pequeña porción a un nuevo tubo y realizar una segunda amplificación con cebadores internos "anidados".

Si bien el concepto de anidación es visitado en otros lugares, los presentes resultados sugieren un método de anidación alternativo atractivo en donde todos los cebadores participantes se combinan en una sola reacción. El fundamento es que el par de oligonucleótidos interno y externo son diferencialmente activos en la recombinación y/o la tasa de alargamiento, y están presentes a diferentes concentraciones. Por ejemplo, el par externo se configuraría para tener una rápida tasa de recombinación/elongación, y el par interno una tasa de recombinación/elongación más lenta. Además, el par externo estaría presente a una concentración más baja (pero todavía una concentración suficientemente alta para una actividad aceptable) y el par interno estaría presente a una concentración alta. ¿Qué pasaría entonces? De manera aislada, el par interno se amplificaría limpiamente, pero más bien lentamente, de modo que podrían no lograr un grado aceptable de amplificación dentro de un período de tiempo deseable. En contraste, en el aislamiento, el par externo se amplificaría rápidamente, aunque con algún ruido de cebador, pero se detendría en una concentración bastante baja debido al agotamiento. En combinación, sin embargo, estos dos comportamientos potencialmente se complementan muy bien. En la práctica, los pares de cebadores externos generalmente serían rápidos, de más de 30 residuos de longitud, no modificados en el extremo 3', y posiblemente contengan 5 residuos

adicionales que promuevan la "solidez". Los cebadores internos serían más lentos, como se confiere potencialmente acortándolos, modificando el extremo 3' con LNA o de otro modo, agregando secuencias de lentitud en el extremo 5', y así sucesivamente.

Par de nucleoproteínas no ruidosas/ruidosas

Los datos experimentales que se ha obtenido sugieren que muchos de los frotis o escalas derivados de cebadores contienen secuencias de una sola especie de cebador (véase Figura 46). Si es cierto, solo este hecho sugiere un método simple para distinguir la señal del ruido simplemente al determinar si los dos cebadores utilizados en la reacción se asocian físicamente con los productos. Aquí se sugiere que esto puede mejorarse aún más combinando oligonucleótidos muy silenciosos con oligonucleótidos más rápidos (más ruidosos). Los oligonucleótidos silenciosos, por ejemplo, oligonucleótidos cortos, todavía pueden funcionar eficientemente si están presentes con otros más ruidosos, siempre que puedan funcionar en reacciones de hibridación (véase Figura 52). Sin embargo, si solo participan en la amplificación a través de la hibridación normal, cuya cinética es muy diferente a la amplificación del ruido promovido por recombinasa, pueden permanecer sin involucrarse en el ruido en donde el oligonucleótido más rápido participa solo.

Tercer cebador y protocolos de detección.

La posibilidad de que los cebadores puedan principalmente dedicarse a la gimnasia sola, como se mencionó anteriormente, sugiere métodos simples para determinar si la amplificación se ha producido de manera eficiente. Un formato simple de detección sin gel emplearía un oligonucleótido marcado con un colorante o enzima, u otro grupo fácilmente detectable, y el otro marcado con un grupo inmovilizable, por ejemplo, biotina (véase Figura 50 Parte 1). Así, antes, durante o después de la fase de reacción principal, el oligonucleótido inmovilizable se inmovilizaría en una superficie, y al final de la reacción esta superficie se lavaría con un regulador apropiado. Si el otro cebador marcado se asocia con el cebador inmovilizable, que se puede determinar fácilmente, entonces se ha producido la amplificación del producto.

Más allá de esto, se imaginan formas adicionales en las que se podrían generar niveles adicionales de rigurosidad en la amplificación bona fide del producto. Un método adicional simple implica un 'tercer' cebador que funciona para capturar en una superficie de amplicones de fase líquida. Este cebador se detendría de generar ruido en sí mismo ya sea por ingeniería genética (por ejemplo, un oligo corto como se describió anteriormente), o por ser agregado al sistema solo en una fase tardía de la reacción. Este tercer cebador podría apuntar a secuencias internas novedosas, pero también podría inmovilizar las dianas mediante la síntesis "en retroceso" descrita en otro lugar para evitar la migración de la ramificación perturbadoras (Figura 50, Partes 2 y 3).

Liofilización de la reacción de RPA

Para configurar pruebas diagnósticas y forenses no de laboratorio o cercas al paciente, será necesario proporcionar reactivos estables al ambiente. Una forma obvia de lograr esto es liofilizando las reacciones, omitiendo solo el ADN de la muestra y, posiblemente, cualquier otro componente que sea estable por separado y se pueda agregar con la muestra como el regulador utilizado para disolver el ácido nucleico de la muestra.

Si bien la liofilización es un proceso bien establecido, no hay garantía de que todos los componentes de un sistema de reacción se liofilizen y reconstituyan con éxito en las mismas condiciones. Se ha intentado liofilizar las reacciones de RPA con y sin varios de los componentes de la reacción final. La Figura 53 muestra que se ha logrado liofilizar con éxito las reacciones de RPA que contienen todo, excepto el ADN de muestra y algún componente del regulador (que puede almacenarse de manera estable a temperatura ambiente y usarse para reconstituir el ADN de muestra). El azúcar disacárido trehalosa demuestra en estos experimentos que se requiere que se estabilice el liofilizado, lo que permite el almacenamiento a temperatura ambiente durante al menos 10 días.

Análisis cinético en tiempo real de reacciones RPA

La capacidad para realizar un análisis cinético de las reacciones de amplificación de ADN proporciona una enorme utilidad en comparación con el análisis puramente de punto final de reacciones similares. Por un lado, esto permite determinar la cantidad de ADN o ARN, copias presentes en una muestra y tiene muchos usos en aplicaciones de investigación, clínicas y pruebas ambientales. Además de las aplicaciones de cuantificación directa, la detección dinámica del producto de reacción ofrece excelentes soluciones a otros problemas, como permitir la discriminación de alelos polimorfos de nucleótido único en virtud de una cinética de acumulación alterada, y un mecanismo para evaluar la presencia frente a la ausencia de dianas formato basado.

La RPA ofrece una excelente alternativa a la PCR para amplificar dianas de ADN específicas, pero al obviar los ciclos térmicos, la RPA requiere una instrumentación menos costosa y es más fácil de implementar en entornos que no sean de laboratorio.

Actualmente, el análisis en tiempo real de la acumulación de ADN se emplea más ampliamente en combinación con la PCR. La PCR muestra la amplificación exponencial del ADN hasta varios ciclos después de alcanzar un umbral de detección del producto y puede implementarse utilizando ópticas relativamente baratas cuando se utilizan varios

sensores basados en la fluorescencia. En consecuencia, la evaluación del número de ciclo de una muestra dada cruza el umbral de detectabilidad, en combinación con resultados equivalentes de las muestras de control, permite la asignación del número de copias presentes en muestras anónimas. Se han descrito varios métodos de sensores, y muchos están actualmente empleados. Se pueden emplear colorantes fluorescentes de unión al surco menor que desarrollan una fuerte fluorescencia una vez que se unen al ADN. Ejemplos de tales colorantes incluyen SYBR dorado y SYBR verde (Wittwer et al. [1]). Se han implementado con éxito otros métodos adicionales, y estos beneficios se obtienen al agregar la especificidad del objetivo a la detección, lo que permite una mayor sensibilidad y especificidad, particularmente a niveles de objetivo bajos en la muestra inicial. Un formato simple comprende dos cebadores oligonucleotídicos que reconocen secuencias internas adyacentes del amplicón, cada una marcada con un fluoróforo. Si la diana está presente, los dos fluoróforos se sitúan muy cerca y se produce la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), que puede detectarse con los filtros adecuados de excitación y emisión (Wittwer et al. 1997 [2]). Otros sistemas preferidos emplean sondas que combinan la presencia tanto de un fluoróforo como de un detenedor. Para algunos métodos, la hibridación con el amplicón objetivo provoca la separación del fluoróforo y el detenedor asociados con la horquilla y, por lo tanto, un aumento de la fluorescencia. En otro método, la hibridación de la sonda se evalúa a través de la acción de una polimerasa que se aproxima y posee una exonucleasa 5'-3' que ataca la sonda y conduce a la separación permanente del fluoróforo y el detenedor (llamadas sondas 'Taqman') [Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM., Real time quantitative PCR. Genome Res. (1996) 6: 986-94]. La implementación de estos métodos y otros está ampliamente documentada.

Durante las reacciones de PCR se pueden identificar varias fases distintas y temporalmente independientes. Todo el ADN es de cadena sencilla a la alta temperatura (por ejemplo, 94°C) utilizado para fundir todas las cadenas de ADN. Posteriormente, los cebadores de amplificación se pueden fusionar a una segunda temperatura baja, como 50-65°C. Finalmente, el alargamiento de los cebadores para generar principalmente productos de doble cadena se realiza a, típicamente, 70-75°C. Debido a la naturaleza cíclica controlada de la PCR, es deseable y necesario evaluar el nivel acumulado de ADN en distintos puntos específicos del ciclo. Esto puede ocurrir al final de la etapa de síntesis. Alternativamente, puede ser deseable medir la fluorescencia en algún otro punto, y en otra temperatura (cuarta) dependiendo del método empleado.

A diferencia de la PCR, las reacciones RPA se configuran principalmente para funcionar a una sola temperatura. Las configuraciones actuales de RPA no tienen fases y, por lo tanto, una variedad completa de "etapas" de reacción se presentarán simultáneamente en una muestra (la eliminación de fases se puede lograr en teoría mediante métodos, por ejemplo, como la eliminación controlada del ATP). Como consecuencia de esta falta de fases en un momento dado, es probable que haya una mezcla de ADN de doble cadena, ADN de cadena sencilla (como cadenas desplazadas, así como oligonucleótidos) e intermedios de naturaleza heterogénea (como triplex). Intermedios y/o complejos de búsqueda de homología). A pesar de la heterogeneidad de la mezcla de reacción, generalmente ocurrirá que los niveles de estado estable del ADN de doble cadena, y posiblemente del ADN de una sola cadena, aumentarán durante la reacción a medida que el producto se acumula. Sobre esta base, parecía razonable que se pudieran emplear fácilmente métodos sencillos para medir la acumulación de productos.

Aquí se describen cantidades de colorantes SYBR verde y SYBR dorado que son compatibles con RPA y permiten la detección en tiempo real de productos de reacción acumulados. También es el caso de que los protocolos de monitorización específicos de secuencia sean compatibles con RPA. Dichos métodos incluirían el empleo de dos oligonucleótidos marcados con fluorescencia, que en la hibridación se someten a transferencia de energía de resonancia de fluorescencia, o el uso de sondas doble marcadas como las que se apagan hasta que la hibridación produce alteraciones en FRET, o están separadas por nucleasas asociadas. actividad. Se proporciona evidencia de que el método 'Taqman' que se basa en la llamada actividad 5'-3' exonucleasa de ciertas polimerasas no se puede usar en reacciones RPA, ya que estas nucleasas son en realidad endonucleasas FLAP de estructura específica que inhiben las reacciones RPA. Además, ciertos métodos, como las balizas moleculares, en las que son esenciales las propiedades naturales de formación de la horquilla de la sonda, pueden tener menos éxito en RPA debido a la probabilidad de que la sonda esté en estado fundido en el presente de proteínas de unión a ADN de cadena sencilla y recombinasas.

La Figura 54 muestra los resultados de los experimentos para determinar si las manchas SYBR dorado y SYBR verde son compatibles con RPA. Se realizó un experimento inicial con SYBR dorado en donde se realizaron varias diluciones del colorante SYBR dorado a partir de la solución madre suministrado (descrito como una solución madre de 10000 x de sondas moleculares en DMSO) utilizando cebadores para amplificar un fragmento del locus de la apolipoproteína B humana (Figura 1A, B), la reacción se inhibe claramente si la concentración final fue 1x (1:10000 de solución madre) o 0.4x (1:25,000 de solución madre), pero no se observó significativamente a 0.2x (1:50.000 de solución madre). Esta concentración de 0.2x se empleó luego como la concentración más alta en una serie de dilución en reacciones de 50 microlitros establecidas con los mismos dos cebadores específicos para humanos, a dos (diana) concentraciones diana del ADN genómico humano total (2 o 20 copias por microlitro de densidad de copia inicial) (Figura 54 C). Una mezcla maestra se montó en hielo y se dividió en partes alícuotas en pozos en una microplaca de 96 pozos enfriada a temperatura de hielo. Una vez que se mezcló la placa, se transfirió a un lector de microplacas de fluorescencia con un escenario ajustado a 37°C. El lector se configuró para recoger lecturas de fluorescencia a 485 nm de excitación, emisión a 528 nm, a intervalos de 1 minuto durante un período de 1 hora. En la misma ejecución, se tiñó con SYBR verde en el mismo grado (D) y se ensayó simultáneamente en muestras similares. Este experimento reveló varios hechos clave relevantes para configurar las reacciones de RPA en tiempo real con SYBR dorado o SYBR verde.

Primero, la comparación directa de los tiempos de detección dentro del experimento de SYBR dorado muestra que aparentemente incluso diluciones de 1:50.000 veces retardan la reacción en relación con diluciones más altas. De hecho, 1:100.000 o 1:80.000 dieron una cinética de reacción significativamente más rápida, y por lo tanto parece ser una mejor cantidad de SYBR dorado para usar que el 1:50.000, que parecía aceptable por un análisis de punto final anterior. Sin embargo, las señales de fluorescencia máximas relativas obtenidas con las diluciones más altas fueron significativamente menores que con las más bajas, lo que sugiere que el colorante se estaba volviendo limitante. Además, incluso en la dilución más alta de SYBR dorado, los aumentos de fluorescencia sobre el fondo se detectaron más tarde que las muestras en el experimento SYBR verde, y las señales de fluorescencia globales para todas las concentraciones de SYBR dorado fueron mucho menores que para SYBR verde. En contraste, las muestras de SYBR verde se detectaron en todos los casos antes de los experimentos con SYBR dorado. En conclusión, se sugiere que, si bien ambos colorantes se pueden implementar en RPA en tiempo real, SYBR verde parece el más robusto para los análisis estándar. Parece que funciona bien en diluciones finales de entre 1:50.000 y 1:100.000, pero las muestras más concentradas (1:50.000) dieron una mayor fluorescencia general y una fase exponencial detectable más larga, lo que sugiere que una dilución de 1:50.000 fue la mejor en estos experimentos. También se ha analizado con concentraciones más altas de SYBR verde con éxito, pero hay algunos indicios de que la inhibición puede ocurrir eventualmente. Se sugiere que entre 1:50.000 y 1:25.000 es la concentración óptima de SYBR verde para los análisis dinámicos de RPA en tiempo real.

La Figura 55 muestra un ejemplo de dos experimentos para determinar la capacidad del sistema para distinguir entre diferentes números de copias de una diana de ADN (presente en el ADN genómico de B. subtilis). El número inicial de moléculas modelo de 500.000, 50.000, 5.000, 500, 50 o cero copias de ADN de B. subtilis estuvo presente en las diversas muestras y la amplificación se realizó con los cebadores BsJ1 y BsK2 específicos del locus SpoOB de B. subtilis. En muchos experimentos independientes, el sistema generó con éxito perfiles similares al experimento representativo que se muestra en la Figura 56. Téngase en cuenta que el espaciado entre las curvas de fase exponencial es similar entre las diluciones del número de copias de 10 veces como se requiere para un sistema cuantitativo. Se concluyó que la RPA es cuantitativa en al menos 4 órdenes de magnitud del número de plantilla inicial, pero los resultados cuantitativos en un rango mayor pueden ser posibles. Téngase en cuenta que en (Figura 55C), el segundo experimento de titulación de B. subtilis, la concentración objetivo más alta se redujo inesperadamente antes. Los experimentos posteriores indican que esto puede surgir esporádicamente como consecuencia de los niveles relativamente bajos de gp32 y uvsX empleados en estos experimentos en comparación con experimentos posteriores con aproximadamente el doble de los niveles (Figura 56).

También se investigó la capacidad del sistema SYBR verde RPA para monitorizar un rango de copias de plantilla de inicio del ADN humano mediante la amplificación con varias diluciones de ADN humano. La Figura 57 muestra los resultados de tales análisis. Como era de esperar, los datos se ajustan al perfil esperado que indica que RPA se comporta de manera cuantitativa y se puede analizar fácilmente con SYBR verde. Se observó un efecto de arrastre similar para las muestras objetivo más altas, pero se corrigió en experimentos posteriores en los que se emplearon mayores cantidades de gp32 y uvsX (véase la Figura 57C frente a B, y el aumento concomitante en los niveles generales de productos de punto final).

Se muestra que al usar colorantes fluorescentes es posible monitorizar la cinética de las reacciones RPA, y que esto a su vez se puede usar para indicar la cantidad de objetivos específicos en una muestra. La interpretación más simple es que el ADN de doble cadena se acumula de manera exponencial en las reacciones de RPA hasta un punto de masa por encima de los límites de detección de fluorescencia SYBR verde. Sin embargo, es posible que el perfil de fluorescencia de las reacciones de RPA de SYBR verde refleje actividades adicionales. Por ejemplo, los productos de RPA pueden, en algunas circunstancias, involucrarse en reacciones de recombinación con otros productos que conducen a productos intermedios complejos cuyo comportamiento de unión SYBR verde no se comprende bien. Además, el perfil cinético de la acumulación de producto puede alterarse como consecuencia del fenómeno de envejecimiento por reacción, solo en parte relacionado con el número de copia inicial. Esto puede subyacer en el seguimiento de la fluorescencia temprana espuria observada para las muestras con el mayor número de copias en algunos de estos experimentos iniciales, aunque experimentos posteriores con niveles aumentados de uvsX y gp32 evitaron este fenómeno.

En varios casos, se observa que el control de agua parecía comenzar a aumentar en un período de tiempo similar a la concentración más baja de la muestra (típicamente 1 copia por densidad de inicio de microlitro, o menos), sin embargo, la cinética de la acumulación de producto de control de agua parecía distinta de las muestras que contienen el objetivo, que tienen una fase exponencial menos profunda, lo que indica tiempos de duplicación más lentos. Esta observación probablemente se deba a las propiedades estructurales que poseen los amplicones (por ejemplo, las repeticiones internas) que reducen la velocidad de síntesis en el sistema RPA. Anteriormente comentamos la posibilidad de que los amplicones derivados del cebador tiendan a contener estructuras repetidas invertidas que a menudo requerirían 2 rondas de invasión/síntesis por duplicación dúplex, en lugar del único que podría ser suficiente para los amplicones objetivo bona fide. Independientemente del origen de este fenómeno, especulamos que, con un sofisticado software de análisis de datos y controles internos experimentales adecuados, este ruido podría identificarse y distinguirse del comportamiento cinético de la amplificación del objetivo real. Además, hubo observación de algunas variaciones distintas en el tiempo necesario para llegar a la detección y las pendientes de las curvas entre los distintos amplicones. Esto se esperaría como una variación en la actividad de diferentes cebadores, y las longitudes variantes y la composición de secuencias de diferentes amplicones, sugiere que los tiempos de duplicación promedio variarían

entre los amplicones. Las pendientes de los perfiles de fluorescencia según este criterio solo es probable que varíen entre los diferentes tipos de amplicones, y esto puede ser útil en el análisis.

Los experimentos realizados aquí sugieren que las reacciones de RPA cinética se pueden usar para disminuir el tiempo necesario para evaluar la presencia de ADN diana en muestras en comparación con la electroforesis en gel posterior. La configuración experimental que se ha utilizado aquí dista mucho de ser ideal, ya que las placas de 96 pozos utilizadas están hechas de plástico grueso y la placa calentada en el fluorómetro no está en contacto directo con los pozos de muestra. Se estima que toma hasta 5 minutos para que una reacción en volumen de 50 µl alcance la temperatura en estas condiciones, y quizás 8 minutos para un volumen de 100 µl. En un dispositivo optimizado, estos largos tiempos de retardo no existirían. Por consiguiente, se estima que para una cantidad clínicamente relevante de ADN humano (por ejemplo, 1000-3000 copias, ~3 ng-9 ng), la amplificación podría evaluarse fácilmente en aproximadamente 30 minutos con el equipo apropiado usando las condiciones típicas que se muestran aquí. A pesar de las limitaciones de estos experimentos con placas de 96 pozos y un fluorómetro convencional, estos experimentos piloto son muy alentadores e indican que la monitorización cinética de las reacciones de RPA ofrece un método manejable para la cuantificación, y que esta es una cuantificación que puede implementarse en la práctica para evaluar los niveles de ADN en al menos 5 órdenes de magnitud.

Control de reacción RPA mediado por la concentración de ATP

La RPA es un método versátil, pero puede mejorarse mediante la incorporación de características para controlar con precisión cuando en la reacción están activas las recombinasas. Dicho control se puede obtener a través de la liberación periódica de ATP por fotólisis de ATP enjaulado. Alternativamente, la concentración de reacción ATP u otros nucleósidos trifosfatos, se puede regular cíclicamente mediante la adición manual repetida o el uso de un oscilador bioquímico.

El ATP enjaulado no puede soportar la unión al ADN y la función recombinasa de la proteína recA de E. coli [Butler BC, Hanchett RH, Rafailov H, MacDonald G (2002) Investigating Structural Changes Induced By Nucleotide Binding to RecA Using Difference FTIR. Biophys J 82(4): 2198-2210]. Después de la fotólisis, sin embargo, el ATP liberado habilita la función recombinasa. Todas las recombinasas procariotas estudiadas hasta ahora son homólogos directos de la proteína recA con homología de secuencia primaria y homología estructural. Además, todos los homólogos recA estudiados, incluidos los homólogos eucariotas, requieren la unión a ATP para permitir la función de recombinasa. Se espera que fenómenos similares estén, por lo tanto, mediados por T4 uvsX y otras recombinasas en consecuencia.

El papel de los nucleótidos en la regulación de la acción de la recombinasa está relativamente bien documentado. En el caso de las recombinasas procariotas, por ejemplo, E. coli recA y T4 fago uvsX, las recombinasas hidrolizan ATP a ADP (y AMP en el caso de uvsX). La hidrólisis se está produciendo con alta actividad siempre que las recombinasas estén unidas al ADN. El estado unido a ADP tiene una menor afinidad por el ADN y generalmente se asocia con el desensamblaje del filamento del ADN (y el paso alterado del filamento de la nucleoproteína). En condiciones típicas *in vitro*, el ATP se mantiene a una concentración relativamente alta en exceso al ADP, para garantizar que el rápido intercambio de ADP por ATP en los filamentos de nucleoproteínas disuade el desensamblaje prematuro. En consecuencia, las recombinasas en una reacción responden a la relación ATP:ADP y, a cierta aproximación, el desensamblaje neto del filamento de nucleoproteína ocurre cuando la concentración de ADP excede la concentración de ATP.

Las reacciones de RPA se basan en la acción de las recombinasas para cargar sobre oligonucleótidos de cadena sencilla sintéticos y llevar a cabo una actividad de búsqueda de homología. Como se describió, la actividad de las recombinasas depende de la presencia de nucleótidos trifosfatos, en especial de ATP. Cuando las recombinasas están unidas al ADN, hidrolizan el nucleótido trifosfato a una alta velocidad, por ejemplo, se sabe que la proteína uvsX T4 hidroliza 200 moléculas de ATP por molécula de proteína por minuto a 37°C en ADN de cadena sencilla (aunque las velocidades en oligonucleótidos más cortos pueden ser mas variable). En consecuencia, existe una necesidad de un gran suministro de ATP para mantener una reacción de recombinación activa en la que una gran proporción de oligonucleótidos estén asociados con filamentos de recombinasa, particularmente cuando los oligonucleótidos están presentes en concentraciones cercanas a las micromolares.

Considérese el flujo de los niveles de nucleótidos de reacción que pueden ocurrir durante una reacción típica de RPA. Si se emplea un par de oligonucleótidos en una reacción a una concentración de 1 µM cada uno, con una longitud de los oligonucleótidos de 35 residuos, luego a una saturación del 10% del oligonucleótido con la recombinasa, existe una concentración aproximada de recombinasa unida de 2.8 µM (a el valor del 10% de saturación en un 3-5% de compuesto de PEG es aproximadamente consistente con los resultados de los experimentos presentes, pero podría ser un poco más alto o más bajo). Esto convertiría una solución de ATP de 0.56 mM en la cantidad equivalente de ADP cada minuto, según la velocidad de hidrólisis publicada. En consecuencia, si se utilizara una solución 3 mM de ATP para iniciar la reacción, y no estuviera presente un sistema de regeneración de ATP, luego de solo 3 minutos la concentración de ADP aumentaría a niveles iguales a la ATP y la recombinasa se volvería inactiva.

Se ha utilizado de forma rutinaria una concentración total de oligonucleótidos de 0.6 µM y una concentración uvsX de aproximadamente 3 µM. Si todos estos uvsX se unieran a los oligonucleótidos, consumirían aproximadamente una solución de ATP 0.6 mM en 3 minutos, dada una velocidad de reacción de 200 cantidades molares por minuto en

oligonucleótidos. Sin embargo, con base en los presentes datos limitados de datos de hidrólisis, es poco probable que alguna vez se logre la unión completa de las moléculas uvsX al ADN de cadena sencilla bajo las presentes condiciones típicas de RPA. Aunque es formalmente posible que la tasa de hidrólisis por monómero sea menor para la longitud de los oligonucleótidos que empleamos. Estas alternativas se sugieren por el hecho de que en algunos casos se ha sido capaces de amplificar un ADN objetivo a niveles detectables por los niveles de tinción con bromuro de etidio sin la presencia de un sistema de regeneración. Otros experimentos sugieren que se necesitan aproximadamente 30 minutos para alcanzar este nivel de amplificación y, por deducción, calculamos que posiblemente se haya consumido un máximo de solo 0.15 mM de ATP en cada período de 3 minutos, una cuarta parte del nivel previsto).

El análisis de las concentraciones efectivas de uvsY en reacciones es consistente con las estequiometrías esperadas. Se ha utilizado de forma rutinaria aproximadamente la mitad de las concentraciones equimolares de uvsY en comparación con la proteína uvsX, y los datos publicados sugieren que la proteína uvsY probablemente funcione como un hexámero. Si esto es así y se requiere un hexámero para cargar, y estabilizar, cada filamento cargado, entonces mientras que habría una necesidad de aproximadamente 12-14 moléculas uvsX por oligonucleótido (30-35-mero), tendría que haber 6 moléculas uvsY por oligonucleótido, es decir, aproximadamente la mitad de la concentración molar. Este óptimo determinado experimentalmente satisface perfectamente la predicción teórica de que se requieren concentraciones de medio a moho de uvsY a uvsX.

En resumen, la conversión de ATP en ADP en una reacción de RPA con soporte uvsX típica con oligonucleótidos 0.6 µM, uvsX 3 µM y uvsY 1-3 µM es de aproximadamente 50 µM por minuto y no más que eso. Aproximadamente 16 moléculas de ATP se hidrolizan por molécula uvsX por minuto en la reacción. Esta cifra es seis veces menor que la predicha si todas las moléculas uvsX estuvieran unidas al ADNss y la hidrolización de ATP a 200 moléculas por uvsX por minuto, y presumiblemente refleja que solo una fracción de uvsX está unida en un momento dado, que las tasas de hidrólisis son más bajas en oligonucleótidos cortos, y/o que, en reacciones sin regeneración, la velocidad de hidrólisis disminuye significativamente a medida que aumentan los niveles de ADP. Se sugiere que, si bien el último factor puede llegar a ser importante con el tiempo, durante la mayor parte de la reacción, este no es el factor principal.

Habiendo deducido experimentalmente la tasa de consumo de ATP en una reacción de RPA típica, ahora queda por estimar qué tamaño de pulso de concentración de ATP necesitaríamos usar para estimular ráfagas adecuadas de actividad de recombinasa. Para hacer esto hay necesidad de una estimación de la K_m para una recombinasa particular.

Se reporta que la K_m de hidrólisis de ATP por recA es de 20 µM. En consecuencia, relativamente poco ATP libre debe ser lanzado en un sistema de recombinasa para promover la actividad. Suponiendo que esto también es cierto para uvsX, un pulso de ATP que cambia la concentración de la reacción de cero a 50 µM apoyaría ampliamente la búsqueda de homología hasta el momento en que el nivel de ADP se acumule en una proporción de 1:1. Bajo condiciones estándar, esto sería aproximadamente 30 segundos y eventualmente produciría ADP de 25 µM y ATP de 25 µM. Es probable que una ráfaga de 30 segundos de actividad de recombinasa sea más larga de lo que se requiere para que ocurra una ronda de invasiones. Los pulsos adicionales de ATP pueden generar fácilmente ráfagas adicionales de actividad de recombinasa. Por ejemplo, un impulso adicional de aumento de 50 µM elevaría el nivel de ATP a 75 µM en comparación con ADP de 25 µM. Después de 30 segundos, el nivel de ATP se equilibrará a 50 µM de ATP y 50 µM de ADP y la reacción se detendrá de nuevo. Un pulso adicional elevará el ATP a 100 µM y el ADP a 50 µM, y después de 30 segundos se equilibrarán 75 µM más de cada uno. Por lo tanto, 30 segundos ráfagas de exceso de ATP podrían liberarse en ráfagas de 50 µM para soportar la ráfaga de actividad recombinasa. Por supuesto, es probable que los cambios en las concentraciones absolutas de ADP y ATP afecten el comportamiento de la reacción que requiere ajustes y que posiblemente se deban liberar pulsos ligeramente más grandes de ATP en cada ronda. Sin embargo, es evidente que con una concentración inicial de ATP enjaulado de 3 mM (similar a la utilizada en los presentes experimentos anteriores) y pulsos de 50 µM, es posible soportar 60 pulsos independientes. Incluso si el tamaño de la ráfaga necesita aumentar progresivamente para tener en cuenta el aumento general de la concentración de ADP, es bastante probable que se puedan acomodar 30 ciclos. Además, el ADP puede eliminarse de la reacción mediante la inclusión de enzimas metabolizadoras de ADP en la reacción. Estos podrían incluir la hidrólisis de ADP, o alternativamente la regeneración de ADP a ATP y una fuente constante de actividad de ATP alternativa que consume, tal como la generación de NADH.

El ATP enjaulado está disponible comercialmente, y recientemente se han puesto a disposición dispositivos de bajo consumo baratos que podrían usarse para impulsar la desconexión. Los avances en los diodos emisores de luz (LED) han llevado al desarrollo de pequeñas fuentes de energía de bajo costo para generar luz de longitud de onda de 365 nm. Prevemos la integración de dichos dispositivos en celdas calentadas de baja potencia, que son portátiles y funcionan con baterías. Alternativamente, se podrían generar breves períodos de actividad de recombinasa simplemente mediante la adición repetida de pequeños volúmenes de ATP adicional, o mediante el uso de un sistema de oscilador, como el oscilador de la fosfofructoquinasa.

Control de reacción RPA mediado por el uso de cebadores asimétricos

Las reacciones de RPA de un lado se pueden dirigir desde un solo sitio diana de cebador. En ausencia de un cebador enfrentado, tales reacciones generarán ADN de cadena sencilla. Se ha encontrado que los oligonucleótidos que poseen un ácido nucleico bloqueado 3' (LNA) [Di Giusto DA, King GC (2004) Strong positional preference in the interaction of LNA oligonucleotides with ADN polimerasa and proofreading exonuclease activities: implications for

genotyping assays. Nucl Acids Res 32(3): e32] nucleótido, no puede servir como cebadores para el alargamiento mediado por recombinasa por ciertas polimerasas, como Bacillus stearothermophilus y Bacillus subtilis polimerasa I, pero sirven como cebadores para otras polimerasas como la E.coli fragmento Klenow consistente con los datos anteriores que muestran que dichos cebadores con 3' LNA rematados pueden servir como cebadores en las reacciones de extensión de la polimerasa cuando se hibridan para dirigirse a los ADN de cadena sencilla. También se ha encontrado que no todas las polimerasas parecen ser capaces de iniciarse a partir de intermedios de recombinación, quizás reflejando que para algunas polimerasas se requieren tramos más largos de ADN de cadena sencilla con cebadores unidos. Por ejemplo, se ha encontrado que la polimerasa phi-29 no puede iniciar la síntesis a partir de un intermedio de recombinación. También existe evidencia de que, sin embargo, se puede sintetizar a partir de un cebador con límite de 3' LNA. Finalmente, de acuerdo con los informes publicados, se ha encontrado que para una recombinasa determinada, existe una longitud mínima de cebador requerida para que el intercambio de cadenas asistido por recombinasa se produzca de manera eficiente. Específicamente, los oligonucleótidos más cortos que 27-30 pares de bases son sustratos pobres para uvsX. Sin embargo, los cebadores tan cortos como 20-27 nucleótidos pueden ser perfectamente adecuados para soportar el cebado mediado por hibridación. De este modo, al combinar un cebador más largo y uno más corto, uno puede sesgar las reacciones de RPA para usar un cebador para el alargamiento impulsado por la invasión y el otro para el alargamiento conducido por hibridación.

En conjunto, estos hechos sugieren una variedad de configuraciones en las cuales las reacciones pueden ser ensambladas de manera que la síntesis se inicia desde un lado, y solo cuando ha pasado el segundo sitio, comienza la síntesis opuesta. Por ejemplo, una reacción de RPA se puede configurar de manera tal que un cebador sea un oligonucleótido normal y el cebador opuesto sea un oligonucleótido rematado con LNA en 3'. En la misma reacción, una polimerasa que no puede usar oligonucleótidos con límite de 3'LNA, pero que trabaja a partir de estructuras invasoras, se mezcla con uno que puede usar oligonucleótidos con límite de 3'LNA pero que funciona solo a partir de estructuras de hibridación. La invasión mediada por la recombinasa y la extensión del cebador normal generarán moléculas de ADN de una sola cadena, que luego pueden servir como plantillas para la síntesis de la segunda polimerasa cuando un cebador opuesto con 3'LNA hibrida a su sitio diana. Alternativamente, un segundo cebador corto que funciona solo en la hibridación también aseguraría el uso del cebador asimétrico. Se pueden usar otras configuraciones de longitud y naturaleza de oligonucleótidos, con diferentes polimerasas, para generar el efecto deseado. Por lo tanto, el uso de cebadores asimétricos debería resolver cualquier interferencia causada por la colisión de la horquilla de replicación; sin embargo, también puede ser necesario controlar la actividad de la recombinasa para evitar la reinvasión de ADN de cadena sencilla desplazados por la síntesis del cebador normal.

La combinación de cebadores asimétricos y el control de los niveles de ATP puede proporcionar condiciones suficientes para amplificar ADN largos (>10 kb). Otro factor que puede afectar la eficiencia de la amplificación de ADN largos es la interferencia de otros ADN de plantilla, otro ADN no de plantilla y el producto de la propia reacción de RPA, como los ADN de cadena sencilla desplazados. Además de la posibilidad de que la recombinasa pueda asociarse con un ADN de cadena sencilla desplazada y mediar una reacción de invasión sobre el ADN de plantilla, también existe la posibilidad de que los ADN de cadena sencilla y otros ADN no de plantilla de la muestra puedan hibridar de forma inadecuada con los ADN de plantilla de destino y interferir con la replicación eficiente. Para evitar algunas de estas dificultades, al menos durante las primeras rondas de replicación sería útil reparar espacialmente el ADN de plantilla y evitar la asociación con otros ADN largos. Un medio conveniente para lograr esto es ensamblar las reacciones de RPA en una matriz de gel, como un gel de poliacrilamida ajustado con un tamaño de poro promedio que permita la libre movilidad de pequeños componentes de RPA, como las enzimas y los cebadores, pero no permita la motilidad libre de ADN largos. Las muestras de ADN a baja concentración de inicio estarán separadas físicamente, no podrán asociarse entre sí, mientras que los componentes de RPA más pequeños permanecerán relativamente libres para asociarse con las moléculas de la plantilla. Church y sus colegas han descrito el uso de geles de poliacrilamida de esta manera para la PCR y sus colegas para producir amplicones aislados espacialmente, que pueden resolverse en dos dimensiones, conocidos como colonias de polimerasa o polonias [Mitra R, Church G (1999) In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules. Nucl Acids Res 27(24): e34i-vi.]. Normalmente, las polonias se usan para obtener imágenes de amplicones de distintas plantillas y, por lo tanto, se generan en portaobjetos de microscopio. Sin embargo, para la amplificación de ADN largos, no sería necesario resolver polonias individuales, por lo que las reacciones podrían ensamblarse en cualquier recipiente apropiado.

El ensayo polonia en sí puede beneficiarse del uso de RPA en lugar de PCR. Hay al menos dos dificultades con el uso de PCR. En primer lugar, debido a que las polonias generalmente se generan en portaobjetos de microscopio y el vidrio es un mal conductor del calor, los tiempos requeridos para las PCR pueden ser significativamente más largos que para la PCR de fase en volumen normal. Esto significa que la difusión del producto de amplificación conduce a tamaños de polonia bastante grandes, incompatibles con ensayos de alta densidad y alto rendimiento. En segundo lugar, debido a que la PCR requiere la fusión térmica del ADN de plantilla, se requieren temperaturas superiores a 90°C durante períodos prolongados. Estas altas temperaturas aumentarán las tasas de difusión y aumentarán aún más el tamaño medio de polonia. RPA con su baja temperatura constante superará ambos problemas.

Uso del entorno de recombinación dinámica RPA para permitir la identificación del estado polimórfico de un amplicón dado

Se ha demostrado ampliamente que la presencia o ausencia de una secuencia de ácido nucleico definida puede determinarse formando un híbrido entre un ácido nucleico de muestra con una sonda de ácido nucleico de naturaleza

previamente determinada, seguido de un método apropiado para detectar dicha interacción. Por ejemplo, ahora se usan ampliamente microarreglos en los que el ADN, el ARN u otros oligonucleótidos de la cadena principal están separados espacialmente e inmovilizados en un soporte. La presencia o ausencia de una secuencia homóloga en una muestra se determina luego mediante la incubación de las muestras en condiciones de temperatura y regulador apropiadas que permiten que se formen híbridos entre la sonda inmovilizada y los ácidos nucleicos de la muestra. En este caso, tanto la muestra como la sonda se proporcionan en estado fundido total o parcialmente para que puedan hibridarse. Siempre que se incorpore una etiqueta en la muestra, la interacción se puede cuantificar posteriormente.

Se han descrito métodos alternativos para formar híbridos específicos de secuencia en los que uno de los ácidos nucleicos participantes es de doble cadena al comienzo, y se forma un híbrido que contiene proteínas de tres cadenas por la acción de enzimas recombinasas como E. coli recA en presencia de análogos de nucleótido trifosfato no hidrolizables (véase la Patente de los Estados Unidos No 5,460,941 y la Patente de los Estados Unidos No 5,223,414). También se describen métodos alternativos que emplean recombinasas pero que buscan estabilizar los intermedios de recombinación libres de proteínas formando estructuras de cuatro cadenas (véase la Patente de los Estados Unidos No 5,273,881). Sin embargo, estos métodos difieren de los descritos en el presente documento tanto en el método como en el resultado como se describe más adelante.

En muchos casos, el proceso de formación híbrida es de fidelidad suficiente para discriminar entre la presencia y la ausencia de la diana, y además para determinar si es una coincidencia perfecta o no. Por ejemplo, los cebadores cortos (por ejemplo, de 7 a 18 nucleótidos de longitud) pueden discriminar entre complementos perfectos e imperfectos si las condiciones de hibridación se controlan rigurosamente. Sin embargo, si el ácido nucleico es más largo y solo hay pequeñas variaciones entre un híbrido perfecto y un híbrido imperfecto, por ejemplo, unos pocos nucleótidos en una región de unos cien o más, es poco probable que una diferencia suficientemente grande en la eficiencia de la hibridación entre una variante de este tipo y una coincidencia perfecta.

Este método se refiere a la determinación del estado polimórfico de una muestra de ácido nucleico formando híbridos entre los productos de una reacción de amplificación y los ácidos nucleicos de la sonda inmovilizados y previamente sintetizados presentes en ubicaciones definidas, y cada ubicación individual que contiene una población pura de fragmentos que representan una de las longitudes de repetición conocidas presentes en la población.

Las secuencias de ADN amplificadas por el método de amplificación de la polimerasa de recombinación (RPA) son objetivos ideales para este tipo de ensayo basado en formación híbrida por las siguientes razones. En primer lugar, es posible configurar el método RPA para generar principalmente un producto de ADN de doble cadena, o en su mayoría un producto de ADN de una sola cadena, por ejemplo, alterando las relaciones de los cebadores de amplificación. En segundo lugar, las reacciones de RPA contienen todos los componentes necesarios para permitir la asociación de híbridos entre el ADN inicialmente dúplex y los ADN de cadena sencilla, sin necesidad de fundir térmicamente el ADN de doble cadena. Por lo tanto, se requiere poca manipulación adicional de la muestra.

Se han descrito otros métodos que emplean recombinasas y el uso de análogos no hidrolizables de ATP, como ATP-γ-S, para estabilizar híbridos de ácidos nucleicos complementarios relacionados en un intermedio 'triplex' mal definido que implica la presencia continua de la recombinasa. Sin embargo, este método no funcionará en este contexto descrito aquí, porque estas estructuras altamente estables no son dinámicas y presentan una resistencia significativa de los productos de reacción al acceso de otros agentes. Como consecuencia, el uso de recombinasas con análogos de ATP no hidrolizables conduce a la formación de híbridos extremadamente estables entre los ADN que contienen un grado significativo de desajuste, lo que no permite una discriminación eficiente entre secuencias. En contraste, el método descrito aquí emplea un sistema dinámico que utiliza ATP u otros análogos hidrolizables en los cuales los híbridos se desestabilizan y se generan fácilmente. El resultado neto es un gran enriquecimiento para las interacciones de complemento perfecto.

En un ejemplo preferido, después de completar una reacción de RPA o concomitante con ella, la mezcla de reacción se pone en contacto con una serie de moléculas de sonda de manera que cada ADN polimórfico amplificado en primer lugar, localizará el ácido nucleico de la sonda inmovilizada correcta que contiene exactamente la misma secuencia complementaria. Si esta reacción inicial de formación de híbridos no se produce con suficiente eficiencia o fidelidad, como es probable con secuencias muy similares, entonces la naturaleza dinámica de la reacción dirigida por la recombinasa debería resolver los desajustes. Esto se debe a que los híbridos imperfectos contendrán burbujas y características no dúplex, que actúan para ayudar a la recarga de la recombinasa en estos híbridos y causan una mayor tasa de interrupción híbrida cuando se comparan con las coincidencias perfectas. Se permite que ocurran nuevos eventos de formación de dúplex y solo si se forman híbridos perfectos se vuelven relativamente resistentes a nuevas reacciones. En la práctica, si todo el número posible de una repetición de STR se ordenó por orden de número de repetición, entonces al final puede producirse un gradiente de híbridos formados que alcanzan los máximos en las coincidencias exactas, es más débil en los flancos directos y está ausente. A medida que las burbujas de desajuste aumentan de tamaño, hay una tendencia progresivamente mayor a que la recombinasa se vuelva a cargar en la región de la burbuja de cadena sencilla. (Figuras. 58 y 59).

Además, si el sistema dinámico de recombinasa no es lo suficientemente específico para discernir entre híbridos perfectos e imperfectos, se pueden incluir componentes adicionales que interrumpan el híbrido en la reacción. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, helicasas, nucleasas, recombinasas, polimerasas y otros agentes de unión al

ADN. Existen varias helicasas y nucleasas que se dirigen selectivamente a formas específicas de ADN, o estructuras, de manera que interactúan y resuelven desajustes o burbujas, pero no en híbridos perfectos. Por ejemplo, la helicasa PriA de E. coli interactúa con regiones en las que el ADN de cadena sencilla está expuesto adyacente al ADN de doble cadena, como ocurriría en una falta de coincidencia en el número de repeticiones que podría ocurrir con las hibridaciones STR, y posteriormente puede actuar para desenrollar ADN en una dirección de 3' a 5'. Dicha desestabilización permitiría que la recombinasa se vuelva a cargar en estas cadenas separadas permitiendo que se forme un nuevo híbrido alternativo. Con el tiempo, tal mecanismo se enriquecería para los híbridos solo entre el objetivo y la sonda correctos. De manera similar, la replicación helicasa de E. coli, DnaB, se cargará en el ADN de una sola cadena y desenrollará el ADN dúplex, en una dirección 5'-3', opuesta a la de PriA. Las dda helicasa del bacteriófago T4 se carga en el ADN de cadena sencilla. La dda helicasa es tan poderosa que puede desplazar otras proteínas unidas al ADN en su camino. Se ha demostrado que la dda helicasa interrumpe las interacciones de estreptavidina-biotina de afinidad muy alta (cuando la biotina está en el extremo 3' del oligonucleótido), por lo tanto, la dda helicasa podría usarse para desestabilizar complejos de sonda inmovilizados en una superficie (Byrd and Raney, 2004 (Morris y Raney, 1999).

Alternativamente, los productos génicos RuvA y RuvB de E. coli forman una helicasa que puede rodear el ADN de doble cadena y conducir puntos de ramificación a lo largo del ADN. De esta manera, se podría "empujar" una burbuja hasta el final de la plantilla, causando una desestabilización suficiente para permitir la carga de recombinasa, así como otros eventos. Las nucleasas que atacarían las imperfecciones en el carácter dúplex incluirían, por ejemplo, la nucleasa S1, que puede cortar ADN de doble cadena en un desajuste o burbuja. Existen otras nucleasas de este tipo con características específicas de la estructura. Tales muescas pueden servir para iniciar el alargamiento de la polimerasa que desplaza la cadena. Alternativamente, si la nucleasa escinde la sonda de ADN, entonces es posible que se libere un grupo químico o enzimático del sitio de inmovilización, de modo que con el tiempo una señal generada posteriormente permanezca solo en el punto en donde se formaron los híbridos perfectos.

Así, al combinar los componentes necesarios, debería ser posible crear un entorno en donde los híbridos perfectos dominen significativamente y los sitios imperfectos se agoten, o se vuelvan indetectables. La clave de este método es el establecimiento de un entorno dinámico en donde los híbridos puedan formarse e interrumpirse de tal manera que la estabilidad de los híbridos perfectos e imperfectos permita la discriminación sensible de productos de reacción con diferentes características polimórficas. Este entorno es idealmente proporcionado por el sistema de recombinasa dinámico/estable que comprende gp32, uvsX, uvsY, compuesto de PEG y un sistema de regeneración de ATP como se describe.

La presencia o ausencia de un híbrido productivo, o la pérdida de una etiqueta de un sitio de inmovilización (por ejemplo, ver el método de nucleasa anterior) se puede medir por métodos estándar. Estos incluyen la incubación de la reacción en el punto final con un sustrato para una enzima inmovilizada en el objetivo de ADN o la sonda de ADN. Otros métodos de detección son posibles y se describen ampliamente en otros lugares.

El entorno dinámico de recombinasa persistente para uso amplio en técnicas moleculares.

Nos propusimos establecer el entorno perfecto para la actividad de recombinasa dinámica con una mente que permita la amplificación geométrica masiva de ácidos nucleicos a baja temperatura constante. Sin embargo, el ambiente establecido obviamente podría emplearse en combinación con otras enzimas, o incluso sin ellas, en una variedad de contextos para reemplazar las reacciones de hibridación clásica en general. Por ejemplo, los procedimientos de clonación molecular podrían aprovechar la posibilidad de recombinar grandes extensiones de ADN entre sí de manera mucho más efectiva que mediante fusión térmica y fusionamiento. Además, muchas otras enzimas que podrían emplearse para procesos moleculares *in vitro* podrían beneficiarse del entorno de baja temperatura compatible con la mayoría de las enzimas mesófilas. Dichas enzimas incluirían, además de las polimerasas, nucleasas que reconocen la distorsión de hélice (por ejemplo, nucleasa S1), endonucleasas FLAP, endonucleasas de restricción, enzimas modificadoras de bases, liasas, helicasas, topoisomerasas, ligasas, transcriptasas inversas, actividad de la ARNasa H, resolvasas, ARN polimerasas y cualquier otra enzima que actúe sobre los ácidos nucleicos o que interactúe con ellos. También podrían involucrar otras enzimas pertinentes al sistema *in vitro* además de las enzimas que metabolizan el ADN, como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano picante utilizadas en los protocolos de detección. La combinación de las propiedades únicas del sistema de recombinación dinámica estable con otras actividades enzimáticas permite un número potencialmente muy grande de nuevos métodos y aplicaciones.

Además de reconocer el importante impacto de la combinación de sistemas de hibridación enzimática dinámica a baja temperatura con otros sistemas enzimáticos, se ha establecido el conocimiento de secuencia para el ensamblaje óptimo de recombinación altamente activa utilizando cebadores de oligonucleótidos cortos con base en experimentos con RPA. Se ha notado que los cebadores muy activos se caracterizaron por una distribución particularmente rica de pirimidinas. Los residuos de guanosina, en contraste, aparecieron pobremente representados en los oligonucleótidos más activos que se ha analizado, y los resultados anteriores sugirieron que cuando se añaden al extremo 5' de los oligonucleótidos, pueden disminuir su actividad. En esta divulgación informamos los resultados experimentales del monitorización dinámico de la reacción para estudiar los efectos de añadir secuencias de ADN a los extremos 5' de los oligonucleótidos. La adición de secuencias a la extensión 5' de oligonucleótidos por lo demás idénticos tiene un efecto significativo sobre su actividad en RPA. Se sugiere que estas observaciones se interpretan mejor como que

reflejan el comportamiento de carga de la recombinasa en el ADN de cadena sencilla y posiblemente dúplex. También pueden tener roles en el control de las fases definidas de las recombinasas en los ADNss.

Como punto de partida, hubo observación de a través de estudios cinéticos (no en tiempo real) y observaciones generales, que algunos pares de cebadores eran capaces de mediar una amplificación de ADN más rápida que otros. Se identificaron cebadores particularmente rápidos para el marcador STR humano CSF1PO, que parecía tener un tiempo de duplicación promedio de aproximadamente 30 segundos (estimado como duplicaciones promedio por unidad de tiempo desde el inicio hasta la acumulación de producto detectable), y capaz de generar niveles detectables de producto en el plazo de 15 minutos comenzando con unos pocos miles de la diana (véase la Figura 67). Otros pares de cebadores tomaron típicamente, tomando 20-35 minutos para lograr resultados similares. Tratamos de obtener más información sobre el origen de esta variabilidad (véase la Figura 67, y los datos no se muestran).

El análisis de la secuencia de ADN de los cebadores CSF1PO reveló que eran relativamente ricos en pirimidinas, y también eran bastante bajos en guanosina. Esta observación se correlacionó con una parte de los datos que surgieron de un experimento anterior en donde se investigó cómo agregar un tramo de residuos de citosina o guanosina al extremo 5' de los oligonucleótidos afectó su comportamiento en RPA. En la Figura 68 se muestra un experimento de amplificación en tiempo real en donde se utilizaron cebadores específicos para el locomotor de esporulación de Bacillus subtilis SpOB, denominados J1 y K2, para amplificar un fragmento del ADN genómico de B. subtilis. En el experimento que se muestra en la figura 67, se observa que un tramo de guanosinas había "calmado" la reacción general, mientras que un tramo de citosinas adjuntas había "silenciado" las reacciones de amplificación. Repetimos este experimento y monitorizamos la reacción en tiempo real, los hallazgos mostrados en la Figura 68. Los resultados fueron consistentes con la noción de que las bases anexas afectaron, al menos, el comportamiento de la velocidad y la actividad presumiblemente de los cebadores. Los cebadores J1 y K2, en los que todas las bases coinciden con el objetivo genómico, generan un producto que es detectable por primera vez con el colorante SYBR verde en poco más de 30 minutos en este experimento (se observaron cinéticas más rápidas en experimentos posteriores, y la variación puede haber surgido debido a la ausencia de aumento de temperatura óptimo cuando se utiliza un lector de microplacas convencional, como ocurrió en estos experimentos). Una muestra con ADN objetivo, y una sin ADN, se distinguieron en este experimento debido a un pequeño retardo en la acumulación de producto y la cinética de acumulación de variantes. Los cebadores añadidos con residuos de citosina adicionales, J1(C) y K2(C), fueron claramente capaces de amplificar el ADN significativamente más rápidamente. Sin embargo, se observa que la acumulación de artefactos (derivados del cebador) se produce en una escala de tiempo similar a la del ADN objetivo, claramente menos bien separados que en los cebadores no aplicados. Se deduce que los cebadores de cola C son simplemente cebadores más rápidos (aunque 'más ruidosos' también en este caso). A la inversa, la cinética de la acumulación de los cebadores anexos a los residuos de G fue muy pobre, y no se observó producto final esperado claramente identificable en la electroforesis en gel, incluso a los 90 minutos.

Sobre la base de los presentes resultados, y la integración de estos hallazgos con el trabajo publicado, lleva a especular que la composición de secuencia podría afectar la carga de recombinasa en los cebadores, y que las pirimidinas podrían promover este proceso de carga. El trabajo publicado es conflictivo en esta área; en algunos estudios se ha hecho un caso para la preferencia de la unión de recA a los procesos de recombinación para los residuos G y T que están enriquecidos en puntos calientes de recombinación de E. coli (Tracy and Kowalczykowski). A la inversa, los estudios de dinámica de carga de recA realizados con anisotropía de fluorescencia sacaron conclusiones sorprendentemente diferentes (Bar-Ziv and Libchaber). En este caso, la barrera para la nucleación de recA (la fase lenta de la formación de filamentos de nucleoproteínas) fue altamente sensible a la composición, mostrando una fuerte tendencia favorable hacia las pirimidinas. Estas últimas observaciones serían más consistentes con las presentes observaciones. De hecho, como RPA tiende a emplear oligonucleótidos bastante cortos, resulta fácil ver cuán importante es el evento de nucleación de la recombinasa para dar un comportamiento de amplificación efectivo. No solo la rápida nucleación es altamente deseable para permitir niveles aceptables de carga de filamentos, sino que además será crítico que esto ocurra preferentemente hacia el extremo 5' del filamento. Si el extremo 5' es un sustrato pobre para la nucleación, mientras que una secuencia interna es bastante buena, existe la posibilidad de que la mayoría de los filamentos se carguen solo parcialmente y, como tal, no funcionen correctamente en RPA. Dichos filamentos parcialmente cargados pueden cargarse de manera insuficiente para hidrolizar el ATP de manera adecuada, no pueden sufrir un intercambio de cadenas de manera eficiente y pueden retirarse de manera efectiva de un conjunto activo de filamentos. Peor aún, pueden "envenenar" la reacción formando complejos de búsqueda de homología con ADN, pero, al no poder experimentar el comportamiento dinámico normal (si están por debajo de la longitud necesaria para promover la hidrólisis), pueden bloquear el ADN objetivo en complejos improductivos, como ocurre cuando se emplea ATP-γ-S

.A pesar de que los presentes primeros resultados son consistentes con la idea de que las pirimidinas son buenos sitios de nucleación y la posibilidad atractiva de que esto solo explique la variación observada, debemos señalar que ninguno de los ensayos anteriores es realmente equivalente al sistema experimental que se está empleando. La carga de filamentos, la descarga, el comportamiento de hidrólisis, etc., son todos relevantes en el concierto en la situación de amplificación, y pueden estar en juego múltiples factores. Además, es probable que la fase de recombinasa pueda desempeñar un papel en la determinación de la actividad de los cebadores, y que esto se haya establecido mediante una nucleación preferencial en ubicaciones particulares, un fenómeno descrito anteriormente para recA (Volodin et al.; Volodin and Camerini-Otero). En este caso, la nucleación ocurriría preferentemente en el extremo 5', establecer una fase comprometida con todo el filamento, y la longitud del filamento tendría que tener una longitud perfecta para colocar

la última proteína sobre el extremo 3' en el hombre más deseable. Además de las complejidades adicionales asociadas con la situación de amplificación descrita, todos estos estudios anteriores se realizaron con la proteína RecA de E. coli, y no con la proteína UvsX T4, y como estas proteínas se desvían significativamente al nivel de secuencia primaria, puede que no sea así posible extrapolar conclusiones de estudios RecA a la proteína UvsX. No obstante, al notar la importancia de la composición de secuencias, y en particular de la composición de secuencias en 5', se ha comenzado a analizar con mayor profundidad qué secuencias son más efectivas para agregarse al extremo 5', es decir, buscamos determinar los 'sitios de aterrizaje' idealizados para la recombinasa en este sistema y/o aquellas que están asociadas con otras propiedades beneficiosas para la amplificación y los procesos *in vitro* en general. Aún más, se anticipa que la eliminación gradual de las recombinasas puede desempeñar un papel importante en la actividad general, y que esto estará influenciado por la composición y la longitud precisa del oligonucleótido.

Se investigó si añadir un tramo de residuos de timina, o una mezcla de citosina y timinas (pirimidinas) sería tan eficaz como un tramo de residuos de citosina para estimular una mayor actividad primaria. Los resultados de este análisis se muestran en la figura 69. Es interesante que, al agregar una serie de timinas al extremo 5' de los oligonucleótidos, este experimento no mejoró el comportamiento de la tasa de amplificación. De hecho, más bien al contrario, la combinación de los cebadores con las timinas anexas dio un comportamiento de amplificación muy pobre en este experimento. También se probó cebadores en los que la secuencia adjunta era una mezcla de citosina y timina, como se indica. El comportamiento de estos cebadores en varias combinaciones fue bastante más variable y complejo. Por ejemplo, se notó la presencia de bandas adicionales consistentes, pero no probadas, como equivalentes de una sola cadena del producto. Un análisis cuidadoso muestra que, en diferentes combinaciones, el comportamiento de migración de esta posible banda de cadena sencilla fue de un tipo o de un segundo tipo, y que esto se correlacionó con el cebador utilizado. En resumen, sospechamos que en estas reacciones uno u otro, el cebador fue más activo, lo que condujo al desarrollo de asimetría en la reacción y la acumulación de ADN de una sola cadena no se observó con los oligonucleótidos progenitores no deseados. Fue difícil racionalizar los resultados, pero se puede concluir que en este experimento los tramos de timina no fueron efectivos, ni los polímeros mixtos fueron muy efectivos a pesar de una ligera tendencia a aparecer más activos si hubiera más citosinas presentes.

En el siguiente experimento, agregamos aún más residuos al final de los oligonucleótidos y se compara su comportamiento en un análisis en tiempo real. Una vez más, hubo variabilidad entre los cebadores, y en este experimento se realiza la inclusión de como control cada cebador incubado por sí mismo. De manera interesante, se observa que, a las muy bajas concentraciones del objetivo utilizado aquí (1 copia por densidad de inicio de microlitro), el ruido generado por los cebadores individuales apareció en un período de tiempo similar a la acumulación de ADN del producto observado cuando se usaron pares de cebadores. Además, esto es más obvio para el oligonucleótido K2(C), estudiado previamente, y es responsable de una amplificación muy rápida cuando se combina con oligonucleótidos J1. Esto sugiere que el monitorización individual de los oligonucleótidos para determinar su tasa de generación de ruido es útil para determinar su actividad general. Finalmente, y desconcertantemente, un oligonucleótido solo un par de bases más corto que K2(C), el oligonucleótido 9 en la serie de la Figura 70, carecía de este comportamiento de amplificación fuerte y rápido. Si bien los oligonucleótidos utilizados en este estudio no se purificaron mediante HPLC, no obstante, se supone que la mayoría de los oligonucleótidos son de forma completa (según las imágenes de gel suministradas por el fabricante). Tomada en el valor nominal, se debe tomar esta observación sorprendente para reflejar que el número de residuos de C, cambiando de 5 a 6, en el extremo 5' es un punto de transición significativa para alguna característica estructural de este oligonucleótido, o podría ser tomado para reflejar la influencia adicional de algunos comportamientos de fase. En este último caso, podríamos especular que las secuencias 5' influyen fuertemente en la fase y deposición del primer monómero UvsX, y que esta fase se mantiene hasta el extremo 3'. Presumiblemente, si el monómero UvsX más 3' se asienta perfectamente sobre el extremo del oligonucleótido, o si hay pares de bases un poco demasiados o demasiado pocos para permitir que cada monómero UvsX se una a su número máximo de residuos de la columna vertebral, puede influir en la probabilidad esa recombinación procede eficientemente hasta su finalización. También puede influir en el fondo, ya que, si hay unas pocas bases 'de repuesto' que sobresalen del extremo 3', esto podría ser un promotor mejorado del ruido del cebador.

En conclusión, se ha mostrado aquí cuán crítica puede ser la composición de la longitud y la secuencia de los oligonucleótidos para obtener el mejor rendimiento en RPA y otros procesos impulsados por la recombinasa. Además, se demuestra formalmente que las secuencias no diana se pueden adjuntar a los extremos 5' de los oligonucleótidos para efectuar la regulación de su actividad en RPA.

Además de la amplificación de ADN, un sistema de recombinasa que incluye análogos de ATP hidrolizables y componentes para asegurar una alta carga de moléculas de ADN en esta situación, podría emplearse como un reemplazo para otros métodos de hibridación descritos.

Control de la contaminación en reacciones RPA.

Como RPA es un método de detección muy sensible, se ha encontrado problemas con la contaminación por arrastre observada con otros protocolos de amplificación ultrasensibles como la PCR. Aquí se muestra que el dUTP se puede usar para reemplazar parcial o totalmente el dTTP en las reacciones de RPA, ofreciendo así una forma sencilla de distinguir los productos de las reacciones de RPA anteriores de las dianas de muestra bona fide. Como el tratamiento térmico de las reacciones de RPA en su inicio con el fin de inactivar la dUTP desglicosilasa (como ocurre en los

protocolos de PCR con control de la contaminación) no es deseable, se sugiere como un método alternativo en donde los inhibidores de la desglicosilasa se mezclan con reacciones para permitir el inicio (véase las Figuras 61 y 62).

RPA de transcripción inversa

En las circunstancias en las que se desea la detección de la presencia de moléculas de ARN específicas, es posible usar RPA para detectarlas siempre que el ARN se convierta primero en una forma de ADN utilizando la actividad de la transcriptasa inversa. Lo más conveniente sería si la transcripción inversa y la RPA pudieran realizarse en un solo entorno homogéneo. Se muestra que las reacciones RPA de transcripción inversa (RT-RPA) se pueden realizar en un entorno de un solo tubo mediante la inclusión de la transcriptasa inversa en el entorno de reacción, y con otras modificaciones menores (véase figura 60).

Detección y evaluación directa de las reacciones de amplificación utilizando membranas de flujo lateral.

Las características de RPA lo hacen ideal para la configuración de productos integrados de diagnóstico de fácil acceso portátiles. En una serie de casos, la evaluación de si se ha producido una reacción de amplificación de ADN específica o no, con solo una necesidad moderada de análisis cuantitativo, puede realizarse mediante formatos simples para evaluar si dos cebadores marcados se han asociado físicamente dentro de un amplicón. Aquí se muestra que esta simple idea es efectiva, y en particular que la tecnología ampliamente empleada de los sistemas de tiras de flujo lateral es ideal para desempeñar esta función. Las reacciones de RPA se pueden mezclar directamente con el regulador de ejecución de la muestra para estos sistemas, y la presencia de amplicón se puede determinar en varios minutos (véase la figura 63).

Compatibilidad de preparaciones crudas de muestras biológicas con RPA.

Aquí se muestra que los lisados simples de sangre se pueden usar directamente en reacciones RPA. Esto ofrece la posibilidad de que el formato de los productos de diagnóstico que contienen el sistema RPA solo requiera un tratamiento trivial de las muestras antes de la adición directa a las reacciones de RPA (véase figura 64).

Comportamiento de las sondas fluorescentes en el entorno estable, persistente y de recombinación dinámica.

Aquí se muestra que la presencia del entorno de recombinación dinámica utilizado en RPA altera el comportamiento de las sondas fluorescentes en relación con entornos equivalentes en otras técnicas como la PCR. Más particularmente si se van a usar sondas de doble marcaje que contienen fluoróforos e inhibidores, el número de bases que separan los dos grupos en el oligonucleótido debe ser menor, probablemente debido a que las proteínas de unión al ADN saturantes estiran las sondas en relación con su estado en forma B ADN dúplex, así como la bobina aleatoria que existe para los oligonucleótidos en solución libre (figura 73). Además, se han identificado enzimas clave que pueden emplearse para procesar específicamente híbridos dúplex entre dichas sondas y sus ADN diana. Estos métodos enseñan el método mediante el cual las estrategias de la 'tercera' sonda en tiempo real deben configurarse con RPA, y cómo esto difiere de los métodos bien establecidos en la PCR, como el método 'Taqman', las balizas moleculares y similares. En particular, se ha determinado que el método 'Taqman' no puede emplearse en RPA presumiblemente porque la nucleasa 5' asociada con las enzimas similares a Pol I de E. coli tiene actividad endonucleasa FLAP que inhibe las reacciones de RPA.

Referencias

Adams, D. E., Tsaneva, I. R. and West, S. C. (1994). Dissociation of RecA filaments from duplex DNA by the RuvA and RuvB DNA repair proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 9901-5.

Alexseyev, A. A., Bakhlanova, I. V., Zaitsev, E. N. and Lanzov, V. A. (1996). Genetic characteristics of new RecA mutants of Escherichia coli K-12. J Bacteriol 178, 2018-24.

Bar-Ziv R, Libchaber A. (2001). Effects of DNA sequence and structure on binding of RecA to single-stranded DNA. PNAS USA Jul 31;98(16):9068-73

Baumann, P., Benson, F. E., Hajibagheri, N. and West, S. C. (1997). Purification of human Rad51 protein by selective spermidine precipitation. Mutat Res 384, 65-72.

Benkovic, S. J., Valentine, A. M. and Salinas, F. (2001). Replisoma-mediated DNA replication. Annu Rev Biochem 70, 181-208.

Bennett, R. L. and Holloman, W. K. (2001). A RecA homologue in Ustilago maydis that is distinct and evolutionarily distant from Rad51 actively promotes DNA pairing reactions in the absence of auxiliary factors. Biochemistry 40, 2942-53.

Better, M. and Helinski, D. R. (1983). Isolation and characterization of the RecA gene of Rhizobium meliloti. J Bacteriol 155, 311-6.

Bianco, P.R. and Weinstock, G.M. (1996). Interaction of the RecA protein of Escherichia colli with single-stranded oligodeoxyribonucleotides. Nucleic Acids Research Dec 15;24(24):4933-9

Bork, J. M., Cox, M. M. and Inman, R. B. (2001). The RecOR proteins modulate RecA protein function at 5' ends of single- stranded DNA. EMBO J 20, 7313-22.

Bork, Cox and Inman J Biol Chem. 2001 Dec 7;276(49):45740-3

Butler BC, Hanchett RH, Rafailov H, MacDonald G (2002) Investigating Structural Changes Induced By Nucleotide Binding to RecA Using Difference FTIR. Biophys J 82(4): 2198-2210

Byrd AK, Raney KD (2004). Protein displacement by an assembly of helicasa molecules aligned along single-stranded DNA. Nat Struct Mol Biol. Jun;11(6):531-8

Cox, M. M., Goodman, M. F., Kreuzer, K. N., Sherratt, D. J., Sandler, S. J. and Marians, K. J. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. Nature 404, 37-41.

Cox, M. M., McEntee, K. and Lehman, I. R. (1981). A simple and rapid procedure for the large scale purification of the RecA protein of Escherichia coli. J Biol Chem 256, 4676-8.

Cromie, G. A. and Leach, D. R. (2000). Control of crossing over. Mol Cell 6, 815-26.

Dillingham, M. S. and Kowalczykowski, S. C. (2001). A step backward in advancing DNA replication: rescue of stalled replication forks by RecG. Mol Cell 8, 734-6.

Eggler, Lusetti and Cox, J Biol Chem. 2003 May 2;278(18):16389-96

Eggleston, A. K. and West, S. C. (2000). Cleavage of holiday junctions by the Escherichia coli RuvABC complex. J Biol Chem 275, 26467-76.

Elias-Arnanz M, Salas M. EMBO J. 1997 Sep 15;16(18):5775-83

Ferrari et al., J Mol Biol. 1994 Feb 11;236(1):106-23

Formosa T, Alberts BM. J Biol Chem. 1986 May 5;261(13):6107-18

Formosa T, Alberts BM. Cell. 1986 Dec 5;47(5):793-806. DNA synthesis dependant on genetic recombination: characterization of a reaction catalyzed by purified bacteriophage T4 proteins.

Glover, B. P. and McHenry, C. S. (2001). The ADN polimerasa III holoenzyme: an asymmetric dimeric replicative complex with leading and lagging strand polymerases. Cell 105, 925-34.

Goodman, H. J., Parker, J. R., Southern, J. A. and Woods, D. R. (1987). Cloning and expression in Escherichia coli of a RecA-like gene from Bacteroides fragilis. Gene 58, 265-71.

Hacker KJ, Alberts BM. J Biol Chem. 1992 Oct 15;267(29):20674-81

Harris LD, Griffith J. J Biol Chem. 1987 Jul 5;262(19):9285-92

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res. 1996 Oct;6(10):986-94.

Heyer, W. D. and Kolodner, R. D. (1989). Purification and characterization of a protein from Saccharomyces cerevisiae that binds tightly to single-stranded DNA and stimulates a cognate strand exchange protein. Biochemistry 28, 2856-62.

Hickson, I. D., Gordon, R. L., Tomkinson, A. E. and Emmerson, P. T. (1981). A temperature sensitive RecA protein of Escherichia coli. Mol Gen Genet 184, 68-72.

Hsieh, P., Camerini-Otero, C. S. and Camerini-Otero, R. D. (1992). The synapsis event in the homologous pairing of DNAs: RecA recognizes and pairs less than one helical repeat of DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 6492-6.

Hsieh P, Camerini-Otero CS, Camerini-Otero RD. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Jul 15;89(14):6492-6

Kato, R. and Kuramitsu, S. (1993). RecA protein from an extremely thermophilic bacterium, Thermus thermophilus HB8. J Biochem (Tokyo) 114, 926-9.

Katz FS, Bryant FR. Biochemistry. 2001 Sep 18;40(37):11082-9

Kelman, Z. and O'Donnell, M. (1995). ADN polimerasa III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. Annu Rev Biochem 64, 171-200.

Komori, K., Miyata, T., DiRuggiero, J., Holley-Shanks, R., Hayashi, I., Cann, I. K., Mayanagi, K., Shinagawa, H. and Ishino, Y. (2000). Both RadA and RadB are involved in homologous recombination in Pyrococcus furiosus. J Biol Chem 275, 33782-90.

Komberg, A. and Baker, T. A. (1992). DNA Replication. New York: W. H. Freeman and Company.Kuil et al., Biophys Chem. 1988 Dec;32(2-3):211-27

Kowalczykowski SC, Lonberg N, Newport JW, Paul LS, von Hippel PH., Biophys J. 1980 Oct;32(1):403-18.

Kuramitsu, S., Hamaguchi, K., Ogawa, T. and Ogawa, H. (1981). A large-scale preparation and some physicochemical properties of RecA protein. J Biochem (Tokyo) 90, 1033-45.

Kurumizaka, H., Ikawa, S., Ikeya, T., Ogawa, T. and Shibata, T. (1994). A chimeric RecA protein exhibits altered double-stranded DNA binding. J Biol Chem 269, 3068-75.

Lavery PE, Kowalczykowski SC. J Biol Chem. 1992 May 5;267(13):9307-14

Liu, J., Nurse, P. and Marians, K. J. (1996). The ordered assembly of the phiX174-type primosome. III. PriB facilitates complex formation between PriA and DnaT. J Biol Chem 271, 15656-61.

Lohman and Ferrari, Annu Rev Biochem. 1994;63:527-70

Lovett, C. M., Jr. and Roberts, J. W. (1985). Purification of a RecA protein analogue from Bacillus subtilis. J Biol Chem 260, 3305-13.

Maeshima, K., Morimatsu, K. and Horii, T. (1996). Purification and characterization of XRad51.1 protein, Xenopus RAD51 homologue: recombinant XRad51.1 promotes strand exchange reaction. Genes Cells 1, 1057-68.

Marians, K. J. (1992). Prokaryotic DNA replication. Annu Rev Biochem 61, 673-719.

Marians, K. J. (1999). PriA: at the crossroads of DNA replication and recombination. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 63, 39-67.

Mazin, A. V. and Kowalczykowski, S. C. (1998). The function of the secondary DNA-binding site of RecA protein during DNA strand exchange. EMBO J 17, 1161-8.

McGlynn, P. and Lloyd, R. G. (1999). RecG helicasa activity at three- and four-strand DNA structures. Nucleic Acids Res 27, 3049-56.

McGlynn, P., Mahdi, A. A. and Lloyd, R. G. (2000). Characterisation of the catalytically active form of RecG helicasa. Nucleic Acids Res 28, 2324-32.

Mitra, R., Church, G. (1999). In situ localized amplification and contact replication of many individual DNA molecules. Nucl Acids Res 27(24): e34i-vi

Morel, P., Cherny, D., Ehrlich, S. D. and Cassuto, E. (1997). Recombination-dependent repair of DNA double-strand breaks with purified proteins from Escherichia coli. J Biol Chem 272, 17091-6.

Morrical SW, Wong ML, Alberts BM. J Biol Chem. 1991 Jul 25;266(21):14031-8. Amplification of retroajuste DNA synthesis reactions by the uvsX recombinase of bacteriophage T4.

Morrical and Alberts J Biol Chem. 1990 Sep 5;265(25):15096-103. The UvsY protein of bacteriophage T4 modulates recombination-dependant DNA synthesis in vitro.

Morris PD, and Raney KD. (1999). DNA helicasas displace streptavidin from biotin-labeled oligonucleotides. Biochemistry Apr 20;38(16):5164-71

Ng, J. Y. and Marians, K. J. (1996a). The ordered assembly of the phiX174-type primosome. I. Isolation and identification of intermediate protein-DNA complexes. J Biol Chem 271, 15642-8.

Ng, J. Y. and Marians, K. J. (1996b). The ordered assembly of the phiX174-type primosome. II. Preservation of primosome composition from assembly through replication. J Biol Chem 271, 15649-55.

Paulus, B. F. and Bryant, F. R. (1997). Time-dependent inhibition of RecA protein-catalyzed ATP hydrolysis by ATP-gammaS: evidence for a rate-determining isomerization of the RecA- ADNss complex. Biochemistry 36, 7832-8.

Pham, P., Bertram, J. G., O'Donnell, M., Woodgate, R. and Goodman, M. F. (2001). A model for SOS-lesion-targeted mutations in Escherichia coli. Nature 409, 366-70.

Pierre, A. and Paoletti, C. (1983). Purification and characterization of RecA protein from salmonella typhimurium. J Biol Chem 258, 2870-4.

Rashid, N., Morikawa, M., Kanaya, S., Atomi, H. and Imanaka, T. (2001). RecA/Rad51 homolog from Thermococcus kodakaraensis KODI. Methods Enzymol 334, 261-70.

Reddy, Weitzel and Von Hippel, Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Apr 15;90(8):3211-5

Riddles PW, Lehman IR. J Biol Chem. 1985 Jan 10;260(1):170-3

Rosselli, W. and Stasiak, A. (1990). Energetics of RecA-mediated recombination reactions. Without ATP hydrolysis RecA can mediate polar strand exchange but is unable to recycle. J Mol Biol 216, 335-52.

Salinas F, Jiang H, Kodadek T. J Biol Chem. 1995 Mar 10;270(10):5181-6. Homology dependence of UvsX protein-catalyzed joint molecule formation.

Scheerhagen et al., J Biomol Struct Dyn. 1986 Apr;3(5):887-98

Shan, Q., Bork, J. M., Webb, B. L., Inman, R. B. and Cox, M. M. (1997). RecA protein filaments: end-dependent dissociation from ADNss and stabilization by RecO and RecR proteins. J Mol Biol 265, 519-40.

Singleton, M. R., Scaife, S. and Wigley, D. B. (2001). Structural analysis of DNA replication fork reversal by RecG. Cell 107, 79-89.

Spies, M., Kil, Y., Masui, R., Kato, R., Kujo, C., Ohshima, T., Kuramitsu, S. and Lanzov, V. (2000). The RadA protein from a hyperthermophilic archaeon Pyrobaculum islandicum is a DNA-dependent ATPase that exhibits two disparate catalytic modes, with a transition temperature at 75 degrees C. Eur J Biochem 267, 1125-37.

Steffen, S. E. and Bryant, F. R. (2000). Purification and characterization of the RecA protein from Streptococcus pneumoniae. Arch Biochem Biophys 382, 303-9.

Tang, M., Pham, P., Shen, X., Taylor, J. S., O'Donnell, M., Woodgate, R. and Goodman, M. F. (2000). Roles of E. coli ADN polimerasas IV and V in lesion-targeted and untargeted SOS mutagenesis. Nature 404, 1014-8.

Tissier, A. F., Lopez, M. F. and Signer, E. R. (1995). Purification and characterization of a DNA strand transferase from broccoli. Plant Physiol 108, 379-86.

Tracy RB, Kowalczykowski SC (1996). In vitro selection of preferred DNA pairing sequences by the Escherichia coli recA protein. Genes Dev. Aug 1;10(15):1890-903.

Vester B, Wengel J., Biochemistry. 2004 Oct 26;43(42):13233-41 Villemain, et al. J Biol Chem. 2000 Oct 6;275(40):31496-504

Volodin AA, Camerini-Otero RD (2002). Influence of DNA sequence on the positioning of RecA monomers in RecA-DNA cofilaments. J Biol Chem. Jan 11;277(2):1614-8.

Volodin AA, Smirnova HA, Bocharova TN, Camerini-Otero RD (2003). Phasing of RecA monomers on quasi-random DNA sequence. FEBS Lett. Jul 10;546(2-3):203-8

Webb, B. L., Cox, M. M. and Inman, R. B. (1995). An interaction between the Escherichia coli RecF and RecR proteins dependent on ATP and double-stranded DNA. J Biol Chem 270, 31397-404.

Webb, B. L., Cox, M. M. and Inman, R. B. (1997). Recombinational DNA repair: the RecF and RecR proteins limit the extension of RecA filaments beyond single-strand DNA gaps. Cell 91, 347-56.

Webb, B. L., Cox, M. M. and Inman, R. B. (1999). ATP hydrolysis and DNA binding by the Escherichia coli RecF protein. J Biol Chem 274, 15367-74.

West, S. C., Countryman, J. K. and Howard-Flanders, P. (1983). Purification and properties of the RecA protein of Proteus mirabilis. Comparison with Escherichia coli RecA protein; specificity of interaction with single strand binding protein. J Biol Chem 258, 4648-54.

Wetmur, J. G., Wong, D. M., Ortiz, B., Tong, J., Reichert, F. and Gelfand, D. H. (1994). Cloning, sequencing, and expression of RecA proteins from three distantly related thermophilic eubacteria. J Biol Chem 269, 25928-35.

Wittwer CT, Hermann M., Moss AA, and Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. Biotechniques. 1997 Jan;22(1):130-1, 134-8

Wittwer C.T., Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques. 1997 Jan;22(1):176-81Xu L, Marians KJ. J Biol Chem. 2002 Apr 19;277(16): 14321-8.

Ejemplos

Como se muestra en este documento, se ha desarrollado un sistema de amplificación de ADN *in vitro* que acopla la secuencia dirigida por recombinasa con la síntesis de desplazamiento de cadena. Esto permite la amplificación de ADN sin una fusión global térmica, química o de plantillas enzimáticas. Las reacciones son sensibles, específicas y funcionan a 37°C sin tratamiento previo del ADN de la muestra. Se observa una amplificación de hasta 1012 veces en 1-1½ horas. Se pueden detectar menos de 10 copias de un ADN objetivo determinado en una muestra compleja con una simple reacción de un solo paso. Este método es una alternativa ideal a la PCR para una variedad de aplicaciones y permitirá sistemas de diagnóstico de ADN altamente portátiles.

Los ejemplos se presentan con el fin de ilustrar más completamente las instancias preferidas de la especificación. Estos ejemplos no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la invención, tal como se abarca en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1: Un ejemplo de una amplificación de la recombinasa polimerasa de cadena principal (lsRPA)

Las secuencias de ADN se pueden amplificar utilizando la síntesis de la cadena principal de acuerdo con el método de amplificación con Recombinasa-Polimerasa (RPA) que se muestra en la Figura 1. La Figura 1 muestra la carga de RecA/cebador. Antes de la adición de la plantilla de ADN y/o polimerasa, RecA y SSB competirán por la unión a los cebadores de oligonucleótidos de cadena sencilla. En presencia de un RecR y RecO, RecA se estabiliza selectivamente en los cebadores de cadena sencilla que forman los filamentos de nucleoproteínas de RecA en un complejo con RecO y RecR. Este complejo es competente para invadir el ADN de doble cadena para formar un bucle D en sitios homólogos a los cebadores de oligonucleótidos. Alternativamente, RecA, RecO y RecR pueden precargarse en cebadores oligonucleotídicos antes de la introducción de SSB en la mezcla de reacción.

En lo que sigue se detalla la composición probable de una reacción RPA ensamblada con E. coli recA y E. coli recO y recR agentes estabilizantes:

Componentes de formación/resolución Bucle D:

Componente	Concentración
RecA	20 µM
Cebadores oligonucleotídicos de cadena sencilla	0.25 µM
ATP	3 mM
RecF	0.1 µM
RecO	0.13 µM
RecR	0.5 µM
Proteína de unión de cadena sencilla (SSB)	1 a 10 µM
ADN polimerasa V	5 unidades

Mezcla polimerasa/helicasa/resolvasa:

Componente	Concentración
ADN Polimerasa	5 unidades

Componente	Concentración
RuvA	0.5 µM
RuvB	0.5 µM
RuvC	0.5 µM
RecG	10 nM

Regulador de reacción:

Componente	Concentración
$MgCl_2$	2 a 10mM
TrisHCl pH 7.2	50 mM
DTT	0 a 10 mM
KCl	0 a 50 mM
Desoxirribonucleótidos trifosfato	0.2 mM
Albúmina de suero bovino (BSA)	0 a 10 µg por ml

La reacción se ensambla de modo que la concentración final satisfaga los Componentes de Formación/Resolución de Bucle D, la Mezcla de Polimerasa/Helicasa/Resolvasa, y el Regulador de Reacción con la ADN polimerasa y/o la plantilla agregadas en último lugar, si es necesario. Por ejemplo, una solución concentrada 2X de los componentes de formación/resolución Bucle D y de la mezcla Polimerasa/Helicasa/Resolvasa se puede preparar en 1 X regulador de reacción. La reacción puede iniciarse mezclando un volumen igual de cada uno de los dos componentes (cada uno en 1x regulador de reacción). Opcionalmente, y como se indicó anteriormente, la ADN polimerasa o plantilla (ADN diana) se puede agregar en último lugar. La reacción se incuba durante un tiempo suficiente hasta que se agotan los reactivos. Los tiempos de incubación típicos oscilarían entre 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas, 10 horas o toda la noche (aproximadamente 16 horas). A diferencia de la PCR, que requiere pequeños volúmenes para un cambio rápido de temperatura, no hay límite para el volumen de reacción de RPA. Se pueden realizar volúmenes de reacción de 25 µl, 50 µl, 100 µl, 1 ml, 10 ml y 100 ml o más en un recipiente. La temperatura de incubación puede ser una temperatura típica de laboratorio, como 25°C, 30°C o 37°C.

Antes de la adición de la plantilla de ADN y/o polimerasa, la recombinasa y la SSB competirán por la unión a los cebadores de oligonucleótidos de cadena sencilla. En presencia de un RecR y RecO, RecA se estabiliza selectivamente en los cebadores de cadena sencilla que forman los filamentos de nucleoproteínas de RecA en un complejo con RecO y RecR. Este complejo es competente para invadir el ADN de doble cadena para formar un bucle D en sitios homólogos a los cebadores de oligonucleótidos. Alternativamente, RecA, RecO y RecR pueden precargarse en cebadores oligonucleotídicos antes de la introducción de SSB en la mezcla de reacción (Figura 1).

Las cadenas invasoras se extenderán por la polimerasa en una dirección de 5' a 3'. A medida que se forman los bucles D y la síntesis avanza, el ADN de cadena sencilla desplazado se reviste con SSB. La liberación de RecA a partir del ADN de doble cadena puede ocurrir a través de la hidrólisis de ATP en una dirección de 5' a 3' o como resultado de la actividad de helicasa/resolvasa o polimerasa (Figura 2A, B). Nuevas rondas de invasión/síntesis ocurrirán continuamente. La tercera ronda de invasión/síntesis de cadenas liberará productos discretos liberados cuyos extremos corresponden a los dos sitios de cebadores enfrentados. Estos fragmentos pronto se convertirán en el producto de reacción dominante y se acumularán en niveles altos. A medida que cada proceso sintético se desplaza hacia el final de la plantilla, la proteína RecA se desplaza por la actividad de la polimerasa o por la actividad de las helicasas, como el RuvAB o las resolvasas, como el RuvC. Una vez que se hayan agotado los cebadores, el ATP, los trifosfatos de desoxinucleósidos o cualquier otro componente limitante, la reacción se detendrá.

La inclusión de mutantes de recombinasa sensibles a la temperatura permitirá el inicio controlado de la síntesis de ADN. En tal situación, la reacción de iniciación se realiza a una temperatura de 25 a 37°C permitiendo la formación de Bucle D. Las reacciones de elongación se realizan a 42°C, lo cual no es permisivo para la invasión de doble cadena mediada por RecA. El número de ciclos determinará la cantidad de producto de reacción. Las fases de alargamiento extendido permitirán la amplificación de ADN extremadamente largos sin interferencia de reinvasión.

Ejemplo 2: RPA anidada

La reacción RPA se realiza como se describe en el Ejemplo 1. Se elimina una fracción de un décimo (1/10) y una centésima parte (1/100) de la reacción y se utiliza en lugar de la plantilla de ADN en una segunda ronda de RPA. LsRPA, RPA anterior/retrasada, y combinaciones de los mismos pueden usarse para RPA anidada.

Ejemplo 3: Amplificación simultánea y retrasada de la recombinasa-polimerasa amplificación

Las secuencias de ADN se pueden amplificar utilizando la síntesis simultánea de cadenas guía y de retardo de acuerdo con el método de amplificación con Recombinasa-Polimerasa (RPA) que se muestra en la Figura 2. Esta figura ilustra específicamente el IsRPA. La Figura 2A muestra que los filamentos de nucleoproteínas RecA/cebador invaden el ADN de plantilla de doble cadena que se asocia preferentemente con sitios diana homólogos. A medida que se forman los bucles D y la síntesis avanza, el ADN de cadena sencilla desplazado se reviste con SSB (Figura 2A). La liberación de RecA a partir del ADN de doble cadena puede ocurrir a través de la hidrólisis de ATP en una dirección 5'-3' o como resultado de la actividad de helicasa/resolvasa o polimerasa (Figura 2A). A medida que continúa la síntesis (Figura 2B), las polimerasas encuentran una plantilla de una sola cadena desplazada y unida a SSB. Los sitios diana de doble cadena son reinvadidos por filamentos de nucleoproteínas RecA/cebador. Las rondas subsiguientes de IsRPA proceden de sitios reinvadidos (Figura 2B).

En lo que sigue se detallan los componentes probables de una amplificación mediada por replisoma que utiliza componentes de E. coli. Una reacción se ensambla con la siguiente composición:

BUCLE D formación/componentes de resolución

Componente	Concentración
RecA	20 µM
Cebadores oligonucleotídicos de cadena sencilla	0.25 µM
ATP	3mM
RecF	0.1 µM
RecO	0.13 µM
RecR	0.5 µM
Proteína de unión de cadena sencilla (SSB)	1 a 10 µM
ADN polimerasa V	5 unidades

Mezcla Helicasa/resolvasa

Componente	Concentración
RuvA	0.5 µM
RuvB	0.5 µM
RuvC	0.5 µM

Componente	Concentración
RecG	10 nM

Complejo primosoma

Componente	Concentración
PriA	20 nM
PriB	20 nM
DnaT	100 nM
DnaB	100 nM
DnaC	200 nM
DnaG	200 nM

ADN polimerasa III complejo de holoenzima

Componente	Concentración
pinza β	2 μM
Cargador de pinza DnaX	500 nM
Complejo de núcleo de polimerasa	500 nM

Mezcla de cadena de retardo

Componente	Concentración
ADN polimerasa I	5 unidades
DNA ligasa	2 unidades

Regulador de reacción

Componente	Concentración
$MgCl_2$	2 a 10 mM
TrisHCl pH 7.2	10 a 60 mM
DTT	0 a 10 mM
KCl	0 a 50 mM
Desoxirribonucleótidos trifosfato	0.2 a 0.4 mM

Componente	Concentración
Albúmina de suero bovino (BSA)	0 a 10 µg por ml

La reacción se ensambla de modo que la concentración final de todos los reactivos sea la que se indica anteriormente. Así, por ejemplo, una solución 5 veces concentrada de cada uno de los componentes (componentes de formación/resolución de bucle D, mezcla Helicasa/Resolvasa, Complejo Primosoma, Complejo de Holoenzima ADN Polimerasa III, Mezcla de Cadena Rezagada) se prepara en 1 X regulador de reacción. Luego, las cinco soluciones se mezclan en volúmenes iguales para iniciar la reacción. La reacción se incuba durante un tiempo suficiente hasta que se agotan los reactivos. Los tiempos de incubación típicos oscilarían entre 1 hora, 2 horas, 3 horas, 5 horas, 10 horas o toda la noche (aproximadamente 16 horas). Como se indicó anteriormente, no hay límite para el volumen de reacción de RPA. Se pueden realizar volúmenes de reacción de 25 µl, 50 µl, 100 µl, 1 ml, 10 ml y 100 ml o más en un recipiente. La temperatura de incubación puede ser una temperatura típica de laboratorio, como 25°C, 30°C o 37°C.

La figura 3 muestra la iniciación (figura 3A), la síntesis (figura 3B) y la amplificación de la polimerasa (figura 3C-3D). Primero, las cargas del primosoma en el bucle D formado por la invasión de filamentos de nucleoproteínas RecA (Figura 3A). El primosoma sintetiza un tramo de cebador de ARN. Finalmente, el primosoma recluta el cargador de pinza, que recluta tanto el dímero de pinza deslizante como el núcleo de ADN polimerasa asimétrico (Figura 3A). La síntesis se produce simultáneamente en las direcciones de avance y retardo. Eventualmente, la síntesis de las cadenas de retardo se detiene y se descarga la pinza de las cadenas de retardo (Figura 3B). La síntesis de la cadena principal continúa hasta que se forma un nuevo sitio de síntesis de soporte retrasado (Figura 3B). Mientras que la síntesis de cadenas principales continúa, se forma un nuevo sitio de síntesis de soporte retrasado. La síntesis de cadenas de retardo continúa hasta el fragmento anterior de Okazaki, donde se descarga la pinza de las cadenas de retardo (Figura 3C). La ADN polimerasa I elimina el cebador de ARN y llena el espacio mientras que el ADN ligasa conecta los dos fragmentos de Okazaki que forman una cadena continúa retrasada (Figura 3D).

Ejemplo 4: Establecimiento de un entorno de amplificación utilizando el ensamblaje de componentes heterólogos E. coli recA(C) y T4 gp32(N)

La Figura 18 muestra los resultados de un experimento en donde recA(C) se ha combinado con gp32(N) en presencia de pares de oligonucleótidos, Tester3bio (que posee un marcador de biotina 5') y Sizer1, Sizer2, Sizer3, Sizer4 o Tester2. Estos últimos oligonucleótidos no biotinilados se colocaron progresivamente más lejos del oligonucleótido Tester3bio común. La plantilla era un fragmento de ADN lineal, de aproximadamente 300 pb, liberado de un plásmido. Tester3bio fue diseñado para ser complementario a un extremo de este fragmento e incluyó un saliente 5' en relación con esta secuencia.

El regulador de reacción incluía acetato de magnesio 10 mM, requerido para soportar la unión de recA al ADN y ATP 3 mM. También se incluyó un sistema de regeneración de ATP, que comprende fosfocreatina y creatina quinasa, así como dNTPS a 200 µM, y se empleó el fragmento Klenow de ADN polimerasa I de E. coli como se muestra. Se utilizó ADN de plantilla de doble cadena (0.5 fmoles), derivado de un plásmido que lleva el gen ruvB de E. coli, como objetivo inicial. Los oligonucleótidos Sizer1, Sizer2, Sizer3 y Sizer4 no reconocieron el otro extremo de la plantilla. En su lugar, estos oligonucleótidos se posicionaron para enfrentar Tester3bio con una distancia creciente entre sus extremos 3' relativos.

Después de una incubación de 2 horas a 37°C, hubo una amplificación sustancial de fragmentos específicos del tamaño correcto cuando se usaron Tester2, 3 y 4. En las mejores condiciones (con Sizer2), se estima que el producto de amplificación era 104 veces más grande que la plantilla de inicio.

Ejemplo 5: La naturaleza de los productos de amplificación y la sensibilidad de la reacción utilizando un ensamblaje heterólogo de E. coli recA(C) y bacteriófago T4 gp32(N)

La Figura 19 muestra los resultados de un experimento en donde recA(C) se ha combinado con gp32(N) en presencia del par de oligonucleótidos, Tester3bio (que posee un marcador de biotina 5') y Sizer2, en condiciones similares a los utilizados en el Ejemplo 1. El compuesto de PEG o PEG 1450 se empleó como se muestra y se utilizaron 0.5 fmoles de plantilla como cantidad de plantilla de partida. En este ejemplo, se investigó la dilución progresiva de la plantilla. Alternativamente, se exploró el uso de la plantilla de inicio linealizada que no posee un extremo que se superponga con el cebador (mediante el uso de una digestión con ClaI del plásmido portador del gen de E. coli ruvB) y la dilución del fragmento Klenow. La amplificación de fragmentos de tamaño correcto ocurrió en todos los carriles y fue más fuerte en el caso de la plantilla de inicio de 0.5 fmoles en presencia de compuesto de PEG.

Cuando los productos de estas reacciones óptimas se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio, se observó una banda limpia de ADN de doble cadena del tamaño correcto. Cuando esta muestra se trató con la enzima de restricción BbvC1 antes de la electroforesis, el aumento esperado en la movilidad del gel se produce de manera consistente con un solo corte como se esperaba. La amplificación de un producto del tamaño correcto se observó con diluciones iniciales de la plantilla de 100 veces o más, aunque el producto era menos abundante e incluye una escalera de productos más cortos debajo de la banda principal. Se observó un patrón similar

cuando se emplea una plantilla sin cortar o cuando no se emplea ninguna plantilla. Razonamos que las proteínas utilizadas en estos estudios estaban significativamente contaminadas con el ADN genómico de E. coli (que naturalmente lleva el gen ruvB), ya que se purificaron en purificaciones de una sola columna sin el uso de nucleasas. Por consiguiente, se cree que este sistema de prueba genera falsos positivos cuando la sensibilidad es lo suficientemente alta.

Ejemplo 6: Establecimiento de un entorno de amplificación utilizando un conjunto de gp32(N) y uvsX(C)

La Figura 24 muestra los resultados de un experimento en donde uvsX(C) se ha combinado con gp32(N) en presencia de los oligonucleótidos Tester3bio y Sizer2. El ADN de plantilla en este experimento fue una digestión con EcoRV del plásmido portador del gen ruvB de E. coli utilizado en los Ejemplos 1 y 2. Tester3bio reconoció un extremo de un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases e incluyó un saliente 5' relativo al final del objetivo secuencia. Sizer2 reconoció la otra cadena de esta plantilla. Este oligonucleótido se dirigió hacia secuencias integradas, de modo que su extremo 3' tenía aproximadamente tres y media vueltas helicoidales desde el final de Tester3bio.

En presencia de PEG1450, hubo observación de la amplificación del fragmento esperado dentro de las 2 horas de la reacción. En los casos en que se produjo la amplificación, se consumió casi toda la población de oligonucleótidos, lo que indica una amplificación de 3-5 X 10^4. Los componentes de la reacción se indican en la Figura 24. En algunas muestras se incluyeron componentes adicionales. Se encuentra que 200 µM de ADP-β-S incluido en esta reacción aumentó ligeramente la cantidad de producto formado en estas condiciones. A la inversa, bajo las condiciones utilizadas aquí, la inclusión de E. coli toposiomerasa I fue inhibidora de la amplificación del ADN. Bajo las condiciones utilizadas, no se detectó amplificación con la proteína delta uvsX(C). Sin embargo, no se incluyó PEG1450 en estas muestras y uvsX (C) tampoco amplificó en estas condiciones sin PEG1450.

Ejemplo 7: Amplificación de un objetivo a partir del ADN genómico humano utilizando proteínas de recombinación T4

La Figura 30 muestra los resultados de un experimento en donde se emplearon varios pares de cebadores para amplificar un fragmento de ADN específico a partir de ADN genómico humano. La reacción incluyó el bacteriófago T4 gp32(C) K3A, uvsX(C) y uvsY(N), así como el fragmento Klenow deficiente en exonucleasa y proteínas que comprenden el sistema de regeneración de ATP para convertir ADP y AMP. Para detectar el fragmento de ADN específico, transferimos los productos de reacción separados electroforéticamente a la membrana de nylon, luego se hibridó una sonda biotinilada, que reconoció una secuencia interna única sin cebador.

Se emplearon tres pares de cebadores, y en cada caso se realizó una comparación entre el ADN genómico sin entrada, 10000 copias de ADN genómico humano sin cortar y 10000 copias de ADN genómico cortado con HpaII (que genera al menos un extremo para los pares de cebadores). En todos los casos, se produjo una amplificación específica de la secuencia de ADN deseada, mientras que la eficiencia mostró una variación entre los pares de cebadores y entre los ADN sin cortar y cortados. En todos los casos, la digestión previa con HpaII de la muestra de ADN no era absolutamente necesaria, pero mejoró la eficiencia de la amplificación. En todos los casos, el ADN genómico de entrada fue importante. En la mejor amplificación (que se muestra en el carril 4), se estima al menos 10^{11} moléculas, lo que indica una amplificación del orden aproximado 10^7.

Ejemplo 8: Sensibilidad de IsRPA cuando se dirige a un complejo ADN-ADN genómico humano

La Figura 31 muestra los resultados de un experimento en donde se emplearon varios pares de cebadores para amplificar un fragmento de ADN específico a partir de ADN genómico humano. La reacción incluyó el bacteriófago T4 gp32(C)K3A, uvsX(C) y uvsY(N), así como un fragmento Klenow deficiente en exonucleasa, y que comprende el sistema de regeneración ATP para convertir ADP y AMP. Para detectar el fragmento de ADN específico, transferimos los productos de reacción separados electroforéticamente a la membrana de nylon. Luego se hibridó una sonda biotinilada, que reconoce una secuencia interna única sin cebador.

Se emplearon tres pares de cebadores y, en cada caso, se hace una comparación entre la plantilla sin inicio y aproximadamente 10, 100, 1000, 3000 y 10000 de la diana genómica. En todos los casos, se detectó una amplificación clara cuando se usaron al menos 1000 de la diana genómica (se observa una señal débil con el mejor par de cebadores en 100 copias). Se concluyó que, durante ese período, las reacciones de IsRPA configuradas de esta manera fueron capaces de amplificar el ADN de objetivos muy complejos con una sensibilidad de al menos 1000 copias, y potencialmente mayores.

Ejemplo 9: Competencia entre la acumulación de productos bona fide y artefactos de cebador (independientes de la plantilla) durante las reacciones

La figura 32 muestra los resultados de un experimento en donde se empleó un par de cebadores para amplificar un fragmento de ADN específico a partir de ADN genómico humano. En la reacción se emplearon las proteínas bacteriófagos T4 gp32(C), uvsX(C) y uvsY(N), así como un fragmento Klenow deficiente en exonucleasa y proteínas que comprenden el sistema de regeneración ATP para convertir ADP y AMP. Se incluyó PEG 1450 al 10% p/v. Uno de los oligonucleótidos incluía una 5'-biotina para que todos los productos de reacción pudieran observarse al final de la amplificación. Se tomaron muestras a las 1, 2 y 3 horas para observar cómo progresaba la reacción. En una muestra, cuando se empleó una cantidad mínima de uvsY(N) (50 ng/µl), se observó la amplificación del fragmento correcto (vea

la flecha en el carril 4). Este fragmento fue escindido por BstXI al fragmento de tamaño esperado, lo que indica que era principalmente de doble cadena. Sin embargo, el fragmento fue menos abundante que las bandas aparentemente independientes de la plantilla que también se acumularon durante la reacción. El tamaño y la naturaleza independiente de la plantilla de estas bandas sugirieron que eran artefactos de cebador, por ejemplo, dímeros de cebadores y/o productos de síntesis de retroajuste. La ausencia de amplificación del fragmento específico sugirió que, en concentraciones uvsY(N) superiores a 50 ng/µl, la reacción se produjo de forma subóptima. Esto fue confirmado por experimentos posteriores.

Ejemplo 10: Optimización de la composición de la reacción para limitar o eliminar severamente los artefactos del cebador y permitir la amplificación sensible sin ruido de plantillas complejas

La figura 36 muestra los resultados de un experimento en donde se empleó un par de cebadores para amplificar un fragmento de ADN específico a partir de ADN genómico humano. En la reacción se emplearon las proteínas bacteriófagos T4 gp32 (C), uvsX (C) y uvsY (N), así como un fragmento Klenow deficiente en exonucleasa o polimerasa Bst, y proteínas que comprenden el sistema de regeneración ATP para convertir ADP y AMP. Uno de los oligonucleótidos incluía una 5'-biotina para que todos los productos de reacción pudieran observarse al final de la amplificación. Los fragmentos amplificados se visualizaron después de la separación de los fragmentos por tamaño ejecutando una pequeña muestra de la reacción en un gel de acrilamida. En este experimento, el ADN genómico humano sin cortar se tituló a partir de cero copias, 45 copias, y luego duplicaciones en el número de copias objetivo hasta 2880. En este experimento se emplearon condiciones ligeramente diferentes para cada una de las dos especies de polimerasa con respecto al regulador y la temperatura. La reacción con el fragmento Klenow se realizó a 37°C, mientras que con Bst polimerasa se realizó a 42°C. Los detalles de la composición del regulador se dan en la descripción de la figura.

De manera notable, e importante para la eficacia de las reacciones en estas condiciones optimizadas, el compuesto de PEG se incluyó en un peso final del 5% en ambos casos. Ambas polimerasas han amplificado efectivamente el fragmento correcto y, en algunos casos, han utilizado la mayoría de los cebadores disponibles. En las condiciones utilizadas para el fragmento de Klenow, la sensibilidad fue tan grande que se observó una señal débil incluso en el carril de cero copias, lo que probablemente refleja una contaminación con una cantidad de ADN humano que representa menos de las 45 copias presentes en el carril inmediatamente adyacente. En el nivel de sensibilidad que se demuestra aquí, fue difícil eliminar niveles de contaminación traza del equipo que se usó, lo que dio lugar a señales en los controles negativos. El empleo rutinario de condiciones similares a las utilizadas en la amplificación mediada por Klenow resultó eficaz para la amplificación sin ruido de numerosos pares de cebadores en experimentos posteriores. Esto sugirió que estas condiciones estaban cerca de un óptimo para las reacciones que involucran este conjunto de componentes proteicos.

Ejemplo 11: Métodos experimentales para la producción de clones y proteínas.

Todos los clones se han construido mediante clonación de productos amplificados por PCR de E. coli, fago T4, B. subtilis o fago Phi-29. Todos los organismos de solución madre utilizados para la amplificación se obtuvieron de una fuente pública en el DSMZ. Los ADN clonados utilizados para la expresión de proteínas en general se han clonado en vectores pET (por ejemplo, pET-21) con la inserción de una etiqueta peptídica de hexahistidina en el extremo N o C durante la amplificación por PCR del fragmento, o en vectores pQE (por ejemplo, pQE31) en el caso de Pol I de B. subtilis (Bsu polimerasa). En esta divulgación, todas las proteínas que contienen una etiqueta N terminal se denominan el nombre de la proteína seguido de (N), por ejemplo, gp32(N), o si contiene la etiqueta en el extremo C, el nombre va seguido de (C), por ejemplo, gp32(C). Adicionalmente, se ha construido varios clones para producir proteínas modificadas de otra manera. Estos incluyen una recA(C) con una eliminación de los últimos 17 residuos de aminoácidos de la proteína nativa, denominada recA(C) delta17. Una forma similar de la proteína T4 UvsX(C) se ha generado y se conoce como UvsX(C) delta 21. También se ha construido formas mutantes de gp32, que modifican la lisina 3 o la arginina 4.

Todas las proteínas se expresaron en exceso en E. coli y se purificaron utilizando protocolos convencionales. Las proteínas generalmente se han purificado mediante procedimientos estándar en resina de níquel en NaCl 1 M y regulador fosfato. Las proteínas se eluyeron con imidazol 250 mM y se dializaron en reguladores apropiados. Las proteínas producidas a partir de los clones generados internamente incluyen: E. coli recA(C), E. coli SSB(N), E. coli PriA(N), E. coli PriB, E. coli PriC, E. coli DnaB, E. coli DnaC, E. coli DnaC810, E. coli DnaT, E. coli RuvA, E. coli RuvB, fago T4 UvsX(C), T4 fago UvsX(N), T4 gp32(N), T4 gp32(C), T4 gp32(C)K3A, T4 fago gp32(C)R4Q, T4 fago gp32(C)R4T, T4 fago gp32, T4 fago gp32 K3A, T4 fago Uvsy(C), fago T4 gp43, fago T4 gp43(exo-), fragmento de E. coli Klenow, exo de E. coli Klenow. Las proteínas gp32 sin etiquetar se purificaron mediante un procedimiento de 2 columnas que implicaba el intercambio aniónico de sefarosa con DEAE seguido de la unión a una matriz de celulosa de ADN de cadena sencilla.

ADN usados en reacciones de RPA.

En este estudio, se ha empleado varios ADN diana diferentes y varios oligonucleótidos. La secuencia de la sección relevante de las plantillas y la secuencia de los oligonucleótidos se dan a continuación.

La diana del gen RuvB de E. coli

La secuencia del fragmento EcoRV del gen RuvB se proporciona a continuación.

ATCATGATTGGTGAAGGTCCGGCGGCACGCTCCATTAAAATTGATTTGCCGC

CGTTTACCCTGATTGGTGCAACCACGCGCGCAGGTTCGCTGACATCACCGTTGCGCG

ACCGTTTTGGTATTGTGCAACGTCTGGAGTTTTATCAGGTGCCGGATCTGCAATATA
TCGTCAGTCGCAGCGCACGCTTTATGGGGCTTGAGATGAGTGATGACGGCGCGCTG

GAAGTTGCTCGTCGCGCTCGCGGTACGCCGCGCATTGCCAACCGTCTGCTGCGTCGA

GTGCGTGATTTCGCCGAAGTGAAGCACGATGGCACCATCTCGGCAGAT (SEQ ID

NO:1)

La secuencia de oligonucleótidos que se dirigen a esta plantilla mencionada en este estudio se presenta a continuación:

Tester2

CTAGCGATGGTGCCATCGTACAGAATTCCCTCAGCATCTGCCGA (SEQ ID NO:2)

Tester3 CTCACTATACCTCAGCATCATGATTGGTGAAGGTCCGGCGGCAC (SEQ ID NO:3)

Tester1bio

5'-biotina-GCTAATACGACTCACTATACCTCAGCATCATGATTGGTGAAGGTC CGGCGGCAC (SEQ ID NO:4)

Tester3bio

5'-biotina-CTCACTATACCTCAGCATCATGATTGGTGAAGGTCCGGCGGCAC (SEQ ID NO:5)

Sizer1

CTATGCGAATTCAGCGAACCTGCGCGCGTGGTTGCACCAATCAGGG (SEQ ID:6)

Sizer2

CTATGCGAATTCGGTGATGTCAGCGAACCTGCGCGCGTGGTTGCA (SEQ ID NO:7)

Sizer3

CTATGCGAATTCTCCAGACGTTGCACAATACCAAAACGGTCGCGC (SEQ ID NO:8)

Sizer4

CTATGCGAATTCCGTGCGCTGCGACTGACGATATATTGCAGATCC (SEQ ID NO:9)

Gen2bio

5'-biotina-ATCTGCCGAGATGGTGCC (SEQ ID NO:10)

La secuencia de parte de la enzima convertidora de angiotensina humana dirigida en este estudio se muestra a continuación:

AACCAACTCCGCCCCGGGCCACGGCCTCGCTCTGCTCCAGGTACTTTGTCAG

CTTCATCATCCAGTTCCAGTTCCACGAGGCACTGTGCCAGGCAGCTGGCCACACGG

GCCCCCTGCACAAGTGTGACATCTACCAGTCCAAGGAGGCCGGGCAGCGC (SEQ ID

NO:11)

Se subrayan los sitios de restricción HpaII que se han apuntado con HpaII en la preparación de algunos ADN en algunos experimentos.

La secuencia de oligonucleótidos usada para atacar parte del gen de la ECA humana se muestra a continuación:

Up3

ATTCGTCAGCCTCGCTCTGCTCCAGGTACTTTGTCAGCTTCATC (SEQ ID NO:12)

GCCTCCTTGGACTGGTAGATGTCACACTTGTGC (SEQ ID NO:13)

GCGCTGCCCGGCCTCCTTGGACTGGTAGATGTCACACTTGTGC (SEQ ID NO:14)

TATGCGAATTGCCTCCTTGGACTGGTAGATGTCACACTTGTGC (SEQ ID NO:15)

Angio1bio

5'-biotin-GCCTCCTTGGACTGGTAGATGTCACACTTGTG (SEQ ID NO:16)

Angio3

GGCCACGGCCTCGCTCTGCTCCAGGTACTTTGTCAGCTTCATC (SEQ ID NO:17)

Ejemplo 12: Resultados experimentales y análisis

La figura 9 muestra los resultados de las investigaciones sobre la naturaleza de las dianas de ADN de doble cadena y los oligonucleótidos dirigidos. Los experimentos que usaron plantillas superenrolladas o ADN linealizados sugirieron que recA cataliza la formación de intermedios capaces de soportar la elongación de la polimerasa más fácilmente en el ADN superenrollado, o los extremos del ADN linealizado. Se muestran los resultados de un experimento en donde el oligonucleótido biotinilado, Tester3bio, se ha incubado con ADN objetivo superenrollado, o una plantilla diana linealizada con EcoRV o ClaI. Esto generó un extremo que se superpuso con el oligonucleótido o las secuencias incluidas, respectivamente. La solución de reacción incluía Tris-acetato 20 mM, pH 7.9, Mg-acetato 10 mM, 13 µg de RecA, 1 µg de E. coli SSB, fosfocreatina 27 mM, IU creatina quinasa, Tester3bio 0.2 µM, ATP 3 mM, ATP 3 mM, DTP 200 µM, dC, y dT; 1 mM dA, 50 U Klenow, plantilla de 0.5 pmoles, 120 ng recO, 120 ng recR, 0.5 µM dnaB y 0.5 µM dnaC810. Las proteínas recO y recR de E. coli, así como las proteínas dnaB y dnaC810, se incluyeron en este experimento, aunque no afectaron significativamente los resultados. Después de 2 horas de reacción a 37°C, la reacción se precipitó y se ejecutó en un gel desnaturalizante al 6%, se transfirió a una membrana de nylon y se incubó con estreptavidina-HRP antes de realizar la ECL para detectar material reactivo. En cada reacción, se utilizaron 0.5 pmoles de plantilla. Se incluyó en el gel como control para el tamaño y la cantidad 0.5 pmoles de fragmento de PCR biotinilado (CON marcado). Otros componentes y condiciones de la reacción se indican en la figura.

La figura 10 muestra la síntesis en retroceso. La síntesis de retroceso se produce cuando un oligonucleótido de direccionamiento revestido con recombinasa que posee un saliente 5' invade un extremo de ADN dúplex en presencia de una polimerasa adecuada y dNTPs. Esta nueva región dúplex es estable para la posterior migración de ramificaciones y puede utilizarse como plataforma para otras aplicaciones. El avance es la elongación del oligonucleótido invasor, que también ocurre en estas reacciones. Se muestran los resultados de los experimentos para detectar la actividad de las polimerasas en intermedios formados cuando el oligonucleótido Tester3, que posee un saliente 5' relativo al final de un ADN objetivo linealizado, se incuba con varias plantillas.

En la parte A, la plantilla utilizada es un producto de PCR de doble cadena generado de tal manera que el producto tiene una etiqueta de biotina en el extremo 5' de la cadena complementaria al oligonucleótido de direccionamiento. Este fragmento es similar al fragmento EcoRV liberado de un plásmido que porta el gen RuvB de E. coli utilizado en otras partes de este estudio, y que es un objetivo para el oligonucleótido Tester3bio. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, 7.5 µg de recA, 1 µg de SSB, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina quinasa, Tester3bio 0.3 µM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, 50 U de Klenow, 0.5 µmoles de plantilla biotinilada. Opcionalmente, se realiza la inclusión de ruvA 0.5 µM y ruvB 0.5 µM; o 1 µM de ruvA y 1 µM de ruvB; o 1.5 µM de ruvA y 1.5 µM de ruvB. El volumen final fue de 30 µl. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a 37ºC. En presencia de recA, la cadena biotinilada de la diana se extendió en 16 bases, como se esperaría si una polimerasa pudiera acceder a un intermedio de recombinación para copiar la región saliente del oligonucleótido invasor.

En la parte B, la reacción se configura de manera similar, excepto que la plantilla no está biotinilada y el oligonucleótido invasor está biotinilado. Se investigaron varias polimerasas en este experimento, y solo el fragmento Klenow no modificado dio una producción significativa de producto. En este experimento, también se investigó la inclusión de un pequeño oligonucleótido diseñado para reconocer el objetivo directamente aguas abajo del sitio de orientación Tester3. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, 10 µg de recA, 1 µg de SSB, fosfocreatina 27 mM, creatina quinasa 1 U, Tester3bio 0.3 µM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, 50 U Klenow, 0.5 moles de plantilla no biotinilada. Opcionalmente, se realiza la inclusión de 5 µl de oligonucleótido ATPγS estable precargado. El volumen final fue de 30 µl. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a 37ºC. Realizamos una incubación previa con recA en presencia de ATP-γ-S en un esfuerzo por cargar la recombinasa de forma estable en ella. La solución de precarga incluía acetato de Mg 10 mM, 2.5 µg de recA, ATPγS 50 µM y oligonucleótido 0.15 µM. La solución de precarga se agregó a la mezcla de invasión/extensión Tester3bio. En todos los casos, el rendimiento del producto se redujo al incluir este material premezclado. Según los presentes datos, se cree que la presencia de ATP-γ-S (concentración final ~8 µM) en la reacción fue levemente inhibitoria. El propósito de este experimento fue abordar si la presencia de un híbrido estable de 3 cadenas formado inmediatamente después del sitio de orientación Tester3 estabilizaría estas invasiones a la migración de la ramificación.

La Figura 11 muestra los usos de la síntesis en retroceso. La síntesis en retroceso puede ser útil porque genera una plataforma resistente a la migración de ramificaciones que puede emplearse en aplicaciones distintas al fuego directo. Aquí se muestran algunos ejemplos, que incluyen la introducción de un sitio diana de la enzima de corte, la introducción de un promotor de la ARN polimerasa y la generación lineal de fragmentos cortos de ADNbc a través de sucesivos eventos de invasión/síntesis/escisión. Si se incluye un sitio de enzima de restricción en la secuencia saliente adicional, de manera que después de apuntar a un fragmento linealizado adecuado, la síntesis en retroceso generará el objetivo dúplex para la enzima de restricción. La enzima puede entonces cortar la secuencia liberando un ADN de doble cadena corto y un ADN de doble cadena más largo, que es un objetivo para futuros eventos de invasión.

En la Figura 11B, el saliente en 5' de un oligonucleótido dirigido se diseña de manera tal que, si se produce una síntesis de fondo, se genere un objetivo para una endonucleasa de corte. En presencia de la endonucleasa de mellado, por ejemplo, BbvC1a o b, una polimerasa adecuada, por ejemplo, el fragmento Klenow, puede extenderse desde la muesca y desplazar una cadena de ADN. Las cadenas múltiples se pueden separar mediante un corte y alargamiento sucesivos de una sola plantilla. En la Figura 11C, la parte superior de 5' que se convierte a dúplex por síntesis en retroceso contiene la secuencia de un promotor de la ARN polimerasa, como el gen de la ARN polimerasa del fago T7. En presencia de la polimerasa necesaria y los nucleósidos trifosfatos adecuados, la transcripción puede iniciarse aguas abajo del promotor para generar un ARN como se muestra. No se predice la presencia de una ruptura en la cadena no de plantilla para evitar el alargamiento exitoso. Los productos de ARN podrían usarse en alguna forma de reacción de amplificación, o para otros propósitos.

La figura 12 muestra que las proteínas de unión de cadena sencilla facilitan la invasión de recombinasa y la extensión del cebador. Tanto E. coli SSB como el bacteriófago T4 gp32 con una etiqueta His N-terminal (gp32 (N)) son capaces de estimular la invasión/elongación mediada por recA en una plantilla de ADN lineal. Se muestran los resultados de un experimento en donde se incubaron 0.5 pmoles de plantilla diana (el fragmento EcoRV liberado de un plásmido que porta el gen ruvB de E. coli) con el oligonucleótido Tester3bio que se superpone a un extremo de la plantilla. Se incluyó la proteína SSB de E. coli o la proteína T4 gp32(N) para estimular la reacción. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, 6 µg de recA, 8.8 µg de gp32 o 1 µg de SSB, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina quinasa, Tester3bio 0.3 mM, ATP 3 mM, dNTP 200 mM, 50 U Klenow, 0.5 pmoles modelo. Opcionalmente, se realiza la inclusión de 120 ng de recO y 120 ng de recR. El volumen final fue de 30 µl. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a 37ºC. Otros componentes y condiciones de la reacción se indican en la figura. La figura también muestra la relación general del cebador y el ADN objetivo. En las reacciones en las que se incluyeron las proteínas recO y recR de E. coli, se observó poco efecto de su adición en estas condiciones. La invasión y el alargamiento parecían haber avanzado en todos los casos, y la gp32(N) parecía haber estimulado la síntesis incluso mejor que la E. coli SSB, aunque en este experimento se utilizó una concentración más alta.

La Figura 13 muestra el requisito de una longitud de oligonucleótido mínima o saliente para la invasión y el alargamiento durante la selección final de las plantillas lineales. Se muestran los resultados de un experimento en donde se incubaron 0.5 pmoles de la plantilla diana (el fragmento EcoRV liberado de un plásmido que porta el gen ruvB de E. coli) con el oligonucleótido Tester3bio. Este oligonucleótido se superpone a un extremo de la plantilla, o el oligonucleótido Gen2bio, que está al ras del otro extremo de la plantilla y tiene solo 18 residuos. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, creatina quinasa 1 U, Tester3bio 0.2 µM o Gen2bio, dATP 10 mM, ATP 3 mM, mezcla de dNTP 200 µM, polimerasa Klenow 50 U o Phi29, 13 µg de recA(C), 1 µg de E. coli SSB y 0.5 pmoles de plantilla. El volumen final fue de 30 µl. La incubación se llevó a cabo durante 2 horas a 37°C y se cargaron 2 µl o la reacción en cada carril del gel. Otros componentes de la reacción, las condiciones y la relación general de los cebadores y el ADN objetivo se indican en la figura. La invasión y el alargamiento parecían haber avanzado de manera eficiente en presencia del fragmento Klenow, menos eficazmente con la polimerasa Phi29, y menos bien con el cebador Gen2bio y el fragmento Klenow. Se llegó a la conclusión de que se requería una longitud mínima del cebador y/o un solapamiento relativo a la plantilla para estimular la invasión y elongación eficientes.

La figura 14 muestra las articulaciones paranémica (A-E) y pletonémica (F-H). Para las articulaciones paranémicas, la interacción del filamento de recombinasa con el ADN estimula el desenrollamiento (Figura 14A). La región desenrollada se mueve con la búsqueda de homología (Figura 14B). Se encuentra la homología (figura 14C). La recombinasa se disocia y un nuevo dúplex intenta rebobinar (Figura 14D). Debido a su restricción topológica, la cadena 'saliente' se ve obligada a rebobinar alrededor del nuevo dúplex (Figura 14E). Este estado es altamente desfavorable e inestable, y no siempre puede ser administrado por SSB (Figura 14E). Para las articulaciones plectonémicas, la interacción del filamento de recombinasa con el ADN estimula el desenrollamiento (Figura 14F). Si el intercambio de la cadena se superpone con un extremo del ADN, la cadena 'saliente' se libera y puede relajarse a medida que el oligo entrante y su complemento se rebobinan cuando la recombinasa se disocia (Figura 14G). Esto forma un producto sin restricciones y una proteína de unión a ADN de una sola cadena inhibe la migración de la ramificación (Figura 14H).

Esta figura compara los eventos probables que ocurren cuando un filamento de nucleoproteína inicia el intercambio de cadenas con una secuencia homóloga ubicada al final de un dúplex linealizado (lado derecho de la figura), o dentro de un dúplex que carece de homología en ambos lados (lado izquierdo de la figura). Comenzando por el lado izquierdo, una vez que el filamento de la nucleoproteína haya localizado la secuencia correcta, se emparejará el ADN de búsqueda con su complemento, y una cadena del dúplex original quedará sin par. De hecho, el complejo de intercambio consta de 3 cadenas, que están relativamente debajo del enrollamiento y estabilizadas por la recombinasa. A medida que la recombinasa comienza a desmontarse en una dirección de 5' a 3', el intermedio de 3 cadenas debajo

del enrollamiento se vuelve inestable. Para que el nuevo dúplex recupere la conformación normal del ADN relajado, debe rotar. Sin embargo, al hacerlo, debe girar simultáneamente el hilo saliente, ya que está vinculado en sentido ascendente y descendente con su socio original. Esto da como resultado un giro excesivo de la cadena saliente, ya que tiene que hacer el mismo número de giros, pero toma un camino más largo alrededor del nuevo dúplex, y es energéticamente desfavorable. En consecuencia, existe el requisito de que las proteínas de unión de cadena sencilla con interacciones de ADN muy estables permitan que tales estructuras existan durante un tiempo significativo. Alternativamente, el lado derecho del diagrama indica que, si el intercambio incluye un extremo del dúplex, el intercambio puede causar la liberación completa de la cadena saliente en un extremo y, por lo tanto, permitir que gire libremente sin restricciones por las otras cadenas involucradas en la recombinación. Esto conduce a una situación estable en la que el nuevo dúplex se puede rebobinar libremente después del desensamblaje de la recombinasa, y las proteínas de unión a ADN de cadena sencilla solo necesitan impedir la migración espontánea de la rama.

La figura 15 muestra el efecto de los agentes de aglomeración. En presencia de polietilenglicoles, gp32(N) y recA recombinase pueden mediar múltiples eventos de invasión en plantillas individuales sin un requisito para la regeneración de los extremos de la plantilla que permitiría salientes de 5' en el oligonucleótido de direccionamiento. La Figura 15A muestra los resultados de un experimento en donde se incubaron los oligonucleótidos Tester1bio o Tester3bio (que difieren en la longitud del saliente 5' en relación con la plantilla) con el fragmento EcoRV liberado de un plásmido que lleva el gen ruvB de E. coli o la digestión con ClaI del plásmido, en presencia o ausencia de PEG 8000 al 10%. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, 10.6 µg de recA, 8.8 µg de gp32, fosfocreatina 27 mM, creatina quinasa 1 U, Tester3bio 0.3 mM o Tester1bio, ATP 3 mM, mezcla de dNTP 200 µM, Klenow 50 U y plantilla de 0.5 pmoles (especies indicadas en la figura). Opcionalmente, se realiza la inclusión de 120 ng de recO y 120 ng de recR. PEG8000 se incluyó como se muestra. El volumen final fue de 30 µl. La incubación se llevó a cabo durante 1 hora a 37ºC.

El diagrama mostrado representa la relación de los oligonucleótidos con las dos posibles plantillas. En particular, ambos oligonucleótidos reconocieron una secuencia incluida dentro del fragmento ClaI. En cada caso, se utilizaron 0.5 pmoles de plantilla, otras condiciones se llevaron a cabo como se indica. Ambos cebadores estimularon la invasión/elongación en la plantilla EcoRV. Según la intensidad de la señal, se produjo aproximadamente un alargamiento por plantilla diana. Sin embargo, en presencia de PEG 8000 al 10%, la intensidad del fragmento completamente alargado fue significativamente mayor que en su ausencia y más fuerte que los 0.5 pmoles del producto de PCR biotinilado de control. La señal más fuerte se observó con el oligonucleótido Tester3bio. En ese caso, se estima que se produjeron al menos 10 invasión/recorridos-inicio por plantilla.

En la Figura 15B, se compara la estimulación de la invasión/elongación en 10% p/v de varios polietilenglicoles disponibles comercialmente. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, 10.6 µg de recA, 8.8 µg de gp32, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina quinasa, Tester3bio o Tester1bio de 0.3 mM, ATP 3 mM, dNTPs de 200 µM, 50 U Klenow y 0.5 pmoles de RV. Las especies de PEG se incluyeron como se muestra. Se observó una variación significativa en el grado de estimulación. El compuesto de PEG (MW=15.000 a 20.000) pareció ser el más efectivo, seguido de PEG1450.

La Figura 16 muestra el efecto de la amplificación dirigida al extremo utilizando RPA de cadena principal. Se demostró la amplificación que comprende varias rondas de invasión y extensión, logrando al menos una amplificación de 10 veces desde 0.05 pmoles de plantilla. En este experimento, se ha empleado pares de cebadores oligonucleotídicos para establecer una reacción de amplificación. Se muestra esquemáticamente la relación de los oligonucleótidos utilizados con el fragmento EcoRV de un plásmido que porta el gen ruvB de E. coli, que se usó como plantilla. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, 6 µg de recA, 8.8 µg de gp32(N), fosfocreatina 27 mM, creatina quinasa 1 U, Tester3bio 0.3 mM, oligonucleótido variable 0.3 mM, ATP 3 mM, ATP 200 mM, PEG al 10% compuesto, 50 U Klenow, y 0.5 pmoles de plantilla. Se usaron proteínas adicionales como se indica.

Tester3bio incluyó un saliente de 16 nucleótidos en relación con la plantilla inicial, mientras que Tester2 incluyó un saliente de 21 nucleótidos y se dirigió al otro extremo de la plantilla. El fósforo se usó como un oligonucleótido con un esqueleto de fosforotiorato. Este oligonucleótido tenía 15 residuos de largo y estaba al ras del extremo objetivo. Se predijo que la fosfo-1 no interactuaría con la recombinasa o la proteína de unión a ADN de cadena sencilla, ya que carecía de un esqueleto de fosfato. Sin embargo, se predijo que funcionaría en una hibridación de solución directa. Se empleó un fragmento de control del producto de PCR biotinilado para demostrar la intensidad de la señal de 0.5 pmoles de ADN, y también fue el tamaño exacto de la plantilla de inicio. Los productos de reacción se procesaron en un gel desnaturalizante al 6%, se transfirieron a nylon y se unieron con estreptavidina-HRP antes de realizar una quimioluminiscencia mejorada para revelar los productos biotinilados de las reacciones.

En todos los casos, la invasión exitosa y el alargamiento con el Tester3bio biotinilado se ha producido como se ve por la presencia de productos completamente alargados. Los productos tenían una movilidad ligeramente más lenta que el control, debido a la presencia de salientes en los oligonucleótidos. Además, hubo evidencia de varias rondas de invasión/corridas, ya que la intensidad de la señal fue al menos tan grande como el control de 0.5 pmoles (iniciamos la reacción con solo 0.05 pmoles). Hubo una acumulación significativa de un producto de aproximadamente 37 nucleótidos más grandes que el control. Se predijo que esto surgiría de Tester3bio alargándose en una cadena previamente copiada, e incluyendo el saliente, del cebador opuesto. Se muestran dos exposiciones del mismo gel.

La inclusión de varias proteínas diferentes, que normalmente están implicadas en el metabolismo del ADN, tuvo efectos variables. La ADN girasa y la toposiomerasa I (humana) disminuyeron el rendimiento del producto de amplificación, y la topoisomerasa redujo profundamente la generación de productos de alargamiento más cortos. La inclusión de E. coli ruvA y ruvB también conduce a una reducción general en la formación del producto. E. coli priA aumentó la cantidad de producto formado y aumentó significativamente el número de productos más cortos formados. La inclusión de E. coli dnaB y dnaC810 aumentaron ligeramente la cantidad de producto formado. Téngase en cuenta que una señal significativamente más fuerte detectada en reacciones que contienen oligonucleótido Fosfo-I en comparación con Tester3bio solo. Esto sugirió que Phospho-1 era capaz de hibridar con cadenas desplazadas y conducir a la formación de ADN dúplex.

La figura 17 muestra la cadena principal RPA y la capacidad de procesamiento de Klenow. En este experimento, se ha empleado pares de cebadores oligonucleotídicos en un esfuerzo por establecer una reacción de amplificación de una manera similar a la que se muestra en la Figura 16, excepto que se usa una dilución adicional de 100 veces de la plantilla de inicio. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, 6 o 12 µg de recA, 8.8 o 14.3 µg de gp32, fosfocreatina 27 mM, creatina quinasa 1 U, Tester3bio 0.3 o 0.9 µM, Tester3bio 0.3 o 0.9 µM, ATP 3 mM, ATP 200 µM, 10% de compuesto de PEG, 50 U Klenow y plantilla de 0.5 pmoles. El volumen final fue de 30 µl. La incubación se llevó a cabo durante 2 horas a 37ºC. Se muestra esquemáticamente la relación de los oligonucleótidos utilizados con un fragmento EcoRV de un plásmido que porta el gen ruvB de E. coli, que se utiliza como plantilla diana. Tester3bio incluyó un saliente de 16 nucleótidos en relación con la plantilla inicial, mientras que Tester2 incluyó un saliente de 21 nucleótidos, se dirige al otro extremo de la plantilla y codifica un sitio EcoRI dentro del saliente. Se empleó un fragmento de control del producto de PCR biotinilado para demostrar la intensidad de la señal de 0.5 pmoles de ADN, y también fue el tamaño exacto de la plantilla de inicio. Los productos de reacción se procesaron en un gel desnaturalizante al 6%, se transfirieron a nylon y se unieron con estreptavidina-HRP antes de realizar una quimioluminiscencia mejorada para revelar los productos biotinilados de las reacciones.

La concentración de los oligonucleótidos, gp32(N) y recA(C) fue variada, y también se investigó si la inclusión de la enzima de restricción EcoRI, que puede escindir parte de la secuencia adicional incorporada por el saliente Tester2, tiene cualquier efecto sobre la reacción. En la mayoría de los casos, hubo evidencia de algún grado limitado de amplificación del tamaño esperado del fragmento, pero hubo principalmente generación de fragmentos de ADN más cortos. Se dedujo que la acumulación relativamente pobre del producto bona fide de longitud completa puede ocurrir en estas concentraciones de plantilla más diluidas debido a que la pobre procesabilidad del fragmento Klenow de ADN polimerasa I de E. coli (10-50 nucleótidos) da lugar a que la mayoría de las interacciones generen fragmentos cortos, lo que es más significativo a bajas concentraciones de plantilla diana.

La Figura 18 muestra la dependencia del espaciado de los cebadores RPA. Como consecuencia de resultados anteriores, intentamos establecer si disminuir la distancia entre pares de cebadores resultaría en un aumento en la eficiencia de amplificación. Para probar esto, empleamos una serie de oligonucleótidos, Sizer1, 2, 3 y 4, que se colocaron a distancias crecientes desde el extremo 3' del oligonucleótido Tester3bio. Todos los oligonucleótidos Sizer incluyeron el saliente EcoRI indicado en el lado inferior derecho de la figura. Se muestran la secuencia del ADN objetivo, un fragmento EcoRV de un plásmido que porta el gen ruvB de E. coli y la posición de los oligonucleótidos utilizados. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, 6 µg de recA, 8.8 µg de gp32, fosfocreatina 27 mM, creatina quinasa 1 U, Tester3bio 0.3 µM, oligonucleótido variable 0.3 µM, ATP 3 mM, ATP 200 µM, compuesto de PEG al 10%, 50 µg U Klenow, 5 U EcoRI y plantilla de 0.5 pmoles. El volumen final fue de 30 µl. La solución de reacción se incubó durante 2 horas a 37ºC. Otras condiciones de reacción están indicadas en la figura.

Se empleó un fragmento de control del producto de PCR biotinilado para demostrar la intensidad de la señal de 0.5 pmoles de ADN, y también fue el tamaño exacto de la plantilla de inicio. Los productos de reacción se procesaron en un gel desnaturalizante al 6%, se transfirieron a nylon y se unieron con estreptavidina-HRP antes de realizar una quimioluminiscencia mejorada para revelar los productos biotinilados de las reacciones. Los fragmentos específicos de las longitudes esperadas se amplificaron eficientemente a partir de 0.5 fmoles de la plantilla de inicio cuando se emplearon Sizer2, 3 y 4. Sin embargo, el rendimiento del producto disminuyó algo a medida que aumentaba la longitud del producto. Se produce poco o ningún producto del tamaño esperado cuando se usó Sizer1. Se estimó que el carril 4 contenía una amplificación de ~4 x 10^4 veces. Este cebador incluyó la distancia entre oligonucleótidos más corta de solo 25 nucleótidos. Esto sugirió que hay una distancia mínima requerida para separar los extremos de los oligonucleótidos, aunque otras explicaciones, como el mal comportamiento del cebador, también podrían explicar el resultado. Se incluyeron en el experimento varias muestras que no contenían ADN de plantilla. En el caso de Sizer2, se observa una banda débil de aproximadamente el tamaño esperado incluso en ausencia de ADN exógeno. Con base en una variedad de datos, se cree que esto se debe a la contaminación de las presentes preparaciones de proteínas con cantidades significativas de ADN genómico de E. coli.

La Figura 19 muestra que los productos de RPA son en gran parte de doble cadena. La reacción de RPA puede generar productos de ADN de doble cadena como lo demuestra la electroforesis en gel de agarosa y la escisión de enzimas de restricción. Sin embargo, bajo las condiciones utilizadas aquí, hubo una disminución significativa en la eficiencia de reacción si la plantilla de inicio cayó significativamente por debajo de 0.5 fmoles. Además, las señales observadas en el control de solo agua sugirieron una contaminación genómica significativa del ADN de E. coli. En este experimento, se ha incubado 0.5 fmoles, o más cantidades diluidas, del fragmento detallado en la Figura 10 con Tester3bio y Sizer2 en las condiciones indicadas. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, 6 µg de recA,

8.8 µg de gp32, fosfocreatina 27 mM, 1 U de creatina quinasa, Tester3bio 0.3 µM, Sizer2 de 0.3 µM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, compuesto de PEG al 10%, 50 U Klenow, y la plantilla o dilución de 0.5 pmoles indicada en la figura. El volumen final fue de 30 µl.

Se ha incluido un control sin ADN, dilución progresiva de la plantilla e se investigó el inicio de la reacción en la plantilla incrustada (el fragmento ClaI detallado en las Figuras 1 y 7), de usar PEG 1450 y diluir el fragmento Klenow. Una fracción (1/10) de los productos de reacción se procesó en un gel desnaturalizante al 6%, se transfirió a nylon y se unió con estreptavidina-HRP antes de realizar una quimioluminiscencia mejorada para revelar los productos biotinilados de las reacciones (Figura 19A). Una fracción adicional (3/10) se extrajo con fenol, se precipitó y se corrió en un gel de agarosa al 2% y se tiñó con bromuro de etidio (Figura 19B). Una fracción final (3/10) se cortó con BbvC1 y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2% junto con un ADN equivalente sin cortar (Figura 19C).

Se estimó que el carril 2 (Figura 19A) contenía una amplificación de 5 x 10^4 veces, que correspondía a 10^{13} moléculas del producto final. En presencia de 0.5 fmoles de la plantilla de inicio, se observó una amplificación extremadamente robusta del fragmento de tamaño esperado, tal como se evidencia por electroforesis en gel desnaturalizante. Además, cuando parte de la muestra se sometió a electroforesis en agarosa, se observó una fuerte banda limpia de precisamente el tamaño correcto para un producto de ADN de doble cadena. Este producto podría ser cortado por BbvC1 para producir un fragmento ligeramente más pequeño del tamaño esperado. La dilución de la plantilla por 100 veces o más dio como resultado una banda significativamente menos intensa y una cantidad mucho mayor de fragmentos más cortos que la longitud esperada. Esto se determinó mediante electroforesis en gel desnaturalizante y mediante electroforesis en gel de agarosa. Se observó un patrón similar cuando se usó el ADN cortado con ClaI, o si no se usó ADN. Se cree que cuando se usa menos de una cantidad umbral de ADN en estas condiciones, hay una reacción de amplificación subóptima, que conduce a productos heterogéneos, y, además, las presentes muestras están altamente contaminadas con el ADN genómico de E. coli de procedimientos de purificación en un solo paso utilizados en la generación de las presentes proteínas recombinantes utilizadas aquí.

La figura 20 muestra la actividad de un mutante de truncamiento C-terminal recA. Las proteínas RecA con una eliminación del péptido ácido C-terminal (recA(C)Δ) son activas en la promoción del intercambio y extensión de cadenas en un ensayo de ejecución de plantilla lineal. Sin embargo, hubo algunas sugerencias de que la concentración óptima de proteínas era menor que con la proteína recA(C). Este experimento aborda si una forma truncada del terminal C de la proteína recA de E. coli, descrita en otro lugar, podría usarse con éxito en las reacciones de invasión/extensión. Se muestra el resultado de un ensayo de un solo lado que utiliza la proteína recA(C) de E. coli o la proteína recAΔ17(C) de E. coli, que carece de los 17 residuos ácidos C-terminales. Se indica la relación entre los cebadores y la plantilla y otras condiciones experimentales. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, creatina quinasa 1 U, Tester3bio 0.3 µM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, Klenow 50 U, plantilla RV de 0.5 pmoles, y especies de recA y la cantidad que se indica en la figura. PEG se incluyó como se muestra. El volumen final fue de 30 µl. La solución se incubó durante 2 horas a 37ºC. Las reacciones se realizaron con o sin PEG1450 al 10% y con las cantidades indicadas de la recombinasa respectiva. Ambas recombinasas soportaron exitosamente la invasión/extensión, aunque bajo las condiciones aquí utilizadas parece haber un óptimo diferente para la cantidad de proteína requerida.

La figura 21 muestra proteínas gp32 modificadas. Se muestra una representación esquemática de las proteínas T4 gp32 utilizadas en este estudio y la posición de diversas modificaciones y mutaciones.

La figura 22 muestra la actividad de las proteínas gp32. Las variaciones significativas confirman que la cooperatividad gp32 tiene un efecto sustancial en la velocidad de las reacciones de invasión/extensión, y confirma además que gp32(N) muestra una disminución significativa en la cooperatividad consistente con la interferencia con la función del dominio B del terminal N. Se muestran los resultados de un experimento en donde se generaron ejecuciones lineales utilizando como plantilla el fragmento EcoRV de un plásmido que lleva el gen RuvB de E. coli y el oligonucleótido Tester3bio. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, 100 ng/µl de creatina quinasa, Tester3bio 400 nM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, mioquinasa de pollo 10 U, 8 µg de etiqueta C uvsX, 7.5 o 15 µg gp32 (cada especie), 50 U Klenow y 0.5 pmoles de plantilla; no se incluyó PEG. El volumen final fue de 30 µl. La solución se incubó durante 2 horas a 37ºC. Las reacciones contenían uvsX(C) y varias formas gp32 como se indica. Se usaron dos concentraciones de cada forma gp32 en este experimento. Para analizar los productos de reacción, se cargaron 2 µl del volumen total (30 µl) en el gel.

En todos los casos, se generaron productos alargados del oligonucleótido que se extienden hasta una longitud consistente con los complementos de longitud completa. Se notó que en este experimento hubo un artefacto de gel que hubo observación de ocasionalmente. Hubo observación de una movilidad más lenta de las bandas. Esto se vio en el carril de fragmentos de control de PCR, también. La cantidad más pequeña de producto se formó cuando se usó la proteína gp32(C), lo que fue coherente con ella permitiendo que solo un nivel bajo de filamentos cargados con recombinasa estuviera presente en la reacción. Se formó una cantidad más pequeña de producto con 15 µg en comparación con 7.5 µg, lo que concuerda con la idea de que las concentraciones más altas disminuyeron la eficiencia de la carga de recombinasa.

Se predijo que la proteína gp32(C)K3A sería la siguiente forma más cooperativa. De acuerdo con esto, produjo un número limitado de productos de longitud completa cuando se utilizan 15 µg de proteína. Sin embargo, el número de

ejecuciones fue mayor que el observado con cualquier cantidad de gp32(C), lo que indica que había más filamentos cargados con recombinasa en la reacción y una mayor rata de invasión/elongación. Cuando se usaron 7.5 mg de gp32(C)K3A, hubo un cambio dramático en la cantidad de producto formado. Una explicación es que un aumento en la velocidad de invasión/elongación en esta reacción podría llevar a la sobrevaloración de la gp32(C)K3A por escorrentías de ADN de una sola cadena. En estas condiciones, la mayoría del oligonucleótido se recubriría con uvsX(C), lo que provocaría una alta rata de invasión y una incapacidad para estabilizar la cadena saliente y recubrirla con gp32. Esto daría como resultado productos truncados más cortos, algunos de los cuales se doblarían sobre sí mismos, se cebarían por sí mismos y se formarían en una variedad de otros productos similares. Esto sugirió que la rata de invasión/elongación de gp32(C)K3A fue notablemente más alta para esta proteína que gp32(C).

Al comparar las intensidades de los productos producidos cuando se utilizan 15 µg de cada proteína, se estima que las reacciones que contienen gp32(C)K3A tienen una rata de invasión/elongación de aproximadamente 10 veces la de gp32(C). Todas las otras proteínas gp32 probadas en este experimento produjeron un patrón similar al observado cuando se empleó gp32(C)K3A y grandes cantidades de producto. Este fue el caso incluso cuando se emplearon 15 µg de la proteína relevante, lo que sugiere que todos mostraron una menor cooperatividad que gp32(C) o gp32(C)K3A. Sin embargo, notablemente, tanto gp32(N) como gp32(C)R4T produjeron significativamente menos producto cuando se usaron solo 7.5 µg de proteína cuando se compararon con 15 µg. Esto contrasta con la situación con las otras proteínas. Sobre esta base, se sugiere que gp32(N) y gp32(C)R4T poseen un grado similar de cooperatividad. Un estudio anterior sugirió que gp32K3A y gp32R4Q son de cooperatividad similar. Sin embargo, los presentes datos sugieren que gp32(C)R4Q se encuentra en algún lugar entre gp32(C)K3A y gp32(C)R4T con respecto a su comportamiento en el apoyo a la invasión/síntesis.

La Figura 23 muestra la invasión y la extensión usando uvsX. Este experimento aborda si una forma truncada del terminal C de la proteína uvsX T4 del bacteriófago podría usarse con éxito en las reacciones de invasión/extensión. Se muestran los resultados de los ensayos de un solo lado que utilizan la proteína uvsX(C) o la proteína uvsXΔ21(C) que carece de los 21 residuos ácidos C-terminales. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, creatina quinasa 1 U, Tester3bio 0.4 µM, ATP 3 mM, dNTPs 200 µM, Klenow 50 U, mioquinasa de pollo 1 U, uvsX(C) o uvsXΔ21(C) 8.8 µg gp32(N) y 0.5 pmoles de plantilla RV. El volumen final fue de 30 µl. La solución se incubó durante 2 horas a 37°C y se cargaron 2 µl o mezcla de reacción en cada carril del gel. La relación de la plantilla y los oligonucleótidos y otras condiciones experimentales se indican en la figura. Las reacciones se realizaron con las cantidades indicadas de la recombinasa respectiva.

Ambas recombinasas soportaron exitosamente la invasión/extensión. Sin embargo, bajo las condiciones utilizadas aquí, parece haber un óptimo diferente para la cantidad de proteína requerida. En el caso de uvsX(C), la rata de invasión/extensión aumentó progresivamente con la concentración de proteína dentro del rango probado. Sin embargo, para la proteína uvsXΔ21(C), la tasa se inhibió a una concentración más alta y el nivel general de producción del producto fue menor en estas condiciones. En contraste con la invasión/extensión mediada por recA en reacciones similares, uvsX(C), parece estimular múltiples eventos de invasión/extensión sin la necesidad de la adición de polietilenglicol.

La figura 24 muestra RPA utilizando uvsX(C). En este experimento, uvsX(C) se combinó con gp32(N) en presencia de los oligonucleótidos Tester3bio y Sizer2. La plantilla de ADN en este experimento fue el plásmido digerido con EcoRV que lleva el gen ruvB de E. coli utilizado en el Ejemplo 1. La solución de reacción incluía Mg-acetato 10 mM, fosfocreatina 27 mM, 100 ng/µl de creatina quinasa, 400 nM Tester3bio, 400 nM Sizer2, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, fragmento Klenow 50 U, mioquinasa de pollo 10 U, 10 µg (IX) o 20 µg (2X) uvsX C-tag, 8.8 µg gp32 (N). Opcionalmente, se realiza la inclusión de ADPβS 0.2 mM, 10 µg de topoisomerasa de E. coli, PEG 1450 al 10% y 10 µg de uvsXΔ21(C). Tester3bio reconoció un extremo de un fragmento de aproximadamente 300 pares de bases e incluyó un saliente de 5' en relación con el final del objetivo. Sizer2 reconoció la otra cadena de esta plantilla y se dirigió hacia una secuencia incrustada de tal manera que su extremo 3' es aproximadamente tres y media vueltas helicoidales desde el final de Tester3bio.

En presencia de PEG1450, hubo observación de la amplificación del fragmento esperado en 2 horas. En los casos en que se produjo la amplificación, se consumió casi toda la población de oligonucleótidos, lo que indica una amplificación de 3-5 X 10^4. Se indican los componentes de la reacción. Incluido en algunas muestras hay componentes adicionales. Se encuentra que 200 µM de ADP-β-S aumentó ligeramente la cantidad de producto generado en estas condiciones. A la inversa, en las condiciones utilizadas aquí, la adición de E. coli toposiomerasa I inhibió la amplificación. Bajo las condiciones utilizadas, no se detectó amplificación con la proteína uvsXΔ21(C). Sin embargo, no se incluyó PEG1450 en estas muestras, y uvsX(C) tampoco amplificó en estas condiciones sin PEG1450.

La figura 25 muestra gp32 de tipo salvaje frente a modificado. Se determinó que la proteína uvsX(C) variante era cualitativamente diferente de la gp32 sin etiquetar nativa. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, 100 ng/µl de creatina quinasa, Tester3bio 300 nM, Sizer2 300 nM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, 50 U de fragmento Klenow, 10 U de mioquinasa de pollo, 300 ng/µl uvsX(C), 300 ng/ml de gp32 (sin etiquetar) o 100, 200, 300, 400, 500 o 600 ng/ml de gp32(C), y PEG como se indica. La reacción se incubó durante 2 horas a 37ºC. Se muestra una comparación entre las reacciones de amplificación realizadas en presencia de gp32 sin etiquetar y una titulación de gp32(C), en presencia o ausencia de PEG1450. Se observa que se requería PEG en la reacción para que gp32(C) funcionara, mientras que este no es el caso para gp32 sin etiquetar. Sin embargo, PEG aumentó

significativamente la cantidad de producto formado durante el período de reacción, en cualquier caso. Incluso en presencia de PEG, la gp32 sin etiquetar consistentemente generó un poco más de producto que la gp32(C) en cada punto de la curva de titulación.

La Figura 26 muestra la titulación de gp32 y el efecto de uvsY. La valoración de gp32 reveló un requisito para una cantidad mínima de gp32, y un requisito para la proteína uvsY(N) cuando se empleó gp32 sin etiquetar. En la Figura 26A, se muestran los resultados de un experimento que demuestra que cuando se usó gp32 sin etiquetar, se requirió la proteína uvsY(N) para la amplificación. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, 100 ng/µl de creatina quinasa, Tester3bio 300 nM, Sizer2 300 nM, ATP 3 mM, dNTP 200 mM, PEG1450 al 10%, fragmento Klenow 50 U, micominasa de pollo 10 U, 300 ng/µl uvsX(C), 300 ng/µl gp32 (sin etiquetar) y uvsY(N) como se indica en la figura. La solución se incubó durante 2 horas a 37ºC. La proteína uvs(Y) operó en un rango de concentraciones que se muestra aquí (50 a 300 ng/µl). Otros experimentos demostraron que mayores cantidades inhibieron la reacción. Por lo tanto, se debe establecer un óptimo para cualquier reacción dada (probablemente entre 5 y 50 ng/µl).

La figura 26B muestra los resultados de la titulación de la proteína gp32 sin marcar en presencia o ausencia de uvsY(N). La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, 100 ng/µl de creatina quinasa, Tester3bio 300 nM, Sizer2 300 nM, ATP 3 mM, dNTP 200 µM, PEG1450 al 10%, mioquinasa de pollo 10 U, 750 ng/µl uvsX(C), 300 ng/µl de gp32 (sin etiquetar) y 300 ng/µl de uvsY(N). La solución se incubó durante 2 horas a 37ºC. Una vez más, existe un requisito para que uvsY(N) alcance la amplificación. Además, este experimento demuestra la necesidad de una cantidad mínima de gp32. En este experimento, la variación de las concentraciones de gp32 entre 80 y 160 ng/µl de gp32 dio lugar a una transición brusca de no amplificación a amplificación eficiente. Un análisis simple del tamaño del sitio de unión conocido para gp32, la longitud de los oligonucleótidos y su concentración, sugirió que este aumento en la concentración representaría una transición desde los niveles subestequiométricos de gp32 para el cebador, hasta los niveles de saturación. En consecuencia, la interpretación más simple es que gp32 satura los oligonucleótidos para tener un exceso de gp32 en la reacción para recolectar y estabilizar la cadena saliente.

La figura 27 muestra factores que afectan la velocidad de reacción y el ruido. La alta cooperatividad de gp32 inhibe la formación de filamentos de recombinasa (Figura 27A). Además, uvsY actúa para aumentar la carga de recombinasa en un entorno gp32 desfavorable (Figura 27B). PEG ayuda a la función de gp32 cooperativamente deshabilitado (Figura 27C). La velocidad de reacción está influenciada por la actividad de recombinasa y la efectividad de gp32 (Figura 27D). Las fases posteriores a la invasión se mejoran en presencia de la gp32 cooperativa (Figura 27E). La cooperativa gp32 es más efectiva para silenciar el ruido de reacción (Figura 27F).

Se sugirieron los efectos e interacciones previstos de gp32, uvsX, uvsY y PEG, con la conclusión de que se debe alcanzar un equilibrio óptimo entre la velocidad de reacción y el ruido. El grado de cooperatividad de gp32 se indica en la parte superior de la figura. La alta cooperatividad favoreció la unión eficiente al ADN de cadena sencilla, lo que evitó un ruido de reacción significativo al inhibir el comportamiento de cebado no deseado. La alta cooperatividad también favoreció la estabilización de la cadena saliente durante la recombinación y la síntesis de ADN. A la inversa, la gp32 altamente cooperativa redujo la abundancia de filamentos de búsqueda cargados con recombinasa y puede afectar considerablemente la velocidad de reacción.

Este comportamiento podría superarse parcialmente al incluir uvsY en la reacción. Sin embargo, aún no se ha determinado si esto podría lograr una tasa de carga tan alta como se desea. Se podrían emplear proteínas gp32 modificadas que sean menos cooperativas. Además, la cooperatividad de las proteínas gp32 y las proteínas uvsX puede verse afectada por la inclusión de PEG. El PEG también puede tener consecuencias beneficiosas, o a veces perjudiciales, sobre otros componentes de la reacción, como el comportamiento de hibridación del ADN y la capacidad de procesamiento de la polimerasa. La velocidad óptima se puede adquirir en una posición alejada de cualquiera de los dos extremos, como se indica, ya que puede ser necesario alcanzar un equilibrio entre la carga de recombinasa y la función gp32.

La figura 28 muestra los efectos de PEG. PEG pudo reducir la longitud promedio de los productos lineales de invasión/ejecución en el experimento de ejecución lineal mediado por uvsX en presencia de gp32(C). Se muestran los resultados de un experimento de ejecución lineal que utiliza el oliognucleótido Tester3bio dirigido al final del fragmento EcoRV de aproximadamente 300 pares de bases de E. coli RuvB. Este fragmento se usó en todos los experimentos descritos y se muestra esquemáticamente a la derecha de la figura. La reacción se reconstituyó con 8 mg de UvsX(C) en un volumen de reacción final de 30 ml, en presencia de gp32(C), y en algunos casos, cantidades variables de UvsY(N) o UvsY(C). La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, creatina quinasa 1 U, Tester3bio 0.4 µM, ATP 3 mM, dNTP 200 mM, fragmento Klenow 50 U, mioquinasa de pollo 1 U, 8 µg uvsX(C), 7.5 µg gp32(C) o 8.8 µg de gp32(N), y plantilla de 0.5 pmoles. El volumen final fue de 30 µl. La solución se incubó durante 2 horas a 37°C y se cargaron 2 µl de la solución en cada carril.

En ausencia de PEG, parece que se produjeron múltiples ciclos de invasión/ejecución en cada plantilla, y se generó una cantidad significativa de producto de longitud completa. Sin embargo, se produjo una cantidad aún mayor de fragmentos ligeramente más cortos, los cuales se cree que constituyen correcciones ligeramente más cortas que pueden haberse doblado sobre sí mismas y sintetizado una horquilla corta. Se interpretaron todas las bandas que no son de longitud completa como resultado de algún tipo de reacción de invasión/extensión bona fide que no ha

alcanzado la extensión completa. Tanto UvsY(N) como UvsY(C) estimulan la cantidad de producto formado hasta cierto punto. En el caso de no PEG, UvsY(C) parece ser más efectivo que UvsY(C). Esto contrasta con otros datos de amplificación geométrica que generamos, lo que sugiere que solo UvsY(N) admite la amplificación geométrica eficiente.

En particular, la inclusión de PEG, en contradicción con los hallazgos con recA de E. coli, pareció disminuir la cantidad total de producto en este gel. También disminuyó la distribución media de longitud de los productos. Para explicar esto, se sugiere que bajo estas condiciones la cooperatividad de gp32(C), quizás ya en su máximo, no puede ser aumentada por PEG mientras que la de UvsX puede ser. Por lo tanto, el comportamiento UvsX relativamente hiperactivo da como resultado una carga rápida en la plataforma saliente, la reinvasión y la eficiente "migración de burbujas" que persigue la cadena recién sintetizada y la desplaza más fácilmente. En consecuencia, la longitud media del producto se reduce significativamente.

La figura 29 muestra la invasión dirigida al final del ADN. Se ilustra la primera ronda de invasión/síntesis que utiliza el objetivo final y el saliente de oligonucleótidos (Figura 29A). Los residuos adicionales de ~10 a 15 (extremo 5') y ~30 residuos (extremo 3') se aproximan al requisito mínimo para el intercambio de cadenas (Figura 29B). Se produce una invasión, seguida de la liberación de la cadena saliente desconstruida, y la síntesis en retroceso (Figura 29C). La mayoría de los filamentos de nucleoproteínas que están recubiertos lo suficiente para completar el intercambio de la cadena catalizarán la liberación completa y desconstruida de la cadena saliente (Figura 29D). Ocurren rondas subsiguientes de invasión/síntesis (Figura 29E). Pocos o ningún filamento de nucleoproteínas pueden intercambiarse hasta el final del objetivo (Figura 29F). Se proporcionan una o ninguna de las moléculas gp32 (Figura 29G). Después de esto está la carga de recombinasa (Figura 29H) y la migración de la ramificación (Figura 29I).

Esta figura describe cómo los oligonucleótidos dirigidos que poseen inicialmente un saliente en relación con una plantilla de objetivo lineal podrían comportarse durante los primeros intentos y luego los intentos subsiguientes para llevar a cabo el intercambio de cadenas. El propósito de este modelo es racionalizar los datos, lo que sugiere que cuando una situación de este tipo se reconstituye experimentalmente, existe una diferencia significativa entre la primera y las posteriores invasiones. La parte superior de la figura muestra filamentos de oligonucleótidos cargados con recombinasa, que muestran diferentes extensiones 5' de cobertura. El ensamblaje direccional de 5 a 3' significa que la mayoría debe tener recubrimiento hasta el extremo 3'. Como se muestra en la figura, todos los oligonucleótidos poseen un saliente 5' en relación con el objetivo inicial.

Es probable que el primer evento de invasión resulte en la liberación completa de la cadena saliente ya que existe una probabilidad significativa de que la recombinasa recubra el oligonucleótido de búsqueda en un grado 5' más que la secuencia que estará involucrada en el intercambio de la cadena. Una vez que la cadena saliente se libera, no tiene restricciones topológicas y se puede estabilizar fácilmente mediante proteínas de unión a ADN de cadena sencilla, probablemente incluso aquellas con cooperatividad relativamente pobre. Además, también se genera estabilidad por las polimerasas que extienden el extremo 3' del ADN dúplex para generar el complemento al extremo 5' del oligonucleótido dirigido. Nos referimos a esta síntesis como síntesis en retroceso. Como consecuencia de la síntesis en retroceso, cualquier invasión subsiguiente estará al ras de la plantilla extendida.

En estas circunstancias, la mayoría de los oligonucleótidos no están completamente recubiertos con recombinasa hasta sus extremos 5'. En algunos casos, puede haber una o más moléculas gp32 que recubren la parte 5' del oligonucleótido. Cuando estos oligonucleótidos realizan el intercambio de cadenas en el objetivo ahora extendido, es poco probable que la cadena saliente se libere de inmediato. Como consecuencia, el evento se asemeja inicialmente al evento topológicamente restringido ya representado en la Figura 6. El modelo sugiere que solo si la cooperatividad de la proteína de unión a ADN de cadena sencilla es suficiente, estos intermedios inestables tensos podrán existir durante un período limitado. En la parte inferior de la figura, se exploró lo que podría ocurrir con estos intermedios inestables.

En el escenario 1, la extensión 5' no modificada del oligonucleótido sufre una migración de la ramificación con la parte dúplex equivalente del objetivo. Esto podría fácilmente conducir a una completa disociación de esta parte de la cadena saliente que luego giraría rápidamente para liberar cualquier estrés y sería estabilizada por proteínas de unión a ADN de cadena sencilla como ocurrió en la primera invasión. Estos sustratos ahora estables serán conjuntos ideales y relativamente estables para el alargamiento de la polimerasa. Alternativamente, en el escenario 2, la proteína de unión a ADN de cadena sencilla se desmonta de la cadena saliente y la migración de la ramificación procede en la dirección opuesta a la del escenario 1, de modo que se expulsa el ADN invasor. En el escenario 3, la cadena saliente se reviste con recombinasa y se reinvierte, lo que lleva a la expulsión del oligonucleótido. Este proceso se asemeja a un proceso descrito en otro lugar como migración de burbuja. Si la recombinasa se carga en la cadena saliente liberada en el escenario 1, también podría ocurrir una migración de burbujas. Tenemos datos experimentales que se reconcilian con mayor facilidad considerando la existencia de la migración de burbujas como se muestra en la Figura 28.

La figura 30 muestra RPA en una muestra compleja. En este experimento, se ha examinado la sensibilidad de RPA y la necesidad de un extremo de ADN en una reacción de RPA en un objetivo de ADN complejo. Se proporciona una representación esquemática de la secuencia de ADN, que corresponde a parte del gen de la enzima convertidora de angiotensina humana (ACE). Se utilizaron tres combinaciones diferentes de cebadores. El experimento utilizó una mezcla de uvsX(C), uvsY(N) y gp32(C)K3A. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27

mM, 100 ng/µl de creatina quinasa; cebador Up3 300 nM; 300 nM Down1, 2 o 3 cebadores; ATP 3 mM, dNTP 200 µM, PEG1450 al 10%, fragmento Klenow 50 U, mioquinasa de pollo 10 U, 300 ng/µl de uvsX(C), 300 ng/µl de gp32(C)K3A y 50 ng/µl de uvsY(N). El volumen final fue de 30 µl. La solución se incubó durante 5 horas a 37ºC. Los productos de reacción se separaron electroforéticamente en un gel de acrilamida, se transfirieron a una membrana de nylon y se sondearon con un oligonucleótido biotinilado que reconocía una secuencia interna única.

Para la reacción de RPA, se compararon la plantilla sin cortar (ADN genómico) y la plantilla de corte, y se compararon los pares de cebadores. Se detectó un fragmento del tamaño esperado. En todos los casos, no hubo ningún producto específico cuando no se agregó ADN genómico a la reacción, pero se generó un producto específico cuando se agregó ADN (equivalente a aproximadamente 10000 copias de cualquier secuencia). La digestión del ADN antes de RPA con HpaII dio lugar a la generación de al menos un extremo que se superpone con uno de los oligonucleótidos, y un aumento en la intensidad de la señal. Sin embargo, no hubo un requisito absoluto para la digestión con HpaII para que se produzca la RPA.

La figura 31 muestra la sensibilidad de RPA. En este experimento, se ha examinado la sensibilidad en una reacción de RPA en un objetivo complejo de ADN. Se proporciona una representación esquemática de la secuencia de ADN, que corresponde a parte del gen de la enzima convertidora de angiotensina humana (ACE). Se utilizaron tres combinaciones diferentes de cebadores. El experimento utilizó una mezcla de uvsX(C), uvsY(N) y gp32(C)K3A. La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, 100 ng/µl de creatina quinasa; cebador Up3 300 nM; 300 nM Down1, 2 o 3 cebadores; ATP 3 mM, dNTP 200 µM, PEG1450 al 10%, fragmento Klenow 50 U, mioquinasa de pollo 10 U, 300 ng/µl de uvsX(C), 300 ng/µl de gp32(C)K3A y 50 ng/µl de uvsY(N). El volumen final fue de 30 µl. La solución se incubó durante 5 horas a 37°C y se utilizó la sonda ACE-hyb. Los productos de reacción se separaron electroforéticamente en un gel de acrilamida, se transfirieron a una membrana de nylon y se sondearon con un oligonucleótido biotinilado que reconocía una secuencia interna única. Se detectó un fragmento del tamaño esperado. En todos los casos, no hubo ningún producto específico cuando no se agregó ADN genómico a la reacción, pero se generó un producto específico cuando se agregó suficiente ADN. En todos los casos, 1000 copias fueron suficientes para generar una señal significativa, y en un caso pudimos detectar una señal muy débil a 100 copias.

La Figura 32 muestra la sensibilidad de RPA y los artefactos independientes de la plantilla. Se muestran los resultados de un experimento en donde se ha investigado la sensibilidad en una reacción de RPA en un objetivo de ADN complejo. Se proporciona una representación esquemática de la secuencia de ADN, que corresponde a parte del gen de la enzima convertidora de angiotensina humana (ACE). Se realizó un curso de tiempo de la amplificación tomando muestras de reacción a 1, 2 y 3 horas. Los productos de reacción se detectaron en virtud de la presencia de residuos de biotina unidos al extremo 5' de uno de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación. De esta manera, fue posible visualizar todos los productos de reacción que involucran a este oligonucleótido, incluidos los artefactos que puedan surgir. Se probó varias concentraciones diferentes de la proteína uvsY(N). La solución de reacción incluía acetato de Mg 10 mM, fosfocreatina 27 mM, 100 ng/µl de creatina quinasa; cebador Up3 300 nM; cebador 300 nM Down1; ATP 3 mM, dNTP 200 µM, PEG1450 al 10%, fragmento Klenow de 50 U, mioquinasa de pollo 10 U, 300 ng/µl de uvsX(C), 300 ng/µl de gp32 (C) y 50 ng/µl de uvsY(N). El volumen final fue de 30 µl. La solución se incubó durante 5 horas a 37ºC. A una concentración uvsY(N) de 50 ng/µl, se detectó el producto correcto directamente, aunque ligeramente, después de 3 horas de incubación. Durante este período hubo una acumulación de bandas fuertes de aproximadamente el doble de la longitud del oligonucleótido, que se acumularon de manera similar en la muestra sin plantilla. Es más probable que estos sean artefactos de cebador.

La figura 33 muestra cómo pueden surgir artefactos de cebador. Los artefactos de cebador probablemente se inician por eventos autocebados erróneos, como se muestra aquí. Los cebadores pueden formar horquillas, como ocurre en la Figura 33A, o hibridar con un segundo cebador, como ocurre en la Figura 33B. Si una polimerasa puede extender tal horquilla, se puede formar un tramo significativo de ADN de doble cadena, como se ve en A* y B*. Estas estructuras pueden convertirse en dianas para otros filamentos cargados con recombinasa, valorar filamentos activos de objetivos auténticos y, posiblemente, entrar en formas geométricas de amplificación por sí mismos.

La figura 34 muestra la supresión de artefactos del cebador. Se muestran esquemáticamente varias estrategias para suprimir el ruido del artefacto del cebador. En la Figura 34A, un segundo oligonucleótido bloqueado en 3' complementario de las secuencias 3' del oligonucleótido dirigido se incluye en la reacción para competir por la formación de la estructura de la estructura secundaria que podría dar como resultado un cebado erróneo. En las Figuras 34B y 34C, se emplea un oligonucleótido bloqueado corto similar al de (A), pero en este caso se construye un puente covalente entre el extremo 5' del oligonucleótido objetivo y el extremo 5', o 3', del cebador corto competidor. De esta manera, el nucleótido bloqueado está atado en su extremo 5' al extremo 5' del oligonucleótido dirigido (Figura 34A-B). En la Figura 34D, se agrega una secuencia corta complementaria a la región 3' del oligonucleótido dirigido a la región 5' del oligonucleótido dirigido. Compite eficientemente con la formación de estructuras secundarias.

La figura 35 muestra el uso de oligonucleótidos en horquilla para estimular el autocebado de las cadenas desplazadas. Se muestra un esquema que muestra cómo los oligonucleótidos cuyo diseño incluye una sección 5' con perfecta complementariedad con la sección 3' podrían usarse para estimular la amplificación a través de el autocebado. En la parte superior del diagrama se muestra un ADN objetivo, designado como A, que tiene extremos distintos que son objetivos para uno de los dos oligonucleótidos dirigidos que se muestran en la parte superior izquierda y derecha de la figura. Ambos de estos oligonucleótidos poseen complementariedad entre sus regiones 5' y 3' como lo indican las

flechas cortas. El objetivo, A, probablemente se habría generado por eventos anteriores de invasión/elongación que involucran a estos oligonucleótidos y un objetivo inicial que carece de las regiones más 5' de estos oligonucleótidos. En el lado izquierdo o derecho de la figura, seguimos el resultado de los eventos de invasión/elongación iniciados por los cebadores izquierdo o derecho, respectivamente. El resultado es similar en ambos casos, aunque los productos finales están ordenados de manera ligeramente diferente.

Al enfocarse en el lado izquierdo de la figura, se observa que cuando el objetivo A está sujeto a invasión y elongación con el cebador izquierdo, el resultado es la formación de un nuevo dúplex idéntico a A y un ADN de cadena sencilla equivalente a la cadena superior del objetivo inicial, designado como B. Debido a la presencia de la complementariedad entre la región 3' y las secuencias adyacentes, B es capaz de formar una horquilla que cebará la síntesis de ADN para generar un producto C en gran parte de doble cadena. Una vez más por el oligonucleótido izquierdo. Sin embargo, en este caso, no se forma ninguna cadena desplazada de una sola cadena. En su lugar, el producto D se forma con una longitud que es aproximadamente el doble que la del objetivo original. Este producto es una repetición invertida y contiene dos secuencias que son dianas para el oligonucleótido izquierdo y una para el oligonucleótido derecho ubicado en el centro.

Los sucesivos eventos de invasión/elongación, y la posible ocurrencia de eventos de hibridación entre cadenas desplazadas, podrían fácilmente conducir a que tales especies "diméricas" se agranden aún más, y la formación en general de productos más complejos. Un curso similar de eventos se muestra en el lado derecho de la figura, esta vez iniciado por invasión/elongación por el cebador derecho. El producto dimérico final, D', no es equivalente a D ya que las dos secuencias finales son dianas para el cebador derecho, y la región central es una diana para el cebador izquierdo. Es probable que procesos similares o idénticos a los que se muestran aquí ocurran con cierta frecuencia en algunas condiciones, incluso en ausencia del diseño deliberado de oligonucleótidos para promoverlo, ya que a menudo hay cierta capacidad limitada para autocebado de ADN de cadena sencilla.

La Figura 36 muestra las condiciones que soportan la amplificación de ADN con poco o ningún artefacto de cebador. Se muestran los resultados de un experimento en donde se ha investigado la sensibilidad de una reacción de RPA en un objetivo de ADN complejo. Se proporciona una representación esquemática de la secuencia de ADN, que corresponde a parte del gen de la enzima convertidora de angiotensina humana (ACE). Los oligonucleótidos utilizados son el cebador de Angiolbio biotinilado y el cebador de Angio3 no biotinilado cuya secuencia se proporciona en los métodos experimentales. Estos cebadores amplificaron un fragmento de ADN de doble cadena de 132 pb. El ADN genómico humano sin cortar se tituló de 45 copias hasta 2880 copias. Los productos de reacción se detectaron en virtud de la presencia de un residuo de biotina unido al extremo 5' de uno de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación. De esta manera, fue posible visualizar todos los productos de reacción que involucran a este oligonucleótido, incluidos los artefactos que puedan surgir.

La reacción se incubó durante 2 horas a 37°C en el caso de Klenow exo, y 2 horas a 42°C en el caso de la Bst polimerasa. La reacción incluyó lo siguiente: 50 ng/µl de uvsY(N), 300 ng/µl de gp32(C), 100 ng/µl de uvsX(C), fosfocreatina 20 mM, ATP 3 mM, 25 miliunidades/µl de mioquinasa, 100 ng/µl de creatina quinasa, dNTP 200 µM, compuesto de PEG al 5% p/v, cebador Angiolbio 300 nM, cebador Angio3 300 nM, 800 ng/µl de Klenow exo o 1.2 unidades/µl de polimerasa Bst. La amplificación mediada por Klenow se realizó en un regulador U2 que comprende una composición final de acetato de tris 20 mM, pH 7.9, acetato de magnesio 8 mM, acetato de potasio 120 mM. La amplificación mediada por la polimerasa Bst se realizó en un regulador U1 que comprende una composición final de acetato de tris 20 mM pH 7.5, acetato de magnesio 6 mM, acetato de potasio 100 mM.

Ejemplo 13: Amplificación de ADN para aplicaciones en el punto de uso

Los clones y las proteínas se produjeron como se describe en el Ejemplo 11, anterior.

ADN utilizados en reacciones RPA

Se ha empleado varios ADN diana diferentes en este estudio y varios oligonucleótidos. La secuencia de los oligonucleótidos se proporciona a continuación, y el objetivo de la plantilla en el experimento que se muestra en la Figura 39B. La diana del gen RuvB de E. coli se usó para el ensayo lineal (Figura 39B). Cantidades idénticas de la plantilla de plásmido que contiene este fragmento se cortaron con EcoRV, liberando un fragmento de aproximadamente 300 pb, o con ClaI que linealiza el ADN. Se utilizaron cantidades molares iguales de plantilla en los experimentos de ejecución (20 nM cada plantilla). La secuencia de un fragmento KpnI/ClaI de esta plantilla se proporciona a continuación. El fragmento EcoRV está incrustado dentro de esta secuencia, y los sitios están resaltados

GGTACCACTTTGCCGGAAGATGTAGCAGATCGCGCCATTCGCCCCAAATTAC
TGGAAGAGTATGTTGGTCAGCCGAGGTTCGTTCACAGATGGAGATTTTCATCAAAG
CAGCGAAACTGCGCGGCGATGCCCTCGATCATTTGTTGATTTTTGGTCCTCCGGGGT
TGGGTAAAACTACGCTTGCCAACATTGTCGCCAATGAAATGGGCGTTAATTTACGC
ACGACTTCTGGTCCGGTGCTGGAAAAGGCGGGCGATTTGGCTGCGATGCTCACTAA
CCTTGAACCGCATGACGTGCTGTTTATTGATGAGATCCACCGTCTATCGCCAGTTGT
TGAAGAAGTGCTGTACCCGGCAATGGAAGACTACCAACTGGATATCATGATTGGTG
AAGGTCCGGCGGCACGCTCCATTAAAATTGATTTGCCGCCGTTTACCCTGATTGGTG
CAACCACGCGCGCAGGTTCGCTGACATCACCGTTGCGCGACCGTTTTGGTATTGTGC
AACGTCTGGAGTTTTATCAGGTGCCGGATCTGCAATATATCGTCAGTCGCAGCGCAC
GCTTTATGGGGCTTGAGATGAGTGATGACGGCGCGCTGGAAGTTGCTCGTCGCGCT
CGCGGTACGCCGCGCATTGCCAACCGTCTGCTGCGTCGAGTGCGTGATTTCGCCGAA
GTGAAGCACGATGGCACCATCTCGGCAGATATCGCTGCTCAGGCGCTGGATATGTT
GAATGTCGATGCTGAAGGTTTCGATTATATGGACCGCAAATTGTTGCTGGCGGTAAT
CGAT (SEQ ID NO:18)

Secuencia del oligonucleótido Tester3bio. Las bases homólogas al objetivo están en negrita. 5'biotina-

CTCACTATACCTCAGCATCATGATTGGTGAAGGTCCGGCGGCAC (SEQ ID NO:19).

ADN humanos

Se ha utilizado ADN genómicos humanos de varias fuentes. Se utilizó una población mixta de ADN genómico masculino de Promega. Además, el ADN de muestras masculinas individuales se estudió en la Figura 38A. Individuo 1 y 2 fueron padre e hijo. El ADN de individuo 2 se usó en el experimento en la Figura 39E, mientras que el ADN para el experimento en la Figura 39F fue otro individuo masculino. Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas para amplificar las secuencias de humanos y B. subtilis son las siguientes:

Correspondiente al locus de la apolipoproteína B humana:

ApoB4 5' CAGTGTATCTGGAAAGCCTACAGGACACCAAAA 3' (SEQ ID NO:20)

Apo300 5' TGCTTTCATACGTTTAGCCCAATCTTGGATAG 3' (SEQ ID NO:21)

Apo700 5' TGGTAAACGGAAGTCTGGCAGGGTGATTCTCG 3' (SEQ ID NO:22)

Apo800 5' CAATTGTGTGTGAGATGTGGGGAAGCTGGAAT 3' (SEQ ID NO:23)

Apo900 5' GAGGTGGTTCCATTCCCTATGTCAGCATTTGC 3' (SEQ ID NO:24)

Apo1000 5' GGGTTTGAGAGTTGTGCATTTGCTTGAAAATC 3' (SEQ ID NO:25)

Apo1500 5' TTGAATTTCAAGTTTAGAAAAGTTGAGGGAGCCAG 3' (SEQ ID NO:26)

Correspondiente al locus SRY humano:

SRY3 5' AAAGCTGTAACTCTAAGTATCAGTGTGAAAC 3' (SEQ ID NO:27)

SRY4 5' GTTGTCCAGTTGCACTTCGCTGCAGAGTACC 3' (SEQ ID NO:28)

Correspondiente al ADN genómico de B. subtilis:

BSA1 5' TTGGGCACTTGGATATGATGGAACTGGCAC 3' (SEQ ID NO:29)

BSA3 5' ACAGAAAGCTATTAAAGCAACTGACGGTGTGG 3' (SEQ ID NO:30)

BSB3 5' CCATCTTCAGAGAACGCTTTAACAGCAATCC 3' (SEQ ID NO:31)

Cebadores marcadores STR humanos:

CSF1PO 5' GTTGCTAACCACCCTGTGTCTCAGTTTTCCTAC (SEQ ID NO:32)

CSF1PO 3' AGACTCTTCCACACACCACTGGCCATCTTCAGC (SEQ ID NO:33)

D7S820 5' GAACACTTGTCATAGTTTAGAACGAACTAACG (SEQ ID NO:34)

D7S820 3' GAATTATAACGATTCCACATTTATCCTCATTGAC (SEQ ID NO:35)

D13S317 5' TTGCTGGACATGGTATCACAGAAGTCTGGGATG (SEQ ID NO:36)

D13S317 3' CCATAGGCAGCCCAAAAAGACAGACAGAAAGA (SEQ ID NO:37)

D16S539 5' AAACAAAGGCAGATCCCAAGCTCTTCCTCTTCC (SEQ ID NO:38)

D16S539 5' ATACCATTTACGTTTGTGTGTGCATCTGTAAGC (SEQ ID NO:39)

D18S51 5' GGTGGACATGTTGGCTTCTCTCTGTTCTTAAC (SEQ ID NO:40)

D18S51 3' GGTGGCACGTGCCTGTAGTCTCAGCTACTTGC (SEQ ID NO:41)

THO1 5' TACACAGGGCTTCCGGTGCAGGTCACAGGGA (SEQ ID NO:42)

THO1 3' CCTTCCCAGGCTCTAGCAGCAGCTCATGGTGG (SEQ ID NO:43)

TPOX 5' ACTGGCACAGAACAGGCACTTAGGGAACCC (SEQ ID NO:44)

TPOX 3' GGAGGAACTGGGAACCACACAGGTTAATTA (SEQ ID NO:45)

Experimento curso de tiempo:

APOB600 GCTCACTGTTCTGCATCTGGTCAATGGTTCTG (SEQ ID NO:46)

APOB300REV CTATCCAAGATTGGGCTAAACGTATGAAAGCA (SEQ ID NO:47)

Experimento de oligonucleótidos más cortos:

APOB500 ATGGTAAATTCTGGTGTGGAAAACCTGGATGG (SEQ ID NO:48)

APO500-28 TAAATTCTGGTGTGGAAAACCTGGATGG (SEQ ID NO:49)

APO500-25 ATTCTGGTGTGGAAAACCTGGATGG (SEQ ID NO:50)

APOB300REV CTATCCAAGATTGGGCTAAACGTATGAAAGCA (SEQ ID NO:51)

APOB300REV-28 CCAAGATTGGGCTAAACGTATGAAAGCA (SEQ ID NO:52)

APOB300REV-25 AGATTGGGCTAAACGTATGAAAGCA (SEQ ID NO:53)

D18S51 5' GGTGGACATGTTGGCTTCTCTCTGTTCTTAAC (SEQ ID NO:54)

D18S51 5'-28 GACATGTTGGCTTCTCTCTGTTCTTAAC (SEQ ID NO:55)

D18S51 5'-25 ATGTTGGCTTCTCTCTGTTCTTAAC (SEQ ID NO:56)

D18S51 3' GGTGGCACGTGCCTGTAGTCTCAGCTACTTGC (SEQ ID NO:57)

D18S51 3'-28 GCACGTGCCTGTAGTCTCAGCTACTTGC (SEQ ID NO:58)

D18S51 3'-25 CGTGCCTGTAGTCTCAGCTACTTGC (SEQ ID NO:59)

SRY3 AAAGCTGTAACTCTAAGTATCAGTGTGAAAC (SEQ ID NO:60)

SRY3-28 GCTGTAACTCTAAGTATCAGTGTGAAAC (SEQ ID NO:61)

SRY3-25 GTAACTCTAAGTATCAGTGTGAAAC (SEQ ID NO:62)

SRY4 GTTGTCCAGTTGCACTTCGCTGCAGAGTACC (SEQ ID NO:63)

SRY4-28 GTCCAGTTGCACTTCGCTGCAGAGTACC (SEQ ID NO:64)

SRY4-25 CAGTTGCACTTCGCTGCAGAGTACC (SEQ ID NO:65)

Las condiciones de las reacciones de RPA estándar incluyeron: Tris 50 mM, pH 8.4, acetato de potasio 80 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 1 mM, compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20 M), ATP 3 mM, fosfocreatina 20 mM, 100 ng/µl Creatina quinasa, 600 ng/µl de gp32; 109 ng/µl, o 125 ng/µl, o 200 ng/µl de uvsX; 16 ng/µl, o 25 ng/µl, o 40 ng/µl, o 60 ng/µl uvsY; 20 ng/µl de polimerasa Bsu, 200 µM de dNTP y 300 nM de cada oligonucleótido. Las condiciones de reacción C1-C4 son las anteriores con: C1 = 109 ng/µl uvsX, 16 ng/µl usvY; C2 = 125 ng/µl uvsX, 25 ng/µl uvsY; C3 = 200 ng/µl uvsX, 40 ng/µl uvsY; C4 = 200 ng/ml uvsX, 60 ng/µl uvsY.

Resultados experimentales

La figura 37 muestra una representación esquemática del método de RPA. En la Figura 37A(i), la proteína Recombinasa uvsX se une de manera cooperativa a oligonucleótidos de cadena sencilla en presencia de ATP. Los filamentos de nucleoproteínas hidrolizan activamente ATP a ADP. El desensamblaje espontáneo puede llevar a la unión competitiva de la proteína de unión de cadena sencilla gp32, lo que se disuade y se recarga con la ayuda de la proteína uvsY y el polietilenglicol. En la Figura 37A(ii), los filamentos de recombinasa catalizan el intercambio de cadenas si se detecta ADN homólogo. En la Figura 37A(iii), el intercambio de cadenas combina la cadena de búsqueda con su complemento y desplaza una cadena a continuación, unida por gp32. La recombinasa se desmonta. En la Figura 37A(iv), las polimerasas acceden a la estructura y extienden el oligonucleótido, desplazando más de la cadena original. En la Figura 37B(i), dos complejos de nucleoproteínas de direccionamiento opuestos se recombinan con sus dianas respectivas y se inicia la síntesis de ADN. En la Figura 37B(ii), los complejos de polimerasa se encuentran entre sí y una de las polimerasas se disocia. En la Figura 37B(iii), la polimerasa restante continúa la síntesis liberando las dos cadenas parentales, una polimerasa se vuelve a unir al extremo 3' libre, por lo que se produce la replicación de ambas cadenas. En la Figura 37B(iv), se producen nuevos eventos de segmentación. En la segunda ronda, un cebador de orientación desplazará un extremo libre. En la Figura 37C, comparación de los productos de intercambio de cadena en un extremo de ADN o en una secuencia de ADN incrustada.

La Figura 38A muestra los resultados de la amplificación de marcadores STR de dos individuos (1 y 2, padre e hijo) utilizando pares de cebadores para siete marcadores independientes. Se emplearon las condiciones RPA C4 (véase arriba). La Figura 38B muestra la titulación de los componentes de la reacción para determinar las concentraciones que soportan la amplificación *in vitro*. Las reacciones incluyeron los cebadores SRY3 y SRY4 a 0.3 µM (dirigidos al gen SRY), acetato de potasio 80 mM, TrisCl 50 mM, pH 8.4, DTT 2 mM, 5% Carbowax-20M, 200 ng/µl uvsX, 60 ng/µl uvsY, 600 ng/µl de gp32, 20 ng/µl de polimerasa Bsu y 50 copias/µl de ADN cromosómico Y, excepto cuando un componente dado estaba en investigación. Se determinaron las cantidades óptimas de gp32, ATP, uvsX, uvsY, PEG y Bsu polimerasa para la amplificación efectiva de este producto en particular. ATP-γ-S y ADP-β-S inhibieron las reacciones.

La Figura 39A muestra los límites de tamaño de las reacciones de RPA. El cebador ApoB4 se combinó con cebadores opuestos capaces de generar productos amplificados de los tamaños indicados. Se emplearon condiciones de 125 ng/µl de uvsX y 25 ng/µl de uvsY (C2), excepto en el caso de que se usaron 109 ng/µl de uvsX y 16 ng/µl de uvsY; se utilizaron 15 copias/µl de ADN humano (30 µl de reacciones). En las condiciones C2, se produjo algo de duplicación del producto mediado por la horquilla convirtiendo parte del amplicón de 300 pb en 2x y 3x de longitud unitaria (*) (L. D. Harris, J. D. Griffith, J Mol Biol 206, 19-27 (5 de marzo de 1989)).

La Figura 39B muestra las eficiencias de alargamiento de secuencias integradas o finales. Se incubó un cebador biotinilado con ADN de plasma linealizado. Se utilizaron cantidades iguales (20 nM final) de plantillas linealizadas con ClaI (carril 3) o EcoRV (carriles 1 y 2), el cebador se superpuso al extremo cortado o el sitio diana se incrustó (carril 3). La incubación con componentes dirigidos a la recombinasa con (carriles 2 y 3) o sin (carril 1) Klenow revela un alargamiento limitado del sitio integrado (producto 1*) y un alargamiento abundante del sitio final (producto 2*). Los productos sometidos a electroforesis se transfirieron a nylon y se detectó biotina por quimioluminiscencia. La banda común débil (~300 pb, carriles 1 y 3) fue un artefacto que surge de este protocolo en particular.

La figura 39C muestra la sensibilidad de las reacciones de RPA. El número de copias indicado de los genomas de subtilis se amplificó con los oligonucleótidos BsA1 y BsB3, que amplifican un fragmento de 200 pb. Se emplearon las condiciones C1. La Figura 39D muestra el ADN humano del número de copia indicado amplificado con los cebadores ApoB4 y Apo300 para generar un fragmento de 300 pb. Se emplearon condiciones C2. La Figura 39E, F muestra los resultados del ADN humano de individuos individuales. El ADN se diluyó y las muestras que contenían teóricamente el número de copias indicado se amplificaron con los cebadores D18S51 5' y 3' que amplifican un STR de tamaño ~300-360 pb. A los números de copia predichos de 2 o 3, varias muestras amplificaron los alelos únicos (*). Las condiciones empleadas fueron C2 en (E) y C4 en (F).

La figura 40 muestra la especificidad de las reacciones de RPA. Los cebadores BsA3 y BsB3, que amplifican un fragmento de 380 pb del ADN genómico de B. subtilis, se incubaron con 1 µg de ADN humano, con (+) o sin (-) adición de 100 copias de ADN de B. subtilis (Figura 40A). Un asterisco indica la posición del producto de reacción esperado, y una flecha indica la posición del ADN genómico. Se emplearon las condiciones C3. Para investigar el tiempo que tarda RPA en generar productos de reacción detectables, se establecieron una serie de reacciones de amplificación con los oligonucleótidos Apo600bio y Apo300rev generando un fragmento de 345 pb. Se utilizó un número de copias de 60 copias/µl (Figura 40B) o 6 copias/µl (Figura 40C). Las reacciones individuales se detuvieron en el número indicado de minutos y se analizaron en un gel. Se emplearon las condiciones C4 (Figura 40D).

Para el almacenamiento a largo plazo de los componentes de la reacción se liofilizaron las reacciones de RPA. Las mezclas de componentes de reacción se ensamblaron en ausencia de los componentes indicados, PEG y regulador. El material se liofilizó y luego se reconstituyó con PEG y regulador más los componentes adicionales omitidos. Se indican los cebadores utilizados. Todos los componentes, aparte de PEG y el regulador, podrían liofilizarse y reconstituirse con éxito en una reacción funcional. El ADN objetivo era ADN genómico masculino humano a 150 copias/µl (Figura 40E). Los oligonucleótidos que se dirigían a tres loci independientes en el ADN genómico humano se incubaron con pares de cebadores superpuestos de 25, 28 o 32 bases, según se indica. Sólo los cebadores de 32

bases de longitud amplificaron con éxito las dianas. Otros experimentos muestran que los cebadores de 30 residuos también son efectivos para amplificar ADN diana.

La Figura 41 muestra el ruido del cebador en el número de copia objetivo bajo.

Dos cebadores, BsA1 y BsB3 (BsA1 - 5'TTGGGCACTTGGATATGATGGAACTGGCAC3' (SEQ ID NO: 29), BsB3 - 5'CCATCTTCAGAGAACGCTTTAACAGCAATCC3' (SEQ ID NO: 30) Se incubaron con ADN genómico de B. subtilis diluido en serie con agua. Las condiciones utilizadas fueron acetato de potasio 80 mM, Tris.Cl 50 mM, pH 8.4, DTT 2 mM, Carbowax 20M al 5%, dNTPS 200 µM, ATP 3 mM, fosfocreatina 20 mM, creatina quinasa 50 ng/µl, 300 nM, oligonucleótido 800 g/µl gp32, 120 ng/µl, 25 ng/µl uvsY, y 28 ng/µl de polimerasa Bsu. La reacción se incubó durante 90 minutos a 37ºC. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 2.5% y se tiñeron con bromuro de etidio. Las flechas indican la posición esperada del amplicón correcto.

La Figura 42 detalla la selección de cebadores óptimos combinando una selección de cebadores directos e inversos candidatos y probando el resultado a densidades de copia de inicio muy bajas.

Se diseñaron varios pares de cebadores para secuencias en el locus de esporulación de Bacillus subtilis SpoOB. La posición y orientación de estos cebadores se indica en (B) de la siguiente manera:

J1	ACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG - SEQ ID NO:66
J2	ATAACCATTTCTTCAATCATTTCAAAGACACGGTC - SEQ ID NO:67
K1	TATAGACGCAAAGCACGAATCAAAGCTCTCAAACC - SEQ ID NO:68
K2	CCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATAT - SEQ ID NO:69
L1	ATATGAAGTTCTCGGAGAAATTAAGGATTTGTCGG - SEQ ID NO:70
L2	AATCAGCTGTCTGTCAGGATGATCCGTTTGAAGCG - SEQ ID NO:71
NEST1	CATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG - SEQ ID NO: 72
NEST2	ACAGATGAAACAGCTTTCTCATCAGTTTCG - SEQ ID NO:73.

Estos cebadores se combinaron como se indica en (A) y se incubaron durante 90 minutos en las siguientes condiciones: acetato de potasio 80 mM, Tris.Cl 50 mM, pH 8.4, DTT 2 mM, carbowax 20%, dNTPS 200 µM, ATP 3 mM, fosfocreatina 20 mM, 50 ng/µl de creatina quinasa, 300 nM de cada oligonucleótido, 800 ng/µl de gp32, 120 ng/µl de uvsX, 25 ng/µl de uvsY y 28 ng/µl de polimerasa Bsu, 2 copias/µl de ADN genómico de B.subtilis (estimado por dilución serial), 37°C . Las flechas indicaron la posición de los productos determinada como el fragmento esperado en función del tamaño. Algunos pares de imprimaciones dan producto, pero fue acompañado de manchas, o algunas bandas adicionales. Unas pocas combinaciones no dan producto del tamaño esperado. Los cebadores J1 y K2 dan una cantidad significativa del producto del tamaño esperado, y bastante limpio. Es interesante que cuando el cebador NEST1, que carece de las 4 bases 5' más presentes en J1, reemplaza a J1 en la reacción equivalente, la reacción no mejora, lo que indica que la adición y la eliminación de bases pueden mejorar el rendimiento del cebador, incluso cuando todos los probados tienen más de 30 residuos de longitud.

La figura 43 muestra una consideración teórica de cómo se inicia el ruido del cebador.

(A) Se muestra un oligonucleótido, y encima hay una flecha, la cabeza indica el extremo 3' del oligonucleótido. La secuencia se generó arbitrariamente, aunque 4 de las 5 bases más 3' forman un palíndromo, lo que podría evitarse en la práctica. (B) Se supone que la mayoría de los eventos iniciales consisten en que el extremo 3' se doble transitoriamente en más secuencias 5' para formar de manera transitoria un par de bases de Watson-Crick. (C) Ocasionalmente, una polimerasa alarga con éxito esta estructura para dar una horquilla de doble cadena larga con un giro en un extremo (etiquetado como H). La secuencia y la dirección 5'-3'del complemento inverso del original se indican mediante una flecha pálida. (D) En la estrategia 1, se supone que un segundo oligonucleótido recubierto con recombinasa de secuencia idéntica se dirige al cuerpo homólogo de doble cadena de la horquilla, por lo que se desenreda. Los desajustes se producen en la región 3' del oligonucleótido invasor porque el complemento de esta sección no se generó correctamente en el paso C. Si no se hubiera generado de forma fortuita un palíndromo de 4 pares de bases, los desajustes serían aún más graves de lo que se muestra aquí. (E) Una polimerasa, muy ocasionalmente, puede extender la región 3' no coincidente de este intermedio para generar una repetición invertida con desajustes en el medio. Esta estructura también se asemejaría al producto si dos cebadores idénticos hubieran formado un breve solapamiento en 3', dando como resultado la formación de un dímero de cebador. Estas estructuras

no pueden entrar fácilmente en la amplificación de fase geométrica. (F) En la estrategia 2, la horquilla larga formada en (C) se descomprime brevemente en un extremo. Este paso podría mejorarse mediante la unión de recombinasa a ADNds porque algunos informes indican que recA puede unirse a ADNds y promover la fusión de dúplex cortos. (G) El extremo 3' fundido de forma transitoria (complemento inverso al extremo 5' original del oligonucleótido) se repliega de manera similar a (B) y forma una estructura capaz de alargarse. (H) La elongación de la polimerasa crea una gran horquilla. En este caso, un extremo contiene una secuencia dúplex idéntica al oligonucleótido principal. (I) Otro oligonucleótido padre invade el objetivo dúplex perfecto. (J) La elongación de la polimerasa de (I) genera una gran repetición invertida con la estructura indicada. Ambos extremos contienen sitios objetivo de cebador perfecto y, por lo tanto, esta estructura se puede amplificar exponencialmente. Curiosamente, la estructura de repetición invertida significa que, si se produce una invasión y el alargamiento desde un extremo, la cadena desplazada tenderá rápidamente a plegarse sobre sí misma para formar la estructura que se muestra en (H). Este producto requerirá otro evento de recombinación para convertirse en estructura (J) y, por lo tanto, puede ser que una mayor actividad de recombinación beneficie particularmente la amplificación de ruido, y se vea fuertemente impedida por una menor actividad de recombinación.

La Figura 44 muestra varias estrategias de diseño de oligonucleótidos para mejorar la señal al ruido en reacciones RPA

Se muestran tres estrategias generales para mejorar las relaciones de señal a ruido en reacciones RPA por facetas de diseño de oligonucleótidos. (1) Pueden analizarse oligonucleótidos acortados progresivamente. El supuesto es que el acortamiento de un oligonucleótido progresivamente desde el extremo 5' conduce a una caída en la actividad del filamento de nucleoproteína respectivo, y que esto influye en el tiempo de duplicación de artefactos ruidosos más rápidamente que el objetivo. Los filamentos de nucleoproteínas de baja actividad también pueden combinarse eficazmente con los más activos en algunos casos. (2) Los ácidos nucleicos bloqueados, u otros azúcares modificados, pueden incluirse en los cebadores con el consiguiente efecto sobre el comportamiento de amplificación. Se indica la estructura de un azúcar de ácido nucleico bloqueado (LNA). (3) El comportamiento de los oligonucleótidos puede mejorarse mediante la adición de residuos 5', posiblemente no relacionados con el objetivo, que suprimen el ruido a través de mecanismos tales como la disuasión del cebado retroajuste, o alterando la actividad de recombinación de las nucleoproteínas. Las secuencias pueden ser estiramientos de homopolímero, o de otra manera. Las secuencias ideales pueden determinarse empíricamente.

La Figura 45 muestra las consecuencias de reducir la longitud del cebador.

(A) Descripción esquemática del diseño experimental. Se sintetizaron pares de oligonucleótidos en tres dianas humanas, y se hicieron conjuntos de cebadores en los que los residuos más en 5' fueron eliminados progresivamente (los cebadores de longitud completa se han descrito anteriormente: D18S51 5' GGTGGACATGTTGGCTTCTCTCTTCTTCAC (SEQ ID NO: 54), D18S51 3' GGTGGCACGTGCCTGTAGTCTCAGCTACTTGC (SEQ ID NO: 57), Sry3 5' AAAGCTGTAACTCTAAGTATCAGTGTGAAAC 3' (SEQ ID NO: 27), SRY4 5' GTTGTCCAGTTGCACTTCGCTGCAGAGTACC 3' (SEQ ID NO: 28), APOB500 ATGGTAAATTCTGGTGTGGAAAACCTGGATGG (SEQ ID NO: 48), APOB300REV CTATCCAAGATTGGGCTAAACGTATGAAAGCA (SEQ ID NO: 51). Se hicieron cebadores más cortos eliminando las bases más 5' para dar la longitud final indicada). Los pares de cebadores de longitud idéntica se combinaron en reacciones de amplificación en la forma indicada. (B) Las reacciones de amplificación se realizaron en el ADN genómico humano, presente en la reacción de inicio a 50 copias/µl. Las tres dianas, un marcador STR D18S51II, parte del gen SRY humano, y el locus de la apolipoproteína B humana, se amplificaron con pares de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se truncaron progresivamente desde el extremo 5' de la manera descrita en (A), y la longitud de ambos cebadores en los pares de cebadores utilizados se indica sobre la línea respectiva. Es evidente que hay una caída bastante precipitada en el comportamiento de la amplificación a medida que los oligonucleótidos se acortan desde poco más de 30 residuos. En consecuencia, es probable que la comparación de oligonucleótidos con una variación en la longitud de poco más de apenas 30 residuos revele una longitud óptima para obtener una amplificación específica suficiente, pero muy poco o ningún fondo. Por ejemplo, dos 29-meros fueron suficientes para amplificar el locus D18S51 II, y hacerlo de manera limpia. Las condiciones de amplificación fueron: Tris.Cl 50 mM, pH 8.3, acetato de magnesio 90 mM, DTT 2 mM, acetato de potasio 80 mM, dNTP 200 mM, 600 ng/µl gp32, 200 ng/µl uvsX, 60 ng/µl uvsY, 300 nM cebadores, 20 ng/µl de polimerasa Bsu, 50 copias/µl de ADN genómico, 90 minutos a 37°C.

La Figura 46 muestra cómo un residuo de LNA 3' altera el comportamiento de amplificación en RPA

La amplificación de una parte del locus ACE humano se muestra utilizando una combinación de oligonucleótidos regulares y contrapartes en la que el resto más 3' tiene un azúcar LNA. (A) Representación esquemática de la relación de los cebadores oligonucleotídicos entre sí. LNA1 y DNA1 son idénticos, excepto que LNA1 contiene un azúcar LNA en la posición máxima 3'. Del mismo modo, LNA2 y ADN2 difieren de manera similar. (la secuencia de LNA/DNA1 es: GCTCCTTGGACTGGTAGATGTCACACTTGTG - SEQ ID 74, la secuencia de LNA/DNA2 es GCCTTGGCTCTGCTGTGCGCATGTGACTTAGC - SEQ ID 75). (B) Las reacciones de RPA se ensamblaron con las combinaciones de cebadores oligonucleotídicos indicadas. Los niveles del producto se reducen significativamente cuando ambos oligonucleótidos contienen un LNA 3' en condiciones de reacción estándar. Sin embargo, la sustitución de un solo oligonucleótido no suprime la reacción demasiado (carriles 2 y 3). Téngase en cuenta que el patrón de

fondo en el carril 3 se asemeja al del carril 4, mientras que en el 2 está prácticamente ausente. Esto sugiere que el fondo se deriva principalmente de las actividades de una sola especie de cebador. Las condiciones de amplificación fueron: Tris.Cl 50 mM pH 8.3, acetato de magnesio 90 mM, DTT 2 mM, acetato de potasio 80 mM, dNTP 200 mM, 800 ng/µl gp32, 200 ng/µl uvsX, 60 ng/µl uvsY, 300 nM cebadores, 20 ng/µl de polimerasa Bsu, 50 copias/µl de ADN genómico, 120 minutos a 37°C. (C) El aumento de los niveles de polimerasa da como resultado la restauración de una actividad robusta cuando se usan dos oligonucleótidos modificados con LNA. LNA1 y LNA2, o DNA1 y DNA2, se combinaron en presencia de las concentraciones indicadas de polimerasa. En particular, los cebadores de ADN mostraron una alta actividad a la concentración más baja utilizada y, en todo caso, los productos parecían menos buenos que la concentración de polimerasa. Productos cortos, 50-100 pares de bases, también se ven notablemente. A la inversa, los cebadores de LNA solo eran óptimamente activos a concentraciones más altas de polimerasa. Se vieron menos productos pequeños, y los que se ven con excepción del tamaño esperado probablemente estén relacionados con el producto (véase más abajo). Las condiciones de amplificación fueron: Tris.Cl 50 mM, pH 8.3, acetato de magnesio 90 mM, DTT 2 mM, acetato de potasio 80 mM, dNTP 200 mM, 800 ng/µl gp32, 200 ng/µl uvsX, 60 ng/µl uvsY, 300 nM cebadores, 43 a 1400 ng/µl de polimerasas Bsu. , 100 copias/µl de ADN genómico, 120 minutos a 37°C. (D) Los oligonucleótidos modificados con LNA proporcionan poco fondo, si es que los hay, cuando no hay un objetivo presente, pero amplifican eficientemente el producto genuino a niveles altos cuando las condiciones de reacción están optimizadas. Se empleó una concentración de polimerasa de 200 ng/µl de polimerasa Bsu. Las reacciones se llevaron a cabo con pares de cebadores de ADN, o pares de cebadores de LNA, en presencia o ausencia de diana. Se encontró una banda débil del tamaño esperado en los controles negativos que indicaban un problema de contaminación. Sin embargo, ambos pares de cebadores se amplificaron de manera eficiente en presencia del objetivo, pero en su ausencia el par de ADN produjo un frotis ruidoso significativo, mientras que el par de LNA no dio ningún otro producto que la ligera contaminación. Esto indica que el par de cebadores de LNA puede ser capaz de distinguir limpiamente entre la presencia y la ausencia del objetivo en la muestra, mientras que los cebadores de ADN generan productos derivados del cebador en ausencia del objetivo. Las condiciones de amplificación fueron: Tris.Cl 50 mM pH 8.3, acetato de magnesio 90 mM, DTT 2 mM, acetato de potasio 80 mM, dNTP 200 mM, 800 ng/µl gp32, 200 ng/µl uvsX, 60 ng/µl uvsY, 300 nM cebadores, 200 ng/µl de polimerasa Bsu, 50 copias/µl de ADN genómico, 120 minutos a 37°C.

La Figura 47 muestra que agregar estiramientos homopoliméricos a los extremos 5' de los cebadores puede alterar la actividad de las nucleoproteínas.

(A) Se muestra la secuencia de seis oligonucleótidos utilizados en el experimento. El oligonucleótido J1 y K2 se dirigen al locus SpoOB de B. subtilis (SEQ ID 66 y 69 respectivamente), y los otros oligonucleótidos listados son derivados de ellos, que llevan un tramo homopolimérico de citosinas, o guanosinas como se indica. Estos oligonucleótidos pueden incubarse por pares para evaluar qué par amplifica más eficazmente el objetivo.

(B) Se muestran los resultados de incubar los seis cebadores solos, o en todas las combinaciones posibles. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 2 horas. Las condiciones de reacción fueron Tris.Cl 50 mM, pH 8.4, DTT 2 mM, Carbowax 20M al 5%, acetato potásico 80 mM, dNTPS 200 µM, ATP 3 mM, fosfocreatina 20 mM, creatina quinasa 50 ng/µl, 300 nM cada oligonucleótido relevante, 800 ng/µl gp32, 120 g/min uvsX, 25 ng/µl uvsY, y 28 ng/µl de polimerasa Bsu, ~1 copia/µl de ADN genómico de B. subtilis (estimado por dilución en serie) (20 µl de volumen de reacción). Los pares de cebadores óptimos fueron J1+K2, y luego J1C+K2C. En general, un tramo homopolimérico de citosina parece hacer que los filamentos de nucleoproteínas sean más activos, y un estiramiento de guanosina menos activo.

La Figura 48 muestra los efectos de la betaína sobre las reacciones de RPA.

Se establecieron reacciones de RPA en las que estaba presente una concentración creciente de betaína en cada reacción. La concentración de betaína de 0.5 M, o mayor, en este experimento redujo el grado de amplificación. A 0.75 M, la banda esperada del producto todavía era claramente visible, sin embargo, se había evitado la mayor parte del frotis presente en algunas muestras. Se cree que la reducción en el frotis supera con creces la reducción en el producto consistente con la posibilidad de que se puedan emplear niveles de betaína que mejoren las relaciones de señal a ruido. Las condiciones de amplificación fueron: Tris.Cl 50 mM pH 8.3, acetato de magnesio 90 mM, DTT 2 mM, acetato de potasio 80 mM, dNTP 200 mM, 600 ng/µl de gp32, 200 ng/µl de uvsX, 60 ng/µl de uvsY, 300 nM de cebadores ApoB4 y Apo300 (IDs de SEG 20 y 21), 40 ng/µl de polimerasa Bsu, 2.5 copias/µl de ADN genómico, 120 minutos a 37°C.

La Figura 49 muestra estrategias de combinación que involucran oligonucleótidos con diferentes actividades de nucleoproteínas.

A) Se resumen las estrategias de anidación de una sola reacción. Un par externo de filamentos de nucleoproteínas activos amplifica rápidamente el ADN, aunque estos cebadores también pueden ser bastante ruidosos. El par de cebadores externos se puede mantener a una concentración relativamente baja, lo suficientemente baja como para no poder alcanzar niveles de producto detectables en gel. Los oligonucleótidos internos son menos activos, pero mucho más limpios. Estos oligonucleótidos internos se mantienen en niveles altos. La actividad puede ajustarse modificando la longitud, la composición y el carácter de la red troncal como se detalla en esta descripción. Los cebadores externos enriquecen rápidamente el objetivo en la muestra, por ejemplo, a través de una amplificación de

un millón de veces. Los cebadores internos, al ser lentos pero limpios, generan poco/ningún ruido, pero son menos sensibles. El enriquecimiento del objetivo por los cebadores externos es suficiente para permitir una acumulación robusta del producto por acción de los cebadores internos lentos en un período de tiempo apropiado. (B) Se muestran esquemas de amplificación en los que un cebador activo se combina con un cebador menos activo. Si bien el cebador activo puede participar en el ruido a bajas concentraciones del objetivo, el oligonucleótido más lento no se involucra en artefactos, por lo que si se prueba la asociación de los cebadores al final de la reacción, esto puede determinar claramente si la diana estaba presente o ausente en la muestra.

La Figura 50 describe varios protocolos de detección. Se muestran esquemáticamente tres estrategias simples mediante las cuales se podría evaluar la amplificación de un objetivo sin necesidad de electroforesis en gel. En todos los casos se utiliza un cebador que puede unirse a una fase sólida para permitir su separación de los reactivos en masa, y que se puede lavar. En la figura, un residuo de biotina en uno de los cebadores representa este cebador inmovilizable, sin embargo, se podrían usar otras químicas de unión. (1) Un cebador es inmovilizable, y el otro contiene una etiqueta de alguna descripción, por ejemplo, una enzima. (2) Uno de los cebadores de amplificación está marcado de alguna manera, y el cebador inmovilizable es un tercer cebador, que reconoce secuencias dentro de los amplicones principales. Este tercer cebador puede estar presente en el ambiente de reacción durante la amplificación principal, pero puede diseñarse, por ejemplo, para ser silencioso (por ejemplo, por ser corto), o podría agregarse solo al final de la reacción. (3) Se emplea un tercer cebador. En este caso, sin embargo, la sonda inmovilizable está relacionada con uno de los cebadores de amplificación, pero contiene residuos 5' adicionales que le permiten capturar de manera estable los amplicones al final de la reacción, como la extensión de la polimerasa del extremo 3' del complemento en el amplicón (es decir, la síntesis "de fondo") crea un dúplex estable que no está sujeto a la migración de la ramificación si las proteínas de reacción se eliminan por lavado.

La Figura 51 muestra una estrategia de enriquecimiento de la tercera sonda: Captura en perlas, Parte I. Esquema de la estrategia experimental en la que una tercera sonda enriquece los productos bona fide derivados del objetivo

(A) Representación esquemática de la relación entre los cebadores. Se indica un sitio de enzima de restricción PstI, ubicado en el medio de NEST3-28 (GGATGAATAAGCTGCAGCTGATTAAAGG - SEQ ID 76) y NEST3-26 (ATGAATAAGCTGCAGCTGATTAAAGG - SEQ ID 77) cebadores que son homólogos a una secuencia amplificada generada por el cebador J1 y K2 (SEQ IDs 66 y 69, respectivamente, arriba). (B) Ilustración de la inmovilización de una versión 5'-biotinilada de N3-26 que está unida a partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina. (C) Esquema para el experimento de captura. Se establece una reacción de amplificación en la que los oligonucleótidos J1 y K2 se combinan en fase de solución con el cebador N3-26 inmovilizado en una perla. La reacción se incuba durante 90 minutos, y cada 20 minutos las perlas se dispersan mediante un movimiento rápido (se asientan solo muy lentamente en la solución de reacción de PEG al 5%). Al final del período de incubación, las perlas se concentran utilizando un imán y el sobrenadante se elimina para su análisis. Las perlas se lavan dos veces rápidamente con agua y luego se incuban durante 30 minutos a 37°C con un exceso de enzima PstI en un regulador apropiado. Una vez más el sobrenadante es eliminado y analizado.

La Figura 52 muestra una estrategia de enriquecimiento de la tercera sonda: Captura en perlas II. Resultados experimentales que demuestran que un filamento de nucleoproteínas de baja actividad inmovilizado en un soporte sólido puede participar como tercer cebador y separar los amplicones objetivo del ruido del cebador.

(A) Representación esquemática de la relación entre los cebadores. Se indica un sitio de enzima de restricción PstI, ubicado en el medio de los cebadores N3-28 y N3-26. (B) La amplificación del ADN de B. subtilis se realizó en presencia (panel inferior) o ausencia (panel superior) del ADN objetivo a 2 copias/µl. Carril 1 contiene escalera de tamaño. Los cebadores J1 y K2 amplifican eficazmente su objetivo en presencia de pocas copias de ADN genómico objetivo (panel inferior, carril 2), sin embargo, en ausencia de objetivo en la muestra, se genera un borrón como se evidencia en el carril superior del panel 2. Oligonucleótidos N3 -28 y N3-26 son homólogos a secuencias ligeramente 3', y en el mismo sentido, a J1. N3-28 es un 28-mer, y N3-26 es un 26-mero que carece de las dos bases más 5' de N3-28. La coincubación de N3-28 o N3-26 con los cebadores J1 y K2 da como resultado la generación de dos productos principales correspondientes al producto J1/K2, y el producto N3-28/K2 o N3-26/K2 esperado (panel inferior, carriles 3 y 4). Cuando el N3-28 se incuba solo, genera cierto borrón, pero el N3-26 incubado solo no lo hace. Se deduce que N3-26 es un olignucleótido "silencioso" y puede depender significativamente de la hibridación de las cadenas desplazadas por el alargamiento de los cebadores más activos para generar productos. (C) Los resultados de un experimento llevado a cabo según se detalla esquemáticamente en la Figura 51, y utilizando una densidad objetivo inicial de 30 copias/µl. Carril 1, marcador de tamaño. Carriles 2 y 3, productos de una reacción en fase completamente líquida (sin inmovilización de N3-26) ejecutada sin (carril 2) o con objetivo (carril 3). Esto es efectivamente equivalente a los carriles 4 de los paneles superior e inferior de (A). Los carriles 4 y 5 contienen el primer sobrenadante eliminado después de la incubación de la amplificación, sin y con el objetivo, respectivamente. Como es de esperar, hay un producto en la reacción que contiene el objetivo, y no se ve el producto más pequeño derivado del uso del cebador N3-26 (inmovilizado en la cuenta). También hay un frotis, como se esperaba, en la muestra sin objetivo. Los carriles 6 y 7 contienen el sobrenadante después de la digestión con PstI de las perlas lavadas. Es interesante que el frotis en la muestra no objetivo no está presente, sin embargo, en la muestra objetivo hay ADN. Los productos liberados de las perlas parecen comprender el producto N3-26/K2 esperado, una movilidad ligeramente más rápida que en el carril 3 debido al recorte por PstI, así como el producto J1/K2 sin cortar que se ha purificado conjuntamente. Quizás no sorprenda que algunos productos de J1/K2 se purifiquen conjuntamente porque los híbridos

pueden haberse formado entre dichos productos y los productos y oligonucleótidos inmovilizados con perlas. Sin embargo, es sorprendente que este material no haya sido cortado aparentemente por la enzima PstI. El motivo de esta observación extraña no se conoce, pero podría indicar que estos productos estaban presentes en híbridos que eran resistentes a la digestión, o que provocaron el corte de una sola cadena de estos productos.

La Figura 53 muestra que la trehalosa estabiliza los liofilizados para permitir que todos los componentes, excepto la muestra regulada, permanezcan activos durante al menos 10 días a temperatura ambiente.

Las reacciones de RPA se ensamblaron usando cebadores específicos para el locus de la apolipoproteína B humana. En general, la composición de la reacción final fue Tris.Cl 55 mM, pH 8.4, DTT 1 mM, acetato de potasio 80 mM, Carbowax 20M al 5%, dNTPS 200 µM, ATP 3 mM, fosfocreatina 20 mM, creatinquinasa 100 ng/µl, oligonucleótido ApoB4 y Apo300 300 mM (SEQ ID 20 y 21 respectivamente), 600 ng/µl de gp32, 200 ng/µl de uvsX, 60 ng/µl de uvsY y 17 ng/µl de polimerasa Bsu, cop160 copias/µl de ADN genómico humano. Sin embargo, el Tris.Cl 55 mM, pH 8.4 y el acetato potásico 80 mM no se incluyeron en el liofilizado, pero se agregaron nuevamente con la muestra de ADN durante la reconstitución. Además, ciertos componentes también se omitieron de los liofilizados que se detallan a continuación. Condición A, no se usó trehalosa, se agregó Carbowax con muestra de ADN (no en liofilizado), se agregó polimerasa con muestra de ADN. Condición B, 50 mM de trehalosa incluida en el liofilizado, se agregó Carbowax con la muestra de ADN, la polimerasa se agregó con la muestra de ADN. Condición C, trehalosa 50 mM en liofilizado, polimerasa agregada con la muestra. Condición D, trehalosa 50 mM en liofilizado, solo se agregó ADN de muestra regulada para la reconstitución. Después de 3, 6 o 10 días de almacenamiento en el banco a temperatura ambiente, y sin condiciones especiales de almacenamiento (por ejemplo, uso de desecantes, etc.), se evaluó la actividad de los liofilizados agregando los reactivos faltantes al sedimento seco en un volumen final de 50 µl. La condición de reacción D en cada caso carecía solo de la muestra de ADN en el regulador de reacción (Tris.Cl 55 mM y acetato de potasio 80 mM). Solo si la trehalosa estaba presente en el liofilizado las reacciones eran estables, pero en esos casos las reacciones permanecieron estables durante al menos 10 días. Los períodos más largos no se investigaron debido a que el material de prueba se agotó, pero puede ser posible.

Ejemplo 14: Las reacciones de RPA se pueden monitorizar en tiempo real para permitir la evaluación del número de copias diana de inicio

La Figura 54 muestra cómo se evaluaron los colorantes fluorescentes SYBR dorado y SYBR verde para determinar su compatibilidad en reacciones RPA y sus propiedades de control de reacción. (A) Disposición de los cebadores ApoB4 y Apo300 (SEQ ID 20 y 21 respectivamente) que flanquean un fragmento del locus B de la apolipoproteína humana. (B) SYBR dorado puede incluirse en reacciones de RPA a diluciones de 1: 50.000 o más sin la inhibición completa de la reacción. Las reacciones estaban compuestas de Tris 50 Mm, pH 8.4, acetato de potasio 80 mM, dATP de 200 µM, dCTP, dGTP y dTTP, 50 ng/µl de creatina quinasa, ATP de 1.5 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT de 2 mM, fosfocreatina 30 mM, cebo ApoB4 300 m, cebo 300 mM cebador, 5% Carbowax 20M, 360 ng/µl gp32, 86 ng/µl uvsX, 15 ng/µl uvsY, 35 ng/µl de polimerasa Bsu. SYBR dorado a la dilución indicada se incluyó en la reacción. (C) Las reacciones de RPA se establecieron en una placa de 96 pozos, cada una con un volumen final de 50 µl. Se estableció una mezcla maestra de componentes que carecen solo del ADN objetivo y el colorante de SYBR dorado en el hielo. Se probaron cinco diluciones diferentes de SYBR dorado, con diluciones finales de la solución madre de 1:50.000, 1:60.000, 1:70.000, 1:80.000 y 1:100.000. Para cada dilución, se investigaron las densidades de copia diana de inicio de 2 y 20 copias por microlitro (ADN genómico humano diluido en TE hasta la densidad de copia esperada). Una vez que las reacciones se habían mezclado completamente en hielo, la placa se transfirió a la placa precalentada (37°C) de un lector de microplacas fluorescente BIO-TEK FLX 800. Las lecturas se recolectaron cada 1 minuto, y se usaron 300 ng de ADN genómico humano diluido en 50 µl de agua como estándar de sensibilidad para el dispositivo. Los datos se transfirieron a Microsoft Excel y la fluorescencia relativa (arbitraria) se representó en función del tiempo de incubación para cada reacción. (D) Se estableció un experimento como en (C) excepto que se analizó SYBR verde en lugar de SYBR dorado.

La Figura 55 muestra que RPA en tiempo real demuestra un comportamiento cuantitativo en cuatro órdenes de magnitud utilizando SYBR verde. Figura 55 (A) Arreglo de los cebadores utilizados en este análisis. (B) Las reacciones de RPA se establecieron en placas de micropozos de 96 pozos, con un volumen final de 50 µl por volumen de reacción, usando cebadores específicos o el locus Sp1OB J1 y K2 de B.subtilis (J1 - 5'-ACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG-3' SEQ ID 66, K2 - 5'-CCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC-3' SEQ ID 69). Un número definido de copias de ADN genómico de Bacillus subtilis se pipetearon en pozos en la placa de 96 pozos y se almacenaron en hielo. Una mezcla maestra de reacción se mezcló en hielo y luego se dividió en alícuotas en los pozos que contenían ADN y se mezcló bien. Las reacciones se transfirieron luego a la placa precalentada de un lector de microplacas fluorescente BIO-TEK FLX 800 (fijado a 38°C). La composición de la reacción fue Tris 50 mM, pH 8.4, acetato potásico 80 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, dATP 200 µM, dCTP, dGTP y dTTP, creatina quinasa 50 ng/µl, ATP 1.5 mM, fosfocreatina 30 mM, cebador BsJ1 300 m, 300 nM BsK2 cebador, 5% Carbowax 20M, 360 ng/µl gp32, 86 ng/µl uvsX, 15 ng/µl uvsY, 35 ng/µl de polimerasa Bsu y dilución 1:50.000 de la solución madre de DMSO de SYBR verde de sondas moleculares. Los resultados de dos experimentos equivalentes se muestran en (B) y (C). Una vez terminadas las reacciones, 7 µl de las reacciones se diluyeron con 1x de regulador de carga de sacarosa y se separaron en un gel de agarosa al 2% (D, E). Téngase en cuenta que cuando se utilizó la concentración más alta del objetivo, la fluorescencia se detectó lo más pronto posible, pero no mostró un aumento exponencial duradero. Esto puede surgir debido al consumo de

reactivos de reacción (se utilizó gp32 a concentraciones más bajas que las típicas en este experimento), o a una acumulación de inhibidores, o de otra manera. Experimentos posteriores sugieren que esto puede surgir debido a la subestimación de gp32/uvsX. Vea abajo. Además, existe cierta evidencia de contaminación del producto en (B) sugerida por la leve presencia de la banda esperada en el gel de análisis de punto final (D).

La figura 56 muestra que las reacciones de RPA pueden evaluar cinéticamente el número de copias de ADN genómico de B. subtilis de al menos 5 órdenes de magnitud. Las reacciones de RPA se establecieron utilizando los cebadores J1 y K2 de Bacillus subtilis como en la figura 55. Sin embargo, la cantidad de reactivos proteicos aumentó como sigue: se usó gp32 a 600 ng/µl, se usó uvsX a 140 ng/µl, se usó uvsY a 35 ng/µl, y el ATP estaba a 3 mM. Los volúmenes de reacción aumentaron a 100 µl de volumen final, y se utilizó un mayor rango de concentraciones de ADN genómico (de 0.1 a 100.000 copias/µl). No se observó ningún rastro temprano de muestras de mayor número de copias, y se cree que esto refleja que los experimentos anteriores tuvieron un poco subestimados gp32 y uvsX. Una vez terminadas las reacciones, 7 µl de las reacciones se diluyeron con 1x de regulador de carga de sacarosa y se separaron en un gel de agarosa al 2%.

La Figura 57 muestra que el RPA en tiempo real demuestra una respuesta cuantitativa a la variación en el número de copias del ADN genómico humano. Figura 57 (A) Disposición de los cebadores ApoB4 y Apo300 que amplifican una secuencia de ADN humano. (ApoB4 - 5'-CAGTGTATCTGGAAAGCCTACAGGACACCACAAAA3' SEQ ID 20, Apo300 - 5'-TGCTTTCATACGTTTAGCCCAATCTTGGATAG3' SEQ ID 21). (B) Las reacciones de RPA se establecieron en placas de micropozos de 96 pozos, con un volumen final de 100 µl por volumen de reacción. Un número definido de copias de ADN genómico humano se pipeteó en pozos en la placa de 96 pozos y se almacenó en hielo. Una mezcla maestra de reacción se mezcló en hielo y luego se dividió en alícuotas en los pozos que contenían ADN y se mezcló bien. Las reacciones se transfirieron luego a la placa precalentada del lector de microplacas fluorescentes BIOTEK FLX 800. La composición de la reacción fue Tris 50 mM, pH 8.4, acetato potásico 80 mM, acetato de magnesio 10 mM, DTT 2 mM, dATP 200 µM, dCTP, dGTP y dTTP, 50 ng/µl de creatina quinasa, 1.5 mM ATP, 30 mM fosfocreatina, 300 nM ApoB4 cebador, 300 nM ApoB4 cebador, 5% Carbowax 20M, 360 ng/µl gp32, 86 ng/µl uvsX, 15 ng/µl uvsY, 35 ng/µl de polimerasa Bsu y dilución 1:50.000 de la solución madre de DMSO de SYBR verde de sondas moleculares. Téngase en cuenta que, como en el Ejemplo 2 (C), la concentración más alta del objetivo generó una curva que se apagó inesperadamente antes. Al igual que en la Figura 55, estos experimentos se realizaron en condiciones de uvsX, uvsY, gp32, ATP y concentraciones de dNTP que pueden requerir una depuración para asegurar una fase exponencial robusta detectable en concentraciones objetivo más altas. Esto está respaldado por (C), en donde se realizó un experimento similar al de (B), excepto que las concentraciones de ciertos reactivos fueron las siguientes: se utilizó gp32 a 600 ng/µl, se utilizó uvsX a 140 ng/µl, se utilizó uvsY utilizado a 35 ng/µl, el ATP estaba a 3 mM. Una vez terminadas las reacciones, 7 µl de las reacciones se diluyeron con 1x de regulador de carga de sacarosa y se separaron en un gel de agarosa al 2%.

Ejemplo 15: Cebador asimétrico RPA que utiliza un cebador con límite de 3'LNA

Como ejemplo de amplificación de un ADN diana utilizando el método del cebador asimétrico RPA, las condiciones estándar de RPA se emplean con dos diferencias. Primero, un cebador es un cebador cubierto en 3'LNA. En segundo lugar, se usa una polimerasa adicional, phi29, que es incapaz de iniciar la síntesis a partir de intermedios de recombinasa.

Por lo tanto, las condiciones de amplificación son las siguientes:

Tris.Cl 50 mM pH 7.85

Acetato de magnesio 10 mM

Ditiotreitol 2 mM

Acetato de potasio 80 mM

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)

Fosfocreatina 15 mMATP 3 mM

dNTPs 200 µM

Creatinina quinasa 12 ng/µl

Oligonucleótido 1, cubierto en 3'LNA 0.3 µM

Oligonucleótido 2 0.3 µM350 ng/µl T4 gp32

100 ng/µl T4 uvsX

20 ng/µl T4 uvsY

20 ng/µl de polimerasa Bsu

20 ng/µl de polimerasa phi29 (exo o exo-atenuada)

Incubación a 33-40°C durante 30 minutos a 2 horas.

Ejemplo 16: Iniciación de RPA en tiempo real con desprotección de ATP enjaulado

Como ejemplo del uso de RPA pulsada con ATP para cuantificar las reacciones de ADN de la plantilla de entrada se ensamblan como reacciones estándar de RPA con varias diferencias. En primer lugar, se utiliza ATP enjaulado en lugar de ATP. En segundo lugar, se utiliza un reactivo de detección de ADN de doble cadena, SYBR verde, para cuantificar los productos RPA. Los cebadores están diseñados de tal manera que se generan productos de reacción cortos (<200 pb), para garantizar una síntesis completa con cada pulso de ATP.

Por lo tanto, las condiciones de amplificación son las siguientes:

Tris.Cl 50 mM pH 7.85

Acetato de magnesio 10 mM

Ditiotreitol 2 mM Acetato de potasio 80 mM

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)

ATP 3 mM enjaulado

Dilución 1:50.000 de la solución madre comercial SYBR-verde I (Molecular Probes)

dNTPs 200 µM

oligonucleótido 1 0.1 µM

oligonucleótido 2 0.3 µM

600 ng/µl T4 gp32

150 ng/µl T4 uvsX

25 ng/µl T4 uvsY

20 ng/µl polimerasa Bsu

Incubación a 33-40°C

Antes de cada ciclo de desenjaulamiento de ATP, se midió en la muestra la fluorescencia SYBR verde I (excitación máxima de 494 nm-521 nm de emisión máxima). La fluorescencia detectada será la base de la cuantificación. Cada minuto, se aplica un pulso corto de luz de 365 nm para desenjaular el ATP, lo que lleva a una explosión de actividad recombinasa. La fluorescencia medida en cada ciclo se compara con un estándar de plantilla de entrada y se puede determinar la cantidad de plantilla de muestra de entrada.

El ejemplo 17 describe el uso de ATP enjaulado para controlar el inicio de RPA en un análisis de polonia.

Como ejemplo de un análisis de polonia basado en RPA, se generan geles de poliacrilamida en portaobjetos de microscopio como describen Church y sus colegas [Mitra R, Church G (1999) Amplificación localizada *in situ* y replicación por contacto de muchas moléculas de ADN individuales. Nucl Acids Res 27(24): e34i-vi.]. En este análisis, se detectan distintos productos polimórficos después de una amplificación inicial por extensión de una sola base utilizando nucleótidos fluorescentes y cebadores específicos de objetivos polimórficos. Una diferencia entre esta configuración y el análisis de polonia normal es que puede que no sea necesario usar los cebadores modificados con acridita 5', ya que la RPA se realiza a una temperatura constante baja y por tiempos significativamente más cortos (las reacciones de polonia normalmente basadas en PCR llevarán de 3 a 7 horas). En este ejemplo, se utilizan tanto los cebadores modificados con 5' acridita como los cebadores normales.

En lugar de la mezcla de "difusión difusa" de PCR, se utiliza una mezcla de difusión difusa RPA y comprende lo siguiente:

50 mM Tris.Cl pH 7.85

Acetato de magnesio 10 mM

Ditiotreitol 2 mM

Acetato de potasio 80 mM

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)

Fosfocreatina 15 mM (incluida según la configuración)

dNTPs 200 µM

* ATP enjaulado de 3 mM (incluido según la configuración)

12 ng/µl de creatina quinasa (incluida según la configuración)

Oligonucleótido 1, 0.3 µM

Oligonucleótido 2 0.3 µM

350 ng/µl T4 gp32

100 ng/µl T4 uvsX

20 ng/µl T4 uvsY

20 ng/µl de polimerasa Bsu

La reacción se inicia ya sea por difusión en ATP, o activando el ATP enjaulado incluido en la mezcla original de "difusión". Las polonias se generan después de la incubación a 33-40°C durante 30 minutos a 2 horas.

Después de la amplificación, se difunde un nuevo cebador polimórfico-objetivo junto con nucleótidos marcados con fluorescencia, y la reacción se reinicia con un pulso adicional de ATP, ya sea de forma manual o por fotólisis. La fluorescencia incorporada se puede cuantificar utilizando microscopía de fluorescencia.

Ejemplo 18: Determinación no basada en gel del número de repeticiones polimórficas en un amplicón utilizando formación híbrida mediada por recombinasa entre ADN amplificado de cadena sencilla y sondas dúplex

En este ejemplo, se amplifica un STR mediante cebadores oligonucleotídicos flanqueantes. El STR es el marcador conocido como TPOX y se usa comúnmente en los conjuntos de marcadores STR de Estados Unidos y Europa utilizados para el análisis forense. El marcador se amplifica mediante cebadores flanqueantes con la secuencia para el cebador 1 de 5'-ACTGGCACAGAACAGGCACTTAGGGAACCC-3', y el cebador 2 5'-GGAGGAACTGGGAACCACACAGGGTATATATATA-3'. El marcador tiene una repetición de 4 nucleótidos, AATG, que varían entre 5 y 14 repeticiones.

Las condiciones de amplificación son las siguientes:

50 mM Tris.Cl pH 7.85

Acetato de magnesio 10 mM

Ditiotreitol 2 mM

Acetato de potasio 80 mM

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)

Fosfocreatina 15 mMATP 3 mM

dNTPs 200 µM

Creatinina quinasa 12 ng/µl

Oligonucleótido 1,5'-marcado con fluoresceína 0.3 µM

Oligonucleótido 2 0.05 µM 600 ng/µl T4 gp32

150 ng/µl T4 uvsX

35 ng/µl T4 uvsY

20 ng/µl de polimerasa Bsu

Incubación a 33-40°C durante 30 minutos a 2 horas.

La reacción de amplificación genera una cantidad de ADN de cadena sencilla debido al desequilibrio del cebador, y este ADN de cadena sencilla está marcado de forma fluorescente. Al final de la reacción de amplificación, la mezcla de reacción se pone en contacto directamente con una serie de sondas de doble cadena inmovilizadas espacialmente. Cada sonda corresponde a una de las formas polimórficas conocidas del ADN en estudio, y tiene la misma longitud que el amplicón que se haría si esta forma existe en la muestra.

Las cargas de recombinasa sobre el ADN de muestra de cadena sencilla amplificado forman filamentos de búsqueda de homología. Estos filamentos podrán apuntar a las sondas de doble cadena inmovilizadas en la superficie de soporte de la matriz. Cuando ocurre un evento de recombinación entre el producto de amplificación recubierto con recombinasa y las sondas, el producto de amplificación se vuelve productivamente emparejado con la base de Watson-Crick con su complemento en la sonda, mientras que la cadena equivalente originalmente emparejada se desplaza y se libera en la solución. Idealmente, la terminación de dichos eventos de recombinación se inhibirá si el evento se inicia entre una muestra de ADN y una sonda emparejada imperfecta que lleva al enriquecimiento de solo los híbridos perfectos.

La reacción es dinámica, de modo que los híbridos formados entre la sonda y la muestra pueden convertirse en objetivos para otros ADN dirigidos. Este comportamiento dinámico acoplado a una menor eficiencia de terminación de la recombinación de híbridos formados de manera imperfecta debería conducir a un enriquecimiento de los híbridos perfectos en la población de mezclas de sonda/muestra. Esto se mejora aún más mediante la adición de una helicasa como E. coli PriA (2-20 ng/µl), E. coli DnaB (5-50 ng/µl), E. coli RuvAB (5-50 ng/µl), T4 el fago dda helicasa (5-50 ng/µl), el fago T4 gp41 (5-50 ng/µl) o una nucleasa apropiada. Estos agentes utilizan, o mejoran, las interrupciones en la hélice, que existen debido a desajustes y conducen a que tales híbridos imperfectos sean menos estables que los híbridos perfectos.

Después de un período de incubación adecuado, tal como 10-30 minutos a 28-40°C, la reacción se termina si es necesario, por ejemplo, mediante la adición de EDTA o agentes caotrópicos como la urea o el clorhidrato de guanidina, aunque no hay tal terminación puede ser necesario. Las interacciones productivas entre la sonda y la muestra se miden exponiendo la matriz a la luz de una longitud de onda apropiada y registrando la fluorescencia utilizando los filtros y la cámara apropiados.

El ejemplo 19 muestra una determinación no basada en gel del número de repeticiones polimórficas en un amplicón que utiliza la formación híbrida mediada por recombinasa entre ADN amplificado dúplex y sondas de cadena sencilla

Como se mencionó anteriormente, este ejemplo implicaría la amplificación del marcador TPOX STR utilizado en medicina forense. Las condiciones de amplificación serían las mismas que para el Ejemplo 18, excepto que la relación de los cebadores de amplificación sería 1:1, y ambos se utilizarían a una concentración de 0.3 µM. La reacción de amplificación se pone en contacto con una serie de sondas de cadena sencilla correspondientes a las posibles formas polimórficas conocidas del ADN en estudio. Con este formato, la recombinasa se carga preferentemente en las sondas que luego buscan y forman híbridos con los ADN de muestra de doble cadena. Como en el Ejemplo 18, los híbridos se enriquecerían idealmente si son perfectos, y de manera similar la inclusión de agentes como las helicasas (por ejemplo, PriA, recG, DnaB, RuvAB, gp41 o dda) o las nucleasas apropiadas pueden acelerar y mejorar este enriquecimiento. Después de un período de incubación adecuado, con o sin detención de la reacción según sea necesario, las interacciones se visualizan como se describe en el Ejemplo 18.

Ejemplo 20, muestra una determinación no basada en gel del número de repeticiones polimórficas en un amplicón utilizando formación híbrida mediada por recombinasa y procesamiento de nucleasas de heterologías para liberar una etiqueta de un punto de inmovilización

En este ejemplo, la reacción de amplificación y la formación de híbridos entre la sonda y la muestra se realizan como se describe en el Ejemplo 1, excepto que los cebadores de amplificación no necesitan contener una etiqueta. La sonda en lugar de la muestra está etiquetada en un extremo. Después de un período de incubación apropiado, como se describe para los Ejemplos 18 y 19, las matrices se tratan con una nucleasa apropiada, que escindirá los dúplex de ADN imperfectos. Como tales cortes se hacen en la columna vertebral de los híbridos imperfectos y la etiqueta se libera de un punto de inmovilización. Adicionalmente, se puede incluir una ADN polimerasa de modo que si la nucleasa introduce una muesca y la polimerasa se desplaza de la cadena, entonces actúa para sintetizar de una manera que desplaza la cadena y, por lo tanto, elimina la cadena marcada en consecuencia. La matriz se puede cuantificar como se describe en el Ejemplo 18.

Ejemplo 21, muestra una determinación no basada en gel del número de repeticiones polimórficas en un amplicón utilizando formación híbrida mediada por recombinasa y procesamiento de nucleasas de heterologías seguido de marcaje de síntesis de ADN

En este ejemplo, la amplificación y la formación de híbridos son como en el Ejemplo 18 o en el Ejemplo 19, excepto que los cebadores de amplificación no están necesariamente marcados. Durante la fase de formación híbrida, se incluye una nucleasa que las muescas en las burbujas o las perturbaciones de la hélice y la inclusión en la reacción de los nucleótidos marcados y una cadena que desplaza a la polimerasa conducen a los híbridos imperfectos que se procesan a una forma híbrida perfecta que incluye bases marcadas modificadas que pueden ser visualizadas.

Ejemplo 22, muestra el uso de una helicasa para interrumpir híbridos imperfectos en un entorno de sistema de recombinación dinámica

En este ejemplo, la amplificación y la formación de híbridos se realizan como en el Ejemplo 18 o en el Ejemplo 19, excepto que los cebadores de amplificación no están necesariamente marcados. Sin embargo, la sonda o el ADN de muestra debe contener una etiqueta. La sonda o el ADN de muestra se inmoviliza en un extremo a un soporte sólido o perla a través de una interacción no covalente de alta afinidad, como una interacción biotina-estreptavidina. Durante la fase de formación híbrida, una helicasa como la helicasa T4 dda, o una combinación de helicasas como las helicasas PriA y dda, u otras mezclas se incluyen para atacar híbridos imperfectos y desenrollarlos, acelerando efectivamente la disociación de una interacción de alta afinidad no covalente por alteración física. Después de un período de incubación adecuado, la asociación entre el ácido nucleico marcado y el soporte sólido se mide con una señal positiva que indica que se han formado híbridos perfectos.

La Figura 58 muestra, en principio, cómo los híbridos imperfectos poseerán burbujas que permiten mejorar la interrupción dúplex general en un entorno de recombinación dinámica

Un amplicón de doble cadena mostrado en A que contiene 8 repeticiones de una repetición corta en tándem y flanqueado por secuencias únicas utilizadas para la amplificación se dirige a B por oligonucleótidos de sonda de cadena sencilla que contienen números variables de la unidad de repetición. La hibridación se realiza mediante recombinasa (no se muestra aquí). En C se muestran los híbridos de doble cadena resultantes, algunos de los cuales contienen burbujas causadas por números de repetición no idénticos entre híbridos. Estas burbujas son más grandes a medida que crece el número de repeticiones diferentes y, por lo tanto, tales híbridos se convierten en mejores dianas para la recombinasa u otras enzimas de procesamiento de ADN.

La Figura 59 muestra el posible resultado de una reacción de hibridación como se describe en el Ejemplo 18, de la figura 58, se muestra. Una muestra de ADN que contiene 8 repeticiones se incuba con una serie de sondas correspondientes a diferentes números de repetición. Con el tiempo, los híbridos se enriquecen para números de repetición perfectos, y menos, pero en menor medida los que difieren solo en una o dos repeticiones.

La Figura 60 muestra con qué facilidad se pueden realizar las reacciones de RPA para evaluar la presencia de especies de ARN específicas mediante la inclusión de una enzima capaz de transcripción inversa en la reacción.

Los números de copia definidos de ARN de MS2 viral (de una fuente comercial) se incubaron en reacciones de RPA que incluían la transcriptasa inversa según lo indicado. Se emplearon dos cebadores que reconocieron la secuencia de MS2 como se indica, más específicamente estos cebadores fueron:

MS2up2	TTCCGACTGCGAGCTTATTGTTAAGGCAATG - SEQ ID78
MS2down2	CTTAAGTAAGCAATTGCTGTAAAGTCGTCAC - SEQ ID79

Las condiciones de reacción fueron estándar, excepto por el aumento de la concentración de dNTP (500 µM), un aumento en la DTT, la inclusión del inhibidor de la ARNasa y la inclusión de la transcriptasa inversa donde se indique. Las condiciones eran:

50 mM Tris.Cl pH 8.5

Acetato de magnesio 10 mM

Ditiotreitol 10 mM

Acetato de potasio 80 mM

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)

Fosfocreatina 15 mM3 mM ATP

500 µM dNTPs

100 ng/µl de creatina quinasa

0.3 µM MS2UP

0.3 µM MS2DOWN

800 ng/µl T4 gp32

120 ng/µl T4 uvsX

30 ng/µl T4 uvsY

70 ng/µl de polimerasa Bsu

0.13 unidades/µl de inhibidor de RNasa

MuMLV (que contiene RNasa H) transcriptasa inversa 10 unidades/µl (Promega)

Los productos de reacción se extrajeron con fenol, se precipitaron y se separaron en un gel de acrilamida no desnaturalizante antes de teñir con SYBR-oro. Las concentraciones de ARN tan bajas como 100 copias por microlitro pueden detectarse fácilmente en este formato sin optimización adicional.

La Figura 61 muestra que el dUTP se puede usar para reemplazar parcial o completamente el dTTP en las reacciones de RPA, ofreciendo así una estrategia para controlar la contaminación por arrastre.

Las reacciones de RPA se establecieron usando las siguientes condiciones:

50 mM Tris.Cl pH 8.5

Acetato de magnesio 10 mM

Ditiotreitol 2 mM

Acetato de potasio 100 mM

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)

Fosfocreatina 15 mM

ATP 3 mM

200 µM de dNTP (dA, dC y dG)

100 ng/µl de creatina quinasa

Cebador J1 0.3 µM para el ADN de B. subtilis (SEQ ID 66)

Cebador K2 0.3 µM para el ADN de B. subtilis (SEQ ID 69)

630 ng/µl T4 gp32

140 ng/µl T4 uvsX

35 ng/µl T4 uvsY

20 ng/µl de polimerasa Bsu

100 copias/µl de ADN genómico de B. subtilis

El producto de las reacciones se separó en un gel de agarosa al 2% y se tiñó con bromuro de etidio. Como se indica en los paneles más a la izquierda, se utilizó dUTP o dTTP en diferentes reacciones. Más específicamente, el carril superior izquierdo contenía 200 µM de dTTP y, por lo tanto, era típico de una reacción RPA estándar. Los siguientes seis carriles también contenían 200 µM de dTTP, pero en este caso dUTP también estaba presente en las concentraciones indicadas. Los últimos seis carriles del panel inferior izquierdo contienen los productos de reacciones de RPA en los que no se incluyó el dTTP, y se usó la concentración indicada (50-800 µM de dUTP) de dUTP. En todos los casos se produjo la amplificación del fragmento esperado, pero notablemente la presencia de dUTP disminuyó la cantidad de amplicón generado, e inhibió el fenómeno de "duplicación" que se observa a menudo en donde se ha producido la síntesis de retroceso.

El panel que está más a la derecha indica los resultados del uso como productos de material de partida generados a partir de las primeras reacciones en el panel que está más a la izquierda luego del procesamiento, como se indica en el esquema. Más específicamente, las reacciones mostradas como A, B, C, D y E en los paneles más a la izquierda se procesaron de la siguiente manera. Sobre la base de la intensidad de la tinción y la estimación del contenido de ADN, se estimaron 10^6 moléculas de cada producto durante 20 minutos con 1 µl de una preparación comercial (Roche) de dUTP-desglicosilasa termolábil, se dejó sin tratar una cantidad similar, y finalmente todas las muestras se calentaron a 94ºC durante 10 minutos. Esta enzima fue controlada por la calidad del fabricante para combatir eficazmente la contaminación de transferencia de 10^5 moléculas, por lo que impusimos un desafío estricto en este caso. Las muestras se utilizaron luego para sembrar una reacción de RPA configurada en condiciones normales de

RPA con 200 µM de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP (véase las condiciones anteriores). Como se indicó, las muestras no tratadas con dUTP-desglicosilasa eran excelentes plantillas de inicio, mientras que las que habían sido tratadas eran extremadamente malas, a menos que no se hubiera empleado inicialmente DUTP. En particular, incluso las mezclas mixtas fueron efectivas.

La Figura 62 muestra cómo se podría combatir la contaminación por arrastre en el sistema RPA.

La capacidad de emplear dUTP en reacciones de RPA podría usarse para prevenir la contaminación por arrastre de acuerdo con el esquema descrito. Las reacciones de RPA se realizarían con dUTP puro, o mezclas de dTTP y dUTP como se muestra en la figura 61. Antes de, o al inicio de una reacción de RPA, se incubaría uracil deglicosilasa (UDG) de E. coli o similar se incubaria con la muestra y atacaría material de arrastre. Luego, después de varios minutos, o al comienzo de la reacción, se agregaría un inhibidor de UDG. Un inhibidor específico de E. coli UDG se conoce como inhibidor de uracil glicosilasa (UGI) y es un péptido de 9.5 kD de Bacillus subtilis, y está disponible comercialmente.

La Figura 63 muestra cómo un sistema desechable integrado simple puede configurarse para permitir pruebas rápidas en el punto de uso de la presencia de secuencias específicas de ADN en una muestra. En (A) se proporciona una descripción esquemática de una tira de flujo de reacción/flujo de RPA desechable que se puede colocar en un calentador barato que puede suministrar aproximadamente 30-39°C cerca de una bolsa de reacción que contiene reactivos de RPA secos. Se supone que la muestra procesada/lisada se usaría para rehidratar el contenido de la bolsa en un volumen apropiado, y luego la bolsa se incubaría a la temperatura adecuada durante 15-60 minutos, según sea necesario. Posteriormente, parte o la totalidad de la muestra se transferiría a la almohadilla de muestra de una tira de flujo lateral, configurada de manera que solo si se han formado los amplicones correctos, se formará una línea visible en una posición específica en la tira. En (B) se muestra la disposición de dos cebadores oligonucleotídicos utilizados para una reacción de RPA realizada en el ADN masculino y femenino, respectivamente. Se utilizaron los oligonucleótidos SRY3 y SRY4, y uno contenía una unidad estructural 5'-fluoresceína y el otro una unidad estructural 5'-biotina. Al final de la reacción, se mezcló 1/500 de una reacción de 50 µl con 'regulador de funcionamiento' (Milenia, Alemania) y se aplicó a una tira de flujo lateral disponible comercialmente (Milenia, Alemania), de modo que solo los productos en los que la fluoresceína y la biotina si estuvieran asociados (es decir, en un producto de amplificación), se produciría la acumulación de partículas de oro visibles en la línea de detección. En (C) se muestra el resultado de este experimento. Solo la reacción realizada en el ADN masculino genera la línea de señal, y la eficacia de la reacción de amplificación se validó por separado en geles de agarosa (datos no mostrados).

La Figura 64 muestra que las reacciones de RPA no se inhiben por la presencia de materiales en la sangre, siempre que se empleen las proporciones adecuadas de reactivos.

Se investigó la capacidad de amplificar un fragmento de ADN genómico de sangre completa y lisada directamente a las reacciones de RPA. Las reacciones de RPA se configuraron de la siguiente manera:

50 mM Tris.Cl pH 8.5

Acetato de magnesio 10 mM

Ditiotreitol 2 mM

Acetato de potasio 80 mM

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)

Fosfocreatina 25 mM3 mM ATP

dNTPs 200 µM

100 ng/µl de creatina quinasa

Oligonucleótido 0.3 µM ApoB4 (SEQ ID 20)

Oligonucleótido 0.3 µM ApoB300 (SEQ ID 21)

420 ng/µl T4 gp32

140 ng/µl T4 uvsX

35 ng/µl T4 uvsY

20 ng/µl de polimerasa Bsu

En (A), se añadió 1 µl de agua o 1 µl de sangre humana entera fresca a una reacción RPA. Los productos se separaron en un gel de agarosa al 2% y una flecha indica la posición del amplicón esperado. Los artefactos de 'cebador' no específicos estaban presentes en el control del agua y en la muestra, y presumiblemente surgen como consecuencia de copias ausentes o muy bajas del objetivo. Se deduce que muy pocas copias de ADN genómico estaban disponibles

para amplificación en la amplificación de la muestra de sangre. En (B) se analizaron muestras en las que primero se mezclaron 1 µl de sangre con 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl o 5 µl de una solución de lisis que comprendía lOmM |Tris, 1 mM EDTA, 120 mM NaOH, 0.1% SDS (como se indica). En cada caso, se usó 1 µl del lisado respectivo para iniciar una reacción de RPA (por lo tanto, aquellos lisados con más regulador contenían menos muestra de sangre por amplificación). También se muestran muestras del mismo experimento en donde solo se usaron agua (carril 1), o ADN purificado equivalente a 500 copias de diana (Promega) (carril 7) para sembrar la reacción de amplificación. Cuando se utilizaron 4 µl o 5 µl de regulador de lisis, la lisis de los glóbulos rojos fue claramente visible y la solución se volvió viscosa. Se notó que estas muestras se convirtieron en excelentes materiales de inicio para las reacciones de RPA, presumiblemente liberando la mayor parte del ADN como plantillas accesibles.

La figura 65 muestra cómo se puede emplear la monitorización en tiempo real de las reacciones de RPA para optimizar las reacciones.

En este caso, las reacciones de RPA se establecieron utilizando el par de cebadores J1 y K2 mencionados anteriormente, y la plantilla que consiste en ADN genómico de Bacillus subtilis (densidad de inicio 1 copia por microlitro). Se varió la concentración de acetato de potasio o la concentración de compuesto de PEG. Otras condiciones fueron, a menos que se especifique lo contrario:

50 mM Tris.Cl pH 8.5

Acetato de magnesio 10 Mm

Ditiotreitol 2 Mm

Acetato de potasio 80 mM (o como se indica)

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M) (o como se indica)

Fosfocreatina 25 Mm

ATP 3 Mm

dNTPs 200 µM

100 ng/µl de creatina quinasa

Cebador de oligonucleótido J1 0.3 µM (SEQ ID 66)

Oligonucleótido K2 0.3 µM (SEQ ID 69)

620 ng/µl T4 gp32

140 ng/µl T4 uvsX

35 ng/µl T4 uvsY

1:50.000 en forma de dilución de SYBR verde (Invitrogen)

20 ng/µl de polimerasa Bsu. Al final de la reacción, una porción de los reactivos se mezclaron con regulador de carga de sacarosa y se separaron en un gel de agarosa, y luego se tiñeron con bromuro de etidio. Se notó que la sal alta retarda la reacción, pero existe un amplio rango de concentraciones de sal que funcionan bien. También se observa que el aumento de las concentraciones de PEG del 4% al 9% resultó en un comportamiento de reacción cada vez más rápido, sin embargo, la aparición de productos en el sistema de gel se vio afectada adversamente por las concentraciones más altas de PEG. Se supone que el aspecto difuminado de las muestras de alta concentración de PEG puede surgir de las redes en curso de ADN generadas por una actividad de recombinación muy alta. Si bien esto puede ser indeseable para el análisis de gel, puede ser perfectamente adecuado para el análisis en tiempo real utilizando fluorescencia.

La Figura 66 muestra cómo las reacciones de RPA se ven afectadas por la concentración de magnesio.

Las reacciones de RPA en tiempo real se establecieron de la siguiente manera:

50 mM Tris.Cl pH 8.5

6, 10 o 16 mM de acetato de magnesio como se indica

Ditiotreitol 2 Mm

Acetato de potasio 80 Mm

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax 20M)

Fosfocreatina 25 Mm

ATP 3 Mm

dNTPs 200 µM

100 ng/µl de creatina quinasa

Cebador de oligonucleótido J1 0.3 µM (SEQ ID 66)

Cebador de oligonucleótido K2 0.3 µM (SEQ ID 69)

600 ng/µl T4 gp32

120 ng/µl T4 uvsX

30 ng/µl T4 uvsY

20 ng/µl de polimerasa Bsu

Dilución 1:50.000 de la solución madre de SYBR verde (Invitrogen)

Se indica la densidad inicial del ADN objetivo, el ADN genómico de Bacillus subtilis, en copias por microlitro. En las muestras de acetato de magnesio 6 mM y 16 mM, se evidenció cierta contaminación por arrastre cuando las muestras en el punto final se verificaron en geles de agarosa, y esto puede explicar en parte la escasa resolución entre cero y 1 copia por microlitro de densidad de inicio. Téngase en cuenta que RPA es eficaz en todas las concentraciones de magnesio probadas, pero es mucho más rápido a medida que aumenta la concentración de magnesio. Los productos finales de estas muestras de magnesio superior aún parecen ser de alta calidad (datos no mostrados). Esto indica que, para alcanzar velocidades de reacción máximas, las concentraciones de magnesio significativamente superiores a 10 mM (utilizadas como estándar en la mayor parte de este documento) pueden emplearse de manera útil.

La figura 67 muestra que diferentes pares de cebadores/amplicones muestran diferentes cinéticas de amplificación. La dependencia del tiempo de reacción varía entre los cebadores oligonucleotídicos, y el análisis indica un posible sesgo de secuencia subyacente a este fenómeno.

Se realizaron dos cursos de tiempo diferentes utilizando diferentes pares de cebadores. Las condiciones no fueron idénticas entre estas reacciones, sin embargo, el nivel de variación indicado es típico del rango de comportamientos que se ha observado entre pares de cebadores presentes y se incluye como solo un ejemplo típico de tasas observadas (los cebadores de LCR se utilizan a 125 ng/µl UvsX, 45 ng/µl uvsY; cebadores Apo utilizados a 200 ng/µl UvsX, 60 ng/µl uvsY). Se muestran secuencias de cebadores. Los cebadores CSF5' (SEQ ID 32) y CSF3' (SEQ ID 33) (dirigidos al locus STR humano CSF1PO) son realmente un par excepcional de cebadores en la medida en que demostraron una cinética de acumulación de producto particularmente rápida, lo más rápido que se ha determinado. Los cebadores ApoB600 (SEQ ID 46) y ApoB300rev (SEQ ID 47), dirigidos a parte del locus de la apoliproteína B humana, demuestran una cinética de amplificación más lenta. En este experimento, este último par generó una cantidad similar de material después de 40 minutos, como ocurrió después de solo 20 minutos con los cebadores de CSF. Sobre la base de estos y otros datos, se llegó a la conclusión de que los tiempos de duplicación típicos varían, en promedio, entre aproximadamente 30 segundos y 1 minuto para la mayoría de los pares de cebadores de 30-35 residuos en RPA. Los cebadores de CSF también fueron notablemente dominantes en los experimentos multiplex (datos no mostrados), lo que concuerda con la noción de que fueron particularmente eficientes y rápidos. El análisis de la composición de los cebadores, comparando ambos cebadores de CSF con, en este caso, los cebadores de Apo utilizados aquí, resalta que el contenido de guanosina es bajo en ambos cebadores de CSF, mientras que el promedio de los cebadores de Apo, y el contenido de citosina es un tercio o más para ambos cebadores CSF, mientras que un cuarto o menos para los cebadores Apo. Esto nos sugirió un posible origen de composición para la variabilidad de la tasa. Las reacciones se realizaron en condiciones similares, aparte de las diferencias mencionadas anteriormente en UvsX y UvsY, y concentraciones de dNTP ligeramente variables:

50 mM Tris pH 8.4

Acetato de potasio 80 Mm

Acetato de magnesio 10 Mm

DTT 2Mm

100 ng/ml creatina quinasa

600 ng/ml gp32

dNTPs 200 µM para cebador Apo, 100 µM dNTPs para cebadores CSF

300 nM cada oligonucleótido

La figura 68 muestra que los estiramientos homopoliméricos en 5' adjuntos influyen en el comportamiento de la reacción: la citosina aumenta la actividad y la guanosina la disminuye.

Los cebadores fueron los indicados. J1 y K2 (SEQ ID 66 y 69) son homólogos a parte del locus SpoOB de Bacillus subtilis. Las condiciones de reacción fueron:

50 mM Tris pH 8.4

Acetato de potasio 80 Mm

Acetato de magnesio 10 Mm

DTT 2 mM

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M)

ATP 3 mM

Fosfocreatina 30 Mm

100 ng/µl de creatina quinasa

420 ng/µl gp32

140 ng/µl UvsX

35 ng/µl UvsY

dNTPs 200 µM

300 nM cada oligonucleótido

35 ng/µl de polimerasa Bsu

25 copias/µl de ADN genómico de B. subtilis

Dilución 1:50.000 de la solución madre de SYBR verde (sondas moleculares)

Volúmenes de reacción 50 µl, 37°C.

Los cebadores J1(C), K(C), J1(G) y K2(G) fueron equivalentes a J1 y K2, pero poseen estiramientos adjuntos de citosina o guanosina, según se indica. Las reacciones se establecieron en hielo en una placa de microtitulación y luego se transfirieron a la etapa de calentamiento de un fluorómetro (FLX800). Después de 90 minutos, las reacciones se diluyeron con 1x de regulador de carga de sacarosa hasta el doble del volumen de reacción original, y luego se analizaron 20 µl de esto directamente en un gel de agarosa al 2%. Las reacciones contenían ADN diana o ninguna diana. Se observa que la adición de residuos de citosina a los cebadores resultó en una rata de amplificación más rápida, mientras que la adición de guanosinas dio como resultado una amplificación defectuosa. Los cebadores añadidos a la citosina también amplificaron el "ruido" muy rápidamente.

La figura 69 muestra que las secuencias 5' adjuntas que consisten en residuos de timina y citosina demuestran una variación significativa en el comportamiento de amplificación.

Los cebadores fueron los indicados. J1 y K2 (SEQ ID 66 y 69) son homólogos a parte del locus SpoOB de Bacillus subtilis. Las condiciones de reacción fueron:

50 mM Tris pH 8.4

Acetato de potasio 80 Mm

Acetato de magnesio 10 Mm

DTT 2Mm

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M)

ATP 3 Mm

Fosfocreatina 30 Mm

100 ng/µl de creatina quinasa

420 ng/µl gp32

140 ng/µl UvsX

35 ng/µl UvsY

dNTPs 200 µM

300 nM cada oligonucleótido

35 ng/µl de polimerasa Bsu

20 copias/µl de ADN genómico de B. subtilis

Dilución 1:50.000 de la solución madre de SYBR verde (sondas moleculares)

Volúmenes de reacción 50 µl, 37°C.

Las reacciones de amplificación se evaluaron en tiempo real empleando el colorante SYBR verde como se describe en la Figura 66. Las condiciones fueron similares, excepto que solo se emplearon 20 copias/µl de la plantilla diana de inicio, y las secuencias del cebador variaron. El análisis del punto final se realizó mediante la ejecución de los productos generados a los 60 minutos en un gel de agarosa al 2% después de la dilución, como se describe en la Figura 68. Las reacciones que contienen estiramientos de timidina homopolimérica, o estiramientos muy ricos en timidina, se amplificaron algo mal. Típicamente, se generó menos ADN y hubo algunos indicios de que la asimetría de la amplificación estaba ocurriendo sustancialmente. En general, estos datos fueron consistentes con los residuos de citosina que se prefieren en las secuencias 5', y que estaban ocurriendo otros fenómenos difíciles de determinar, posiblemente algunos efectos de la "eliminación de fases" de la recombinasa preferida.

La Figura 70 muestra un estudio más detallado de los efectos de las secuencias adjuntas en 5'.

Se investigaron aun más cebadores derivados de los cebadores J1 y K2 (SEQ ID 66 y 69), que en su mayoría contienen residuos de pirimidina adicionales, pero un par que contiene un residuo de guanosina muy 5'. Algunos cebadores (6 y 12 en esta serie) contenían pirimidinas 5', pero se acortaron a un total de 33 residuos mediante la eliminación de bases en los extremos 5' (J1) o 3' (K2) respectivamente. Estos cebadores compartían así menos de 30 residuos de homología con el objetivo genómico. Los cebadores se incubaron en condiciones similares a las utilizadas en las Figuras 69 y 70. Las principales diferencias fueron que se emplearon 630 ng/ml de gp32, y solo se utilizó 1 copia por microlitro de ADN genómico objetivo. Además, en estos experimentos también se examinó la velocidad de amplificación que ocurre en reacciones que contienen solo cebadores simples. En aquellas reacciones que contenían pares de cebadores, se examinaron pares que contenían un oligonucleótido que es un derivado J1 y uno que es un derivado K2. Se utilizaron pares en los que los derivados contenían modificaciones 5' similares. En particular, las tasas de amplificación del cebador único fueron bastante similares a las tasas de amplificación de dos cebadores a esta baja densidad objetivo, lo que indica que el ruido del cebador tiende a iniciarse como un efecto competitivo en aproximadamente esta densidad objetivo muy baja. Curiosamente, los cebadores 8 y 9, que se diferencian en un solo residuo de citosina, mostraron un comportamiento de amplificación profundamente diferente. Esto puede indicar que se requiere una extensión mínima de citosinas para una actividad de alta velocidad, o que se evidencia algún efecto de fase específico.

La Figura 71 muestra varias estrategias mediante las cuales la especificidad de la detección de secuencia podría mejorarse mediante el uso de "terceras sondas", y cómo podrían configurarse para funcionar con pares de fluoróforo/detenedor.

La presencia de una secuencia de ADN específica puede detectarse mediante el uso de una tercera sonda oligonucleotídica que está bloqueada en el extremo 3' y, por lo tanto, no participa en la amplificación ruidosa (al menos sin procesamiento posterior). Dichas terceras sondas pueden formar híbridos con el amplicón específicamente, y en dicho entorno dúplex se convierten en los sustratos para las enzimas de procesamiento de ADN que escinden la sonda, separando así el fluoróforo y el detenedor. Dada la naturaleza del entorno de recombinasa, el fluoróforo y el inhibidor estarán separados por no más de aproximadamente 10-12 nucleótidos. Se enumera una selección de nucleasas candidatas, y se indican las bases modificadas que se incluirían en las sondas, o la naturaleza del esqueleto de la sonda para cada nucleasa.

La figura 72 muestra cómo se puede emplear una nucleasa con distorsión de hélice o específica de base para detectar secuencias específicas que incluyen polimorfismos.

Se muestra un ADN de cadena sencilla que se ha recubierto con recombinasa para formar un filamento de nucleoproteína de búsqueda de homología. Las flechas indican que la interacción de dicha estructura será dúplex homóloga, ya sea idéntica a la sonda con respecto a un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), o diferente (A en

lugar de G). En ambos casos se produce con éxito un intercambio de cadena, y la cadena saliente se estabiliza por una proteína de unión a ADN de cadena sencilla. Los nuevos dúplex resultantes son perfectamente complementarios o contienen un desajuste de base, lo que provocará una distorsión local de la hélice. En presencia de una nucleasa específica de estructura adecuada, la sonda/plantilla que contiene la distorsión se escinde específicamente, ya sea como muescas posiblemente en cualquiera de las cadenas, o como una rotura de doble cadena, dependiendo de la nucleasa. En otros formatos, se podría utilizar un método similar para detectar la presencia o ausencia de una secuencia específica, independientemente del estado polimórfico, incluyendo bases modificadas en la sonda, como la 8-oxoguanina. En este caso, se podría emplear una enzima de separación de bases y de corte abásico específica para ambientes de 8-oxoguanina y dúplex, como la proteína Fpg de E. coli (ADN-glicosilasa de 8-oxoguanina). En cualquier caso, las moléculas de sonda podrían contener tanto un fluoróforo como un detenedor que se separan en la escisión.

La Figura 73 muestra cómo los oligonucleótidos fluorescentes marcados dualmente muestran propiedades diferenciales en un entorno RPA en comparación con un entorno que carece de recombinasa saturante y proteínas de unión a ADN de cadena sencilla.

En la parte superior izquierda, se muestran tres sondas que se usaron en un experimento para investigar las propiedades fluorescentes de esos oligonucleótidos en presencia o ausencia de proteínas usadas en ambientes RPA. Las condiciones fueron las siguientes:

50 mM Tris pH 8.4

Acetato de potasio 80 Mm

Acetato de magnesio 10 Mm

DTT 2Mm

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M)

ATP 3 Mm

Fosfocreatina 30 mM

100 ng/µl de creatina quinasa

dNTPs 200 µM

120 nM cada oligonucleótido como se indica

Opcional:

630 ng/µl gp32

140 ng/µl UvsX

35 ng/µl UvsY

Se observa que el FAM que solo contiene oligonucleótidos se extingue ligeramente en presencia de proteínas de unión al ADN, lo que probablemente indica alguna extinción de la fluorescencia por la proteína unida cerca del fluoróforo. Sin embargo, en marcado contraste, los oligonucleótidos que contienen tanto fluoróforo como detenedor muestran un fenómeno inverso, y esto es marcadamente diferente dependiendo de si tienen 10 o 15 residuos de longitud. Más específicamente, las dos últimas sondas se apagaron significativamente en ausencia de proteínas, lo que concuerda con la idea de que la formación de una bobina aleatoria garantizaría una extinción eficiente independientemente de la longitud. Sin embargo, en presencia de proteínas se reduce este enfriamiento. En particular, la extinción para el 15-mero está casi abolida, y asume una fluorescencia cercana a ese nivel del FAM que solo contiene oligonucleótidos en presencia de proteínas. A la inversa, el 10-mero es poco afectado y permanece altamente detenido. Esta reducción en la extinción para el 15-mero se explica más fácilmente por la sugerencia de que, en presencia de proteínas de unión al ADN, la sonda se estira en una varilla bastante rígida. Por ejemplo, UvsX y recA estiran el ADN de cadena sencilla y doble hasta aproximadamente 1.5 veces la longitud equivalente del ADN de forma B, y se describe una extensión similar para gp32. Por lo tanto, y en contraste con el comportamiento de la solución libre, el fluoróforo y el inhibidor están altamente separados en un entorno RPA, incluso más que en un dúplex de ADN, y es probable que se enfríen más en la hibridación (aunque no se investigan en este experimento). Se proporciona un esquema en el lado derecho que indica cuáles pueden ser los estados de la sonda 10-mero y 15-mero en ausencia o presencia de un entorno de recombinasa, y potencialmente cuando se hibrida con ADN dúplex. El fluoróforo y el detenedor se muestran con un radio de "excitación" más grande, que al solaparse conduciría a una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia eficiente y una disminución concomitante en la emisión de fluorescencia.

La figura 74 muestra que una sonda de amplicón que contiene un residuo de tetrahidrofuranilo se convierte en un sustrato para la enzima Nfo de E. coli en una reacción de amplificación de RPA, se escinde, y que el producto de escisión puede ser alargado.

Las reacciones de RPA se establecieron utilizando los cebadores específicos para el ADN genómico de B. subtilis J1 y K2 (SEQ ID NO: 66 y SEQ ID NO: 69), el cebador anidado NEST26 (SEQ ID NO: 77) y la sonda marcada con biotina y digoxigenina THF-Sonda 1 (5'-BIOTIN-CATGATTGGATGAATAAGCTGCAG-tetrahidrofurano-TGATTAAAGGAAAC-DIG-3' SEQ ID NO: 80), que también contiene un residuo de tetrahidrofuranilo dentro del cuerpo de la sonda. Esta sonda es específica para el fragmento amplificado por los cebadores J1 y K2, y se superpone a la secuencia del cebador NEST26 (todos estos cebadores se discuten en otra parte). NEST26, un cebador que no genera ruido por sí solo, se incluyó para que se pueda generar un producto anidado más pequeño, uno de cuyos extremos sería el objetivo de la sonda, en caso de que la sonda fuera altamente inestable en el entorno topológicamente restringido que resultado de la invasión de la sonda en el amplicón dúplex J1/K2. Las reacciones tuvieron las siguientes condiciones:

50 mM Tris pH 7.9

Acetato de potasio 80 Mm

Acetato de magnesio 10 Mm

DTT 2Mm

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M)

ATP 3 Mm

Fosfocreatina 25 Mm

100 ng/µl de creatina quinasa

600 ng/µl gp32

120 ng/µl UvsX

30 ng/µl UvsY

DNTPs de 100 µM

200 nM de cebador J1, cebador K2 y cebador NEST26

Sonda de 100Nm

30 ng/µl de polimerasa Bsu

1000 copias/µl de ADN genómico de B. subtilis o controles de agua como se indica

Las reacciones de amplificación fueron extraídas con fenol, precipitadas y separadas en un 16.5% de Urea-PAGE desnaturalizante. Los productos separados se transfirieron a una membrana de nylon y los productos se detectaron utilizando un conjugado de estreptavidina-HRP. Como el extremo 5' de la sonda estaba biotinilado, esto permitió la detección de sondas sin cortar, cortadas y alargadas. (A) Detección de sondas libres y procesadas. Téngase en cuenta que, en presencia de un entorno RPA capaz de amplificar el fragmento objetivo, la sonda se alargó preferentemente alargada. El tamaño de la sonda alargada es consistente con el alargamiento hasta el final del producto de amplificación J1/K2, y esto puede ocurrir porque la actividad de escisión Nfo genera un 3'-hidroxilo, "desbloqueando" la sonda y permitiendo la extensión sintética. Se observó una mayor elongación cuando se empleó una mayor concentración de enzima Nfo. En (B) se muestra la estructura de la sonda utilizada en este experimento. Comprende una secuencia homóloga a parte de los amplicones generados por los cebadores J1 y K2, pero contiene un residuo de tetrahidrofuranilo y se marca en el extremo 5' con biotina, y en el extremo 3' (y, por lo tanto, se bloquea) con digoxigenina. En (C) se proporciona una representación esquemática de las secuencias de eventos que se cree que subyacen a la generación de producto alargado a través de la interacción de la sonda con el amplicón deseado, la escisión y el posterior alargamiento de la polimerasa del extremo 3' libre. En este experimento, se cree que la actividad aparente en las reacciones que carecen de plantilla de inicio se debe a la contaminación por arrastre del amplicón de experimentos de laboratorio anteriores, un fenómeno que se ha vuelto problemático en nuestro laboratorio debido a la muy alta sensibilidad de la RPA. La evidencia de apoyo se proporciona en la figura siguiente.

La figura 75 muestra que una sonda de amplicón que contiene un residuo de tetrahidrofuranilo se convierte en un sustrato para la enzima Nfo de E. coli en una reacción de amplificación de RPA, se escinde y que el producto de escisión puede ser alargado.

En estos experimentos se presenta evidencia de que la escisión y extensión de una sonda específica de amplicón que contiene un residuo de tetrahidrofuranilo es específica y depende de la presencia de esas secuencias objetivo en la reacción, y también de tener un extremo libre superpuesto al objetivo de la sonda (para prevenir la tensión topológica del intermedio de recombinación sonda/diana) no es necesario. En (A) la configuración de la reacción se representa esquemáticamente. El locus de Bacillus subtilis seleccionado por los cebadores J1, K2, L2, NEST26 (SEQ ID'S 66, 69, 71 y 77) y la sonda se muestran (la secuencia real se muestra en la figura 42B). Por lo general, los cebadores J1 y K2 se usan habitualmente para amplificar este lugar y, por lo tanto, el principal contaminante de laboratorio es el fragmento generado por estos dos cebadores. Por lo tanto, también se ha combinado J1 con L2 en algunos experimentos, este fragmento no está sujeto a la amplificación de la contaminación por arrastre del amplicón anterior. En (B) se muestran los resultados de un experimento en donde las reacciones de RPA se configuraron para amplificar el producto J1/K2 o el producto J1/L2, en presencia de una plantilla de inicio agregada (ADN genómico) o sin ella. Incluidos en la reacción están la sonda y la proteína Nfo de E. coli. En más detalle se utilizaron las siguientes condiciones:

50 mM Tris pH 7.9

Acetato de potasio 80 Mm

Acetato de magnesio 10 Mm

DTT 2Mm

Compuesto de PEG al 5% (Carbowax-20M)

ATP 3 Mm

Fosfocreatina 25 Mm

100 ng/µl de creatina quinasa

600 ng/µl gp32

120 ng/µl UvsX

30 ng/µl UvsY

DNTPs de 100 µM

200 nM de cebador J1, 200 nM cebador K2 OR L2 y 200 nM cebador NEST26 (carriles 1-4), en los carriles 5 y 6 los cebadores J1 y L2 estaban a 300 nM y no se usó NEST26

Sonda de 120Nm

30 ng/µl de polimerasa Bsu

1000 copias/µl de ADN genómico de B. subtilis o controles de agua como se indica

Las reacciones de amplificación se extrajeron con fenol, se precipitaron y se separaron en un gel de Urea-PAGE desnaturalizante al 16.5%. Los productos separados se transfirieron a una membrana de nylon y los productos se detectaron utilizando un conjugado de estreptavidina-HRP. Como el extremo 5' de la sonda estaba biotinilado, esto permitió la detección de sondas sin cortar, cortadas y alargadas. (A) Detección de sondas, libres y procesadas. Téngase en cuenta que, en presencia de un entorno RPA capaz de amplificar el fragmento objetivo, la sonda se alargó, preferentemente fue alargada. También téngase en cuenta que si bien se produce un alargamiento significativo en ausencia del objetivo agregado para el par de cebadores J1/K2 (debido a que se cree que hay contaminación), cuando se usa el par de cebadores J1/L2 esto no ocurre (una banda muy débil es, nos creer, una muestra de artefacto de carga cruzada). En consecuencia, se deduce que el corte/alargamiento de la sonda es un evento específico. Además, las señales significativas en las muestras sin plantilla J1/K2 sugieren que el sistema es altamente sensible incluso a un número muy pequeño de objetivos, como es de suponer que se debe a la contaminación por arrastre. En (C) se muestran los resultados de un experimento similar en donde los cebadores J1 y L2 se usaron en combinación con la sonda en ADN no objetivo o en una muestra con ADN objetivo a 1000 copias por microlitro (ADN genómico). Las concentraciones de oligonucleótidos son las siguientes: se utilizaron J1 y L2 a 240 nM, sonda a solo 12 nM y ~1000 ng por microlitro de enzima Nfo. Otras condiciones son las descritas para el experimento en la parte (B). Las muestras se retiraron en los tiempos indicados y se detuvieron. Las muestras se extrajeron con fenol, se precipitaron y se procesaron en un gel desnaturalizante como ya se describió, se transfirieron a una membrana de nylon y se detectaron como se describió anteriormente. Se notó que los productos de escisión/elongación se pueden detectar en 30 minutos, incluso cuando la sonda es tan baja como 12 nM. Esto sugiere que la cinética de la acción de Nfo en estas condiciones es lo suficientemente rápida para monitorizar las reacciones de manera excelente en tiempo real.

La figura 76 muestra la estructura general de varios tipos posibles de sondas que podrían usarse para el análisis en tiempo real de las reacciones de RPA.

Combinando los datos que sugieren que las sondas de doble etiquetado para su uso en RPA requerirían distancias de separación relativamente cortas para permitir la extinción con nuestro conocimiento de la acción eficiente de la proteína Nfo de E. coli en el procesamiento de intermedios entre las sondas que contienen THF-residuo y objetivos dúplex, se sugiere varias estructuras de sonda. En (A) y (B) se muestra sondas en las que tanto un fluoróforo como un detenedor están presentes internamente (a través de modificaciones de la base), y entre ellas se coloca un residuo de THF. La separación del fluoróforo y el inhibidor es inferior a 10-12 residuos para garantizar una FRET eficiente entre los grupos. La sonda está bloqueada en el extremo 3' con un grupo adecuado. La escisión por la enzima Nfo en el residuo de THF eliminará la asociación covalente del fluoróforo y el inhibidor, lo que finalmente conduce a un aumento en la fluorescencia de la solución. En (C) y (D) y se representa la disposición alternativa. En este caso, el fluoróforo o el interruptor se colocan en el extremo 3' de la sonda, bloqueando así la elongación. El otro resto que absorbe la luz se une a través de un enlace interno un poco más de 5'. El residuo de THF se coloca entre estos 2 grupos, y los 2 grupos que absorben la luz están separados por no más de 10-12 residuos para garantizar una buena FRET incluso cuando se estiran por proteínas de unión al ADN.

Discusión

Existe una gran necesidad de métodos *in vitro* para amplificar secuencias específicas de ADN. Desde fines de la década de 1980, el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha cumplido principalmente con esta necesidad (R. K. Saiki et al., Science 239, 487-91 (29 de enero de 1988)). Sin embargo, el requisito para los equipos de ciclización térmica plantea una barrera importante para el uso de PCR fuera de un entorno de laboratorio. Como se describe en este documento, se ha desarrollado un método llamado RPA, que elimina la necesidad de fusión térmica de los ADN de plantilla. RPA combina componentes del sistema de recombinación/replicación del bacteriófago T4 *in vitro* en condiciones críticas definidas para mediar en la hibridación de los cebadores oligonucleótidos a los ADN de la plantilla. Específicamente, el bacteriófago T4 recombinasa uvsX, la proteína gp32 de unión a ADN de cadena sencilla (SSB) y el factor de carga de recombinasa uvsY junto con agentes de aglomeración molecular permiten una focalización de ADN mediada por recombinasa *in vitro* de alta fidelidad. Cuando este sistema de direccionamiento se combina con la síntesis de ADN de desplazamiento de cadena mediada por enzimas de la clase Pol I de E. coli o B. subtilis, se logra una amplificación de ADN exponencial eficiente.

Cualquier secuencia de oligonucleótidos puede ser recubierta por recombinasa para formar homología en la búsqueda de filamentos (Figura 37), lo que le da a RPA una amplia utilidad que permite la amplificación de prácticamente cualquier secuencia de ADN. Esta característica ha sido una de las principales ventajas de la PCR sobre otros métodos de amplificación de ADN *in vitro* (G.T. Walker, M.C. Little, J.G. Nadeau, D.D. Shank, Proc Natl Acad Sci USA 89, 392-6 (January 1, 1992); D.Y. Zhang, M. Brandwein, T. Hsuih, H.B. Li, Mol Diagn 6, 141-50 (June 2001); M. Vincent, Y. Xu, H. Kong, EMBO Rep 5, 795-800 (August 2004); J. Compton, Nature 350, 91-2 (March 7 1991)). Los filamentos de búsqueda de homología, que se asemejan a su función *in vivo*, exploran el ADN dúplex en busca de secuencias complementarias a las del oligonucleótido (T. Yonesaki, Y. Ryo, T. Minagawa, H. Takahashi, Eur J Biochem 148, 127-34 (April 1, 1985); T. Shibata, C. DasGupta, R.P. Cunningham, C.M. Radding, Proc Natl Acad Sci USA 76, 1638-42 (April 1979)). Al encontrar una coincidencia, la recombinasa cataliza varias reacciones: el cebador se aparea con su complemento, la cadena 'saliente' similar se desplaza, y la recombinasa se disocia. Esto establece una estructura de 'Bucle D' accesible a otros componentes de reacción. Los eventos de intercambio que ocurren lejos de un extremo de ADN libre generan uniones topológicamente tensas, ya que la cadena saliente está unida a ambos lados de la región intercambiada (Figura 37C).

Las secuencias incrustadas generan intermedios topológicamente limitados que son inestables. Las juntas formadas en los extremos del ADN permiten la rotación libre de la cadena desplazada (P. W. Riddles, I. R. Lehman, J. Biol Chem 260, 165-9 (January 10, 1985)). Debido a que estas dos estructuras tienen diferentes estabilidades, el alargamiento de los eventos de invasión de la cadena inicial es menos eficiente que los posteriores (Figura 39B). El extremo 3' libre del oligonucleótido ceba la síntesis mediante una ADN polimerasa que desplaza la cadena, como el fragmento Klenow de E. coli, o la ADN polimerasa I de Bacillus subtilis (Bsu). Las actividades sintéticas y de desplazamiento de la cadena de la polimerasa dan como resultado la producción de un ADN de doble cadena y una cadena única desplazada. Esta cadena desplazada se replica ya sea por hibridación directa y alargamiento del segundo oligonucleótido, o por síntesis de desplazamiento de cadena si ya hubiera ocurrido un evento de invasión desde el extremo opuesto. La generación de dos dúplex hijos completos completa una ronda de RPA. Las invasiones continúan actuando en productos de reacciones de síntesis previas con los productos dirigidos al final que finalmente dominan la reacción.

Al desarrollar el método de la invención, se ha encontrado que varias condiciones importantes son importantes para que se produzca un RPA óptimo. Primero, debe haber cantidades saturantes de proteínas de fusión de ácido nucleico presentes en la reacción, especialmente un SSB como gp32. En segundo lugar, es necesario que haya una cantidad suficiente de cebador cargado con recombinasa para lograr una tasa aceptable de invasión/intercambio de cadenas. Finalmente, los filamentos de cebado de recombinasa/ADN de cadena sencilla deben ser dinámicos y capaces de desensamblarse. Hay actividades bioquímicas competitivas de los componentes de reacción. Por ejemplo, en una situación típica *in vitro*, las recombinasas generalmente son superadas por la saturación de cantidades de SSB como la gp32.

Para superar este problema, otros han usado análogos de ATP no hidrolizables, como el ATP-γ-S, que estabiliza la interacción del ADN de la recombinasa/cebador de cadena sencilla (S.C. Kowalczykowski, J. Clow, R. Somani, A. Varghese, J Mol Biol 193, 81-95 (January 5, 1987); A.L. Eggler, S.L. Lusetti, M.M. Cox, J Biol Chem 278, 16389-96 (May 2, 2003); T. Shibata, C. DasGupta, R.P. Cunningham, C.M. Radding, Proc Natl Acad Sci USA 77, 2606-10 (May 1980)). Sin embargo, los análogos de ATP no hidrolizables son incompatibles con la actividad dinámica de los filamentos de cebado de recombinasa/ADN de cadena sencilla necesarios para completar las reacciones de intercambio de cadenas y permitir el acceso de las polimerasas a los bucles D (L. Xu, K.J. Marians, J Biol Chem). 277, 14321-8 (April 19, 2002); P.W. Riddles, I.R. Lehman, J Biol Chem 260, 170-3 (January 10, 1985); N. Armes, D. Stemple, en la Solicitud de Patente PCT WO 03/072805 (ASM Scientific, Inc., Estados Unidos, 2003)) (Figura 38).Hay otras formas en que se podría estabilizar la interacción de ADN recombinante/de cadena sencilla. Por ejemplo, se sabe que otra proteína bacteriófaga T4 llamada uvsY ayuda a cargar uvsX en ADN recubierto con gp32 (L. D. Harris, J. D. Griffith, J Mol Biol 206, 19-27 (March 5, 1989)). Además, también se sabe que los agentes de aglomeración molecular facilitan la carga y la estabilización de la proteína recombinasa recA de E. coli (P. E. Lavery, S. C. Kowalczykowski, J Biol Chem 267, 9307-14 (May 5, 1992)). Por lo tanto, se probó si los agentes de aglomeración molecular y uvsY podrían aliviar la competencia desfavorable entre uvsX y gp32 en un sistema dinámico dependiente de ATP.

La valoración de los componentes de la reacción revela que se requieren cantidades definidas de T4 gp32, T4 uvsX, T4 uvsY, ATP y PEG para la amplificación de ADN (Figura 38). De hecho, la proteína mediadora de la recombinasa T4 uvsY y el compuesto PEG (Carbowax 20M) son necesarios para lograr una amplificación detectable. A concentraciones reducidas de gp32, la eficiencia de la amplificación se ve afectada al generar manchas y escalonamientos de los productos de reacción. La proteína recombinasa uvsX es importante para la RPA y la velocidad de reacción se acelera a concentraciones más altas, aunque esto también puede aumentar los artefactos (Figura 39A). El ATP es importante para la reacción, y se ha encontrado que se necesita un sistema de regeneración de ATP para alcanzar niveles detectables de producto para la mayoría de las reacciones. A la inversa, ATP-γ-S es un poderoso inhibidor de la amplificación.

Para ser una herramienta útil para aplicaciones de amplificación de ADN de rutina, como las pruebas de diagnóstico, RPA debe ser sensible y específico, aplicable a diversos objetivos de secuencia y ser capaz de amplificar fragmentos de tamaño suficiente. Primero se investigó el tamaño de los productos que podrían generarse. Los productos amplificados de hasta 1000 pares de bases de tamaño podrían amplificarse utilizando condiciones de reacción estándar (Figura 38A). Los productos amplificados más grandes también pueden generarse utilizando RPA.

Se probó la sensibilidad de RPA en las condiciones más estrictas, utilizando una reacción de RPA de un solo paso, sin anidar, y detectando productos mediante tinción con bromuro de etidio convencional de geles de agarosa. Con varios conjuntos de cebadores/objetivos independientes, se detectó rutinariamente menos de 10 copias de la plantilla dúplex inicial. Hubo observación de la variabilidad entre los experimentos con el número más bajo de copias detectables, pero todos los intentos tuvieron éxito en detectar menos de 10 copias. Con el manejo adecuado de la muestra, RPA puede usarse para amplificar desde moléculas individuales hasta niveles detectables en una sola reacción. Para explorar esta posibilidad, amplificamos un marcador polimórfico de repetición en tándem simple (STR) del ADN humano diluido hasta que solo queden algunas copias. Generamos una serie de productos amplificados correspondientes a ambos posibles alelos presentes en la muestra de ADN (Figura 39E, F). Este efecto de separación alélica sugiere que RPA tiene una sensibilidad de molécula única y, por lo tanto, supera la sensibilidad de muchos otros métodos de amplificación de ADN.

El análisis de la cantidad de producto amplificado muestra que RPA amplificará rutinariamente las muestras de ADN por 10^{11-12} veces a partir de pequeñas cantidades de la plantilla de inicio. Los niveles finales del producto están típicamente en el rango de 10-250 nM, generando cantidades más que suficientes de ADN incluso para los protocolos de detección menos sensibles. Para evaluar la especificidad de las reacciones de amplificación, se ha analizado muchos pares de cebadores, la mayoría dirigidos a secuencias de ADN humano. Para cada conjunto de cebadores/plantillas, se ha probado los tamaños de producto predichos, los patrones de digestión con enzimas de restricción o la secuencia de ADN del producto para demostrar que la amplificación es específica. No se ha observado la amplificación de secuencias no diana del ADN de muestra a la mejor interpretación de los presentes datos. Los artefactos que se ha observado están relacionados con el producto o la cebador (Figura 39A).

A menudo en entornos de diagnóstico, los problemas de especificidad surgen de las grandes cantidades de ADN no objetivo presentes en una muestra. Por ejemplo, en la detección de patógenos, el ADN humano de las muestras de sangre puede interferir con la detección de ADN de patógenos. Por lo tanto, buscamos detectar cantidades traza de ADN objetivo en una gran masa de ADN no relacionado. Se encuentra que RPA fue capaz de amplificar un objetivo a niveles detectables de 100 copias de ADN de Bacillus subtilis en presencia de 1 µg de ADN humano (es decir, 10^8 veces menos ADN de B. subtilis que el ADN humano en masa). Con una masa tan grande de ADN de muestra, se encuentra que teníamos que aumentar los niveles de uvsX y uvsY en comparación con las reacciones equivalentes sin un exceso de ADN competidor para lograr una velocidad de reacción aceptable. Esto es quizás debido a la titulación de los componentes de búsqueda de homología.

En experimentos de curso de tiempo con varios conjuntos diferentes de cebadores/plantillas, se encuentra que la tasa de amplificación dependía parcialmente de la longitud del producto. Sin embargo, para fragmentos en el rango de 150-

400 pares de bases, se observaron tasas bastante similares, lo que permite la amplificación de cientos a miles de copias iniciales a niveles detectables en gel (~10^{12} copias) en tan solo 20 minutos). Se estima que se ha sido capaces de reducir los tiempos promedio de "ciclos" a tan solo 30 segundos en promedio para dichos fragmentos. Al utilizar secuencias objetivo óptimamente cortas y un método de detección sensible, se espera que un análisis de amplificación/detección de diagnóstico pueda realizarse bien dentro de una hora. Los presentes estudios muestran que para un gran número de dianas de ADN arbitrarias en muestras complejas se pueden diseñar fácilmente pares de cebadores de alta calidad. Se ha abordado la longitud mínima de oligonucleótidos y se encuentra que mientras que los oligonucleótidos de menos de 30 nucleótidos no amplifican el ADN de manera efectiva, los de 30-35 nucleótidos de longitud son excelentes cebadores y son lo suficientemente cortos para una fácil síntesis (Figura 40).Como se demuestra aquí, RPA es un excelente método general para amplificar secuencias específicas de ADN. Se ha demostrado que las reacciones de RPA se pueden monitorizar en tiempo real utilizando colorantes de unión de surco menor y demostrar una excelente capacidad para evaluar el número de copias objetivo de inicio. Además, se pueden coamplificar múltiples objetivos, y se pueden incluir fácilmente sensores de tiempo real específicos de secuencia ('terceras sondas') en el entorno de reacción. Se ha identificado y demostrado que las enzimas reparadoras de ADN como fpg, Nth y particularmente Nfo operan en reacciones RPA y pueden combinarse con sondas adecuadas para permitir la evaluación en tiempo real del comportamiento de la reacción de una manera específica de la secuencia. Se muestra que los sistemas de sonda basados en fluorescencia muestran propiedades notablemente diferentes en el entorno RPA a los entornos de reacción de PCR convencionales, o similares. Finalmente, los presentes experimentos iniciales indican que es fácil liofilizar los componentes de la reacción RPA para un almacenamiento y reconstitución convenientes (Figura 40). Este método, que funciona de manera robusta a bajas temperaturas constantes, puede liofilizarse para un fácil almacenamiento y no requiere ciclos térmicos ni fusión para una alta sensibilidad, ni otro manejo complejo, y se puede monitorizar fácilmente en tiempo real, ofrece un avance significativo en el desarrollo de diagnóstico de ADN, forenses y otras aplicaciones de punto de uso. Una vez que se integra con los sistemas portátiles de extracción de ADN y detección de productos, RPA debería permitir kits de pruebas clínicas o domésticas fáciles de usar para una variedad de patógenos (por ejemplo, Clamydia o MRSA), así como kits de campo para otras aplicaciones.

Los detalles de uno o más casos de la invención se han expuesto en la descripción adjunta anterior. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o prueba de la presente divulgación, ahora se describen los métodos y materiales preferidos. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

En la especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares incluyen referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. A menos que se indique expresamente lo contrario, las técnicas empleadas o contempladas en este documento son metodologías estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

Párrafos relevantes

1. Un proceso de amplificación de recombinasa polimerasa de amplificación de ADN de una molécula de ácido nucleico diana de doble cadena que comprende una primera y segunda cadena de ADN, que comprende las etapas de

(a) poner en contacto en una solución un agente de recombinasa uvsX con un primer y un segundo cebador de ácido nucleico para formar un primer y un segundo cebador de nucleoproteínas, en donde dichos cebadores de ácido nucleico comprenden una región de cadena sencilla en su extremo 3';

(b) poner en contacto el primer y el segundo cebadores nucleoproteínicos con dicha molécula de ácido nucleico diana de doble cadena, formando así:

(1) una primera estructura de doble cadena en una primera parte de dicha primera cadena y

(2) una segunda estructura de doble cadena en una segunda parte de dicha segunda cadena

de modo que los extremos 3' de dicho primer cebador de nucleoproteínas y dicho segundo cebador de nucleoproteínas están orientados uno hacia el otro en la misma molécula de ácido nucleico de plantilla doble de cadena;

(c) extender el extremo 3' de dicho primer y segundo cebador de nucleoproteínas con dNTP y una o más ADN polimerasas con propiedades de desplazamiento de cadena para generar un primer y segundo productos de ácido nucleico de doble cadena y una primera y segunda cadenas desplazadas de producto de ácido nucleico; y

(d) repetir (b) y (c) hasta que se alcance el grado de amplificación deseado; en donde el producto de ácido nucleico puede servir como la secuencia diana de doble cadena en la etapa (d);

en donde dicha solución comprende además una proteína de unión a ADN de cadena sencilla gp32 a una concentración suficiente para saturar el primer y segundo cebadores en la etapa (a);

en donde dicha solución comprende además un factor de carga de recombinasa uvsY a una concentración de entre 0.2 y 8 micromolar;

en donde dicha solución comprende además un agente de aglomeración en una concentración de entre 1% y 12%;

en donde dicho uno o más ADN polimerasa carecen de actividad exonucleasa 5' a 3' y carecen de actividad endonucleasa FLAP;

en donde dicha solución comprende además un trifosfato de nucleósido hidrolizable suficiente para soportar el desensamblaje y ensamblaje del filamento de ADN cargado con uvsX; y

en donde la reacción se realiza a una temperatura de entre 20ºC y 50ºC.

2. El proceso del párrafo 1, en donde dichas primera y segunda cadenas desplazadas del producto de ácido nucleico se convierten en ADN de doble cadena mediante una reacción de polimerasa recombinada concurrente con el primer o segundo cebador de nucleoproteínas.

3. El proceso del párrafo 1, en donde la primera y la segunda cadena de ácido nucleico desplazadas se convierten en ADN de doble cadena mediante:

(a) poner en contacto el primer o el segundo cebador con dicha cadena desplazada; y

(b) extender dicho primer o segundo cebador con dichas una o más polimerasas y dNTP.

4. El proceso del párrafo 4, en donde dicha etapa de contacto produce un híbrido dúplex de ADN.

5. El proceso del párrafo 1, en donde dichas primera y segunda cadenas desplazadas son al menos parcialmente complementarias entre sí y se hibridan para formar un ácido nucleico de doble cadena o parcialmente de doble cadena.

6. El proceso del párrafo 6, en donde el ácido nucleico parcialmente de doble cadena se convierte en un ácido nucleico completamente de doble cadena mediante una polimerasa y dNTP.

7. El proceso del párrafo 1, en donde la primera y segunda cadenas de ácido nucleico desplazadas comprenden dos regiones de ácido nucleico en su extremo 3' que pueden formar una estructura de horquilla autocebadora.

8. El proceso del párrafo 1, en donde dichos cebadores de ácido nucleico se seleccionan del grupo que consiste en ADN, ARN, ANP, LNA, ácido nucleico de la columna vertebral de morfolino, ácido nucleico de la cadena principal de fosforotiorato y una combinación de los mismos.

9. El proceso del párrafo 1, en donde el agente de recombinasa uvsX es una proteína de fusión que comprende una secuencia de etiqueta corta en el extremo N o C.

10. El proceso del párrafo 1, en donde el agente de recombinasa uvsX comprende una eliminación C terminal de residuos ácidos.

11. El proceso del párrafo 1, en donde el agente de recombinasa uvsX está presente en una concentración seleccionada del grupo que consta de entre aproximadamente 0.2 μM y aproximadamente 1 μM, entre aproximadamente 1 μM y aproximadamente 4 μM, entre aproximadamente 4 μM y aproximadamente 6 μM, y entre aproximadamente 6 μM y aproximadamente 12 μM.

12. El proceso del párrafo 1, en donde dicha solución comprende además uno o más agentes accesorios seleccionados del grupo que consiste en proteínas de unión de cadena sencilla, helicasa, topoisomerasa, resolvasa, RuvA, RuvB, RuvC, RecG, PriA, PriB, PriC, DnaT , DnaB, DnaC, DnaG, DnaX pinza cargadora, complejo de núcleo de polimerasa, ADN ligasa, una pinza deslizante, E. coli β-dímero pinza deslizante, PCNA eucariota corredera pinza, T4 pinza deslizante gp45, E. coli SSB proteína, gp32 proteína, gp32 con aminoácidos adicionales en el extremo N, gp32 con aminoácidos adicionales en el término C, gp32 con la sustitución de lisina 3 con un aminoácido no lisina y gp32 con la sustitución de arginina 4 con un aminoácido no arginina, y derivados y combinaciones de los mismos.

13. El proceso del párrafo 12, en donde los aminoácidos adicionales comprenden una etiqueta de poli His.

14. El proceso del párrafo 12, en donde dicho derivado se selecciona del grupo que consiste en gp32(N), gp32(C), gp32(C)K3A, gp32(C)R4Q, gp32(C)R4T, gp32K3A, gp32R4Q, gp32R4T y una combinación de los mismos.

15. El proceso del párrafo 12, en donde dicho agente estabilizante de cadena sencilla está presente en una concentración entre aproximadamente 1 μM y 20 μM.

16. El proceso del párrafo 1, en donde dicha T4 gp32 está en una concentración de entre 1 μM y 30 μM.

17. El proceso del párrafo 1, en donde dicho agente de aglomeración se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, alcohol polivinílico, dextrano, ficoll, PEG1450, PEG3000, PEG8000, PEG10000, compuesto de PEG con un peso molecular entre 15000 a 20000 daltons y derivados y combinaciones de los mismos.

18. El proceso del párrafo 17, en donde dicho polietilenglicol está entre 1 y 12% en peso o volumen de la reacción.

19. El proceso del párrafo 1, en donde los uvsY además comprenden una etiqueta poli-His en el extremo N o C.

20. El proceso del párrafo 1, en donde dicha solución comprende además un cofactor para el agente de recombinasa seleccionado del grupo que consiste en ATP, ATP análogo, ATP-γ-S y derivados y combinaciones de los mismos.

21. El proceso del párrafo 1, en donde dicha solución comprende además un sistema de regeneración de ATP para convertir ADP en ATP, un sistema para regenerar ADP a partir de AMP, pirofosfatasa o una combinación de los mismos.

22. El proceso del párrafo 21, en donde dicho sistema de regeneración de ATP comprende fosfocreatina y creatina quinasa, ADP-β-S, y una combinación de las mismas.

23. El proceso del párrafo 1, en donde la una o más ADN polimerasas se seleccionan del grupo que consiste en polimerasa procariota, polimerasa eucariota y polimerasa codificada en fagos.

24. El proceso del párrafo 23, en donde la polimerasa procariota se selecciona del grupo que consiste en el fragmento Klenow ADN polimerasa I de E. coli, el fragmento grande Bacylus stearothermophilus polimerasa I, la ADN polimerasa Phi-29, la ADN polimerasa T7, el fragmento grande Pol I de Bacillus subtilis, ADN polimerasa I de E. coli, ADN polimerasa II de E. coli, ADN polimerasa IV de E. coli, ADN polimerasa V de E. coli y una combinación de los mismos.

25. El proceso del párrafo 24, en donde al menos uno de dicha una o más ADN polimerasa es una proteína de fusión que comprende una secuencia de etiqueta corta en el extremo N o C.

26. El proceso del párrafo 1, en donde al menos un cebador de ácido nucleico comprende un enlace no fosfato entre las dos bases en su extremo 3' y es resistente a la actividad de la nucleasa 3' a 5' o al menos un ácido nucleico bloqueado en su 3' última base o penúltima base 3' o ambas.

27. El proceso del párrafo 1 en donde la molécula de ácido nucleico diana se selecciona del grupo que consiste en ácido nucleico superenrollado, ácido nucleico lineal con dos extremos y en donde ambos extremos están unidos a una molécula de ácido nucleico no diana, ácido nucleico lineal con dos extremos y en donde un extremo está unido a una molécula de ácido nucleico no diana, ácido nucleico lineal, ácido nucleico de cadena sencilla que se convierte en un ácido nucleico de doble cadena mediante una polimerasa y un ácido nucleico de doble cadena desnaturalizado por la acción del calor o tratamiento químico.

28. El proceso del párrafo 1, en donde el primer o segundo cebadores de ácido nucleico tienen al menos 20 residuos de longitud o al menos 30 residuos de longitud.

29. El proceso del párrafo 1, en donde dicho primer cebador de ácido nucleico y dicho segundo cebador de ácido nucleico están orientados con sus extremos 3' uno hacia el otro en la misma molécula de ácido nucleico de plantilla de doble cadena y en donde sus extremos 3' están separados por una distancia seleccionada del grupo que consta de entre 0 y 10 bases después del paso (b), 10 y 30 bases después del paso (b), entre 30 y 100 bases después del paso (b), más de 100 bases después del paso (b) y más de 1000000 de bases después del paso (b).

30. El proceso del párrafo 1, en donde dicho proceso se realiza en presencia de oligonucleótidos cortos, bloqueados en 3', con una secuencia complementaria a la región 3' del primer o segundo cebadores de ácido nucleico.

31. El proceso del párrafo 30, en donde los oligonucleótidos cortos están unidos al primer o al segundo cebadores de ácido nucleico a través de un enlazador covalente entre el extremo 5' del cebador de ácido nucleico y el extremo 3' o 5' del oligonucleótido corto.

32. El proceso del párrafo 1, en donde al menos un cebador de ácido nucleico contiene una región 5' corta no complementaria a la molécula de ácido nucleico diana, pero complementaria a una región 3' del mismo cebador.

33. El proceso del párrafo 1, en donde dicho proceso se realiza entre 20°C y 40°C o entre 20°C y 30°C.

34. El proceso del párrafo 1, en donde dicho proceso se realiza sin fusión inducida por la temperatura del ácido nucleico plantilla.

35. El proceso del párrafo 1, en donde el primer y el segundo cebadores nucleoproteínicos están presentes cada uno en una concentración molar que es al menos 1000 veces mayor que una concentración de la molécula de ácido nucleico diana.

36. El proceso del párrafo 1, en donde al menos un cebador de ácido nucleico comprende una o más bases que no son complementarias a la molécula de ácido nucleico diana en su extremo 5'.

37. El proceso del párrafo 36, en donde la una o más bases que no son complementarias del ácido nucleico diana comprende la secuencia de un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción.

38. El proceso del párrafo 1, en donde al menos un cebador de ácido nucleico es parcialmente de cadena sencilla y parcialmente de doble cadena, en donde dicho cebador comprende una cadena invasora más larga que posee una secuencia cebadora 3' específica y una cadena no invasora más corta, que es complementario al extremo 5' de la cadena invasora más larga.

39. El proceso del párrafo 1, en donde dicho primer cebador de ácido nucleico comprende una primera cadena invasora y una primera cadena no invasora y dicho segundo cebador de ácido nucleico comprende una segunda cadena invasora y una segunda cadena no invasora y dicha primera y segunda no invasoras cadena son complementarias entre sí.

40. El proceso del párrafo 39, en donde dicha cadena invasora, dicha cadena no invasora o ambas están marcadas con una unidad estructural detectable.

41. El proceso del párrafo 39, en donde tanto la cadena invasora como la cadena no invasora están marcadas y se detecta la separación de la cadena invasora y la cadena no invasora.

42. El proceso del párrafo 40, en donde dicho resto detectable se selecciona del grupo que consiste en un fluorocromo, una enzima, un inactivador de fluorescencia, un inhibidor enzimático, un marcador radiactivo y una combinación de los mismos.

43. El proceso del párrafo 39, en donde tanto dicha cadena invasora como dicha cadena no invasora están marcadas y en donde la cadena invasora está marcada con un primer fluorocromo o una primera enzima y en la que la cadena no invasora está marcada con un segundo fluorocromo, una segunda enzima, un detenedor de fluorescencia o un inhibidor de enzimas.

44. El proceso del párrafo 39 en donde tanto dicha cadena invasora como dicha cadena no invasora están marcadas y en donde la cadena no invasora está marcada con un primer fluorocromo o una primera enzima y en la que la cadena invasora está marcada con un segundo fluorocromo, una segunda enzima, un detenedor de fluorescencia o un inhibidor de enzimas.

45. El proceso del párrafo 1, en donde uno o ambos cebadores de ácido nucleico es un cebador de cadena sencilla.

46. El proceso del párrafo 45, en donde dicho cebador de ácido nucleico está marcado con un resto detectable seleccionado del grupo que consiste en un fluorocromo, una enzima, un inhibidor de fluorescencia, un inhibidor de enzimas, un marcador radiactivo y una combinación de los mismos.

47. El proceso del párrafo 1, en donde el agente de recombinasa uvsX es sensible a la temperatura, en donde dicho agente de recombinasa uvsX sensible a la temperatura posee actividad de invasión de cadena a una temperatura permisiva y no actividad de invasión de cadena a una temperatura no permisiva.

48. El proceso del párrafo 1, en donde dicho proceso amplifica dicho ácido nucleico diana en una cantidad seleccionada del grupo que consiste en al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, o al menos 1000000 de veces.

49. El proceso del párrafo 1 en donde dichos pasos (b) y (c) se repiten al menos una o al menos cinco veces.

50. El proceso del párrafo 1, en donde la molécula de ácido nucleico diana contiene al menos una mutación específica que está asociada con una enfermedad genética.

51. El proceso del párrafo 1, en donde la molécula de ácido nucleico diana está contenida en un organismo patógeno, un oncogén, un oncogén activado o un oncogén reprimido.

52. El proceso del párrafo 1, en donde al menos un cebador es complementario a una secuencia asociada con una enfermedad genética, una secuencia de ácido nucleico en un organismo patógeno, un oncogén, un oncogén activado o un oncogén reprimido.

53. Un proceso de amplificación de amplificación de recombinasa polimerasa anidada que comprende los pasos de:

(a) amplificar una región de ADN utilizando el proceso de amplificación de recombinasa polimerasa de la reivindicación 1 utilizando un primer y un segundo cebador para producir un primer producto amplificado;

(b) amplificar dicho producto amplificado utilizando un tercer y un cuarto cebador utilizando el proceso de amplificación de polimerasa con recombinasa del párrafo 1 para producir un segundo producto amplificado, en donde dicho segundo producto amplificado es una secuencia más pequeña contenida dentro de dicho primer producto amplificado.

54. El proceso del párrafo 53, en donde dicho primer cebador, dicho segundo cebador, dicho tercer cebador y dicho cuarto cebador son diferentes cada uno.

55. El proceso del párrafo 53 en donde dicho uno de dicho primer y dicho segundo cebador es idéntico a uno de dicho tercer y cuarto cebador.

56. Un proceso de amplificación de polimerasa por recombinasa de amplificación de ADN de una molécula de ácido nucleico diana, comprendiendo dicha molécula de ácido nucleico diana una primera y segunda cadena de ADN, que comprende las etapas de

(a) poner en contacto en una solución una proteína recombinasa uvsX con un cebador de ácido nucleico para formar un cebador de nucleoproteínas que comprende una región de cadena sencilla en su extremo 3';

(b) poner en contacto el cebador nucleoproteínico con dicha molécula de ácido nucleico diana, formando así una estructura de doble cadena en una porción de dicha molécula de ácido nucleico diana;

(c) extender un extremo 3' de dicho cebador nucleoproteínico con dNTP y una o más polimerasas con propiedades de desplazamiento de cadena para generar un producto de ácido nucleico de doble cadena y una cadena desplazada de producto de ácido nucleico; y

(d) repetir (b) y (c) hasta que se alcance el grado de amplificación deseado;

en donde el producto de ácido nucleico puede servir como la secuencia diana de doble cadena en la etapa (d);

en donde dicha solución comprende además una proteína de unión a ADN de cadena sencilla gp32 a una concentración suficiente para saturar los cebadores de nucleoproteínas en la etapa (a);

en donde dicha solución comprende además un factor de carga de recombinasa uvsY a una concentración entre 0.2 y 8 micromolar;

en donde dicha solución comprende además un agente de aglomeración en una concentración entre 1% y 12%;

en donde dicha una o más polimerasas carece de actividad exonucleasa 5' a 3' y carece de actividad endonucleasa FLAP;

en donde dicha solución comprende además un trifosfato de nucleósido hidrolizable suficiente para soportar el desensamblaje y ensamblaje del filamento de ADN cargado con uvsX; y

en donde una fracción de dichos dNTPs comprende dNTPs que terminan en cadena;

en donde al menos una fracción de dichos dNTP se marca con un marcador detectable.

57. Un proceso de detección de la presencia o ausencia de un producto de ácidos nucleicos amplificados por amplificación de polimerasa recombinada en una muestra, que comprende los pasos de:

(a) poner en contacto en la solución un agente T4 recombinasa con un primer y segundo cebador de ácido nucleico para formar un primer y segundo cebador de nucleoproteínas, en donde dicho cebador de ácido nucleico comprende una región de cadena sencilla en su 3', en donde dicho primer cebador de ácido nucleico está marcado con un primer miembro de un primer par de unión, y en donde dicho segundo cebador de ácido nucleico está marcado con un primer miembro de un segundo par de unión;

(b) poner en contacto el primer y el segundo cebador nucleoproteínico con una muestra para formar un complejo del primer y segundo cebador nucleoproteínico y el producto de amplificación;

(c) poner en contacto dicho complejo con un primer soporte sólido móvil revestido con un segundo miembro de dicho primer par de unión y un segundo soporte sólido móvil cubierto con un segundo miembro de dicho segundo par de unión;

(d) determinar si dicho primer soporte sólido móvil está colocalizado con dicho segundo soporte sólido móvil para determinar la presencia de dicho producto de ácido nucleico amplificado por amplificación;

en donde el factor de carga de recombinasa T4 uvsY se incluye en la reacción a una concentración de entre 0.2 y 8 micromolar;

en donde se incluye un agente de aglomeración en una concentración entre 1% y 12%;

en donde se emplea un trifosfato de nucleósido hidrolizable para soportar la actividad de recombinasa de modo que los filamentos de ADN cargados con uvsX sean capaces de desensamblar y ensamblar de manera eficiente.

58. El proceso del párrafo 57, en donde el primer cebador de ácido nucleico tiene la misma secuencia de ácido nucleico que un cebador utilizado para producir el producto de amplificación, o en donde el segundo cebador de ácido nucleico tiene la misma secuencia de ácido nucleico que un cebador utilizado para producir el producto de amplificación o ambos.

59. El proceso del párrafo 57, en donde el primer o segundo cebador está asociado con el ADN objetivo mediante la formación de una triple hélice mediada por una recombinasa después de la amplificación del objetivo mediante una reacción de amplificación de la polimerasa recombinada.

60. Un proceso de amplificación de recombinasa polimerasa de amplificación de ADN de una molécula diana de doble cadena que comprende los pasos de:

(a) poner en contacto en solución un agente de recombinasa seleccionado del grupo que consiste en uvsX y recA con un primer y un segundo cebador de ácido nucleico para formar un primer y un segundo cebadores de nucleoproteínas;

(b) poner en contacto el primer y segundo cebadores nucleoproteínicos con dicha molécula de ácido nucleico diana de doble cadena, formando así una primera estructura de doble cadena en una primera porción de dicha molécula de ácido nucleico diana y una segunda estructura de doble cadena en una segunda porción de dicho ácido nucleico diana molécula tal que los extremos 3' de dicho primer cebador de ácido nucleico y dicho segundo cebador de ácido nucleico están orientados uno hacia el otro en la molécula de ácido nucleico plantilla;

(c) poner en contacto dicha molécula de ácido nucleico diana con proteínas de ensamblaje de primosomas y un complejo de holoenzima cargadora/polimerización para formar una horquilla de replicación en dicha primera porción de la molécula de ácido nucleico diana y una segunda horquilla de replicación en dicha segunda porción del ácido nucleico diana molécula;(d) poner en contacto dicha molécula diana con un núcleo de ADN polimerasa III, una ADN polimerasa I, una primasa, una helicasa y una ligasa para permitir la síntesis de ADN de la cadena guía y de retardo acoplada y la migración de cada horquilla de replicación entre sí; y

(e) repetir (b), (c) y (d) hasta que se alcance el grado de amplificación deseado;

en donde se incluye una proteína de unión a ADN de cadena sencilla gp32 a una concentración al menos suficiente para saturar el primer y segundo cebadores de ácido nucleico en solución en la etapa (a);

en donde el factor de carga de recombinasa uvsY o los productos de los genes recO y recR de E. coli se incluyen en la reacción a una concentración de entre 0.2 y 8 micromolar;

en donde se incluye un agente de aglomeración en una concentración de al menos 1% a 12%; en donde se emplea un trifosfato de nucleósido hidrolizable para soportar la actividad de recombinasa de modo que los filamentos de ADN cargados con recombinasa sean capaces de desensamblar y ensamblar de manera eficiente.

61. El proceso del párrafo 60, que se realiza en presencia de dNTP, rNTP, proteína de unión a ADN de cadena sencilla o una combinación de los mismos.

62. El proceso del párrafo 60, en donde dichas proteínas de ensamblaje de primosomas se seleccionan del grupo que consiste en la holoenzima PriA, PriB, PriC, DnaT, DnaC, DnaB, DnaG, Pol III y una combinación de las mismas.

63. El proceso del párrafo 60, en donde el cargador de pinza es un complejo de cargador de pinza DnaX.

64. El proceso del párrafo 60, en donde la ADN polimerasa III holoenzima es la polimerasa III de E. coli.

65. El proceso del párrafo 60, en donde la ADN polimerasa I es la polimerasa I de E. coli.

66. El proceso del párrafo 60, en donde la primasa es E. coli DnaG primasa.

67. El proceso del párrafo 60, en donde la helicasa es E. coli DnaB helicasa.

68. Un proceso de amplificación de la polimerasa con recombinasa de amplificación de ADN que comprende los pasos de:

(a) combinar los siguientes reactivos en una solución

(1) al menos una recombinasa;

(2) al menos una proteína de unión a ADN de cadena sencilla;

(3) al menos una ADN polimerasa;

(4) dNTPs o una mezcla de dNTPs y ddNTPs

(5) un agente de aglomeración;

(6) un regulador;

(7) un agente reductor;

(8) ATP o análogo de ATP hidrolizable;

(9) al menos una proteína de carga de recombinasa;

(10) un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador; y

(11) una molécula de ácido nucleico diana; y

(b) incubar dicha solución hasta lograr un grado de amplificación deseado.

69. El proceso del párrafo 68, en donde dicha recombinasa se selecciona del grupo que consiste en uvsX, recA y derivados y combinaciones de los mismos.

70. El proceso del párrafo 68, en donde dicha recombinasa es una proteína de fusión que comprende una secuencia de etiqueta corta en un extremo N o C.

71. El proceso del párrafo 68, en donde la recombinasa comprende una eliminación C terminal de residuos ácidos.

72. El proceso del párrafo 68, en donde la recombinasa está presente en una concentración seleccionada del grupo que consiste en entre aproximadamente 0.2 µM y aproximadamente 1 µM, entre aproximadamente 1 µM y aproximadamente 4 µM, entre aproximadamente 4 µM y aproximadamente 6 µM, entre aproximadamente 6 µM y aproximadamente 12 µM, y entre aproximadamente 0.2 µM y aproximadamente 12 µM.

73. El proceso del párrafo 68, en donde dicha proteína de unión a ADN de cadena sencilla se selecciona del grupo que consiste en gp32, y derivados y combinaciones de los mismos.

74. El proceso del párrafo 73, en donde dicho derivado gp32 se selecciona del grupo que consiste en gp32(N), gp32(C), gp32(C)K3A, gp32(C)R4Q, gp32(C)R4T, gp32K3A, gp32R4Q, gp32R4T y una combinación de los mismos.

75. El proceso del párrafo 68, en donde dicha proteína de unión a ADN de cadena sencilla está presente en una concentración de entre 1 µM y 30 µM.

76. El proceso del párrafo 68, en donde dicha ADN polimerasa es una polimerasa eucariota o una polimerasa procariota.

77. El proceso del párrafo 76, en donde dicha polimerasa eucariota se selecciona del grupo que consiste en pol-α, pol-β, pol-δ, pol-ε y derivados y combinaciones de los mismos.

78. El proceso del párrafo 76, en donde dicha polimerasa procariota se selecciona del grupo que consiste en el fragmento Klenow ADN polimerasa I de E. coli, el bacteriófago T4 gp43 ADN polimerasa, la polimerasa Bacillus stearothermophilus polimerasa I, la polimerasa de ADN Phi-29, la polimerasa de ADN T7 Bsu Pol I, ADN polimerasa I de E. coli, ADN polimerasa II de E. coli, ADN polimerasa III de E. coli, ADN polimerasa IV de E. coli, ADN polimerasa V de E. coli y derivados y combinaciones de los mismos.

79. El proceso del párrafo 68, en donde dicha ADN polimerasa es una proteína de fusión que comprende una secuencia de etiqueta corta en el extremo N o C.

80. El proceso del párrafo 79, en donde dicha ADN polimerasa está en una concentración de entre 10000 unidades/ml a 16 unidades/ml o entre 5000 unidades/ml a 500 unidades/ml.

81. El proceso del párrafo 68, en donde la una o más ADN polimerasa incluye al menos una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3'-5'.

82. El proceso del párrafo 68, en donde dicha una o más ADN polimerasa comprende una ADN polimerasa con propiedades de desplazamiento de cadena.

83. El proceso del párrafo 68, en donde dicho dNTP está en una concentración de 1 mM a 40 µm.

84. El proceso del párrafo 68, en donde dicho agente de aglomeración es polietilenglicol, dextrano, ficoll o una combinación de los mismos.

85. El proceso del párrafo 84, en donde dicho polietilenglicol está entre el 1 y el 12% de un peso o un volumen de la reacción.

86. El proceso del párrafo 85, en donde dicho polietilenglicol se selecciona del grupo que consiste en PEG1450, PEG3000, PEG8000, PEG10000, mezcla de PEG con un peso molecular entre 15000 a 20000 daltons, y una combinación de los mismos.

87. El proceso del párrafo 68, en donde dicho regulador es un regulador Tris-HCl, un regulador Tris-Acetato, o una combinación de los mismos.

88. El proceso del párrafo 87, en donde dicho regulador está en una concentración de entre 10 a 60 mM y a un pH de entre 6.5 y 9.0.

89. El proceso del párrafo 68, en donde dicho agente reductor es DTT.

90. El proceso del párrafo 68, en donde dicho agente reductor está en una concentración de 1 a 10 mM.

91. El proceso del párrafo 68, en donde dicho ATP o análogo de ATP se selecciona del grupo que consiste en ATP, ATP-γ-S, ATP-β-S y ddATP.

92. El proceso del párrafo 91 en donde dicho ATP o análogo de ATP está en una concentración de 1 a 10 mM.

93. El proceso del párrafo 68, en donde dicha proteína de carga de recombinasa se selecciona del grupo que consiste en T4uvsY, E. coli recO, E. coli recR y derivados y combinaciones de los mismos.

94. El proceso del párrafo 68, en donde dicha proteína de carga de recombinasa comprende además una etiqueta poli-His en el extremo N, un extremo C, o tanto en el extremo N como en el extremo C.

95. El proceso del párrafo 68, en donde dicha proteína de carga de recombinasa está en una concentración entre 0.2 y 8 μM.

96. El proceso del párrafo 68, en donde el primer o segundo cebador comprende ADN, ARN, ANP, LNA, ácido nucleico de la cadena principal morfolino, ácido nucleico de la cadena principal de fosforotiorato o una combinación de los mismos.

97. El proceso del párrafo 68, en donde dicho primer o segundo cebador está en una concentración entre 100 nM y 1000 nM

98. El proceso del párrafo 68, en donde el primer o segundo cebador comprende un enlace no fosfato entre las dos bases en su extremo 3' y es resistente a la actividad de nucleasa 3' a 5'.

99. El proceso del párrafo 68, en donde el primer o segundo cebador comprende al menos un ácido nucleico bloqueado en su base final 3' o base penúltima 3'.

100. El proceso del párrafo 68, en donde el primer o segundo cebador tiene al menos 20 bases de longitud.

101. El proceso del párrafo 68, en donde el primer o segundo cebador tiene una longitud de al menos 30 bases.

102. El proceso del párrafo 68, en donde el primer o segundo cebador comprende además una o más bases en su extremo 5' que no son complementarias al ácido nucleico diana.

103. El proceso del párrafo 102, en donde dichas una o más bases comprenden la secuencia de un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción.

104. El proceso del párrafo 68, en donde dicho primer o segundo cebador es parcialmente de doble cadena con una región de cadena sencilla en su extremo 3'.

105. El proceso del párrafo 68, en donde al menos un cebador está marcado con una etiqueta detectable.

106. El proceso del párrafo 105, en donde dicha etiqueta detectable se selecciona del grupo que consiste en un fluorocromo, una enzima, un inactivador de fluorescencia, un inhibidor de enzimas, una etiqueta radioactiva y una combinación de los mismos.

107. El proceso del párrafo 68, en donde la molécula de ácido nucleico diana se selecciona del grupo que consiste en ácido nucleico superenrollado, ácido nucleico lineal con dos extremos y en donde ambos extremos están unidos a una molécula de ácido nucleico no diana, ácido nucleico lineal con dos extremos y en donde un extremo está vinculado a una molécula de ácido nucleico no objetivo, ácido nucleico lineal y una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que se convierte en un ácido nucleico de doble cadena mediante una polimerasa o un ácido nucleico de doble cadena desnaturalizado por la acción del tratamiento térmico o químico.

108. El proceso del párrafo 68, en donde el ácido nucleico diana está en una concentración de menos de 1000 copias por ml o entre 1 y 10 copias por reacción.

109. El proceso del párrafo 68, en donde dicha incubación dura entre 5 minutos y 16 horas.

110. El proceso del párrafo 68, en donde dicha incubación dura entre 15 minutos y 3 horas.

111. El proceso del párrafo 68, en donde dicha incubación dura entre 30 minutos y 2 horas.

112. El proceso del párrafo 68, en donde dicha incubación se realiza hasta que se alcanza el grado de amplificación deseado.

113. El proceso del párrafo 112 en donde dicho grado de amplificación deseado se selecciona del grupo que consiste en al menos 10 veces, al menos 100 veces, al menos 1000 veces, al menos 10000 veces, al menos 100.000 veces y al menos 1000000 de veces.

114. El proceso del párrafo 68, en donde dicha incubación se realiza entre 20°C y 50°C, entre 20°C y 40°C, o entre 20°C y 30°C.

115. El proceso del párrafo 68, que se realiza sin fusión por temperatura, del ácido nucleico plantilla.

116. El proceso del párrafo 68, en donde la etapa (a) comprende además un agente accesorio.

117. El proceso del párrafo 116, en donde dicho agente accesorio se selecciona del grupo que consiste en helicasa, topoisomerasa, resolvasa y una combinación de las mismas.

118. El proceso del párrafo 116, en donde el agente accesorio se selecciona del grupo que consiste en RuvA, RuvB, RuvC, RecG, PriA, PriB, PriC, DnaT, DnaB, DnaC, DnaG, DnaX, complejo de núcleo de polimerasa, ADN ligasa, una pinza deslizante, un complejo de holoenzima ADN polimerasa III que consiste en una pinza β, un cargador de pinza DnaX y un complejo de núcleo de polimerasa.

119. El proceso del párrafo 118, en donde dicha pinza deslizante es la pinza deslizante de dímero β de E. coli, la pinza deslizante de PCNA eucariota, o la pinza deslizante de T4 gp45 y una combinación de las mismas.

120. El proceso del párrafo 68, en donde la etapa (a) comprende además un agente estabilizador de filamentos de nucleoproteína RecA/ADNss.

121. El proceso del párrafo 120, en donde dicho agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en RecR, RecO, RecF y una combinación de los mismos.

122. El proceso del párrafo 120, en donde dicho agente estabilizador está en una concentración de entre 0.01 μM y 20 μM.

123. El proceso del párrafo 68, en donde dicha solución comprende además un sistema de regeneración de ATP para convertir ADP en ATP, un sistema para regenerar ADP a partir de AMP, un sistema para convertir pirofosfato en fosfato, o una combinación de los mismos.

124. El proceso del párrafo 123, en donde dicho sistema de regeneración de ATP comprende fosfocreatina y creatina quinasa.

125. El proceso del párrafo 68, en donde uno o más reactivos se liofilizan antes de dicha etapa (a), dichos reactivos se seleccionan del grupo que consiste en la recombinasa, la proteína de unión a ADN de cadena sencilla, la ADN polimerasa, los dNTP o la mezcla de dNTPs y ddNTPs, el agente reductor, el ATP o el análogo de ATP, la proteína de carga de recombinasa, el agente de aglomeración, el regulador, las sales, el DTT y el primer cebador y, opcionalmente, un segundo cebador o una combinación de los mismos.

126. Un proceso de amplificación de polimerasa con recombinasa de amplificación de ADN que comprende los pasos de:

(a) combinar los siguientes reactivos en una reacción

(1) una recombinasa uvsX a una concentración de entre 0.2 y 12 μM;

(2) una proteína de unión a ADN de cadena sencilla gp32 a una concentración entre 1 y 30 μM;

(3) polimerasa Bsu a una concentración entre 50 y 5000 unidades por ml;

(4) dNTP o una mezcla de dNTP y ddNTP a una concentración de entre 1-500 μM;

(5) polietilenglicol en una concentración de entre el 1% y el 12% en peso o en volumen;

(6) regulador de trisacetato en una concentración de entre 25 mM y 60 mM;

(7) DTT a una concentración de entre 1 mM-10 mM;

(8) ATP en una concentración de entre 1.5 mM-5 mM;

(9) uvsY a una concentración de entre 0.2 µM-8 µM;

(10) un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador, en donde dichos cebadores están en una concentración de entre 10 nM y 1 µM; y

(11) una molécula de ácido nucleico diana de al menos una copia;

(b) incubar dicha reacción hasta lograr el grado de amplificación deseado.

127. Un proceso de amplificación de la polimerasa con recombinasa de amplificación de ADN que comprende los pasos de:

(a) combinar los siguientes reactivos en una reacción;

(1) 100-200 ng/µl de uvsX recombinasa;

(2) 600 ng/µl de gp32;

(3) 20 ng/µl de polimerasa Bsu;

(4) dNTP 200/uM;

(5) 1 mM de DTT

(6) 3. ATP mM o un análogo de ATP hidrolizable;

(7) 16 ng/µl a 60 ng/µl uvsY

(8) 300 nM de un primer cebador y 300 nM de un segundo cebador;

(9) Acetato de potasio 100 mM

(10) Acetato de magnesio 8-16 mM

(11) Fosfocreatina 25 mM

(12) 100 ng/µl de creatina quinasa

(b) liofilizar los reactivos de dicha etapa (a) para formar reactivos liofilizados;

(c) reconstituir dichos reactivos liofilizados con

(1) regulador de trisacetato en una concentración de entre 1 mM y 60 mM;

(2) polietilenglicol en una concentración de entre el 1% y el 12% en peso o en volumen;

(3) un ácido nucleico diana;

(d) incubar dicha reacción hasta que se alcance un grado de amplificación deseado.

128. Un proceso de amplificación de la polimerasa con recombinasa de amplificación de ADN que comprende los pasos de:

(a) combinar los siguientes reactivos en una reacción;

(1) 100-200 ng/µl de uvsX recombinasa;

(2) 300-1000 ng/µl de gp32;

(3) 10-50 ng/µl de polimerasa Bsu o polimerasa T4;

(4) 50-500 µM dNTPs;

(5) DTT de 0.1 a 10 mM

(6) ATP 3 mM o un análogo de ATP hidrolizable;

(7) 16 ng/µl a 60 ng/µl uvsY

(8) 50-1000 nM de un primer cebador y 50-1000 nM de un segundo cebador;

(9) 40-160 mM acetato de potasio

(10) Acetato de magnesio 5-20 mM

(11) Fosfocreatina 10-40 Mm

(12) 50-200 ng/µl de creatina quinasa

(b) liofilizar los reactivos de dicha etapa (a) para formar reactivos liofilizados;

(c) reconstituir dichos reactivos liofilizados con

(1) regulador de trisacetato en una concentración de entre 1 mM y 60 mM;

(2) polietilenglicol en una concentración de entre el 1% y el 12% en peso o en volumen;

(3) un ácido nucleico diana;

(d) incubar dicha reacción hasta que se alcance un grado de amplificación deseado.

129. Un proceso de amplificación de la polimerasa con recombinasa de amplificación de ADN que comprende los pasos de:

(a) combinar los siguientes reactivos en una reacción;

(1) 100-200 ng/µl de uvsX recombinasa;

(2) 300-1000 ng/µl de gp32;

(3) 10-50 ng/µl de polimerasa Bsu o polimerasa T4;

(4) 50-500 µM dNTPs;

(5) DTT de 0.1 a 10 Mm

(6) ATP 3 mM o un análogo de ATP;

(7) 16 ng/µl a 60 ng/µl uvsY

(8) 50-1000 nM de un primer cebador y 50-1000 nM de un segundo cebador;

(9) 40-160 mM acetato de potasio

(10) Acetato de magnesio 5-20 Mm

(11) Fosfocreatina 10-40 Mm

(12) 50-200 ng/µl de creatina quinasa

(13) polietilenglicol en una concentración de entre el 1% y el 12% en peso o en volumen

(b) liofilizar los reactivos de dicha etapa (a) para formar reactivos liofilizados;

(c) reconstituir dichos reactivos liofilizados con

(1) regulador de trisacetato en una concentración de entre 1 mM y 60 mM;

(2) un ácido nucleico diana;

(d) incubar dicha reacción hasta que se alcance un grado de amplificación deseado.

130. El proceso de los párrafos 127, 128 o 129, en donde se añade trehalosa al reactivo antes de la liofilización.

131. El proceso de acuerdo con el párrafo 130, en donde se agrega trehalosa al reactivo a una concentración de entre 10 mM y 200 mM.

132. Un proceso RPA de amplificación de ADN de una secuencia diana de doble cadena, comprendiendo dicha secuencia diana una primera y una segunda cadena de ADN, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

(a) poner en contacto un agente de recombinasa con un primer y un segundo cebador de ácido nucleico para formar un primer y un segundo cebador de nucleoproteínas;

(b) poner en contacto los cebadores nucleoproteínicos primero y segundo con dicha secuencia diana de doble cadena, formando así una primera estructura de doble cadena en una primera porción de dicha primera cadena y formando una estructura de doble cadena en una segunda porción de dicha segunda cadena de manera que el 3' los extremos de dicho primer cebador de ácido nucleico y dicho segundo cebador de ácido nucleico están orientados uno hacia el otro en la misma molécula de ácido nucleico plantilla;

(c) extender el extremo 3' de dicho primer y segundo cebador de nucleoproteínas con una o más polimerasas y dNTP para generar un primer y segundo ácido nucleico de doble cadena y una primera y segunda cadena de ácido nucleico desplazada;

(d) continuar la reacción mediante la repetición de (b) y (c) hasta alcanzar el grado de amplificación deseado

en donde el ácido nucleico de doble cadena generado puede servir como secuencia diana de doble cadena.

133. El proceso del párrafo 132, en donde dichos primer o segundo cebadores de ácido nucleico tienen una longitud que está por debajo de la longitud requerida para que el intercambio óptimo de cadenas disminuya las reacciones de amplificación no específicas.

134. El proceso del párrafo 132, en donde dichos primer o segundo cebadores de ácido nucleico tienen una longitud de entre 25 y 29 residuos o de entre 16 y 24 residuos.

135. El proceso del párrafo 132, que comprende además la etapa de ligar la secuencia de ácido nucleico adicional a al menos un extremo de dicho ácido nucleico diana antes de la etapa (b) para reducir el cebado en retroplegamiento o para modular la tasa de recombinación/elongación de la nucleoproteína.

136. El proceso del párrafo 132 en donde dichos primer o segundo cebadores de ácido nucleico comprenden uno o más residuos de azúcares modificados.

137. El proceso del párrafo 136, en donde dichos residuos de azúcar modificados se seleccionan del grupo que consiste en ácido nucleico bloqueado, ribosa, 2'-O-metil ribosa, residuos de azúcar acíclicos y una combinación de los mismos.

138. El proceso del párrafo 136, en donde dicho residuo de azúcar modificado se encuentra en la posición 3' del cebador.

139. El proceso del párrafo 132, que comprende además la etapa de monitorizar la concentración total de ADN con un sensor durante dicho proceso.

140. El proceso del párrafo 139, en donde dicho sensor detecta la concentración de ADN mediante mediciones de fluorescencia, detecta una fluorescencia de SYBR dorado, o SYBR verde, detecta la concentración de ADN en una secuencia específica o una combinación de las mismas.

141. El proceso del párrafo 139, en donde el sensor funciona por hibridación con objetivos de cadena sencilla en la reacción.

142. El proceso del párrafo 141, en donde dicha hibridación es ayudada por agentes de fusión/fusionamiento tales como proteínas de unión a ADN de cadena sencilla o recombinasa.

143. El proceso del párrafo 139 en donde el sensor funciona por medio de la segmentación mediada por recombinasa a dianas de ADN de doble cadena.

144. El proceso del párrafo 139, en donde el sensor comprende dos o más oligonucleótidos específicos de secuencia marcados con fluorescencia que se someten a una transferencia de energía de resonancia de fluorescencia específica solo cuando se hibridan con sitios diana adyacentes en el ADN objetivo.

145. El proceso del párrafo 139, en donde un fluoróforo presente en el sensor se separa de un detenedor también conectado al sensor por la acción de una nucleasa que funciona solo cuando el sensor está unido a su sitio diana.

146. El proceso del párrafo 145, en donde en la nucleasa es una nucleasa de doble cadena.

147. El proceso del párrafo 146, en donde dicha nucleasa de doble cadena es una endonucleasa de restricción.

148. El proceso del párrafo 132, en donde dicho proceso RPA se inicia o controla mediante una fotodesprotección impulsada por luz de una o más sustancias enjauladas.

149. El proceso del párrafo 148, en donde dicha sustancia enjaulada es ATP enjaulado u oligonucleótidos enjaulados.

150. El proceso del párrafo 148 en donde uno o más de dichos cebadores, ATP o nucleótidos es una molécula enjaulada y en donde las etapas (a), (b) o (c) están controladas o iniciadas por fotodesprotección mediada por luz de dicha molécula enjaulada para producir moléculas no enjauladas.

151. El proceso del párrafo 148 en donde se monitoriza la concentración de moléculas no enjauladas.

152. El proceso del párrafo 148, en donde dicha molécula no enjaulada se consume en uno o más ciclos de RPA, lo que detiene dicha reacción de RPA hasta que se producen moléculas sin enjaular adicionales.

153. El proceso del párrafo 148 en donde dicha molécula enjaulada se selecciona del grupo que consiste en ATP enjaulado, dATP enjaulado y UTP enjaulado.

154. El proceso del párrafo 132, en donde uno o más de dichos cebadores, ATP o NTP están en una concentración que solo puede soportar un ciclo de los pasos (a), (b) o (c), y en donde los pasos adicionales de (a) (b) y (c) se inician mediante la adición de una nueva cantidad de uno o más de dichos cebadores, ATP o NTP.

155. El proceso del párrafo 154, en donde dicha nueva cantidad de uno o más de dichos cebadores, ATP o NTP se suministra a una concentración que solo puede soportar un ciclo de los pasos (a), (b) o (c).

156. El proceso del párrafo 154 en donde dicha nueva cantidad de uno o más de dichos cebadores, ATP o NTP se suministra mediante la acción de un sistema enzimático.

157. El proceso de acuerdo con el párrafo 132 en donde dicho proceso de RPA se realiza en presencia de un sistema enzimático seleccionado del grupo que consiste en: una enzima para eliminar el ADP que se acumula en la reacción por su conversión directa a un compuesto que no regula la actividad de recombinasa; un sistema enzimático para eliminar ADP que se acumula en la reacción por su conversión directa a un compuesto que no es ADP, ATP o un equivalente; un sistema enzimático para convertir todo ADP en ATP para reducir la concentración de ADP en dicha reacción; un sistema enzimático para reducir el ATP en dicho proceso para detener la reacción de RPA después de los pasos (b) y (c) y en donde los pasos de adición (b) y (c) se inician con la adición de ATP.

158. El proceso del párrafo 157, en donde dicha adición de ATP se realiza mediante la eliminación de un ATP enjaulado.

159. El proceso del párrafo 158, en donde dicha ATP enjaulado no se enjaula por excitación con luz.

160. El proceso del párrafo 159, en donde dicha excitación con luz conduce a un aumento de concentración efectivo de ATP entre 10 µM y 30 µM, ATP 30 µM a 60 µM, ATP 60 µM a 90 µM, ATP 90 µM a 200 µM, ATP 200 µM hasta 500 µM o ATP 500 µM hasta 3000 µM.

161. El proceso del párrafo 132 o 160, en donde la concentración de ATP en la reacción se controla mediante un sensor.

162. El proceso del párrafo 161, en donde dicho sensor de ATP comprende luciferasa y luciferina.

163. El proceso del párrafo 132, en donde dichos cebadores comprenden un alto contenido de citosina para mejorar la interacción de la recombinasa.

164. El proceso del párrafo 163, en donde dicho contenido de citosina es superior al 75% de las bases del cebador.

165. El proceso del párrafo 132, que se realiza en una matriz de gel que restringe la movilidad del ácido nucleico de plantilla y el producto RPA.

166. El proceso del párrafo 165, en donde dicha matriz de gel es una matriz de gel polonia.

167. Un proceso de RPA anidada que comprende los pasos de:

(a) realizar una reacción RPA del párrafo 132 en presencia de un primer par de cebadores externos y un segundo par de cebadores internos en dicha etapa (a);

en donde dicho primer par de cebadores externos comprende una secuencia de ácido nucleico tal que los extremos 3' de dicho par de cebadores externos están orientados uno hacia el otro en la misma molécula de ácido nucleico de plantilla después de la etapa (b);

en donde dicho segundo par de cebadores internos comprende una secuencia de ácido nucleico tal que los extremos 3' de dicho par de cebadores internos están orientados uno hacia el otro en la misma molécula de ácido nucleico de plantilla después de la etapa (b),

además, en donde dicho segundo par de cebadores internos se hibrida con el ácido nucleico diana en una ubicación que está dentro de la ubicación de hibridación de dicho primer par de cebadores externos.

168. El proceso del párrafo 167, en donde el primer par de cebadores externos admite una cinética de amplificación más rápida debido a la longitud o composición en comparación con el par de cebadores internos.

169. El proceso del párrafo 167, en donde el primer par de cebadores externos se encuentra en una concentración que es menor que la concentración del segundo par de cebadores internos.

170. El proceso del párrafo 167, en donde al menos un cebador es inmovilizado o inmovilizable y al menos otro cebador es un cebador marcado, y la hibridación del primer cebador con el segundo cebador se determina después de la etapa (d).

171. El proceso del párrafo 170, en donde el cebador inmovilizable y el cebador marcado son los únicos cebadores en dicha reacción de RPA.

172. El proceso de acuerdo con el párrafo 170 en donde el cebador inmovilizable se hibrida a una secuencia única dentro de un ADN generado por 2 o más cebadores en la reacción de RPA.

173. El proceso del párrafo 170, en donde dicho cebador inmovilizable es un cebador de fondo que permite la captura estable del producto a través de la formación de un dúplex migrable no ramificado.

174. El proceso del párrafo 170, en donde el cebador marcado es un cebador de fondo que permite la captura estable del producto a través de la formación de un dúplex migrable no ramificado.

175. El proceso del párrafo 167, en donde dicho proceso se realiza en presencia de dUTP, de manera que el dUTP se incorpora al producto RPA, en donde dicho producto RPA es susceptible a una desglucosilasa dUTP.

176. El proceso del párrafo 167 comprende además el paso de monitorizar dicha reacción de RPA al monitorizar la fluorescencia de un cebador, en donde uno de dicho cebador es una sonda de oligonucleótido doble marcada que consiste en un fluoróforo y un detenedor separados por una distancia de no más de 10 a 12 residuos, de modo que el interruptor es más eficiente cuando el cebador está en el estado no hibridado que en el estado hibridado.

177. El proceso del párrafo 167, en donde comprende además la etapa de monitorizar dicha reacción RPA mediante el monitorización de la fluorescencia de un cebador, en donde uno de dicho cebador es una sonda de oligonucleótido doble marcada que consiste en un fluoróforo y un detenedor separados por una distancia de no más de 10-12 residuos y en donde la fluorescencia aumenta como consecuencia de la actividad de la nucleasa que actúa preferentemente en los híbridos dúplex entre la sonda y el objetivo, lo que conduce finalmente a una menor asociación entre el inhibidor y el fluoróforo.

178. El proceso del párrafo 167, en donde uno o más de los cebadores está inicialmente bloqueado en 3' y contiene un residuo de tetrahidrofuranilo, y en donde una proteína Nfo de E. coli o equivalente funcional está presente en dicho proceso de RPA, en donde el oligonucleótido bloqueado forma híbridos dúplex con el ADN objetivo y posteriormente se procesan mediante la proteína Nfo u homólogo funcional; y en donde una polimerasa extiende el extremo 3' libre de la sonda generada por la escisión de Nfo.

179. El proceso del párrafo 178, en donde dicho cebador bloqueado contiene un residuo de tetrahidrofuranilo, un fluoróforo y un colorante de unión al surco menor de enfriamiento, de manera que, al formar híbridos dúplex, el enfriamiento se reduce en virtud de un cambio en las propiedades de absorción del enlace del surco menor un colorante tal que un aumento en la emisión de fluorescencia del fluoróforo aumenta como consecuencia de la amplificación del ADN.

180. El proceso del párrafo 167, en donde dicha recombinasa se selecciona del grupo que consiste en el fago T4 UvsX, E. coli RecA o Rad51 eucariótico.

181. El proceso del párrafo 167 en donde dicha RPA se realiza en presencia de un agente de aglomeración.

182. El proceso del párrafo 181 en donde el agente de aglomeración molecular se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, alcohol polivinílico, Ficoll, Dextan y polivinilpirrolidona.

183. El proceso del párrafo 167 en donde dicha RPA se realiza en presencia de un agente promotor de recarga.

184. El proceso del párrafo 183 en donde el agente promotor de recarga se selecciona del grupo que consiste en T4 UvsY, RecO de E. coli, RecR de E. coli y combinaciones y homólogos de los mismos.

185. El proceso del párrafo 167, en donde dicho proceso se realiza en presencia de una enzima seleccionada del grupo que consiste en ADN ligasa, topoisomerasa, helicasa, ARN polimerasa, transcriptasa inversa, endonucleasa FLAP, exonucleasa 5'-3',3'-exonucleasa 5', endonucleasa de restricción, endonucleasa y nucleasa específica de base dañada específica de base.

186. El proceso del párrafo 185 en donde dicha endonucleasa FLAP es FEN1 humana o sus equivalentes.

187. El proceso del párrafo 185, en donde dicha endonucleasa es una endonucleasa que reconoce la distorsión de hélice o una nucleasa específica de base dañada específica de base.

188. El proceso del párrafo 187, en donde dicha endonucleasa que reconoce la distorsión de la hélice es una nucleasa S1.

189. El proceso del párrafo 187, en donde dicha nucleasa específica de base dañada específica de base se selecciona del grupo que consiste en proteína Fpg de E. coli, Nth de E. coli y Nfo de E. coli.

190. El proceso del párrafo 167, en donde al menos uno de dichos cebadores comprende secuencias adicionales de ácido nucleico que permiten las propiedades óptimas de siembra y eliminación gradual de la recombinasa en el cebador.

191. El proceso del párrafo 190, en donde las secuencias de ADN adicionales comprenden más del 70% de pirimidinas o más del 75% de los residuos de citosina.

192. El proceso del párrafo 167.

en donde la secuencia de ADN diana es parcial o completamente de doble cadena durante la reacción de replicación, de modo que se requiere una polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena inherente;

en donde al menos una polimerasa tiene una actividad de desplazamiento de cadena significativa;

en donde está presente una proteína de unión a ADN de cadena sencilla;

en donde un agente de aglomeración está presente a 1% en peso por volumen o más en la reacción; y

en donde dicho proceso se realiza a una temperatura de entre aproximadamente 30ºC y aproximadamente 39ºC.

193. Un proceso RPA de amplificación de ADN de una secuencia diana de doble cadena que comprende una primera y una segunda cadena de ADN que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un agente de recombinasa con un primer cebador de ácido nucleico para formar un primer cebador de nucleoproteína;

(b) proporcionar un segundo cebador de ácido nucleico que no contiene el agente de recombinasa;

(c) poner en contacto los primeros cebadores de nucleoproteína con dicha secuencia diana de doble cadena, formando así una primera estructura de doble cadena en una primera parte de dicha primera cadena;

(d) extender el extremo 3' de dicho primer cebador de nucleoproteínas con una o más polimerasas y dNTP para generar un ácido nucleico de doble cadena y una primera cadena desplazada de ácido nucleico;

(e) hibridar dicho segundo cebador de ácido nucleico con dicha primera cadena de ácido nucleico desplazada y extender el extremo 3' de dicho segundo cebador de ácido nucleico con una o más polimerasas y dNTP para generar un ácido nucleico de doble cadena;

(f) continuar la reacción mediante la repetición de (c) y (e) hasta que se alcance el grado de amplificación deseado;

en donde dichos pasos (c) a (e) se realizan de forma simultánea o secuencial y en donde el ácido nucleico de doble cadena generado puede servir como la secuencia diana de doble cadena.

194. El proceso de acuerdo con el párrafo 193 en donde el segundo cebador es demasiado corto para la función de recombinasa y para participar en la secuenciación sustancial dirigida por recombinasa en dicho ácido nucleico diana y en donde el segundo cebador es de longitud suficiente para la reacción de hibridación y elongación.

195. El proceso de acuerdo con el párrafo 193, en donde se suprime el segundo cebador para que no se involucre en un direccionamiento de secuencia sustancial mediado por recombinasa.

196. El proceso del párrafo 193, en donde dicho segundo cebador comprende uno o más nucleótidos modificados y se suprime para que no se involucre en la segmentación sustancial de la secuencia mediada por recombinasa.

197. El proceso del párrafo 196, en donde el nucleótido modificado comprende un azúcar de ácido nucleico bloqueado.

198. Un proceso para analizar una muestra de ADN polimórfico que comprende los pasos de:

(i) hibridar un ADN de muestra con una o más sondas para formar una o más regiones híbridas en una reacción que incluye una recombinasa, en donde dicha una o más sondas corresponde a las posibles variantes de secuencia en dicho ADN de muestra, en donde la muestra o la sonda es de doble cadena;

(ii) mayor desestabilización de las regiones híbridas imperfectas;

(iii) detectar híbridos perfectos formados entre la sonda y la muestra mediante la detección de la presencia o ausencia de un marcador inicialmente presente en la sonda o en los ácidos nucleicos de la muestra.

199. El proceso del párrafo 198, en donde dicha etapa de mejora se realiza mediante una enzima;

200. El proceso del párrafo 199, en donde la enzima es una recombinasa.

201. El proceso del párrafo 200, en la misma recombinación es la proteína T4 uvsX.

202. El proceso del párrafo 198, en donde dicho proceso se realiza en presencia de un componente adicional que se incluye en el grupo que consiste en la proteína T4 gp32, proteína T4uvsY, ATP, un agente de aglomeración.

203. El proceso del párrafo 202, en donde dicho agente de aglomeración se selecciona del grupo que consiste en cloruro de polivinilo, polietilenglicol, mezcla de polietilenglicol, ficoll, polidextrano, albúmina de suero bovino y polivinilpirrolidona.

204. El proceso del párrafo 203, en la que dicha mezcla de polietilenglicol comprende polietilenglicol con un peso molecular de entre 15.000 y 20.000 daltons.

205. El proceso de acuerdo con el párrafo 203, que comprende también un sistema de regeneración de ATP.

206. El proceso de acuerdo con el párrafo 198 en donde se incluye una ayuda para desestabilizar los híbridos imperfectos.

207. El proceso de acuerdo con el párrafo 206 en donde la helicasa pertenece al grupo que incluye E. coli PriA, E. coli DnaB helicasa, E. coli RuvAB helicasa, T4 fago gp41, T4 fago dda helicasa.

208. El proceso de acuerdo con el párrafo 206 en donde helicasa se interrumpe físicamente en una interacción estable entre la sonda y la superficie, como una interacción biotina-estreptavidina.

209. El proceso de acuerdo con el párrafo 198 en donde se incluye una nucleación que actúa sobre las plantillas de ADN en la que hay una región mal emparejada o en la que hay una burbuja en la plantilla.

210. El proceso de acuerdo con el párrafo 209, en donde la nuclea pertenece al grupo que incluye nucleasa S1, nucleasa P1, endonucleasa I T7, nucleasa BAL31, nucleasa celular.

211. El proceso de acuerdo con el párrafo 198, en donde se incluye en la reacción un ADN puede ser capaz de iniciar la síntesis a partir de una muesca o brecha pequeña para producir una muestra de ADN amplificado.

212. El proceso de acuerdo con el párrafo 211, en la muestra de ADN amplificado es de cadena sencilla y la sonda es principalmente de doble cadena o de cadena sencilla al comienzo de la reacción.

213. El proceso de acuerdo con el párrafo 211 en donde el ADN de muestra amplificado o el ácido nucleico de la sonda contiene una etiqueta en un extremo de una o ambas cadenas.

214. El proceso de acuerdo con el párrafo 213, en el cual la etiqueta se selecciona del grupo que consiste en un grupo fluorescente, un punto cuántico, un detenedor, una partícula paramagnética, una unidad estructural catalítica.

215. El proceso del párrafo 214, en donde dicha unidad estructural catalítica es una enzima o catalizador inorgánico.

216. El proceso de acuerdo con el párrafo 213 en donde la etiqueta es una entidad capaz de formar una interacción no covalente de alta afinidad con otra molécula, en particular incluyendo anticuerpos y antígenos conocidos.

217. El proceso de acuerdo con el párrafo 198 en donde tanto los ácidos nucleicos de la sonda como de la muestra contienen una etiqueta.

218. El proceso de acuerdo con el párrafo 217 en donde las etiquetas consisten en un fluoróforo y/o un detenedor.

219. Un aparato para realizar una reacción de RPA que comprende:

(a) una cámara de reacción que comprende un sensor de detección de luz; y

(b) un medio de control de temperatura no cíclico para mantener una temperatura de entre 33-39°C.

220. El aparato del párrafo 219 en donde dicho sensor de detección de luz es un sensor de detección de fluorescencia.

221. El aparato del párrafo 219 que comprende además uno o más diodos emisores de luz para iluminar dicha cámara de reacción para realizar una medición de luz mediante dicho sensor detector de luz.

222. El aparato del párrafo 219 en donde dicho sensor comprende un diodo pin o una matriz de diodos pin.

REIVINDICACIONES

1. Un kit para amplificar un ácido nucleico diana mediante amplificación con recombinasa polimerasa (RPA), en donde el kit comprende:

(i) al menos una recombinasa;

(ii) al menos una proteína de unión a ADN de cadena sencilla;

(iii) al menos una ADN polimerasa;

(iv) dNTPs o una mezcla de dNTPs y ddNTPs;

(v) un agente de aglomeración para estimular la amplificación de la reacción de RPA, en donde dicho agente de aglomeración se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), dextrano, ficoll, PEG1450, PEG3000, PEG8000, PEG10000, compuesto de PEG con un peso molecular entre 15000 y 20000 daltons y una combinación de ellos;

(vi) un regulador;

(vii) un agente reductor;

(viii) ATP o ATP análogo; y

(ix) al menos una proteína de carga de recombinasa; y

(x) un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador.

2. Un kit de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene una solución que comprende:

(a) al menos una recombinasa;

(b) al menos una proteína de unión a ADN de cadena sencilla;

(c) al menos una ADN polimerasa;

(d) dNTPs o una mezcla de dNTPs y ddNTPs;

(e) dicho agente de aglomeración;

(f) un regulador;

(g) un agente reductor;

(h) ATP o análogo de ATP hidrolizable;

(i) al menos una proteína de carga de recombinasa;

(j) un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador; y

(k) una molécula de ácido nucleico diana.

3. Un kit de acuerdo con la reivindicación 1, en donde (i) a (x) son liofilizados.

4. Un kit de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo dicho kit los siguientes reactivos, opcionalmente en forma liofilizada:

(i) uvsX recombinasa;

(ii) proteína de unión a ADN de cadena sencilla gp32;

(iii) un fragmento grande de ADN polimerasa I de Bacillus subtilis (polimerasa Bsu);

(iv) dNTPs o una mezcla de dNTPs y ddNTPs;

(v) polietilenglicol;

(vi) regulador de trisacetato;

(vii) TDT;

(viii) ATP;

(ix) uvsY; y

(x) dicho cebador o cebadores.

5. Un kit de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende los siguientes reactivos liofilizados:

(i) uvsX recombinasa;

(ii) proteína de unión a ADN de cadena sencilla gp32;

(iii) T4 gp43 ADN polimerasa o Bsu polimerasa;

(iv) dNTPs o una mezcla de dNTPs y ddNTPs;

(v) polietilenglicol;

(vi) regulador de trisacetato;

(vii) DTT;

(viii) ATP;

(ix) uvsY;

(x) un primer cebador y opcionalmente un segundo cebador;

(xi) opcionalmente un agente estabilizante como el azúcar trehalosa.

6. Un kit de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, en donde la proteína de unión a ADN de cadena sencilla es gp32 o un derivado de la misma.

7. Un kit de la reivindicación 6, en donde el derivado gp32 se selecciona del grupo que consiste en gp32(N), gp32(c), gp32(c)K3A, gp32(c)R4Q, gp32(c)R4T, gp32K3A, gp32R4Q, gp32R4T y combinaciones de los mismos.

8. Un kit de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 6 o 7 en donde dicho agente reductor es DTT.

9. Un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 6 a 8, en donde dicho ATP o análogo de ATP se selecciona del grupo que consiste en ATP, ATP-γ-S, ATP-β-S y ddATP.

10. Un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 o 6 a 9, en donde dicha proteína de carga de recombinasa se selecciona del grupo que consiste en T4 uvsY, E. coli recO, E. coli recR y derivados y combinaciones de los mismos.

11. Un kit según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el primer o el segundo cebador comprende ADN, ARN, ANP, ANL, ácido nucleico de la cadena principal de morfolino, ácido nucleico de la cadena principal de fosforotiorato o una combinación de los mismos.

12. Un kit de la reivindicación 11, en donde el primer o segundo cebador comprende un enlace no fosfato entre las dos bases en su extremo 3' y es resistente a la actividad de nucleasa 3' a 5'.

13. Un kit de la reivindicación 11 o 12, en donde el primer o segundo cebador comprende al menos un ácido nucleico bloqueado en su base final 3' o penúltima base 3'.

14. Un kit de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el primer o segundo cebador tiene una longitud de al menos 20 bases, preferiblemente una longitud de al menos 30 bases.

15. Un kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicho primer o segundo cebador es parcialmente de doble cadena con una región de cadena sencilla en su extremo 3'.

16. Un kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde al menos un cebador está marcado con un marcador detectable, opcionalmente, en donde dicho marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un fluorocromo, una enzima, un detenedor de fluorescencia, un inhibidor de enzimas, una etiqueta radioactiva y una combinación de las mismas.

17. Un kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la molécula de ácido nucleico diana se selecciona del grupo que consiste en ácido nucleico superenrollado, ácido nucleico lineal con dos extremos y en donde ambos extremos están unidos a una molécula de ácido nucleico no diana, ácido nucleico lineal con dos extremos y en donde un extremo está vinculado a una molécula de ácido nucleico no diana, ácido nucleico lineal y una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla que se convierte en un ácido nucleico de doble cadena mediante una polimerasa o un ácido nucleico de doble cadena desnaturalizado por la acción de calor o tratamiento químico.

18. Un kit de la reivindicación 17, en donde el ácido nucleico diana está a una concentración de menos de 1000 copias por ml o entre 1 y 10 copias por reacción.

19. Un kit de la reivindicación 17 o 18, en donde el primer o segundo cebador comprende además una o más bases en su extremo 5' que no son complementarias del ácido nucleico diana, opcionalmente en donde dicha una o más bases comprenden la secuencia de un sitio de reconocimiento de una endonucleasa de restricción.

20. Un kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o las reivindicaciones 6 a 19, en donde la recombinasa se selecciona del grupo que consiste en uvsX, recA y derivados y combinaciones de las mismas, opcionalmente en donde la recombinasa es una proteína de fusión que comprende una secuencia de etiqueta corta en el término N o C.

21. Un kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 6 a 20, en donde la ADN polimerasa es una polimerasa eucariota o una polimerasa procariota, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en pol-α, pol-β, pol-α, pol-ε y derivados de las mismas, opcionalmente en donde la polimerasa es una proteína de fusión que comprende una secuencia de etiqueta corta en el extremo N o C.

22. Un kit de la reivindicación 21, en donde dicha polimerasa procariota se selecciona del grupo que consiste en el fragmento Klenow de ADN polimerasa I de E. coli, ADN polimerasa del bacteriófago T4 gp43, fragmento grande de la polimerasa I de Bacillus stearothermophilus, ADN polimerasa de Phi-29, ADN polimerasa de T7 Bsu Pol I, ADN polimerasa I de E. coli, ADN polimerasa II de E. coli, ADN polimerasa III de E. coli, ADN polimerasa IV de E. coli, ADN polimerasa V de E. coli y derivados y combinaciones de las mismas.

23. Un kit de la reivindicación 21 o 22, en donde la ADN polimerasa incluye al menos una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa 3'-5', y/o una ADN polimerasa con propiedades de desplazamiento de cadena.

24. Un kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 6 a 23, en donde dicho agente de aglomeración es polietilenglicol, dextrano o ficoll.

25. Un kit de la reivindicación 24, en donde dicho polietilenglicol es para uso entre 1 a 12% de un peso o un volumen de la reacción.

26. Un kit de la reivindicación 24, en donde dicho polietilenglicol se selecciona del grupo que consiste en PEG1450, PEG3000, PEG8000, PEG10000, compuesto de PEG con un peso molecular entre 15000 y 20000 daltons, y una combinación de los mismos.

27. Un kit de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 o 26 en donde dicho agente de aglomeración se usa en una concentración de entre 1% a 12% en volumen o en peso de la reacción.

Figura 1. RecA / Carga del cebador Antes de la adición del ADN plantilla y/o Polimerasa, RecA y SSB competirán por la unión a los cebadores de oligonucleótidos de cadena sencilla. En la presencia de un RecR y RecO, RecA se estabiliza selectivamente en los cebadores de cadena sencilla que forman filamentos de nucleoproteínas RecA en un complejo con RecO y RecR. Este complejo es competente para invadir el ADN de doble cadena para formar un bucle D en sitios homólogos a los cebadores de oligonucleótidos. Alternativamente, RecA, RecO y RecR pueden precargarse en cebadores de oligonucleótidos antes de la introducción de SSB en la mezcla de reacción.

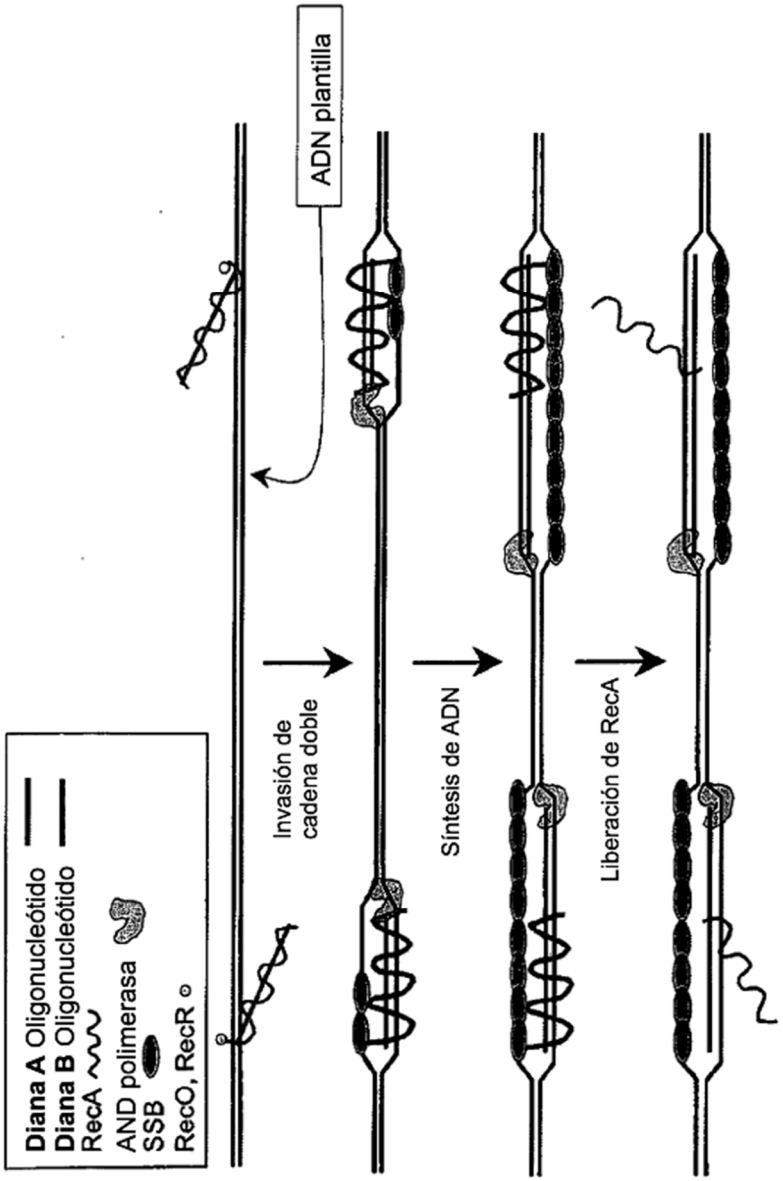


Figura 2A. Cadena de recombinasa de guía- amplificación de polimerasa (IsRPA) Los filamentos de nucleoproteínas de RecA/cebador invaden el ADN plantilla de doble cadena que se asocia preferentemente con sitios diana homólogos. La liberación de RecA a partir de ADN de doble cadena puede ocurrir a través de la hidrólisis de ATP en una dirección 5'-3 'o como resultado de la actividad de helicasa/resolvasa o polimerasa.

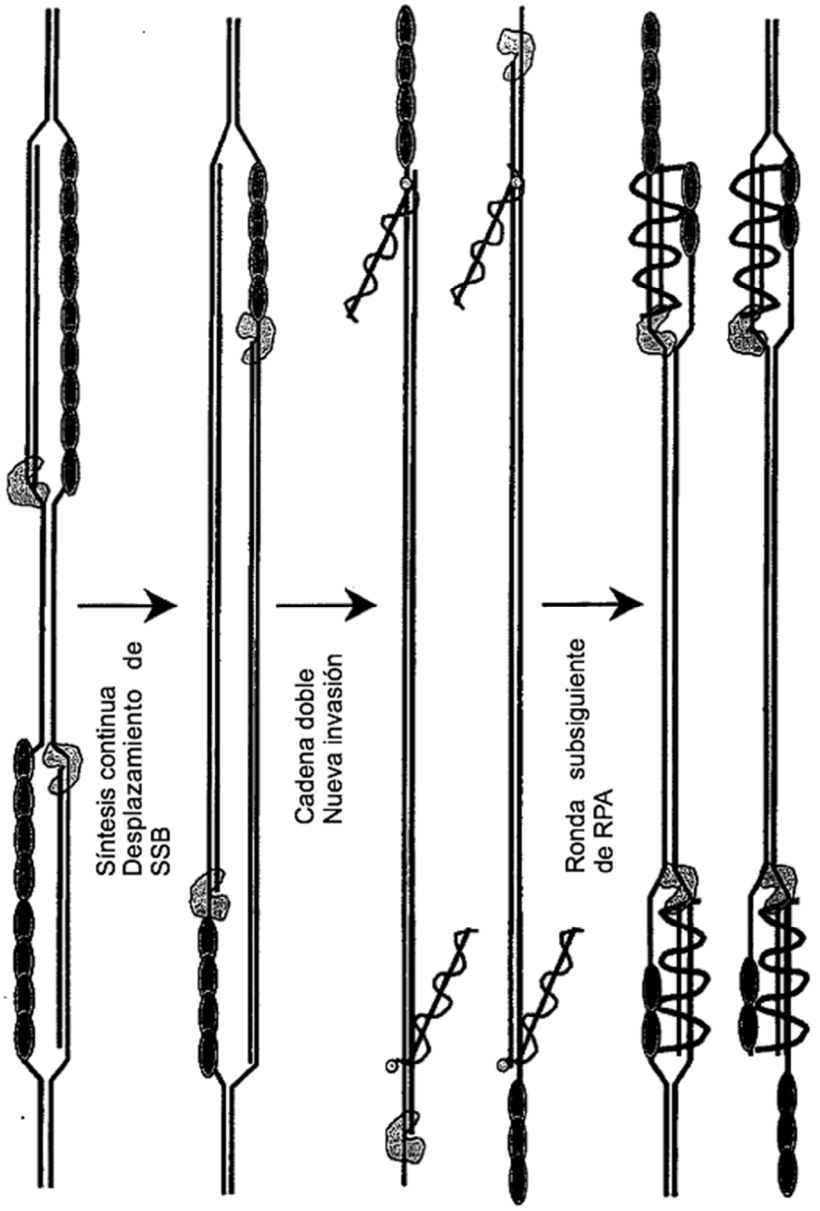


Figura 2B. Cadena de recombinasa de guía - amplificación de polimerasa (IsRPA) A medida que continúa la síntesis, las polimerasas encuentran una plantilla unida a SSBB, desplazada y de cadena sencilla. Los sitios diana de doble cadena son nuevamente invadidos por filamentos de nucleoproteínas RecA/cebador. Las rondas subsiguientes de IsRPA proceden de sitios nuevamente invadidos.

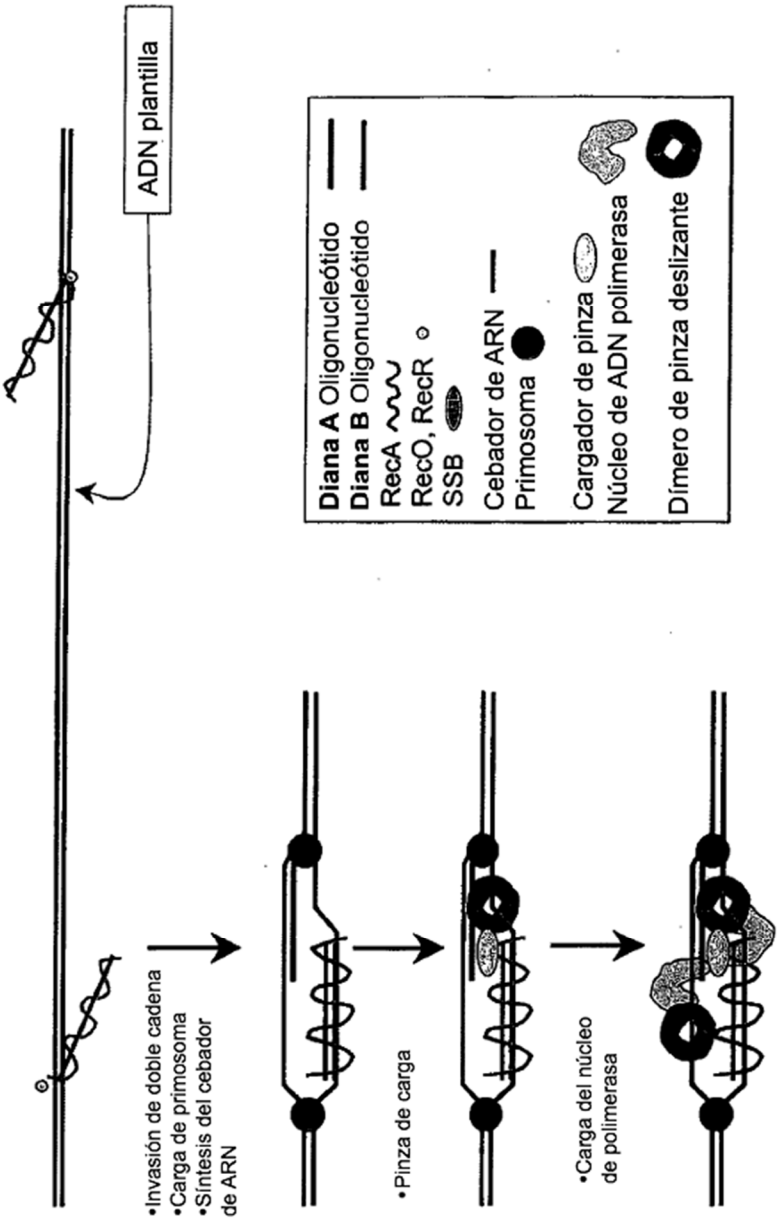


Figura 3A. Cadena de recombinasa de guía /de retardo - amplificación de polimerasa: Iniciación

Primero, el primosoma se carga en el bucle D formado por la invasión de filamentos de nucleoproteínas RecA. El primosoma sintetiza un tramo de cebador de ARN. Finalmente, el primosoma recluta el cargador de pinza, que recluta tanto el dímero de pinza deslizante como el núcleo de ADN polimerasa asimétrico.

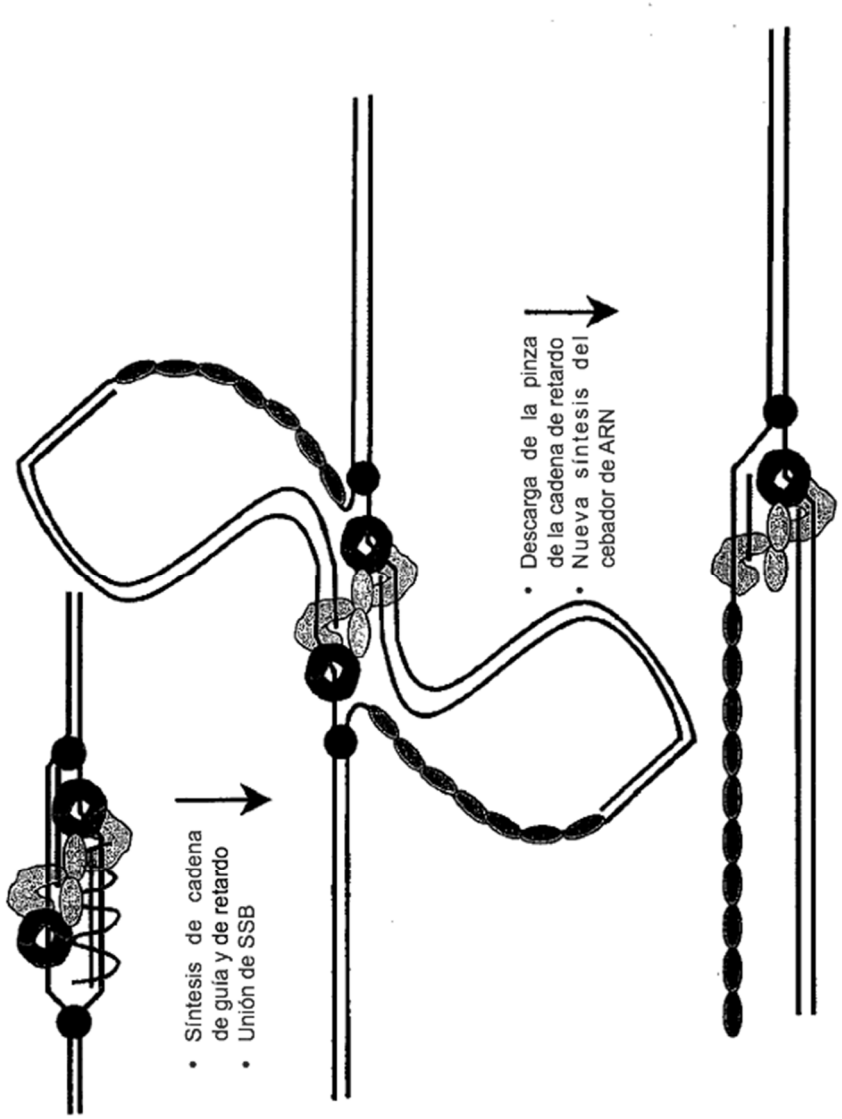


Figura 3B. Cadena de recombinasa de guía /de retardo - amplificación de polimerasa: Síntesis
La síntesis ocurre simultáneamente tanto en la dirección de guía como en la de retraso. Eventualmente se detiene la la síntesis de la cadena de guía y la pinza de la cadena de retardo se descarga. La síntesis de la cadena de guía continúa hasta que se forma un nuevo sitio de síntesis de cadena de retardo.

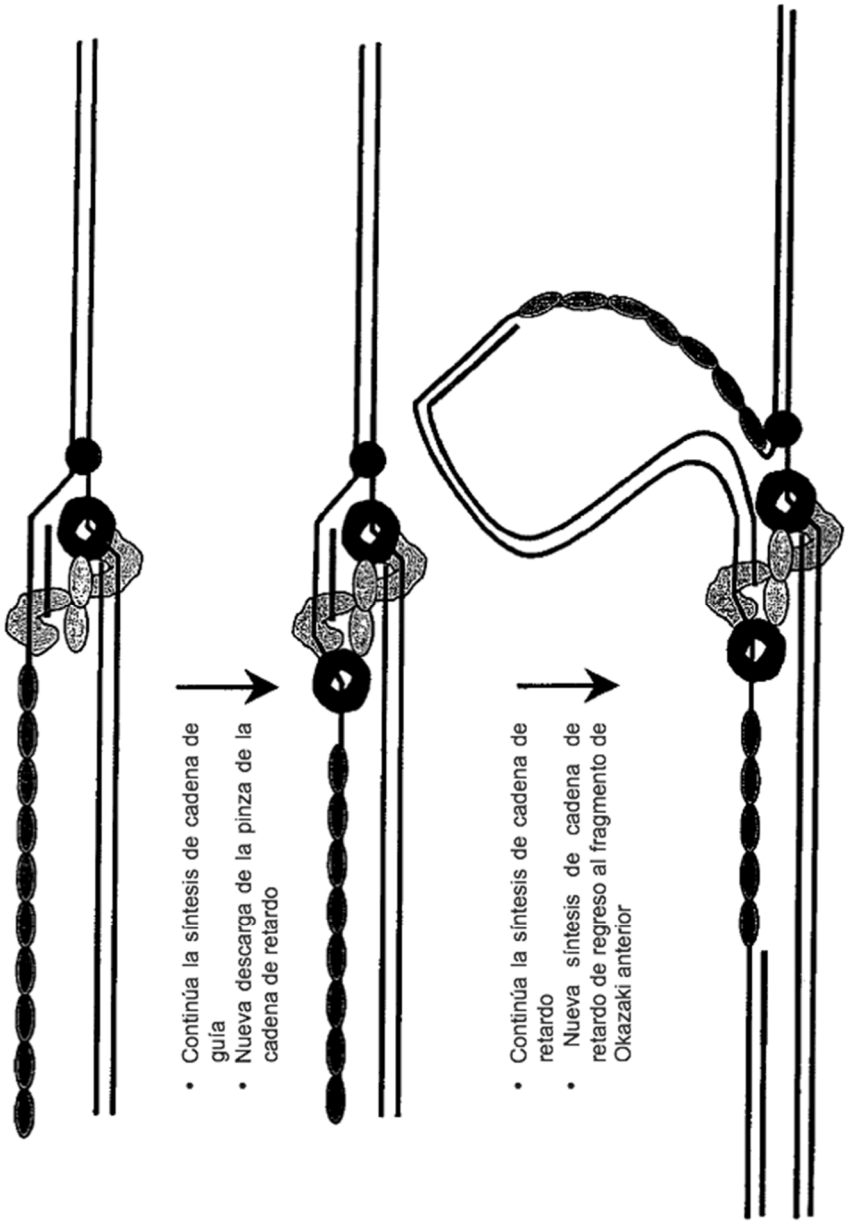


Figura 3C. Cadena de recombinasa de guía /de retardo - amplificación de polimerasa
Mientras que la síntesis de la cadena de guía continua, se forma un nuevo sitio de síntesis de cadena de retardo. La síntesis de la cadena de guía continua de regreso al fragmento de Okazaki anterior donde se descarga la pinza de la cadena de retardo.

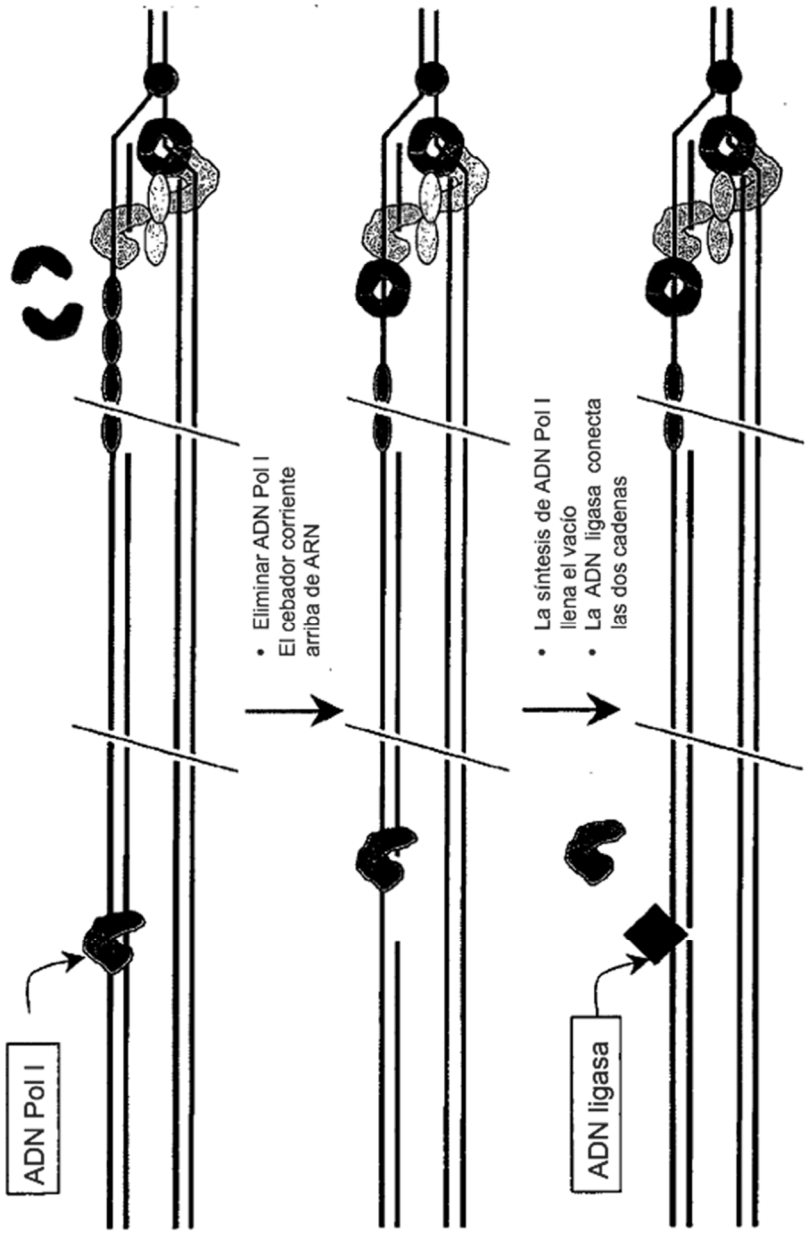


Figura 3D. Cadena de recombinasa de guía /de retardo - amplificación de polimerasa
La ADN polimerasa I elimina el cebador de ARN, y llena el vacío mientras que la ADN ligasa conecta los dos fragmentos de Okazaki formando una cadena de retardo continua.

Figura 4

Conjunto de cebador 1
Conjunto de cebador 2
Conjunto de cebador 3
Conjunto de cebador 4
Conjunto de cebador 5
a|---->
a|---->
a|---->
e|---->
f|---->
<----|b
<----|c
<----|d
<----|d
<----|d

Figura 5. Ejemplos de ácidos nucleicos de plantilla de doble cadena adecuados.

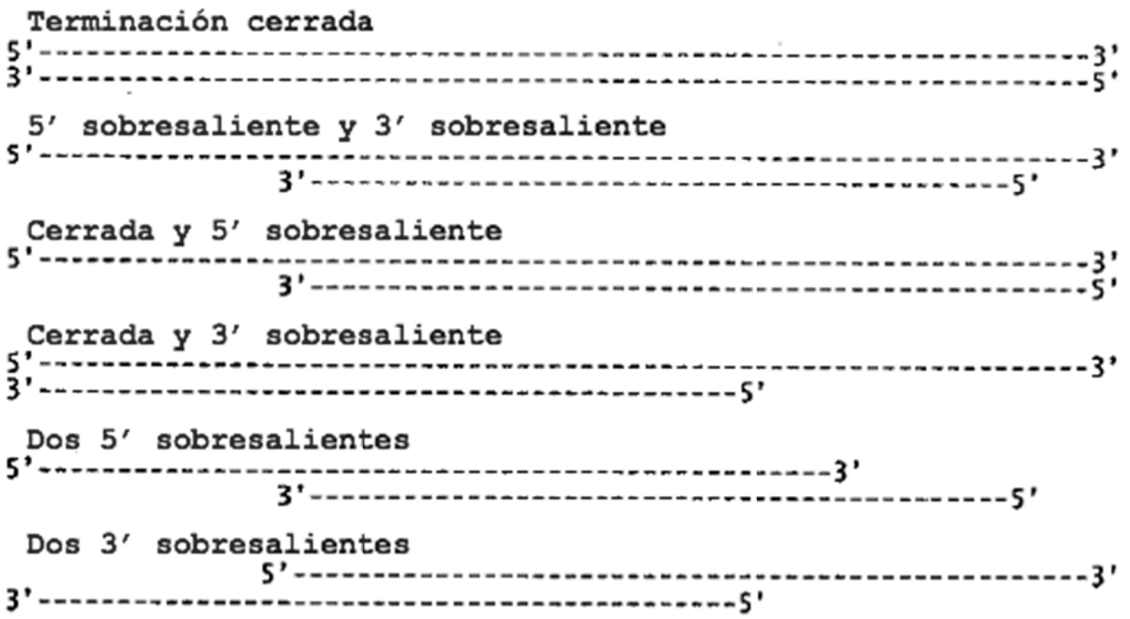


Figura 6A. Orientación de los pares de cebadores de ácido nucleico.

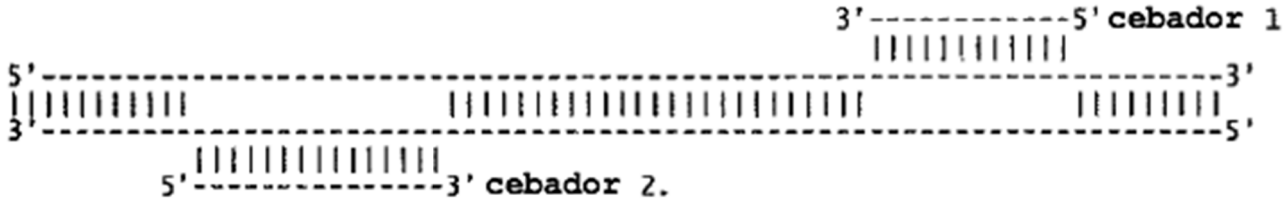


Figura 6B

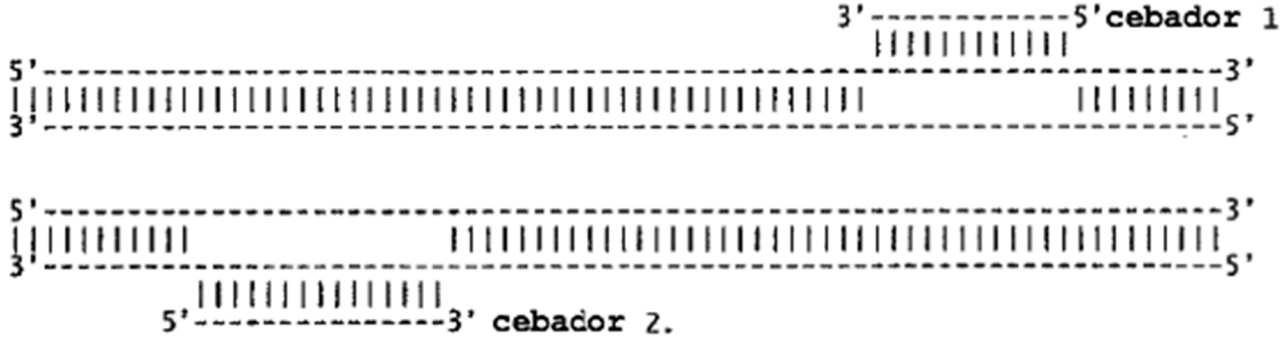


Figura 7A Reacción RPA en progreso

Figura 7B

Figura 7C

Figura 8A

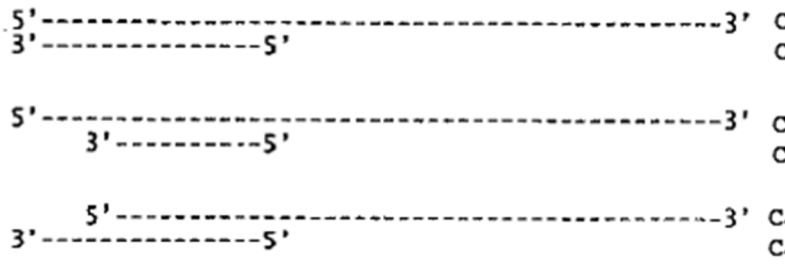


Figura 8B

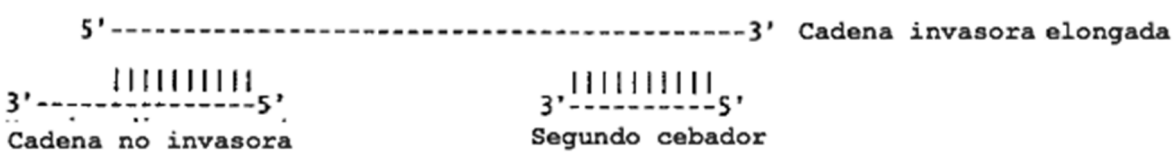
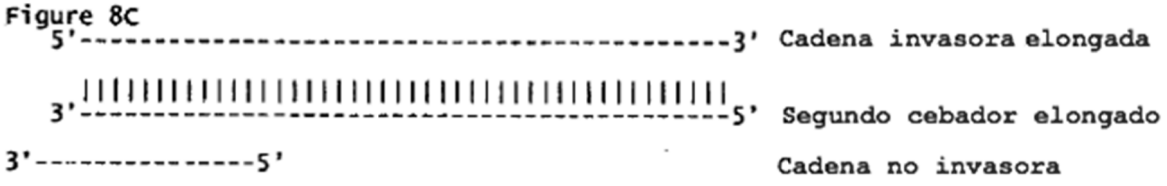


Figure 8C



ES 2 718 482 T3

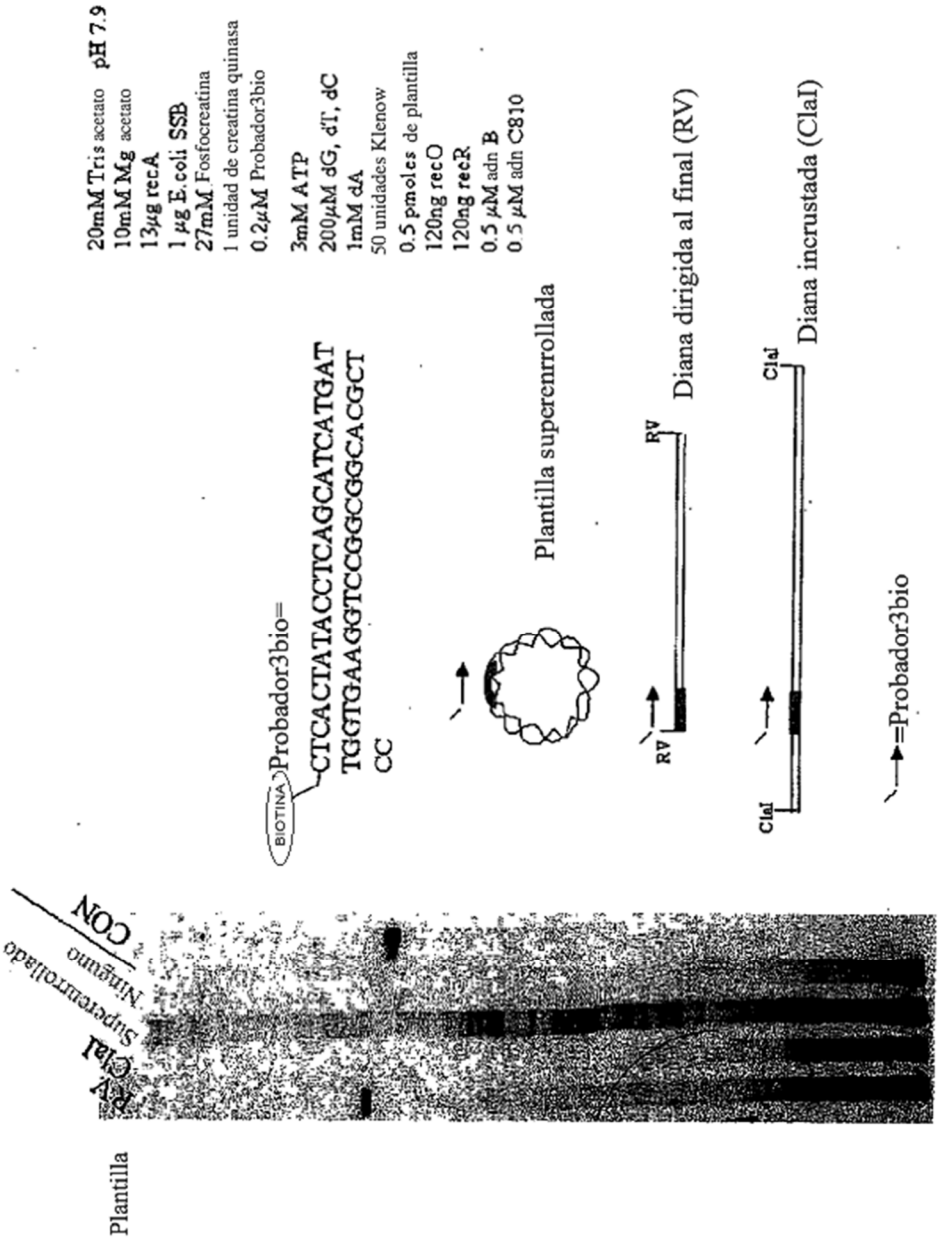

20mM Tris acetato pH 7.9
10mM Mg acetato
13µg recA
1 µg E.coli SSB
27mM Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.2µM Probador3bio
3mM ATP
200µM dG, dT, dC
1mM dA
50 unidades Klenow
0.5 pmoles de plantilla
120ng recO
120ng recR
0.5 µM adn B
0.5 µM adn C810
BIOTINA
Probador3bio=
CTCACTATACCTCAGCATCATGAT
TGGTGAAGGTCCGGCGGCACGCT
CC
Plantilla supercenrrollada
RV
Diana dirigida al final (RV)
ClaI
Diana incrustada (ClaI)
=Probador3bio
Plantilla
RV ClaI Superenrrollado
Ninguno
CON

Figura 9

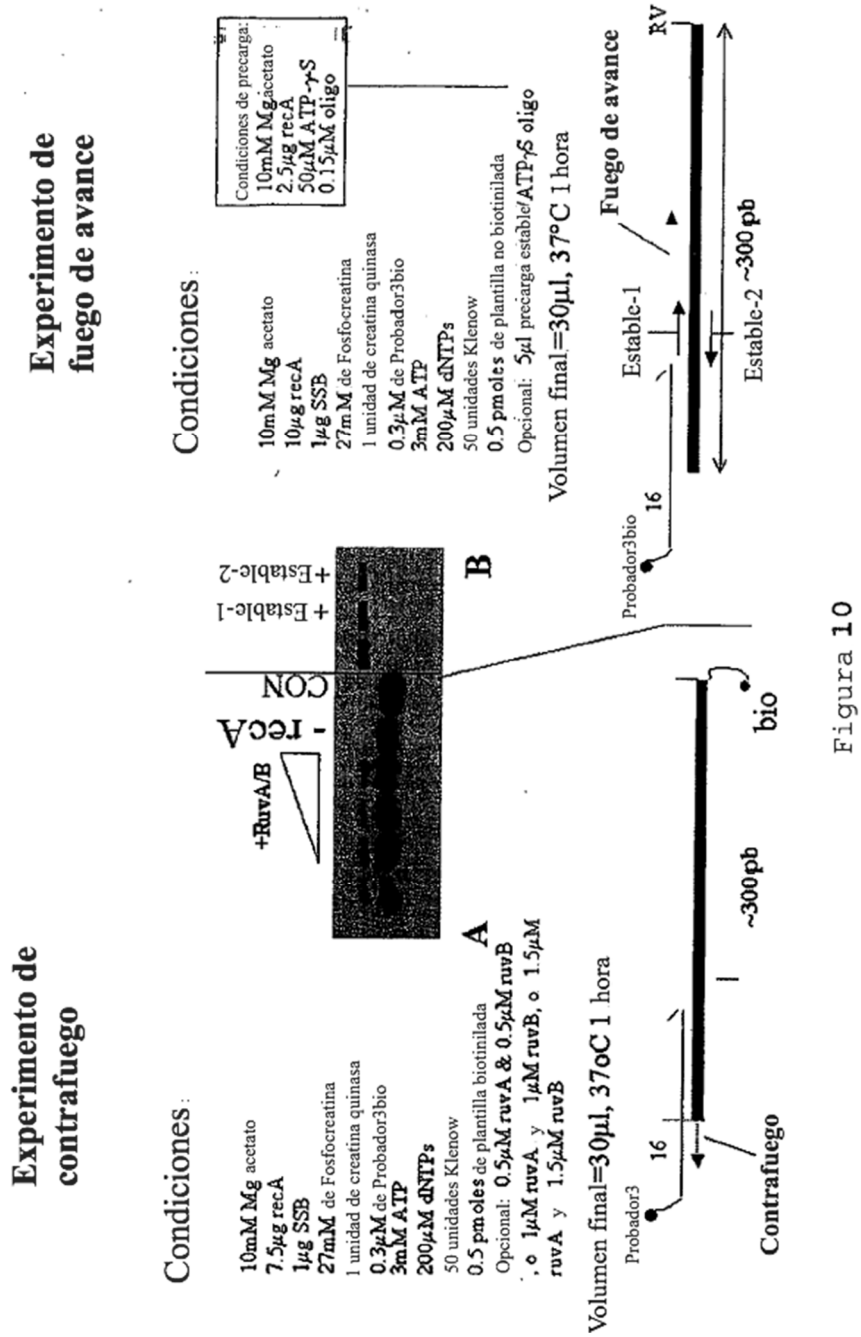

Experimento de contrafuego
Condiciones:
10mM Mg acetato
7.5µg recA
1µg SSB
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.3µM de Probador3bio
3mM ATP
200µM dNTPs
50 unidades Klenow
0.5 pmoles de plantilla biotinilada
Opcional: 0.5µM ruvA & 0.5µM ruvB
, o 1µM ruvA y 1µM ruvB, o 1.5µM ruvA y 1.5µM ruvB
Volumen final=30µl, 37oC 1 hora
Probador3
16
~300pb
Contrafuego
bio
A
+RuvA/B
- recA
CON
+ Estable-1
+Estable-2
B
Experimento de fuego de avance
Condiciones:
10mM Mg acetato
10µg recA
1µg SSB
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.3µM de Probador3bio
3mM ATP
200µM dNTPs
50 unidades Klenow
0.5 pmoles de plantilla no biotinilada
Opcional: 5µl precarga estable/ATP-γS oligo
Volumen final=30µl, 37°C 1 hora
Condiciones de precarga:
10mM Mgacetato
2.5µg recA
50µM ATP-γS
0.15µM oligo
Probador3bio
16
Estable-1
Fuego de avance
RV
Estable-2 ~300 pb

Figura 10

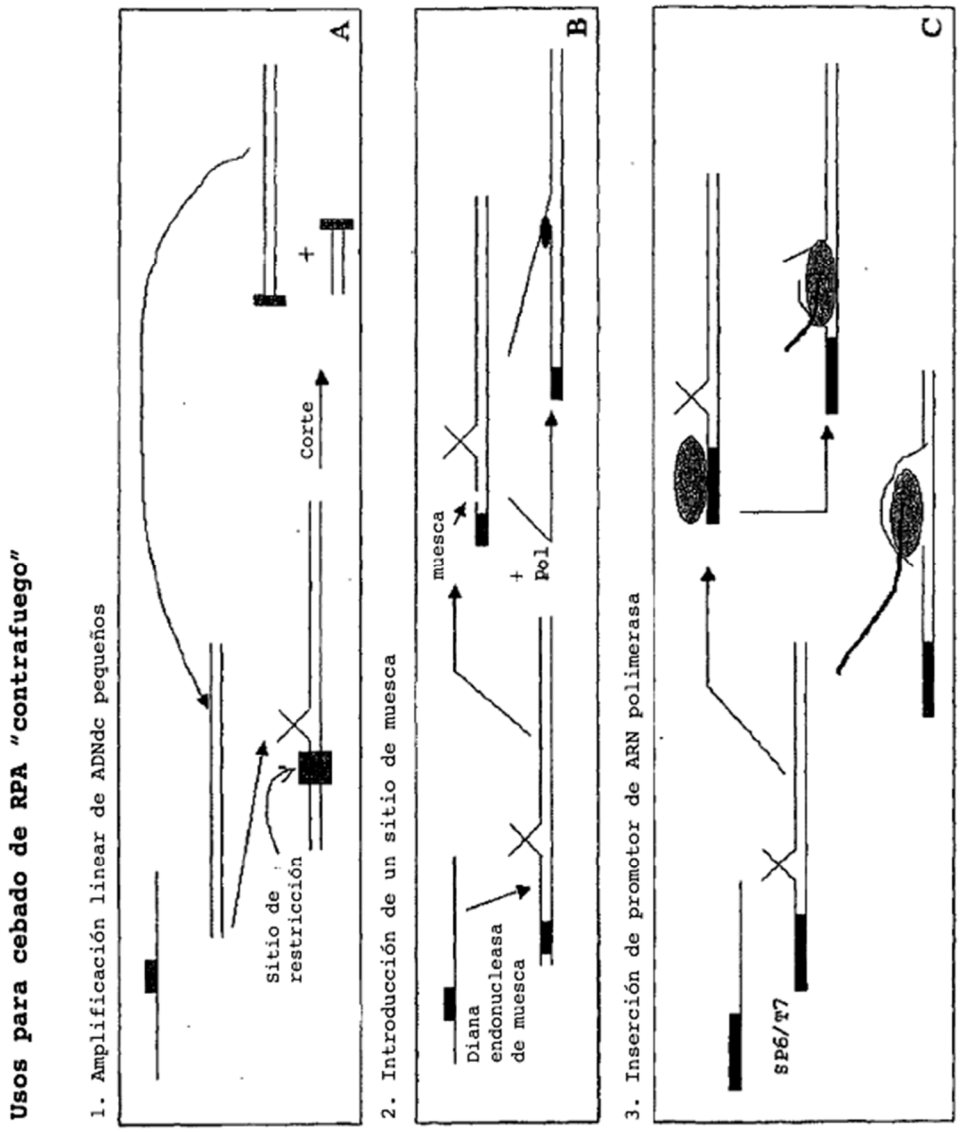

Usos para cebado de RPA "contrafuego"
1. Amplificación linear de ADNdc pequeños
Sitio de restricción
Corte
A
2. Introducción de un sitio de muesca
Diana endonucleasa de muesca
muesca
Pol
B
3. Inserción de promotor de ARN polimerasa
SP6/T7
C

Figura 11

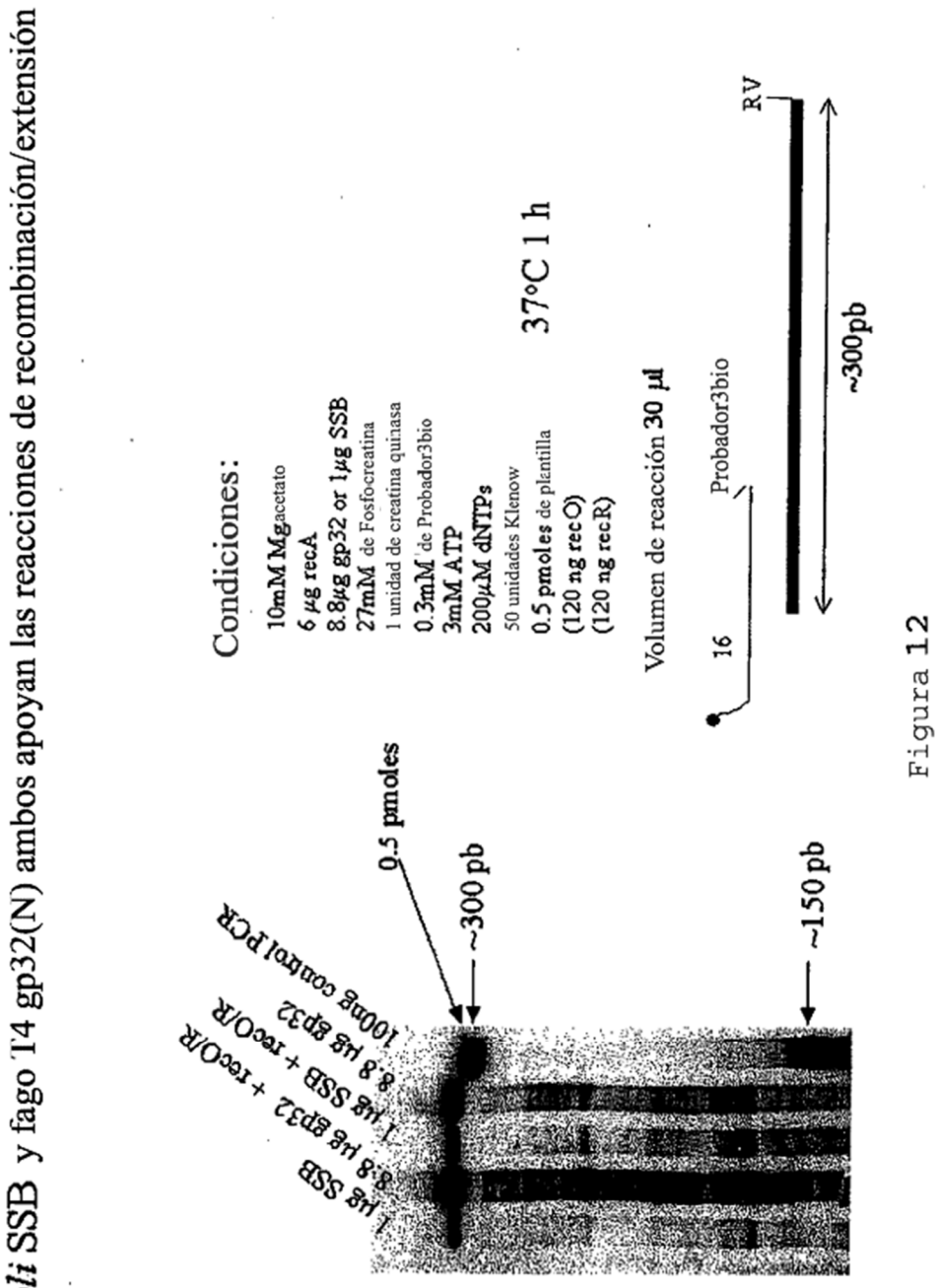

E.coli SSB y fago T4 gp32(N) ambos apoyan las reacciones de recombinación/extensión
Condiciones:
10mM Mgacetato
6 μg recA
8.8μg gp32 or 1μg SSB
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.3mM de Probador3bio
3mM ATP
200μM dNTPs
50 unidades Klenow
0.5 pmoles de plantilla
(120 ng recO)
(120 ng recR)
37°C 1 h
Volumen de reacción 30 μl
16
Probador3bio
RV
~300pb
0.5 pmoles
~300 pb
~150 pb
1 μg SSB
8.8 μg gp32 + recO/R
1 μg SSB + recO/R
8.8 μg gp32
100ng control PCR

Figura 12

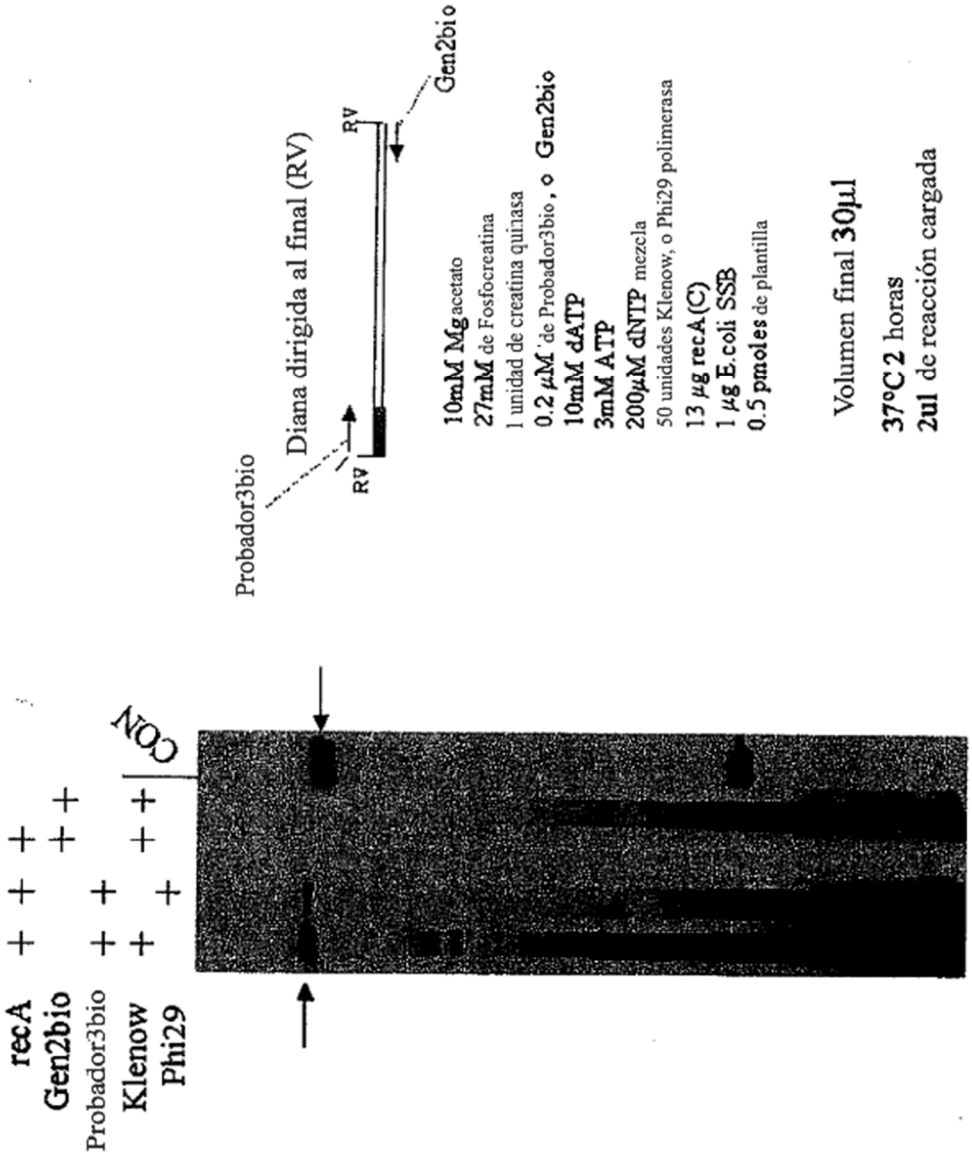

recA
Gen2bio
Probador3bio
Klenow
Phi29
CON
Probador3bio
Diana dirigida al final (RV)
RV
RV
Gen2bio
10mM Mg acetato
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.2 µM de Probador3bio, o Gen2bio
10mM dATP
3mM ATP
200µM dNTP mezcla
50 unidades Klenow, o Phi29 polimerasa
13 µg recA (C)
1 µg E.coli SSB
0.5 pmoles de plantilla
Volumen final 30µl
37°C 2 horas
2ul de reacción cargada

Figura 13

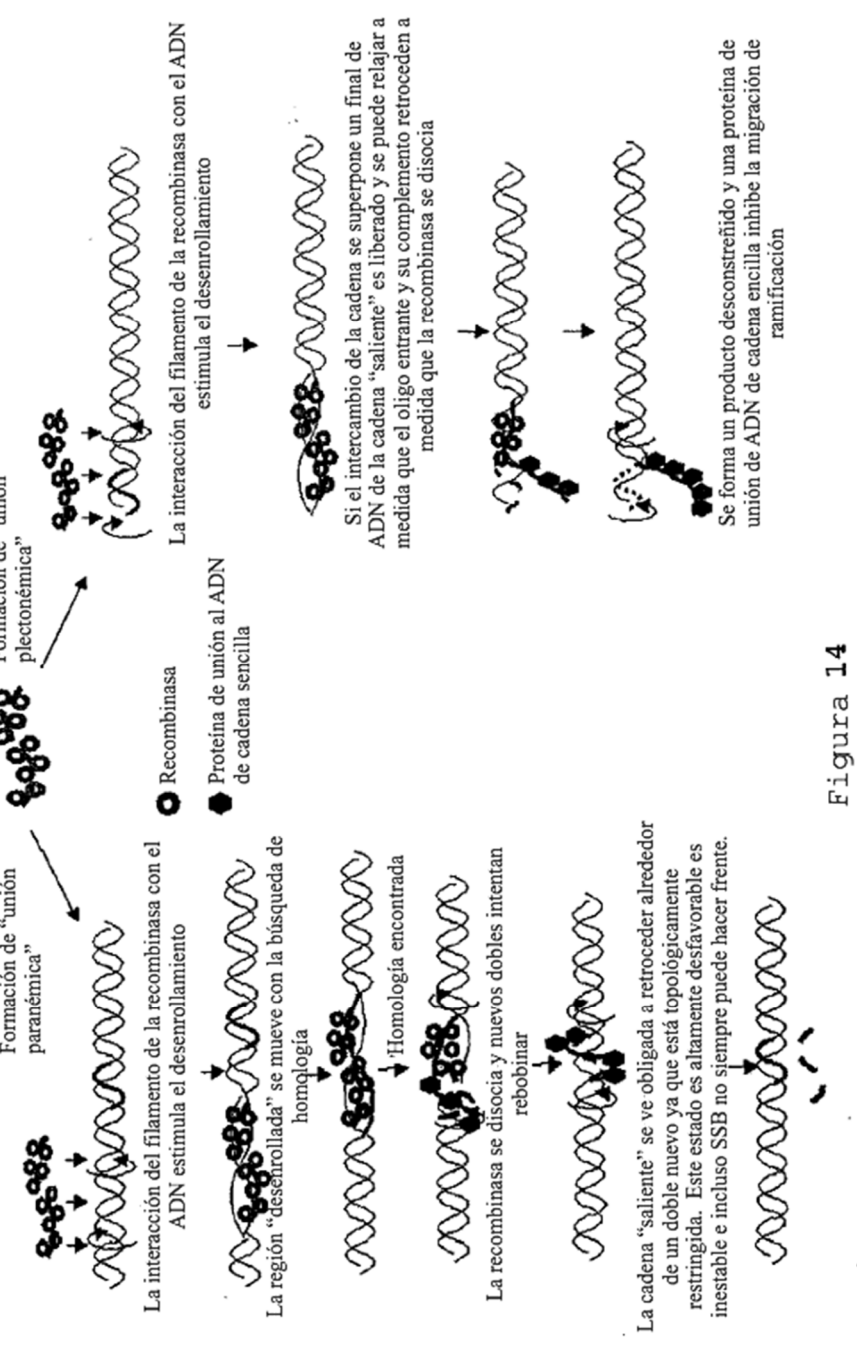

Secuencias del final focalizadas vs incrustadas focalizadas
Formación de "unión paranémica"
Formación de "unión plectonémica"
Recombinasa
Proteína de unión al ADN de cadena sencilla
La interacción del filamento de la recombinasa con el ADN estimula el desenrollamiento
La región "desenrollada" se mueve con la búsqueda de homología
¡Homología encontrada
La recombinasa se disocia y nuevos dobles intentan rebobinar
La cadena "saliente" se ve obligada a retroceder alrededor de un doble nuevo ya que está topológicamente restringida. Este estado es altamente desfavorable es inestable e incluso SSB no siempre puede hacer frente.
La interacción del filamento de la recombinasa con el ADN estimula el desenrollamiento
Si el intercambio de la cadena se superpone un final de ADN de la cadena "saliente" es liberado y se puede relajar a medida que el oligo entrante y su complemento retroceden a medida que la recombinasa se disocia
Se forma un producto desconstreñido y una proteína de unión de ADN de cadena encilla inhibe la migración de ramificación

Figura 14

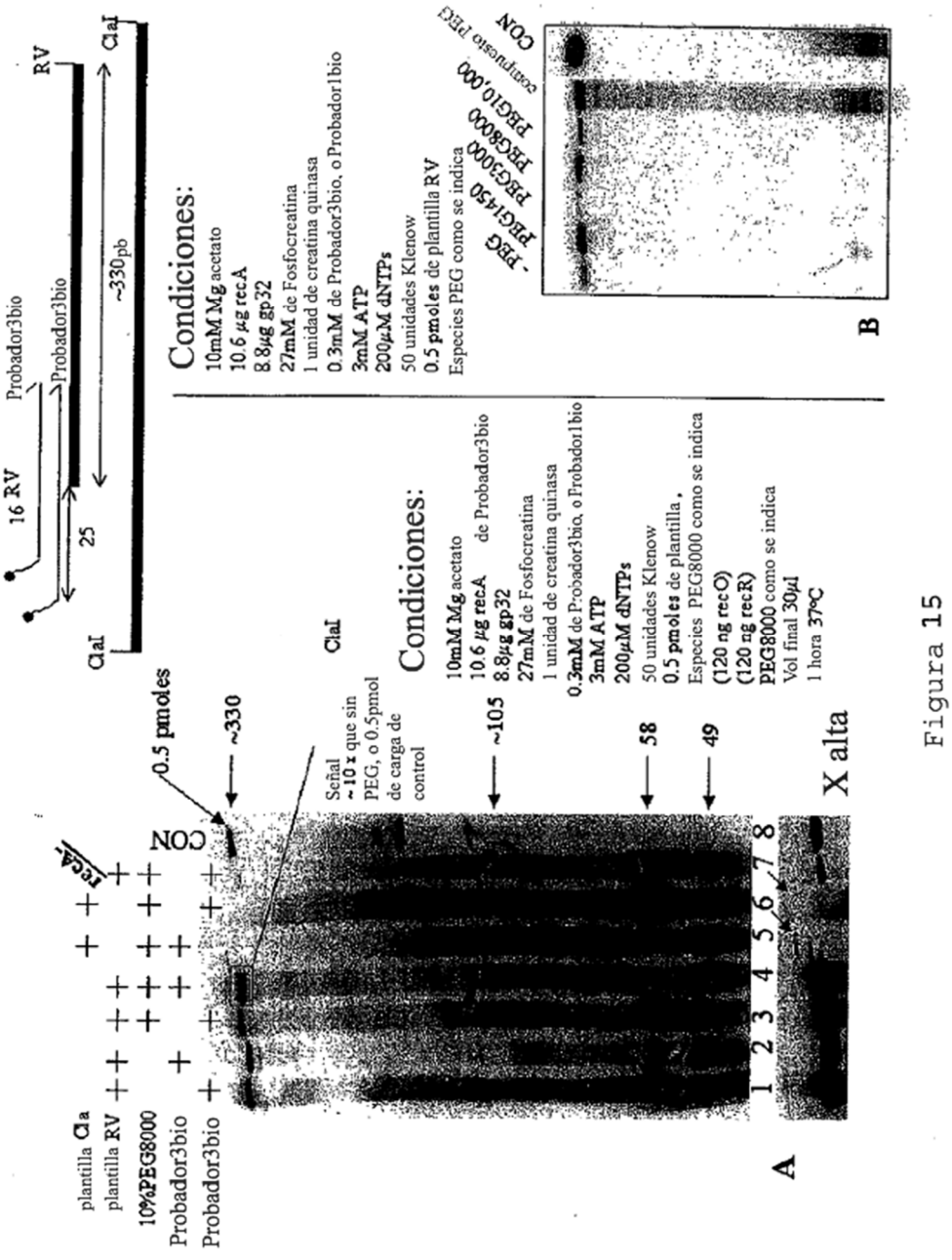

16 RV
Probador3bio
Probador3bio
RV
25
~330pb
ClaI
ClaI
Condiciones:
10mM Mg acetato
10.6 µg recA
8.8µg gp32
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.3mM de Probador3bio, o Probador1bio
3mM ATP
200µM dNTPs
50 unidades Klenow
0.5 pmoles de plantilla RV
Especies PEG como se indica
PEG
PEG1450
PEG3000
PEG8000
PEG10,000
compuesto PEG
CON
B
plantilla Ca
plantilla RV
10%PEG8000
Probador3bio
Probador3bio
recA
CON
0.5 pmoles
~330
Señal ~10 x que sin PEG, o 0.5pmol de carga de control
ClaI
Condiciones:
10mM Mg acetato
10.6 µg recA de Probador3bio
8.8µg gp32
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.3mM de Probador3bio, o Probador1bio
3mM ATP
200µM dNTPs
50 unidades Klenow
0.5 pmoles de plantilla,
Especies PEG8000 como se indica
(120 ng recO)
(120 ng recR)
PEG8000 como se indica
Vol final 30µl
1 hora 37ºC
~105
58
49
1 2 3 4 5 6 7 8
X alta
A

Figura 15

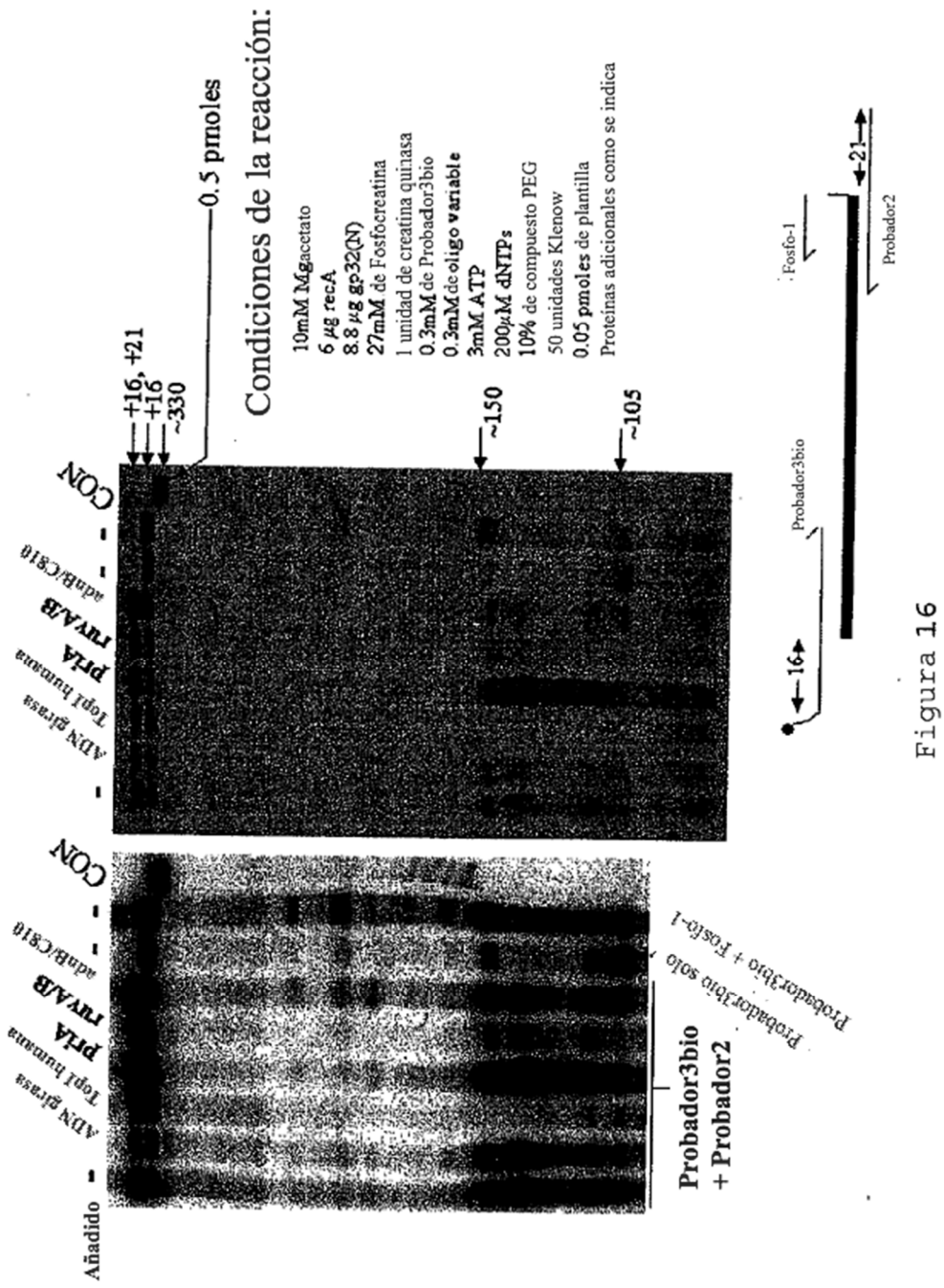

Condiciones de la reacción:
10mM Mgacetato
6 µg recA
8.8 µg gp32(N)
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.3mM de Probador3bio
0.3mM de oligo variable
3mM ATP
200µM dNTPs
10% de compuesto PEG
50 unidades Klenow
0.05 pmoles de plantilla
Proteínas adicionales como se indica
0.5 pmoles
+16, +21
+16
~330
~150
~105
CON
adnB/C810
RuvA/B
PriA
Topt humana
ADN girasa
Añadido
Probador3bio + Fosfo-1
Probador3bio solo
Probador3bio
+ Probador2
Fosfo-1
Probador3bio
Probador2
16
21

Figura 16

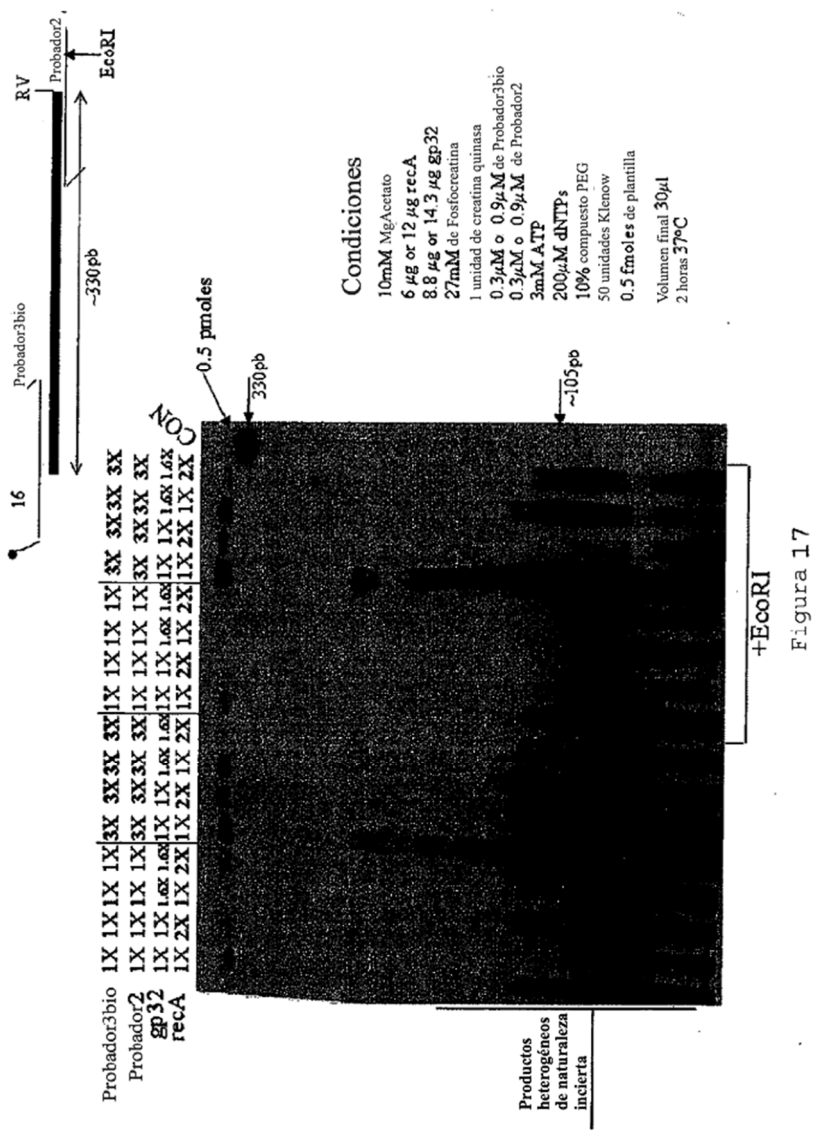

RV
Probador2
EcoRI
16
Probador3bio
~330pb
0.5 pmoles
330pb
~105pb
Condiciones
10mM MgAcetato
6 µg or 12 µg recA
8.8 µg or 14.3 µg gp32
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.3µM o 0.9µM de Probador3bio
0.3µM o 0.9µM de Probador2
3mM ATP
200µM dNTPs
10% compuesto PEG
50 unidades Klenow
0.5 fmoles de plantilla
Volumen final 30µl
2 horas 37ºC
Probador3bio
Probador2
gp32
recA
CON
+EcoRI
Productos heterogéneos de naturaleza incierta

Figura 17

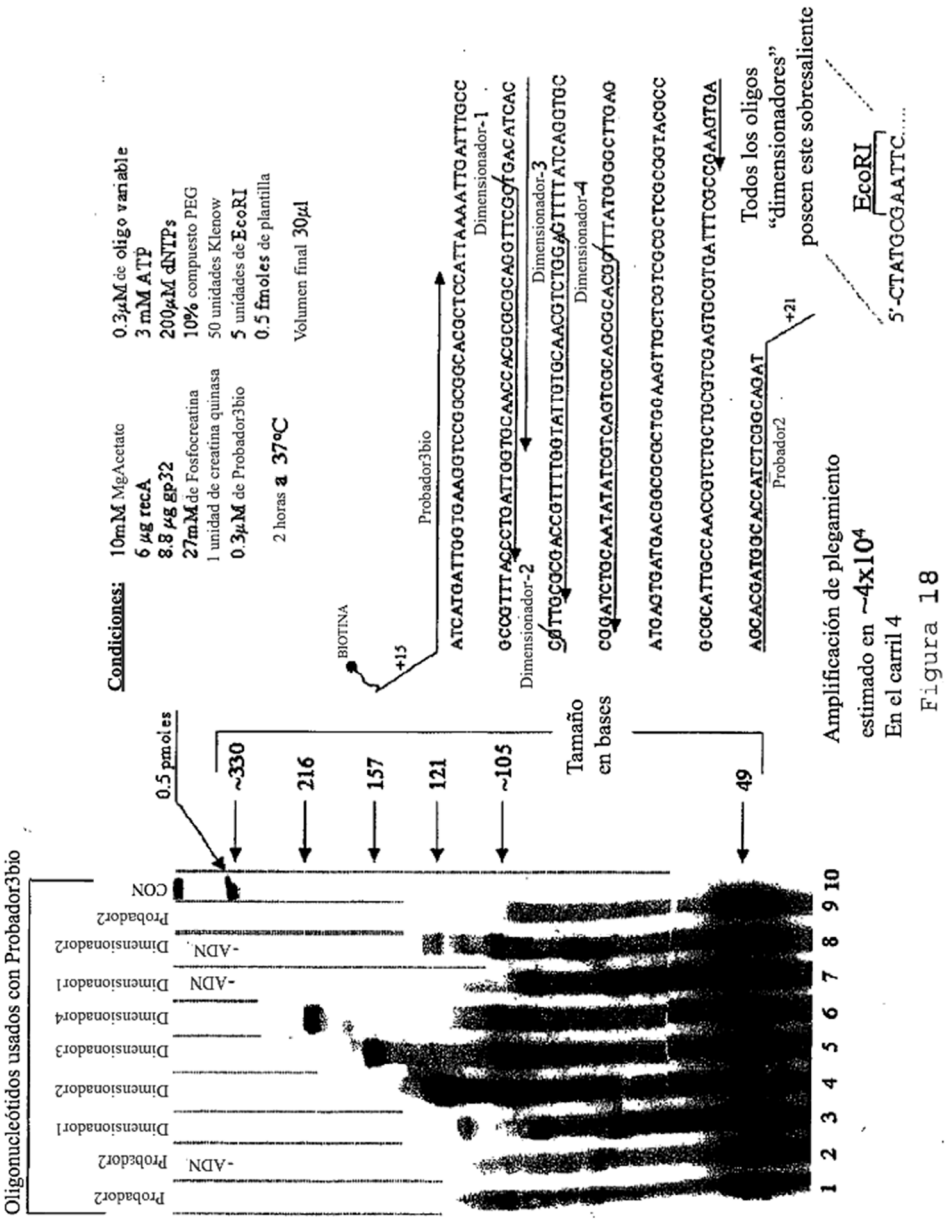

Oligonucleótidos usados con Probador3bio
Probador2
-ADN
Probador2
Dimensionador1
Dimensionador2
Dimensionador3
Dimensionador4
-ADN
Dimensionador1
-ADN
Dimensionador2
Probador2
CON
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
0.5 pmoles
~330
216
157
121
~105
49
Tamaño en bases
Condiciones:
10mM MgAcetato
6 µg recA
8.8 µg gp32
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.3µM de Probador3bio
2 horas a 37ºC
0.3µM de oligo variable
3 mM ATP
200µM dNTPs
10% compuesto PEG
50 unidades Klenow
5 unidades de EcoRI
0.5 fmoles de plantilla
Volumen final 30µl
BIOTINA
+15
Probador3bio
ATCATGATTGGTGAAGGTCCGGCGCACGCTCCATTAAAATTGATTGCC
Dimensionador-1
GCCGTTTACGCTGATTGGTGCAACCACGCGCGCAGGTTCGGTGACATCAC
Dimensionador-2
Dimensionador-3
GGTTGCGCGACCGTTTTGGTATTGTGCAACGTCTGGAGTTTTATCAGGTGC
Dimensionador-4
CGGATCTGCAATATATCGTCAGTCGCACGCACGGTTTATGGGGCTTGAG
ATGAGTGATGACGGCGCGCTGGAAGTTGCTCGTCGCGCTCGCGGTACGCC
GCGCATTGCCAACCGTCTGCTGCGTCGAGTGCGTGATTTCGCCGAAGTGA
AGCACGATGGCACCATCTCGGCAGAT
Probador2
+21
Todos los oligos "dimensionadores" poseen este sobresaliente
EcoRI
5'-CTATGCGAATTC....
Amplificación de plegamiento estimado en ~4x10^4
En el carril 4

Figura 18

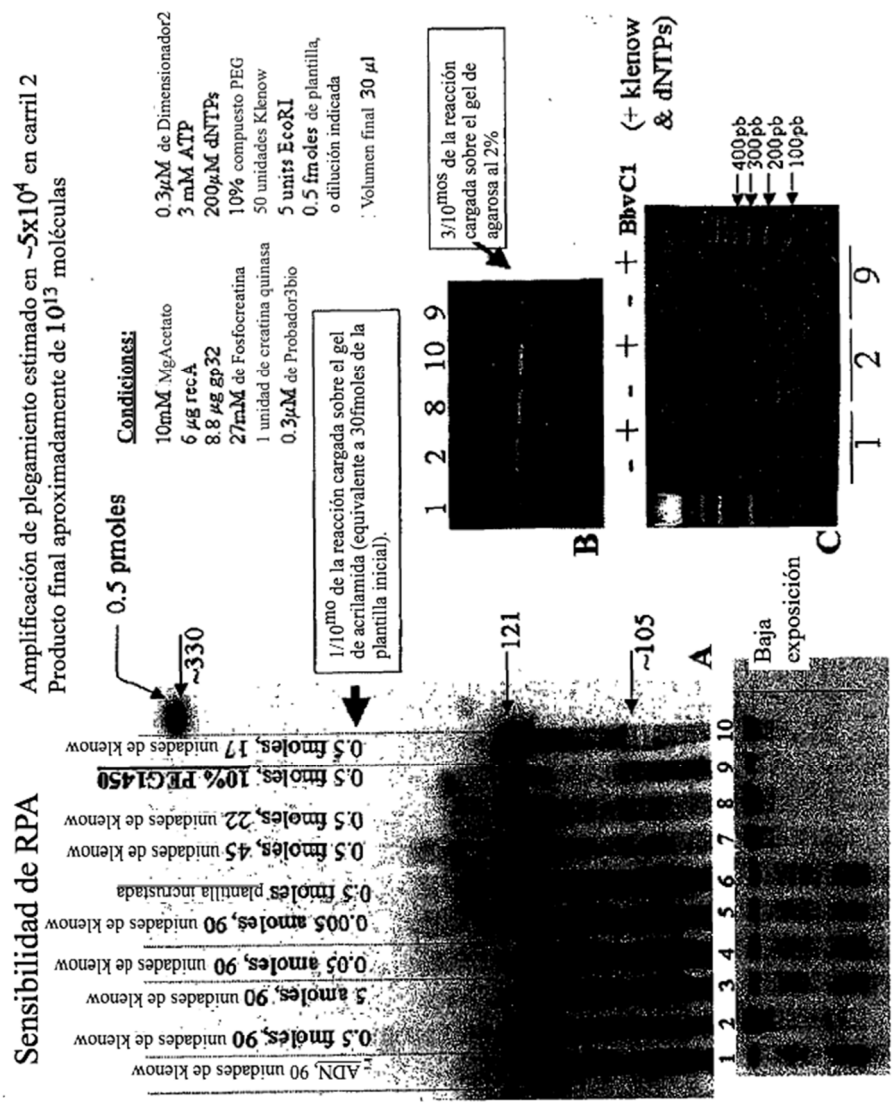

Sensibilidad de RPA
Amplificación de plegamiento estimado en ~5x10⁴ en carril 2
Producto final aproximadamente de 10¹³ moléculas
0.5 pmoles
~330
Condiciones:
10mM MgAcetato
6 μg recA
8.8 μg gp32
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.3μM de Probador3bio
0.3μM de Dimensionador2
3 mM ATP
200μM dNTPs
10% compuesto PEG
50 unidades Klenow
5 units EcoRI
0.5 fmoles de plantilla, o dilución indicada
Volumen final 30 μl
1/10mo de la reacción cargada sobre el gel de acrilamida (equivalente a 30fmoles de la plantilla inicial).
3/10mos de la reacción cargada sobre el gel de agarosa al 2%
ADN, 90 unidades de klenow
0.5 fmoles, 90 unidades de klenow
5 amoles, 90 unidades de klenow
0.05 amoles, 90 unidades de klenow
0.005 amoles, 90 unidades de klenow
0.5 fmoles plantilla incrustada
0.5 fmoles, 45 unidades de klenow
0.5 fmoles, 22 unidades de klenow
0.5 fmoles, 10% PEG1450
0.5 fmoles, 17 unidades de klenow
121
~105
A
Baja exposición
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
1 2 8 10 9
B
- + - + - + BbvC1 (+ klenow & dNTPs)
400pb
300pb
200pb
100pb
C
1 2 9

Figura 19

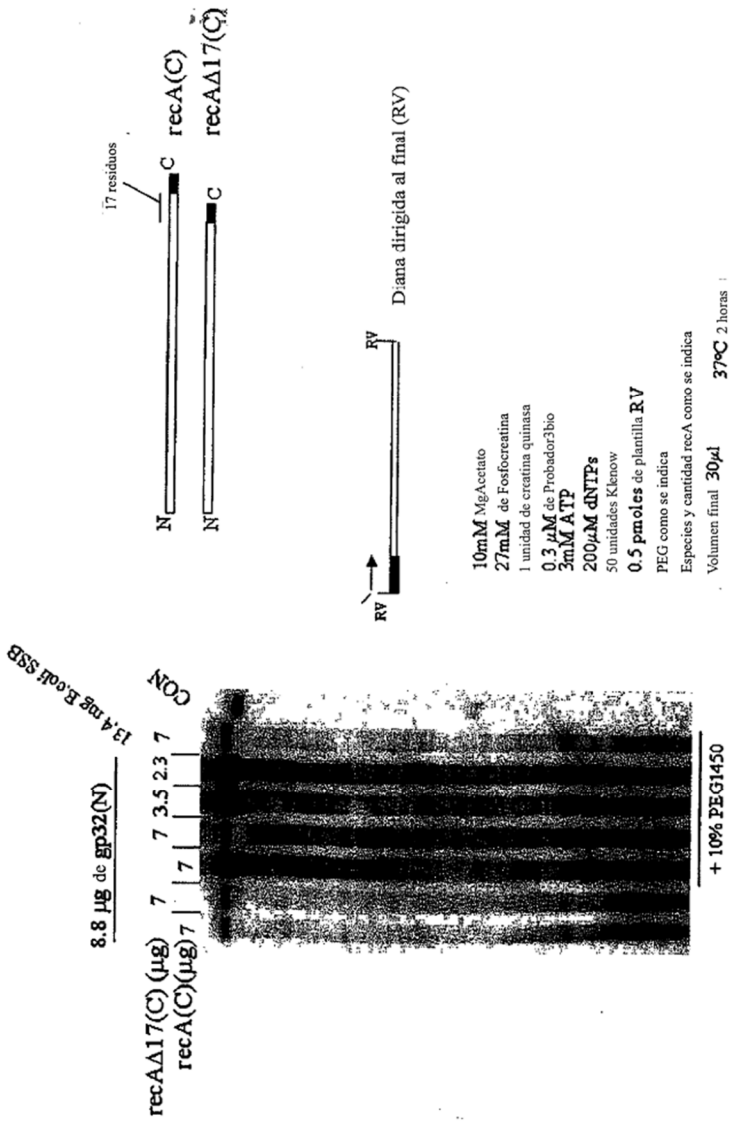

recAΔ17(C) (μg) 7
recA(C)(μg) 7 7
8.8 μg de gp32(N) 7 3.5 2.3 7
13,4 nts E.coli SSB
CON
+ 10% PEG1450
RV
Diana dirigida al final (RV)
10mM MgAcetato
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.3 μM de Probador3bio
3mM ATP
200μM dNTPs
50 unidades Klenow
0.5 pmoles de plantilla RV
PEG como se indica
Especies y cantidad recA como se indica
Volumen final 30μl 37ºC 2 horas
recA(C)
recAΔ17(C)
17 residuos
N
C

Figura 20

Estructura esquemática de proteínas gp32 utilizadas en este estudio

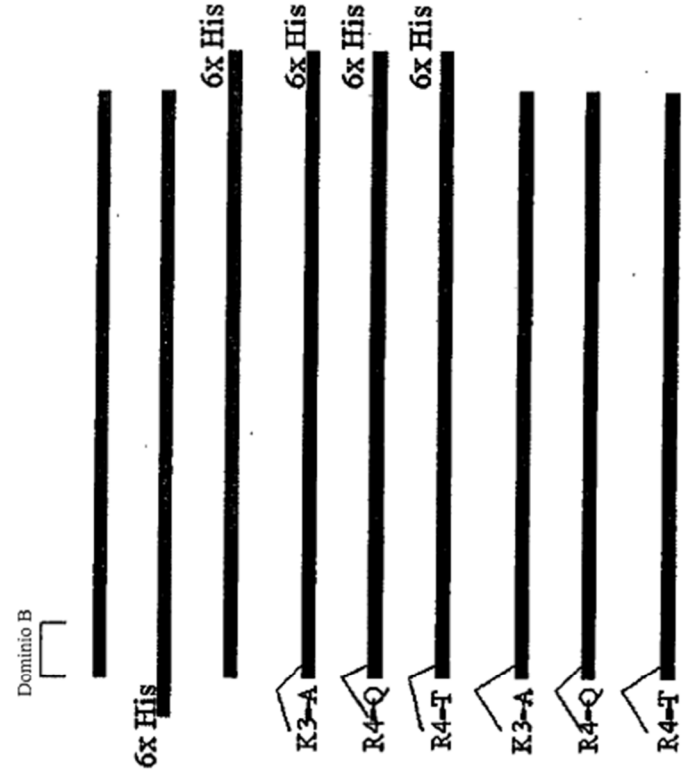


Figura 21

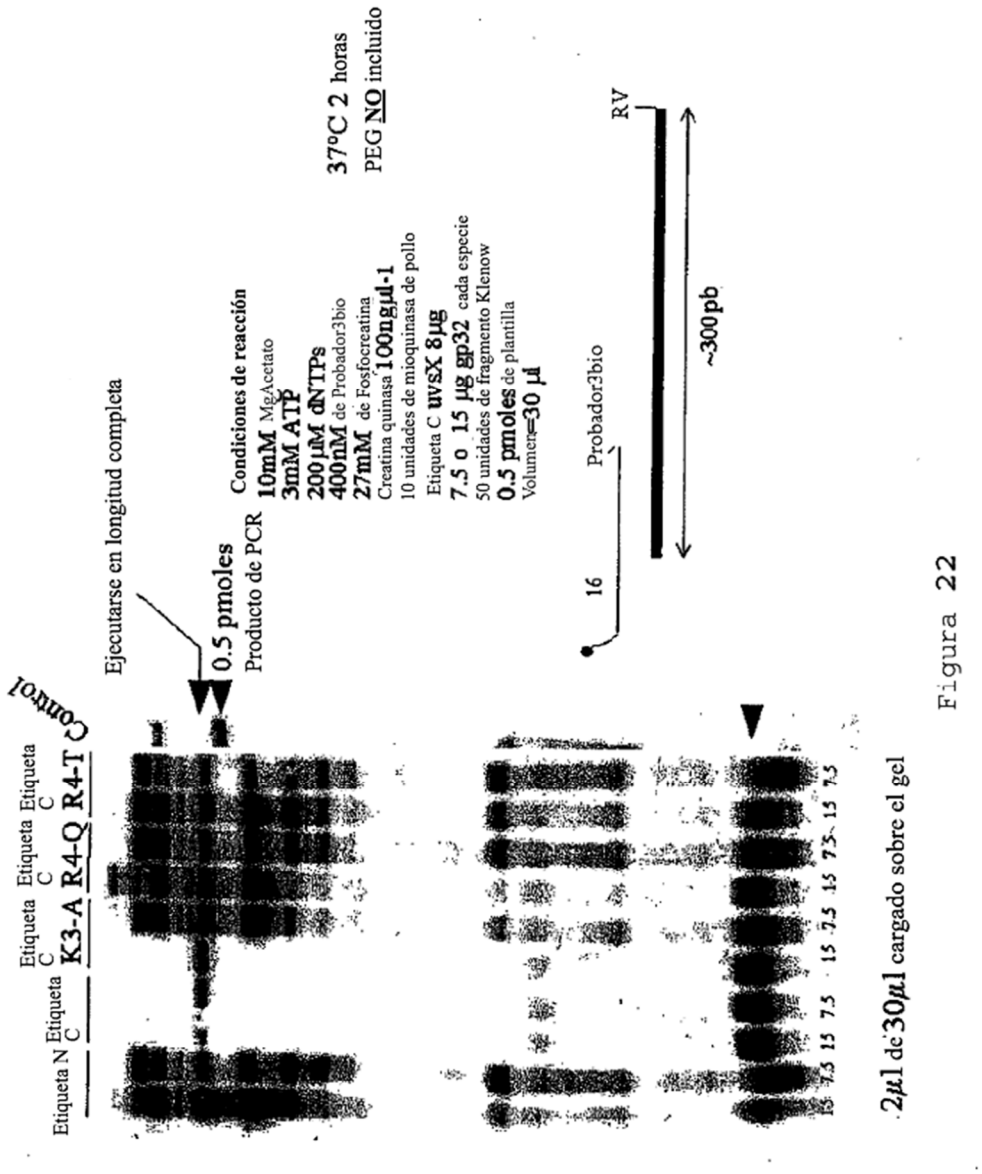

Control
Etiqueta C
Etiqueta C
Etiqueta C
Etiqueta N C
K3-A
R4-Q
R4-T
Ejecutarse en longitud completa
0.5 pmoles
Producto de PCR
Condiciones de reacción
10mM MgAcetato
3mM ATP
200 µM dNTPs
400nM de Probador3bio
27mM de Fosfocreatina
Creatina quinasa 100ngµl-1
10 unidades de mioquinasa de pollo
Etiqueta C uvsX 8µg
7.5 o 15 µg gp32 cada especie
50 unidades de fragmento Klenow
0.5 pmoles de plantilla
Volumen=30 µl
37°C 2 horas
PEG NO incluido
16
Probador3bio
RV
~300pb
7.5 15 7.5 15 7.5 15 7.5 15 7.5 15 7.5
2µl de 30µl cargado sobre el gel

Figura 22

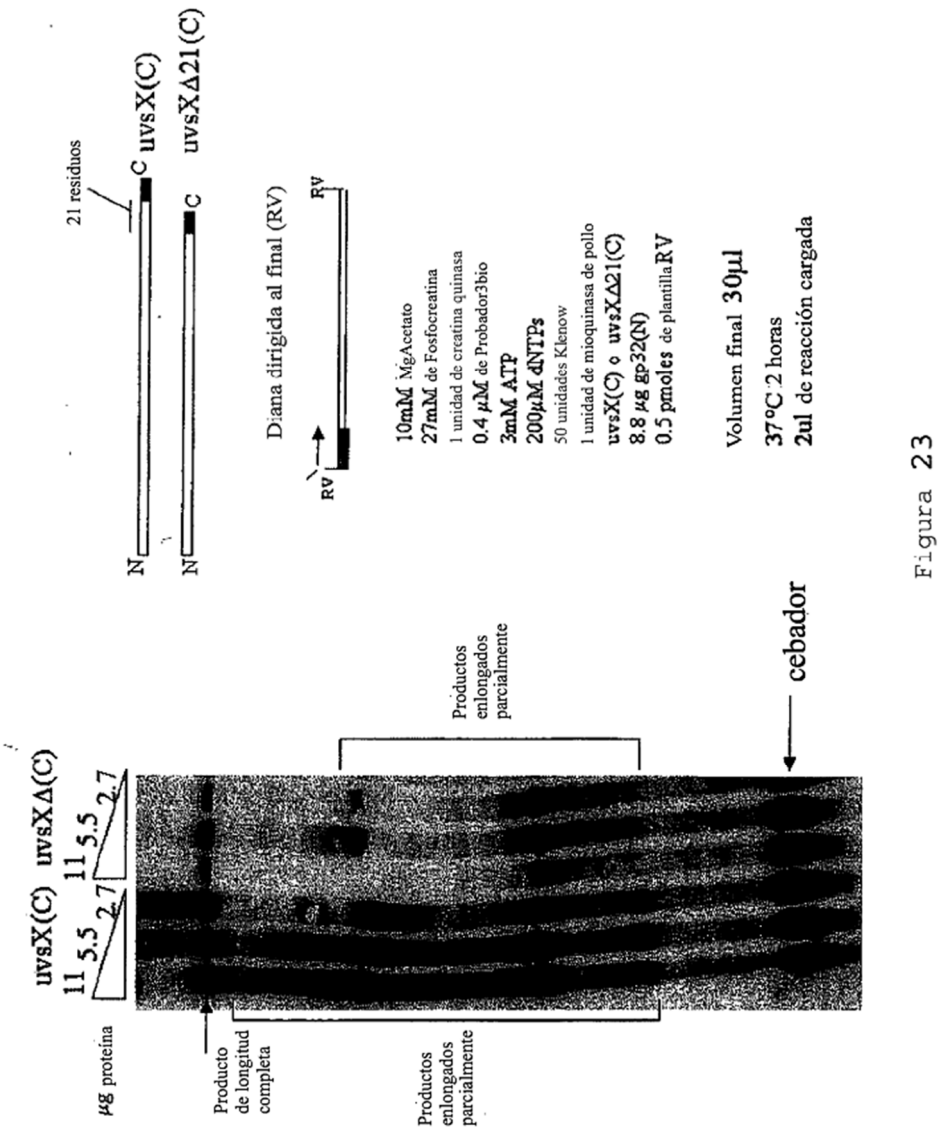

21 residuos
C uvsX(C)
C uvsXΔ21(C)
N
N
Diana dirigida al final (RV)
RV
RV
10mM MgAcetato
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.4 μM de Probador3bio
3mM ATP
200μM dNTPs
50 unidades Klenow
1 unidad de mioquinasa de pollo
uvsX(C) o uvsXΔ21(C)
8.8 μg gp32(N)
0.5 pmoles de plantilla RV
Volumen final 30μl
37°C 2 horas
2ul de reacción cargada
cebador
Productos enlongados parcialmente
uvsX(C) uvsXΔ(C)
11 5.5 2.7
11 5.5 2.7
μg proteína
Producto de longitud completa
Productos enlongados parcialmente

Figura 23

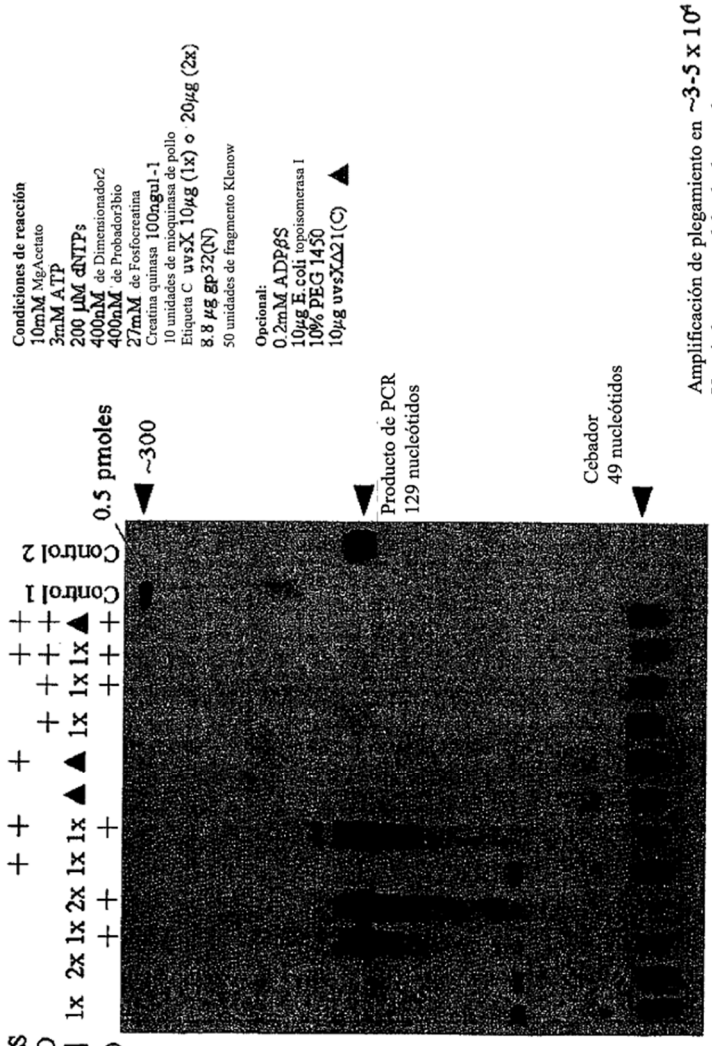

Condiciones de reacción
10mM MgAcetato
3mM ATP
200 µM dNTPs
400nM de Dimensionador2
400nM de Probador3bio
27mM de Fosfocreatina
Creatina quinasa 100ng.ul-1
10 unidades de mioquinasa de pollo
Etiqueta C uvsX 10µg (1x) o 20µg (2x)
8.8 µg gp32(N)
50 unidades de fragmento Klenow
Opcional:
0.2mM ADPβS
10µg E. coli topoisomerasa I
10% PEG 1450
10µg uvsXΔ21(C)
Amplificación de plegamiento en ~3-5 x 10⁴
Y casi el consumo del cebador total
ADPβS
TOPO
uvsX[]
PEG1450
1x 2x 1x 2x 1x 1x ▲ ▲ 1x 1x 1x ▲
Control 1
Control 2
0.5 pmoles
~300
Producto de PCR
129 nucleótidos
Cebador
49 nucleótidos

Figura 24

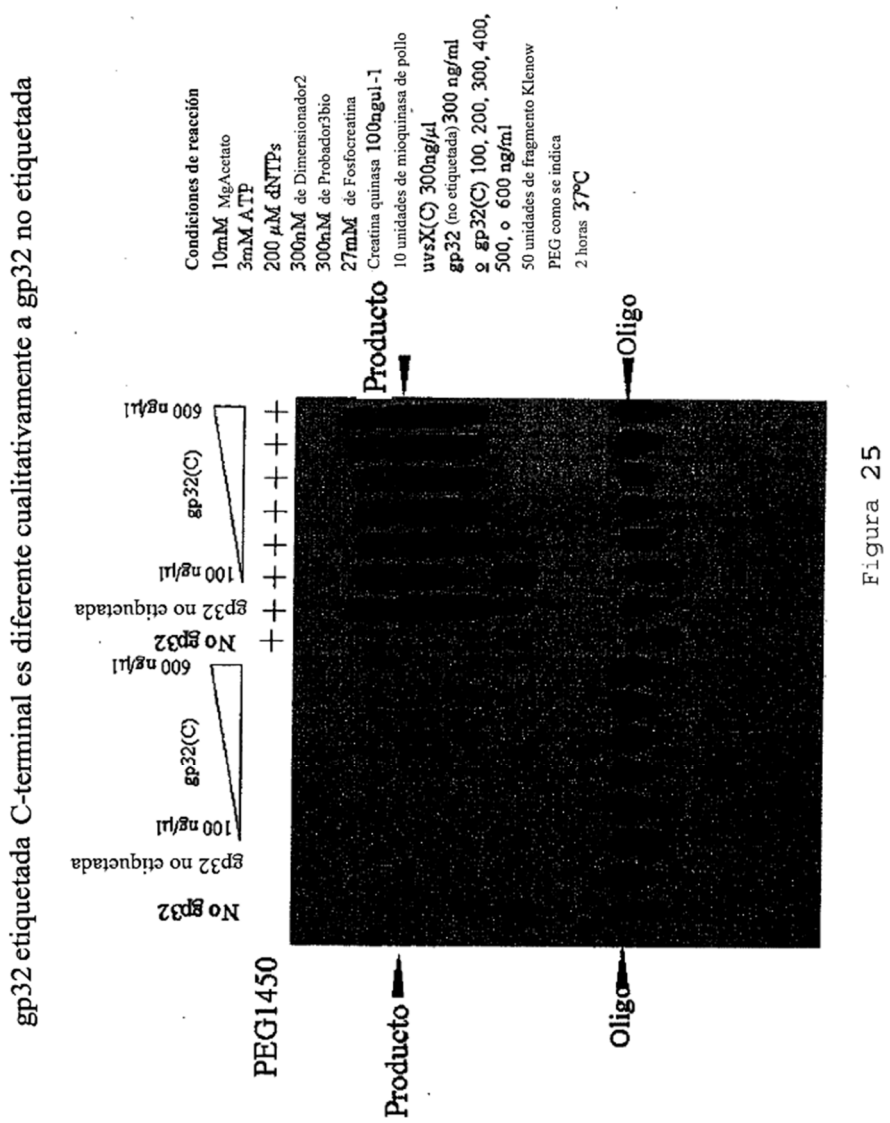

gp32 etiquetada C-terminal es diferente cualitativamente a gp32 no etiquetada
Condiciones de reacción
10mM MgAcetato
3mM ATP
200 μM dNTPs
300nM de Dimensionador2
300nM de Probador3bio
27mM de Fosfocreatina
Creatina quinasa 100ngul-1
10 unidades de mioquinasa de pollo
uvsX(C) 300ng/μl
gp32 (no etiquetada) 300 ng/ml
gp32(C) 100, 200, 300, 400, 500, o 600 ng/ml
50 unidades de fragmento Klenow
PEG como se indica
2 horas 37°C
Producto
Oligo
PEG1450
No gp32
gp32 no etiquetada
100 ng/μl
gp32(C)
600 ng/μl
No gp32
gp32 no etiquetada
100 ng/μl
gp32(C)
600 ng/μl
Producto
Oligo

Figura 25

Titulación de gp32 no etiquetada, y requisito para uvs Y

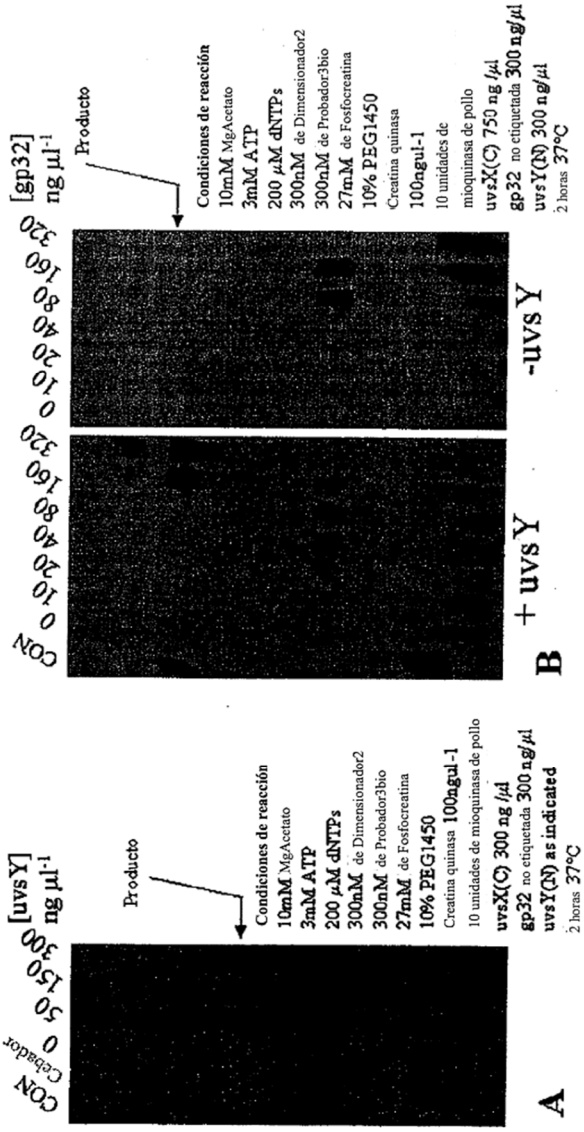


Figura 26

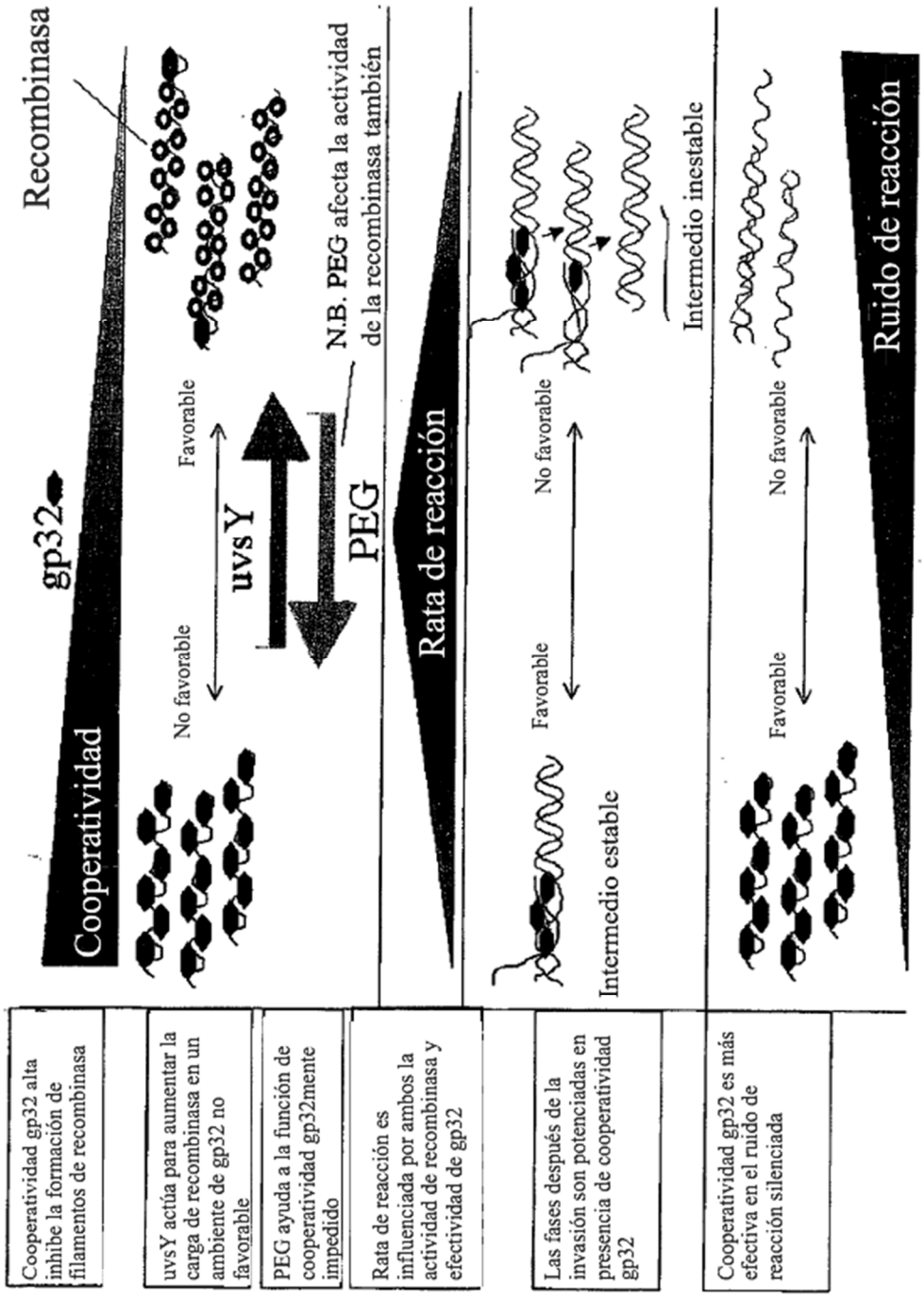

Recombinasa
gp32
Cooperatividad
No favorable
Favorable
uvsY
PEG
N.B. PEG afecta la actividad de la recombinasa también
Rata de reacción
Favorable
No favorable
Intermedio estable
Intermedio inestable
Favorable
No favorable
Ruido de reacción
Cooperatividad gp32 alta inhibe la formación de filamentos de recombinasa
uvsY actúa para aumentar la carga de recombinasa en un ambiente de gp32 no favorable
PEG ayuda a la función de cooperatividad gp32mente impedido
Rata de reacción es influenciada por ambos la actividad de recombinasa y efectividad de gp32
Las fases después de la invasión son potenciadas en presencia de cooperatividad gp32
Cooperatividad gp32 es más efectiva en el ruido de reacción silenciada

Figura 27

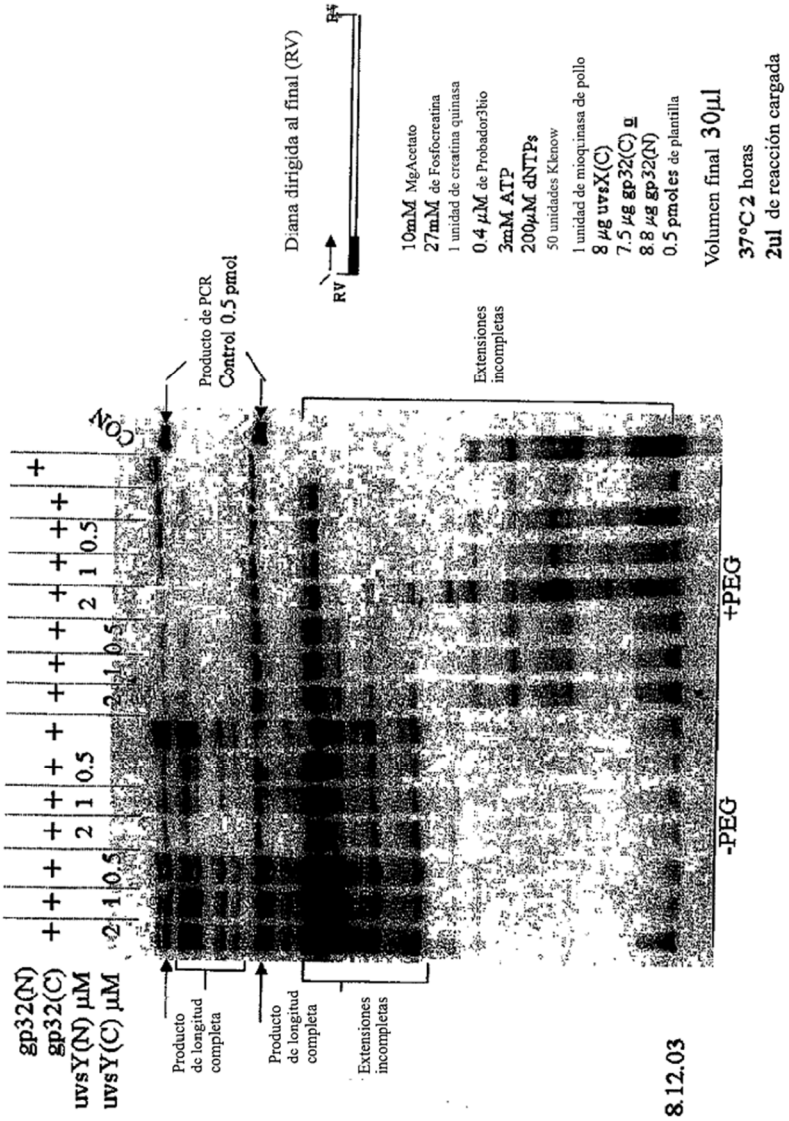

gp32(N)
gp32(C)
uvsY(N) µM
uvsY(C) µM
Producto de longitud completa
Producto de longitud completa
Extensiones incompletas
Producto de PCR
Control 0.5 pmol
Diana dirigida al final (RV)
RV
Extensiones incompletas
10mM MgAcetato
27mM de Fosfocreatina
1 unidad de creatina quinasa
0.4 µM de Probador3bio
3mM ATP
200µM dNTPs
50 unidades Klenow
1 unidad de mioquinasa de pollo
8 µg uvsX(C)
7.5 µg gp32(C) o
8.8 µg gp32(N)
0.5 pmoles de plantilla
Volumen final 30µl
37°C 2 horas
2ul de reacción cargada
-PEG
+PEG
8.12.03

Figura 28

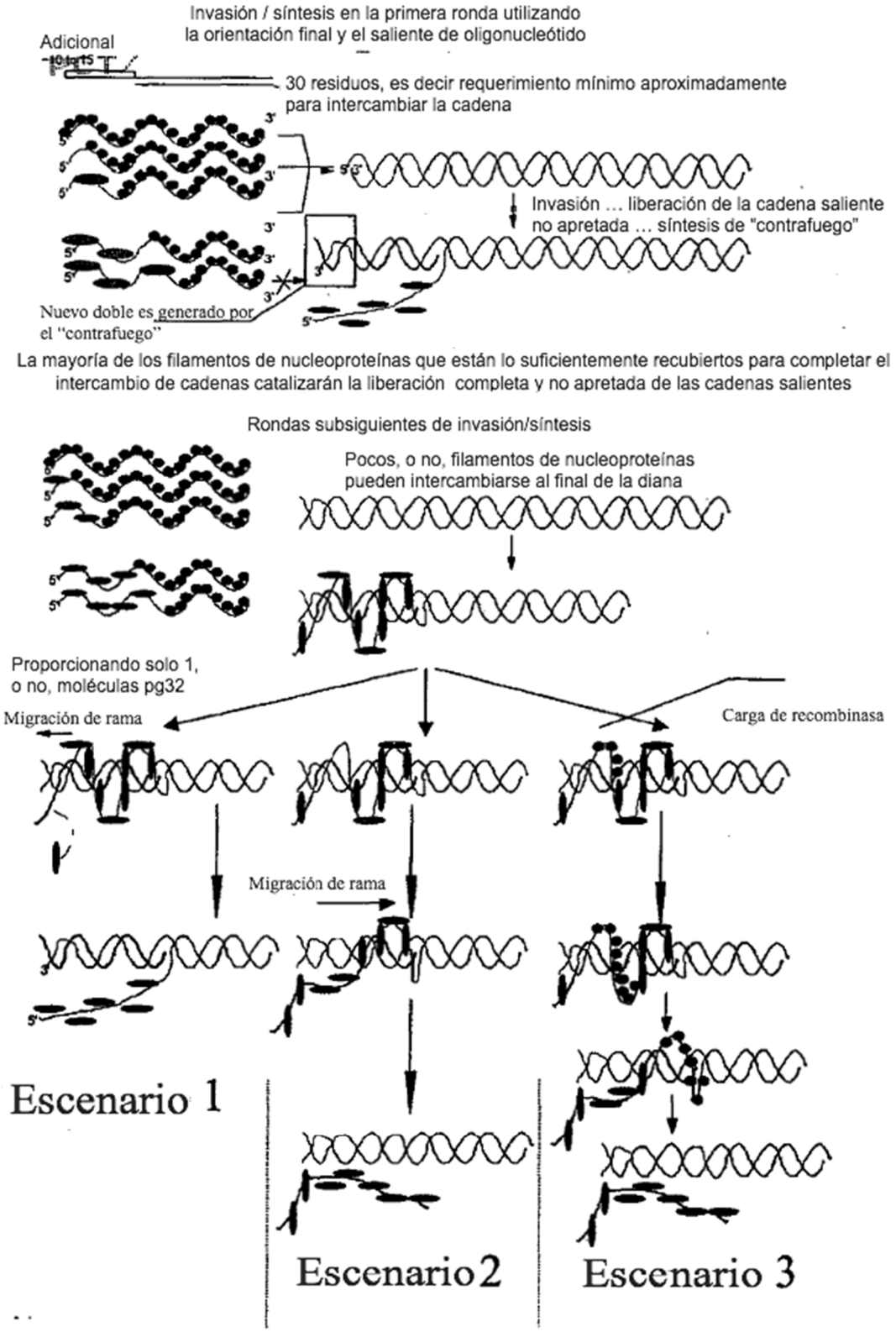

Invasión / síntesis en la primera ronda utilizando
la orientación final y el saliente de oligonucleótido
Adicional
30 residuos, es decir requerimiento mínimo aproximadamente
para intercambiar la cadena
Invasión ... liberación de la cadena saliente
no apretada ... síntesis de "contrafuego"
Nuevo doble es generado por
el "contrafuego"
La mayoría de los filamentos de nucleoproteínas que están lo suficientemente recubiertos para completar el
intercambio de cadenas catalizarán la liberación completa y no apretada de las cadenas salientes
Rondas subsiguientes de invasión/síntesis
Pocos, o no, filamentos de nucleoproteínas
pueden intercambiarse al final de la diana
Proporcionando solo 1,
o no, moléculas pg32
Migración de rama
Carga de recombinasa
Migración de rama
Escenario 1
Escenario 2
Escenario 3

Figura 29

Reacción RPA de ADN genómico humano: compararla plantilla no cortada vs cortada; comparar los cebadores pares

Condiciones de reacción
10mM MgAcetato
3mM ATP
200 μM dNTPs
300nM cebador Arriba3
300nM cebador Abajo 1, 2, o 3
27mM de Fosfocreatina
Creatina quinasa **100ngul-1**
10 unidades de mioquinasa de pollo
uvsX(C) 300ng/µl
gp32(C)K3A 300 ng/µl
uvsY(N) 50 ng/µl
50 unidades de fragmento Klenow
10% PEG1450

Volumen final de reacción **30 µl**
37°C 5 horas

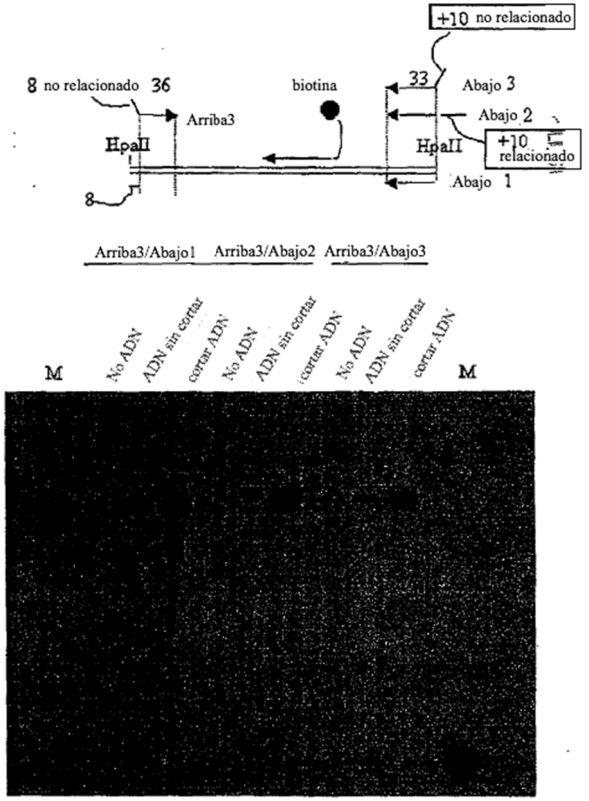


Figura 30

ES 2 718 482 T3

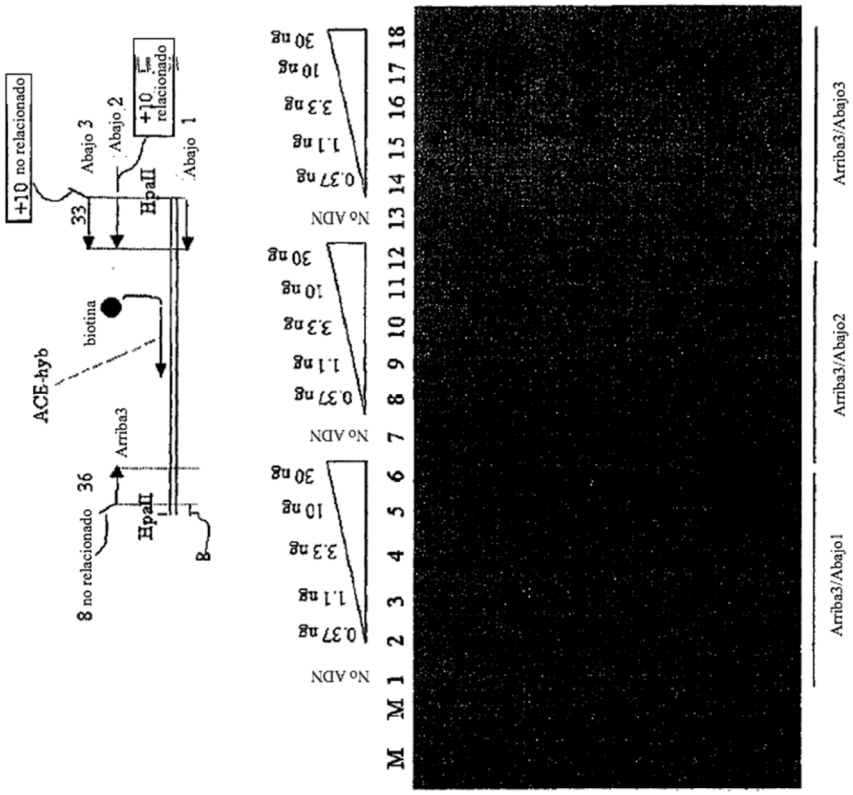


Figura 31

Condiciones de reacción
10mM MgAcetato
3mM ATP
200 µM dNTPs
300nM cebador Arriba3
300nM cebador Abajo 1, 2, o 3
27mM de Fosfocreatina
Creatina quinasa **100ngul-1**
10 unidades de mioquinasa de pollo
uvsX(C) 300ng/µl
gp32(C)K3A 300 ng/µl
uvsY(N) 50 ng/µl
50 unidades de fragmento Klenow
10% PEG1450

Volumen final de reacción **30 µl**
37°C 5 horas

Sonda **ACE-hyb**

Condiciones de reacción
10mM MgAcetato
3mM ATP
200 µM dNTPs
300nM cebador Arriba3
300nM cebador Abajo 1, 2, o 3
27mM de Fosfocreatina
Creatina quinasa **100ngul-1**
10 unidades de mioquinasa de pollo
uvsX(C) 300ng/µl
gp32(C)K3A 300 ng/µl
uvsY(N) 50 ng/µl
50 unidades de fragmento Klenow
10% PEG1450

Volumen final de reacción **30 µl**
37°C 5 horas

Figura 32

Modo por el cual los artefactos del cebador pueden ser generados en condiciones de baja temperatura

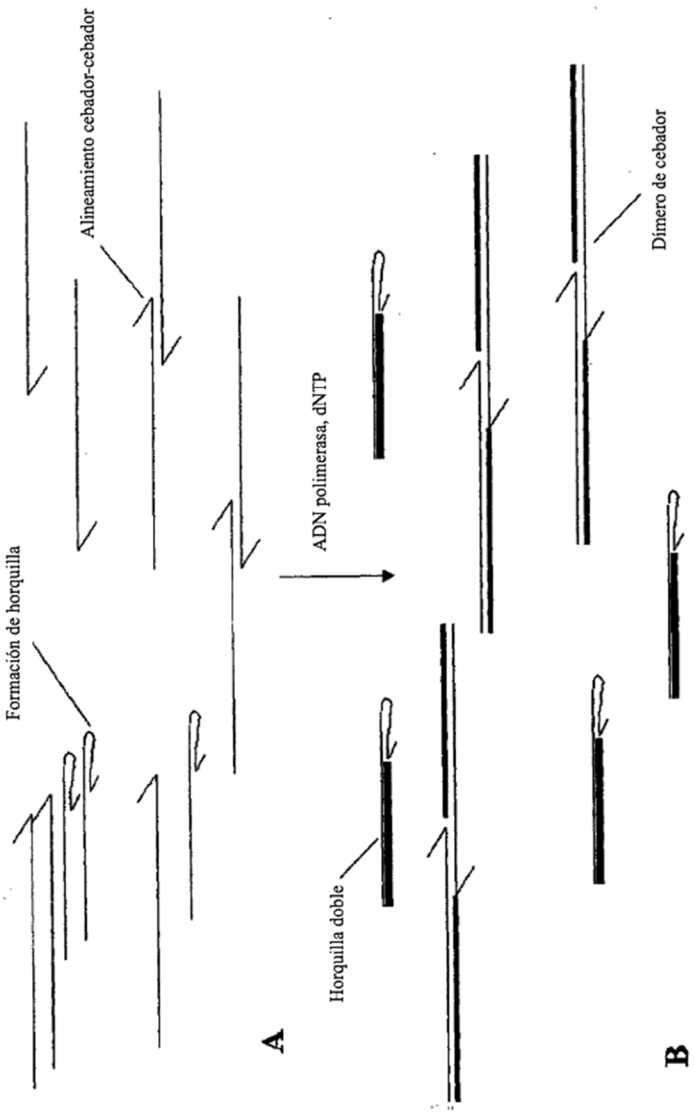


Figura 33

Métodos para limitar el ruido del cebador
Descripción
Región doble diseñada
A
Base 3' única sobresaliente
3'
5'
5'
bloqueado en 3'
Un oligonucleótido corto bloqueado en 3' complementario a la región 3' del oligonucleótido focalizado compite eficientemente con la formación de la estructura secundaria
B
Base 3' única sobresaliente
3'
5'
5'
bloqueado en 3'
Un oligonucleótido corto bloqueado en 3' complementario a la región 3' del oligonucleótido focalizado compite eficientemente con la formación de la estructura secundaria. Está atado en su extremo 3' al extremo 5' del oligo focalizado.
C
Base 3' única sobresaliente
3'
5'
5'
bloqueado en 3'
Un oligonucleótido corto bloqueado en 3' complementario a la región 3' del oligonucleótido focalizado compite eficientemente con la formación de la estructura secundaria. Está atado en su extremo 5' al extremo 5' del oligo focalizado.
D
Base 3' única sobresaliente
3'
5'
Una región complementaria corta a la región 3' del oligo focalizado es adicionada a la región 5' del oligo focalizado. Este compite eficientemente con la formación de la estructura secundaria.

Figura 34

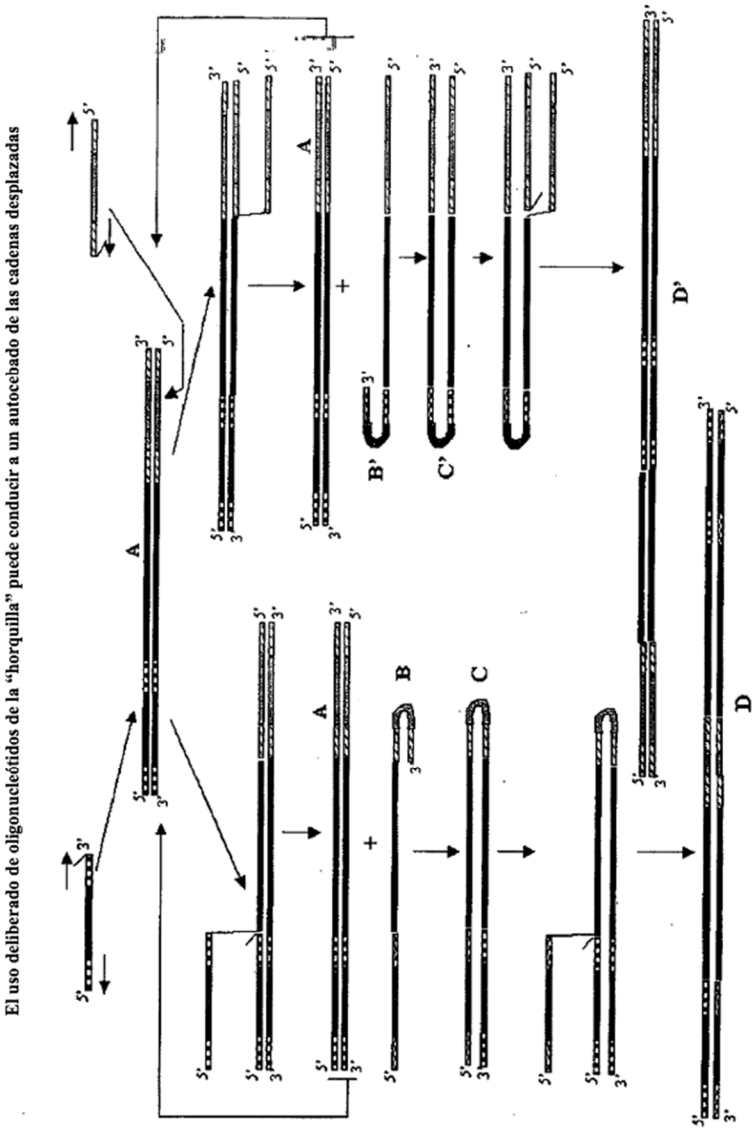

El uso deliberado de oligonucleótidos de la "horquilla" puede conducir a un autocebado de las cadenas desplazadas
A
B
C
D
B'
C'
D'

Figura 35

Establecimiento de condiciones para la amplificación sensible sin ruido

Figura 36

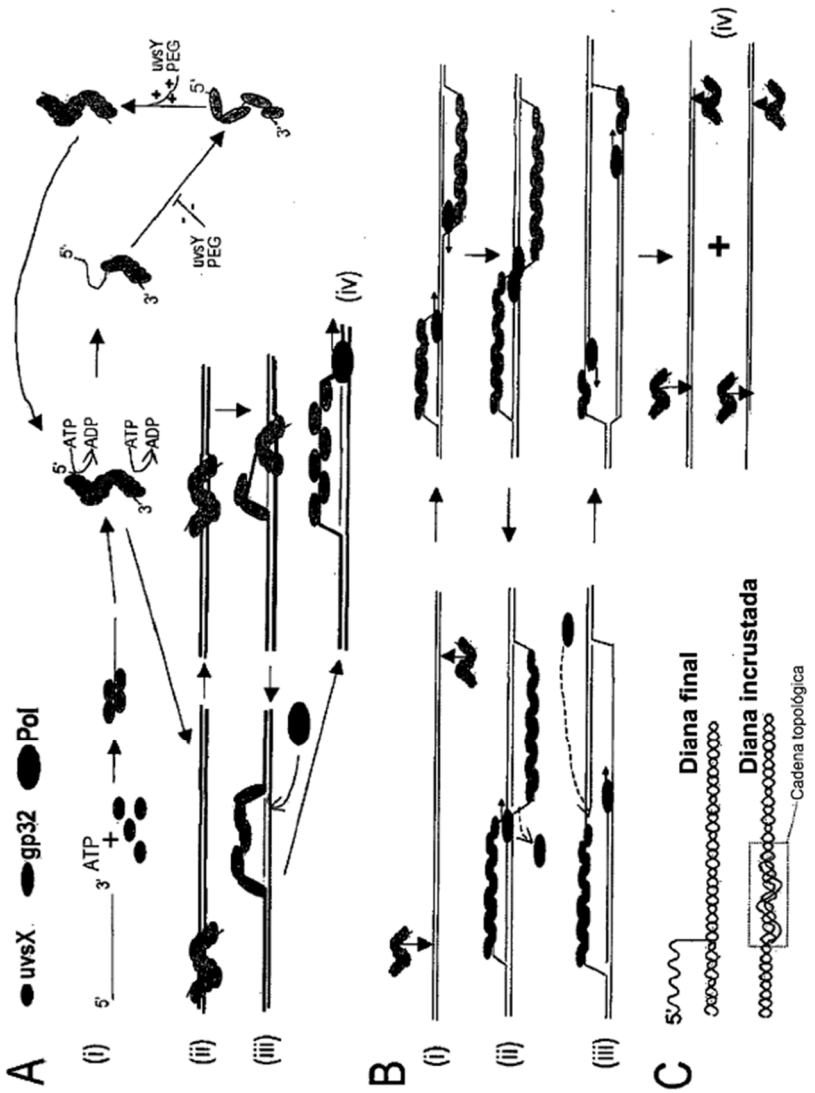

A
uvsX
gp32
Pol
(i)
5'
3'
ATP
ADP
uvsY
PEG
(ii)
(iii)
(iv)
B
(i)
(ii)
(iii)
C
5'
Diana final
Diana incrustada
Cadena topológica
(iv)

Figura 37

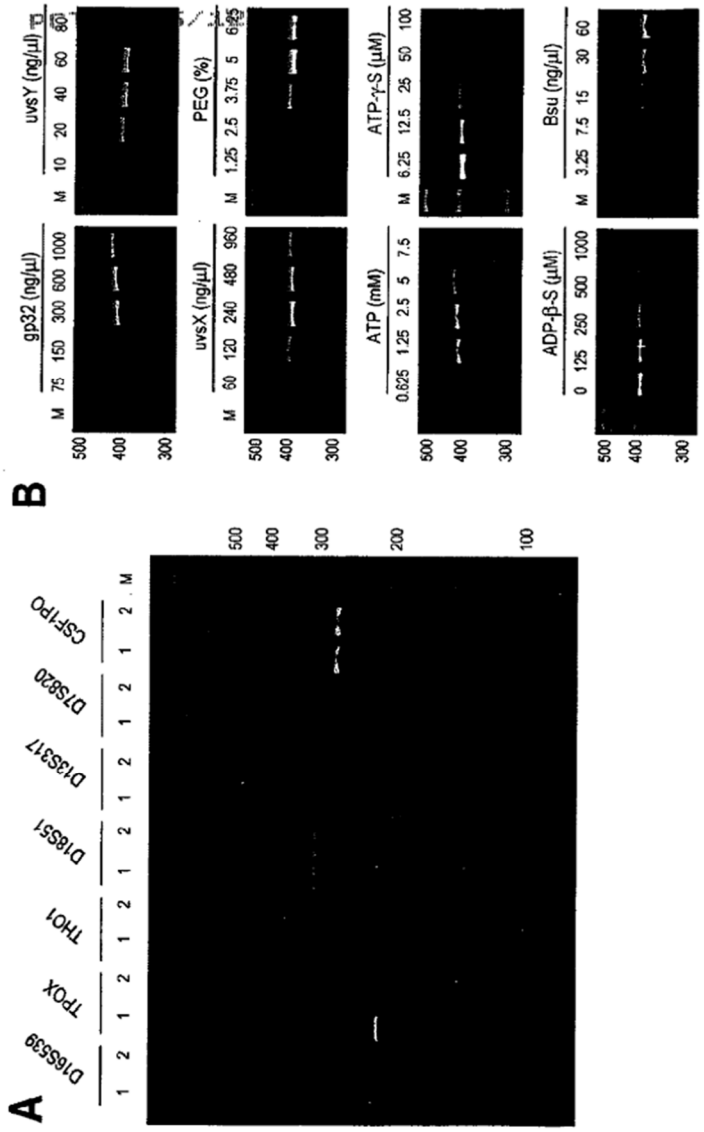

A
D16S539
TPOX
THO1
D18S51
D13S317
D7S820
CSF1PO
M
500
400
300
200
100
B
gp32 (ng/µl)
uvsY (ng/µl)
uvsX (ng/µl)
PEG (%)
ATP (mM)
ATP-γ-S (µM)
ADP-β-S (µM)
Bsu (ng/µl)

Figura 38

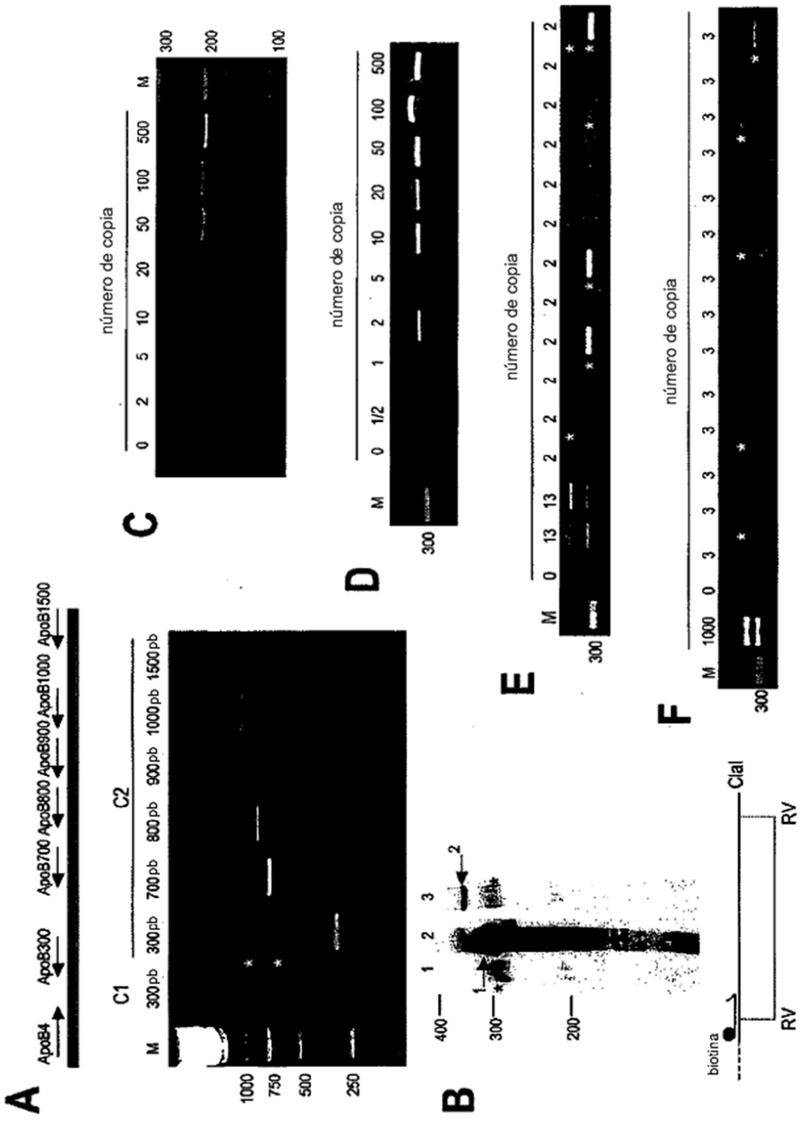

A
ApoB4
ApoB300
ApoB700
ApoB800
ApoB900
ApoB1000
ApoB1500
C1
C2
B
biotina
ClaI
RV
C
D
E
F
número de copia

Figura 39

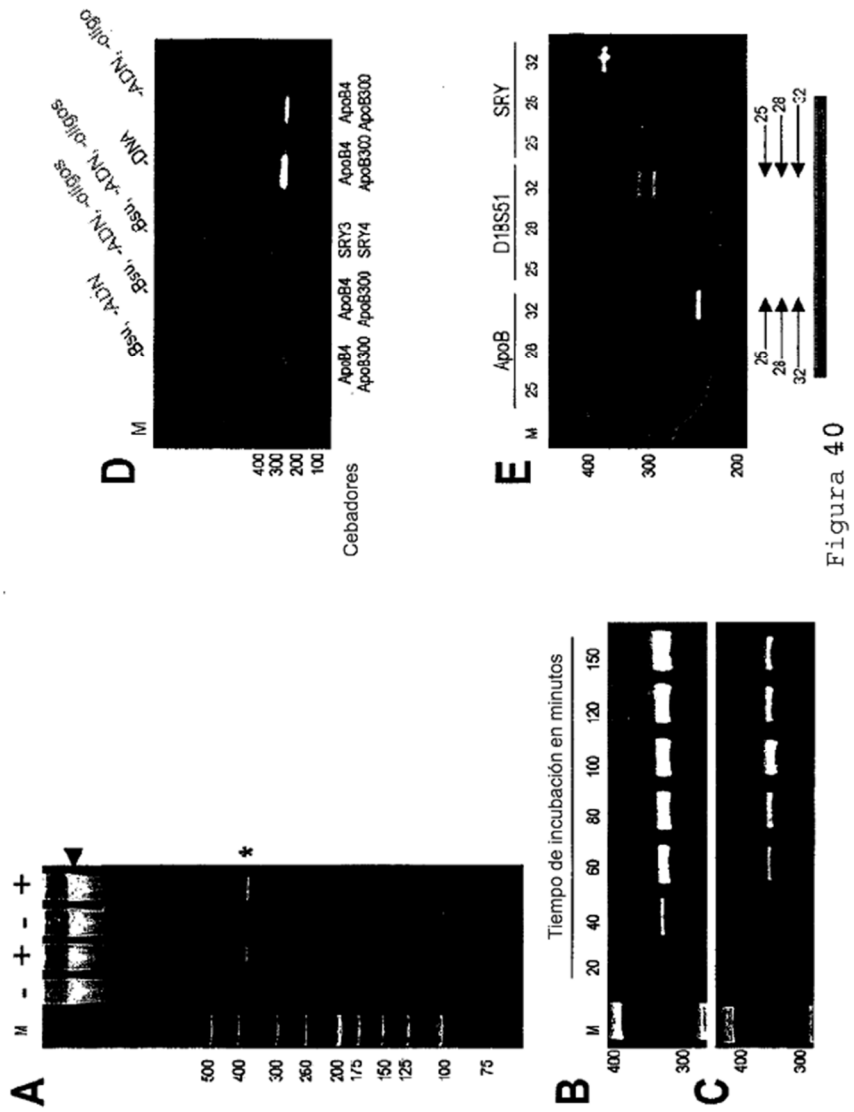
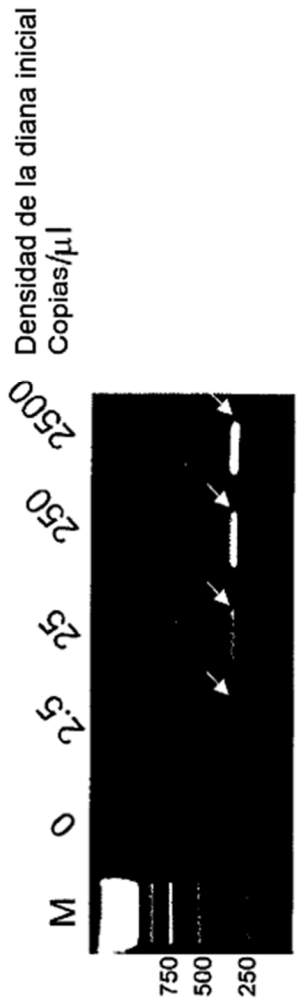

A
M
- + - +
500
400
300
250
200
175
150
125
100
75
B
Tiempo de incubación en minutos
M
20
40
60
80
100
120
150
400
300
C
400
300
D
M
400
300
200
100
ApoB4
ApoB300
SRY3
SRY4
Cebadores
E
M
ApoB
D18S51
SRY
25
28
32
26
28
32
400
300
200

Figura 40



Plantilla: ADN genómico de *B.subtilis*

Cebadores: BsA1 & BsB3

Fig 41

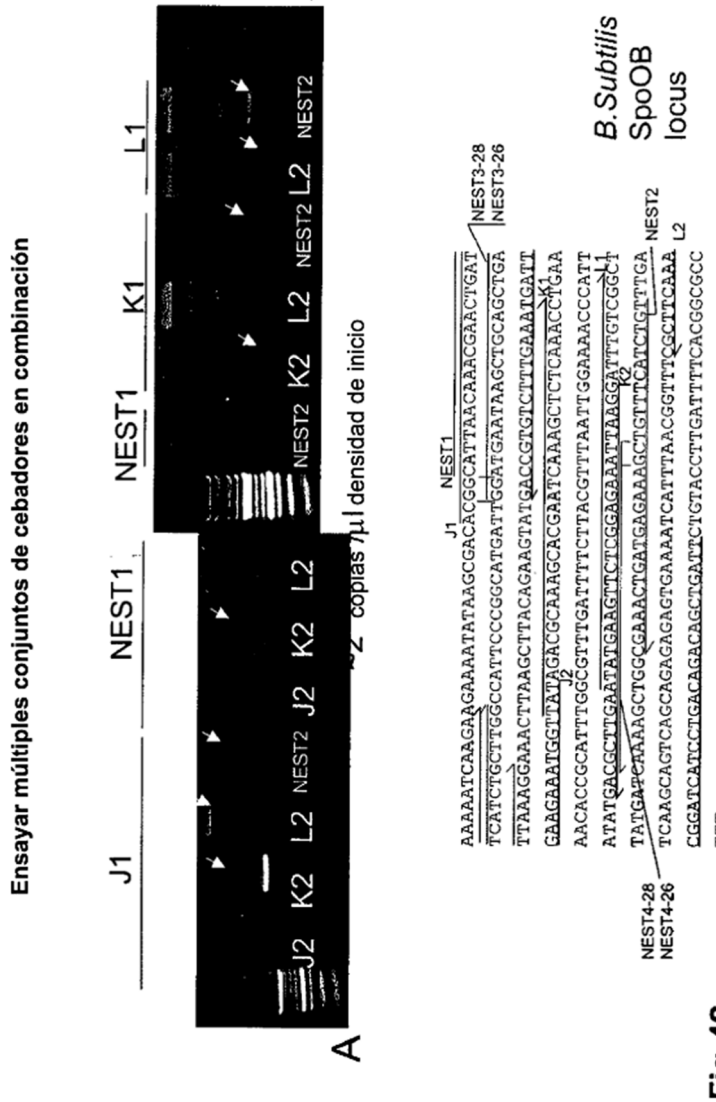

Ensayar múltiples conjuntos de cebadores en combinación
J1
NEST1
NEST1
K1
L1
J2 K2 L2 NEST2 J2 K2 L2
NEST2 K2 L2 NEST2 L2 NEST2
copias /µl densidad de inicio
A
J1
NEST1
NEST3-28
NEST3-26
B.Subtilis
SpoOB
locus
NEST2
L2
NEST4-28
NEST4-26
B

Fig 42

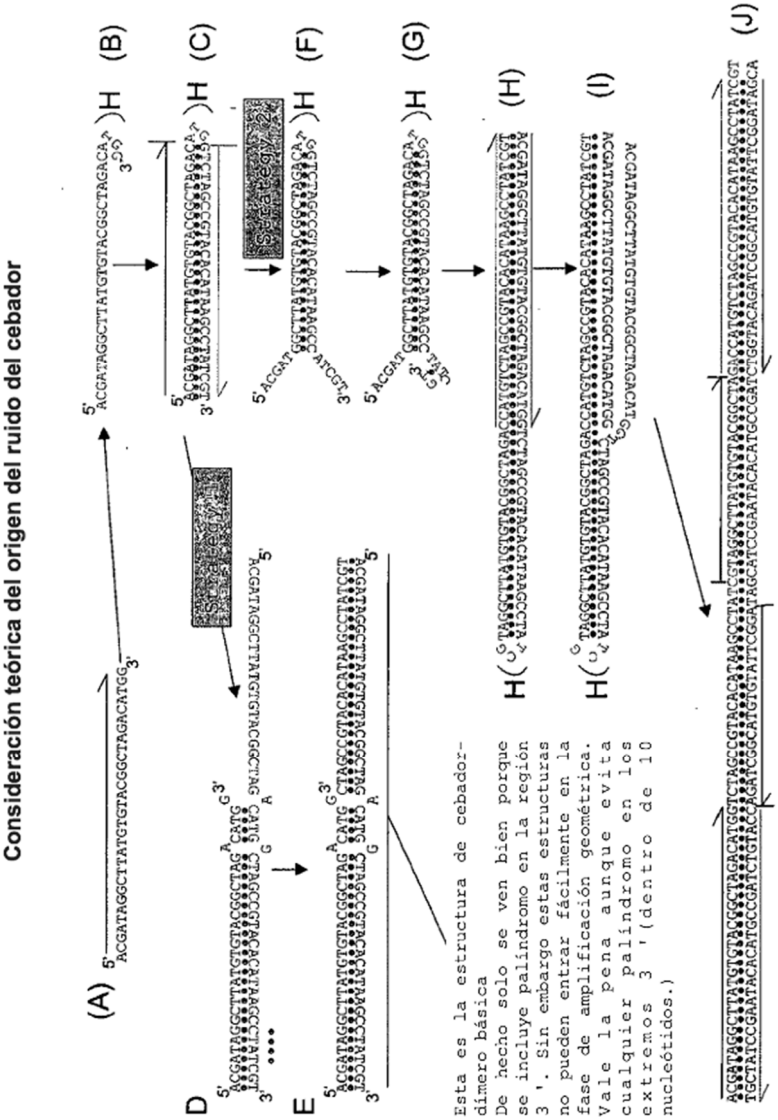

Consideración teórica del origen del ruido del cebador
(A)
(B)
(C)
D
E
(F)
(G)
Esta es la estructura de cebador-dímero básica
De hecho solo se ven bien porque se incluye palíndromo en la región 3 '. Sin embargo estas estructuras no pueden entrar fácilmente en la fase de amplificación geométrica. Vale la pena aunque evita cualquier palíndromo en los extremos 3 '(dentro de 10 nucleótidos.)
(H)
(I)
(J)
Ampliación de fase geométrica

Fig 43

Estrategias de diseño de oligonucleótido
1. Longitud
2. Inclusión de bases de LNA, u otros azúcares modificados.
B
O
PO4
OH
O
3. Adición de secuencias al extremo 5' de oligo.
GGGGG
CCCCC
NNNNN
OTHER

Fig 44

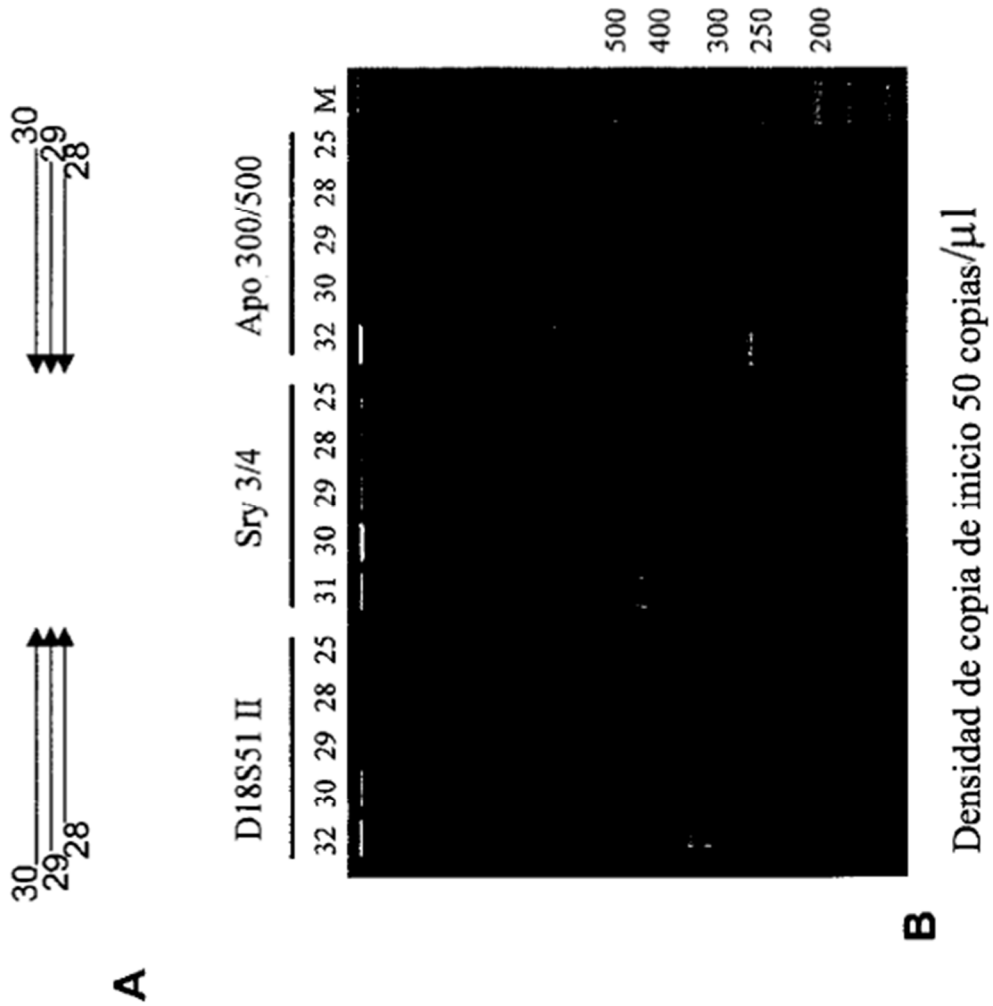

A
30
29
28
30
29
28
D18S51 II
32 30 29 28 25
Sry 3/4
31 30 29 28 25
Apo 300/500
32 30 29 28 25 M
500
400
300
250
200
B
Densidad de copia de inicio 50 copias/µl

Fig 45

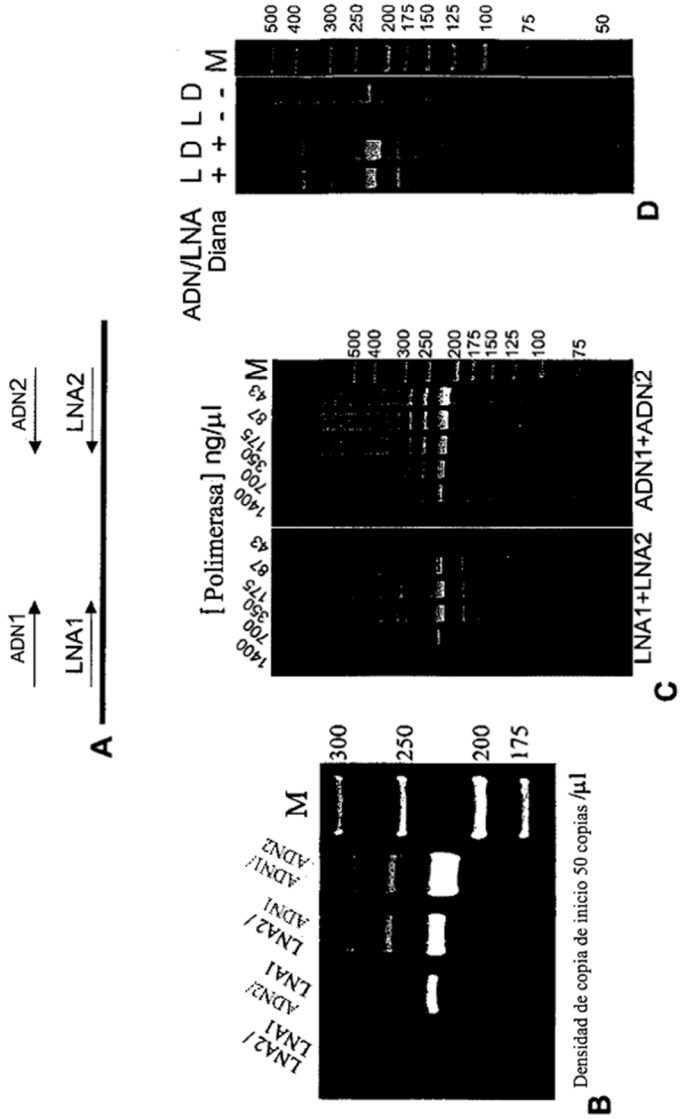

A
ADN1
LNA1
ADN2
LNA2
B
M
300
250
200
175
LNA2 / LNA1
ADN2/ LNA1
LNA2 / ADN1
ADN1/ ADN2
Densidad de copia de inicio 50 copias /µl
C
[Polimerasa] ng/µl
M
500
400
300
250
200
175
150
125
100
75
1400
700
350
175
87
43
LNA1+LNA2
ADN1+ADN2
D
ADN/LNA
Diana
L D L D
+ + - -
M
500
400
300
250
200
175
150
125
100
75
50

Fig 46

Las secuencias adjuntadas 5' heterólogas pueden afectar la actividad del cebador en RPA

A

J1- ACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
J1C - CCCCCACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
J1G - GGGGGACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG

K2 - CCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC
K2C - CCCCCCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC
K2G - GGGGGCCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC

B

Fig 47

Betaína puede regular la proporción señal – ruido

Fig 48

Estrategias de combinación/anidamiento

Oligos rápidos exteriores, concentración limitada, interior más lento/ limpiador

Uno corto o LNA, uno normal

Fig 49

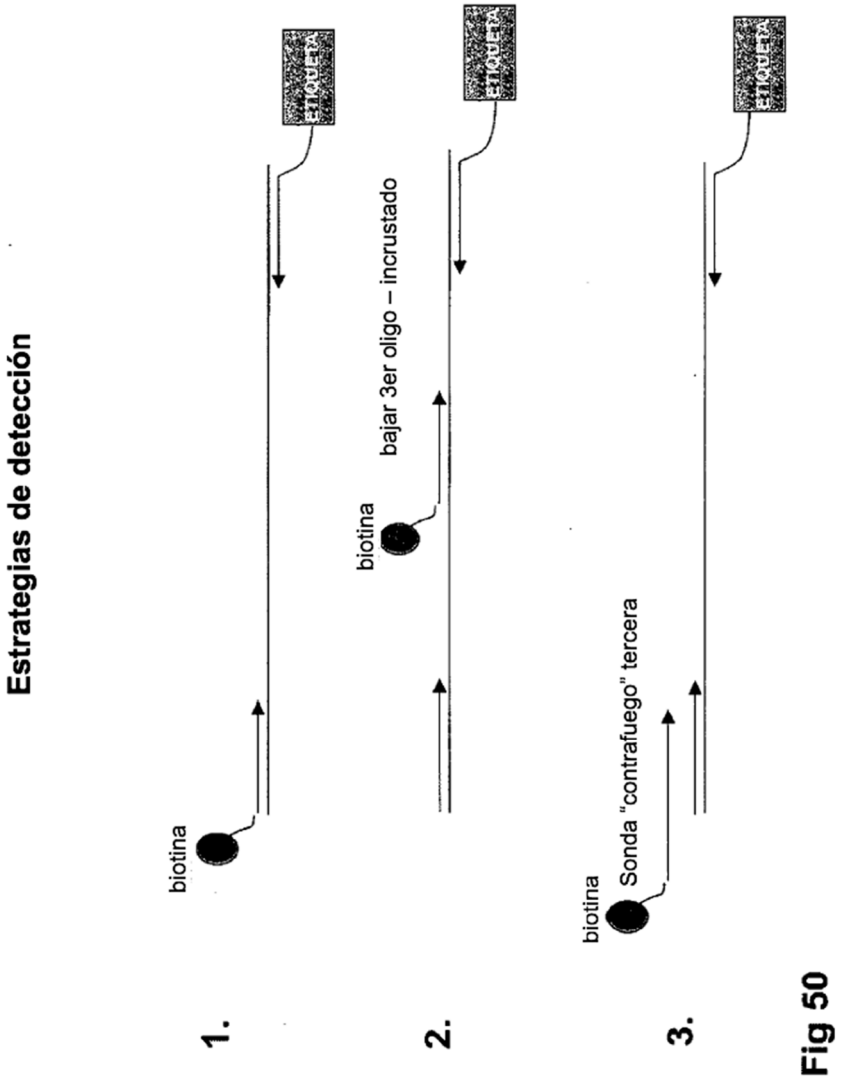

Estrategias de detección
biotina
ETIQUETA
1.
biotina
bajar 3er oligo – incrustado
ETIQUETA
2.
biotina
Sonda "contrafuego" tercera
ETIQUETA
3.

Fig 50

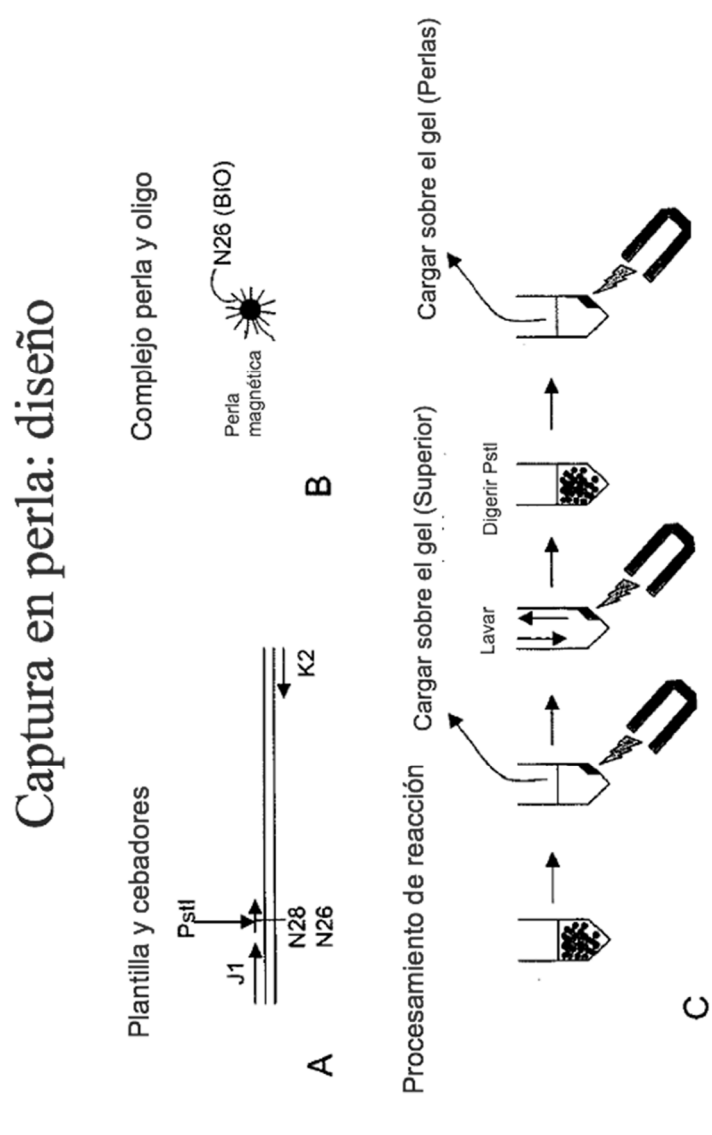

Captura en perla: diseño
Plantilla y cebadores
PstI
J1
N28
N26
K2
A
Complejo perla y oligo
N26 (BtO)
Perla magnética
B
Procesamiento de reacción
Cargar sobre el gel (Superior)
Lavar
Digerir PstI
Cargar sobre el gel (Perlas)
C

Fig 51

Captura de perla: resultados
Un oligo corto puede ser utilizado para capturar pero no soporta la amplificación eficiente
Cantidades significativas de productos específicos son capturadas sobre las perlas
PstI
J1
N28
N26
K2
A
Oligo(s)
M
J1+K2
J1+K2+N28
J1+K2+N26
N28
N26
K2+N28
K2+N26
Sin diana
2 copias/µl
B
Diana
Total
Superior
Perlas (PstI)
M
C

Fig 52

Liofilización

- Reacciones de RPA completas fueron liofilizadas bajo una variedad de condiciones (A-D).
- Reconstitución con amortiguador e incubación con plantillas de rendimientos de generación de producto bueno después de 3, 6 y 10 días de almacenamiento en temperatura ambiente.

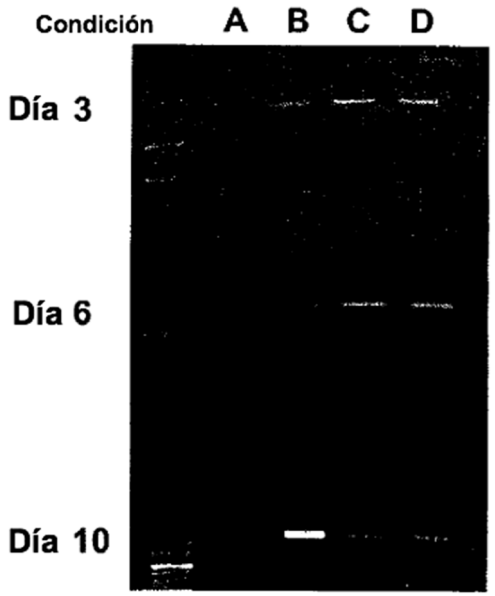


Fig 53

ES 2 718 482 T3

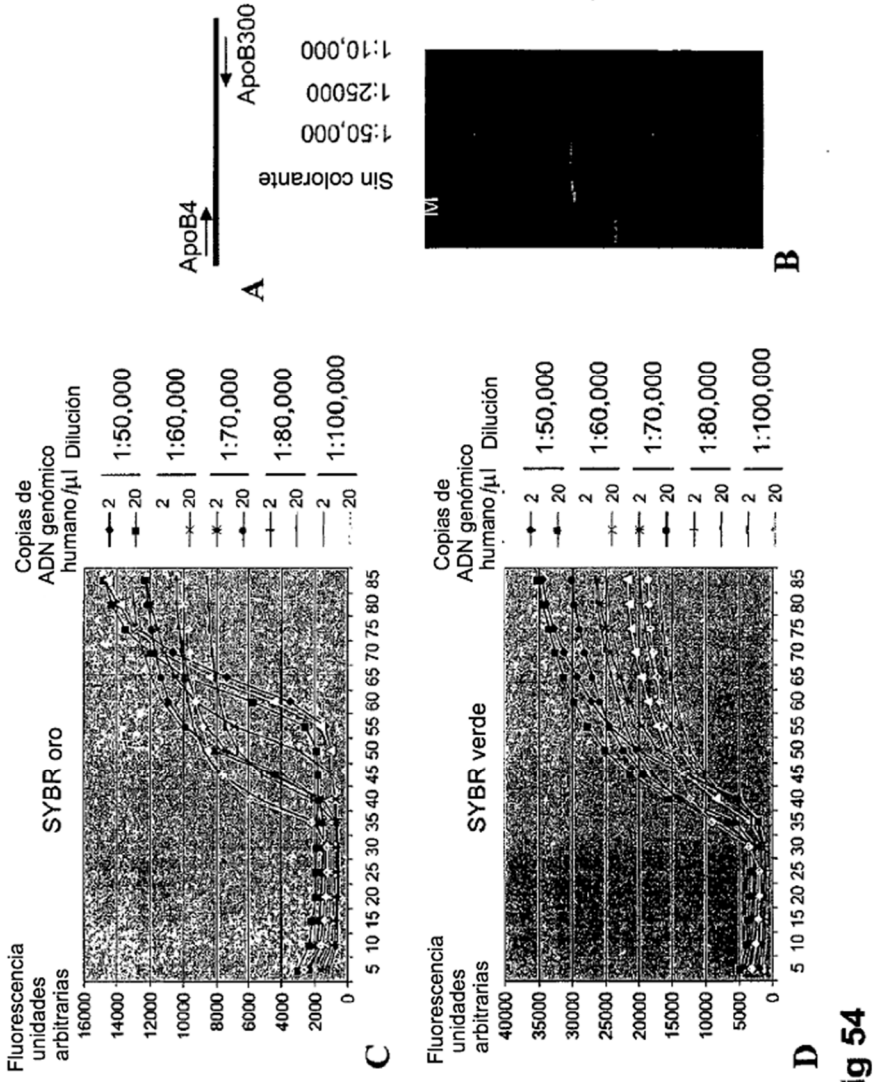

A
ApoB4
ApoB300
Sin colorante
1:50,000
1:25000
1:10,000
M
B
C
SYBR oro
Fluorescencia unidades arbitrarias
Copias de ADN genómico humano /µl
Dilución
1:50,000
1:60,000
1:70,000
1:80,000
1:100,000
D
SYBR verde

Fig 54

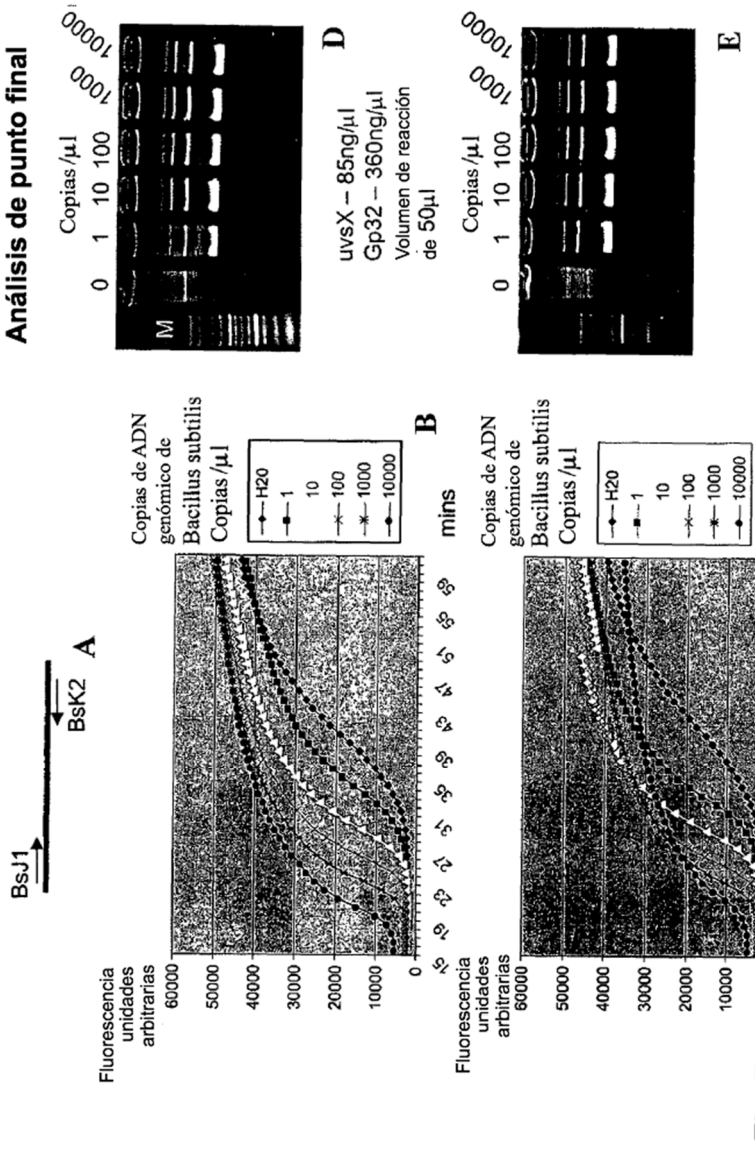

Análisis de punto final
Copias /µl
0 1 10 100 1000 10000
M
D
uvsX – 85ng/µl
Gp32 – 360ng/µl
Volumen de reacción de 50µl
E
BsJ1
BsK2
A
Copias de ADN genómico de Bacillus subtilis Copias /µl
H20
1
10
100
1000
10000
B
mins
Fluorescencia unidades arbitrarias
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
C

Fig 55

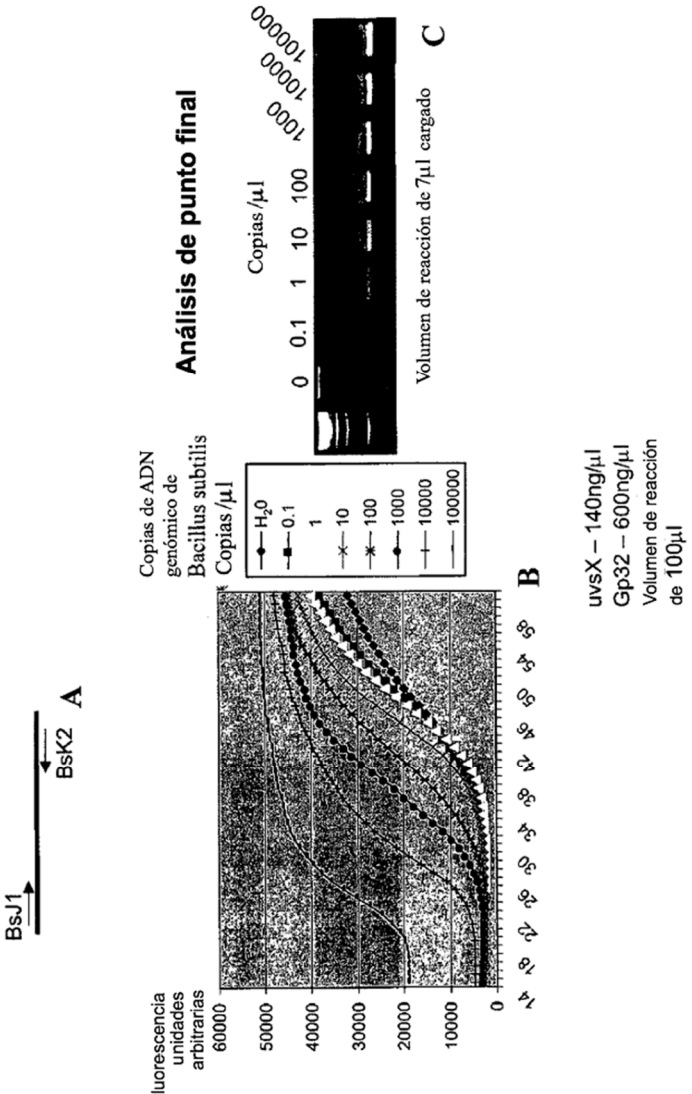

BsJ1
BsK2
A
Fluorescencia unidades arbitrarias
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Copias de ADN genómico de Bacillus subtilis Copias /µl
H2O
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
B
Análisis de punto final
Copias /µl
0
0.1
1
10
100
1000
10000
100000
Volumen de reacción de 7µl cargado
C
uvsX – 140ng/µl
Gp32 – 600ng/µl
Volumen de reacción de 100µl

Fig 56

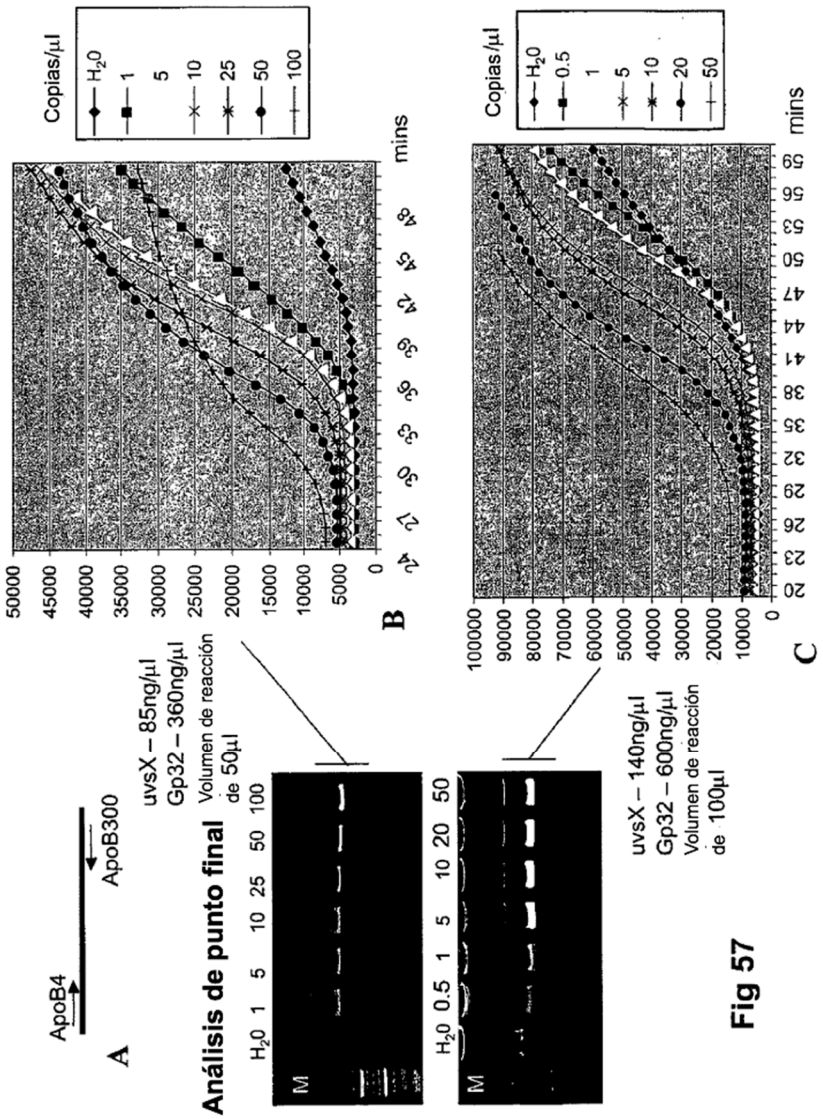

A
ApoB4
ApoB300
Análisis de punto final
uvsX – 85ng/µl
Gp32 – 360ng/µl
Volumen de reacción de 50µl
M
H2O 1 5 10 25 50 100
M
H2O 0.5 1 5 10 20 50
uvsX – 140ng/µl
Gp32 – 600ng/µl
Volumen de reacción de 100µl
B
Copias/µl
H2O
1
5
10
25
50
100
mins
C
Copias/µl
H2O
0.5
1
5
10
20
50
mins

Fig 57

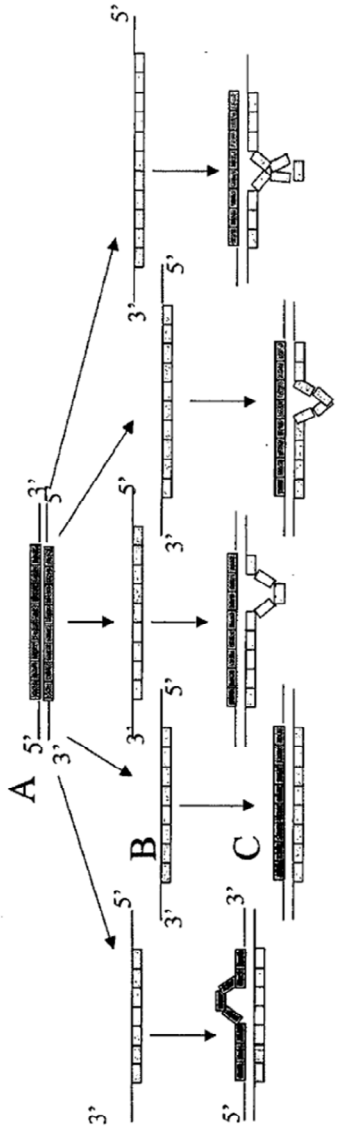


Fig 58

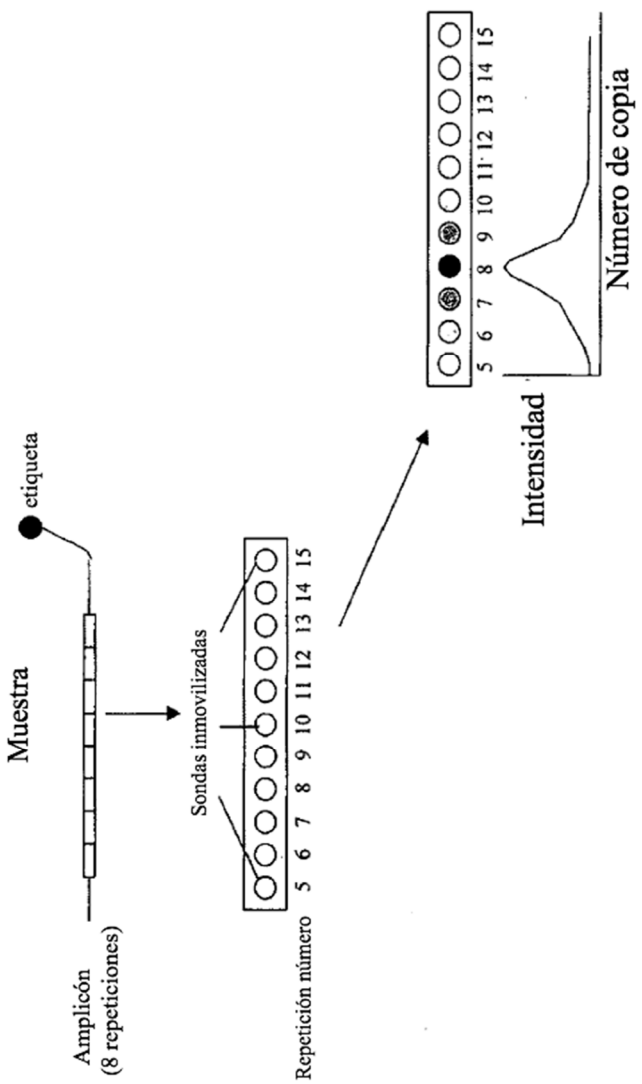
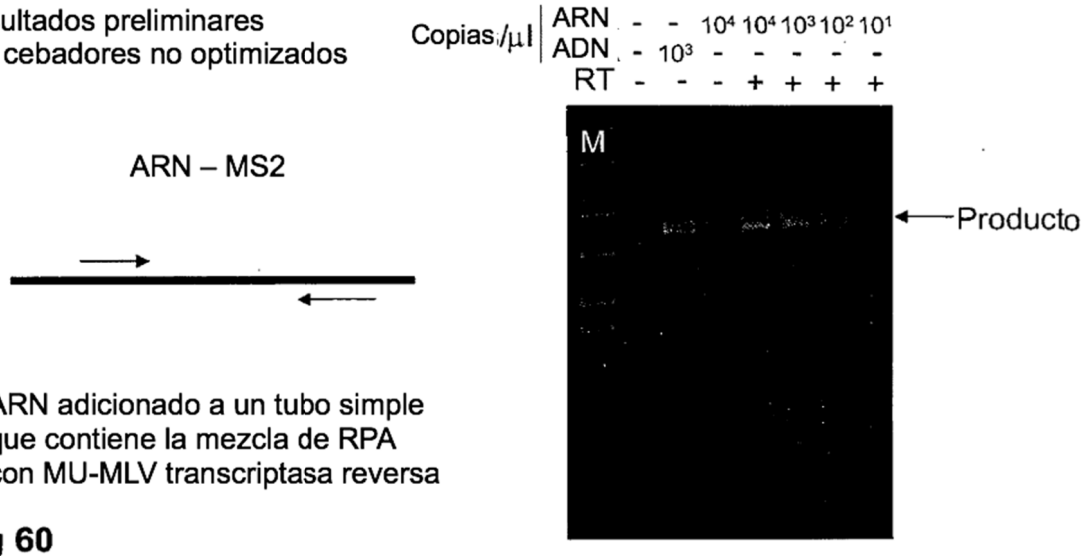

Muestra
etiqueta
Amplicón
(8 repeticiones)
Sondas inmovilizadas
Repetición número 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Intensidad
Número de copia

Fig 59

Tubo RT-RPA simple

Resultados preliminares
con cebadores no optimizados



ARN – MS2

ARN adicionado a un tubo simple
que contiene la mezcla de RPA
con MU-MLV transcriptasa reversa

Fig 60

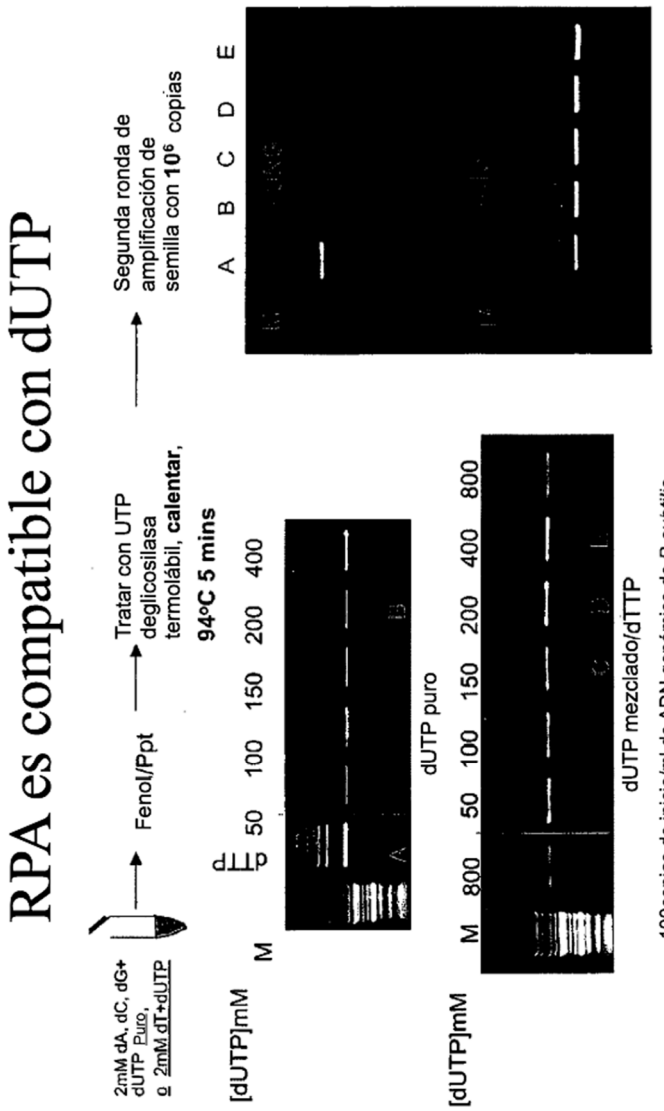

RPA es compatible con dUTP
2mM dA, dC, dG+
dUTP Puro,
o 2mM dT+dUTP
Fenol/Ppt
Tratar con UTP
deglicosilasa
termolábil, calentar,
94ºC 5 mins
Segunda ronda de
amplificación de
semilla con 10⁶ copias
A B C D E
[dUTP]mM
M
d
p
50 100 150 200 400
dUTP puro
[dUTP]mM
M 800 50 100 150 200 400 800
dUTP mezclado/dTTP
100copias de inicio/ml de ADN genómico de B.subtilis

Fig 61

Control de arrastre en RPA
Uso del inhibidor de UNG en la iniciación de la reacción
Muestra
UNG
RT o 37ºC
RPA+ inhibidor de UNG

Fig 62

Estar solo SÍ / NO Ensayo de varilla
Experimento RPA en ADN de hombre y mujer
Biotina
SRY humano
Fluoresceína
B
Amplificar y aplicar 1/500vo de reacción diluida en amortiguador en ejecución
C
Control de amplificación
Control de flujo
Diana +/-
Reactivos secos en bolsa de reacción
Calentador
Muestra
Extraer
<10 cm
A

Fig 63

RPA no es inhibida por sangre
M
H2O
Sangre
A
Proporción de sangre: amortiguador de lisis
M
H2O
1:1
1:2
1:3
1:4
1:5
500 copias
B
RPA es capaz de amplificación de sangre humana entera. Amplicón esperado es indicado por la flecha.
El rendimiento de la plantilla es potenciado por el tratamiento de sangre humana completa con un amortiguador de lisis simple. Para cada una de las muestras experimentales esperamos el número posible total de copias de genoma sea ~1750. Esto se compara con~500 de copias de genoma de ADN purificado utilizado como control.

Fig 64

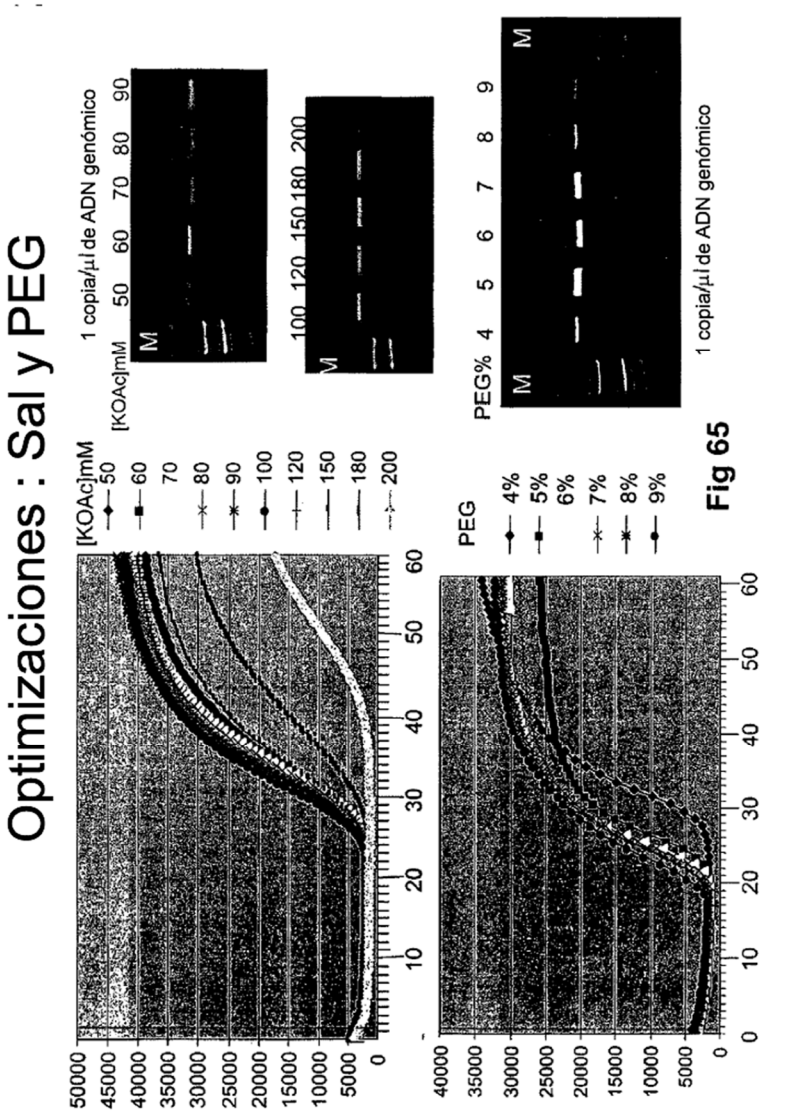

Optimizaciones : Sal y PEG
[KOAc]mM
50
60
70
80
90
100
120
150
180
200
PEG
4%
5%
6%
7%
8%
9%
1 copia/µl de ADN genómico
[KOAc]mM 50 60 70 80 90
100 120 150 180 200
PEG% 4 5 6 7 8 9
M

Fig 65

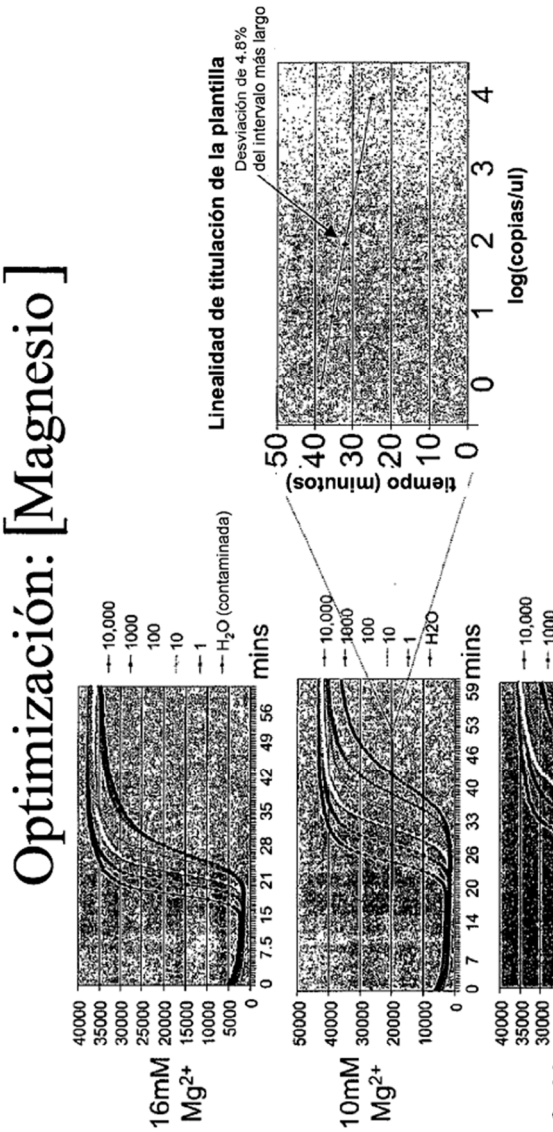
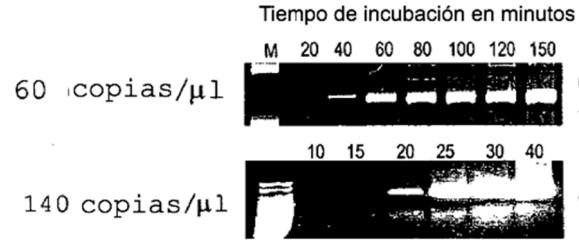

Optimización: [Magnesio]
Linealidad de titulación de la plantilla
Desviación de 4.8% del intervalo más largo
tiempo (minutos)
log(copias/ul)
16mM Mg2+
10mM Mg2+
6mM Mg2+
10,000
1000
100
10
1
H2O (contaminada)
H2O
mins

Fig 66

Dependencia del tiempo de reacción, variabilidad del cebador

Tiempo de detección varía (típicamente) de 20 a 40 minutos de niveles trazos



		G	A	T	C	T/C
ApoB600	GCTCACTGTTCTGCATCTGGTCAATGGTTCTG	25%	12.5%	37.5%	25%	62.5%
ApoB300Rev	CTATCCAAGATTGGGCTAAACGTATGAAAGCA	22%	37.5%	22%	18.5%	40.5%
CSF5'	AGACTCTTCCACACACCACTGGCCATCTTCAGC	12%	24%	21%	42.5%	63.5
CSF3'	GTTGCTAACCACCCTGTGTCTCAGTTTTCCTAC	15%	15%	36%	33%	70%

Observaciones:
1. El par rápido tiene escasez de G.
2. El par rápido tiene alto contenido de C.
3. Correlación de contenido A/T menos clara.

Hipótesis de composición
1. ¿Contenido alto de pirimidina?
2. ¿Alto C, bajo G?
3. ¿Características de distribución importante?

Fig 67

Diseño del extremo 5' para generar actividad de cebador uniforme y deseada

Fig 68 Análisis de punto final

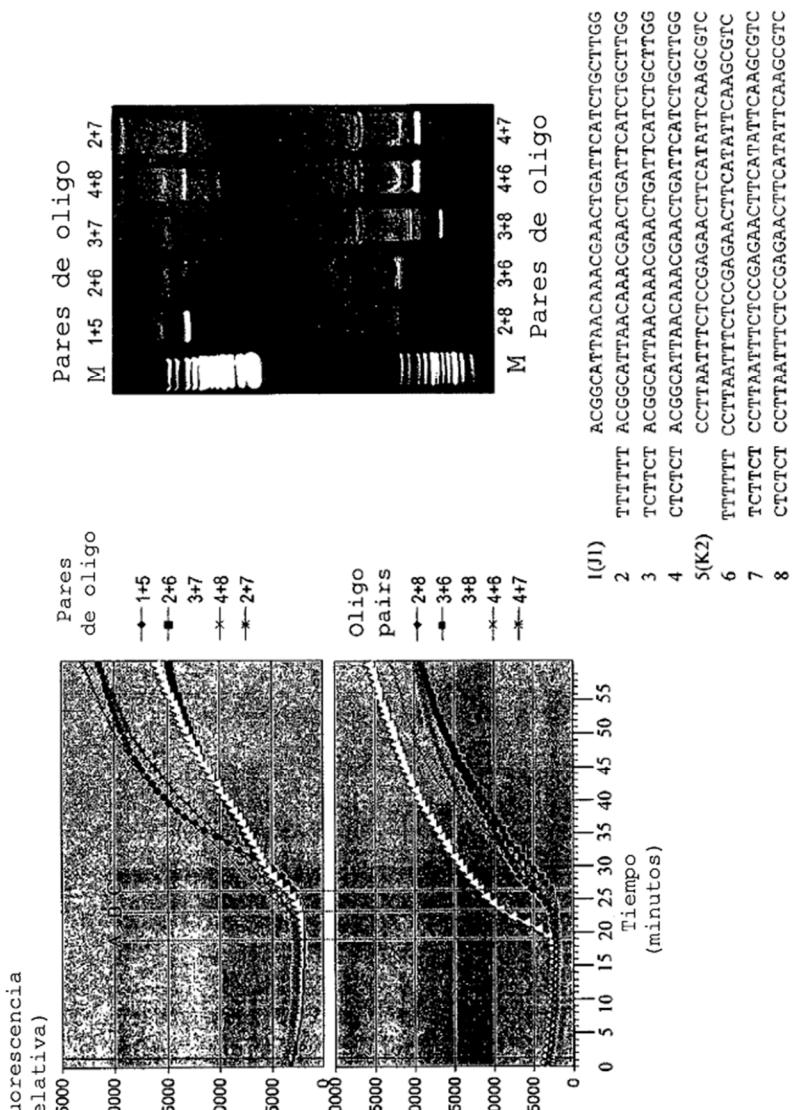

Pares de oligo
M 1+5 2+6 3+7 4+8 2+7
M 2+8 3+6 3+8 4+6 4+7
Pares de oligo
Fluorescencia (relativa)
Pares de oligo
1+5
2+6
3+7
4+8
2+7
Oligo pairs
2+8
3+6
3+8
4+6
4+7
Tiempo (minutos)
I(J1)
5(K2)
ACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
TTTTTT ACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
TCTTCT ACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
CTCTCT ACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
CCTTAATTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC
TTTTTT CCTTAATTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC
TCTTCT CCTTAATTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC
CTCTCT CCTTAATTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC

Fig 69

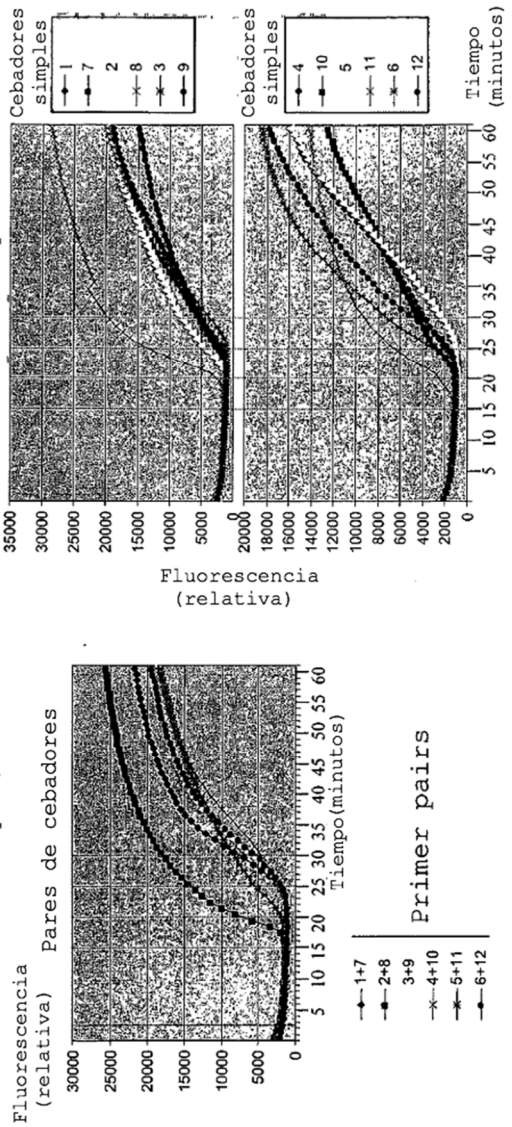
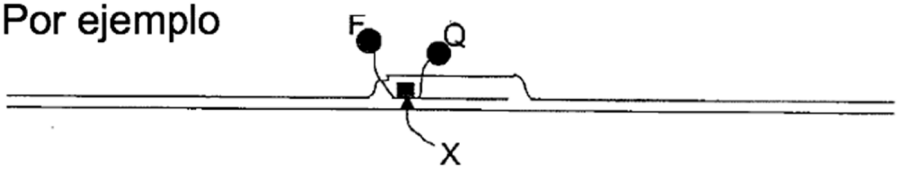

1 copia/µl de la diana
Fluorescencia (relativa)
Pares de cebadores
Tiempo(minutos)
Primer pairs
1+7
2+8
3+9
4+10
5+11
6+12
Cebadores simples
Fluorescencia (relativa)
Tiempo (minutos)
1+7 2+8 3+9 4+10 5+11 6+12 M
Análisis de punto final
1(J1)
7(K2)
ACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
CCCCCACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
CCCACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
CCCTTACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
GCCCTTACGGCATTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
CCCTTTTAACAAACGAACTGATTCATCTGCTTGG
CCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC
CCCCCCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC
CCCCCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC
CCCTTCCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC
GCCCTTCCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTCAAGCGTC
CCCTTCCTTAATTTCTCCGAGAACTTCATATTCA

Fig 70

Terceras sondas en tiempo real

- Usar un amplio repertorio de nucleasas que puedan discriminar los híbridos sonda/diana

Por ejemplo



Donde la sonda es ADN y X =
8-oxoguanina y es cortada por fpg
Glicol tiamina y es cortada por Nth
Mímica abásica(tetrahidrofuranilo) y es cortado por Nfo

O una sonda es ARN y H RNasa es empleada
O cebadores de amplificación son protegidos con 5'LNA y T7 exo es utilizado
O la sonda "contrafuego" es utilizada y la endonucleasa de restricción es utilizada

Fig 71

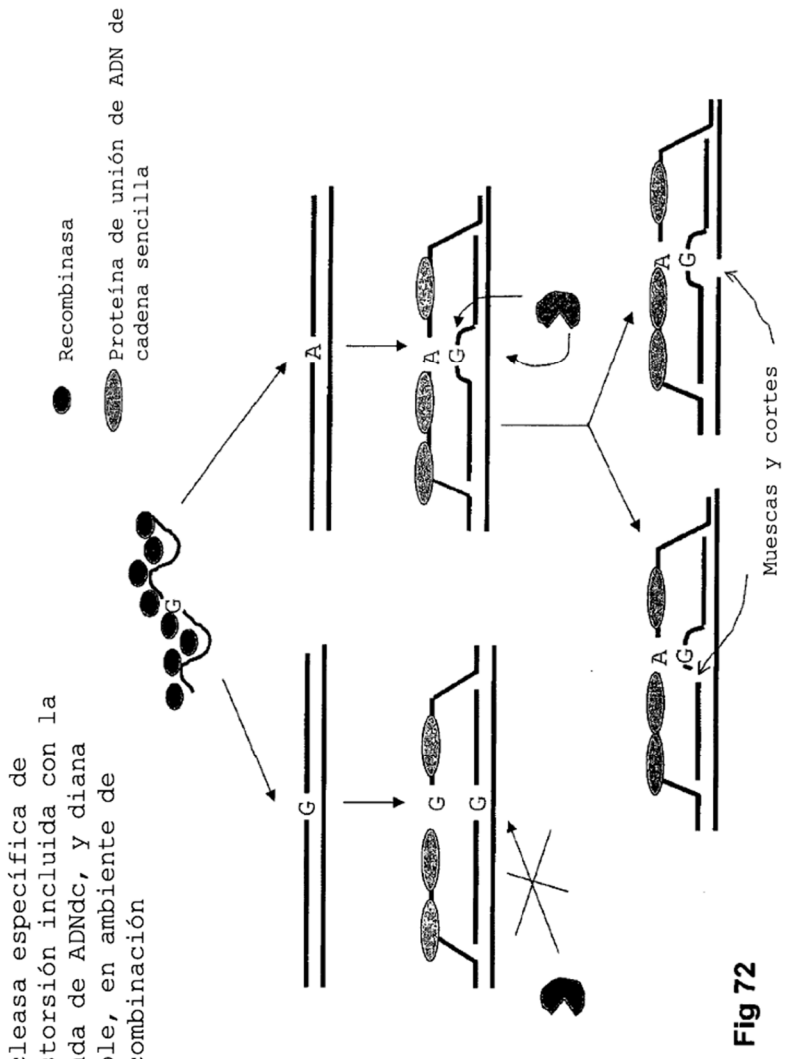

Nucleasa específica de distorsión incluida con la sonda de ADNdc, y diana doble, en ambiente de recombinación
Recombinasa
Proteína de unión de ADN de cadena sencilla
Muescas y cortes

Fig 72

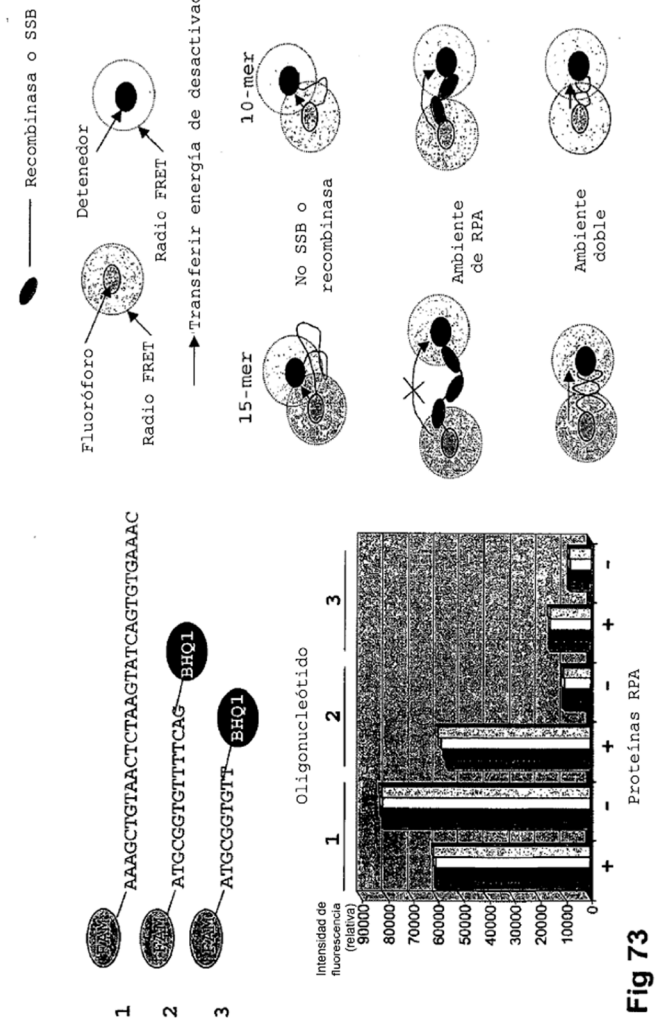

Recombinasa o SSB
Fluoróforo
Detenedor
Radio FRET
Radio FRET
Transferir energía de desactivación
15-mer
No SSB o recombinasa
10-mer
Ambiente de RPA
Ambiente doble
1
2
3
AAAGCTGTAACTCTAAGTATCAGTGTGAAAC
ATGCGGTGTTTTTCAG
BHQ1
ATGCGGTGTT
BHQ1
Oligonucleótido
Intensidad de fluorescencia (relativa)
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
Proteínas RPA

Fig 73

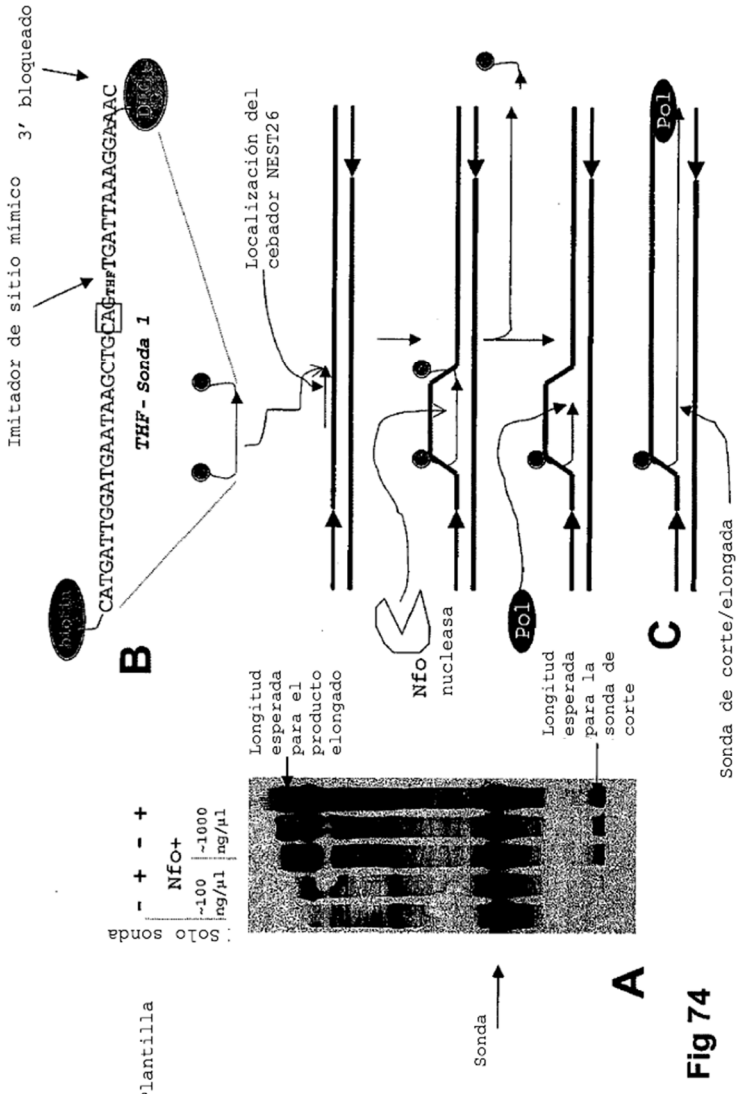

Imitador de sitio mímico
3' bloqueado
CATGATTGGATGAATAAGCTGCAGTHFTGATTAAAGGAAAC
THF- Sonda 1
Localización del cebador NEST26
B
Nfo nucleasa
Pol
Pol
C
Sonda de corte/elongada
Longitud esperada para el producto elongado
Longitud esperada para la sonda de corte
Sonda
A
Plantilla
Solo sonda
Nfo+
~100 ng/µl
~1000 ng/µl

Fig 74

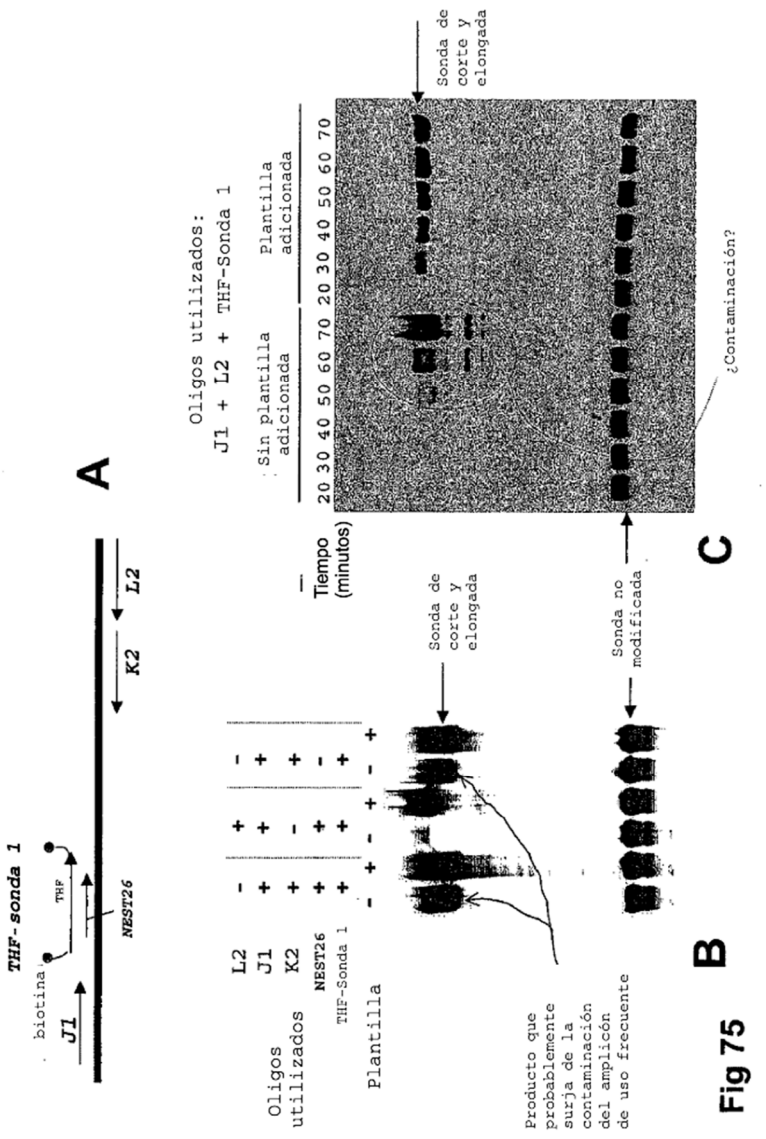

A
THF-sonda 1
biotina
J1
THF
NEST26
L2
K2
B
Oligos utilizados
Plantilla
L2
J1
K2
NEST26
THF-Sonda 1
Sonda de corte y elongada
Sonda no modificada
Producto que probablemente surja de la contaminación del amplión de uso frecuente
C
Oligos utilizados:
J1 + L2 + THF-Sonda 1
Sin plantilla adicionada
Plantilla adicionada
20 30 40 50 60 70 20 30 40 50 60 70
Tiempo (minutos)
Sonda de corte y elongada
¿Contaminación?

Fig 75

Ejemplo de sondas para RPA utilizando corte de enzima Nfo

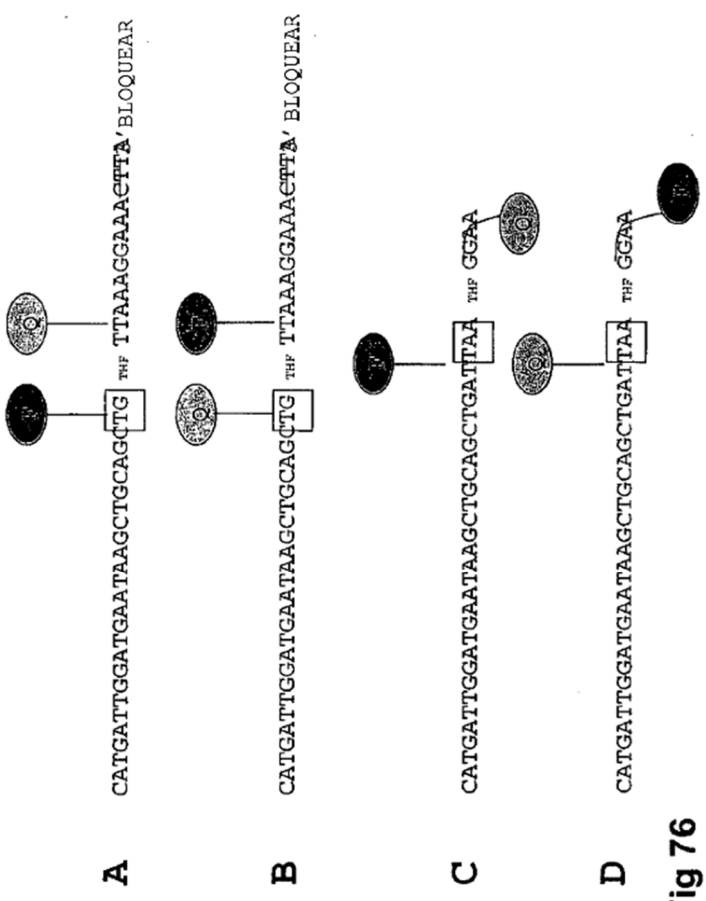


Fig 76