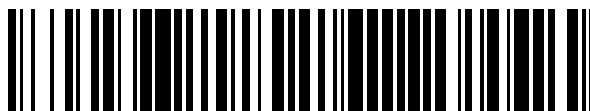


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 297**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2006** **E 11168429 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013** **EP 2365078**

54 Título: **Procedimientos que utilizan un oligonucleótido de doble especificidad y oligonucleótido de doble especificidad para los mismos**

30 Prioridad:

05.03.2005 KR 20050018419

26.04.2005 WO PCT/KR2005/001206

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

11.03.2014

73 Titular/es:

SEEGENE, INC. (100.0%)

**8, 9F Taewon Bldg. 65-5, Bangi-dong Songpa-gu
Seoul 138-050, KR**

72 Inventor/es:

CHUN, JONG-YOON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 447 297 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos que utilizan un oligonucleótido de doble especificidad y oligonucleótido de doble especificidad para los mismos

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere a diversos procedimientos que utilizan un oligonucleótido de doble especificidad y a un oligonucleótido de doble especificidad para los mismos. Más concretamente, la presente invención se refiere a diversos procedimientos mediante una reacción de extensión dependiente de molde que utiliza un oligonucleótido de doble especificidad y a un oligonucleótido de doble especificidad para la misma.

15 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

La amplificación de ácidos nucleicos es un proceso crucial para una amplia diversidad de métodos de la biología molecular, de modo que se han propuesto diversos métodos de amplificación. Por ejemplo, Miller H.I. et al. (patente WO nº 89/06700) amplificaron una secuencia de ácidos nucleicos basándose en la hibridación de un promotor/secuencia de cebador con un ADN de cadena sencilla diana ("ADNmc") seguido de la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Entre otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos se incluyen los sistemas de amplificación basados en la transcripción (Kwoh D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:1173, 1989; y Gingeras T.R. et al., patente WO nº 88/10315).

25 El procedimiento más predominante para la amplificación de ácidos nucleicos conocido como reacción en cadena de la polimerasa (en lo sucesivo de nominado "PCR") se basa en ciclos repetidos de desnaturalización del ADN de doble cadena, seguido de la hibridación de un cebador oligonucleótido al molde de ADN, y la extensión del cebador por parte de una ADN polimerasa (Mullis et al., patentes US nº 4.683.195, nº 4.683.202 y nº 4.800.159; Saiki et al., Science 230:1350-1354, 1985). Los cebadores oligonucleótidos utilizados en la PCR están diseñados para hibridarse a cadenas opuestas del ADN molde. Los cebadores son extendidos por la ADN polimerasa, a partir de la que el producto de un cebador puede servir como cadena molde para el otro cebador en reacciones posteriores. El procedimiento de amplificación por PCR resulta en el incremento exponencial de fragmentos discretos de ADN cuya longitud está definida por los extremos 5' de los cebadores oligonucleótidos.

35 El éxito de las amplificaciones de ácidos nucleicos, en particular la amplificación por PCR, se basa en la especificidad con la que un cebador se hibrida únicamente a su secuencia diana (y no a secuencias no diana); por lo tanto, resulta importante optimizar esta interacción molecular. Que un cebador pueda hibridarse únicamente a su complemento perfecto o también a secuencias que presentan uno o más desapareamientos depende críticamente de la temperatura de hibridación. En general, una temperatura de hibridación más alta conducirá a una hibridación más específica del cebador con su molde perfectamente correspondiente, lo que a su vez incrementará la probabilidad de amplificar únicamente la secuencia diana. Por otra parte, puede tolerarse un número mayor de no correspondencias entre el molde y el cebador a temperaturas de hibridación más bajas. En consideración a este fenómeno, el ajuste de la temperatura de hibridación puede alterar la especificidad de apareamiento entre molde y cebador. Por ejemplo, en el caso de que no haya producto, la temperatura puede ser excesivamente alta para la hibridación. En el caso de existir varios productos de diferente tamaño en donde únicamente se encuentre presente un cebador, lo anterior indica que el cebador único se está hibridando con más de una región del molde. En este caso, debería incrementarse la temperatura de hibridación.

40 Además de la temperatura de hibridación, para determinar la especificidad de hibridación del cebador deben considerarse varios "parámetros de búsqueda de cebador", tales como longitud de cebador, el contenido de GC y la longitud del producto de PCR. Un cebador que satisfaga todos estos parámetros resultará en una mejora significativa de la especificidad de hibridación del cebador durante la amplificación del ADN diana, resolviendo simultáneamente los problemas de fondos y productos no específicos derivados de los cebadores utilizados en los experimentos. Es habitual que unos cebadores bien diseñados ayuden a evitar la hibridación y niveles de fondo no específicos, así como a distinguir entre los ADNc o moldes genómicos en la PCR de ARN.

50 Se han desarrollado muchos enfoques para mejorar la especificidad de hibridación de los cebadores y por lo tanto para conseguir la amplificación del producto deseado. Son ejemplos la PCR "touchdown" (Don et al., Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification, Nucleic Acids Res. 19:4008, 1991), la PCR de inicio en caliente (Daquila et al., Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. Nucleic Acids Res. 19:3749), PCR anidada. (Mullis and Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155:335-350, 1987) y la PCR "booster" (Ruano et al., Biphasic amplification of very dilute DNA samples via booster PCR. Nucleic Acids Res. 17, 540). También se ha informado de que en otros

60

enfoques alternativos diversos compuestos “intensificadores” pueden mejorar la especificidad de la PCR. Entre los compuestos intensificadores se incluyen compuestos químicos que incrementan la temperatura de hibridación efectiva de la reacción, proteínas de unión al ADN y reactivos disponibles comercialmente. Sin embargo, no existe ningún aditivo “mágico” que garantice el éxito de todas las PCR y resulta muy laborioso someter a ensayo diferentes aditivos bajo diferentes condiciones, tales como la temperatura de hibridación. Aunque estos enfoques han contribuido en algunos casos a la mejora de la especificidad de hibridación de los cebadores, no han accedido fundamentalmente a una solución a los problemas planteados por los cebadores utilizados en la amplificación de PCR, tales como productos no específicos y niveles de fondo elevados.

Las técnicas basadas en la PCR han sido utilizadas ampliamente no sólo para la amplificación de una secuencia de ADN diana, sino también para aplicaciones o métodos científicos en los campos de la investigación biológica y médica, tales como la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), PCR de expresión diferencial (DD-PCR), clonación de genes conocidos o desconocidos mediante PCR, amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE), PCR de cebado arbitrario (AP-PCR), PCR multiplex, tipado genómico de SNP y análisis genómico basado en la PCR (McPherson y Moller, PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, NY, 2000).

Tal como se ha indicado anteriormente, todos estos métodos y técnicas que incluyen amplificación de ácidos nucleicos, notablemente la amplificación por PCR, no están completamente libres de las limitaciones y problemas, resultando de la no especificidad de los cebadores utilizados en cada método, tales como falsos positivos, pobre reproducibilidad, niveles de fondo elevados, aunque se han introducido continuamente enfoques mejorados en cada método. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevos cebadores y métodos para mejorar la especificidad de hibridación, que pueda dar lugar a resultados de amplificación reales.

La hibridación de ADN sigue siendo un procedimiento fundamental de la biología molecular, y se ve afectado por la fuerza iónica, la composición de bases, la longitud de fragmento al que haya sido reducido el ácido nucleico, el grado de desapareamiento y la presencia de agentes desnaturizantes. Las tecnologías basadas en la hibridación del ADN son una herramienta muy útil en la determinación de secuencias de ácidos nucleicos específicos y resultan claramente valiosas en el diagnóstico útil, en la investigación genética y en el análisis de laboratorio forense. Por ejemplo, Wallace y colaboradores han demostrado que diferencias de secuencia tan sutiles como un único cambio de base resultan suficientes para permitir la discriminación de oligómeros cortos (por ejemplo 14-meros) y han demostrado cómo podría aplicarse al análisis molecular de mutaciones puntuales en el gen de la β -globina (Wallace B.R. et al., The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit β -globin DNA. Nucleic Acids Res. 9:879-894, 1981; y Conner, B.J., et al. Detection of sickle cell β -globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:278-282, 1983).

A pesar de la capacidad que presenta la hibridación de oligonucleótidos de identificar correctamente una cadena complementaria, los investigadores todavía se enfrentan a limitaciones. Los híbridos que contienen oligonucleótidos son mucho menos estables que los híbridos de ácidos nucleicos largos. Esto se pone de manifiesto en una temperatura de fusión más baja. La inestabilidad de los híbridos es uno de los factores más importantes a considerar durante la preparación de la hibridación de oligonucleótidos. La diferencia de estabildades entre un complemento perfectamente correspondiente y un complemento desapareado en únicamente una base puede ser bastante reducida, correspondiendo incluso a una diferencia de tan sólo 0,5°C en sus T_m (temperatura de fusión del dúplex). Cuanto más corto es el oligómero de interés (permitiendo la identificación de una cadena complementaria dentro de una mezcla más compleja), más fuerte es el efecto del desapareamiento de una sola base sobre la estabilidad global del dúplex. Sin embargo, la desventaja de utilizar dichos oligonucleótidos cortos es que se hibridan débilmente, incluso con una secuencia perfectamente complementaria, y de esta manera deben utilizarse bajo condiciones de astringencia reducida, lo que resulta en una reducción considerable de la especificidad de la hibridación.

Se han realizado muchos esfuerzos para mejorar la especificidad de la hibridación de los oligonucleótidos. Se ha propuesto un método para la modificación química de bases de ADN para la hibridación de alta sensibilidad (Azhikina et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:11460-11462, 1993) y un método en el que se lleva a cabo el lavado después de la hibridación a temperaturas bajas durante un periodo prolongado con el fin de incrementar la capacidad de discriminar el desapareamiento (Drmanac et al., DNA and Cell Biology 9:527-534, 1990). Recientemente se ha presentado otro método para incrementar el poder de resolución de polimorfismos de un solo nucleótidos (SNPs) en la hibridación de ADN por medio de desapareamientos artificiales (Guo et al., Nature Biotechnology 15:331-5, 1997). Además, muchas patentes estadounidenses, entre ellas las patentes US nº 6.077.668, nº 6.329.144, nº 6.140.054, nº 6.350.580, nº 6.309.824, nº 6.342.355 y nº 6.268.128, dan a conocer la sonda de hibridación y las aplicaciones de la misma. Aunque han aparecido enfoques mejorados de cada método, ninguno de dichos métodos y técnicas que incluyen la hibridación de oligonucleótidos ha podido liberarse por completo de las limitaciones y problemas planteados por la no especificidad de la hibridación de oligonucleótidos.

Existe otra posibilidad: que algunos factores artificiales, tales como el fracaso del punteado e inmovilización de los oligonucleótidos sobre el sustrato y en el establecimiento de las condiciones de hibridación óptimas, afecten a los

datos negativos de hibridación; el efecto de los resultados erróneos es más vulnerable a los resultados generados en el método de cribado de alto rendimiento. Dichos factores artificiales inherentes al punteado e hibridación son desventajas prácticas mayores en las micromatrices de ADN basadas en oligonucleótidos.

Además, el desarrollo de las técnicas de determinación de la secuencia de ADN de mayores velocidad, sensibilidad y rendimiento son de importancia fundamental para el estudio de los sistemas biológicos. La técnica de secuenciación de ADN convencional, desarrollada originariamente hace más de dos décadas (Sanger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 74:5463-5467, 1977), presenta limitaciones tanto de rendimiento como de coste para aplicaciones futuras. Por lo tanto se han propuesto varias técnicas nuevas. Tres métodos muy prometedores son la secuenciación mediante hibridación (Brain y Smith, J. Theor. Biol. 135:303-307, 1988), Drmanac et al., Genomics 4:114-128, 1989) y Southern E.M., patente WO n° 10977, 1989), la secuenciación de firmas paralelas basada en la ligación y el corte (Brenner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 97:1665-1670, 2000) y la pirosecuenciación (Ronaghi et al., Anal. Biochem. 242:84-89, 1996, y Science 281:363-365, 1998). Para todas las técnicas anteriormente indicadas, el éxito de las reacciones de secuenciación depende absolutamente de la especificidad de hibridación del cebador de secuenciación respecto al ácido nucleico diana. En la consideración de la especificidad de hibridación del cebador de secuenciación, los métodos actuales se encuentran limitados por la longitud de los ácidos nucleicos diana suministrados para las reacciones de secuenciación. En general, las reacciones de secuenciación se llevan a cabo utilizando ácidos nucleicos molde preferentemente de longitud inferior a unos cuantos cientos de pares de bases, de manera que se consigue en cierto grado la hibridación específica del cebador de secuenciación.

Sin embargo, para estudios avanzados, las reacciones de secuenciación de ADN de velocidad, sensibilidad y rendimiento incrementados no deben verse perjudicadas por el tamaño de los ácidos nucleicos diana. A la luz de lo anterior, se permite la secuenciación directa de un ácido nucleico diana a partir de una población de ácidos nucleicos molde a condición de que los cebadores de secuenciación se hibriden con los ácidos nucleicos diana con alta especificidad.

Loakes et al. (Loakes, D. et al. Nucleic Acid Research 23(13):2361-2366, 1995) dan a conocer cebadores oligonucleótidos con dos tipos de bases universales. Bartl et al. (Bartl, S. et al. Biotechniques 16(2), 1994) dan a conocer un oligonucleótido con 4 inosinas contiguas. El documento US n° 2003/170711 da a conocer oligonucleótidos con >3 bases universales contiguas "B". El documento WO n° 03/050305 se refiere a un cebador de control de hibridación para mejorar la especificidad de hibridación en la amplificación de ácidos nucleicos y sus aplicaciones en todos los campos tecnológicos implicados en la amplificación de ácidos nucleicos. El presente cebador comprende: (a) una parte de extremo 3' con una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio en un ácido nucleico molde para hibridarse con la misma, (b) una parte de extremo 5' que presenta una secuencia de nucleótidos arbitraria preseleccionada, y (c) una parte reguladora situada entre dicha parte de extremo 3' y dicha parte de extremo 5' que comprende por lo menos una base universal o análogo de base no discriminatorio, en el que dicha parte reguladora es capaz de regular una parte hibridante de dicho cebador en asociación con la temperatura de hibridación.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

Con el fin de eliminar los problemas y desventajas de dichos oligonucleótidos convencionales, utilizados a modo de cebadores o de sondas, y de diversos métodos que incluyen la hibridación de ácidos nucleicos, el presente inventor ha desarrollado un oligonucleótido de doble especificidad según la reivindicación 1 que permite que una reacción dependiente del molde se produzca con una especificidad mucho más alta y ha encontrado excelentes aplicaciones en una amplia diversidad de procedimientos, incluyendo la hibridación o apareamiento de oligonucleótidos.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 11 utilizando un oligonucleótido de doble especificidad mediante una reacción de extensión dependiente de molde.

Se describe además un método para amplificar selectivamente una secuencia diana de ácidos nucleicos a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos.

Se describe además un método para amplificar dos o más secuencias diana de nucleótidos simultáneamente, utilizando dos o más parejas de cebadores en la misma reacción.

Se describe además un método para amplificar una molécula de ácidos nucleicos a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos.

Se describe además un método para detectar una molécula de ácidos nucleicos con diversidad genética mediante una reacción de extensión dependiente de molde.

Se describe además un método para detectar una secuencia diana de nucleótidos en una muestra de ácidos nucleicos mediante la utilización de una micromatriz con un oligonucleótido de doble especificidad inmovilizado.

5 Es todavía otro objetivo de la presente invención proporcionar un oligonucleótido de doble especificidad para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos mediante una reacción de extensión dependiente de molde.

Se da a conocer además un método que permite determinar una especificidad de apareamiento de un oligonucleótido a partir de una estructura del oligonucleótido.

10 Se describe además un método para mejorar la especificidad de hibridación de un oligonucleótido.

Otros objetivos y ventajas de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción detallada a continuación considerada conjuntamente con las reivindicaciones y dibujos adjuntos.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las figs. 1A y 1B representan esquemáticamente el principio del oligonucleótido de doble especificidad (DE) de la presente invención en una reacción de extensión dependiente de molde. La fig. 1A muestra una especificidad de hibridación elevada del oligonucleótido de DE bajo condiciones de alta astringencia. La fig. 1B muestra tolerancia al desapareamiento del oligonucleótido de DE.

20 La fig. 2 muestra representaciones esquemáticas para amplificar selectivamente un ácido nucleico diana de ADN de doble cadena utilizando cebadores oligonucleótidos de DE de la presente invención.

La fig. 3 muestra representaciones esquemáticas para amplificar selectivamente un ácido nucleico diana de ARNm utilizando cebadores oligonucleótidos de DE de la presente invención.

25 La fig. 4 muestra representaciones esquemáticas de reacciones de extensión dependiente de molde en la determinación selectiva de un ácido nucleico diana utilizando oligonucleótidos de doble especificidad sobre una micromatriz de oligonucleótidos.

La fig. 5 es una fotografía de un gel de agarosa que muestra los resultados de la amplificación por PCR de genes de la familia de las citoquinas, IL-1 β e IL-19, utilizando un conjunto de cebadores convencionales (IL-1b-5'-0 e IL-1b-3'-0, carril 1; IL-19-5'-0 e IL-19-3'-0, carril 3) y los oligonucleótidos de doble especificidad (IL-1b-5' e IL-1b-3', carril 2; IL-19-5' e IL-19-3', carril 4). M es un marcador de tamaño de 100 pb generado por el Forever 100-bp Ladder Personalizer (Seegene, Inc., Seoul, Corea).

30 La fig. 6A es una fotografía de un gel de agarosa que muestra los resultados del 3'-RACE (amplificación rápida de los extremos de ADNc) del gen DEG 10, que demuestra la especificidad de PCR del oligonucleótido de doble especificidad. El carril 1 representa un cebador con una secuencia de correspondencia perfecta, los carriles 2 a 4 representan cebadores con desapareamientos de 3, 2 y 1 base en su parte 3' de especificidad a baja T_m, respectivamente, y los carriles 5 a 7 representan cebadores con desapareamientos de 5, 3 y 2 bases en su parte 5' de especificidad a alta T_m, respectivamente. M es un marcador de tamaño de 100 pb generado por el Forever 100-bp Ladder Personalizer.

40 La fig. 6B es una fotografía de un gel de agarosa que muestra los resultados del 3'-RACE del gen DEG 10, que demuestra la tolerancia al desapareamiento del oligonucleótido de doble especificidad en la PCR. El carril 1 representa un cebador con una secuencia de correspondencia perfecta, los carriles 2 a 4 representan cebadores con desapareamientos de 3, 2 y 1 base en su parte 3' de especificidad a baja T_m, respectivamente, y los carriles 5 a 7 representan cebadores con desapareamientos de 5, 3 y 2 bases en su parte 5' de especificidad a alta T_m, respectivamente. M es un marcador de tamaño de 100 pb generado por el Forever 100-bp Ladder Personalizer.

45 La fig. 7A representa las secuencias de cebadores 5' para la 3'-RACE de los genes Psx1 y Psx2 de la familia homeobox específica de placenta de ratón. Psx1-5'-40 y Psx2-5'-40 son cebadores convencionales y Psx1-5'-41 y Psx2-5'-41 son cebadores diseñados según la presente invención.

50 La fig. 7B es una fotografía de un gel de agarosa que muestra los resultados de la 3'-RACE de Psx1 y Psx2. Carril 1, 3'-RACE de Psx1 utilizando el cebador oligonucleótido de doble especificidad Psx1-5'-41; carril 2, 3'-RACE de Psx2 utilizando el cebador oligonucleótido de doble especificidad Psx2-5'-41; carril 3, 3'-RACE de Psx1 utilizando el cebador convencional Psx1-5'-40, y carril 4, 3'-RACE de Psx2 utilizando el cebador convencional Psx2-5'-40. M es un marcador de tamaño de 100 pb generado por el Forever 100-bp Ladder Personalizer.

55 La fig. 8 muestra los resultados de la secuenciación de ciclado directo para los genes Psx1 y Psx2 del grupo de ADNc de placenta de ratón utilizando los cebadores oligonucleótidos de doble especificidad Psx1-5'-41 (para Psx1) y Psx2-5'-41 (para Psx2) como cebador de secuenciación.

60 La fig. 9 muestra los resultados de la PCR multiplex utilizando 9 conjuntos de cebadores de doble especificidad específicos de genes de la familia de las citoquinas. Carril 1, PCR multiplex de 9 genes de citoquina; carril 2, PCR monoplex de IL-3 (200 pb); carril 3, PCR monoplex de IL-15 (250 pb); carril 4, PCR monoplex de IL-18 (300 pb); carril 5, PCR monoplex de IL-25 (350 pb); carril 6, PCR monoplex de IL-2 (400 pb); carril 7, PCR monoplex de IL-6 (450 pb); carril 8, PCR monoplex de IL-19 (500 pb); carril 9, PCR monoplex de IL-1 β (550 pb), y carril 10, PCR monoplex de IL-10 (600 pb). M es un marcador de tamaño de 100 pb generado por el Forever 100-bp Ladder Personalizer.

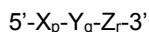
La fig. 10 muestra los resultados de amplificaciones por PCR del gen de glucoproteína de fusión (F) del metaneumovirus humano (MPVh) mediante la utilización de los cebadores oligonucleótidos de doble especificidad. Carril 1, PCR diana utilizando el conjunto de cebadores hMPV5'-585 y hMPV-3'-698; carril 2, PCR diana utilizando los conjuntos de cebadores hMPV5'-585 y hMPV-3'-1007; carril 3, PCR diana utilizando cebadores de β -actina humana; carril 4, PCR diana sin molde; y carril 5, PCR diana sin molde.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se refiere de manera general a: (a) una amplia diversidad de procedimientos que hacen uso de un oligonucleótido de doble especificidad, y (b) un oligonucleótido de doble especificidad para los mismos. El oligonucleótido de doble especificidad de la presente invención (en lo sucesivo denominado "oligo de DE") permite al cebador o sonda la hibridación con su secuencia diana con una especificidad mejorada, de manera que puede mejorarse significativamente la especificidad de la amplificación de los ácidos nucleicos (en particular de la PCR) y de la reacción de hibridación.

Oligonucleótido de doble especificidad (oligo de DE)

En un aspecto de la presente invención se proporciona un oligonucleótido de doble especificidad para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos mediante una reacción de extensión dependiente de molde, que se representa mediante la fórmula general siguiente:



en la que X_p representa una parte 5' de especificidad alta a T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante que es sustancialmente complementaria a un sitio de un ácido nucleico molde que hibrida con el mismo; Y_q representa una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales; Z_r representa una parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante que es sustancialmente complementaria a un sitio del ácido nucleico molde que hibrida con el mismo; p, q y r representan los números de nucleótidos, y p representa un número entero de por lo menos 15, q representa un número entero por lo menos 3 y r representa un número entero por lo menos 3, y X, Y y Z son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la parte 5' de especificidad a alta T_m es por lo menos 20°C superior a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m ; la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte 5' de especificidad a alta T_m es más larga que la parte 3' de especificidad a baja T_m ; la parte de separación forma una estructura de burbuja sin apareamiento de bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a alta T_m y la parte 3' de especificidad a baja T_m se hibridan con el ácido nucleico molde, permitiendo que la parte 5' de especificidad a alta T_m se separe de la parte 3' de especificidad a baja T_m en términos de especificidad de apareamiento del ácido nucleico molde diana inicial, de manera que la especificidad de hibridación del oligonucleótido para el ácido nucleico molde diana inicial se determina dualmente, a partir de la parte 5' de especificidad a alta T_m y de la parte 3' de especificidad a baja T_m de manera que resulta incrementada la especificidad global de apareamiento del oligonucleótido.

La expresión "doble especificidad" con referencia al oligonucleótido de DE (en lo sucesivo denominado "oligo de DE") de la presente invención utilizada en la presente memoria se utiliza para describir la característica principal de que su especificidad de apareamiento con una secuencia diana se determina dualmente a partir de sus dos partes separadas, es decir, la parte 5' de especificidad a alta T_m y la parte 3' de especificidad a baja T_m . En general, la especificidad de apareamiento de los cebadores o sondas está gobernada por la secuencia consecutiva global. En contraste, la especificidad de apareamiento del oligo de DE se determina dualmente a partir de sus dos partes (la parte 5' de especificidad a alta T_m y la parte 3' de especificidad a baja T_m) separadas por la parte de separación, en la que estas tres partes se encuentran situadas en una secuencia oligonucleótida. Dicha especificidad dual permite que el oligo de DE sirva como cebador y sonda, mostrando una especificidad mucho más alta y convirtiendo la presente invención en nueva y no evidente respecto a la técnica anterior.

Simultáneamente, el presente inventor ya ha desarrollado el CCH (cebador de control de hibridación) para mejorar la especificidad de apareamiento, tal como se da a conocer en el documento WO n° 03/050303. El oligo de DE de la presente invención es claramente diferente del CCH a la luz de lo siguiente: (i) el oligo de DE presenta dos partes de especificidad que deben hibridarse con una secuencia diana, mientras que el CCH presenta una sola parte de especificidad, (ii) tres partes en el oligo de DE se discriminan claramente a partir de la T_m , mientras que las partes del CCH, no pueden discriminarse, (iii) el cebador de DE se extiende para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria al molde al producirse el apareamiento de tanto la parte 5' de especificidad a alta T_m como de la parte 3' de especificidad a baja T_m , mientras que el CCH se extiende incluso en el caso de que el apareamiento se produzca con la parte de extremo 3', y (iv) de esta manera, la especificidad de apareamiento o hibridación del oligo de DE se determina dualmente a partir de las dos partes separadas, es decir, la parte 5' de especificidad a alta T_m y la parte 3' de especificidad a baja T_m , mientras que la del CCH está gobernada únicamente por la parte de extremo 3'. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, pudo apreciarse que la especificidad de

apareamiento o hibridación del oligo de DE con su secuencia diana era mucho más alta que la del CCH, con lo que el oligo de DE es nuevo y no evidente en comparación el CCH.

La característica inesperada del oligo de DE es que presenta tres partes diferentes con propiedades diferentes dentro de una molécula oligonucleótida: parte 5' de especificidad a alta T_m , parte 3' de especificidad a baja T_m y parte de separación.

El oligo de DE resulta útil en una amplia diversidad de procedimientos y análisis que implican una reacción de extensión dependiente de molde. La expresión "una reacción de extensión dependiente de molde" utilizada en la presente memoria se refiere a una reacción para extender una molécula oligonucleótida hibridada con una secuencia diana mediante la incorporación de nucleótidos sucesivos en su fracción terminal, en la que la secuencia extendida se determina a partir de una secuencia molde complementaria.

Una representación esquemática de los principios que gobiernan la especificidad de hibridación (apareamiento) del oligo de DE se ilustra en la fig. 1A. En referencia a la fig. 1A, se describe en mayor detalle el oligo de DE.

En el caso de que únicamente se aparee con un molde la parte 5' de especificidad a alta T_m del oligo de DE, no podrá utilizarse como sitio de cebado para una extensión dependiente de molde, resultando en que no se produce extensión.

Mientras que la parte 5' de especificidad a alta T_m del oligo de DE se aparee con una secuencia no diana, la parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia más corta es improbable que se aparee con la secuencia no diana. Los motivos para ello son que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se encuentran separados por la parte de separación en términos de sucesos de apareamiento. En otras palabras, la parte 3' de especificidad a baja T_m participa en sucesos de apareamiento de una manera relativamente independiente de la parte 5' de especificidad a T_m elevada, y el apareamiento de la parte 3' de especificidad a baja T_m resulta menos afectada por el apareamiento de la parte 5' de especificidad a T_m elevada. En este sentido, la probabilidad de apareamiento de la parte 3' de especificidad a baja T_m con una secuencia no diana resulta mucho más baja.

En el caso de que únicamente la parte 3' de especificidad a baja T_m presente una secuencia complementaria a un sitio no diana, el apareamiento no se produce bajo determinadas condiciones de elevada astringencia, por ejemplo condiciones restrictivas para el apareamiento de la parte 5' de especificidad a T_m elevada. Según una realización preferente, resulta ventajoso llevar a cabo reacciones de extensión dependientes de molde utilizando el oligo de DS bajo condiciones restrictivas con una temperatura de hibridación mucho más alta que la T_m de la parte 3' de especificidad a baja T_m .

En el caso de que tanto la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m presenten una secuencia sustancialmente complementaria a un molde, el oligo de DE puede aparearse con el molde y por lo tanto se produce con éxito la extensión.

Sin respaldo teórico se cree que la parte de separación provoca que la parte 3' de especificidad a baja T_m resulte más sensible a las condiciones de hibridación (por ejemplo la temperatura y la complementariedad de las secuencias). A este respecto, la incidencia de la hibridación no específica entre la parte 3' de especificidad a baja T_m y las secuencias no diana se reduce mucho bajo determinadas condiciones de hibridación (o restrictivas). En el caso de que la parte 3' de especificidad a baja T_m , así como la parte de especificidad a T_m elevada, se apareen con su secuencia diana, el extremo 3' de la parte 3' de especificidad a baja T_m es más probable que genere un sitio extensible por parte de las ADN polimerasas.

El término "oligonucleótido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligómero lineal de monómeros o enlaces naturales o modificados, incluyendo desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos y similares, capaces de hibridarse específicamente con una secuencia de nucleótidos diana, sea natural o de producción sintética. El oligonucleótido preferentemente es de cadena sencilla para una eficiencia máxima de la hibridación. Preferentemente, el oligonucleótido es un oligodesoxirribonucleótido. El oligonucleótido de la presente invención puede comprender dNMP naturales (es decir, dAMP, dGM, dCMP y dTMP), análogos de nucleótido o derivados de nucleótido. El oligonucleótido también puede incluir ribonucleótidos. Por ejemplo, el oligonucleótido de la presente invención puede incluir nucleótidos con modificaciones del esqueleto, tales como los péptido-ácido nucleico (APN) (M. Egholnn et al., Nature 365:566-568, 1993), ADN fosforotioato, ADN fosforoditioato, ADN fosforamidato, ADN unido por enlaces amida, ADN unido por MMI, 2'-O-metil-ARN, alfa-ADN y metilfosfonato-ADN, nucleótidos con modificaciones de sacáridos, tales como 2'-O-metil-ARN, 2'-fluoro-ARN, 2'-amino-ARN, 2'-O-alquil-ADN, 2'-O-alil-ADN, 2'-O-alquini-ADN, ADN con hexosas, piranosil-ARN y anhidrohexitol-ADN y nucleótidos que presentan modificaciones de las bases, tales como pirimidinas con sustitución en C-5 (con sustituyentes tales como flúor, bromo, cloro, yodo, metilo, etilo, vinilo, formilo, etinilo, propinilo, alquinilo, tiazolilo, imidazolilo o piridilo), 7-deazapurinas con sustituyentes en C-7 (entre ellos fluoro, bromo, cloro, yodo, metilo, etilo, vinilo, formilo, alquinilo, alquenilo, tiazolilo, imidazolilo, piridilo), inosina y diaminopurina.

El término "cebador" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido que es capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis bajo condiciones en las que resulta inducida la síntesis del producto de extensión del cebador que es complementario a una cadena (molde) de ácidos nucleicos, es decir, en presencia de nucleótidos y de un agente de polimerización, tal como ADN polimerasa, y una temperatura y pH adecuados. El cebador preferentemente es de cadena sencilla para una eficiencia máxima de la amplificación. Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador de la presente invención puede comprender dNMP naturales (es decir, dAMP, dGMP, dCMP y dTMP), nucleótidos modificados o nucleótidos no naturales. El cebador también puede incluir ribonucleótidos. El cebador debe ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente de polimerización. La longitud exacta de los cebadores depende de muchos factores, entre ellos la temperatura, la aplicación y el origen del cebador. El término "apareamiento" o "cebado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la aposición de un oligodesoxinucleótido o ácido nucleico a un ácido nucleico molde, en donde la aposición permite que la polimerasa polimerice nucleótidos formando una molécula de ácidos nucleicos que es complementaria al ácido nucleico molde o a una parte del mismo. El término "hibridante" utilizado en la presente memoria se refiere a la formación de un ácido nucleico de doble cadena a partir de ácidos nucleicos de cadena sencilla complementarios. No se pretende realizar ninguna distinción entre los términos "de apareamiento" e "hibridante", y estos términos se utilizarán intercambiablemente.

El término "sonda" utilizado en la presente memoria se refiere a una molécula de ácidos nucleicos de cadena sencilla que comprende una parte o partes que son sustancialmente complementarias a una secuencia de nucleótidos diana.

El término "parte" utilizado en la presente memoria conjuntamente con el oligo de DE de la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos separada por la parte de separación. La expresión "parte 5' de especificidad a T_m elevada" o "parte 3' de especificidad a baja T_m" se refiere a una secuencia de nucleótidos en el extremo 5' ó 3' del oligo de DS de la presente invención, respectivamente, que se encuentra separada por la parte de separación. La expresión "parte 5' de especificidad a T_m elevada" conjuntamente con el oligo de DS pretende referirse a una parte con la T_m más alta de entre las tres partes y que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante que es sustancialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde. La expresión "parte 3' de especificidad a baja T_m" en referencia al oligo de DS se refiere a una parte con una T_m más baja que la parte 5' de especificidad a T_m elevada pero con una T_m más alta que la parte de separación y que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde.

El término "T_m" utilizado en la presente memoria se refiere a la temperatura de fusión a la que la mitad de las moléculas de un ácido nucleico dúplex son de cadena sencilla. Los términos "T_m elevada" y "Baja T_m" conjuntamente con las partes en el oligo de DE pretenden referirse a un valor relativo de la T_m y no a un valor absoluto de la T_m. Es decir, sólo resulta necesario que la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada sea elevada respecto a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m.

La parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m están diseñadas para presentar una secuencia de nucleótidos hibridante que es sustancialmente complementaria a un sitio en un ácido nucleico molde para hibridarse con el mismo. La expresión "sustancialmente complementario" en referencia al oligo de DS se utiliza en la presente memoria para referirse a que la molécula oligonucleótida es suficientemente complementaria para hibridarse selectivamente con una secuencia molde de ácidos nucleicos bajo las condiciones de hibridación o restrictivas que se indican, de manera que el oligonucleótido apareado puede ser extendido por una polimerasa, formando una copia complementaria del molde. Por lo tanto, dicha expresión presenta un significado diferente de "perfectamente complementario" o expresiones relacionadas con la misma. Se apreciará que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m del oligo de DS puede presentar uno o más desapareamientos con un molde en la medida en que el oligo de DS pueda servir como cebador o sonda. Más preferentemente, la parte 5' de especificidad a T_m elevada y/o la parte 3' de especificidad a baja T_m del oligo de DE presentan una secuencia de nucleótidos perfectamente complementaria a un sitio del molde, es decir, sin desapareamientos.

Para un buen rendimiento del oligo de DE, resulta esencial que la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada sea superior a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m. Resulta preferente que la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada se encuentre comprendida entre 40°C y 80°C, más preferentemente entre 40°C y 75°C, todavía más preferentemente entre 50°C y 68°C, y todavía más preferentemente entre 50°C y 65°C. Resulta preferente que la T_m de la parte 3' de especificidad a baja T_m se encuentre comprendida entre 10°C y 40°C, más preferentemente entre 15°C y 40°C, y todavía más preferentemente entre 20°C y 35°C. Preferentemente, la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior en por lo menos 5°C, más preferentemente en por lo menos 10°C, todavía más preferentemente en por lo menos 15°C, y todavía más preferentemente en por lo menos 20°C a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m. Ventajosamente, la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior en 5°C a 70°C, preferentemente en 10°C a 70°C, más preferentemente en 10°C a 60°C, todavía más preferentemente en

10°C a 50°C, todavía más preferentemente en 10°C a 40°C, y todavía más preferentemente en 20°C a 40°C a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m.

- 5 Según una realización preferente, la parte 5' de especificidad a T_m elevada es más larga que la parte 3' de especificidad a baja T_m. La longitud de la parte 5' de especificidad a T_m elevada preferentemente presenta 15 a 40 nucleótidos, más preferentemente 15 a 30 residuos nucleótidos y más preferentemente 20 a 25 residuos nucleótidos. La longitud de la parte 3' de especificidad a baja T_m preferentemente presenta 3 a 15 nucleótidos, más preferentemente 5 a 15 residuos nucleótidos y más preferentemente 6 a 12 residuos nucleótidos.
- 10 La parte de separación que comprende por lo menos tres bases universales es parcialmente responsable de las ventajas y características del oligo de DE. La expresión "base universal" utilizada en la presente memoria se refiere a una base capaz de formar pares de bases con cada una de las 5 bases de ADN/ARN naturales con poca discriminación entre ellas.
- 15 Es ampliamente conocido que los nucleótidos en algunas posiciones ambiguas de cebadores degenerados han sido sustituidos por una base universal tal como desoxiinosina (Ohtsuka B. et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985, y Sakanari J.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89:4863-4867, 1985), 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol (Nichols R. et al., Nature 369:492-493, 1994) y 5-nitroindol (Loakes D. et al., Nucleic Acids Res. 22:4039-4043, 1994) para resolver los problemas de diseño asociados a los cebadores degenerados, debido a que dichas bases universales son capaces de apareamiento de bases no específico con las cuatro bases convencionales. Sin embargo, no se ha informado de que dichas bases universales permitan la formación de una parte de una molécula oligonucleótida que genere una estructura de burbuja durante el apareamiento (hibridación) o la amplificación, separando de esta manera dos secuencias contiguas opuestas y resultando en el incremento de la especificidad de apareamiento de un cebador o sonda con una secuencia diana debido a la doble especificidad de dos partes separadas de especificidad (hibridantes).
- 20 Según una realización preferente, la base universal en la parte de separación se selecciona de entre el grupo que consiste de desoxiinosina, inosina, 7-deaza-2'-desoxiinosina, 2-aza-2'-desoxiinosina, 2'-OMe-inosina, 2'-F-inosina, desoxi-3-nitropirrol, 3-nitropirrol, 2'-OMe-3-nitropirrol, 2'-F-3-nitropirrol, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol, desoxi-5-nitroindol, 5-nitroindol, 2'-OMe-5-nitroindol, 2'-F-5-nitroindol, desoxi-4-nitrobencimidazol, 4-nitrobencimidazol, desoxi-4-aminobencimidazol, 4-aminobencimidazol, desoxinebularina, 2'-F-nebularina, 2'-F-4-nitrobencimidazol, PNA-5-nitroindol, PNA-nebularina, APN-inosina, APN-4-nitrobencimidazol, APN-3-nitropirrol, morfolino-5-nitroindol, morfolino-nebularina, morfolino-inosina, morfolino-4-nitrobencimidazol, morfolino-3-nitropirrol, fosforamidato-5-nitroindol, fosforamidato-nebularina, fosforamidato-inosina, fosforamidato-4-nitrobencimidazol, fosforamidato-3-nitropirrol, 2'-O-metoxietilinosina, 2'-O-metoxietilnebularina, 2'-O-metoxietil-5-nitroindol, 2'-O-metoxietil-4-nitrobencimidazol, 2'-O-metoxietil-3-nitropirrol y combinaciones de los mismos. Más preferentemente, la base universal o análogo de base no discriminatoria es la desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol ó 5-nitroindol, más preferentemente desoxiinosina.
- 30 Dichas bases universales pueden encontrarse contenidas en la parte de separación de modo contiguo o de modo interrumpido por otros nucleótidos tales como los dNMP. Resulta preferible que la parte de separación comprenda nucleótidos contiguos que presenten bases universales, preferentemente desoxiinosina.
- 40 Resulta crítico que la parte de separación del oligo de DE presente la T_m más baja de las tres partes a fin de que la parte de separación forme una estructura de burbuja en la que no se apareen las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se apareen con el ácido nucleico molde, permitiendo que la parte 5' de especificidad a T_m elevada se diferencie de la parte 3' de especificidad a baja T_m en términos de especificidad de apareamiento con el ácido nucleico molde, de manera que la especificidad de apareamiento del oligonucleótido se determina dualmente a partir de la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m, de manera que la especificidad de apareamiento global del oligonucleótido resulta considerablemente incrementada. Preferentemente, la T_m de la parte de separación es de entre 3°C y 15°C, más preferentemente de entre 4°C y 15°C, y todavía más preferentemente de entre 5°C y 10°C.
- 45 Según una realización preferente, la parte de separación entre la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m contiene por lo menos 3 bases universales, más preferentemente por lo menos 4 bases universales, y todavía más preferentemente por lo menos 5 bases universales. Según una realización preferente, la parte de separación contiene 2 a 10 bases universales, más preferentemente 3 a 10 bases universales, todavía más preferentemente 4 a 8 bases universales, y todavía más preferentemente 5 a 7 bases universales.
- 50 En el caso de que resulte necesario un cebador o sonda que presente una secuencia más larga, se ponen más de manifiesto las ventajas del oligo de DE. Por ejemplo, según una técnica convencional, un cebador que presente una secuencia de nucleótidos de más de 35 pb como secuencia hibridante es muy probable que genere amplicones no específicos. En contraste, el oligo de DE puede generar amplicones específicos incluso con secuencias largas,

debido a que porta dos secuencias hibridantes (es decir, la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m) diferenciadas en términos de la interacción molecular con moldes (es decir, del apareamiento). Por ejemplo, el oligo de DS puede contener 35 a 45 pb de una secuencia hibridante complementaria a una secuencia diana. A este respecto, puede apreciarse que la presente invención permite diseñar cebadores con secuencias mucho más largas que se consideran no practicables en las estrategia convencionales de diseño de cebadores.

Según una realización preferente, la parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos, siendo la parte de separación de entre 3 y 15 nucleótidos, y la parte 3' de especificidad a baja T_m de entre 3 y 15 nucleótidos.

Más preferentemente, la parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos; la parte de separación presenta una longitud de entre 3 y 10 nucleótidos y la parte 3' de especificidad a baja T_m presenta una longitud de entre 5 y 15 nucleótidos. Más preferentemente, la parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una longitud de entre 15 y 25 nucleótidos; la parte de separación presenta una longitud de entre 5 y 7 nucleótidos y la parte 3' de especificidad a baja T_m presenta una longitud de entre 6 y 10 nucleótidos. Según el oligo de DS ejemplar e ilustrativo descrito en los Ejemplos, la parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una longitud aproximada de 20 nucleótidos; la parte de separación presenta una longitud aproximada de 5 nucleótidos y la parte 3' de especificidad a baja T_m presenta una longitud aproximada de entre 8 y 10 nucleótidos.

En la realización más preferente, el oligo de DE se encuentra representado por la fórmula general siguiente: 5'-X_p-(dl)_q-Z-3' (la definición y características de X_p y Z_r son las indicadas anteriormente, dl representa desoxinosina, (dl)_q representa una parte de separación que comprende nucleótidos contiguos que presentan bases universales, y q es un número entero entre 5 y 7).

Resulta interesante que el presente oligo de DE también presenta tolerancia al desapareamiento bajo condiciones restrictivas, suficiente para tolerar el desapareamiento con su secuencia diana.

Una representación esquemática de los principios que gobiernan la tolerancia al desapareamiento del oligo de DE se ilustra en la fig. 1B. Pueden tolerarse uno o más, preferentemente uno a tres desapareamientos de bases en la parte 5' de especificidad a T_m elevada bajo la condición de que tanto la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se apareen con el molde. Pueden tolerarse una o más, preferentemente uno a dos desapareamientos de bases en la parte 3' de especificidad a baja T_m bajo la condición de que tanto la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se apareen con el molde. Pueden tolerarse uno o más, preferentemente uno a cinco desapareamientos de bases tanto en la parte 5' de especificidad a T_m elevada como en la parte 3' de especificidad a baja T_m bajo la condición de que tanto la parte 5' de especificidad a T_m elevada como la parte 3' de especificidad a baja T_m se apareen con el molde.

Para imponer tolerancia al desapareamiento al oligo de DE, resulta importante las condiciones del apareamiento, notablemente la temperatura de hibridación. El apareamiento se lleva a cabo bajo condiciones en las que no se produce el apareamiento de únicamente la parte 3' de especificidad a baja T_m , aunque el apareamiento de todas las partes se produce en el caso de que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y/o la parte 3' de especificidad a baja T_m presenten una o más, aunque un número limitado, de bases desapareadas con su sitio diana. Resultan necesarios oligos de DS que presentan tolerancia al desapareamiento para amplificar o detectar una secuencia de nucleótidos con diversidad genética. Los oligos de DS con tolerancia al desapareamiento pueden aparearse con secuencias diana que muestran diversidad genética, resultando en el buen funcionamiento de la amplificación y detección de las secuencias de nucleótidos de interés. En otras palabras, el oligo de DS desarrollado originalmente para incrementar drásticamente la especificidad de apareamiento e hibridación también pueden utilizarse en procedimientos que requieran tolerancia al desapareamiento en los que las condiciones de hibridación o restrictivas se ajustan convenientemente.

También se da a conocer en la presente memoria un método que permite determinar dualmente una especificidad de apareamiento de un oligonucleótido a partir de una estructura del oligonucleótido, comprendiendo las etapas siguientes: (a) seleccionar una secuencia diana de ácidos nucleicos, (b) diseñar una secuencia de un oligonucleótido que presente: (i) una secuencia hibridante sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana, e (ii) una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales, de manera que la parte de separación interviene en la secuencia hibridante formando tres partes en el oligonucleótido, y (c) determinar la posición de la parte de separación en el oligonucleótido que permita que una parte en la dirección 5' de la parte de separación presente una T_m más alta que una parte en la dirección 3' de la parte de separación y que permita que la parte de separación presente la T_m más baja de las tres partes, proporcionando de esta manera un oligonucleótido que presenta tres partes diferenciadas con diferentes valores de T_m en el que: (i) una parte 5' de especificidad a T_m elevada del oligonucleótido presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana, (ii) una parte 3' de especificidad a baja T_m del oligonucleótido presenta una secuencia de nucleótidos

hibridante sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana, e (iii) la parte de separación del oligonucleótido entre la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m comprende por lo menos dos bases universales, y la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m y la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes, en donde la especificidad de apareamiento del oligonucleótido con el ácido nucleico diana se determina dualmente a partir de tanto la parte 5' de especificidad a T_m elevada como la parte 3' de especificidad a baja T_m .

El propósito del presente método es proporcionar un nuevo enfoque para incrementar drásticamente la especificidad de apareamiento de un oligonucleótido que debe hibridarse con su secuencia diana. El presente método también se expresa como método para mejorar una especificidad de apareamiento de un oligonucleótido. Además, la presente invención se expresa como un método que utiliza una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales para mejorar la especificidad de apareamiento de un oligonucleótido hibridado con una secuencia diana.

El presente método se lleva a cabo con el fin de preparar el oligo de DE comentado anteriormente en la presente memoria. Por lo tanto, en aras de evitar una redundancia excesiva, las descripciones comunes no se repiten sino que se incorporan en la presente descripción del método como si se hubiesen repetido.

La mayoría de los métodos convencionales para diseñar cebadores o sondas utilizan meramente una secuencia de la máxima hibridabilidad disponible con sus secuencias dianas. Además, con el fin de incrementar la especificidad de apareamiento de los oligonucleótidos, convencionalmente se ha intentado ajustar las condiciones de amplificación o hibridación, tales como la temperatura y la concentración iónica.

En contraste, el presente método proporciona una nueva estrategia para incrementar la especificidad de apareamiento mediante la introducción de nuevas características en las secuencias oligonucleótidas per se. La expresión "mediante una estructura del oligonucleótido", utilizada en la presente memoria en referencia a permitir que la especificidad de apareamiento de los oligonucleótidos se determine dualmente, se refiere a que la estructura de los oligonucleótidos contribuye de manera importante al incremento de la especificidad de apareamiento de los oligonucleótidos al imponer a los oligonucleótidos una nueva característica que se determina dualmente en términos de especificidad de apareamiento.

Resulta crítico en el presente método diseñar una secuencia oligonucleótida que presente: (i) una secuencia hibridante sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana, e (ii) una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales. En esta etapa, se presentan las líneas básicas de la estructura del oligonucleótido con el fin de mostrar una parte de extremo 5'/parte de separación/parte de extremo 3' del oligonucleótido. Las partes tanto de extremo 5' como de extremo 3' portan una secuencia hibridante sustancialmente complementaria a un ácido nucleico diana y presentan entre ellas la parte de separación.

La etapa más crítica en la presente invención es determinar la posición de la parte de separación en el oligonucleótido con el fin de permitir que una parte situada en el lado 5' de la parte de separación presente una T_m superior a la de una parte situada en el lado 3' de la parte de separación, y con el fin de permitir que la parte de separación presente la T_m más baja de las tres partes, proporcionando de esta manera un oligonucleótido que presenta tres partes diferenciadas con diferentes valores de T_m .

Las nuevas características estructurales introducidas en los oligonucleótidos por el presente método son: (i) tres partes diferenciadas (parte 5' de especificidad a T_m elevada, parte de separación y parte 3' de especificidad a baja T_m) en secuencias oligonucleótidas, (ii) diferentes valores de T_m de las tres partes, (iii) parte de separación entre la parte 5' de especificidad a T_m elevada y parte 3' de especificidad a baja T_m que comprende por lo menos dos bases universales, (iv) dos partes que participan en la interacción molecular con dianas durante la etapa de apareamiento, las cuales se encuentran separadas en términos de sucesos de apareamiento por la parte de separación, (v) valores de T_m que siguen el orden siguiente: parte 5' de especificidad a T_m elevada, parte 3' de especificidad a baja T_m y parte de separación. Dichas características estructurales garantizan la especificidad de apareamiento de los oligonucleótidos proporcionada finalmente por la presente invención que se determina dualmente a partir de tanto la parte 5' de especificidad a T_m elevada como de la parte 3' de especificidad a baja T_m , permitiendo el drástico incremento de la especificidad de apareamiento de los oligonucleótidos con su secuencia diana.

Los oligonucleótidos diseñados y preparados según el presente método muestran una especificidad de apareamiento mucho más alta que los que no presentan dichas tres partes.

Las características y ventajas del oligo de DE se describen a continuación:

(a) la parte de separación del oligo de DE comprende por lo menos dos bases universales que generan la región de T_m más baja en el oligo de DE, de manera que forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja

T_m se hibridan con el ácido nucleico molde. Dicha estructura de burbuja en la que no se aparean las bases permite que la parte 5' de especificidad a T_m elevada se separe de la parte 3' de especificidad a baja T_m en términos de especificidad de apareamiento con el ácido nucleico molde.

(b) La T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior en por lo menos 20°C a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m , y la parte de separación muestra la T_m más baja, lo que permite establecer condiciones restrictivas bajo las que no se produce el apareamiento de únicamente la parte 3' de especificidad a baja T_m .

(c) De esta manera, la especificidad de apareamiento global del oligo de DE se determina dualmente a partir de tanto la parte 5' de especificidad a alta T_m como la parte 3' de especificidad a baja T_m , y

(d) En consecuencia, la especificidad de apareamiento global del oligo de DS resulta drásticamente mejorada.

Puede apreciarse que el oligo de DE dado a conocer en la presente memoria resulta muy útil en una diversidad de (i) métodos de amplificación de ácidos nucleicos basados en cebadores, tales como los métodos de Miller H.L. (documento WO n° 89/06700) y Davey C. et al. (patente EP n° 329.822), reacción en cadena de la ligasa (LCR, Wu D.Y et al., Genomics 4:360, 1989), reacción en cadena de la polimerasa-ligasa (Barany, PCR Methods and Applic. 1:5-16, 1991), la gap-LCR (documento WO n° 90/01069), la reacción de reparación de cadena (patente EP n° 439.182), la reacción 3SR (Kwoh et al., PNAS, USA 86:1173, 1989) y la reacción NASBA (patente US n° 5.130.238), (ii) tecnologías basadas en la extensión de cebadores, tales como la secuenciación cíclica (Kretz et al., Cycle sequencing. PCR Methods Appl. 3:S107-S112, 1994) y la pirosecuenciación (Ronaghi et al., Anal. Biochem. 242:84-89, 1996) y Science 281:363-365, 1998), e (iii) tecnologías basadas en la hibridación, tales como la detección de una secuencia de nucleótidos diana utilizando una micromatriz de oligonucleótidos.

El oligo de DE de la presente invención puede aplicarse a una diversidad de tecnologías basadas en la amplificación, secuenciación e hibridación de ácidos nucleicos. Son ejemplos representativos para demostrar el efecto del oligo de DS los siguientes:

I. Aplicación a la síntesis de una molécula de ácidos nucleicos

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos utilizando un oligonucleótido de doble especificidad mediante una reacción de extensión dependiente de molde, que comprende las etapas siguientes:

(a) apareamiento del oligonucleótido de doble especificidad con una molécula molde de ácidos nucleicos, en el que el oligonucleótido de doble especificidad presenta tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde para permitir la hibridación con el mismo, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde para permitir la hibridación con el mismo, en donde la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es por lo menos 20°C superior a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m , la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se aparean con el ácido nucleico molde, en la que el apareamiento se lleva a cabo bajo condiciones en las que no se produce el apareamiento de únicamente la parte 3' de especificidad a baja T_m , y

(b) extensión del oligonucleótido de doble especificidad para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria al ácido nucleico diana.

Debido a que el método de síntesis de la presente invención utiliza el oligo de DE de la presente invención, se omiten las descripciones comunes con el fin de evitar complejidad de la presente memoria que conlleva una excesiva redundancia.

Dicha aplicación en la que se utiliza el oligo de DE de la presente invención puede proporcionar un método mejorado para sintetizar selectivamente una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a una secuencia diana mediante una reacción de extensión dependiente de molde que incluye etapas de apareamiento y extensión. En particular, la síntesis de una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a una secuencia diana puede conseguirse repitiendo el procedimiento de la reacción de extensión dependiente de molde en la que tras las etapas de apareamiento y extensión se realiza una etapa de desnaturalización.

El método de la presente invención puede utilizarse para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria a cualquier molécula molde de ácidos nucleicos. Dicha molécula puede ser de ADN o ARN. La molécula puede encontrarse en forma de doble cadena o de cadena sencilla. En el caso de que el ácido nucleico como material de partida sea de doble cadena, resulta preferente convertir las dos cadenas a una forma monocatenaria o parcialmente monocatenaria. Entre los métodos conocidos para separar cadenas se incluyen, aunque sin limitación, el calentamiento, los tratamientos con álcali, formamida, urea o glicoxal, los métodos enzimáticos (por ejemplo la acción de una helicasa) y las proteínas de unión. Por ejemplo, la separación de cadenas

puede conseguirse mediante calentamiento a una temperatura comprendida entre 80°C y 105°C. Los métodos generales para llevar a cabo este tratamiento se proporcionan en Joseph Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001.

En el caso de que se utilice un ARNm como material de partida, resulta necesaria una etapa de transcripción inversa previamente a la realización de una etapa de apareamiento, los detalles de la cual pueden encontrarse en Joseph Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, y Noonan K.F. et al., *Nucleic Acids Res.* 16:10366 (1988)). Para la transcripción inversa, se utiliza un cebador oligonucleótido dT hibridable con una cola poliA de ARNm. El cebador oligonucleótido dT comprende dTMPs, uno o más de los cuales puede sustituirse por otros dNMPs con la condición de que el cebador dT pueda funcionar como cebador. La transcripción inversa puede llevarse a cabo con una transcriptasa inversa que presente actividad de ARNasa H. En el caso de que se utilice un enzima que presente actividad de ARNasa H, puede resultar posible omitir una etapa separada de digestión con ARNasa H seleccionando cuidadosamente las condiciones de reacción.

Los presentes métodos no requieren que las moléculas molde de ácidos nucleicos presenten ninguna secuencia o longitud de secuencia en particular. En particular, entre las moléculas se incluye cualquier ácido nucleico de origen natural procariótico, eucariótico (por ejemplo protozario o parasitario, fúngico, de levadura, de planta superior, de animal inferior o superior, incluyendo mamíferos y seres humanos), vírico (por ejemplo de virus herpes, VIH, virus influenza, virus de Epstein-Barr, virus de la hepatitis, virus polio, etc.) o viroide. La molécula de ácidos nucleicos también puede ser cualquier molécula de ácidos nucleicos que ha sido, o puede ser, sintetizada químicamente. De esta manera, la secuencia de ácidos nucleicos puede encontrarse o no en la naturaleza.

El oligo de DE utilizado en la presente invención se hibrida o se aparea con un sitio del molde, de manera que se forma una estructura de doble cadena. Las condiciones de hibridación de los ácidos nucleicos adecuadas para formar dichas estructuras de doble cadena se describen en Joseph Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, y Haymes B.D. et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington D.C., 1985. Las secuencias de la parte 5' de especificidad a T_m elevada y de la parte 3' de especificidad a baja T_m del oligo de DS no necesitan mostrar una complementariedad exacta, sino que únicamente deben ser de secuencia sustancialmente complementaria para poder formar una estructura de doble cadena estable. De esta manera, son permisibles las desviaciones respecto a la complementariedad total, con la condición de que dichas desviaciones no sean suficientes para impedir por completo la hibridación para formar una estructura de doble cadena. El apareamiento del oligo de DS con un sitio del ácido nucleico molde es un requisito previo para su polimerización dependiente de molde con polimerasas. Los factores (ver Joseph Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, y Haymes B.D. et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington D.C., 1985) que afectan al apareamiento de bases del oligo de DE con sus ácidos nucleicos complementarios afectan posteriormente a la eficiencia de cebado. La composición de nucleótidos del oligo de DS puede afectar a la temperatura a la que el apareamiento es óptimo y por lo tanto puede afectar a su eficiencia de cebado.

La parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m del oligo de DE durante la etapa de apareamiento desempeñan un papel como parte hibridante o como sitio determinante de especificidad (es decir, sitio determinante de doble especificidad), mientras que la parte de separación no sirve como sitio de hibridación y no interactúa con el molde para el apareamiento de bases.

Puede utilizarse una diversidad de ADN polimerasas en la etapa de extensión de los presentes métodos, que incluyen fragmento "Klenow" de la ADN polimerasa I de *E. coli*, una ADN polimerasa termoestable, y la ADN polimerasa del bacteriófago T7. Preferentemente, la polimerasa es una ADN polimerasa termoestable que puede obtenerse de una diversidad de especies bacterianas, incluyendo *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* y *Pyrococcus furiosus* (Pfu). Durante la realización de una reacción de polimerización, resulta preferible que los componentes necesarios para dicha reacción se proporcionen en exceso dentro del reactor. El término "exceso" en referencia a los componentes de la reacción de extensión se refiere a una cantidad de cada componente que permite que la capacidad para conseguir la extensión deseada no se encuentre sustancialmente limitada por la concentración de dicho componente. Resulta deseable proporcionar a la mezcla de reacción una cantidad de cofactores necesarios, tales como Mg²⁺, dATP, dCTP, dGTP y dTTP en cantidad suficiente para proporcionar soporte al grado de extensión deseado.

El apareamiento o hibridación en el presente método se lleva a cabo bajo condiciones restrictivas que permiten la unión específica entre el oligo de DE y el ácido nucleico molde. Dichas condiciones restrictivas para el apareamiento son dependientes de la secuencia y se modifican dependiendo de los parámetros ambientales. En el presente método, la etapa de apareamiento generalmente se lleva a cabo bajo condiciones restrictivas. Sin embargo, en el caso de que se aplique el presente método a procedimientos que requieren tolerancia al desapareamiento, resulta

preferible que la etapa de apareamiento se lleve a cabo bajo condiciones restrictivas en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se apareen al molde a pesar de la presencia de uno o más, aunque un número limitado, de desapareamientos de bases. Dicha tolerancia al desapareamiento resulta muy útil en la amplificación o detección de un gen con diversidad genética. Las condiciones restrictivas pueden determinarse fácilmente a partir del estándar conocido de la técnica.

Resulta ventajoso llevar a cabo la etapa de apareamiento a una temperatura de hibridación superior a la T_m de la parte 3' de especificidad a baja T_m , garantizando que no se produce únicamente el apareamiento con la parte 3' de especificidad a baja T_m . Preferentemente, la temperatura de hibridación es superior en por lo menos 5°C, más preferentemente en por lo menos 10°C, todavía más preferentemente en por lo menos 15°C, y todavía más preferentemente en por lo menos 20°C a la T_m de la parte 3' de especificidad a baja T_m .

En una realización preferente, la temperatura de hibridación se encuentra comprendida entre 40°C y 75°C, más preferentemente entre 45°C y 72°C, todavía más preferentemente entre 50°C y 68°C, y todavía más preferentemente entre 55°C y 65°C. Las temperaturas de apareamiento adecuadas en el presente método pueden determinarse considerando independientemente los valores de T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m . En otras palabras, las temperaturas de apareamiento en el presente método no deben determinarse a partir de la longitud total y composiciones de nucleótidos de tanto la parte 5' de especificidad a T_m elevada como la parte 3' de especificidad a baja T_m , sino a partir de la longitud y composición de nucleótidos individuales de la parte 5' de especificidad a T_m elevada y/o de la parte 3' de especificidad a baja T_m . Habitualmente, la temperatura de hibridación determinada a partir de la consideración de únicamente la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada puede ser muy superior a la T_m de la parte 3' de especificidad a baja T_m y convertirse en una óptima.

En el caso de que se requiera una tolerancia al desapareamiento en la etapa de apareamiento, resulta preferente que la temperatura de hibridación se ajuste para que sea inferior a las indicadas anteriormente.

El presente método puede combinarse con muchos otros procedimientos conocidos de la técnica para conseguir un objetivo específico. Por ejemplo, el aislamiento (o purificación) del producto sintetizado puede realizarse después de la reacción de extensión. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante electroforesis en gel, cromatografía de columna, cromatografía de afinidad o hibridación. Además, el producto sintetizado de la presente invención puede insertarse en un vehículo adecuado para la clonación. Adicionalmente, el producto sintetizado de la presente invención puede expresarse en un huésped adecuado que aloje un vector de expresión.

II. Aplicación a la amplificación de una secuencia diana de ácidos nucleicos

Se describe adicionalmente en la presente memoria un método para amplificar selectivamente una secuencia diana de ácidos nucleicos a partir de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos, que comprende amplificar la secuencia diana de ácidos nucleicos mediante la realización de por lo menos dos ciclos de apareamiento de cebadores, extensión de cebadores y desnaturalización, utilizando una pareja de oligonucleótidos de doble especificidad como cebadores, en el que el oligonucleótido de doble especificidad presenta tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m , la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se aparean con la secuencia diana de ácidos nucleicos, en el que el apareamiento en la reacción de amplificación se lleva a cabo bajo condiciones en la que no se produce únicamente el apareamiento con la parte 3' de especificidad a baja T_m .

Debido a que el método de amplificación utiliza el oligo de DE de la presente invención, se omiten las descripciones comunes con el fin de evitar complejidad de la presente memoria que conlleva una excesiva redundancia. Además, debido a que dicho método implica procedimientos de hibridación y extensión, se han omitido las descripciones referentes a los dos procedimientos a fin de evitar complejidad en la presente invención que conlleve una excesiva redundancia. Por ejemplo, la composición y estructura del oligo de DS utilizado y las condiciones de hibridación y extensión son comunes en este procedimiento y en el método de síntesis de la molécula de ácidos nucleicos anteriormente comentada.

Dicha aplicación que utiliza el oligo de DE de la presente invención puede proporcionar un método mejorado para amplificar selectivamente una secuencia diana de ácidos nucleicos a partir de un ácido nucleico o de una mezcla de

ácidos nucleicos (ADN o ARNm) mediante la realización de amplificaciones de ácidos nucleicos, preferentemente mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

En la fig. 2 se ilustra una representación esquemática de la amplificación selectiva de un ácido nucleico diana de ADN de doble cadena mediante la utilización del oligo de DE indicado anteriormente. 2. Tal como se muestra en la fig. 2, se hibrida una pareja de oligos de DS con un molde de ADNdc desnaturalizado. La parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m durante el apareamiento desempeñan una función como parte hibridante o sitio determinante de especificidad (es decir, sitio determinante de doble especificidad), mientras que la parte de separación no sirve como sitio de hibridación y no interactúa con el molde para el apareamiento de bases. En este momento, la parte de separación forma una estructura de burbuja en el oligo de DE con el fin de que dos partes terminales, es decir, la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m puedan separarse espacialmente para determinar dualmente la especificidad global del oligo de DE. Los detalles de las reacciones posteriores son similares a los de las amplificaciones de ácidos nucleicos convencionales basadas en cebadores conocidas de la técnica e indicadas anteriormente en la presente memoria.

El presente método para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo utilizando diversas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos basadas en cebadores conocidas de la técnica. Preferentemente, los métodos se llevan a cabo según el procedimiento de PCR dado a conocer en las patentes US nº 4.683.195, nº 4.683.202 y nº 4.800.159, más preferentemente mediante el método de PCR de inicio en caliente.

La fig. 3 ilustra una representación esquemática de la amplificación selectiva de un ácido nucleico diana de ARNm mediante la utilización del oligo de DE. En la primera etapa, el ARNm obtenido a partir de diversas muestras biológicas se transcribe inversamente utilizando el cebador oligo-dT hibridable con la cola poli-A del ARNm y transcriptasa inversa. Pueden obtenerse mayor información sobre la transcripción inversa en Joseph Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; y Noonan K.F. et al., Nucleic Acids Res. 16:10366 (1988)). La descripción de las reacciones posteriores es similar a la de las amplificaciones de ácidos nucleicos convencionales basadas en cebadores conocidas de la técnica que se han comentado anteriormente.

III. Aplicación a la amplificación multiplex de ADN

Se describe adicionalmente en la presente memoria un método para amplificar dos o más secuencias diana de nucleótidos simultáneamente utilizando dos o más parejas de cebadores en la misma reacción, que comprende amplificar las secuencias diana de nucleótidos mediante la realización de por lo menos dos ciclos de apareamiento de cebador, extensión de cebador y desnaturalización, utilizando dos o más parejas de oligonucleótidos de doble especificidad como cebadores, caracterizado porque los oligonucleótidos de doble especificidad presentan tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a baja T_m presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m , la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se hibridan con la secuencia diana de nucleótidos, en el que el apareamiento en la reacción de amplificación se lleva a cabo bajo condiciones en las que no se produce únicamente la hibridación con la parte 3' de especificidad a baja T_m .

Dicha aplicación que utiliza el oligo de DE de la presente invención también puede proporcionar un método mejorado para amplificar más de una secuencia diana utilizando más de una pareja de cebadores en la misma reacción. En general, resulta extremadamente difícil preparar condiciones de PCR multiplex para amplificar más de 10 secuencias diana en paralelo, debido a que resulta necesaria una reacción de PCR óptima para amplificar incluso un solo locus específicos sin que aparezca ningún producto secundario inespecífico. Debido a que es necesario que la hibridación tenga lugar a una temperatura suficientemente elevada para permitir que se produzcan en la reacción correspondencias ADN-ADN perfectas, el oligo de DS de la invención resulta ideal para optimizar la amplificación multiplex de ADN debido a su acción de mejora de la especificidad de la amplificación. La expresión "PCR multiplex" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la amplificación simultánea de múltiples dianas de ADN en una única mezcla de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En una realización específica de la presente invención, dicho procedimiento de multiplexado comprende la realización de una reacción de amplificación que comprende por lo menos dos ciclos de apareamiento de cebador, extensión de cebador y desnaturalización, utilizando las parejas de cebadores del oligo de DE, caracterizado porque los cebadores son oligonucleótidos de doble especificidad que presentan tres partes, en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un

sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior en por lo menos 20°C a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m , la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se aparean con la secuencia diana de nucleótidos, en el que el apareamiento en la reacción de amplificación se lleva a cabo bajo condiciones en la que no se produce únicamente la hibridación con la parte 3' de especificidad a baja T_m .

Debido a que dicha aplicación que utiliza el oligo de DE de la presente invención se lleva a cabo según el presente método de amplificación de una secuencia de ácidos nucleicos comentada anteriormente, excepto por la utilización de más de una secuencia diana de nucleótidos y parejas de cebadores, las descripciones comunes han sido omitidas a fin de evitar complejidad en la presente memoria que conlleve una redundancia excesiva. Por ejemplo, la composición y estructura del oligo de DS utilizado y las condiciones de hibridación son comunes en este procedimiento y en los presentes métodos de amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos anteriormente comentada.

Según una realización preferente, la temperatura de apareamiento es de entre aproximadamente 40°C y 70°C, más preferentemente de entre 45°C y 68°C, todavía más preferentemente de entre 50°C y 65°C, y todavía más preferentemente de entre 55°C y 65°C.

En una realización preferente, los productos amplificados de cada una de las secuencias diana de nucleótidos presentan un tamaño diferente para el análisis posterior. Según una realización preferente, los productos de amplificación de múltiples secuencias diana de nucleótidos pueden analizarse mediante la separación por tamaño. La comparación por separación por tamaño se lleva a cabo utilizando una diversidad de métodos conocidos de la técnica, tales como la electroforesis a través de una matriz de gel de poliacrilamida o una matriz de gel de agarosa y la secuenciación de los nucleótidos. La secuenciación de los nucleótidos puede llevarse a cabo rápidamente utilizando un secuenciador automático disponible de diversos fabricantes.

Tal como se ejemplifica en el Ejemplo, posteriormente, el multiplexado de la presente invención permite que los productos amplificados finales se encuentren libres de los problemas de ruido de fondo, así como de la inespecificidad que resulta de los procedimientos multiplex convencionales conocidos de la técnica.

La ventaja de la amplificación multiplex es que pueden someterse a ensayo en la misma reacción numerosas enfermedades o alteraciones de secuencias de nucleótidos específicas (por ejemplo los polimorfismos de nucleótidos individuales o las mutaciones puntuales). El número de análisis que pueden realizarse simultáneamente es ilimitado; sin embargo, el límite superior probablemente es aproximadamente 20 y probablemente depende de la diferencia de tamaño necesaria para la resolución y los métodos disponibles para resolver el producto amplificado.

El método de la presente invención puede aplicarse al diagnóstico de enfermedades genéticas e infecciosas, a la determinación del sexo, al análisis de ligamientos génicos y a estudios forenses.

IV. Aplicación a la secuenciación del ADN

La especificidad mejorada permite utilizar el oligo de DE en la secuenciación directa a modo de cebador en la secuenciación en fase solución (en particular la secuenciación cíclica) o a modo de sonda en la secuenciación en fase sólida (en particular la secuenciación con chip de secuenciación) mediante la utilización del principio de extensión dependiente de molde del oligo de DE.

Se describe adicionalmente en la presente memoria un método de secuenciación de una molécula diana de ácidos nucleicos utilizando un oligonucleótido de doble especificidad de un ADN o de una mezcla de ácidos nucleicos, que comprende las etapas siguientes:

- (a) síntesis de una molécula de ácidos nucleicos complementaria a una molécula diana de ácidos nucleicos que debe secuenciarse mediante la realización de por lo menos dos ciclos de apareamiento de cebador, extensión de cebador y desnaturalización, utilizando el oligonucleótido de doble especificidad a modo de cebador de secuenciación, en la que el oligonucleótido de doble especificidad presenta tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia diana de nucleótidos para permitir la hibridación con el mismo; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es

superior a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m, la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se hibridan con la secuencia diana de ácidos nucleicos, en el que el apareamiento en la reacción de síntesis se lleva a cabo bajo condiciones en la que no se produce únicamente la hibridación con la parte 3' de especificidad a baja T_m, y

(b) determinación de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácidos nucleicos complementaria sintetizada.

Generalmente, la secuenciación del ADN se lleva a cabo mediante diversas metodologías, tales como la secuenciación de Maxam-Gilbert, la secuenciación de Sanger, la pirosecuenciación y la secuenciación mediante digestión con exonucleasa. El presente método de secuenciación pretende mejorar la pirosecuenciación, así como la secuenciación mediante ciclado térmico.

El presente método puede llevarse a cabo según variaciones del método dideoxi de Sanger. La secuenciación mediante ciclado térmico de la presente invención puede realizarse en ácidos nucleicos molde amplificados mediante PCR. Además, según la invención, la secuenciación mediante ciclado térmico se lleva a cabo con un ácido nucleico molde que no ha sido amplificado mediante PCR inmediatamente antes de la secuenciación.

Brevemente, la secuenciación de Sanger se basa en el principio de que la ADN polimerasa incorporará 2',3'-dideoxynucleótidos en cadenas de ácidos nucleicos, resultando en la terminación de la cadena (Sanger et al., PNAS USA 74:5463, 1977). El método desarrollado por Sanger se refiere al método dideoxi de terminación de cadena. En la técnica más tradicional de dicho método, un segmento de ADN del que se desea conocer la secuencia, se clona en un fago de ADN de cadena sencilla tal como M13. Estos fagos de ADN pueden servir de molde para la síntesis con cebador de la cadena complementaria por parte del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I. El cebador es un oligonucleótido sintético que se hibrida específicamente con una región del vector M13 en posición próxima al extremo 3' de la inserción clonada. En cada una de las cuatro reacciones de secuenciación, la síntesis con cebador se lleva a cabo en presencia de suficiente análogo dideoxi de uno de los cuatro posibles desoxinucleótidos para que las cadenas en crecimiento se terminen aleatoriamente al incorporarse dichos nucleótidos de terminación. La concentración relativa de formas dideoxi y desoxi se ajusta para proporcionar un abanico de sucesos de terminación correspondiente a todas las posibles longitudes de cadena que pueden resolverse mediante electroforesis en gel. Se utilizan etiquetas incorporadas en las cadenas en crecimiento para revelar una imagen autorradiográfica del patrón del ADN en cada carril de la electroforesis. La secuencia de los desoxinucleótidos en el ácido nucleico molde clonado se determina a partir de un examen del patrón de bandas en los cuatro carriles.

A modo de variación del método de Sanger, el método de secuenciación mediante ciclado térmico normalmente implica la utilización de soluciones que contienen un ácido nucleico cebador de secuenciación, desoxinucleósidos trifosfato, uno o más dideoxynucleósidos trifosfato (ddNTP), una solución tampón adecuada, una ADN polimerasa termoestable (por ejemplo la polimerasa Taq) y el ácido nucleico molde que debe secuenciarse. Puede encontrarse mayor información sobre la secuenciación mediante ciclado térmico en las patentes US nº 5.432.065, nº 5.723.298, nº 5.756.285, nº 5.817.797 y nº 5.831.065, las enseñanzas de las cuales se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad. Los procedimientos del método generalmente se llevan a cabo bajo condiciones de ciclado térmico similares a las de la PCR común.

Tras llevar a cabo una reacción de secuenciación en un ácido nucleico molde, la determinación de la secuencia de la molécula requiere que se identifiquen los productos de reacción. Se conoce de la técnica un número considerable de métodos de detección. Estos métodos generalmente implican la detección de etiquetas, incluyendo nucleótidos radioactivos, etiquetas fluorescentes, infrarrojas y quimioluminiscentes, tal como se describe en Ausubel F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y., 1993. Los marcajes pueden etiquetarse con cebadores o ddNTP, preferentemente ddNTP. El marcaje más preferente es uno fluorescente, incluyendo 6-carboxifluoresceína, 6-carboxi-X-rodamina, 3-(ε-carboxipentil)-3'-etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina, 6-carboxi-X-rodamina, derivados del ácido 4,4-difluoro-4-bora-3α,4α-diaza-s-indacén-3-propiónico, y el pigmento 4,7-diclororodamina.

Preferentemente, la temperatura de apareamiento es de entre aproximadamente 40°C y 70°C, más preferentemente de entre 45°C y 68°C, y todavía más preferentemente de entre 50°C y 65°C.

El presente método demuestra que permite realizar una secuenciación altamente específica de una molécula diana de ácidos nucleicos, tal como se demuestra en los Ejemplos, posteriormente. Más concretamente, los genes de la familia homeobox específica de placenta de ratón Psx1 y Psx2 pueden secuenciarse diferencialmente utilizando su cebador de secuenciación diseñado para presentar una estructura única del oligo de DE. Se subraya dicha secuenciación diferencial en el sentido de que las secuencias globales de los cebadores de secuenciación son diferentes en únicamente una base en la parte 3' de especificidad a baja T_m.

Inesperadamente, la presente invención permite secuenciar directamente una molécula diana de ácidos nucleicos contenida en un ADN genómico o en una población de ADNc sin purificación o aislamiento. No se ha informado todavía de que se haya podido llevar a cabo la secuenciación directa de una molécula diana de ácidos nucleicos en un ADN genómico o en una población de ADNc. En el caso de que se utilice el presente método de secuenciación para secuenciar directamente una molécula diana de ácidos nucleicos contenida en una población de ADNc a partir de un ARN total, dicho método comprende las etapas siguientes:

(a) poner en contacto una población de ARNm con un cebador oligonucleótido dT que se hibrida con una cola poli-A de los ARNm bajo condiciones suficientes para que se produzca la síntesis enzimática de ácido desoxirribonucleico controlada por molde.

(b) transcribir inversamente los ARNm a los que se hibrida el cebador oligonucleótido dT para producir una población de primeras cadenas de ADNc que son complementarias a los ARNm a los que se hibrida el cebador oligonucleótido dT,

(c) sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria a la primera cadena de ADNc que debe secuenciarse mediante la realización de por lo menos dos ciclos de apareamiento de cebador, extensión de cebadores y desnaturalización, utilizando el oligonucleótido de doble especificidad a modo de cebador de secuenciación, en la que el oligonucleótido de doble especificidad presenta tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a la primera cadena de ADNc para permitir la hibridación con la misma, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la primera cadena de ADNc para permitir la hibridación con el mismo; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m , la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se aparean con la primera cadena de ADNc, en el que el apareamiento en la reacción de síntesis se lleva a cabo bajo condiciones en la que no se produce únicamente el apareamiento con la parte 3' de especificidad a baja T_m , y

(b) determinación de la secuencia de nucleótidos de la molécula de primera cadena de ADNc sintetizada.

V. Aplicación de detección de moléculas de ácidos nucleicos con diversidad genética

Adicionalmente en la presente memoria se describe un método para detectar una molécula de ácidos nucleicos con diversidad genética mediante una reacción de extensión dependiente de molde de un oligonucleótido de especificidad dual, que comprende las etapas siguientes:

(a) apareamiento del oligonucleótido de doble especificidad con una molécula molde de ácidos nucleicos, en el que el oligonucleótido de doble especificidad presenta tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio del ácido nucleico molde para permitir la hibridación con el mismo, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio en el ácido nucleico molde para permitir la hibridación con el mismo, en donde la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m , la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se aparean con el ácido nucleico molde, en la que el apareamiento se lleva a cabo bajo condiciones en las que no se produce el apareamiento de únicamente la parte 3' de especificidad a baja T_m , y el apareamiento se produce en el caso de que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y/o la parte 3' de especificidad a baja T_m presenta una o más bases desapareadas a su sitio diana, y

(b) extensión del oligonucleótido de doble especificidad para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria al molde.

(c) detección de la extensión dependiente de molde del oligonucleótido de doble especificidad.

Debido a que dicha aplicación en la que se utiliza el oligo de DE de la presente invención se lleva a cabo según los presentes métodos de síntesis de secuencias de ácidos nucleicos comentadas anteriormente, las descripciones comunes han sido omitidas con el fin de evitar complejidad en la presente memoria que conlleve una redundancia excesiva.

Dicha aplicación en la que se utiliza el oligo de DE de la presente invención puede proporcionar un método mejorado para sintetizar selectivamente una secuencia de ácidos nucleicos con diversidad genética mediante una reacción de extensión dependiente de molde que incluye etapas de apareamiento y extensión. En particular, la detección de una secuencia diana de ácidos nucleicos con diversidad genética puede conseguirse mediante la repetición del procedimiento de la reacción de extensión dependiente de molde en la que tras las etapas de apareamiento y

extensión se realiza una etapa de desnaturalización.

El presente método se basa en la tolerancia al desapareamiento del oligo de DE.

5 Se ha informado de diversidad genética en diversos genomas. Este fenómeno se ha considerado un obstáculo a la
detección de un gen o genoma de interés sin errores. El propósito de la presente invención es proporcionar un
enfoque para superar dichos problemas convencionales mediante la utilización del oligo de DS con tolerancia al
desapareamiento. El oligo de DS con una secuencia diana puede hibridarse con varias secuencias diana que
muestran diversidad genética, resultando en el buen funcionamiento de la amplificación y detección de las
10 secuencias de nucleótidos de interés. En otras palabras, el oligo de DS desarrollado originalmente para incrementar
drásticamente la especificidad de apareamiento e hibridación también pueden utilizarse en procedimientos que
requieran tolerancia al desapareamiento en los que las condiciones de hibridación o restrictivas se ajustan
convenientemente.

15 Con el fin de proporcionar el oligo de DE que muestra tolerancia al desapareamiento, éste debe diseñarse a partir de
una región conservada de las moléculas de ácidos nucleicos generadas mediante la alineación de todas las
secuencias de nucleótidos disponibles. La expresión "región conservada" tal como se utiliza en la presente memoria
se refiere a un segmento de secuencia de nucleótidos de un gen o una secuencia de aminoácidos de una proteína
que es significativamente similar en diversas secuencias de nucleótidos diferentes de un gen. Dicha expresión se
20 utiliza intercambiamente con la expresión "secuencia conservada".

En una realización preferente, la secuencia más conservada dentro de la región conservada se encuentra situada
hacia el extremo 3' del oligo de DE, mientras que la secuencia menos conservada se encuentra situada en la parte
de separación. La parte 5' de especificidad a Tm elevada y/o la parte 3' de especificidad a baja Tm, preferentemente
25 la parte 5' de especificidad a Tm elevada, puede presentar una o más, preferentemente una a tres, más
preferentemente una o dos bases desapareadas con su diana debido a la tolerancia al desapareamiento del oligo de
DS.

30 Para imponer tolerancia al desapareamiento al oligo de DE, resultan importante las condiciones del apareamiento,
en particular la temperatura de apareamiento. El apareamiento se lleva a cabo bajo condiciones en las que no se
produce el apareamiento de únicamente la parte 3' de especificidad a baja Tm, aunque el apareamiento de todas las
partes se produce en el caso de que la parte 5' de especificidad a Tm elevada y/o de la parte 3' de especificidad a
baja Tm presente una o más bases desapareadas con su sitio diana.

35 Preferentemente, la temperatura de apareamiento es de entre aproximadamente 40°C y 70°C, más preferentemente
de entre 45°C y 68°C, y todavía más preferentemente de entre 50°C y 65°C.

Según una realización preferente, la presente invención se lleva a cabo de acuerdo con la reacción en cadena de la
40 polimerasa (PCR).

La etapa de detección del presente método puede llevarse a cabo mediante una multitud de técnicas
convencionales. Por ejemplo, la detección del producto de la extensión dependiente de molde puede llevarse a cabo
fácilmente mediante electroforesis en gel convencional en el caso de que el presente método se lleve a cabo de una
manera repetida para generar productos suficientes para ser detectados en un gel. En el caso de los materiales
45 marcados, incluyendo los detectables mediante medición espectroscópica, fotoquímica, bioquímica, bioelectrónica,
inmunoquímica, electrónica y química, puede llevarse a cabo una medición adecuada para detectar la presencia de
la extensión dependiente de molde.

La diversidad genética se observa y se genera más frecuentemente en el genoma vírico (Nathalie B. et al., Journal
50 of Clinical Microbiology 42:3532, 2004; Tersa C. et al., Journal of Infectious Diseases 185:1660, 2002; Takashi E. et
al., Journal of Clinical Microbiology 42:126, 2004; y Elizabeth R. et al., Clinical Infectious Diseases 32:1227, 2001). A
este respecto, resulta preferente que la molécula de ácidos nucleicos con diversidad genética que debe detectarse
sea un ácido nucleico de un virus que muestre diversidad genética. Por ejemplo, en el caso de que la presente
invención se aplica a la detección de metaneumovirus humanos que muestran diversidad genética mediante PCR, el
55 conjunto de cebadores más preferible diseñado para presentar la estructura de los oligos de DS se indica en las
secuencias SEC ID n° 39 (para el cebador 5') y n° 40 (para el cebador 3') o las secuencias SEC ID n° 39 y n° 41
(para el cebador 3').

60 VI. Aplicación a la detección de una secuencia de nucleótidos diana utilizando oligos de DS inmovilizados en una
micromatriz

La presente aplicación es un nuevo procedimiento para detectar una secuencia de nucleótidos diana mediante la
repetición de una reacción dependiente de molde en una micromatriz con oligos de DE inmovilizados.

Se describe adicionalmente en la presente memoria un método para detectar una secuencia de nucleótidos diana en una muestra de ácidos nucleicos mediante una reacción de extensión dependiente de molde, que comprende las etapas siguientes:

- (a) extensión de un oligonucleótido de doble especificidad a modo de sonda inmovilizada sobre un sustrato, que comprende por lo menos un ciclo de hibridación, una extensión dependiente de molde y una desnaturalización, en la que la hibridación se lleva a cabo mediante la puesta en contacto del oligonucleótido de doble especificidad con la muestra de ácidos nucleicos, en la que el oligonucleótido de doble especificidad presenta tres partes en las que una parte 5' de especificidad a T_m elevada presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia de nucleótidos diana para permitir la hibridación con la misma, una parte de separación que comprende por lo menos dos bases universales y una parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria a un sitio de la secuencia de nucleótidos diana para permitir la hibridación con la misma; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m , la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte de separación forma una estructura de burbuja en la que no se aparean las bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m se aparean con la secuencia de nucleótidos diana, en la que la hibridación se lleva a cabo bajo condiciones en las que la hibridación no se produce únicamente con la parte 3' de especificidad a baja T_m , y
- (b) análisis de las observaciones de extensión dependiente de molde.

En la fig. 4 se ilustra una representación esquemática de detección de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra de ácidos nucleicos mediante la utilización de la micromatriz con oligos de DE inmovilizados.

Dicho procedimiento que utiliza los oligos de DE puede llevarse a cabo bajo condiciones de hibridación adecuadas determinadas rutinariamente mediante procedimientos de optimización. Algunas condiciones, tales como la temperatura, la concentración de los componentes, los tiempos de hibridación y de lavado, los componentes tamponadores y su pH y fuerza iónica, pueden modificarse dependiendo de diversos factores, entre ellos la longitud y contenido de GC del oligonucleótido y de la secuencia de nucleótidos diana. Por ejemplo, en el caso de que se utilice un oligonucleótido relativamente corto, resulta preferible que se adopten condiciones de baja astringencia. Las condiciones detalladas de hibridación pueden encontrarse en Joseph Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001, y M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag, New York Inc., N.Y., 1999.

Los oligos de DE se inmovilizan sobre un sustrato. Un sustrato preferible incluye soportes sólidos o semisólidos, tales como membranas, filtros, chips, portaobjetos, obleas, fibras, perlas magnéticas o no magnéticas, geles, tubos, placas, macromoléculas, micropartículas y tubos capilares. Dicha inmovilización puede producirse mediante unión química o unión covalente mediante radiación ultravioleta. En una realización de la presente invención, los oligos de DS se unen a una superficie de cristal modificada para contener compuestos epoxi o grupos aldehído o a una superficie recubierta con polilisina. Además, los oligos de DS se unen a un sustrato mediante moléculas conectoras (por ejemplo oligómero de etilenglicol y diamina). Los oligos de DE inmovilizados pueden fabricarse para producir una o más matrices para una aplicación dada mediante tecnologías de fabricación convencionales, tales como la fotolitografía, la impresión de chorro de tinta, la microimpresión mecánica y derivados de los mismos.

Según el presente método, los dNTPs utilizados en la etapa de extensión preferentemente se marcan. Para el marcaje, se utilizan materiales detectables mediante medición espectroscópica, fotoquímica, bioquímica, bioelectrónica, inmunoquímica, electrónica o química. Por ejemplo, entre los marcajes se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, isótopos radioactivos como P^{32} y S^{35} , compuestos quimioluminiscentes, marcadores espectroscópicos, tales como marcadores de fluorescencia y pigmentos, y marcajes magnéticos. Entre los pigmentos se incluyen, por ejemplo, aunque sin limitación, pigmento quinolina, pigmento triarilmetano, ftafeína, pigmento azo y pigmento cianina. Entre los marcadores de fluorescencia se incluyen, aunque sin limitación, fluoresceína, ficoeritrina, rodamina, lisamina, Cy3 y Cy5 (Pharmacia). El marcaje se lleva a cabo según diversos métodos conocidos de la técnica.

Las secuencias de nucleótidos diana en una muestra de ácidos nucleicos se hibridan con los oligos de DE a modo de sondas inmovilizadas sobre un sustrato, preferentemente un soporte sólido, y a su vez los oligos de DE hibridados con secuencias de nucleótidos diana se extienden utilizando los dNTP, preferentemente dNTP marcados fluorescentemente y ADN polimerasa de un modo dependiente de molde. La etapa (a) preferentemente se repite para llevar a cabo reacciones de hibridación en la medida en que la totalidad o la mayoría de los oligos de DS se hibridan con secuencias de nucleótidos diana, proporcionando resultados del análisis de hibridación más reproducibles.

La producción de hibridación se verifica mediante diversos métodos conocidos de la técnica, dependiendo de los tipos de marcaje utilizados. Por ejemplo, la microscopía de fluorescencia, preferentemente la microscopía confocal de fluorescencia, se utiliza para los marcajes fluorescentes, y la intensidad de la señal detectada con dichos instrumentos se incrementa en proporción al grado de hibridación. Los microscopios de fluorescencia, en general, están dotados de un dispositivo de escaneo que construye una imagen bidimensional cuantitativa de la intensidad de hibridación. La intensidad de la señal detectada con dichos instrumentos se incrementa en proporción al grado de hibridación y del grado de extensión dependiente de molde.

A continuación se describe la presente invención en mayor detalle mediante ejemplos. Resultará evidente para el experto en la materia que estos ejemplos no pretenden ser más concretamente ilustrativos y que el alcance de la presente invención según las reivindicaciones adjuntas no se encuentra limitado por los ejemplos ni limitado a los mismos.

EJEMPLO 1: Especificidad de la PCR utilizando oligonucleótidos de doble especificidad (DS)

Los oligonucleótidos de DE desarrollados en la presente invención se aplicaron como cebadores con el fin de amplificar secuencias de nucleótidos diana de los genes IL-19 e IL-1beta. En la presente memoria se describen el procedimiento y los resultados de la amplificación de las secuencias de nucleótidos diana de IL-19 e IL-1beta utilizando cebadores de DS.

Se seleccionaron las secuencias de cebadores convencionales siguientes y se utilizaron para la comparación con los oligonucleótidos de DE respecto a la especificidad de la PCR:

Los cebadores convencionales específicos para IL-19 utilizados en el Ejemplo (500 pb) fueron:

IL-19-5'-0 5'-GTCTCATCTGCTGCCCTTAAGTCTCTAGGAGAACT-3' (SEC ID nº 1), y

IL19-3'-0 5'-CATAGGCCTGGAAGAAGCCGCTTTACAATAAGTTAG-3' (SEC ID nº 2).

Los cebadores convencionales específicos para IL-1beta utilizados en el Ejemplo (550 pb) fueron:

IL1b-5'-0 5'-GGAGAGTGTGGATCCCAAGCAATACCCAAAGAAG-3' (SEC ID nº 3), y

IL1b-3'-0 5'-AGACCTCAGTGCAGGCTATGACCAATTGATCCC-3' (SEC ID nº 4).

Los oligonucleótidos de DE de la presente invención se aplicaron a dichas secuencias de cebador convencionales para demostrar que los oligonucleótidos de DE pueden superar los problemas principales planteados por estas secuencias de cebador convencionales, tales como la generación de ruido de fondo y de productos inespecíficos.

Los cebadores de DE siguientes comprenden secuencias idénticas a los cebadores convencionales anteriormente indicados, excepto por la parte de separación, que presenta un conector polidesoxiinosina [poli(dI)] entre la parte 5' y la parte 3'. Los cebadores de DS están diseñados para comprender una parte 5' de especificidad a T_m elevada y una parte 3' de especificidad a baja T_m de manera que la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada sea superior a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m, mientras que la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes.

Los cebadores de DE para IL-19 utilizados en el Ejemplo (500 pb) fueron:

IL19-5' 5'-GTCTCATCTGCTGCCCTTAIIIIITAGGAGAACT-3' (SEC ID nº 5), y

IL19-3' 5'-CATAGGCCTGGAAGAAGCCGIIIIICAATAAGTTAG-3' (SEC ID nº 6), en la que I es desoxiinosina.

Los cebadores de DE para IL-1 utilizados en el Ejemplo (550 pb) fueron:

IL1b-5' 5'-GGAGAGTGTGGATCCCAAGCIIIIICCAAGAAG-3' (SEC ID nº 7), y

IL1b-3' 5'-AGACCTCAGTGCAGGCTATGIIIIITCATCCC-3' (SEC ID nº 8), en la que I es desoxiinosina.

La amplificación por PCR de la diana se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que contenía 2 µl (50 ng) del ADN genómico aislado a partir de tejidos de placenta de ratón cepa ICR, 2 µl de 10x de tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 2 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 10 µl de cebador 5' de DS o convencional (10 µM), 1 µl de cebador 3' de DS o convencional (10 µM) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una incubación de 7 minutos a 72°C.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se detectaron mediante tinción con bromuro de etidio. Los productos de PCR resultantes también pudieron detectarse en un gel de poliacrilamida desnaturizante mediante autorradiografía o métodos de detección no radioactivos, tales como la tinción con plata (Gottschlich et al., Res. Commun. Mol. Path. Pharm. 97:237-240, 1997; Kociok N. et al. Mol. Biotechnol. 9:25-33, 1998) o mediante la utilización de oligonucleótidos marcados fluorescentemente (Bauer D. et al., Nucleic Acids Res. 21:4272-4280, 1993; Ito T. et al., FEBS Lett. 351, 231-236. Luehrsen K.R. et al., BioTechniques 22:168-174, 1997; Smith N.R. et al., BioTechniques 23:274-279, 1997), y la utilización de cebadores biotinilados (Korn B. et al., Hum. Mol. Genet. 1:235-242, 1992; Tagle D.A. et al., Nature 361:751-753, 1993; Rosok O. et al., BioTechniques 21:114-121, 1996).

Tal como se muestra en la fig. 5, las amplificaciones mediante PCR dirigida de los genes IL-1b e IL-19 de la familia de las citoquinas utilizando los conjuntos de cebadores IL1b-5' e IL1b-3', e IL19-5' e IL19-3', generan una única banda que corresponde al tamaño esperado de 550 pb para IL-1beta (carril 2) y al tamaño esperado de 500 pb para IL-19 (carril 4), respectivamente. La posterior clonación y análisis de secuencias confirmó que las bandas eran fragmentos de IL-1beta e IL-19. En contraste, los conjuntos de cebadores convencionales (IL19-5'-0 e IL19-3'-0; IL1b-5'-0 e IL1b-3'-0), que no contenían [poli(dI)], produjeron productos no específicos (fig. 5, carriles 1 y 3). Estos resultados indican que los cebadores de DS diseñados para presentar tres partes con diferente Tm (parte 5' de especificidad a Tm elevada, parte 3' de especificidad a baja Tm y parte de separación) pueden superar los problemas principales planteados por las secuencias de cebador convencionales, tales como el fondo y los productos inespecíficos, e incrementar notablemente la especificidad de la PCR.

EJEMPLO 2: Evaluación de la especificidad de la PCR utilizando oligonucleótidos de doble especificidad (DS)

Los oligonucleótidos de doble especificidad se caracterizan por elevadas especificidad de hibridación y tolerancia al desapareamiento, las cuales surgen de su estructura única, dependiente de la astringencia de la hibridación. La elevada especificidad de la hibridación de los oligonucleótidos de DS se consigue bajo condiciones de elevada astringencia en las que tanto la parte 5' como la 3' se encuentran apareadas con el molde. Entretanto, la tolerancia al desapareamiento de los oligonucleótidos de DS se consigue bajo condiciones de astringencia en las que tanto la parte 5' como la 3' se encuentran apareadas con el molde a pesar de la presencia de uno o más pares de bases, aunque un número limitado, desapareados.

La especificidad dual de los oligonucleótidos de DE desarrollados según la presente invención se evaluó en términos de especificidad de hibridación y tolerancia al desapareamiento mediante la 3'-RACE de un nuevo gen, DEG10, el cual se ha identificado que se expresa en la placenta del ratón (Kim Y.J. et al., Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels, BioTechniques 36:424-434, 2004; XM_129567). Para esta evaluación, se sustituyeron unos cuantos nucleótidos en ambas partes por otros nucleótidos de manera que se encontrasen desapareados con la secuencia molde de la diana.

Los cebadores de DE específicos de 5'-DEG10 utilizados en el Ejemplo fueron:

DEG10-5'-108: 5'-TG TAGTTTGGGTTTCCTCCIIIICTCCGATG-3' (SEQ ID nº 9),
 DEG10-5'-103: 5'-TG TAGTTTGGGTTTCCTCCIIIICTGCCATC-3' (SEC ID nº 10),
 DEG10-5'-102: 5'-TG TAGTTTGGGTTTCCTCCIIIICTCCCATC-3' (SEC ID nº 11),
 DEG10-5'-101: 5'-TG TAGTTTGGGTTTCCTCCIIIICTCCCATG-3' (SEC ID nº 12),
 DEG10-5'-158: 5'-TG TACTTATGCGTATCGTCCIIIICTCCGATG-3' (SEC ID nº 13),
 DEG10-5'-138: 5'-TG TACTTTGCGTTTCGTCCIIIICTCCGATG-3' (SEC ID nº 14), y
 DEG10-5'-128: 5'-TG TAGTTATGGGTATCCTCCIIIICTCCGATG-3' (SEC ID nº 15),

en los que los nucleótidos sustituidos se encuentran subrayados y en negrita, y en donde I es desoxiinosina.

A. Mejora de la especificidad de la PCR bajo condiciones de alta astringencia

Se aislaron ARN totales procedentes de tejidos de placenta de 17,5 dpc (E17,5) de la cepa ICR de ratón y se utilizaron para la síntesis de primeras cadenas de ADNc utilizando transcriptasa inversa, tal como se ha descrito anteriormente (Hwang I.T. et al., Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. BioTechniques 35:1180-1184, 2003). Se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa utilizando los ARN totales durante 1,5 horas a 42°C en un volumen de reacción de 20 µl compuesto de lo siguiente: 3 µg de ARN total, 4 µl de 5x tampón de reacción (Promega, USA), 5 µl de dNTP (cada uno 2 mM), 2 µl de cebador de síntesis de ADNc 10 µM (adaptador oligo (dT)₂₀), 0,5 µl de inhibidor de ARNasa (40 unidades/µl, Promega) y 1 µl de transcriptasa inversa (200 unidades/µl, Promega). Se diluyeron primeras cadenas de ADNc mediante la adición de 180 µl de H₂O ultrapurificada. El cebador de síntesis de ADNc oligo (dT)₁₈-ACP1 es: 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIII(T)₁₈-3', en el que I es desoxiinosina.

La 3'-RACE de DEG10 se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que contenía 2 µl (30 ng) de la primera cadena de ADNc diluida, 2 µl de 10x de tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 2 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de uno de los cebadores de DE específicos para DEG10 (10 µM), 1 µl de oligo (dT)₁₅-ACP2 (10 µM) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado a 94°C; las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 68°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una incubación de 7 minutos a 72°C. El oligo (dT)₁₅-ACP2 es: 5'-CTGTGAATGCTGCGACTACGATIIII(T)₁₅-3', en el que I es desoxiinosina.

B. Tolerancia al desapareamiento de los oligonucleótidos de DS

Se utilizaron los cebadores de DE, molde y condiciones de PCR de la muestra para la 3'-RACE de DEG10 utilizada en el Ejemplo 2A excepto por la temperatura de apareamiento. La amplificación por PCR se llevó a cabo bajo las condiciones siguientes: un ciclo de 94°C durante 5 minutos, 60°C durante 3 minutos y 72°C durante 3 minutos, en la parte 5' o en la parte 3' no generaron ningún producto: el desapareamiento de tres (carril 2), dos (carril 3) o una (carril 4) base en la parte 3'; el desapareamiento de cinco (carril 5), tres (carril 6) o dos (carril 7) bases en la parte 5'.

Como resultado, la fig. 6A muestra la elevada especificidad de hibridación de los cebadores oligonucleótidos de DS mediante la 3'-RACE de DEG10. El cebador de DS 5' específico de DEG10 intacto (DEG10-5'-108) generó un producto esperado de 677 pb de la 3'-RACE de DEG10 (carril 1). En contraste, los demás cebadores (DEG10-5'-103, DEG10-5'-102, DEG10-5'-101, DEG10-5'-158, DEG10-5'-138 y DEG10-5'-128) con secuencias desapareadas en la parte 5' o en la parte 3' no generaron ningún producto: el desapareamiento de tres (carril 2), dos (carril 3) o una (carril 4) base en la parte 3'; el desapareamiento de cinco (carril 5), tres (carril 6) o dos (carril 7) bases en la parte 5'.

Estos resultados demuestran que la especificidad dual de los cebadores de DE pueden discriminar las bases desapareadas no sólo en el extremo 3' sino también en el extremo 5' bajo dichas condiciones de elevada astringencia.

En general, la región de los cebadores que debería ser perfectamente complementaria al molde es el extremo 3', debido a que este extremo es la región que extiende la ADN polimerasa y es, por lo tanto, la más importante para garantizar que se produce la hibridación con la secuencia diana correcta. Además, el extremo 5' de los cebadores resulta menos importante para determinar la especificidad de apareamiento con la secuencia diana y puede ser modificado para portar secuencias adicionales, tales como sitios de restricción y secuencias promotoras que no son complementarias al molde (McPherson M.J., Moller S.G., PCR BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York, Berlin, Heidelberg, N.Y., 2000). En contraste con ellas, las excepcionales ventajas de los cebadores de DS quedan demostradas por la doble especificidad debida su estructura única, que permite la discriminación de bases desapareadas en el extremo 5', así como en el extremo 3'.

La fig. 6B muestra un ejemplo de la tolerancia al desapareamiento de los cebadores oligonucleótidos de DE mediante la 3'-RACE de DEG10. Aunque los cebadores de DS (DEG10-5'-108, DEG10-5'-101, DEG10-5'-128 y DEG10-5'-138) que presentan pocos o ningún nucleótido desapareado en las partes de extremo 5' ó 3' de los mismos todavía generaron un producto esperado de 677 pb de la 3'-RACE de DEG10 (carriles 1, 4, 6 y 7). En contraste, los demás cebadores (DEG10-5'-103, DEG10-5'-102 y DEG10-5'-158), con más nucleótidos desapareados en las partes 5' ó 3' de los mismos no generaron ningún producto (carriles 2, 3 y 5). Estos resultados indican que los cebadores de DS también pueden aplicarse en amplificaciones de diversas secuencias de nucleótidos que requieren tolerancia al desapareamiento.

En resumen, estos resultados apoyan los principios siguientes de los cebadores de DE:

- 1) sólo en el caso de que se produzca el apareamiento tanto con la parte 5' de especificidad a T_m elevada como con la parte 3' de especificidad a baja T_m, se extiende el cebador de DE para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria al molde (carril 1); sin embargo,
- 2) en el caso de que se produzca el apareamiento con la parte 5' de especificidad a T_m elevada pero no con la parte 3' de especificidad a baja T_m, no se extiende el cebador de DE para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos complementaria al molde (carriles 2 a 4), y
- 3) aunque la secuencia de la parte 3' de especificidad a baja T_m presenta una correspondencia perfecta con el molde, el apareamiento con únicamente la parte 3' de especificidad a baja T_m no se produce bajo condiciones de alta astringencia (carriles 5 a 7). Con respecto a la parte hibridante, el cebador de DS es claramente diferente del cebador de control de hibridación (ACP), que se extiende únicamente mediante hibridación de la parte de extremo 3' en una etapa inicial de la PCR (Hwang I.T. et al., Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification, BioTechniques 35:1180-1184, 2003).

EJEMPLO 3: Discriminación de bases individuales utilizando oligonucleótidos de doble especificidad (DS)

Con el fin de demostrar la especificidad dual de los oligonucleótidos de DE para la discriminación de bases individuales, se amplificaron los ADNc de los genes Psx1 y Psx2 de la familia homeobox específica de placenta, utilizando cebadores convencionales o cebadores de DE. La identidad global de secuencia entre los dos ADNc de Psx era de 91% a nivel de nucleótidos (Han Y.J. et al., Identification and characterization of Psx2, a novel member of the Psx (placenta-specific homeobox) family, Gene 241: 149-155). Se diseñaron los cebadores 5' para distinguir Psx1 y Psx2 mediante la discriminación de una o dos bases (fig. 7A). Sin embargo, el cebador 3' se diseñó para presentar una secuencia conservada para ambos ADNc de Psx. Las secuencias de cebador convencional y de DE específicas de Psx1 y Psx2 eran:

Psx1-5'-10: 5'-AAGGAAGACATGCTGGTGGTGGTCTTCTAGCT-3' (SEC ID nº 16),
 Psx2-5'-10: 5'-AAGGAAGACATGCTGGTGGTGGTCTTCTGGCC-3' (SEC ID nº 17),
 Psx1-5'-11: 5'-AAGGAAGACATGCTGGTGGTGGTCTTCTAGCT-3' (SEC ID nº 18),
 Psx2-5'-11: 5'-AAGGAAGACATGCTGGTGGTGGTCTTCTGGCC-3' (SEC ID nº 19),
 Psx1-5'-40: 5'-TCTTGCACGATGGATGGGTGTGGATGAATGTGA-3' (SEC ID nº 20),
 Psx2-5'-40: 5'-TCTTGCACGATGGATGGGTGTGGATGAATCTGA-3' (SEC ID nº 21),
 Psx1-5'-41: 5'-TCTTGCACGATGGATGGGTGIIIIIGAAIGIGA-3' (SEC ID nº 22),
 Psx2-5'-41: 5'-TCTTGCACGATGGATGGGTGIIIIIGAAICIGA-3' (SEC ID nº 23), y
 Psx-3'-2: 5'-TTCATCCACACCCATCCATCIIIIAGATCCCT-3' (SEC ID nº 24),

en los que los nucleótidos específicos de Psx1 ó de Psx2 se encuentran subrayados y en negrita.

A. Síntesis de primera cadena de ADNc

Como material de partida para la 3'-RACE se utilizó la primera cadena de ADNc de placenta de ratón sintetizada en el Ejemplo 2 y una PCR dirigida del ADNc de Psx.

B. 3'-RACE de Psx1 y Psx2 utilizando cebadores de DE específicos de Psx1 y de Psx2

La 3'-RACE de Psx1 y Psx2 se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que contenía 2 µl (30 ng) de la primera cadena de ADNc diluida, 2 µl de 10x de tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 2 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de uno de los cebadores de DE específicos de 5'-Psx1 ó de 5'-Psx2 ó convencionales (10 µM), 1 µl de oligo (dT)₁₅-ACP2 (10 µM) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado a 94°C; las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 68°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una incubación de 7 minutos a 72°C. El oligo (dT)₁₅-ACP2 es:

C. Amplificación de ácidos nucleicos diana de Psx1 y Psx2 utilizando cebadores de DE específicos de Psx1 y de Psx2

La amplificación mediante PCR dirigida de Psx1 y Psx2 se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que contenía 2 µl (30 ng) de la primera cadena de ADNc diluida, 2 µl de 10x de tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 2 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de uno de los cebadores de DE específicos de 5'-Psx1 ó de 5'-Psx2 ó convencionales (10 µM), 1 µl de Psx-3'-2 (10 µM) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C); las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 68°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una incubación de 7 minutos a 72°C.

Como resultado, la fig. 7B muestra los productos de la 3'-RACE y de la PCR dirigida generados por los cebadores específicos de 5'-Psx1 ó 5'-Psx2. Debido a que los dos ADNc de Psx difieren entre sí por una delección o inserción de 29 pb hacia su extremo 3', se esperaba que los productos de tamaño que difería en 29 pb fueran amplificados en su 3'-RACE. La 3'-RACE del ADNc de Psx1 utilizando los cebadores de DE específicos de Psx1 ó Psx2, Psx1-5'-41 y Psx2-5'-41, generaron, cada uno, una única banda que correspondía al tamaño esperado de 311 pb (carril) y de 282 pb (carril 2), respectivamente. El análisis posterior de las secuencias de los productos generados mediante 3'-RACE confirmó que los cebadores específicos de 5'-Psx1 y de 5'-Psx2 habían amplificado los ADNc de Psx1 y Psx2, respectivamente. En contraste, los cebadores convencionales (Psx1-5'-40 y Psx2-5'-40), que no satisfacían los principios de los oligonucleótidos de DE, no distinguieron entre los dos ADNc de Psx (carriles 3 y 4).

Estos resultados indican que los cebadores de DE según la presente invención pueden discriminar el desapareamiento de una única base. Por lo tanto, los oligonucleótidos de DS pueden aplicarse a la identificación de mutaciones puntuales o al genotipado de polimorfismos de un único nucleótido.

EJEMPLO 4: Secuenciación directa de un ADNc diana a partir de un pool de ADNc utilizando oligonucleótidos de doble especificidad (DS)

La mayoría de intentos para identificar y aislar un nuevo ADNc resultan en la obtención de clones que representan únicamente una parte de la secuencia del ARNm. Tras identificar la secuencia parcial, el resto del transcrito con frecuencia puede obtenerse mediante un cribado típico de la biblioteca de ADNc o mediante métodos basados en la PCR, tales como la RACE (amplificación rápida de extremos del ADNc), seguido de la secuenciación del ADNc obtenido. De esta manera, todos los métodos actuales son una etapa previa necesaria para obtener la información de secuencia del resto del transcrito. En el caso de que la información de secuencia que falta se obtenga directamente a partir de una población de ADNc generados a partir de una célula diana, estas laboriosas etapas previas necesarias pueden omitirse por completo y la secuencia del ADNc diana puede determinarse directamente a partir de una muestra biológica cruda.

Los oligonucleótidos de DE de la presente invención se aplicaron como cebadores a la secuenciación directa de los ADNc del gen Psx de la familia homeobox específico de placenta de ratón, utilizando el pool de primeras cadenas de ADNc de placenta. El procedimiento y los resultados de la secuenciación directa de los ADNc del gen específico de placenta procedente del pool de ADNc de placenta se describen en la presente memoria. Se utilizaron los mismos cebadores de DE específicos de 5'-Psx utilizados en el Ejemplo 3: Eran Psx1-5'-11, Psx2-5'-11, Psx1-5'-41 y Psx2-5'-41.

A. Síntesis de primera cadena de ADNc

La primera cadena de ADNc de placenta de ratón sintetizada en el Ejemplo 2 se utilizó como molde para la secuenciación directa de los ADNc de Psx.

B. Secuenciación directa del ADNc de Psx a partir del pool de ADNc de placenta utilizando el cebador de DE específico para Psx

Se llevó a cabo la reacción de secuenciación cíclica en un volumen final de 20 µl que contenía 13 µl (150 ng) de la primera cadena de ADNc diluida, 2 µl de la mezcla de reacción ABI PRISM Big Dye Terminator (Applied Biosystems, USA), 3 µl de 5x tampón de reacción de secuenciación (Applied Biosystems) y 1,6 µl de uno de los cebadores de DS específicos para 5'-Psx1 ó 5'-Psx2 (1 µM); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 40-50 ciclos de 10 segundos a 94°C, 3 minutos a 50-60°C y 4 minutos a 60-65°C. Los productos de secuenciación se purificaron del modo siguiente: 1) adición de 2 µl de acetato sódico 3 M (pH 4,6) y 50 µl de EtOH al 100% frío, 2) mantenimiento a -75°C durante 30 minutos, 3) centrifugación durante 15 a 30 minutos a 13.000 g y eliminación del sobrenadante, 4) lavado con 200 µl de EtOH al 70%, 5) centrifugación durante 15 a 30 minutos a 13.000 g y eliminación cuidadosa del sobrenadante y secado. El pellet se resuspendió en 10 µl de HiDi formamida inmediatamente antes de analizar el producto de secuenciación en un analizador génico ABI PRISM 3100.

Inesperadamente, los cebadores de DE de Psx secuenciaron con precisión sus ADNc específicos para Psx. En otras palabras, el cebador de DE específico de Psx1 (Psx1-5'-41) secuenció únicamente el ADNc de Psx1 y el cebador de DE específico de Psx2 (Psx2-5'-41) secuenció únicamente el ADNc de Psx2 (fig. 8). La región delecionada de 29 pb en Psx2 se muestra con una raya negra. En contraste, los cebadores convencionales (Psx1-5'-40 y Psx2-5'-40), que no satisfacían los principios de los oligonucleótidos de DE, no distinguieron entre los dos ADNc de Psx.

Estos resultados indican que los cebadores de DE pueden discriminar desapareamientos de una sola base incluso en la secuenciación cíclica, así como en la amplificación por PCR.

EJEMPLO 5: PCR multiplex utilizando oligonucleótidos de doble especificidad (DS)

Con el fin de demostrar la aplicación de los cebadores oligonucleótidos de DE en la PCR multiplex, se amplificaron nueve genes diferentes de la familia de las citoquinas utilizando cebadores de DE. En la presente memoria se describen el procedimiento y resultados para la amplificación mediante PCR multiplex utilizando cebadores de DS. Se diseñaron los cebadores de DS específicos para genes de la familia de las citoquinas con el fin de generar una escalera de 50 pb mediante la utilización de la secuencia de exón más larga de cada gen de citoquina.

Los cebadores de DE para IL-3 utilizados en el Ejemplo (200 pb) fueron:

IL3-5' 5'-GCTGCCAGGGGTCTTCATTCIIIICTGGATGA-3' (SEQ ID nº 25), y
IL3-3' 5'-GGCCATGAGGAACATTCAGAIIIIGGTGCTCT-3' (SEQ ID nº 26).

Los cebadores de DE para IL-15 utilizados en el Ejemplo (250 pb) fueron:

IL15-5' 5'-ATGTAGCAGAATCTGGCTGCIIIIIATGTGAGG-3' (SEC ID nº 27); y

IL15-3' 5'-ATGTGATCCAAGTGGCTCATIIIIICCTTGTTAGG-3' (SEC ID nº 28).

Los cebadores de DE para IL-18 utilizados en el Ejemplo (300 pb) fueron:

- 5 IL18-5' 5'-AGGAAATGGATCCACCTGAIIIIITGATGATA-3' (SEC ID nº 29); y
IL18-3' 5'-ATGGAAATACAGGCGAGGTCIIIIIAAGGCGCA-3' (SEC ID nº 30).

Los cebadores de DE para IL-25 utilizados en el Ejemplo (350 pb) fueron:

- 10 IL25-5' 5'-AGCTCTCCAAGCTGGTGATCIIIIICAAGGCGG-3' (SEC ID nº 31); y
IL25-3' 5'-GAGCTGCCCTGGATGGGGTIIIIIGTGGTCT-3' (SEC ID nº 32).

Los cebadores de De para IL-2 utilizados en el Ejemplo (400 pb) fueron:

- 15 IL2-5' 5'-CTCTGACAACACATTTGAGTGCIIIIIICGATGATGAG-3' (SEC ID nº 33); y
IL2-3' 5'-GTGCTGTCCTAAAAATGACAGAIIIIIIGAGCTIATTT-3' (SEC ID nº 34).

Los cebadores de De para IL-6 utilizados en el Ejemplo (450 pb) fueron:

- 20 IL6-5' 5'-CCAATGCTCTCCTAACAGATAAIIIIAGTCACAGAA-3' (SEQ ID NO:35); and
IL6-3' 5'-AGGTAACTTATACATTCCAAGAAIIIIITGGCTAGG-3' (SEQ ID NO:36).

Los cebadores de De para IL-19 utilizados en el Ejemplo (500 pb) fueron:

- 25 IL19-5' 5'-GTCTCATCTGCTGCCCTTAIIIIITAGGAGAACT-3' (SEQ ID NO:5); and
IL19-3' 5'-CATAGGCCTGGAAGAAGCCGIIIIICAATAAGTTAG-3' (SEQ ID NO:6).

Los cebadores de De para IL-1beta utilizados en el Ejemplo (550 pb) fueron:

- 30 IL1b-5' 5'-GGAGAGTGTGGATCCCAAGCIIIIICCAAAGAAG-3' (SEQ ID NO:7); and
IL1b-3' 5'-AGACCTCAGTGCAGGCTATGIIIIITTCATCCC-3' (SEQ ID NO:8).

Los cebadores de De para IL-10 utilizados en el Ejemplo (600 pb) fueron:

- 35 IL10-5' 5'-AAGGCCATGAATGAATTTGAIIIITCATCAACTG-3' (SEQ ID NO:37); and
IL10-3' 5'-TGACAGTAGGGGAACCCCTCTIIIIIGCTGCAGG-3' (SEQ ID NO:38).

A. PCR monoplex utilizando un conjunto de cebadores de DS específicos de genes de la familia de las citoquinas

- 40 La PCR dirigida única para cada gen de la familia de las citoquinas se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que
contenía 2 µl (50 ng) de ADN genómico de ratón, 2 µl de 10x tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15
mM (Roche), 2 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de cada cebador 5' de DE
específico de genes de la familia de las citoquinas (10 µM), 1 µl de cada cebador 3' de DS específico de genes de la
45 familia de las citoquinas (10 µM) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla
de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las muestras se desnaturalizaron durante 5
minutos a 94°C y se sometieron a 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60-65°C y 1 minuto a 72°C, seguido de
una incubación de 7 minutos a 72°C.

50 B. PCR multiplex utilizando nueve conjuntos de cebadores de DS específicos de genes de la familia de las citoquinas

- La amplificación por PCR multiplex se llevó a cabo en un único tubo mediante la utilización de 9 conjuntos de
cebadores de DE específicos de genes de la familia de las citoquinas; la mezcla de reacción presentaba un volumen
final de 50 µl que contenían 100 ng de ADN genómico de ratón, 5 µl de 10x tampón de reacción de PCR que
55 contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 5 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl de cada
cebador 5' de DE específico de genes de la familia de las citoquinas (0,2 a 5 µM), 1 µl de cada cebador 3' de DE
específico de genes de la familia de las citoquinas (0,5 a 5 µl) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el
tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las condiciones de
PCR eran: un ciclo de 94°C durante 5 minutos, 50°C durante 3 minutos y 72°C durante 3 minutos, seguido de 29
60 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 40 segundos, y un ciclo final de
extensión de 5 minutos a 72°C.

Tal como se muestra en la fig. 9, la amplificación por PCR multiplex genera múltiples bandas que correspondían a los tamaños esperados de 200 a 600 pb para 9 productos de genes de citoquina diferentes (fig. 4, carril 1). Cada amplificación por PCR monoplex generó una única banda que correspondía al tamaño esperado de 200 pb para IL-3 (fig. 4, carril 2), 250 pb para IL-15 (fig. 4, carril 3), 300 pb para IL-18 (fig. 4, carril 4), 350 pb para IL-25 (fig. 4, carril 5), 400 pb para IL-2 (fig. 4, carril 6), 450 pb para IL-6 (fig. 4, carril 7), 500 pb para IL-19 (fig. 4, carril 8), 550 pb para IL-1beta (fig. 4, carril 9) y 600 pb para IL-10 (fig. 4, carril 10), respectivamente.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, pudo apreciarse que los cebadores de DE desarrollados en la presente invención pueden aplicarse con éxito a la PCR multiplex. La estructura única de los oligonucleótidos de DS permite superar el problema común de cualquier PCR multiplex convencional, es decir, la interferencia entre cebadores y la formación de dímeros.

EJEMPLO 6: Detección de metaneumovirus humano utilizando la tolerancia al desapareamiento de los oligonucleótidos de doble especificidad (DS)

Con el fin de demostrar la aplicación de los cebadores oligonucleótidos de DE en la tolerancia al desapareamiento, se aplicaron cebadores de DE a la detección de metaneumovirus humanos (MPVh) en muestras clínicas. En la presente memoria se describen el procedimiento y resultados para la detección del metaneumovirus humano utilizando cebadores de DS. El presente Ejemplo no debe interpretarse como limitativo de las aplicaciones de la invención a la detección del virus específico.

Los cebadores de DE se diseñaron basándose en la región conservada del gen de glucoproteína de fusión (F) generado mediante la alineación de secuencias de todos los aislados de MPVh disponibles (ver la Tabla 1). Para tolerar la diversidad genética de dichos aislados, los cebadores se diseñaron basándose en los criterios siguientes: (a) las regiones conservadas deben presentar una longitud de por lo menos 30 nucleótidos a pesar de la presencia de uno o más pares de bases, aunque un número limitado, de desapareadas (Tabla 1); (b) la mayoría de secuencias desapareadas dentro de las regiones conservadas preferentemente se localizan en la parte de separación del cebador de DS (por ejemplo MPVh 5'-585, MPVh 3'-698 y MPVh 3'-1007); (c) en caso contrario, los nucleótidos desapareados se localizan en la parte de extremo 5', algunos de los cuales podrían sustituirse por bases universales, tales como las desoxiinosinas (por ejemplo MPVh 3'-698 y MPVh 3'-1007), y (d) pueden sustituirse uno o dos nucleótidos desapareados por uno o más nucleótidos degenerados o bases universales (por ejemplo MPVh 3'-1007).

TABLA 1. Cebadores oligonucleótidos de DE específicos de MPVh en la región conservada del gen (F) de la glucoproteína de fusión de todos los aislados de MPVh disponibles

Cebador	Secuencia	Nº de aislados
Secuencias víricas	AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAAGGTTCTAAATGTTG.....	1
	AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAAGATTCTAAATGTTG.....	3
	AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAAGATTCCTAAATGTTG.....	4
	AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAAGATTCTAAATGTTG.....	1
	AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAAGATTCCTAAATGTTG.....	9
	AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAAGGTTCTAAATGTTG.....	14
Cebador 5' (585):	5'-AGCTTCAGTCAATTCAACAGAAIIIICTAAATGTTG-3'	
Secuencias víricas	AACATCAGTTTTATTTGTCCTGCAGATGTTGGCATGT.....	4
	AACATCAGTTTTATCTGCCCTGCAGATGTTGGCATGT.....	3
	AACATTAGTTTTATCTGTCTGCAGATGTTGGCATGT.....	12
	AACATCAGTTTTATCTGTCTGCAGATGTTGGCATGT.....	2
	AACATCAATTTTATTTGTCCTGCAGATGTTGGCATGT.....	3
	AACATCAATTTTATTTGTCCTGCAGATGTTGGCATGT.....	3
	AACATCAATTTTATTTGTCCTGCAGATGTTGGCATGT.....	5
Cebador 3' (698):	5'-AACATCAITTTTATITGTCCTGCAIIIIITGGCATGT-3'	
Secuencias víricas	TTGACTGCTCAGCAACATTGATTCCTGCTGCTGTGTC.....	2
	TTGATTGCTCAGCAACATTGATCCCTGCTGCTGTGTC.....	7
	TTGATTGCTCAGCAACATTGATCCCTGCAGCTGTGTC.....	8
	TTGATTGCTCAGCGACATTGATCCCTGCTGCTGTGTC.....	1
	TTGATTGCTCAGCAACATTGATCCCTGCTGCTGTGTC.....	1
	TTGATTGCTCAGCAACATTAAATCCCTGCTGCTGTGTC.....	9
	TTGATTGCTCAGCAACATTAAATCCCGCTGCTGTGTC.....	2
Cebador 3' (1007):	5'-TTGATTGCTCAGCIACATTGATIIIIICWGCTGTGTC-3'	

* La diversidad genética entre aislados de MPVh se muestra como nucleótidos subrayados

Los cebadores de De específicos del gen F del MPVh utilizados en el Ejemplo eran:

- 5 hMPV 5'-585 5'-AGCTTCAGTCAATCAACAGAAIIIICTAAATGTTG-3' (SEC ID nº 39),
hMPV 3'-698 5'-AACATCAITTTTATITGTCCTGCAIIIIITGGCATGT-3' (SEC ID nº 40), y
hMPV 3'-1007 5'-TTGATTGCTCAGCIACATTGATIIIIICWGCTGTGTC-3' (SEC ID nº 41),

en los que W puede ser A o T, e I es desoxinosina.

Se extrajo el ARN total vírico mediante la utilización del método del ARNzol B siguiendo el protocolo del fabricante (ARN zol LS, Tel-Test, Inc.). Se llevó a cabo una reacción de transcripción inversa para sintetizar ADNc utilizando el ARN vírico durante 1,5 horas a 42°C en un volumen de reacción de 20 µl compuesto de lo siguiente: 5 µl de ARN total (aproximadamente 100 ng), 4 µl de 5x tampón de reacción (Invitrogen, USA), 5 µl de dNTP (cada uno, 3 mM), 2 µl de hexadesoxinucleótidos aleatorios 10 µM, 0,5 µl de inhibidor de ARNasa (40 unidades/µl, Promega) y 1 µl de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (200 unidades/µl, Promega).

La amplificación por PCR dirigida del gen F del MPVh se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl que contenía 2 µl (30 ng) de la primera cadena de ADNc, 2 µl de 10x de tampón de reacción de PCR que contenía MgCl₂ 15 mM (Roche), 2 µl de dNTP (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 1 µl cebador de DS 5' específico de MPVh (MPVh 5'-585, 10 µM), 1 µl de cebador de DS 3' específico de MPVh (MPVh 3'-698 ó MPVh 3'-1007, 10 µM) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Roche); el tubo que contenía la mezcla de reacción se introdujo en un ciclador térmico precalentado (94°C), las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 94°C y se sometieron a 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60-65°C y 1 minuto a 72°C, seguido de una incubación de 7 minutos a 72°C.

Tal como se muestra en la fig. 10B, cada pareja de cebadores de DE específicos de MPVh (MPVh 5'-585 y MPVh 3'-698 y MPVh 5'-585 y MPVh 3'-1007) generó una única banda que correspondía a los tamaños esperados de 150 pb y 459 pb, respectivamente (carriles 1 y 2). El posterior análisis de secuencias de los productos confirmó que son secuencias parciales del gen (F) de glucoproteína de fusión del MPVh. En contraste, dichos cebadores no generaron producto en una PCR de control negativo sin molde (carriles 4 y 5). A modo de control positivo se utilizó el conjunto de cebadores específico para la beta-actina humana (carril 3).

Estos resultados indican que los cebadores de DE pueden aplicarse a la detección de los MPVh de pacientes con infecciones respiratorias. De esta manera, podría hacerse efectivo que los oligonucleótidos de DS se adaptasen como cebadores en la amplificación por PCR o como sondas en un chip de oligonucleótidos, a todas las potenciales situaciones que se presentan en el campo.

EJEMPLO 7: Detección de una secuencia diana de nucleótidos utilizando una micromatriz de oligos de DS inmovilizados

Los oligos de DE complementarios a una región de una molécula diana de ácidos nucleicos se sintetizaron utilizando un sintetizador de ADN (Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesis System, Applied Biosystems (ABI)) según un protocolo estándar. Los oligos de DS sintetizados se inmovilizan sobre un portaobjetos de vidrio como micromatriz. A continuación, se añadió a la micromatriz una mezcla de reacción de extensión dependiente de molde que contenía 50 a 200 ng de muestra de ADN, 5 µl de 10x tampón de reacción de PCR (Promega), 5 µl de MgCl₂ 15 mM, 5 µl de dNTP marcado fluorescentemente (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Promega), introduciendo seguidamente la micromatriz en un ciclador térmico precalentado (94°C). La reacción de extensión dependiente de molde se lleva a cabo siguiendo el ciclado térmico siguiente: desnaturalización durante 5 minutos a 94°C y 15 a 50 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 a 3 minutos a 50-65°C y 1 a 4 minutos a 60-72°C, seguido de una extensión de 5 minutos a 72°C. Tras la reacción de extensión dependiente de molde, los oligos de DS extendidos se lavan y se detectan a partir de sus imágenes fluorescentes utilizando un escáner de micromatrices, seguido del análisis de las imágenes.

EJEMPLO 8: Genotipado de SNP (polimorfismos de nucleótidos individuales) utilizando oligonucleótidos de DE

Los oligos de DE se sintetizaron utilizando un sintetizador de ADN (Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesis System, Applied Biosystems (ABI)) según un protocolo estándar, introduciendo una base polimórfica (sitio de interrogación) en el centro de una parte 3' de especificidad a baja T_m. Los oligonucleótidos sintetizados se inmovilizaron en un portaobjetos de vidrio para micromatriz. A continuación, se añadió a la micromatriz una mezcla de reacción de extensión dependiente de molde que contenía 50 a 200 ng de muestra de ADN, 5 µl de 10x tampón de reacción de PCR (Promega), 5 µl de MgCl₂ 15 mM, 5 µl de dNTP marcado fluorescentemente (2 mM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y 0,5 µl de polimerasa Taq (5 unidades/µl, Promega), introduciendo seguidamente la micromatriz en un ciclador térmico precalentado (94°C). La reacción de extensión dependiente de molde se lleva a cabo siguiendo el ciclado térmico siguiente: desnaturalización durante 5 minutos a 94°C y 15 a 50 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 a 3 minutos a 50-65°C y 1 a 4 minutos a 60-72°C, seguido de una extensión de 5 minutos a 72°C. Tras la reacción de extensión dependiente de molde, los oligos de DS extendidos se lavan y se detectan a partir de sus imágenes fluorescentes utilizando un escáner de micromatrices, seguido del análisis de las imágenes.

<110> SEEGENE, INC.

<120> PROCEDIMIENTOS QUE UTILIZAN UN OLIGONUCLEÓTIDO DE DOBLE ESPECIFICIDAD Y OLIGONUCLEÓTIDO DE DOBLE ESPECIFICIDAD PARA LOS MISMOS

<130> P46244

<140> EP

<141> 2006-03-03

<150> KR 10-2005-0018419

<151> 2005-03-05
 <150> PCT/KR2005/001206
 <151> 2005-04-26
 5 <160> 41
 <170> KopatentIn 1.71
 10 <210> 1
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> IL19-5'-0
 <400> 1
 gtctcatctg ctgcccttaa gtctctagga gaact 35
 20 <210> 2
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> IL19-3'-0
 <400> 2
 30 cataggcctg gaagaagccg cttacaata agttag 36
 <210> 3
 <211> 34
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IL1b-5'-0
 40 <400> 3
 ggagagtgtg gatccaagc aatacccaaa gaag 34
 <210> 4
 <211> 33
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IL1b-3'-0
 50 <400> 4
 agacctcagt gcaggctatg accaattcat ccc 33
 <210> 5
 55 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> IL19-5'
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

 <400> 5
 5 gtctcatctg ctgcccttaa nnnnttagga gaact 35

 <210> 6
 <211> 36
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> IL19-3'

 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

 20 <400> 6
 cataggcctg gaagaagccg nnnnncaata agttag 36

 <210> 7
 <211> 34
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> IL1b-5'

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

 35 <400> 7
 ggagagtgtg gatccaagc nnnnnccaaa gaag 34

 <210> 8
 40 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 45 <223> IL1b-3'

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 50 <223> desoxiinosina

 <400> 8
 agacctcagt gcaggctatg nnnnttcat ccc 33

 55 <210> 9
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> DEG10-5'-108

 <220>

<221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

5 <400> 9
 tgtagtttg ggttcctcc nnnnctccg atg 33

<210> 10
 <211> 33
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DEG10-5'-103

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

20 <400> 10
 tgtagtttg ggttcctcc nnnnctgcc atc 33

<210> 11
 25 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> DEG10-5'-102

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 35 <223> desoxiinosina

<400> 11
 tgtagtttg ggttcctcc nnnnctccc atc 33

40 <210> 12
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> DEG10-5'-101

<220>
 <221> misc_feature
 50 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

<400> 12
 tgtagtttg ggttcctcc nnnnctccc atg 33

55 <210> 13
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> DEG10-5'-158

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 5
 <400> 13
 tgtacttatg cgtatcgcc nnnnnctccg atg 33
 10
 <210> 14
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> DEG10-5'-138
 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 <400> 14
 tgtacttttg cgtttcgcc nnnnnctccg atg 33
 25
 <210> 15
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> DEG10-5'-128
 35
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 <400> 15
 tgtagttatg ggtatcctcc nnnnnctccg atg 33
 40
 <210> 16
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Psxl-5'-10
 50
 <400> 16
 aaggaagaca tgctggtgat ggtgcttcta gct 33
 55
 <210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Psx2-5'-10
 60
 <400> 17
 aaggaagaca tgctggtgat ggtgcttctg gcc 33
 <210> 18

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Psx1-5'-11
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 <400> 18
 aaggaagaca tgctggtgat nnnnnttcta gct 33
 15 <210> 19
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Psx2-5'-11
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 <400> 19
 30 aaggaagaca tgctggtgat nnnnnttctg gcc 33
 <210> 20
 <211> 33
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Psx1-5'-40
 40 <400> 20
 tcttgacga tggatgggtg tggatgaatg tga 33
 <210> 21
 <211> 33
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Psx2-5'-40
 50 <400> 21
 tcttgacga tggatgggtg tggatgaatc tga 33
 <210> 22
 55 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Psx1-5'-41
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)
 <223> desoxiinosina

 10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)
 <223> desoxiinosina

 15 <400> 22
 tctgcacga tggatgggtg nnnnngaang nga 33

 <210> 23
 <211> 33
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Psx2-5'-41

 25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)
 <223> desoxiinosina

 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (31)
 <223> desoxiinosina

 40 <400> 23
 tctgcacga tggatgggtg nnnnngaanc nga 33

 <210> 24
 <211> 33
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Psx-3'-2
 50 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

 55 <400> 24
 ttcattccaca cccatccatc nnnnnagatc cct 33

 <210> 25
 60 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL3-5'

 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

 10 <400> 25
 gctgccaggg gtcttcattc nnnnnctgga tga 33

 <210> 26
 <211> 33
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> IL3-3'

 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

 25 <400> 26
 ggccatgagg aacattcaga nnnnnggtgc tct 33

 <210> 27
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> IL15-5'
 35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 40 <400> 27
 atgtagcaga atctggctgc nnnnnatgtg agg 33

 <210> 28
 45 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 50 <223> IL15-3'

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 55 <223> desoxiinosina

 <400> 28 35
 atgtgatcca agtggctcat nnnnncttg ttagg 35

 60 <210> 29
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> IL18-5'
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 10 <400> 29
 aggaaatgga tccacctgaa nnnnntgatg atata 35
 <210> 30
 <211> 33
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> IL18-3'
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 25 <400> 30
 atggaaatac aggcgaggtc nnnnnaaggc gca 33
 <210> 31
 30 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> IL25-5'
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 40 <223> desoxiinosina
 <400> 31
 agctctcaa gctggtgatc nnnncaagg cgg 33
 45 <210> 32
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> IL25-3'
 <220>
 <221> misc_feature
 55 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina
 <400> 32
 gagctgccct ggatggggtt nnnnngtggt cct 33
 60 <210> 33
 <211> 37
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> IL2-5'

5 <220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(27)
<223> desoxiinosina

10 <400> 33
ctctgacaac acatttgagt gcnnnnncga tgatgag 37

15 <210> 34
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> IL2-3'

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(27)
<223> desoxiinosina

30 <400> 34
gtgctgtcct aaaaatgaca gannnnngag cttattt 37

35 <210> 35
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> IL6-5'

45 <220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(27)
<223> desoxiinosina

50 <400> 35
ccaatgtctt cctaacagat aannnnnagt cacagaa 37

55 <210> 36
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> IL6-3'

65 <220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(30)
<223> desoxiinosina

70 <400> 36
aggtaaactt atacattcca agaaannnnn tggctagg 38

75 <210> 37
<211> 35

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> IL10-5'

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 10 <223> desoxiinosina

 <400> 37
 aaggccatga atgaattga nnnnntcatc aactg 35

 15 <210> 38
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> IL10-3'

 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (21)..(25)
 <223> desoxiinosina

 <400> 38
 tgacagtagg ggaaccctct nnnnngctgc agg 33
 30 <210> 39
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> hMPV 5'-585

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> desoxiinosina

 <400> 39
 45 agcttcagtc aattcaacag aannnnncta aatgttg 37

 <210> 40
 <211> 37
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> hMPV 3'-698

 55 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)
 <223> desoxiinosina

 60 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)
 <223> desoxiinosina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(29)
 5 <223> desoxiinosina

 <400> 40
 aacatcantt ttatntgtcc tgcannnnnt ggcatgt 37

 10 <210> 41
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> hMPV 3'-1007

 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (5)
 <223> desoxiinosina

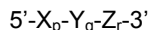
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (14)
 <223> desoxiinosina

 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (23) .. (27)
 <223> desoxiinosina

 <400> 41
 35 ttgantgctc agcnacattg atnnnnncwg ctgtgtc 37

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido de doble especificidad con especificidad de apareamiento incrementado, que se encuentra representado por la fórmula general siguiente:



en la que X_p representa una parte 5' de especificidad a alta T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante que es sustancialmente complementaria a un sitio de un ácido nucleico molde inicial que hibrida con el mismo; Y_q representa una parte de separación que comprende por lo menos tres bases universales contiguas; Z_r representa una parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante que es sustancialmente complementaria a un sitio del ácido nucleico molde que hibrida con el mismo; p, q y r representan los números de nucleótidos, y p representa un número entero igual o superior a 15, q representa un número entero igual o superior a 3 y r representa un número entero igual o superior a 3; y X, Y y Z son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la parte 5' de especificidad a alta T_m es superior por lo menos en 20°C a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m ; la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte 5' de especificidad a alta T_m es más larga que la parte 3' de especificidad a baja T_m ; la parte de separación forma una estructura de burbuja sin apareamiento de bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a alta T_m y la parte 3' de especificidad a baja T_m se hibridan con el ácido nucleico molde inicial, permitiendo que la parte 5' de especificidad a alta T_m se diferencie de la parte 3' de especificidad a baja T_m en términos de especificidad de hibridación con el ácido nucleico molde inicial, de manera que la especificidad de apareamiento del oligonucleótido está determinada doblemente, a partir de la parte 5' de especificidad a alta T_m y de la parte 3' de especificidad a baja T_m de manera que resulta incrementada la especificidad global de apareamiento del oligonucleótido.

2. Oligonucleótido de doble especificidad según la reivindicación 1, en el que la base universal en la parte de separación se selecciona de entre el grupo que consiste de desoxiinosina, inosina, 7-deaza-2'-desoxiinosina, 2-aza-2'-desoxiinosina, 2'-OMe-inosina, 2'-F-inosina, desoxi-3-nitropirrol, 3-nitropirrol, 2'-OMe-3-nitropirrol, 2'-F-3-nitropirrol, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol, desoxi-5-nitroindol, 5-nitroindol, 2'-OMe-5-nitroindol, 2'-F-5-nitroindol, desoxi-4-nitrobencimidazol, 4-nitrobencimidazol, desoxi-4-aminobencimidazol, 4-aminobencimidazol, desoxinebularina, 2'-F-nebularina, 2'-F-4-nitrobencimidazol, PNA-5-nitroindol, PNA-nebularina, APN-inosina, APN-4-nitrobencimidazol, APN-3-nitropirrol, morfolino-5-nitroindol, morfolino-nebularina, morfolino-inosina, morfolino-4-nitrobencimidazol, morfolino-3-nitropirrol, fosforamidato-5-nitroindol, fosforamidato-nebularina, fosforamidato-inosina, fosforamidato-4-nitrobencimidazol, fosforamidato-3-nitropirrol, 2'-O-metoxietilinosina, 2'-O-metoxietilinebularina, 2'-O-metoxietil-5-nitroindol, 2'-O-metoxietil-4-nitrobencimidazol, 2'-O-metoxietil-3-nitropirrol y combinaciones de los mismos.

3. Oligonucleótido de doble especificidad según la reivindicación 2, en el que la base universal es la desoxiinosina, 1-(2'-desoxi-beta-D-ribofuranosil)-3-nitropirrol ó 5-nitroindol.

4. Oligonucleótido de doble especificidad según la reivindicación 3, en el que la base universal es la desoxiinosina.

5. Oligonucleótido de doble especificidad según la reivindicación 1, en el que p representa un número entero entre 15 y 40, preferentemente entre 15 y 25.

6. Oligonucleótido de doble especificidad según la reivindicación 1, en el que q representa un número entero entre 3 y 10.

7. Oligonucleótido de doble especificidad según la reivindicación 1, en el que r representa un número entero entre 3 y 15.

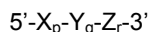
8. Oligonucleótido de doble especificidad según la reivindicación 1, en el que la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es de entre 40°C y 80°C.

9. Oligonucleótido de doble especificidad según la reivindicación 1, en el que la T_m de la parte 3' de especificidad a baja T_m se encuentra comprendida entre 10°C y 40°C.

10. Oligonucleótido de doble especificidad según la reivindicación 1, en el que la T_m de la parte de separación se encuentra comprendida entre 3°C y 15°C.

11. Método para sintetizar una molécula de ácidos nucleicos utilizando un oligonucleótido de doble especificidad mediante una reacción de extensión dependiente de molde, que comprende las etapas siguientes:

(a) aparear el oligonucleótido de doble especificidad con una molécula molde de ácidos nucleicos, en el que el oligonucleótido de doble especificidad se encuentra representado por la fórmula general siguiente:



en la que X_p representa una parte 5' de especificidad a alta T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante que es sustancialmente complementaria a un sitio de un ácido nucleico molde que hibrida con el mismo; Y_q representa una parte de separación que comprende por lo menos tres bases universales contiguas; Z_r representa una parte 3' de especificidad a baja T_m que presenta una secuencia de nucleótidos hibridante que es sustancialmente complementaria a un sitio del ácido nucleico molde que hibrida con el mismo; p, q y r representan los números de nucleótidos, y p representa un número entero igual o superior a 15, q representa un número entero igual o superior a 3 y r representa un número entero igual o superior a 3; y X, Y y Z son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos; la T_m de la parte 5' de especificidad a alta T_m es superior por lo menos en 20°C a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m ; la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte 5' de especificidad a alta T_m es más larga que la parte 3' de especificidad a baja T_m ; la parte de separación forma una estructura de burbuja sin apareamiento de bases bajo condiciones en las que la parte 5' de especificidad a alta T_m y la parte 3' de especificidad a baja T_m se hibridan con el ácido nucleico molde inicial, permitiendo que la parte 5' de especificidad a alta T_m se diferencie de la parte 3' de especificidad a baja T_m en términos de especificidad de hibridación con el ácido nucleico molde inicial, de manera que la especificidad de apareamiento del oligonucleótido está determinada doblemente, a partir de la parte 5' de especificidad a alta T_m y de la parte 3' de especificidad a baja T_m de manera que resulta incrementada la especificidad global de apareamiento del oligonucleótido.

(b) extensión del oligonucleótido de doble especificidad para sintetizar la molécula de ácidos nucleicos complementaria al ácido nucleico de molde.

12. Método según la reivindicación 11, en el que la síntesis de la molécula de ácidos nucleicos se consigue mediante la repetición del procedimiento de reacción de extensión dependiente de molde en el que tras las etapas de apareamiento y extensión del oligonucleótido de doble especificidad se realiza una etapa de desnaturalización.

13. Método según la reivindicación 11, en el que el oligonucleótido de doble especificidad es una sonda inmovilizada sobre un sustrato.

14. Método según la reivindicación 11, en el que la hibridación se lleva a cabo a una temperatura de entre 45°C y 68°C.

15. Método según la reivindicación 11, en el que p representa un número entero entre 15 y 40, preferentemente entre 15 y 25.

16. Método según la reivindicación 11, en el que q representa un número entero entre 3 y 10.

17. Método según la reivindicación 11, en el que r representa un número entero entre 3 y 15.

18. Método según la reivindicación 11, en el que la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es de entre 40°C y 80°C.

19. Método según la reivindicación 11, en el que la T_m de la parte 3' de especificidad a baja T_m es de entre 10°C y 40°C.

20. Método según la reivindicación 11, en el que la T_m de la parte de separación es de entre 3°C y 15°C.

21. Utilización de bases universales para la preparación de un oligonucleótido de doble especificidad con especificidad de apareamiento incrementada para permitir que la especificidad de apareamiento del oligonucleótido de doble especificidad sea determinada dualmente a partir de la estructura del oligonucleótido de doble especificidad, en la que la preparación comprende las etapas siguientes: (a) seleccionar una secuencia diana de ácidos nucleicos, (b) diseñar una secuencia de un oligonucleótido que presente: (i) una secuencia hibridante sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana, e (ii) una parte de separación que comprende por lo menos tres bases universales contiguas, de manera que la parte de separación interviene en la secuencia hibridante formando tres partes en el oligonucleótido, y (c) determinar la posición de la parte de separación en el oligonucleótido que permita que una parte en la dirección 5' de la parte de separación presente una T_m más alta que una parte en la dirección 3' de la parte de separación y que permita que la parte de separación presente la T_m más baja de las tres partes, proporcionando de esta manera un oligonucleótido que presenta tres partes diferenciadas con diferentes valores de T_m en el que: (i) una parte 5' de especificidad a T_m elevada del oligonucleótido presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana, (ii) una parte 3' de

especificidad a baja T_m del oligonucleótido presenta una secuencia de nucleótidos hibridante sustancialmente complementaria al ácido nucleico diana, e (iii) la parte de separación del oligonucleótido entre la parte 5' de especificidad a T_m elevada y la parte 3' de especificidad a baja T_m comprende por lo menos tres bases universales contiguas; la parte 5' de especificidad a alta T_m presenta una longitud de por lo menos 15 nucleótidos, la parte de separación presenta una longitud de por lo menos 3 nucleótidos, y la parte 3' de especificidad a baja T_m presenta una longitud de por lo menos 3 nucleótidos; la T_m de la parte 5' de especificidad a T_m elevada es superior en por lo menos 20°C a la de la parte 3' de especificidad a baja T_m , la parte de separación presenta la T_m más baja de las tres partes; la parte 5' de especificidad a alta T_m es más larga que la parte 3' de especificidad a baja T_m , en donde la especificidad de apareamiento del oligonucleótido con el ácido nucleico diana se determina dualmente a partir de tanto la parte 5' de especificidad a T_m elevada como la parte 3' de especificidad a baja T_m .

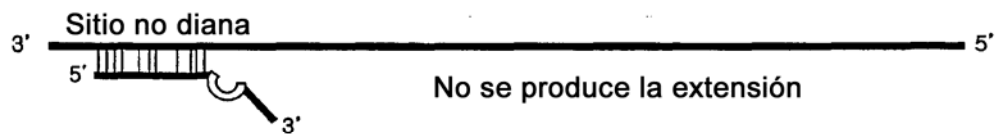
FIG. 1A

Especificidad de hibridación elevada del oligonucleótido de doble especificidad

(a) Sin extensión

No se produce la extensión

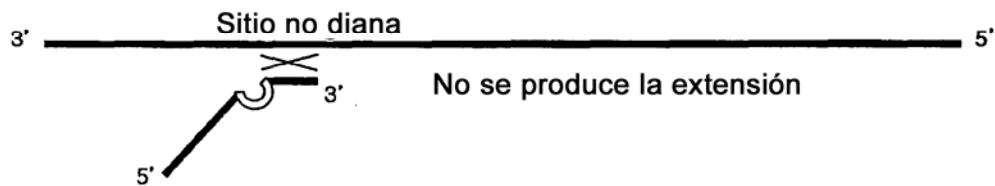
en el caso de que la parte de extremo 5', pero no la parte de extremo 3', se encuentre hibridada con el molde



(b) Sin hibridación

No se produce la hibridación

en el caso de que la parte de extremo 3', pero no la parte de extremo 5', presente una secuencia complementaria al sitio no diana



(c) Extensión

Tanto la parte de extremo 5' como la del extremo 3' se hibridan con la secuencia diana y por lo tanto se produce con éxito la extensión

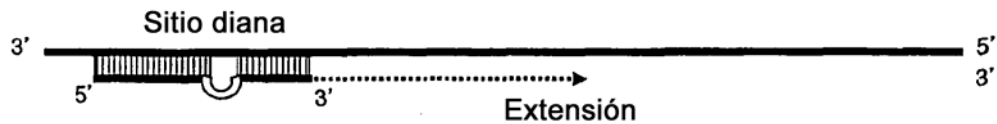
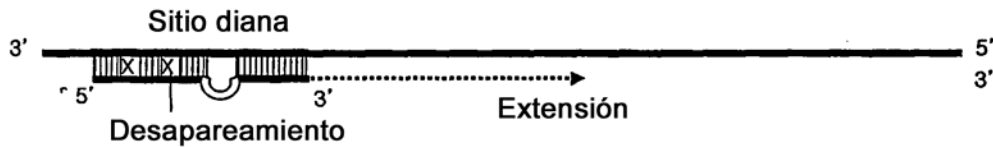


FIG. 1B

Tolerancia al desapareamiento del oligonucleótido de doble especificidad

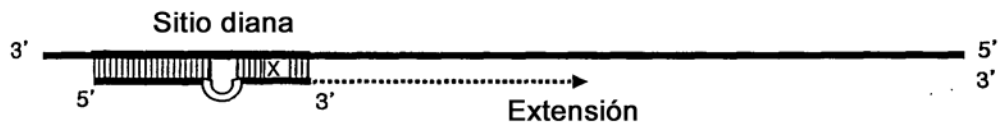
(a) Extensión

Se tolera el desapareamiento en la parte de extremo 5' ya que tanto la parte de extremo 5' como la de extremo 3' se encuentran hibridadas con el molde



(b) Extensión

Se tolera el desapareamiento en la parte de extremo 3' ya que tanto la parte de extremo 5' como la de extremo 3' se encuentran hibridadas con el molde



(c) Extensión

Se toleran los desapareamientos en las partes de extremos 5' y 3' ya que tanto la parte de 5' como la del extremo 3' se encuentran hibridadas con el molde

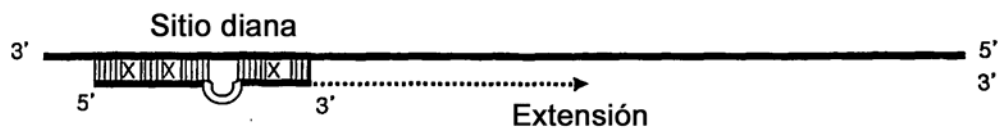
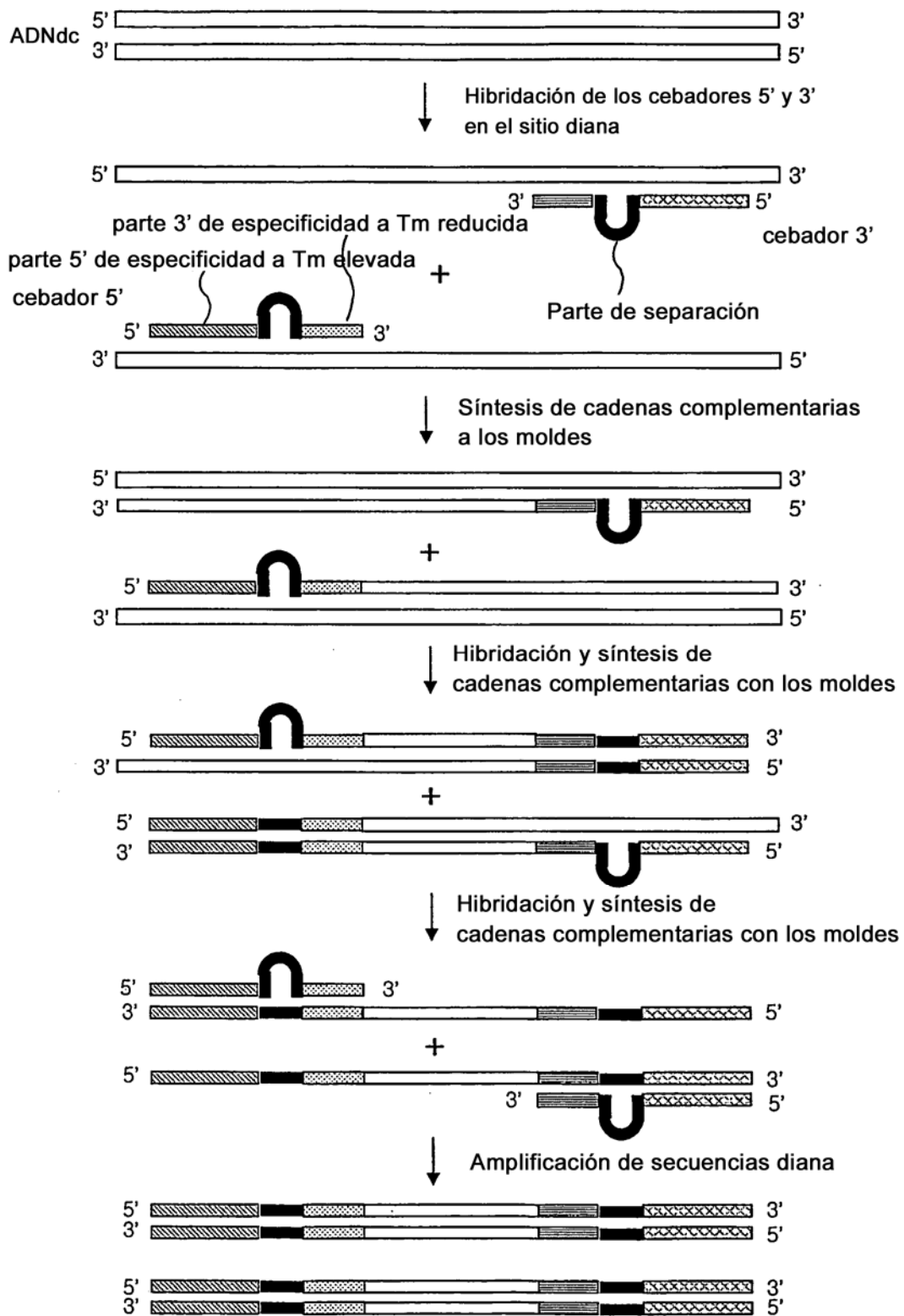


FIG. 2



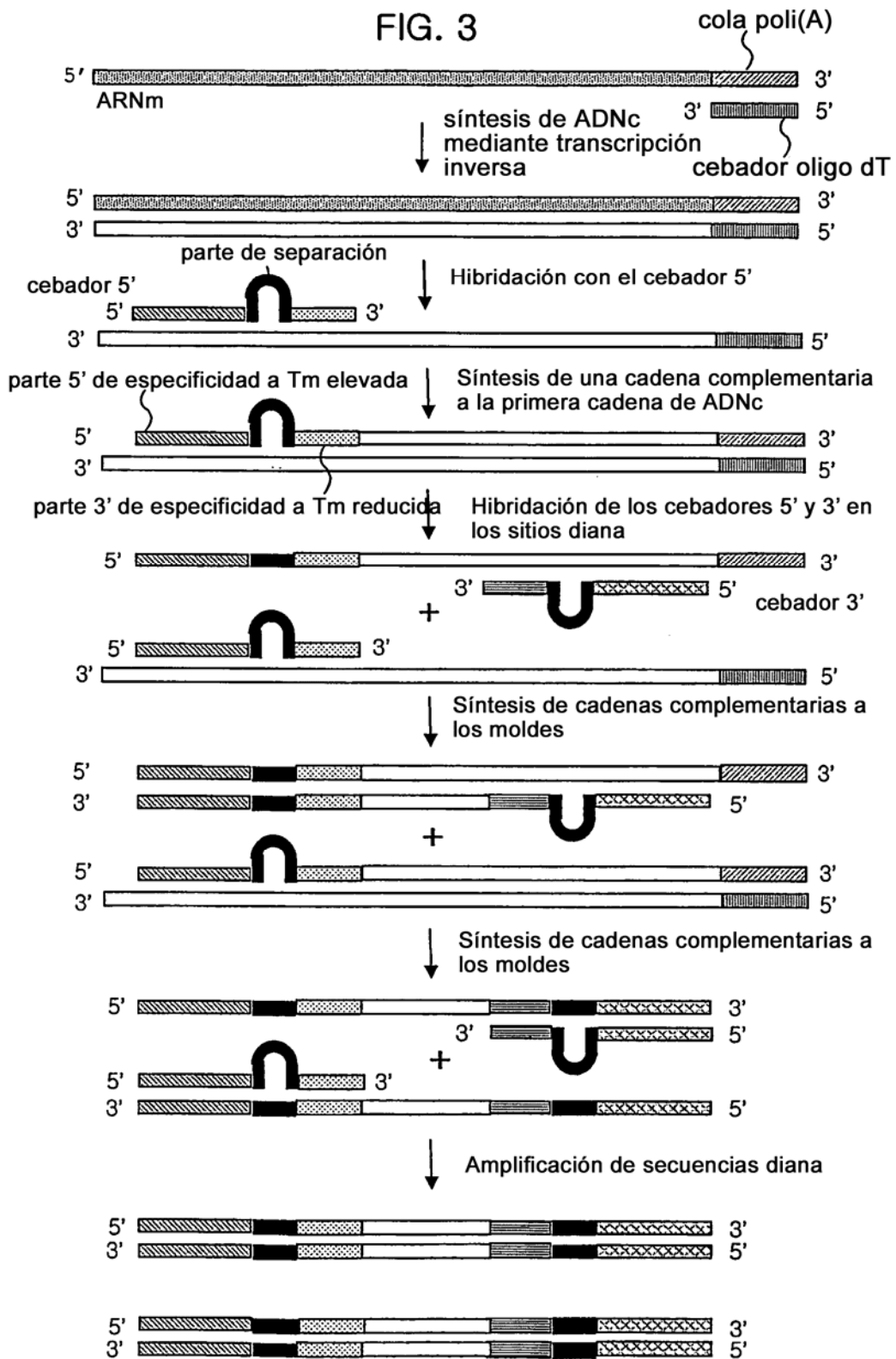
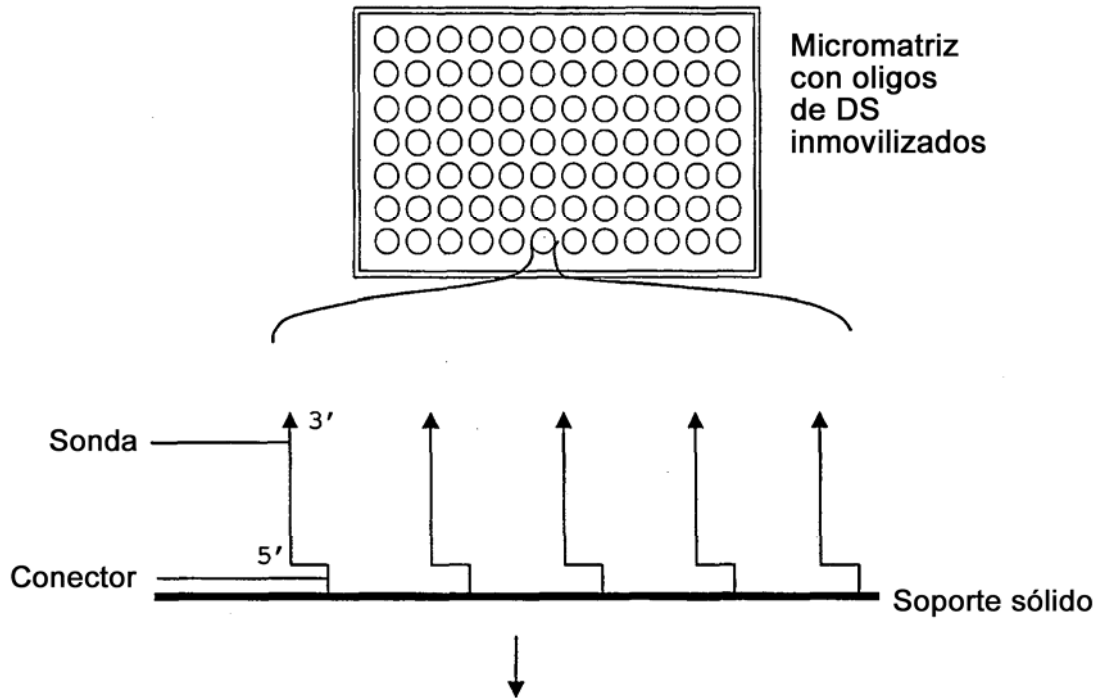


FIG. 4



1º ciclo: los ácidos nucleicos molde se hibridan con las sondas oligonucleótidas diana, seguido de la extensión complementaria

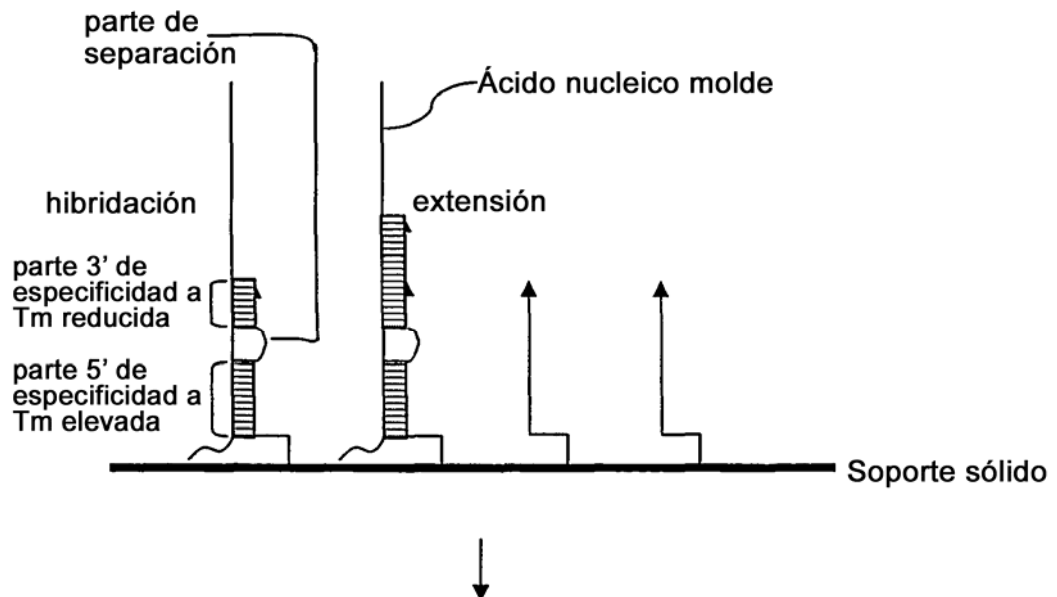
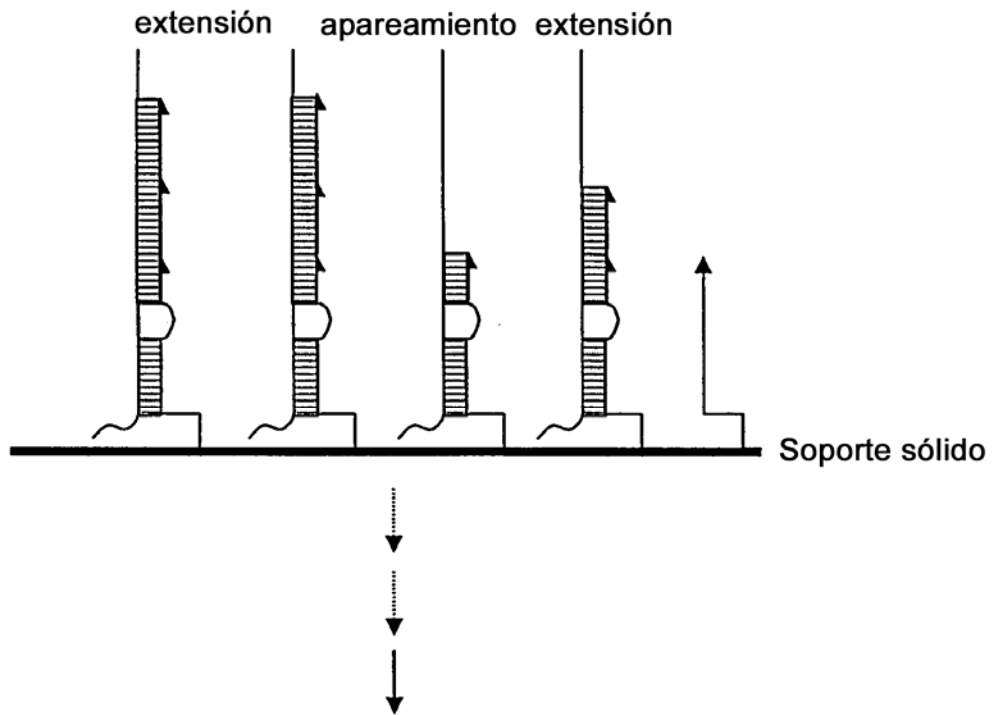


FIG. 4 (continuación)

2º ciclo: las sondas oligonucleótidas diana no hibridadas se hibridan con ácidos nucleicos molde, seguido de la extensión complementaria.



Se repite el ciclo hasta que la totalidad o la mayoría de las sondas oligonucleótidas diana se hayan hibridado con los ácidos nucleicos molde.

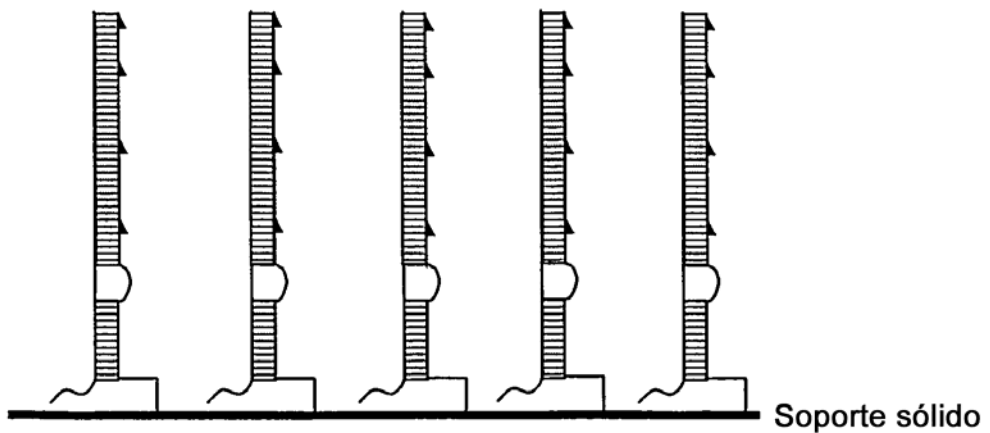


FIG. 5

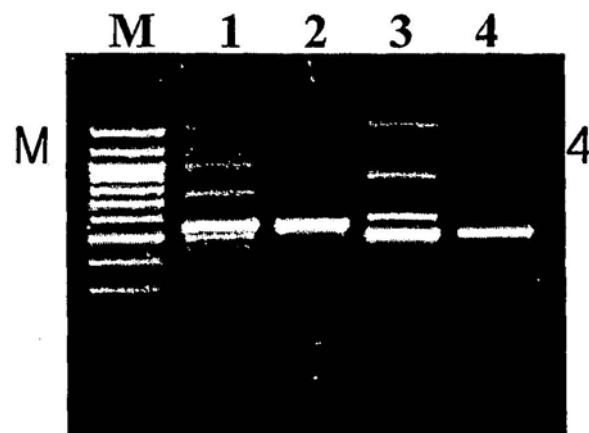


FIG. 6A

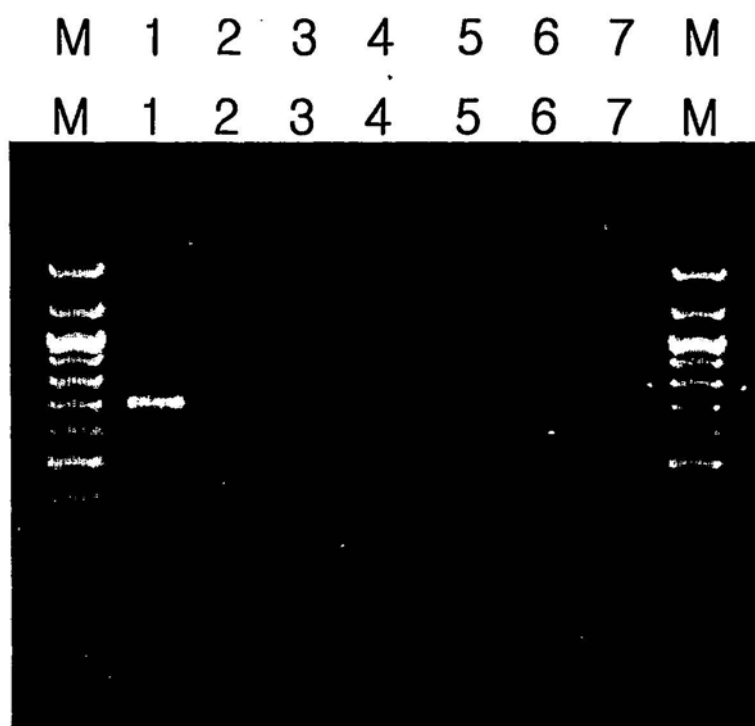


FIG. 6B

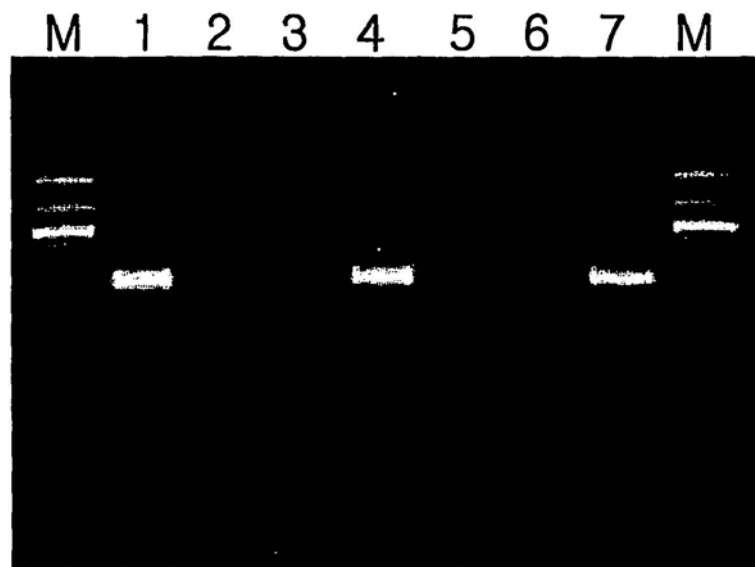


FIG. 7A



FIG. 7B

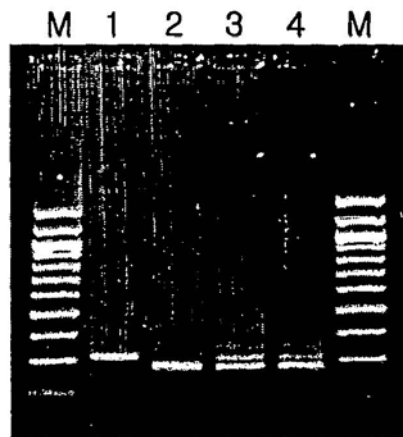


FIG. 8

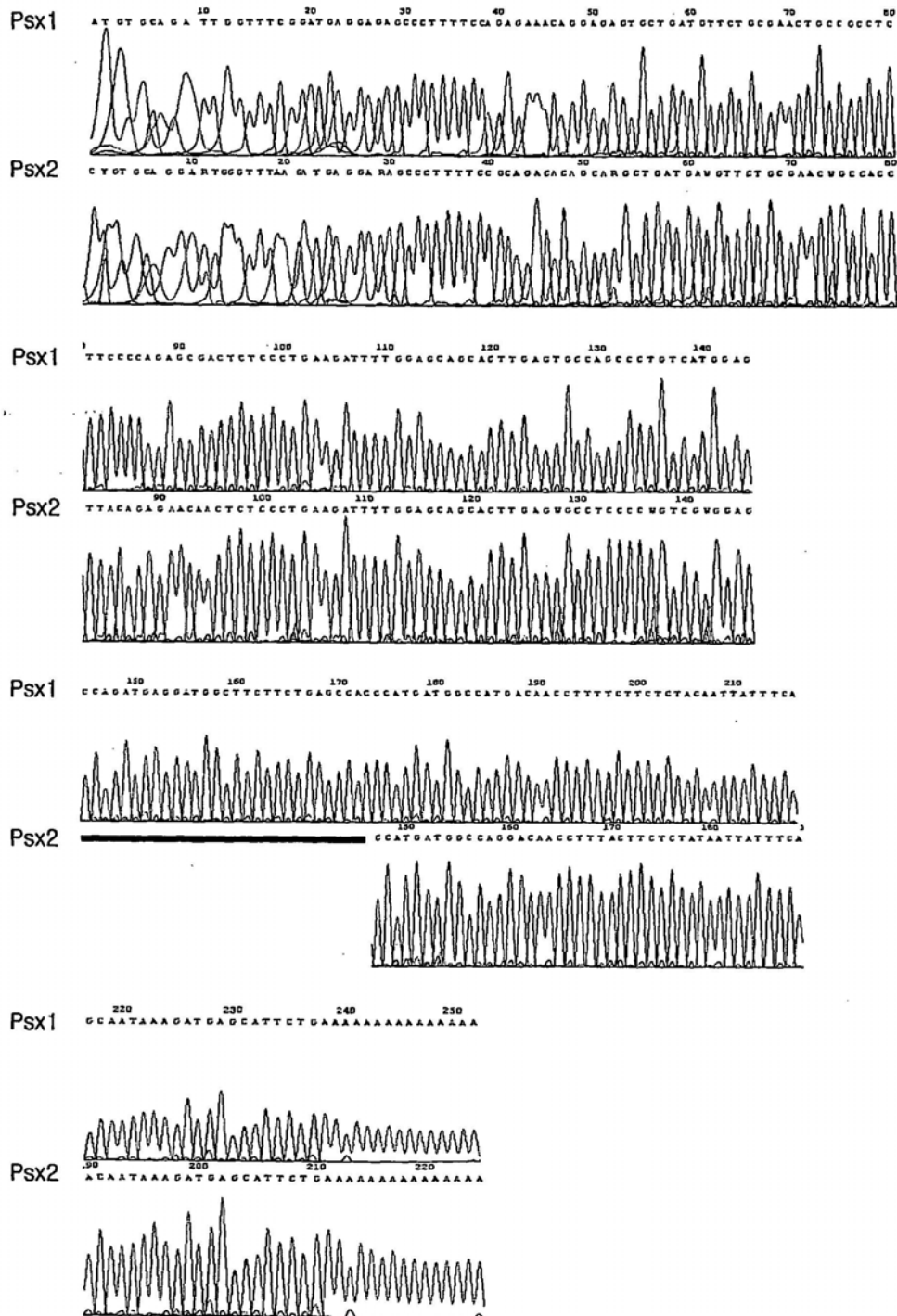


FIG. 9

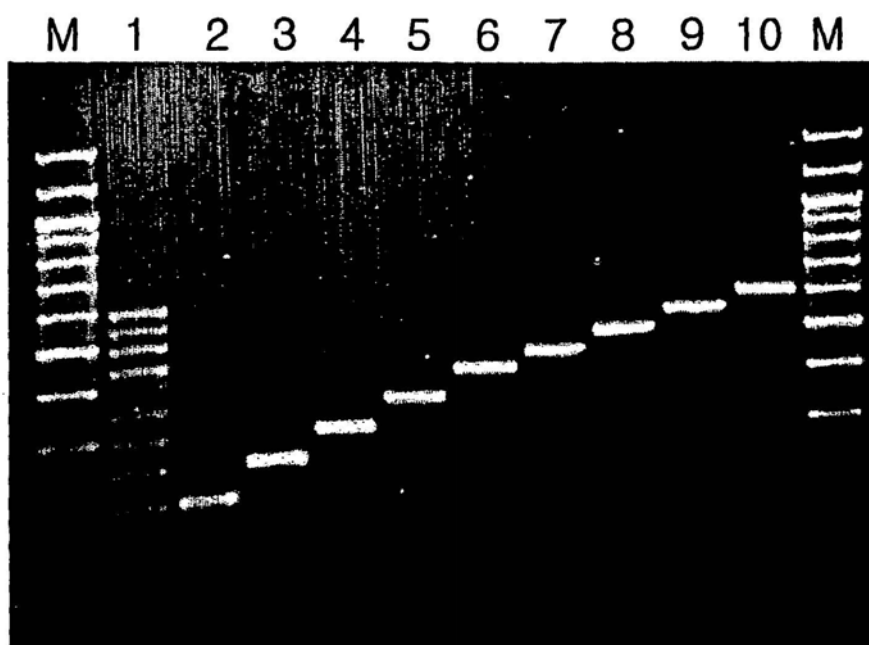


FIG. 10

