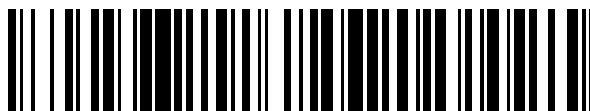


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 464 132**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2001 E 10008007 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2253717**

54 Título: **Procedimiento de amplificación de ácido nucleico utilizando como molde ácido nucleico bicatenario**

30 Prioridad:

**07.04.2000 JP 2000111939**

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

**30.05.2014**

73 Titular/es:

**EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)  
4-19-9, Taito, Taito-ku  
Tokyo 110-8408, JP**

72 Inventor/es:

**NOTOMI, TSUGUNORI y  
NAGAMINE, KENTARO**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**ES 2 464 132 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**

Procedimiento de amplificación de ácido nucleico utilizando como molde ácido nucleico bicatenario

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de sintetización de un ácido nucleico a temperatura constante que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a un ácido nucleico bicatenario molde, de acuerdo con las reivindicaciones.

**Técnica anterior**

10 El procedimiento de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) dependiente de molde para sintetizar ácido nucleico ha sido una gran fuerza impulsora para estudios en el reciente campo de la biociencia. El procedimiento de la PCR permite la amplificación exponencial de un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a un ácido nucleico molde utilizando una pequeña cantidad de molde. El procedimiento de la PCR prevalece ampliamente en la actualidad como una herramienta de clonación o detección de un gen. En el procedimiento de la PCR, para ambos extremos de la secuencia de nucleótidos diana, se utiliza un par de cebadores, que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria. El par de cebadores se diseña de tal manera que un cebador se hibrida con un producto de extensión proporcionado por otro cebador. Prosigue una reacción de síntesis repitiendo una hibridación con el producto de extensión mutuo y una reacción de síntesis de cadena complementaria y así se consigue una amplificación exponencial.

15 En el procedimiento de la PCR, se produce un molde de ácido nucleico monocatenario por algún procedimiento y un cebador se hibrida con el molde. Dado que, como origen de replicación, una ADN polimerasa dependiente de molde requiere un cebador, se considera que la preparación del molde monocatenario es esencial para hibridar el cebador con este en el procedimiento de la PCR. En general, la etapa de convertir un ácido nucleico molde bicatenario en uno monocatenario se denomina desnaturalización. Normalmente la desnaturalización se realiza por calentamiento. Dado que otros componentes de la reacción, necesarios para la síntesis de ácido nucleico, incluyendo la ADN polimerasa, son termorresistentes, las reacciones de desnaturalización y síntesis de cadena complementaria sucesiva puede realizarse combinando todos los componentes de la reacción y calentando a su vez la mezcla de reacción. Sin embargo, los procedimientos convencionales que contienen la etapa de tratamiento térmico tienen los problemas descritos a continuación.

20 En primer lugar, en el procedimiento de la PCR, la desnaturalización del ácido nucleico bicatenario y la hibridación de un cebador deben realizarse en cada ciclo. Para esta finalidad, se requiere un mecanismo específico para el control de la temperatura. Por ejemplo, aunque se ha desarrollado un procedimiento para controlar el aumento de un producto de reacción durante la PCR, el procedimiento no puede realizarse utilizando un equipo analítico convencional y, por lo tanto, es necesario proporcionar un equipo especializado que tenga un mecanismo para el control de la temperatura para realizar el procedimiento de la PCR, así como un mecanismo para el control de la reacción. Por consiguiente, si todas las reacciones para la síntesis de ácido nucleico pudieran realizarse a temperatura constante, la reacción podría controlarse fácilmente utilizando un equipo analítico convencional. Dicho procedimiento conveniente podría simplificar no solo el equipamiento sino también la operación experimental. Sin embargo, actualmente no se conoce ningún principio de reacción para este procedimiento.

25 La especificidad de la reacción de la PCR depende de la especificidad de la hibridación del cebador. Puede esperarse que un cebador se hibride con un ácido nucleico monocatenario con una especificidad adecuada a alta temperatura, cerca del punto de fusión. Cuando la temperatura no es adecuadamente alta, a menudo se produce la hibridación no específica y reacciones de síntesis de cadena complementaria no específica resultantes. Dado que el procedimiento de la PCR viene acompañado por un cambio de temperatura complicado, la mezcla de reacción puede estar posiblemente expuesta a una temperatura a la cual puede producirse una reacción no específica. Esta es una de las causas de las reacciones no específicas asociadas con el procedimiento de la PCR.

30 Se han propuesto diversos procedimientos para resolver el problema de la reacción no específica dependiente de temperatura. Por ejemplo, un procedimiento prácticamente utilizado utiliza un ADN polimerasa que no actúa a una determinada temperatura o inferior. Específicamente, supuestamente se utiliza un inhibidor de ADN polimerasa sensible a temperatura, un anticuerpo contra la ADN polimerasa, o una variante de la ADN polimerasa y similar. Adicionalmente, también se conoce un procedimiento en el que los componentes de la reacción se ponen en compartimentos separados por una división que puede fundirse a alta temperatura, de tal manera que los componentes se mezclan solo después de calentarse a una temperatura adecuada. En todos los casos, dado que el procedimiento de la PCR viene acompañado por un cambio de temperatura complicado, se requiere utilizar un componente especial para prevenir la reacción no específica.

35 También se conocen (Pro. N. A.S., 89, páginas 392-396; 1992, Nucleic Acid, Res., 20, páginas 1691-1696; 1992) procedimientos de amplificación de ADN que tienen una secuencia complementaria con una secuencia diana utilizando la secuencia diana como un molde, tal como el procedimiento de Amplificación con Desplazamiento de Cadena (SDA, *Strand Displacement Amplification*). En el procedimiento SDA, sintetiza una cadena complementaria se sintetiza utilizando, como origen de síntesis un cebador complementario al lado 3' de una secuencia de

nucleótidos determinada, una sola ADN polimerasa permite la síntesis de una cadena complementaria que desplaza la región bicatenaria al lado 5'. Cuando en lo sucesivo en el presente documento se refiera "lado 5'" o "lado 3'", las expresiones significan la dirección de una cadena molde. Este procedimiento se denomina amplificación con desplazamiento de cadena porque la parte bicatenaria del lado 5' se desplaza con una cadena complementaria que se ha sintetizado recientemente.

En el procedimiento SDA, la etapa de cambiar la temperatura, que es esencial para el procedimiento PCR, puede omitirse insertando una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción en una secuencia con la que se hibrida un cebador. Concretamente, un corte enzimático proporcionado por la enzima de restricción da un grupo 3'-OH que se convierte en el origen de la síntesis de cadena complementaria. El desplazamiento de cadena y la síntesis de cadena complementaria se realizan desde el origen y la cadena complementaria sintetizada se disocia como una cadena sencilla y se utiliza como molde en la síntesis de cadena complementaria posterior. Por lo tanto, el procedimiento SDA no requiere un control de temperatura complicado que es esencial para el procedimiento de la PCR.

Aunque en el procedimiento SDA no es necesario el control de la temperatura, el tratamiento térmico es aún necesario para preparar la cadena sencilla necesaria para la hibridación del cebador cuando como molde se utiliza ácido nucleico bicatenario. Además, este procedimiento requiere tanto una enzima de restricción, que proporciona un corte enzimático, como una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena. La necesidad de una enzima adicional conduce a un incremento del coste. Además, para introducir un corte enzimático y no escindir la cadena doble (es decir, escindir solo una cadena), debe utilizarse un derivado de dNTP, tal como  $\alpha$ -tio dNTP, como un sustrato para la síntesis de tal manera que una de las cadenas doble es resistente a la digestión enzimática. Por consiguiente, un producto amplificado obtenido por SDA tiene una configuración diferente a la del ácido nucleico natural. Por tanto, la escisión con enzimas de restricción y el uso de un producto amplificado en la clonación de genes están limitados. El uso del derivado de dNTP también ocasiona un incremento del coste.

Como un procedimiento para amplificar el ácido nucleico sin un control de temperatura complicado, se conoce la Amplificación basada en la Secuencia de Ácidos Nucleicos (NASBA, *Nucleic Acid Sequence-based Amplification*), también denominada TMA/Procedimiento de Amplificación Mediada por Transcripción. NASBA es un sistema de reacción en el que la síntesis de ADN se realiza utilizando ADN polimerasa, un ARN diana como molde, y una sonda en la que se ha añadido el promotor de T7. El ADN sintetizado se hace bicatenario utilizando una segunda sonda, y la transcripción se realiza utilizando la ARN polimerasa de T7. El ADN bicatenario obtenido se utiliza como molde, amplificando por tanto una gran cantidad de ARN (Nature, 350, páginas 91-92, 1991). La transcripción utilizando ARN polimerasa de T7 en NASBA se lleva a cabo isotérmicamente. Sin embargo, NASBA requiere, como molde, ARN y por tanto no puede aplicarse al ácido nucleico bicatenario. Si el ácido nucleico bicatenario se hace monocatenario, esta reacción puede realizarse, sin embargo, en este caso, se necesita un control de temperatura complicado similar al de la PCR. Además, es esencial un uso combinado de varias enzimas, tales como, enzima de transcripción inversa, RNasaH, ADN polimerasa y ARN polimerasa de T7, lo que, al igual que ocurre en la SDA, resulta económicamente desventajoso. Por tanto, los procedimientos conocidos de reacción de amplificación de ácidos nucleicos tienen el problema de necesitar un control de temperatura complicado o la necesidad de utilizar varias enzimas.

Para resolver el problema del control de la temperatura en los procedimientos conocidos de síntesis de ácidos nucleicos, se ha sintetizado una cadena complementaria en una condición específica, utilizando un cebador como origen para la síntesis (Traducción Japonesa Publicada de Publicación Internacional N° Hel 11-509406; WO97/00330). El procedimiento reconoce el hecho de que la hibridación de ácidos nucleicos que tienen secuencias de nucleótidos complementarias se produce en un estado de equilibrio dinámico (cinético). En este procedimiento de la técnica anterior, se creía que la reacción de la síntesis de cadena complementaria, utilizando un cebador como origen para la síntesis, puede producirse con una determinada probabilidad, incluso a una temperatura que produce la desnaturalización completa o por debajo. El término "desnaturalización completa" como se utiliza en el presente documento significa una condición en la que la mayor parte del ácido nucleico molde bicatenario se convierte en monocatenario.

En esta memoria, cuando un cebador y una ADN polimerasa con actividad de desplazamiento de cadena se combinan con el ácido nucleico molde bicatenario y la temperatura se eleva, la síntesis de la cadena complementaria se observó a una temperatura que no produjo la desnaturalización del ácido nucleico molde. Sin embargo, la eficacia de la reacción de la síntesis de cadena complementaria sin ciclado térmico es notablemente inferior a la obtenida en el procedimiento de la PCR con ciclado térmico. De hecho, los autores de la presente invención realizaron un ensayo complementario y confirmaron que la reacción se producía realmente, pero la cantidad del producto de reacción obtenida por este procedimiento no alcanzaba un nivel utilizable de un procedimiento práctico de síntesis de ácidos nucleicos.

Como se ha descrito anteriormente, aún no se ha descrito ninguna reacción de síntesis de ácidos nucleicos sin control de la temperatura y deterioro de la especificidad y eficacia de la reacción.

**Divulgación de la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de síntesis de ácidos nucleicos utilizando, como molde, ácido nucleico bicatenario, en el que el procedimiento no requiere cambio de temperatura y no produce deterioro de la eficacia de la síntesis, operatividad, especificidad o similar. Más específicamente, es un objeto de la presente invención proporcionar un nuevo procedimiento de síntesis de ácidos nucleicos en el que la reacción se realiza incubando, a una temperatura constante, ácido nucleico bicatenario como molde junto con componentes de la reacción, tal como un cebador y una ADN polimerasa. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para amplificar eficazmente ácido nucleico utilizando el procedimiento de síntesis.

Para realizar la síntesis de cadena complementaria utilizando, como molde, ácido nucleico bicatenario, sin ciclado térmico, los autores de la presente invención estudiaron si la reacción de síntesis de cadena complementaria utilizando un cebador como origen para la síntesis podría realizarse en una condición de temperatura constante. El procedimiento de síntesis de cadena complementaria conocido, basado en el equilibrio dinámico entre un ácido nucleico bicatenario y un cebador (Traducción Japonesa Publicada de la Publicación Internacional N° Hei 11-509406; WO97/00330), no requiere el cambio de temperatura. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, utilizando este procedimiento es difícil conseguir una eficacia de síntesis prácticamente utilizable. Por lo tanto, los autores de la presente invención combinaron este procedimiento con la reacción isotérmica de síntesis de ácido nucleico para realizar eficazmente una síntesis de cadena complementaria basada en el equilibrio dinámico sin deteriorar la especificidad. Como resultado, los autores de la presente invención descubrieron que podía obtenerse un alto nivel de eficacia de amplificación que no podía conseguirse mediante procedimientos conocidos, y llevaron a cabo la presente invención. Concretamente, la presente invención se refiere al siguiente procedimiento de síntesis de ácidos nucleicos y al procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos basado en ello.

[1] Un procedimiento de sintetización de ácido nucleico utilizando, como molde, ácido nucleico bicatenario, en el que el procedimiento comprende:

a) incubar un molde de ácido nucleico bicatenario y un cebador arbitrario en presencia de una ADN polimerasa que cataliza una reacción de síntesis de cadena complementaria acompañada de desplazamiento de cadena, en una condición que garantice la síntesis de cadena complementaria utilizando, como origen, el cebador arbitrario, de tal manera que una región del ácido nucleico molde diana a hibridar mediante un cebador capaz de amplificar el ácido nucleico molde a una temperatura constante se coloque en una condición que permita que la región experimente emparejamiento de bases;

b) hibridar un cebador que pueda amplificar el ácido nucleico molde a una temperatura constante, con la región obtenida en la etapa a), que se coloca en una condición de tal manera que pueda experimentar emparejamiento de bases; y

c) realizar la síntesis de cadena complementaria utilizando el cebador como un origen de síntesis.

[2] El procedimiento de acuerdo con [1], en el que la etapa a) se realiza en presencia de un regulador de temperatura de fusión.

[3] El procedimiento de acuerdo con [2], en el que el regulador de temperatura de fusión es al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en betaína, prolina, dimetil sulfóxido y trimetilamina-N-óxido.

[4] Un procedimiento de sintetización de un ácido nucleico, en el que diversos nucleótidos que constituyen una región específica de un molde de ácido nucleico bicatenario que está constituido por secuencias de nucleótidos complementarias, están conectados en una cadena sencilla, en el que el procedimiento comprende:

a) incubar un molde de ácido nucleico bicatenario y un cebador arbitrario en presencia de una ADN polimerasa que cataliza una reacción de síntesis de cadena complementaria acompañada de desplazamiento de cadena, en una condición que garantice la síntesis de la cadena complementaria utilizando, como origen, el cebador arbitrario, de tal manera que una región del ácido nucleico molde diana a hibridar mediante un segundo cebador, se coloque en una condición que permita que la región experimente emparejamiento de bases;

b) hibridar el segundo cebador con la región obtenida en la etapa a), que se coloca en una condición de tal manera que pueda experimentar emparejamiento de bases y realizar la síntesis de cadena complementaria utilizando, como origen, el segundo cebador, en el que el extremo 3' del segundo cebador se hibrida con una región que define el lado 3' de una de las cadenas que constituye la región específica y el extremo 5' del segundo cebador comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria de un producto de reacción de síntesis de cadena complementaria obtenido utilizando, como origen, el cebador;

c) colocar una región del producto extendido del segundo cebador sintetizado en la etapa b), con el que se hibridará un primer cebador, en una condición de tal manera que la región pueda experimentar emparejamiento de bases, en el que el extremo 3' del primer cebador se hibrida con una región que define el lado 3' de dicha región en el producto extendido obtenido utilizando, como origen, el segundo cebador;

d) hibridar el primer cebador con la región obtenida en la etapa c), que se coloca en una condición de tal manera que pueda experimentar emparejamiento de bases y realizar la síntesis de cadena complementaria utilizando, como origen, el primer cebador; y

5 e) dejar que se produzca la autohibridación en el extremo 3' del producto extendido del primer cebador sintetizado en la etapa d) y realizar la síntesis de cadena complementaria utilizando, como molde, el propio producto extendido y obtener un ácido nucleico en el que diversos los nucleótidos, que constituyen la región específica están conectados en una cadena sencilla.

[5] El procedimiento de acuerdo con [4], en el que el cebador arbitrario en la etapa a) es un primer cebador.

10 [6] El procedimiento de acuerdo con [4], en el que la etapa c) se realiza por desplazamiento de acuerdo con una reacción de síntesis de cadena complementaria utilizando, como origen, un cuarto cebador que se hibrida con el lado 3' de la región del molde hibridado por el segundo cebador.

15 [7] El procedimiento de acuerdo con [4], en el que la etapa e) comprende adicionalmente una etapa de convertir el producto extendido del primer cebador en una cadena sencilla por desplazamiento de acuerdo con una reacción de síntesis de cadena complementaria utilizando, como origen, un tercer cebador que se hibrida con el lado 3' de la región del molde hibridado por el primer cebador.

[8] El procedimiento de acuerdo con [4], en el que el extremo 5' del primer cebador comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria del producto de reacción de síntesis de cadena complementaria obtenido utilizando, como origen, el primer cebador.

20 [9] Un procedimiento para amplificar ácido nucleico, en el que diversos nucleótidos, que constituyen una región específica de un molde de ácido nucleico bicatenario que está constituido por secuencias de nucleótidos complementarias, están conectados en una cadena sencilla, en el que el procedimiento comprende:

1) dejar que se produzca la autohibridación en el extremo 3' del producto extendido del primer cebador producido mediante el procedimiento de acuerdo con [7] y realizar la reacción de síntesis de cadena complementaria utilizando, como origen, el producto extendido;

25 2) hibridar el segundo cebador o el primer cebador con una región bucle que se forma por autohibridación del extremo 3' y realizar la síntesis de cadena complementaria utilizando, como origen, el cebador;

3) dejar que se produzca el desplazamiento de cadena del producto extendido del extremo 3' mediante la reacción de síntesis de cadena complementaria de la etapa 2) de tal manera que el extremo 3' pueda experimentar emparejamiento de bases;

30 4) realizar la reacción de síntesis de cadena complementaria utilizando, como molde, la propia cadena desplazada obtenida en la etapa 3), que puede experimentar emparejamiento de bases y utilizar su extremo 3' como origen para desplazar una cadena complementaria sintetizada en la etapa 2) utilizando, como origen, la región bucle, produciendo de esta manera un ácido nucleico monocatenario; y

5) repetir las etapas 2) a 4) para amplificar el ácido nucleico deseado.

35 [10] El procedimiento de acuerdo con [9], en el que el procedimiento comprende adicionalmente:

6) realizar la reacción de síntesis de cadena complementaria por autohibridación del extremo 3' del ácido nucleico monocatenario producido en la etapa 4);

7) hibridar el segundo cebador o el primer cebador con una región bucle que está formada por autohibridación del extremo 3' y realizar la síntesis de cadena complementaria utilizando, como origen, el cebador;

40 8) dejar que se produzca el desplazamiento de cadena del producto extendido del extremo 3' mediante la reacción de síntesis de cadena complementaria de la etapa 7), de tal manera que el extremo 3' pueda experimentar emparejamiento de bases;

45 9) realizar la reacción de síntesis de cadena complementaria utilizando, como molde, la propia cadena desplazada obtenida en la etapa 8), que puede experimentar emparejamiento de bases y utilizar este extremo 3' como origen para desplazar una cadena complementaria sintetizada en la etapa 7) utilizando, como origen, la región bucle, produciendo de esta manera un ácido nucleico monocatenario; y

10) repetir las etapas 7) a 9) para amplificar el ácido nucleico deseado.

50 [11] Un procedimiento para detectar una secuencia de nucleótidos diana en una muestra, comprendiendo el procedimiento realizar el procedimiento de amplificación de acuerdo con [10] y observar si se ha generado o no el producto reacción de amplificación.

[12] Un procedimiento de acuerdo con [11], en el que el procedimiento de acuerdo con [10] se realiza en presencia de un agente de detección de ácido nucleico, que adicionalmente comprende determinar si el producto de reacción de amplificación se ha generado o no, basándose en el cambio de señal del agente de detección.

[13] Un procedimiento para detectar mutación por el procedimiento de detección de acuerdo con [11], en el que la mutación en una secuencia de nucleótidos a amplificar impide la síntesis de cadena complementaria, al menos en un extremo 3' que es el origen de la síntesis de cadena complementaria que constituye el procedimiento de amplificación.

[14] Un procedimiento para amplificar un ácido nucleico en el que diversos nucleótidos, que constituyen una región específica de un ácido nucleico bicatenario molde que está constituido por secuencias de nucleótidos complementarias, están conectados en una cadena sencilla, en el que el procedimiento comprende una etapa de incubar los siguientes elementos:

- una diana que comprende un ácido nucleico bicatenario que comprende una región específica a amplificar;
- una ADN polimerasa que cataliza la reacción de síntesis de cadena complementaria acompañada de desplazamiento de cadena;

- un primer cebador, cuyo extremo 3' se hibrida con una región que define el lado 3' de una de las cadenas que constituye la región específica y cuyo extremo 5' comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria de un producto reacción de síntesis de cadena complementaria obtenido el cebador como origen de síntesis;

- un segundo cebador, cuyo extremo 3' se hibrida con una región que define el lado 3' de una de las cadenas que constituye la región específica y cuyo extremo 5' comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria de un producto de reacción de síntesis de cadena complementaria obtenido utilizando el cebador como un origen de síntesis; y

- un sustrato de nucleótido; en una condición que permita la síntesis de cadena complementaria utilizando como origen el primer cebador.

[15] El procedimiento de acuerdo con [14], en el que los elementos comprenden adicionalmente:

- un tercer cebador que se convierte en un origen de la reacción de síntesis de cadena complementaria, utilizando, como origen, el lado 3' de la región en el molde a hibridar por el primer cebador; y

- un cuarto cebador que se convierte en un origen de la reacción de síntesis de cadena complementaria, utilizando, como origen, el lado 3' de la región en el molde a hibridar por el segundo cebador.

[16] El procedimiento de acuerdo con [14], en el que la incubación se realiza en presencia de un regulador de temperatura de fusión.

[17] El procedimiento de acuerdo con [16], en el que el regulador de temperatura de fusión es al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en betaína, prolina, dimetil sulfóxido y trimetilamina-N-óxido.

[18] Un procedimiento para colocar una región de un ácido nucleico molde diana a hibridar por un cebador que inicia una reacción de amplificación de un ácido nucleico molde a una temperatura constante, en una condición de tal manera que la región puede experimentar emparejamiento de bases, en el que el procedimiento comprende la etapa de incubar un ácido nucleico bicatenario molde, un cebador arbitrario, y un cebador capaz de amplificar el ácido nucleico molde a una temperatura constante, en presencia de ADN polimerasa, que cataliza una síntesis de cadena complementaria acompañada de desplazamiento de cadena, en una condición que garantiza la síntesis de cadena complementaria, utilizando como origen el cebador arbitrario.

En la presente invención, se utiliza un cebador capaz de amplificar un molde de ácido nucleico a una temperatura constante. Un cebador capaz de amplificar un molde de ácido nucleico a una temperatura constante significa un cebador utilizado para un procedimiento para amplificar ácido nucleico sin ciclado térmico, utilizando como molde un ácido nucleico que tiene una región que va a hibridarse por el cebador, que puede experimentar emparejamiento de bases. En concreto, el cebador de la presente invención es uno que se utiliza en una reacción de amplificación de un ácido nucleico sin ciclado térmico. El cebador de la presente invención no está específicamente limitado, siempre que este sea un cebador que permita la amplificación isotérmica de ácido nucleico. Por consiguiente, independientemente de que se pueda utilizarse para una reacción que requiera ciclado térmico, cualquier cebador que permita la amplificación isotérmica de ácido nucleico se incluye en el cebador de la presente invención. Como se ha descrito anteriormente, supuestamente la amplificación se ha realizado a una temperatura constante utilizando los cebadores para PCR. Sin embargo, dado que el procedimiento no puede conseguir la amplificación a un nivel práctico, no puede decirse que el cebador para la PCR sea un cebador que permite la amplificación isotérmica de ácido nucleico. En particular, la amplificación de un ácido nucleico molde puede realizarse utilizando un

procedimiento que puede realizar la síntesis de cadena complementaria continua que no requiera ciclado térmico. Los cebadores utilizados para dicho procedimiento son deseables como cebadores de la presente invención.

En una realización preferida, el procedimiento de amplificación de ácido nucleico utiliza un principio de reacción (procedimiento LAMP) que repite la reacción de síntesis de cadena complementaria por autohibridación de la región 3' terminal que, como se describe más adelante, se utiliza como un molde por sí mismo. Adicionalmente, puede utilizarse el procedimiento SDA que es una reacción de amplificación de ácido nucleico. En la presente invención, la frase "una región que puede experimentar emparejamiento de bases" significa una reacción que no está acompañada por una cadena complementaria. Por consiguiente, esto incluye no solo un ácido nucleico monocatenario que se produce por desnaturalización de un ácido nucleico bicatenario, sino también un ácido nucleico monocatenario contenido en un ácido nucleico bicatenario que tiene partes parcialmente monocatenarias.

Adicionalmente, en la presente invención, el ácido nucleico puede ser ADN, ARN o una molécula quimérica de los mismos. El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico natural o un ácido nucleico sintetizado artificialmente. Además, en el ácido nucleico de la presente invención, puede incluirse un derivado de nucleótido que tenga una configuración artificial parcial o totalmente completa, siempre que pueda experimentar emparejamiento de bases. Un ejemplo de dicha molécula es, por ejemplo, un derivado de polinucleótido en el que se forma una estructura por enlaces fosfotioato. El número de nucleótidos que constituye el ácido nucleico utilizado en la presente invención no está limitado. En el presente documento, la expresión ácido nucleico tiene el mismo significado que el término polinucleótido. Por otro lado, el término oligonucleótido utilizado en el presente documento significa un polinucleótido particular que tiene un número menor de nucleótidos constituyentes. En general, un oligonucleótido significa un polinucleótido que tiene de 2 a 100 y más normalmente de 2 a 50 nucleótidos, pero no está limitado por estos números.

Como se utiliza en el presente documento, una secuencia de nucleótidos diana significa una secuencia de nucleótidos del ácido nucleico a sintetizar. Concretamente, una secuencia de nucleótidos que constituye el ácido nucleico a sintetizar en la presente invención es la secuencia de nucleótidos diana. Además, cuando la amplificación del ácido nucleico se realiza basándose en el procedimiento de síntesis de ácido nucleico de la presente invención, una secuencia de nucleótidos que constituye el ácido nucleico a amplificar es la secuencia de nucleótidos diana. En general, la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico se describe desde el lado 5' hacia el lado 3' de la cadena en sentido. La secuencia de nucleótidos diana de la presente invención no solo incluye la secuencia en sentido sino también la secuencia de nucleótidos de su cadena complementaria, es decir, la cadena antisentido. Más específicamente, la expresión "secuencia de nucleótidos diana" se refiere a al menos la secuencia de nucleótidos a sintetizar o a su cadena complementaria.

El procedimiento de síntesis de ácido nucleico de la presente invención utiliza, como molde, un ácido nucleico bicatenario. En el contexto de la presente invención, el ácido nucleico bicatenario es un ácido nucleico en forma de cadenas complementarias hibridadas, al menos en una región que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a un cebador que se utiliza como un origen de síntesis de la síntesis de cadena complementaria. Por consiguiente, una secuencia de nucleótidos diana que no es bicatenaria se incluye en parte en el ácido nucleico bicatenario utilizado en la presente invención. Además, el ácido nucleico bicatenario utilizado en la presente invención puede ser no solo un dímero, sino también un producto de hibridación de dos o más ácidos nucleicos monocatenarios, siempre que cumpla la condición mencionada anteriormente. Además, este puede ser un bucle en horquilla constituido por un polinucleótido monocatenario que contenga una secuencia de nucleótidos complementaria en la molécula. El ácido nucleico bicatenario a utilizar en la presente invención incluye, por ejemplo, ADNc, ADN genómico e híbridos de ADN-ARN. Además, como ácido nucleico bicatenario utilizado en la presente invención, también pueden utilizarse diversos vectores en los que estos ADN se han insertado. El ácido nucleico bicatenario utilizado en la presente invención puede ser ácido nucleico purificado o natural. Además, el procedimiento de la presente invención también puede aplicarse a ácidos nucleicos en células (*in situ*). Puede realizarse análisis genómico *in situ* utilizando como molde un ácido nucleico bicatenario en células.

Cuando en la presente invención se utiliza como molde un ADNc, la síntesis de ADNc puede realizarse en las mismas condiciones que para la síntesis de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Cuando se sintetiza una primera cadena de ADNc utilizando como molde ARN, se forma un ácido nucleico bicatenario en forma de híbrido de ADN-ARN. Utilizando como molde el ácido nucleico bicatenario obtenido de esta manera, puede realizarse el procedimiento para sintetizar ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención. Cuando la ADN polimerasa utilizada en el procedimiento de síntesis de ácido nucleico de la presente invención tiene una actividad de transcriptasa inversa, la síntesis de ácido nucleico puede realizarse utilizando esta como una enzima sencilla en las mismas condiciones. Por ejemplo, la ADN polimerasa Bca es una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena así como actividad de transcriptasa inversa. Se entiende que, el procedimiento para sintetizar ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención también puede utilizarse después de la formación de ADNc bicatenario completo por la síntesis de segunda cadena.

La polimerasa que cataliza la reacción de síntesis de cadena complementaria acompañada de desplazamiento de cadena se emplea en la síntesis de ácido nucleico de la presente invención. La reacción de síntesis de cadena complementaria acompañada de desplazamiento de cadena utilizada en el presente documento se refiere a la siguiente reacción. En concreto, una reacción en la que cuando el molde para la reacción de síntesis de cadena

complementaria, utilizando un cebador como origen de síntesis, se hibrida con otro polinucleótido y en forma de una cadena doble, la síntesis de cadena complementaria prosigue separando al mismo tiempo el polinucleótido del molde, se denomina reacción de síntesis de cadena complementaria con desplazamiento de cadena. En este momento, los enlaces fosfodiéster en el polinucleótido separado se mantienen normalmente. Por consiguiente, el polinucleótido así formado tiene una longitud correspondiente a la de la cadena complementaria sintetizada y puede experimentar emparejamiento de bases.

Como una polimerasa que cataliza la síntesis de cadena complementaria con desplazamiento de cadena puede utilizarse el mismo tipo de ADN polimerasas que las utilizadas para la SDA y similares. Las polimerasas únicas conocidas sintetizan cadenas complementarias desplazando, si existe una región bicatenaria en el lado 5' del molde, la región bicatenaria utilizando como origen de síntesis un cebador complementario a una región del lado 3' de una determinada secuencia de nucleótidos. De acuerdo con la presente invención, también se utiliza un sustrato necesario para la síntesis de cadena complementaria.

En la presente invención, un cebador arbitrario se mezcla con el ácido nucleico bicatenario y la mezcla se incuba en condiciones que garanticen la síntesis de la cadena complementaria utilizando como origen el cebador. El cebador arbitrario de la presente invención permite que la región con la cual se hibridará un cebador para la reacción de amplificación del ácido nucleico a temperatura constante, esté listo para el emparejamiento de bases. Por tanto, el cebador arbitrario debe ser capaz de iniciar la síntesis de cadena complementaria, utilizando como molde la cadena complementaria de la cadena de nucleótidos, con la cual se hibrida un cebador para la reacción de amplificación, del ácido nucleico bicatenario molde. Además, la extensión de cadena en la síntesis de cadena complementaria, utilizando el cebador arbitrario de la presente invención como origen de síntesis, debe proseguir hacia la región con la cual se hibrida un cebador para la reacción de amplificación. En otras palabras, el cebador puede proporcionar el origen de síntesis en una parte arbitraria de la región, cuya región sirve como el molde en una síntesis de cadena complementaria utilizando, como origen, el cebador para la reacción de amplificación. El cebador arbitrario puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria a regiones arbitrarias, siempre que cumpla el criterio anterior. Por ejemplo, como cebador arbitrario también puede utilizarse un cebador del conjunto de cebadores para la reacción de amplificación. El uso del cebador es uno de las realizaciones preferidas de la presente invención, debido al número reducido de componentes de reacción necesarios.

El emparejamiento de bases con cebador para la reacción de amplificación puede garantizarse por desplazamiento de una de las dos cadenas del ácido nucleico bicatenario en la síntesis de cadena complementaria utilizando como origen el cebador arbitrario. Seleccionando dichos parámetros, la reacción de síntesis puede proseguir sin cambiar la temperatura, que es una de las excelentes características de la presente invención. Las condiciones que permiten que se realice la reacción de síntesis de cadena complementaria por un cebador arbitrario utilizando como molde un ácido nucleico bicatenario son prácticamente iguales a las necesarias para que se realice lo indicado a continuación:

- i) proporcionar el origen de síntesis mediante un cebador arbitrario a un ácido nucleico bicatenario molde; y
- ii) continuar con la reacción de síntesis de cadena complementaria utilizando el origen de síntesis.

Se creía que un cebador solo podía proporcionar un origen de síntesis a una cadena de ácido nucleico si la región con la cual se hibridaba el cebador era monocatenaria. Por tanto, previamente, cuando como molde se usó un ácido nucleico bicatenario, el ácido nucleico se sometía a desnaturalización, una etapa que convertía el ácido nucleico en cadenas sencillas antes de la hibridación con el cebador. Sin embargo, puede proporcionarse un origen de síntesis incubando un molde con un cebador en una condición mediante la cual la cadena doble se desestabiliza por un medio determinado aunque no se convierte completamente en cadenas sencillas. Un ejemplo de dicha condición de desestabilización de cadena doble implica el calentamiento del ácido nucleico bicatenario casi a la temperatura de fusión (en lo sucesivo en el presente documento indicado con la abreviatura  $T_m$ ). Como alternativa, la adición de un regulador de  $T_m$  también es eficaz.

La reacción, que comprende una serie de etapas, se realiza en presencia de tampón, que proporciona un pH adecuado para la reacción enzimática, así como sales necesarias para la hibridación del cebador y mantiene la actividad catalítica de la enzima, conservantes para la enzima y además, si fuera necesario, un regulador de temperatura de fusión ( $T_m$ ) y etc. En la presente invención se utiliza un tampón con una acción tamponante en un intervalo de pH neutro a alcalino débil, tal como Tris-HCl. El pH se ajusta dependiendo del tipo de ADN polimerasa utilizada. Como ejemplos de sales a añadir para mantener la actividad enzimática y para modificar la temperatura de fusión ( $T_m$ ) del ácido nucleico se incluyen KCl, NaCl,  $(NH_4)_2SO_4$ , etc. Como conservantes enzimáticos se incluyen albúmina de suero bovino y azúcares.

Adicionalmente, los reguladores de temperatura de fusión ( $T_m$ ) típicos incluyen betaína, prolina, dimetilsulfóxido (en lo sucesivo en el presente documento DMSO), formamida y trimetilamina-N-óxido (TMANO). Cuando se utiliza un regulador de temperatura de fusión ( $T_m$ ), la hibridación del oligonucleótido mencionado anteriormente puede regularse dentro de un intervalo de temperatura limitado. Además, la betaína (N,N,N-trimetilglicina) y las sales de tetraalquilamonio contribuyen eficazmente a mejorar la eficiencia del desplazamiento de cadena debido a su acción isoestabilizante. Se espera que, la adición de betaína, a una concentración de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 3,0 M, preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 M, a la solución de



reacción, mejore la amplificación de los ácidos nucleicos de la presente invención. Dado que estos reguladores de temperatura de fusión disminuyen la temperatura de fusión, dada la rigurosidad y reactividad deseadas, se selecciona empíricamente una condición, considerando las condiciones de reacción, tales como concentración salina y temperatura de reacción.

5 Las condiciones de temperatura adecuadas para las reacciones enzimáticas pueden seleccionarse fácilmente utilizando un regulador de T<sub>m</sub>. La T<sub>m</sub> varía, dependiendo de la relación del cebador y de la secuencia de nucleótidos diana. Por tanto, es preferible ajustar la cantidad de un regulador de T<sub>m</sub> de tal manera que las condiciones que mantienen la actividad enzimática sean coherentes con las condiciones de incubación que cumplen el criterio de la presente invención. Basándose en la descripción de la presente invención, los expertos en la técnica pueden  
10 seleccionar fácilmente cantidades adecuadas de un regulador de T<sub>m</sub> a añadir, dependiendo de la secuencia de nucleótidos del cebador. Por ejemplo, la T<sub>m</sub> puede determinarse basándose en la longitud de la secuencia de nucleótidos de hibridación, en el contenido de GC, en la concentración salina y en la concentración del regulador de T<sub>m</sub>.

15 La hibridación de un cebador con un ácido nucleico bicatenario en dichas condiciones se supone que es inestable. Sin embargo, la síntesis de cadena complementaria prosigue utilizando, como origen de síntesis, el cebador inestable cuando los ADN se incuban con una polimerasa que cataliza la síntesis de cadena complementaria con desplazamiento de cadena. Dado que la síntesis de cadena complementaria prosigue, la hibridación entre la cadena complementaria sintetizada y el ácido nucleico molde se estabiliza con el tiempo. Las ADN polimerasas indicadas a  
20 continuación pueden catalizar la síntesis de cadena complementaria utilizando como origen de síntesis un cebador para el ácido nucleico bicatenario molde.

Un ADN polimerasa que cataliza la reacción de síntesis de cadena complementaria con desplazamiento de cadena desempeña una función importante en el procedimiento para sintetizar un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. Dichas ADN polimerasas incluyen las indicadas más adelante. Además, diversos mutantes de estas  
25 enzimas pueden utilizarse en la presente invención, siempre que tengan la actividad de síntesis de cadena complementaria dependiente de secuencia y la actividad de desplazamiento de cadena. Dichos mutantes incluyen enzimas truncadas que solo tienen las estructuras con la actividad catalítica o enzimas mutantes cuya actividad catalítica, estabilidad o estabilidad térmica se ha modificado por mutaciones de aminoácidos y similar.

ADN polimerasa Bst

ADN polimerasa Bca(exo-)

30 Fragmento Klenow de ADN polimerasa I

ADN polimerasa Vent

ADN polimerasa Vent (Exo-) (ADN polimerasa de Vent sin actividad exonucleasa)

ADN polimerasa DeepVent

ADN polimerasa DeepVent (Exo-) (ADN polimerasa de DeepVent sin actividad exonucleasa)

35 ADN polimerasa del fago  $\Phi$ 29

ADN polimerasa del fago MS-2

ADN polimerasa Z-Taq (Takara Shuzo)

ADN polimerasa KOD (TOYOBO)

40 Entre estas enzimas, la ADN polimerasa Bst y la ADN polimerasa Bca (exo-) se prefieren particularmente, porque tienen un alto grado de actividad térmica y de actividad catalítica. De acuerdo con la presente invención, la etapa de utilizar un cebador como origen de síntesis para un ácido nucleico bicatenario y la reacción de síntesis de cadena complementaria se realizan en las mismas condiciones. Dado que dichas reacciones a menudo requieren algo de calentamiento, se prefiere el uso de enzimas termoestables. La reacción puede realizarse en una amplia diversidad de condiciones utilizando enzimas termoestables.

45 Por ejemplo, la ADN polimerasa Vent(Exo-) es una enzima muy termoestable que tiene actividad de desplazamiento de cadena. Se ha descrito que la adición de una proteína de unión monocatenaria acelera la reacción de síntesis de cadena complementaria con desplazamiento de cadena por ADN polimerasa (Paul M. Lizardi y col., Nature Genetics 19, 225-232, julio, 1998). Aplicando el procedimiento de la presente invención, se espera la aceleración de la síntesis de cadena complementaria por la adición de una proteína de unión monocatenaria. Cuando se utiliza la ADN  
50 polimerasa Vent(Exo-), el gen 32 de T4 es eficaz como una proteína de unión monocatenaria.

Quando se utiliza una ADN polimerasa que carece de actividad 3'-5' exonucleasa, en la técnica se conoce un fenómeno en el que la síntesis de cadena complementaria no se termina incluso cuando la reacción alcanza el

extremo 5' del molde y se añade un nucleótido extra a la cadena sintetizada. Dicho fenómeno no es preferible en la presente invención, porque la siguiente síntesis de cadena complementaria se inicia desde la secuencia de cadena complementaria en el extremo 3' sintetizada. Sin embargo, el nucleótido añadido al extremo 3' por la ADN polimerasa es el nucleótido "A" con alta probabilidad. Por tanto, debe seleccionarse una secuencia para la síntesis de cadena complementaria de manera que se inicie la síntesis desde el extremo 3' a partir de A para evitar problemas por la adición errónea de un nucleótido de dATP sencillo. Como alternativa, incluso cuando sobresale el extremo 3' durante la síntesis de cadena complementaria, este puede someterse a digestión, mediante una actividad exonucleasa en dirección 3'→5', y pasar a ser un extremo romo. Por ejemplo, la ADN polimerasa Vent natural, que tiene dicha actividad, puede utilizarse en combinación con la ADN polimerasa Vent(Exo-) para superar el problema.

10 A diferencia de las ADN polimerasas descritas anteriormente, las ADN polimerasas, tal como la Taq polimerasa PCR que se utiliza rutinariamente en PCR y similar, no presenta sustancialmente actividad de desplazamiento de cadena en condiciones típicas. Sin embargo, dichas ADN polimerasas pueden utilizarse para la presente invención, siempre que se usen en condiciones que garanticen el desplazamiento de cadena.

15 Se ha descrito un fenómeno en el que una cadena complementaria se sintetiza incubando un cebador en una condición en la que el ácido nucleico bicatenario se vuelve inestable (Traducción Japonesa Publicada de la Publicación Internacional N° Hei 11-509406; WO97/00330). Sin embargo, se espera que solo una pequeña cantidad del producto de síntesis se produzca realmente en la condición descrita. Aunque en principio es posible realizar la síntesis de cadena complementaria utilizando un cebador como origen de síntesis, utilizando la desestabilización del ácido nucleico bicatenario, la reacción no es tan eficaz como la reacción que utiliza como molde un ácido nucleico monocatenario. Cuando se combina con una reacción de síntesis de cadena complementaria que requiere un cambio de temperatura, tal como el procedimiento de la PCR, la eficacia de la reacción de síntesis de cadena complementaria, que utiliza la desestabilización de la doble cadena, ejerce influencia sobre todas las reacciones de síntesis de cadena complementaria; por lo tanto, es difícil conseguir una eficacia de reacción prácticamente utilizable. Se piensa que esta es la causa de una eficacia de amplificación insuficiente en los procedimientos conocidos.

20 Por otro lado, la presente invención se basa en el hallazgo mediante el cual la baja eficacia de la síntesis de cadena complementaria basada en la desestabilización del ácido nucleico bicatenario puede verse compensada aplicando la reacción de síntesis de cadena complementaria basada en la desestabilización del ácido nucleico bicatenario con respecto a la amplificación de ácido nucleico que proporciona una región a hibridar por el cebador para la reacción de amplificación que originalmente prosigue a una temperatura constante. Dado que la presente invención utiliza una reacción de amplificación de ácido nucleico que prosigue a una temperatura constante, si una región con la que se hibrida un cebador se pone en una condición que garantiza el emparejamiento de bases, la siguiente reacción de síntesis de cadena complementaria, que no requiere la desestabilización de la cadena doble, prosigue. Por consiguiente, la influencia de la baja eficacia de la reacción de síntesis de cadena complementaria basada en la desestabilización de la cadena bicatenaria puede minimizarse. Por primera vez se consigue un nivel prácticamente utilizable de la eficacia de síntesis mediante la combinación de dos procedimientos. En otras palabras, la reacción de síntesis de cadena complementaria basada en la desestabilización de la doble cadena es útil como la reacción para proporcionar una región a hibridar por el cebador para la reacción de amplificación de ácido nucleico que prosigue isotérmicamente. Por el contrario, es difícil aplicarlo a una reacción de amplificación de ácido nucleico que requiera ciclo térmico.

30 En el procedimiento de amplificación isotérmica de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, es deseable que el extremo 3' se hibride consigo mismo y que se use como un molde para la reacción de síntesis de cadena complementaria. En concreto, la característica principal de la presente invención es que no se requiere un cambio de temperatura y que el mejor uso de esto se realiza en particular cuando se utiliza el cebador como se describe más adelante. Los autores de la invención diseñaron el procedimiento de amplificación de ácido nucleico utilizando un cebador que tiene una configuración específica. En lo sucesivo, en el presente documento, el procedimiento se describe como procedimiento LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle). De acuerdo con el procedimiento LAMP, el extremo 3' de un polinucleótido molde se hibrida consigo mismo para servir como el origen de la síntesis de cadena complementaria, y el cebador que se hibrida con el bucle así formado se utiliza para permitir la reacción de síntesis de cadena complementaria isotérmica. Los autores de la presente invención descubrieron que no era necesaria la desnaturalización de un molde bicatenario.

La presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis de ácido nucleico que utiliza un cebador que puede amplificar el ácido nucleico de manera isotérmica, siendo el cebador un oligonucleótido constituido por al menos dos regiones, X2 y X1c, en la que X1c está conectada al lado 5' de X2.

55 En el presente documento, X2 se define como una región que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria X2c del ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos específica.

Adicionalmente, X1c se define como una región que tiene una secuencia de nucleótidos sustancialmente idéntica a una región arbitraria en el lado 5' de la región X2c del ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos específica.

El cebador se utiliza como un primer cebador y un segundo cebador en la explicación ofrecida más adelante. El primer cebador se hibrida con el producto extendido sintetizado utilizando como origen el segundo cebador para actuar como origen de la reacción de síntesis de cadena complementaria y viceversa. El producto de síntesis preparado por el procedimiento de síntesis de ácido nucleico, que utiliza el cebador como origen de síntesis, permite la amplificación del ácido nucleico que se mencionará más adelante. La presente invención se refiere a un procedimiento para sintetizar ácido nucleico en el que diversos nucleótidos, que constituyen una región específica de un ácido nucleico molde bicatenario que está constituido por secuencias de nucleótidos complementarias, están conectados en una cadena sencilla, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas. En el presente documento, una condición en la que sobre la misma cadena existe una secuencia de nucleótidos 1 determinada y al menos una secuencia de nucleótidos 2 complementaria a la misma, se denomina una condición que contiene diversas secuencias de nucleótidos complementarias en una cadena sencilla

a) incubar un ácido nucleico bicatenario molde y un cebador arbitrario en presencia de ADN polimerasa, que cataliza una reacción de síntesis de cadena complementaria acompañada de desplazamiento de cadena, en una condición que garantice la síntesis de la cadena complementaria utilizando el cebador como origen, de tal manera que una región del ácido nucleico molde diana a hibridarse por un cebador capaz de amplificar el ácido nucleico molde a una temperatura constante, se coloca en una condición en la que la región puede experimentar emparejamiento de bases;

b) hibridar el segundo cebador con la región obtenida en la etapa a), que puede experimentar emparejamiento de bases y realizar la síntesis de cadena complementaria utilizando el segundo cebador como origen, en el que el extremo 3' del segundo cebador se hibrida con una región que define el lado 3' de una de las cadenas que constituyen la región específica y el lado 5' del segundo cebador que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una región arbitraria de un producto de reacción de síntesis de cadena complementaria obtenido utilizando el cebador como origen;

c) colocar una región del producto extendido del segundo cebador sintetizado en la etapa b), con la que el primer cebador se hibridará, en una condición en la que pueda experimentar emparejamiento de bases;

d) hibridar el primer cebador con la región obtenida en la etapa c), que puede experimentar emparejamiento de bases y realizar la síntesis de cadena complementaria utilizando el primer cebador como origen, en el que el extremo 3' del primer cebador se hibrida con una región que define el lado 3' de dicha región en un producto extendido obtenido utilizando el segundo cebador como origen, y

e) permitir la autohibridación en el extremo 3' del producto extendido del primer cebador sintetizado en la etapa d), realizar la síntesis de cadena complementaria utilizando, como molde, el producto extendido y obtener un ácido nucleico en el que diversos nucleótidos, que constituyen la región específica, se conectan sobre la cadena sencilla.

Entre las reacciones mencionadas anteriormente, solo se consigue la etapa a) por la desestabilización del ácido nucleico bicatenario. El producto extendido del cebador para la reacción de amplificación (concretamente, el segundo cebador), que ha obtenido una región para hibridarse en esta etapa, se utiliza como molde en la reacción posterior. Debe observarse que, dado que la ADN polimerasa que cataliza la reacción de síntesis de cadena complementaria con desplazamiento de cadena se utiliza, no solo junto con el cebador para la reacción de amplificación, sino también a lo largo de la síntesis de cadena complementaria en la presente invención, la configuración bicatenaria que aparece en la dirección anterior de la reacción de síntesis de cadena complementaria no obstaculiza la reacción si solo se consigue la hibridación del cebador.

Adicionalmente, en la presente invención, la reacción después de esta etapa originalmente prosigue a una temperatura constante y no depende de una síntesis de cadena complementaria que utiliza la desestabilización del ácido nucleico bicatenario con una mala eficacia. Concretamente, la reacción de amplificación de ácido nucleico, que prosigue a una temperatura constante, se inicia después de la síntesis de la cadena complementaria utilizando, como origen de síntesis, el cebador utilizado en la etapa a).

Incluso después de iniciar la reacción de amplificación del ácido nucleico que prosigue isotérmicamente, un cebador para la secuencia de nucleótido diana que existe en el sistema de reacción puede producir posiblemente la síntesis de la cadena complementaria, basándose en la desestabilización del ácido nucleico bicatenario. La posibilidad de que aparezca dicha reacción no puede negarse y no es necesario decir que la aparición de dicha reacción contribuye a la mejora completa de la eficacia de reacción. La reacción de síntesis de cadena complementaria basada en la desestabilización del ácido nucleico bicatenario, que se produce simultáneamente durante la reacción de amplificación, no es esencial en la reacción de amplificación de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención.

En la etapa c) de la reacción mencionada anteriormente es ventajoso utilizar un cebador externo. En el presente documento, el cebador externo proporciona el origen de la reacción de síntesis de cadena complementaria que prosigue hacia un cebador que se hibrida con la secuencia de nucleótidos diana (este cebador se denomina cebador interno, contrario al cebador externo). Por consiguiente, la región con la que se hibrida el cebador externo es la

región del lado 5' (lado 3' en un molde) del cebador interno. Como cebador externo, se puede utilizar un oligonucleótido que comprenda una secuencia de nucleótidos que actúe como un cebador al menos en su lado 3'. En este ejemplo, el primer cebador y el segundo cebador corresponden al cebador interno.

5 Por otro lado, el cebador interno contiene en su extremo 3' la secuencia de nucleótidos del molde de ácido nucleico bicatenario, que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de una región a sintetizar. El cebador interno se utiliza normalmente como un conjunto de dos cebadores. Sin embargo, si la región a sintetizar contiene repeticiones de la misma secuencia de nucleótidos, los dos cebadores pueden comprender la misma secuencia de nucleótidos. El conjunto de cebadores se diseña de tal manera que uno de los cebadores internos pueda hibridarse con el producto extendido de otro cebador interno. Cuando al menos las secuencias de nucleótidos en ambos extremos de la región a amplificar se conocen, es muy conocido un procedimiento para determinar la secuencia de nucleótidos utilizada como cebador.

10 Si los cebadores internos son cebadores cuyos lados 3' pueden hibridarse con la secuencia de nucleótidos diana, puede añadirse una secuencia de nucleótidos arbitraria al lado 5' del cebador interno. El hecho de que pueda añadirse una secuencia arbitraria al lado 5' del cebador interno proporciona muchas variaciones en el procedimiento de síntesis de ácido nucleico de la presente invención. Más adelante se describen ejemplos específicos.

15 Los cebadores internos en la presente invención pueden anidarse. Concretamente, el segundo conjunto de cebadores internos, que pueden hibridarse con la segunda secuencia de nucleótidos diana, puede combinarse adicionalmente con el primer conjunto de cebadores internos, que puede hibridarse con la primera secuencia de nucleótidos diana interna. En esta combinación, la primera secuencia de nucleótidos diana está incluida dentro de la segunda secuencia de nucleótidos diana. Cuando los cebadores internos se anidan, los cebadores externos se diseñan para hibridarse con el lado 5' de los segundos cebadores internos (lado 3' del molde).

20 Los cebadores internos normalmente comprenden una combinación de dos cebadores, aunque el número de los cebadores externos puede ser arbitrario. En general, el cebador externo de la presente invención comprende dos cebadores que proporcionan los orígenes de la reacción de síntesis de cadena complementaria que prosigue hacia las regiones con las que se hibridan los cebadores internos respectivos. Sin embargo, incluso si los cebadores externos solo se aplican a cualquiera de los cebadores internos, el procedimiento de la presente invención puede realizarse. Como alternativa, diversos cebadores externos pueden combinarse con un cebador interno. En todo momento, cuando se acompaña la síntesis de cadena complementaria que prosigue hacia la región con la que se hibridan los cebadores internos, el producto de la reacción de síntesis de cadena complementaria utilizando los cebadores internos como origen de síntesis puede generarse eficazmente.

25 La síntesis de cadena complementaria conducida por los cebadores externos en la presente invención se diseña para iniciarse después de la síntesis de la cadena complementaria utilizando los cebadores internos como origen de síntesis. El medio más simple para conseguir esto se produce cuando la concentración de los cebadores internos es mayor que la de los cebadores externos. Específicamente, la síntesis de cadena complementaria de los cebadores internos puede realizarse predominantemente cuando la diferencia de la concentración de los cebadores es normalmente de aproximadamente 2 a 50 veces, y preferentemente de aproximadamente 4 a 10 veces. Además, la duración de la reacción de síntesis de cadena complementaria puede controlarse estableciendo la temperatura de fusión (Tm) de los cebadores externos inferior a la Tm de los cebadores internos. La temperatura de fusión (Tm) puede calcularse teóricamente, basándose en la longitud de la cadena complementaria que está hibridada y en la combinación de los nucleótidos que constituyen el emparejamiento de bases, cuando las otras condiciones son constantes. Por consiguiente, los expertos en la técnica pueden deducir una condición de reacción deseable a partir de la descripción de la presente memoria descriptiva.

30 Además, para ajustar la duración de la hibridación de los cebadores externos, puede aplicarse un fenómeno denominado apilamiento contiguo. El apilamiento contiguo es un fenómeno en el que un oligonucleótido que no puede hibridarse independientemente es capaz de hibridarse cuando se coloca adyacente a una parte bicatenaria (Chiara Borghesi-Nicoletti y col., Bio Techniques 12, páginas 474-477 (1992)). Concretamente, los cebadores externos se colocan adyacentes a los cebadores internos y se diseñan de tal manera que no pueden hibridarse independientemente en la condición de incubación. Por tanto, los cebadores externos pueden hibridarse solo si se hibridan los cebadores internos. Por lo tanto, la hibridación de los cebadores internos predomina inevitablemente. Basándose en el principio, en los Ejemplos se describe un ejemplo para determinar la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido cebador necesaria para una serie de reacciones.

35 En la explicación descrita a continuación, X2 y X1c en uno de los cebadores internos se refiere temporalmente a F2 y F1c y X2 y X1c en el otro cebador interno se refiere a R2 y R1c. Los cebadores internos utilizados para la explicación se denominan temporalmente FA y RA. Uno de FA y RA es el primer cebador de la presente invención y el otro actúa como el segundo cebador. Las regiones que constituyen FA y RA son las siguientes:

55

|    |    |     |
|----|----|-----|
|    | X2 | X1c |
| FA | F2 | F1c |
| RA | R2 | R1c |

En el procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos de la presente invención, a través de la etapas de a) a c) mencionadas anteriormente, es importante producir un ácido nucleico que tenga en su extremo 3' la región F1, que puede hibridarse con la parte F1c de la misma cadena, formando un bucle que contenga la región F2c y experimente emparejamiento de bases hibridando la región F1 con F1c en la misma cadena. Dicha configuración de ácido nucleico puede proporcionarse por la reacción de síntesis de ácido nucleico basado en la presente invención utilizando los cebadores internos que tienen la siguiente configuración. Los detalles de la reacción son como se ha mencionado anteriormente.

Concretamente, los cebadores internos que se utilizan para la reacción de amplificación de ácido nucleico de la presente invención están constituidos por al menos las dos regiones X2 y X1c mencionadas anteriormente y comprenden el oligonucleótido en el cual X1c está conectado con el lado 5' de X2.

En el presente documento, el ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos específica que determina la configuración de los cebadores internos de la presente invención significa un ácido nucleico que se transforma en el molde cuando los cebadores internos de la presente invención se utilizan como cebador. Cuando la amplificación de ácido nucleico se realiza basándose en el procedimiento de síntesis de la presente invención, el ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos específica es un ácido nucleico bicatenario a amplificar o su derivado. El ácido nucleico bicatenario que tiene una secuencia de nucleótidos específica significa un ácido nucleico en el que al menos una parte de la secuencia de nucleótidos se clarifica o cuya secuencia puede suponerse. La parte cuya secuencia de nucleótidos debe clarificarse es la región X2c y la región X1c en su lado 5' anteriormente mencionada.

Las dos regiones pueden estar unidas entre sí o pueden estar por separado. El estado de la parte bucle formada por autohibridación del ácido nucleico producto depende de la posición relativa de las dos regiones. Preferentemente, las dos regiones no están innecesariamente separadas; de tal manera que la autohibridación del ácido nucleico producto se consigue más preferentemente que la hibridación de las dos moléculas. Por tanto, una longitud preferida de la secuencia de nucleótidos espaciadora entre las dos regiones es típicamente de 0 a 500 nucleótidos. Sin embargo, en algunos casos, regiones existentes demasiado cercanas entre sí distintas pueden ser desventajoso para la formación de un bucle de autohibridación deseable. Más específicamente, es deseable que el bucle tenga una estructura que permita la hibridación de un nuevo cebador y un inicio uniforme para la reacción de síntesis de cadena complementaria con desplazamiento de cadena. Por tanto, más preferentemente, los cebadores se diseñan de tal manera que la distancia entre la región X2c y la región X1c localiza en su lado 5' sea de aproximadamente 0 a 100 nucleótidos, adicionalmente de modo preferente de aproximadamente 10 a 70 nucleótidos. Los valores de distancia enumerados en el presente documento no contienen las longitudes de X1c y X2. La longitud de nucleótidos de la parte bucle incluye adicionalmente la longitud correspondiente a X2.

Además, los términos "idéntico" y "complementario", como se utilizan en el presente documento para caracterizar la secuencia de nucleótidos que constituye el cebador utilizado para la presente invención, incluyen casos que no son completamente idénticos y no completamente complementarios. Más específicamente, una secuencia idéntica a una determinada secuencia también puede incluir una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con la secuencia determinada. Por otro lado, una secuencia complementaria se refiere a una secuencia que se hibrida en condiciones rigurosas y proporciona el origen para la síntesis de cadena complementaria. En la presente invención, el término "idéntico" significa que la homología de la secuencia de nucleótidos es, por ejemplo, de 90 % o más, normalmente 95 % o más y más preferentemente 98 % o más. El término "complementario" se refiere a una secuencia de nucleótidos idéntica a la secuencia complementaria.

Concretamente, cuando la homología de la secuencia de nucleótidos es, por ejemplo, de 90 % o más, normalmente 95 % o más y más preferentemente 98 % o más con la secuencia complementaria, puede decirse que es "complementaria". Además, cuando la secuencia de nucleótidos complementaria actúa como origen de la síntesis de cadena complementaria, es deseable que al menos un nucleótido del extremo 3' coincida completamente con la secuencia complementaria.

Las regiones X2 y X1c que constituyen el cebador interno utilizado en la presente invención se disponen típicamente de manera continua, sin solapamiento entre sí. Como alternativa, si X2 y X1c comparten una secuencia de nucleótidos común, pueden colocarse de tal manera que se solapen parcialmente entre sí. Sin excepción, X2 debe colocarse en el extremo 3' para actuar como un cebador. Por otro lado, X1c se coloca en el extremo 5' como se describe más adelante, para proporcionar una función como un cebador en el extremo 3' de una cadena complementaria sintetizada utilizando X1c como molde. La cadena complementaria obtenida utilizando el oligonucleótido como origen de síntesis se utiliza como molde de la síntesis de cadena complementaria inversa en la etapa siguiente y finalmente la parte de cebador interno de acuerdo con la presente invención también se copia como el molde para la cadena complementaria. El extremo 3' copiado contiene la secuencia de nucleótidos X1 y se hibrida con X1c localizado dentro de la misma cadena para formar un bucle.

El cebador interno utilizado en la presente invención es un oligonucleótido que cumple dos requisitos: (1) tiene la capacidad de formar un par de bases con una secuencia de nucleótidos diana y (2) proporciona un grupo OH en el extremo 3' del par de bases que se utiliza como el origen de síntesis de cadena complementaria. La estructura del cebador no está limitada a la compuesta por enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, el cebador puede comprender fosfotioato. Adicionalmente, el nucleótido puede ser cualquier nucleótido, siempre que forme un par de bases

complementario. En general, hay cinco tipos de nucleótidos de origen natural, concretamente A, C, T, G, y U; sin embargo, también se incluyen análogos tales como, por ejemplo, bromodesoxiuridina. El oligonucleótido utilizado en la presente invención no solo se utiliza como origen de síntesis sino que actúa preferentemente también como molde de síntesis de cadena complementaria.

5 El cebador interno utilizado en la presente invención consta de nucleótidos con longitud apropiada que permita el emparejamiento de bases con la cadena complementaria manteniendo la especificidad necesaria en una determinada condición en diversos tipos de reacciones de síntesis de ácido nucleico descritas más adelante. Específicamente, el cebador comprende de 5 a 200 nucleótidos y más preferentemente de 10 a 50 nucleótidos. La longitud mínima de un cebador reconocido por polimerasas conocidas que catalizan la síntesis de ácido nucleico dependiente de secuencia, es de aproximadamente 5 nucleótidos. Por tanto, la longitud de una parte de hibridación debe tener una longitud de al menos 5 nucleótidos o mayor. Además, para garantizar una alta probabilidad de especificidad de secuencia-nucleótido, se prefiere utilizar un cebador que comprenda 10 nucleótidos o más. Por otro lado, una secuencia de nucleótidos demasiado larga es difícil de sintetizar químicamente. Por tanto, la longitud anteriormente mencionada de cebadores se ilustra como el intervalo preferido. La longitud ilustrada de cebadores corresponde solo a la parte que se hibrida con la cadena complementaria. El cebador interno de la presente invención comprende al menos dos regiones, X2 y X1c. Por tanto, la longitud ilustrada de cebadores anterior debe entenderse como una longitud correspondiente a la longitud de cada región que constituye el cebador interno.

Además, el cebador interno utilizado en la presente invención puede marcarse con sustancias marcadoras conocidas. Dichas sustancias marcadoras incluyen ligandos con capacidad de unión, tales como digoxina y biotina; enzimas; sustancias fluorescentes; sustancias luminiscentes; y radioisótopos. Además, se conocen técnicas para convertir nucleótidos en cebadores internos con análogos fluorescentes (documento WO 95/05391; Proc. Nati. Acad. Sci. USA, 91, 6644-6648, 1994).

Adicionalmente, el cebador interno utilizado en la presente invención puede inmovilizarse en una fase sólida. Como alternativa, puede marcarse una parte arbitraria del cebador interno con un ligando que tiene capacidad de unión, tal como biotina, y después inmovilizarse indirectamente mediante un compañero de unión, tal como avidina inmovilizada.

Cuando un cebador interno inmovilizado se utiliza como origen de síntesis, el producto de ácido nucleico sintetizado se inmoviliza sobre una fase sólida, y por tanto puede separarse fácilmente. El producto separado puede detectarse por indicadores específicos de ácido nucleico o mediante hibridación adicional de una sonda marcada. Como alternativa, un fragmento de ácido nucleico de interés puede recuperarse digiriendo el ácido nucleico con una enzima de restricción arbitraria.

El término "molde" como se utiliza en el presente documento se refiere a un ácido nucleico que se utiliza como molde en la síntesis de una cadena complementaria. Aunque una cadena complementaria que tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un molde es una cadena correspondiente al molde, la relación entre las dos es meramente relativa. Específicamente, una cadena sintetizada como una cadena complementaria tiene la capacidad de actuar como un molde. En otras palabras, una cadena complementaria también sirve como un molde.

El cebador interno en la presente invención puede contener regiones adicionales a las dos regiones mencionadas anteriormente. Específicamente, X2 y X1c se colocan en el extremo 3' y en el extremo 5', respectivamente, y una secuencia arbitraria puede colocarse entre las dos regiones. Dicha secuencia arbitraria incluye, por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción, un promotor reconocido por ARN polimerasa, un ADN codificante de ribozima, etc. El ácido nucleico monocatenario, el producto de síntesis de la presente invención, en el que las secuencias de nucleótidos complementarias están conectadas, puede someterse a digestión para dar dos ácidos nucleicos bicatenarios con idéntica longitud insertando una secuencia de reconocimiento de enzimas de restricción. Insertando una secuencia promotora reconocida por ARN polimerasa, el producto sintetizado de la presente invención puede transcribirse en ARN utilizando como molde el producto. Adicionalmente, disponiendo también un ADN codificante de ribozima, es posible establecer un sistema de autoescisión para los transcritos. Todas las secuencias de nucleótidos adicionales mencionadas anteriormente actúan solo cuando las secuencias se forman en ácidos nucleicos bicatenarios. Por consiguiente, estas secuencias no actúan en el ácido nucleico monocatenario de la presente invención que está en forma de un bucle. Las secuencias adicionales actúan durante la primera vez solamente después de proseguir la extensión de ácido nucleico y la secuencia se hibrida con una secuencia de nucleótidos complementaria sin formar ningún bucle.

Cuando los cebadores internos utilizados en la presente invención se combinan con un promotor en la dirección que permite la transcripción de la región sintetizada, el producto de reacción de acuerdo con la presente invención, que tiene la misma secuencia de nucleótidos repetida, realiza un sistema de transcripción muy eficaz. La traducción a proteína también es posible combinando el sistema de transcripción con un sistema de expresión apropiado. En concreto, esto puede aplicarse a la transcripción y traducción de la proteína en una bacteria o en una célula animal o *in vitro*.

Diversos cebadores utilizados en la presente invención pueden sintetizarse químicamente. Como alternativa, para modificar o conectar un ácido nucleico natural puede someterse a digestión con enzimas de restricción y similar de

manera que contenga la secuencia de nucleótidos anteriormente mencionada.

El principio básico de la reacción de amplificación para ácidos nucleicos bicatenarios por el uso combinado de los cebadores internos, FA y RA, anteriormente mencionados y la ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de cadena, se describe más adelante haciendo referencia a las Figuras 1 a 4. De acuerdo con los ejemplos, el conjunto de cebadores de amplificación consta de los cebadores internos FA y RA y además, RA actúa como un cebador arbitrario en la presente invención.

El cebador arbitrario anteriormente mencionado (RA en la Fig. 1-(1)) se hibrida primero con X2c (correspondiente a R2c) en el ácido nucleico bicatenario molde que actúa como el origen de síntesis de cadena complementaria. En dichas condiciones, el ácido nucleico bicatenario es inestable y el cebador actúa directamente como el origen de la síntesis de cadena complementaria en el ácido nucleico bicatenario. En la Figura 1-(2), la cadena complementaria sintetizada utilizando RA como origen desplaza una de las cadenas del ácido nucleico bicatenario molde, y F2c, que es la región de hibridación con el cebador para la reacción de amplificación FA, está listo para el emparejamiento de bases (Fig. 1-(2)).

Una síntesis de cadena complementaria se realiza hibridando FA con la región F2c que está lista para el emparejamiento de bases. En el presente documento, un cebador externo F3, que inicia la síntesis de cadena complementaria desde el lado 5' de FA (lado 3' del molde), también se hibrida con la región (Fig. 2-(4)). El cebador externo se diseña de tal manera que inicia la síntesis de cadena complementaria en el lado 5' de cada cebador interno (lado 3' del molde). El cebador externo adicionalmente tiene una Tm mayor y se utiliza a una menor concentración que la de los cebadores internos. Por tanto, el cebador externo siempre inicia una síntesis de cadena complementaria con una probabilidad menor en comparación con los cebadores internos. Como resultado de la síntesis de cadena complementaria utilizando, como origen, el cebador externo F3, el producto extendido sintetizado utilizando, como origen, el cebador interno FA, se desplaza y se libera como una cadena sencilla (Fig. 2-(5)). Utilizando como molde esta cadena sencilla, RA y el cebador externo, R3, correspondiente a RA se hibridan entre sí y se inicia la síntesis de cadena complementaria (Fig. 3-(6)). Como resultado, los productos extendidos de RA tienen una estructura con la que el extremo 3' de F1 puede hibridarse intramolecularmente consigo mismo (Fig. 3-(8)). En la Fig. 3-(6), el extremo 5' de la cadena se hibrida intramolecularmente consigo mismo. Sin embargo, la reacción de amplificación no puede iniciarse con esta estructura, ya que el extremo 5' no actúa como origen de síntesis de cadena complementaria. La reacción de amplificación se inicia solamente cuando se sintetiza una cadena complementaria con la cadena mostrada en la Fig. 3-(6) y posteriormente se proporciona una estructura que se hibrida consigo misma en su extremo 3' (Fig. 3-(8)). Estas etapas de reacción pueden referirse a etapas preliminares para la reacción de amplificación de la presente invención.

La amplificación de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se describe específicamente a continuación, con referencia a la ilustración esquemática representada en las Figuras. El extremo 3' de F1 autohibridado (Fig. 3-(8)) actúa como el origen de síntesis de cadena complementaria. La hibridación en el extremo 3' se produce entre F1 y F1c, y por tanto, existe la posibilidad de que la hibridación compita con FA, que también contiene F1c. Sin embargo, en realidad, las secuencias de nucleótidos complementarias F1/F1c que existen en una región adyacente en una cadena idéntica se hibridan preferentemente entre sí. Por tanto, la reacción de síntesis de cadena complementaria se inicia preferentemente utilizando su propia cadena como molde. El ácido nucleico en el que se ha conectado la secuencia de nucleótidos diana en una sola cadena se sintetiza a través de esta reacción. Además, F2c, con el que puede hibridarse el cebador interno FA, está presente en una región formadora de bucle que se forma por la autohibridación F1 en el extremo 3'. Después de la hibridación de FA con esta parte, se inicia la síntesis de cadena complementaria (Fig. 3-(8)). La síntesis de cadena complementaria de FA hibridada con el bucle desplaza los productos de síntesis de cadena complementaria iniciados desde el extremo 3' utilizando el mismo como molde, y de nuevo el extremo 3' queda listo para autohibridarse (Fig. 4-(9)). La reacción posterior comprende etapas alternativas de síntesis de cadena complementaria utilizando el extremo 3' del mismo como origen y su propia cadena como molde, y la síntesis de cadena complementaria utilizando una parte bucle como origen y el cebador interno FA o RA como origen. Como se ha descrito anteriormente, la reacción de amplificación de ácido nucleico comprende las etapas alternativas de repetir la extensión del extremo 3' utilizando su propia cadena como molde, y nuevamente se inicia la extensión desde el cebador que se hibrida con la parte bucle.

Por otro lado, con respecto a la cadena de ácido nucleico sintetizada complementaria al ácido nucleico monocatenario, que se extiende utilizando como molde su propia cadena, utilizando la hibridación de oligonucleótidos con la parte bucle de la misma como origen, la síntesis de un ácido nucleico que tiene varias secuencias de nucleótidos complementarias conectadas en una sola cadena también prosigue en la cadena de ácido nucleico sintetizada. Específicamente, la síntesis de cadena complementaria de la parte bucle se completa, por ejemplo, cuando alcanza R1 como se representa en la Fig. 4-(9). Entonces, otra síntesis de cadena complementaria se inicia nuevamente utilizando el extremo 3' desplazado por la síntesis de ácido nucleico como origen (Fig. 4-(9)). Eventualmente, la reacción alcanza la parte bucle que ha sido el origen de la síntesis en las etapas previas para iniciar de nuevo el desplazamiento. Por tanto, el ácido nucleico que inició la síntesis a partir de la parte bucle también se desplaza y como resultado el extremo 3' de R1 se hibrida con cadena en sí misma producida (Fig. 4-(11)). Este extremo 3' de R1 inicia la síntesis de cadena complementaria después de hibridarse con R1c presente en la misma cadena. Cuando en esta reacción se considera F como R y R como F, la reacción es la misma que la representada en la Fig. 3-(8). Por tanto, la estructura representada en la Fig. 4-(11) actúa como un



nuevo ácido nucleico que continúa el procedimiento de auto-extensión y síntesis de otro ácido nucleico.

Como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, la reacción que proporciona continuamente ácidos nucleicos que inicia otra extensión prosigue junto con la elongación de un ácido nucleico. Dado que el ácido nucleico se extiende adicionalmente, se generan secuencias múltiples formadoras de bucles no solo en el extremo de la cadena sino también dentro de la misma cadena. Cuando estas secuencias formadoras de bucles comienzan a estar listas para el emparejamiento de bases a través de la reacción de síntesis que comprende desplazamiento de cadena, los cebadores internos se hibridan con las secuencias formadoras de bucles y actúan como orígenes de síntesis para producir nuevos ácidos nucleicos. Se consigue una amplificación más eficaz combinando la síntesis iniciada desde regiones internas de la cadena con la síntesis de cadena del extremo de cadena. Como se ha descrito anteriormente, la síntesis de nuevos ácidos nucleicos acompañada de extensión de cadena puede realizarse aplicando el procedimiento LAMP. Además, de acuerdo con el procedimiento, LAM, los ácidos nucleicos recién generados se extienden por sí mismos, y se produce una nueva generación de ácidos nucleicos distintos. Teóricamente, esta serie de reacciones continúa indefinidamente y por tanto puede conseguir una amplificación de ácidos nucleicos extremadamente eficaz. Además, el procedimiento de la presente invención puede realizarse en una condición de reacción isotérmica.

En el presente documento, el producto de reacción acumulado tiene una estructura en la que las secuencias de nucleótidos entre F1 y R1, y sus cadenas complementarias, están conectadas en números plurales. La región que contiene las secuencias de nucleótidos de F2-F1 (F2c-F1c) o R2-R1 (R2c-R1c) es continua en ambos extremos de las secuencias de unidades de repetición. Por ejemplo, la Fig. 4-(10) muestra un estado en el que las secuencias de nucleótidos están conectadas siguiendo el orden (R2-F2c)-(F1-R2c)-(R1-F1c)-(F2-R2c) a partir del lado 5'. Esto es porque la reacción de amplificación de la presente invención se realiza basándose en un principio en el que la amplificación se inicia desde F2 (o R2) utilizando los cebadores internos como orígenes de síntesis y sucesivamente, el producto se extiende desde F1 (o R1) por la reacción de síntesis de cadena complementaria utilizando el propio extremo 3' como origen de síntesis.

Como la realización más preferente del presente documento, los cebadores internos, FA y RA, se utilizan como los oligonucleótidos que se hibridan con una parte bucle. Sin embargo, la amplificación de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede realizarse solo cuando se utilizan tanto los oligonucleótidos que tienen esta estructura limitada así como un oligonucleótido capaz de iniciar la síntesis de cadena complementaria a partir de un bucle. Concretamente, si solamente se desplaza el extremo 3' (que continúa extendiéndose) por la síntesis de cadena complementaria desde un bucle, otra parte bucle se proporciona de nuevo. Dado que la síntesis de cadena complementaria, que se inicia desde de una parte bucle, utiliza un ácido nucleico molde en el que varias secuencias de nucleótidos complementarias se conectan en una cadena sencilla, es obvio que puede sintetizarse un ácido nucleico deseado de la presente invención. Sin embargo, el ácido nucleico así sintetizado, forma un bucle después del desplazamiento para realizar la síntesis de cadena complementaria, pero no tiene extremo 3' para formar el bucle después de esto y por tanto no puede actuar como un nuevo molde. Por consiguiente, contrario al caso del uso de ácido nucleico que inicia la síntesis de FA o RA, no puede esperarse una amplificación exponencial. Por esta razón, los cebadores internos que tienen estructuras como FA y RA son útiles en la presente invención para una síntesis de ácido nucleico altamente eficaz.

Una serie de reacciones prosigue simplemente añadiendo los componentes indicados a continuación al ácido nucleico bicatenario que actúa como molde e incubándolos en condiciones que aseguren la hibridación de los cebadores internos y los cebadores externos y la reacción de síntesis de cadena complementaria utilizando estos cebadores como orígenes. Las condiciones de incubación son como se ha descrito anteriormente. En la presente invención, la reacción de amplificación del ácido nucleico molde se consigue incubando los siguientes elementos a una temperatura más baja que la necesaria para desnaturalizar el ácido nucleico bicatenario que actúa como molde. En este momento, la etapa de desnaturalizar el ácido nucleico molde es innecesaria. En el presente documento, la temperatura necesaria para la desnaturalización del ácido nucleico bicatenario se refiere a una temperatura a la cual el ácido nucleico molde puede convertirse en una sola cadena después de enfriamiento rápido.

- Cuatro tipos de oligonucleótidos:

FA,

RA,

Cebador externo F3, y

Cebador externo R3;

- ADN polimerasa que cataliza la reacción de síntesis de cadena complementaria con desplazamiento de cadena;

- Nucleótido como sustrato de ADN polimerasa.

Como se ha descrito en la explicación del principio de reacción, cuando como cebadores internos se utilizan los FA y



los RA mencionados anteriormente, el procedimiento de síntesis de ácido nucleico de la presente invención, utilizando como molde el ácido nucleico bicatenario, es necesario para una reacción utilizando como molde un ácido nucleico derivado de una muestra. Cuando se aplican los cebadores internos que tienen estructuras específicas como FA y RA al procedimiento de síntesis de ácido nucleico de la presente invención, el extremo 3' del producto  
 5 generado se hibrida consigo mismo y sirve como origen de síntesis para la cadena complementaria, utilizando el mismo como un molde. Además, un nuevo cebador se hibrida con la parte bucle, formada por autohibridación del extremo 3' del producto anteriormente mencionado, que sirve como un origen de síntesis, y la reacción de síntesis de cadena complementaria con desplazamiento de cadena prosigue. Estas reacciones prosiguen con independencia del procedimiento de síntesis de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención utilizando, como molde, el  
 10 ácido nucleico bicatenario.

Concretamente, cuando como cebadores internos se utiliza FA y RA, la reacción de síntesis de ácido nucleico de la presente invención utilizando, como molde, ácido nucleico bicatenario, constituye una reacción inicial. Por consiguiente, la reacción inicial requiere una condición que garantice la hibridación de los cebadores internos y los  
 15 cebadores externos y la reacción de síntesis de cadena complementaria utilizando, como orígenes, estos cebadores. Las reacciones posteriores pueden realizarse en condiciones más apropiadas. Sin embargo, cuando para esto se requiere un cambio de temperatura, la ventaja de la presente invención, en la que la etapa de desnaturalización no se requiere, no puede aprovecharse por completo. Por consiguiente, en la presente invención, se prefiere que no solo la reacción inicial, sino también todas las reacciones posteriores se realicen en condiciones preferentes.

En los casos en los que se utiliza FA y RA como cebadores internos de la presente invención, es importante  
 20 observar que la serie de etapas de reacción prosiga únicamente cuando las posiciones relativas de las regiones múltiples se mantengan constantemente. Por consiguiente, la síntesis de cadena complementaria no específica que acompaña a la síntesis no específica puede impedirse eficazmente. Específicamente, este aspecto contribuye a reducir la probabilidad de que el producto servirá como un material de partida en una etapa de amplificación posterior, incluso cuando se produce alguna reacción no específica. Además, el hecho de que el proceso de la  
 25 reacción se controle por una pluralidad de regiones diferentes proporciona una con la flexibilidad para construir un sistema de detección que garantice la discriminación exacta de secuencias de nucleótidos similares.

El aspecto de la invención puede utilizarse para detectar una mutación de un gen. En la realización de la presente invención, que utiliza cebadores externos, se utiliza en total de cuatro tipos de cebadores, dos tipos de cebadores  
 30 externos y dos tipos de cebadores internos. Si las secuencias de nucleótidos constituyen seis regiones que están contenidas en cuatro tipos de oligonucleótidos y la secuencia nucleótido diana no se ha realizado como se ha diseñado, se inhibe cualquiera de las reacciones de síntesis de cadena complementaria de la presente invención. En particular, las secuencias de nucleótidos próximas al extremo 3' de los oligonucleótidos respectivos que sirven como origen de síntesis para la cadena complementaria y las secuencias de nucleótidos cercanas al extremo 5' de la  
 35 región X1c cuya secuencia de nucleótidos complementaria sirve como origen de síntesis, son importantes para la síntesis de cadena complementaria. Por tanto, si la secuencia de nucleótidos importante para la síntesis de cadena complementaria se diseña de modo que se corresponda con la mutación a detectar, la presencia o ausencia de la mutación, tal como la delección e inserción del nucleótido (o nucleótidos) o polimorfismo génico, tal como SNP, puede detectarse observando el producto de reacción de síntesis de acuerdo con la presente invención.

Más específicamente, cuando se espera que el nucleótido tenga una mutación o un polimorfismo localizado cerca  
 40 del extremo 3' de los oligonucleótidos que sirven como origen de la síntesis de cadena complementaria o una cadena complementaria recién sintetizada que se transforma en un origen de síntesis, las secuencias de nucleótidos deben diseñarse para que sean equivalentes a la secuencia próxima al extremo 5' de la cadena que sirve como molde en la síntesis de cadena complementaria. Cuando existe emparejamiento erróneo en el extremo 3', que sirve como origen de síntesis de cadena complementaria, o más o menos cerca de esta, la reacción de síntesis de cadena  
 45 complementaria de ácido nucleico se inhibe extraordinariamente.

De acuerdo con el procedimiento LAMP, la amplificación extensiva no se consigue cuando una reacción de la estructura final del producto, que se produce en etapas tempranas de la reacción, no se repite muchas veces. Por tanto, incluso si se produce una síntesis errónea, la amplificación extensiva no se conseguirá con emparejamientos erróneos, porque la síntesis de cadena complementaria para la amplificación se inhibe en alguna fase. Como  
 50 resultado, los emparejamientos erróneos suprimen de modo eficaz la amplificación para proporcionar un resultado correcto. Concretamente, la amplificación de ácido nucleico utilizando el procedimiento LAMP tiene un mecanismo de control de secuencias de nucleótidos con un alto grado de perfección. Estas características proporcionan una ventaja sobre procedimientos, tales como, por ejemplo, PCR, en la que se simplemente se amplifican secuencias entre dos regiones.

Además, la región X1c, que es característica del oligonucleótido utilizado en la presente invención, solo sirve como origen cuando se sintetiza una secuencia complementaria, y la secuencia complementaria se hibrida con la X1 recién sintetizada dentro de la misma secuencia para realizar la reacción de síntesis utilizando la propia cadena como molde. Por lo tanto, los oligonucleótidos de la presente invención carecen de bucles formadores, que a menudo son un problema grave en la técnica anterior, incluso si se genera lo que se denomina dímero-cebador. Por consiguiente, en la presente invención no se produce la amplificación no específica debida a un dímero-cebador, lo  
 60 que contribuye a mejorar la especificidad de la reacción.

La amplificación de ácido nucleico puede realizarse eficazmente determinando la  $T_m$  de los cebadores externos para que sea (cebadores externos F3:  $F3c \leq (F2c/F2)$ ) con respecto a los cebadores internos FA. Es deseable diseñar las regiones respectivas que constituyen FA para que la hibridación entre F1c y F1 se produzca más predominantemente que la de entre F2c y F2. Esto debe diseñarse teniendo en cuenta la  $T_m$ , la base constituyente, y similar. Además, dado que la hibridación entre F1c y F1 es una reacción intermolecular, también debe observarse que la hibridación prosigue predominantemente con una alta posibilidad. Es innecesario decir que la misma condición también deberá tenerse en cuenta para diseñar RA, que se hibrida con el producto extendido de FA. Una condición de reacción ideal puede obtenerse con una fuerte probabilidad garantizando dicha reacción.

En la presente invención se utilizan los términos "síntesis" y "amplificación" de ácido nucleico. En el presente documento, síntesis de ácido nucleico se refiere a la elongación de ácidos nucleicos a partir de un oligonucleótido que sirve como origen de síntesis. Una serie de reacciones, incluyendo la reacción de formación continua de otros ácidos nucleicos y la elongación de los ácidos nucleicos formados, además de la síntesis, se denomina en su conjunto "amplificación".

La región F1, que puede hibridarse con una parte F1c en la misma cadena, se proporciona en el extremo 3' utilizando FA y RA como cebadores internos. La hibridación de la región F1 con la región F1c sobre la misma cadena produce un ácido nucleico monocatenario que puede formar un bucle que contiene la región F2c que después puede experimentar emparejamiento de bases. El ácido nucleico monocatenario actúa como una importante sustancia de partida en la reacción de amplificación de ácido nucleico posterior. El ácido nucleico monocatenario también puede proporcionarse basándose en el siguiente principio. Concretamente, la síntesis de cadena complementaria prosigue utilizando un cebador que tiene la siguiente estructura como cebador interno:

5'-[región X1 que se hibrida con la región X1c posicionada en el cebador] - [secuencia formadora de bucle que está en una condición que garantiza el emparejamiento de bases] - [región X1c] - [región que tiene secuencia complementaria al molde]-3'

Se prepararon dos tipos de una secuencia de nucleótidos complementaria a F1 (el cebador FA) y una secuencia de nucleótidos complementaria a R1c (el cebador RA) para la región que tenía una secuencia complementaria a un molde. Además, la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico a sintetizar incluye la secuencia nucleótidos de la región F1 para la región R1c y la secuencia de nucleótidos de la región R1, que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos, para la región F1c. Por otro lado, X1c y X1, que se han hibridado intermolecularmente en el cebador, pueden ser una secuencia arbitraria. Sin embargo, es deseable que las secuencias de la región X1c/X1 difieran de los cebadores FA y RA.

En primer lugar, utilizando un cebador arbitrario, la región F2 del ácido nucleico bicatenario que se convierte en el molde, se coloca en una condición que garantice el emparejamiento de bases. Después, el cebador FA se hibrida con F2 que puede experimentar emparejamiento de bases, y se realiza la síntesis de cadena complementaria. En este momento, RA puede utilizarse como cebador arbitrario. Entonces, la región R2c de la cadena complementaria sintetizada de esta manera se coloca en una condición que garantiza el emparejamiento de bases, y otro cebador se hibrida con esta región para preparar el origen de la síntesis de cadena complementaria. Dado que el extremo 3' de la cadena complementaria sintetizada tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a la del cebador FA que constituye la parte del extremo 5' de la cadena inicialmente sintetizada, este tiene la región X1 en el extremo 3', que después se hibrida con la región X1c en la cadena misma para formar un bucle. Por tanto, se proporciona la configuración del extremo 3' que es característica de la presente invención, como se describe anteriormente, y la reacción posterior es el sistema de reacción que se ha mostrado previamente como la realización más deseable. Obsérvese que el oligonucleótido que se hibrida con la parte bucle tiene la región X2 complementaria a la región X2c, que existe en el bucle, en el extremo 3', y la región X1 en el extremo 5'. En el sistema de reacción anterior, la configuración en bucle se proporciona en el extremo 3' del ácido nucleico sintetizando una cadena complementaria al ácido nucleico molde utilizando los cebadores FA y RA. El procedimiento proporciona eficazmente la configuración terminal, que es característica de la presente invención, utilizando un cebador corto. Por otro lado, en la presente realización, desde el principio se proporciona la secuencia de nucleótidos completa del bucle como un cebador y se requiere la síntesis de un cebador más largo.

Además, el principio de la presente invención puede también aplicarse a procedimientos de amplificación de ácido nucleico conocidos, tales como, por ejemplo, SDA y NASBA. Para aplicar el principio de SDA de la presente invención, el conjunto de cebadores para SDA, la ADN polimerasa, que cataliza la reacción de síntesis de cadena complementaria con desplazamiento de cadena, una enzima de restricción y un sustrato necesario para la síntesis de cadena complementaria (incluyendo tionucleótidos para proporcionar resistencia a nucleasas), se incuban junto con el ácido nucleico bicatenario que se transforma en molde en las condiciones de la presente invención anteriormente mencionadas. Cuando cualquiera de los cebadores para SDA inicia la síntesis de cadena complementaria por la desestabilización de la cadena doble, la región con la cual otro cebador debe hibridarse en el ácido nucleico molde sustituido se transforma en una condición que garantiza el emparejamiento de bases. Después, se realiza la hibridación de los cebadores y la síntesis de la cadena complementaria con el ácido nucleico molde.

A continuación, se produce la hibridación de los cebadores externos con el cebador y la síntesis de la cadena complementaria, y la cadena complementaria previamente sintetizada a partir del cebador para SDA se sustituye para generar un ácido nucleico monocatenario. Además, la síntesis de cadena complementaria utilizando el cebador arbitrario mencionado anteriormente prosigue en la dirección del lado 5' del ácido nucleico molde. Por consiguiente, no solo la región con la cual el cebador para SDA debe hibridarse, sino también la región con la cual el cebador externo debe hibridarse, se transforman en una condición que garantiza la formación de pares de bases. La cadena complementaria sintetizada a partir de otro cebador, utilizando como molde el ácido nucleico monocatenario, es resistente a nucleasas. Por consiguiente, la enzima de restricción actúa solo en el sitio de reconocimiento de enzimas de restricción en el cebador para generar de esta manera un corte enzimático. La síntesis de cadena complementaria y el desplazamiento se realizan repetidamente utilizando este corte enzimático como origen de síntesis, para conseguir la amplificación. Al mismo tiempo, el cebador para SDA también se hibrida con el ácido nucleico monocatenario que se genera por la sustitución, y se realiza la síntesis de la cadena complementaria.

El ácido nucleico que sirve como molde en este momento es resistente a nucleasas, pero, el corte enzimático producido por la enzima de restricción se genera en los cebadores para SDA dado que no son resistentes a nucleasas. Como resultado, la reacción de amplificación de ácido nucleico también se consigue en el ácido nucleico monocatenario sustituido. Por consiguiente, continuando la incubación en esta condición, el ADN bicatenario, que comprende las secuencias de nucleótidos de la región que se establece por los cebadores para SDA, se sintetiza sucesivamente, y, como resultado, se consigue la amplificación del ácido nucleico. Aunque el principio del procedimiento SDA ya se conoce, la presente invención proporciona un nuevo hallazgo, concretamente que la etapa de desnaturalización del ácido nucleico bicatenario puede eliminarse iniciando la reacción utilizando la reacción de síntesis de ácido nucleico basada en la desestabilización de la doble cadena.

Para realizar el procedimiento NASBA basado en la presente invención, se utilizan cebadores para el procedimiento NASBA en combinación con la ADN polimerasa y la ARN polimerasa que cataliza la reacción de síntesis de cadena complementaria con desplazamiento de cadena. Los cebadores para NASBA están constituidos por el primer cebador al cual se añade la secuencia promotora y el segundo cebador que se hibrida con la cadena complementaria sintetizada utilizando, como origen, el primer cebador.

En primer lugar, la síntesis de cadena complementaria se realiza utilizando un cebador arbitrario para el ácido nucleico molde bicatenario, y la región con la cual el primer cebador para NASBA debe hibridarse se coloca en una condición que garantiza el emparejamiento de bases. Posteriormente, la cadena complementaria sintetizada utilizando, como origen, el primer cebador para NASBA, se sustituye por los cebadores externos para constituir la cadena sencilla. Cuando el segundo cebador para NASBA se hibrida con la cadena sencilla obtenida para constituir la doble cadena, la región promotora añadida al primer cebador para NASBA se convierte en bicatenaria. La reacción de transcripción utilizando ARN polimerasa la inicia la región promotora, que se ha convertido en bicatenaria, y la síntesis de ARN se realiza utilizando, como molde, la secuencia de nucleótidos diana.

Diversos reactivos que son necesarios para el procedimiento de síntesis de ácido nucleico o para el procedimiento de amplificación de acuerdo con la presente invención pueden proporcionarse como un kit previamente envasado. Específicamente, un kit de la presente invención comprende oligonucleótidos que son necesarios como cebadores internos y cebadores externos, dNTP (que es el sustrato de la síntesis de cadena complementaria), ADN polimerasa que realiza la síntesis de cadena complementaria con desplazamiento de cadena, un tampón que proporciona una condición preferente para la reacción enzimática, y además, si fuera necesario, reactivos necesarios para la detección del producto de la reacción de síntesis y similar. En particular, en la realización preferida de la presente invención, dado que la adición de reactivos es innecesaria durante la reacción, los reactivos necesarios para una reacción pueden proporcionarse en un estado de tal manera que se pongan en el recipiente de reacción de manera que la reacción pueda iniciarse solamente añadiendo una muestra. Si se construye un sistema de detección en el que la detección del producto de reacción puede realizarse en el recipiente de reacción utilizando una señal emisora de luz o una señal fluorescente, la apertura y cierre de recipiente después de la reacción puede suprimirse. Esto es muy deseable desde el punto de vista preventivo de contaminación.

#### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa esquemáticamente las partes (1) y (2) del principio de reacción de una realización preferida de acuerdo con la presente invención.

La Figura 2 representa esquemáticamente las partes (3) a (5) del principio de reacción de una realización preferida de acuerdo con la presente invención.

La Figura 3 representa esquemáticamente las partes (6) a (8) del principio de reacción de una realización preferida de acuerdo con la presente invención.

La Figura 4 representa esquemáticamente las partes (9) a (11) del principio de reacción de una realización preferida de acuerdo con la presente invención.

La Figura 5 es una fotografía de un gel de electroforesis después de una reacción de amplificación utilizando secuencias génicas del HBV, HCV y PSA.

La Figura 6 es una fotografía de un gel de electroforesis después de la reacción de amplificación en presencia o en ausencia de betaina.

La Figura 7 es una fotografía de un gel de electroforesis después de la reacción de amplificación en presencia de prolina y DMSO.

- 5 La Figura 8 es un gráfico que muestra un resultado de observar la influencia de un cebador externo en el procedimiento de amplificación de ácido nucleico de la presente invención. El eje vertical y el eje horizontal indican la intensidad de fluorescencia y el tiempo de reacción, respectivamente.

#### Mejor modo para realizar la invención

A continuación, la presente invención también se ilustra específicamente como ejemplo.

#### 10 [Ejemplo 1] Amplificación de secuencias génicas del HBV, HCV y PSA

El procedimiento de síntesis de ácido nucleico de la presente invención se realizó utilizando como molde un ADN (bicatenario) que se preparó incorporando en un plásmido cada una de las secuencias parciales génicas del HBV, HCV y PSA. En el experimento se utilizaron cuatro tipos de cebadores -Interno F, Interno R, Externo F y Externo R-. Los cebadores externos F y R son cebadores externos para el desplazamiento de un primer ácido nucleico obtenido utilizando, como orígenes de síntesis, los cebadores internos F y R, respectivamente.

La concentración del cebador F Interno (o R Interno) se estableció elevada de tal manera que la hibridación del cebador se produciría predominantemente. Las secuencias molde del Ejemplo de la presente invención, derivadas de HBV, HCV y PSA, que se incorporaron en plásmidos se muestran en la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3, respectivamente. Adicionalmente, a continuación se muestran las secuencias de los cebadores (F Interno, R Interno, F Externo y R Externo) utilizados para amplificar los moldes respectivos.

· HBV:

F Interno (SEC ID N°: 4):

5'-GATAAAACGCCGACACATCCTTCCAACCTCTTGTCCTCAA-3'

R Interno (SEC ID N°: 5):

25 5'-CCTGCTGCTATGCCTCATCTTCTTTGACAAACGGGCAACATACCTT-3'

F Externo (SEC ID N°: 6):

5'-CAAATTCGAGTCCCAAC-3'

R Externo (SEC ID N°: 7):

5'-GGTGGTTGATGTTCTGGA-3'

30 · HCV:

F Interno (SEC ID N°: 8):

5'-GAGTGGGTTTATCCAAGAAAGGACTTTAGCCATAGTGGTCTGCGGA-3'

R Interno (SEC ID N°: 9):

5'-CTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGCTTTGCACTCGCAAGCACCTATC-3'

35 F Externo (SEC ID N°: 10):

5'-GCAGAAAGCGTCTAGCCATGG-3'

R Externo (SEC ID N°: 11):

5' -CTAGCCGAGTAGCGTTGGGTTGC-3'

· PSA:

40 F Interno (SEC ID N°: 12):

5' -TGTTCTGATGCAGTGGGCAGCTTTAGTCTGCGGCGGTGTTCTG-3'

R Interno (SEC ID N°: 13):

5'-TGCTGGGTCGGCACAGCCTGAAGCTGACCTGAAATACCTGGCCTG-3'

F Externo (SEC ID N°: 14):

5'-TGCTTGTGGCCTCTCGTG-3'

R Externo (SEC ID N°: 15):

5'-GGGTGTGTGAAGCTGTG-3'

Además, las características de la configuración de cebadores se resumen a continuación.

F Interno:

Cebador región del lado 5'/región del lado 3'

F Interno la misma que la de la región F1c de la cadena complementaria sintetizada utilizando F Interno

10 /complementaria a la región F2c del ADN molde

R Interno la misma que la de la región R1c de la cadena complementaria sintetizada utilizando R Interno

/complementaria a la región R2c de la cadena complementaria sintetizada utilizando F Interno

F Externo complementario a F3c adyacente al lado 3' de la región F2c del ADN molde

15 R Externo complementario a R3c adyacente al lado 3' de la región R2c de la cadena complementaria sintetizada utilizando F Interno

Estos cebadores sintetizaron el ácido nucleico en el que la región, desde la región F1c a R1c, donde se incorporó la secuencia parcial del gen individual y su secuencia de nucleótidos complementaria se conectan pluralmente sobre una cadena sencilla que intercala la secuencia formadora de bucle que contiene F2c. A continuación se muestra la composición de la solución de reacción para el procedimiento de síntesis de ácido nucleico utilizando estos

20 cebadores de acuerdo con la presente invención.

· Composición de la solución de reacción (en 25 µl)

Tris-HCl 20 mM, pH 8,8

KCl 10 mM

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM

25 MgSO<sub>4</sub> 4 mM

Betaína 1 M

Tritón X-100 al 0,1%

dNTP 0,4 mM

ADN polimerasa Bst (NEW ENGLAND BioLabs) 8 U

30

Cebador:

F Interno 1600 nM

R Interno 1600 nM

F Externo 400 nM

35 R Externo 400 nM

Molde:

ADN de HBV 1 X 10<sup>-20</sup> mol

ADN de HCV 1 X 10<sup>-17</sup> mol

ADN de PSA 1 X 10<sup>-22</sup> mol

Como molde, se preparan los que no estaban térmicamente desnaturalizados. La solución de reacción se hizo reaccionar a 65 °C durante una hora.

Confirmación de la reacción: se añadieron 5 µl de tampón de carga a 5 µl de la solución de reacción anterior, y después, se cargó sobre un gel de agarosa al 2% (TBE al 0,5 %). La electroforesis se realizó durante 0,5 horas a 100 V. Como marcador de tamaño molecular, se utilizó ΦX174 Hae III. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio (en el presente documento, abreviado como EtBr) para visualizar los ácidos nucleicos. En la Figura 6 se representan los resultados. Cada uno de los carriles corresponde a los siguientes ejemplos.

Carril 1: ΦX174 Hae III

Carril 2: ADN (+), PSA

Carril 3: ADN (-), PSA

Carril 4: ADN (+), HBV

Carril 5: ADN (-), HBV

Carril 6: ADN (+), HCV

Carril 7: ADN (-), HCV

Como resultado de los experimentos, incluso en los casos de utilizar como molde cualquiera de los ADN, tales como de HBV, HCV, y PSA, se observó una escalera que es característica para el producto de amplificación por los cebadores internos de la presente invención. Se confirmó que la síntesis del ácido nucleico es posible en una condición de temperatura constante utilizando, como molde, el ácido nucleico bicatenario y cebadores internos en combinación con cebadores externos.

#### [Ejemplo 2] Amplificación en presencia de betaína

El procedimiento de síntesis de ácido nucleico de la presente invención se realizó utilizando un ADN ( $1 \times 10^{-17}$  mol) en el que la secuencia parcial del gen del HCV se incorporó en un plásmido, como molde. En el experimento se utilizaron cuatro tipos de cebadores - F Interno, R Interno, F Externo y R Externo -. En este momento, también se preparó una solución de reacción que no contenía betaína.

Como molde, se prepararon los que no estaban térmicamente desnaturalizados. Las soluciones de reacción se hicieron reaccionar a 65 °C durante una hora y dos horas.

Confirmación de la reacción: se añadieron 5 µl de tampón de carga a 5 µl de la solución de reacción anterior y después, se cargó sobre un gel de agarosa al 2% (TBE al 0,5 %). La electroforesis se realizó durante 0,5 horas a 100 V. Como un marcador de tamaño molecular, se utilizó ΦX174 Hae III. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con EtBr para visualizar los ácidos nucleicos. El resultado se representa en la Figura 7. Cada uno de los carriles corresponde a los siguientes ejemplos.

Carril 1: ΦX174 Hae III

Carril 2: ADN (-), Betaína (-), 1h

Carril 3: ADN (+), Betaína (-), 1h

Carril 4: ADN (-), Betaína (+), 1h

Carril 5: ADN (+), Betaína (+), 1h

Carril 6: ΦX174 Hae III

Carril 7: ADN (-), Betaína (-), 2h

Carril 8: ADN (+), Betaína (-), 2h

Como resultado de los experimentos, cuando el tiempo de reacción fue de una hora, solo se observó amplificación en presencia de betaína. Por otro lado, cuando el tiempo de reacción se prolongó a 2 horas, se observó amplificación incluso en ausencia de betaína. Concretamente, pudo confirmarse que la amplificación también se observaba en un sistema de reacción normal.

#### [Ejemplo 3] Amplificación en presencia de prolina o DMSO

El procedimiento de síntesis de ácido nucleico de la presente invención se realizó utilizando ADN ( $1 \times 10^{-17}$  mol) en el que la secuencia parcial del gen del HCV se incorporó en un plásmido, como molde. En los experimentos se

utilizaron cuatro tipos de cebadores - F Interno, R Interno, F Externo y R Externo -.

Se añadió prolina o DMSO a la solución de reacción en lugar de betaína de tal manera que la concentración final de prolina o de DMSO era del 1 % o del 5 %. La otra composición de la solución de reacción era la misma a la descrita anteriormente.

- 5 Como molde, se prepararon los que no estaban desnaturalizados térmicamente. La solución de reacción se hizo reaccionar a 65 °C durante dos horas.

10 Confirmación de la reacción: se añadieron 5 µl de tampón de carga a 5 µl de la solución de reacción anterior y después, se cargó sobre un gel de agarosa al 2% (TBE al 0,5 %). La electroforesis se realizó durante 0,5 horas a 100 V. Como un marcador de tamaño molecular, se usó ΦX174 Hae III. Después de la electroforesis, el gel se tiñó con EtBr para visualizar los ácidos nucleicos. El resultado se representa en la Figura 8. Cada uno de los carriles corresponde a los siguientes ejemplos.

Carril 1: ΦX174 Hae III

Carril 2: prolina (+)

Carril 3: DMSO (+)

- 15 Carril 4: Betaína (-)

Como resultado de la reacción de amplificación utilizando prolina o DMSO, que tiene un efecto similar (la acción de disminuir una temperatura de fusión) al de la betaína, puede confirmarse que la reacción de amplificación prosiguió incluso si se utilizaba prolina o DMSO.

#### [Ejemplo 4] Influencia de cebadores externos

20 El procedimiento de síntesis de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se realizó utilizando ADN lambda (SEC ID N°: 16, 1 X 10<sup>5</sup> moléculas) que es una cadena lineal y sirve como secuencia de nucleótidos diana. Para el experimento se utilizaron cuatro tipos de cebadores -F Interno, R Interno, F Externo y R Externo-. Las reacciones en las que no se utilizaron los cebadores externos F y R se realizaron en el mismo momento. Se añadió bromuro de etidio (EtBr) a todos los sistemas de reacción a una concentración final de 0,25 µg/ml.

25 La diana, que no está térmicamente desnaturalizada, se preparó. Las soluciones de reacción se hicieron reaccionar a 65 °C durante 1,5 horas y el cambio de intensidad de fluorescencia se observó en el intervalo de tiempo utilizando ABI 7700 (Perkin Elmer). El EtBr es un agente de tinción fluorescente que es específico para el ácido nucleico bicatenario. Por consiguiente, la intensidad de fluorescencia aumenta dependiendo de la cantidad de ácido nucleico bicatenario que se genera por la amplificación de ácido nucleico.

30 El resultado de la medición se muestra en la Figura 9. Se descubrió que la velocidad de amplificación era lenta en el sistema de reacción sin los cebadores externos.

La secuencia de nucleótidos del cebador ADN lambda

F Interno (SEC ID N°: 17):

CAGCCAGCCGCAGCACGTTTCGCTCATAGGAGATATGGTAGAGCCGC

35 R Interno (SEC ID N°: 18):

GAGAGAATTTGTACCACCTCCCACCGGGCACATAGCAGTCCTAGGGACAGT

F Externo (SEC ID N°: 19):

GGCTTGGCTCTGCTAACACGTT

R Externo (SEC ID N°: 20):

40 GGACGTTTGTAAATGTCCGCTCC

#### Aplicabilidad industrial

45 La presente invención proporciona un procedimiento de síntesis de ácido nucleico que elimina la necesidad de cambiar la temperatura sin deteriorar la especificidad y eficacia de la reacción. Aunque la presente invención utiliza, como molde, ácido nucleico bicatenario, el cambio de temperatura para desnaturalizar es innecesario. Por consiguiente, la síntesis del ácido nucleico puede realizarse sin utilizar equipos que tengan un mecanismo de control de temperatura específicos. Además, de acuerdo con la presente invención que no requiere ciclado térmico, una reacción no específica ocasionada por un cambio de temperatura puede prevenirse de manera esperada.

El procedimiento de síntesis de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede aplicarse a cualquier procedimiento de síntesis de ácido nucleico basado en un principio utilizando un cebador como origen de síntesis. En particular, una mayor eficacia de síntesis puede conseguirse cuando se combina con la reacción de síntesis de ácido nucleico basada en un principio que no requiere originalmente un cambio de temperatura. El procedimiento de 5  
amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos, que proporciona un producto amplificado con una configuración en la que la región 3' terminal puede hibridarse con una parte de ella misma, puede conseguir excelente operatividad y especificidad cuando se combina con la presente invención. Puede conseguirse un alto nivel de eficacia de amplificación solamente incubando el ácido nucleico bicatenario, que se 10  
transforma en un molde, junto con un cebador y una ADN polimerasa a temperatura constante. La presente invención permite un procedimiento de amplificación de ácido nucleico que no requiere un cambio de temperatura conservando al mismo tiempo una alta especificidad y una alta eficacia de amplificación.

Dado que el procedimiento de síntesis de ácido nucleico basado en la presente invención no requiere cambios de temperatura, el control de la reacción puede realizarse fácilmente. Concretamente, un mecanismo de incubación que proporcione una temperatura constante y un equipo con un mecanismo de lectura óptica puede utilizarse para 15  
controlar la reacción. Dicho mecanismo es un mecanismo general proporcionado en equipos de análisis ópticos convencionales. Por consiguiente, el procedimiento de amplificación de ácido nucleico basado en la presente invención permite el control mediante un equipo de análisis convencional.

Como se ha descrito anteriormente, el procedimiento de síntesis de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención no requiere un control de temperatura complicado, que es un problema asociado con los procedimientos 20  
conocidos, tales como los procedimientos de la PCR, y simplifica de un modo notable la operación experimental. Adicionalmente, la presente invención permite un procedimiento de amplificación de ácido nucleico que no requiere equipamiento específico para el control de la temperatura y que por tanto puede utilizarse de un modo general. Además, en la presente invención, puede impedirse la reacción no específica producida por el cambio de 25  
temperatura.



## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eiken Chemical Co., Ltd.

5 <120> PROCEDIMIENTO DE AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDO NUCLEICO UTILIZANDO COMO MOLDE ÁCIDO NUCLEICO BICATENARIO

<130> EP25540IFZapu

10 <140> sin asignar aún  
<141> adjunto

<150> 01 917 714.6

<151> 30-03-2001

15 <150> JP 2000-111939  
<151> 07-04-2000

<160> 20

20 <170> Patentin ver. 2.0

<210> 1

<211> 198

<212> ADN

25 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 1

```

caaaattcgc agtccccaac ctccaatcac tcaccaacct cttgtcctcc aatttgtcct 60
ggctatcgct ggatgtgtct gcggcgtttt atcatattcc tcttcatcct gctgctatgc 120
ctcatcttct tgttggttct tctggactac caaggtagtg tgcccgtttg tcctctactt 180
ccaggaacat caaccacc 198

```

30 <210> 2

<211> 279

<212> ADN

<213> Virus de la hepatitis C

35 <400> 2

```

gcagaaagcg tctagccatg gcgttagtat gagtgtcgtg cagcctccag gccccccct 60
cccgggagag ccatagtggg ctgcggaacc ggtgagtaca ccggaattac cggaaagact 120
gggtcctttc ttggataaac ccactctatg tccggtcatt tgggcgtgcc ccgcaagac 180
tgctagccga gtagcgttgg gttgcgaaag gccttgtggg actgcctgat aggggtgctg 240
cgagtgcccc gggaggcttc gtagaccgtg catcatgag 279

```

<210> 3

<211> 178

40 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

tgcttgtggc ctctcgtggc agggcagtct gcggcggtgt tctggtgcac ccccagtggg 60
tcctcacagc tgcccactgc atcaggaaca aaagcgtgat cttgctgggt cggcacagcc 120
tgtttcatcc tgaagacaca ggccaggtat ttcaggtcag ccacagcttc acacaccc 178

```

45

<210> 4

<211> 44

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente

55 <400> 4

gataaaagcg cgagacaca tcctccaac ctctgtcct ccaa

44

ES 2 464 132 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <210> 5   |    |
|    | <211> 46  |    |
|    | <212> ADN   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial  |    |
| 5  | <220>   |    |
|    | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
|    | <400> 5   |    |
| 10 | cctgctgcta tgctcatct tctttgacaa acgggcaaca tacctt   | 46 |
|    | <210> 6   |    |
|    | <211> 20  |    |
|    | <212> ADN   |    |
| 15 | <213> Secuencia Artificial  |    |
|    | <220>   |    |
|    | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
|    | <400> 6   |    |
| 20 | caaaattcgc agtccccaac   | 20 |
|    | <210> 7   |    |
|    | <211> 19  |    |
| 25 | <212> ADN   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial  |    |
|    | <220>   |    |
|    | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
| 30 | <400> 7   |    |
|    | ggtggtgat gttcctgga   | 19 |
|    | <210> 8   |    |
| 35 | <211> 46  |    |
|    | <212> ADN   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial  |    |
|    | <220>   |    |
| 40 | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
|    | <400> 8   |    |
|    | gagtgggtt atccaagaaa ggactttagc catagtggtc tgcgga   | 46 |
| 45 | <210> 9   |    |
|    | <211> 46  |    |
|    | <212> ADN   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial  |    |
| 50 | <220>   |    |
|    | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
|    | <400> 9   |    |
| 55 | ctagccgagt agcgtgggt tgctttgcac tgcaagcac cctatc  | 46 |
|    | <210> 10  |    |
|    | <211> 21  |    |
|    | <212> ADN   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial  |    |
| 60 | <220>   |    |
|    | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
|    | <400> 10  |    |
| 65 | gcagaaagcg tctagccatg g   | 21 |

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <210> 11  |    |
|    | <211> 23  |    |
|    | <212> ADN   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial  |    |
| 5  | <220>   |    |
|    | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
|    | <400> 11  |    |
| 10 | ctagccgagt agcgttggtg tgc   | 23 |
|    | <210> 12  |    |
|    | <211> 44  |    |
|    | <212> ADN   |    |
| 15 | <213> Secuencia Artificial  |    |
|    | <220>   |    |
|    | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
|    | <400> 12  |    |
| 20 | tgctcctgat gcagtgaggca gcttagtct gggcggtg tctg  | 44 |
|    | <210> 13  |    |
|    | <211> 45  |    |
| 25 | <212> ADN   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial  |    |
|    | <220>   |    |
|    | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
| 30 | <400> 13  |    |
|    | tgctgggtcg gcacagcctg aagctgacct gaaatacctg gcctg   | 45 |
|    | <210> 14  |    |
| 35 | <211> 18  |    |
|    | <212> ADN   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial  |    |
|    | <220>   |    |
| 40 | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
|    | <400> 14  |    |
|    | tgctgtggc ctctcgtg  | 18 |
| 45 | <210> 15  |    |
|    | <211> 17  |    |
|    | <212> ADN   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial  |    |
| 50 | <220>   |    |
|    | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
|    | <400> 15  |    |
| 55 | gggtgtgga agctgtg   | 17 |
|    | <210> 16  |    |
|    | <211> 245   |    |
|    | <212> ADN   |    |
|    | <213> Bacteriófago lambda   |    |
| 60 | <400> 16  |    |
|    | ggcttggtc tgctaacacg ttgctcatag gagatatggt agagccgcag acacgtcgtg 60                       |    |
|    | tgcaggaacg tgctgaggct ggctgggtgaa cttccgatag tgcgggtgtt gaatgatttc 120                    |    |
|    | cagttgctac cgattttaca tattttttgc atgagagaat ttgtaccacc tcccaccgac 180                     |    |
|    | catctatgac tgtacgccac tgtccctagg actgctatgt gccggagcgg acattacaaa 240                     |    |
|    | cgccc 245   |    |

ES 2 464 132 T3

|    |   |    |
|----|---|----|
|    | <210> 17  |    |
|    | <211> 46  |    |
|    | <212> ADN   |    |
| 5  | <213> Secuencia Artificial  |    |
|    | <220>   |    |
|    | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
| 10 | <400> 17  |    |
|    | cagccagccg cagcacgttc gctcatagga gatatggtag agccgc  | 46 |
|    | <210> 18  |    |
|    | <211> 51  |    |
| 15 | <212> ADN   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial  |    |
|    | <220>   |    |
|    | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
| 20 | <400> 18  |    |
|    | gagagaattt gtaccacctc ccaccgggca catagcagtc ctagggacag t                                  | 51 |
|    | <210> 19  |    |
| 25 | <211> 22  |    |
|    | <212> ADN   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial  |    |
|    | <220>   |    |
| 30 | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
|    | <400> 19  |    |
|    | ggcttggctc tgtaacacg tt   | 22 |
| 35 | <210> 20  |    |
|    | <211> 22  |    |
|    | <212> ADN   |    |
|    | <213> Secuencia Artificial  |    |
| 40 | <220>   |    |
|    | <223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia Cebadora Sintetizada Artificialmente |    |
|    | <400> 20  |    |
| 45 | ggacgttgt aatgtocgct cc   | 22 |

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de amplificación de ácido nucleico a temperatura constante utilizando, como molde, ácido nucleico bicatenario, en el que una cadena del ácido nucleico bicatenario comprende las regiones F3c, F2c, F1c, R1, R2 y R3 del lado 3' del ácido nucleico bicatenario y en el que la otra cadena del ácido nucleico bicatenario comprende las regiones complementarias F3, F2, F1, R1c, R2c y R3c del lado 5' del ácido nucleico bicatenario, en el que el procedimiento comprende:
- 5
- a) incubar un molde de ácido nucleico bicatenario y un cebador interno RA constituido por las regiones R1c y R2, mediante lo cual la región R2 se hibrida con la región R2c en el molde de ácido nucleico bicatenario en presencia de una ADN polimerasa que cataliza una reacción de síntesis de cadena complementaria acompañada de desplazamiento de cadena, en una condición en la que el ácido nucleico bicatenario es inestable utilizando, como origen, el cebador interno RA, tal como una región F2c del ácido nucleico molde diana a hibridar por un cebador interno FA constituido por las regiones F1c y F2, mediante el cual la región F2 se hibrida con la región F2c en el molde de ácido nucleico bicatenario que puede amplificar el ácido nucleico molde a una temperatura constante cuando la cadena sencilla liberada se hibrida intramolecularmente consigo misma
- 10
- b) hibridar un cebador externo F3 con la región F3c de la cadena sencilla desplazada en la etapa a), que se coloca en una condición de tal manera que puede experimentar emparejamiento de bases;
- 15
- c) realizar la síntesis de cadena complementaria utilizando, como origen de síntesis, el cebador externo F3, mediante lo cual el producto extendido, sintetizado utilizando como origen el cebador interno FA, se desplaza y se libera como una cadena sencilla; y
- 20
- d) utilizar la cadena sencilla como molde, el cebador interno RA y el cebador externo R3, mediante lo cual la región R2 se hibrida con la región R2c, y R3 se hibrida con la región R3c en la cadena sencilla desplazada en la etapa c) e iniciar la síntesis de cadena complementaria.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa a) se realiza en presencia de un regulador de temperatura de fusión.
- 25
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el regulador de temperatura de fusión es al menos uno de los compuestos seleccionados del grupo que consiste en betaína, prolina, dimetil sulfóxido y trimetilamina-N-óxido.

Figura 1

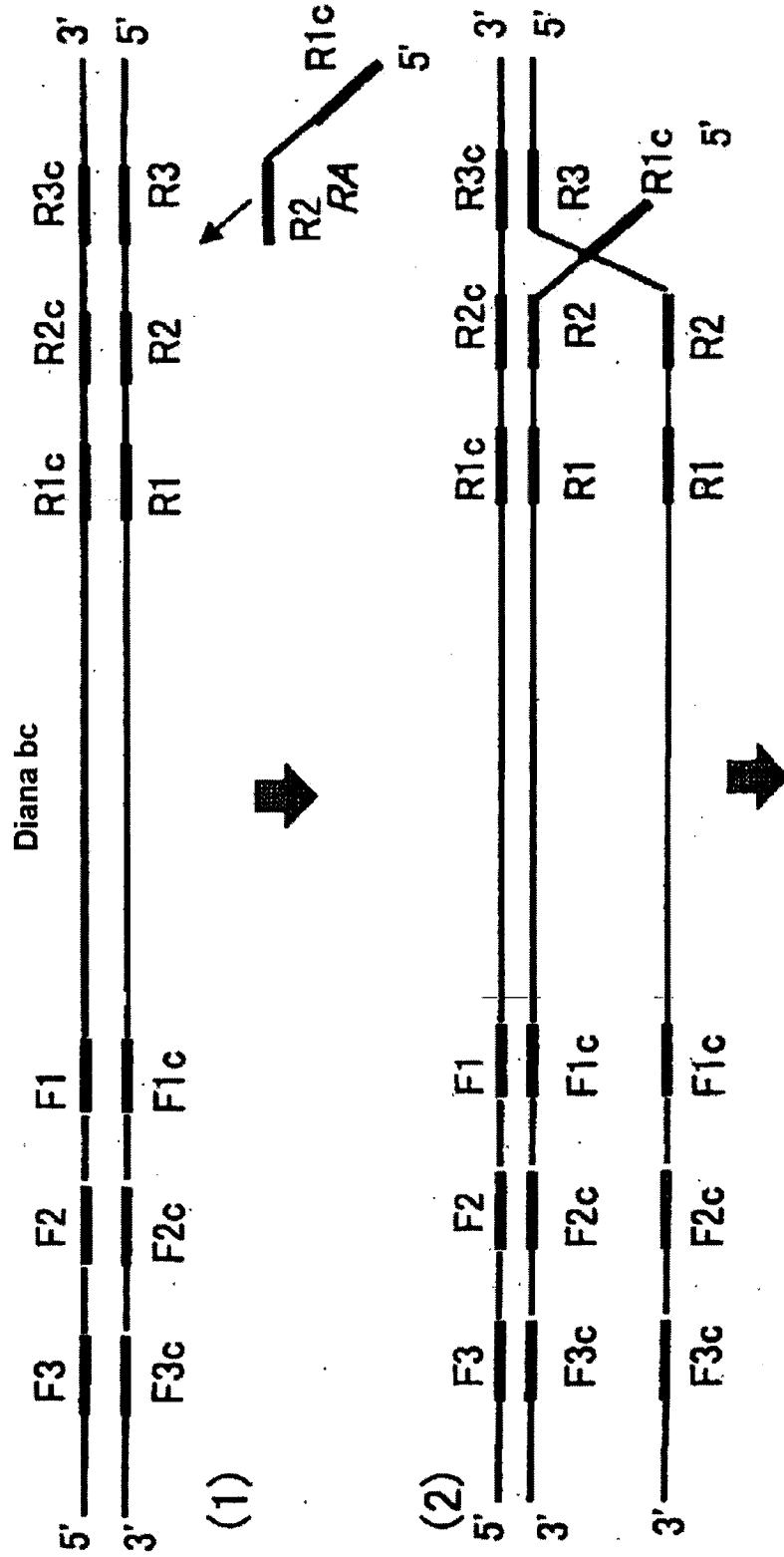


Figura 2

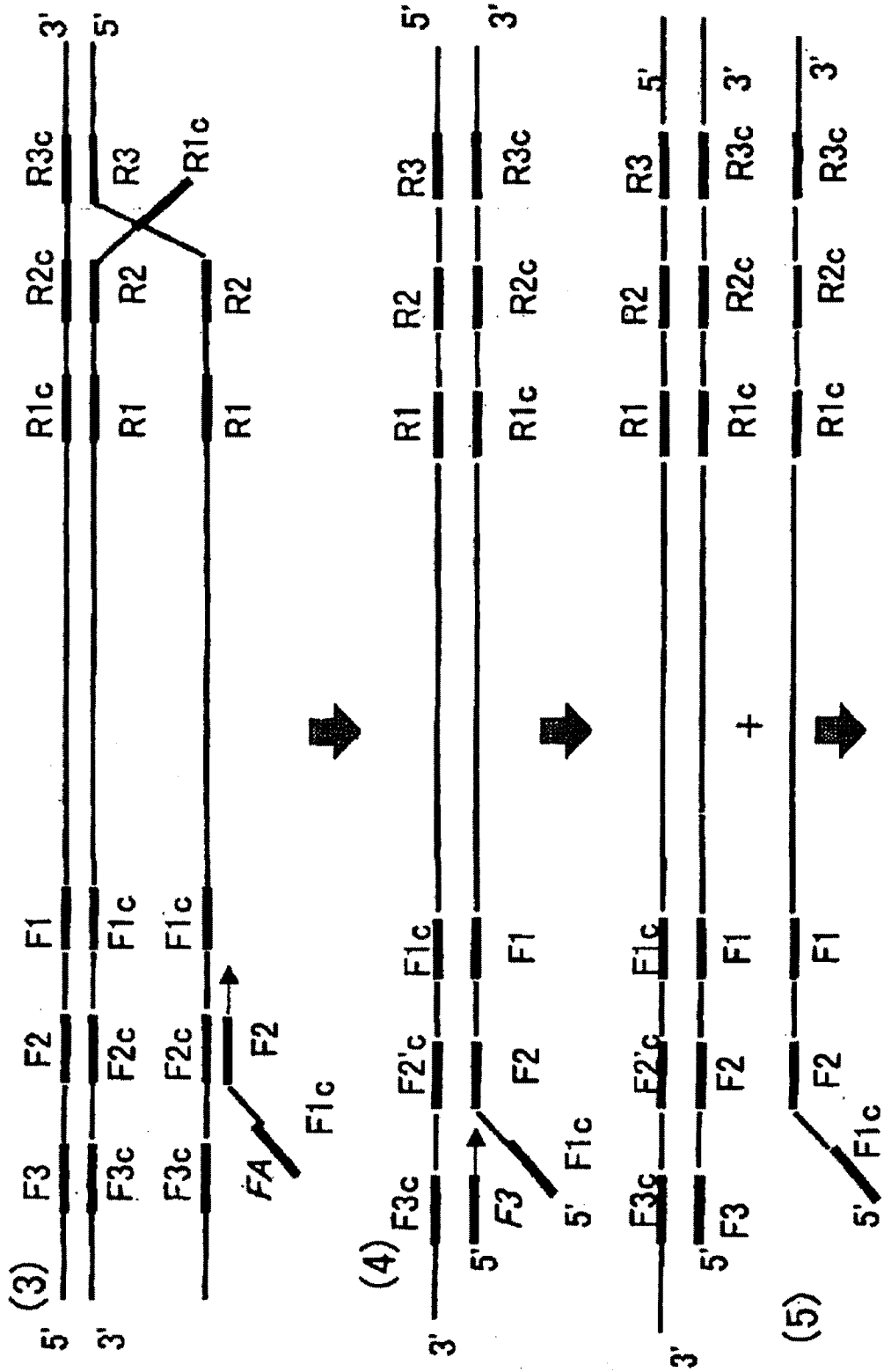


Figura 3

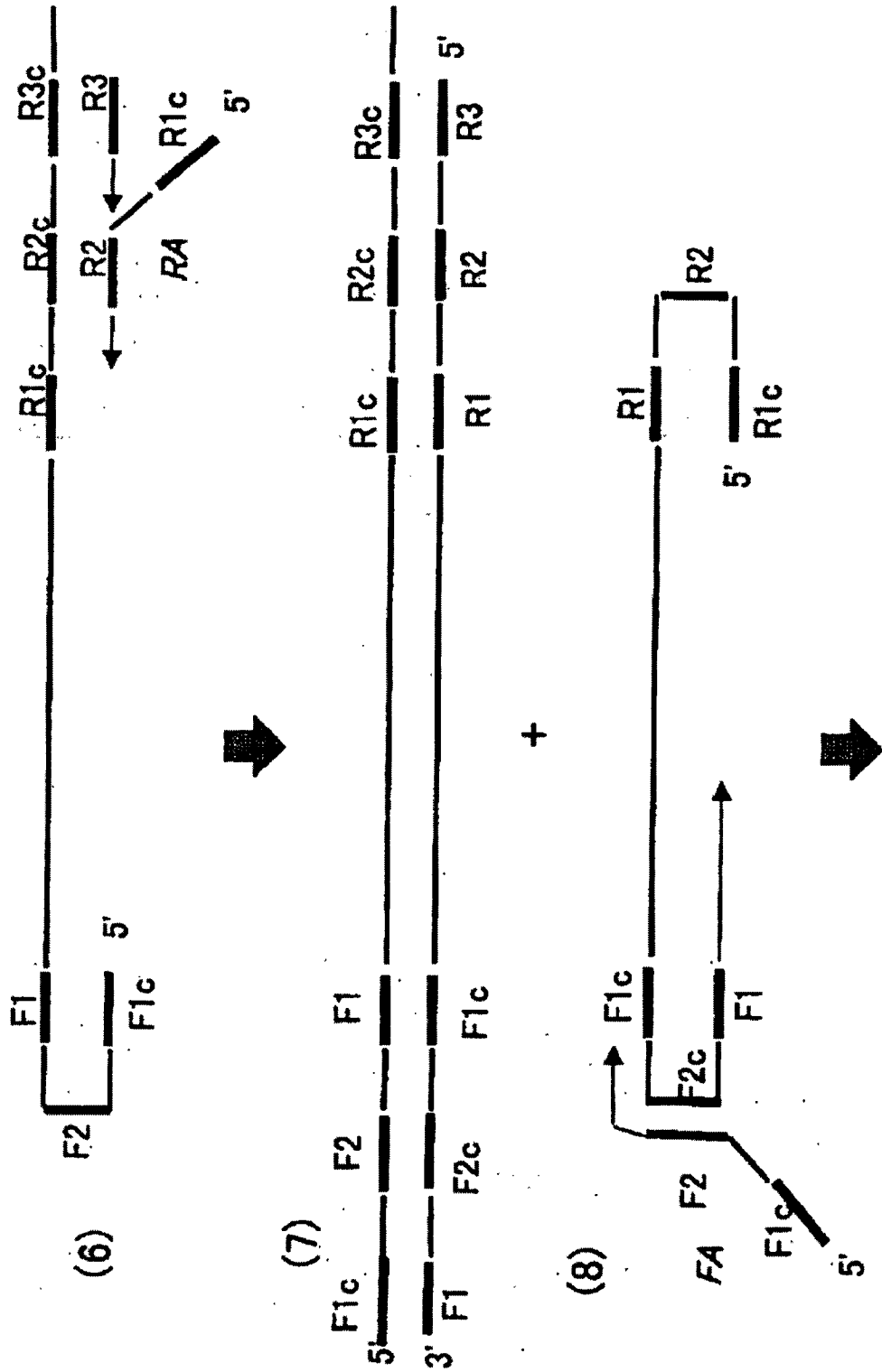
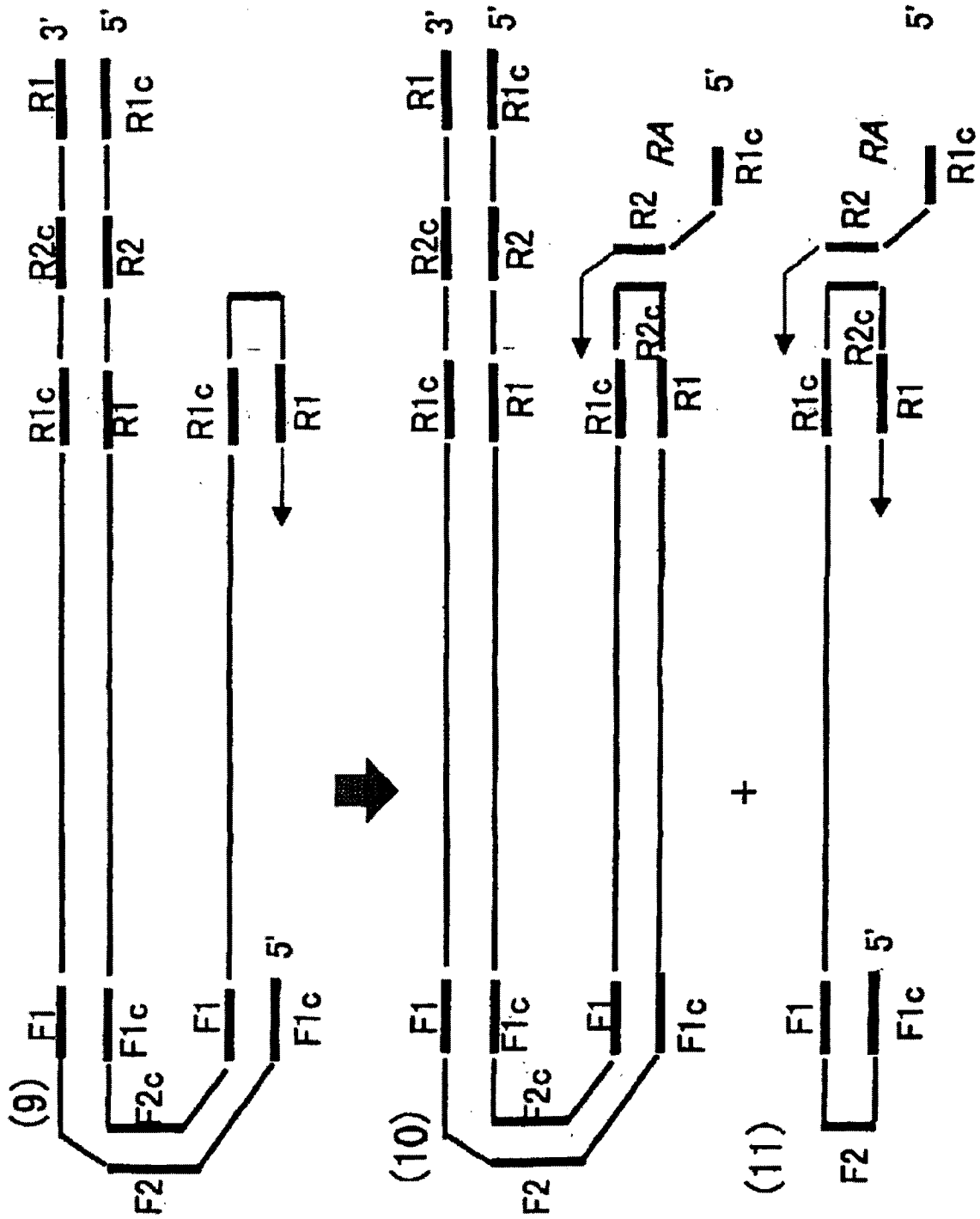




Figura 4



**Figura 5**

1 2 3 4 5 6 7

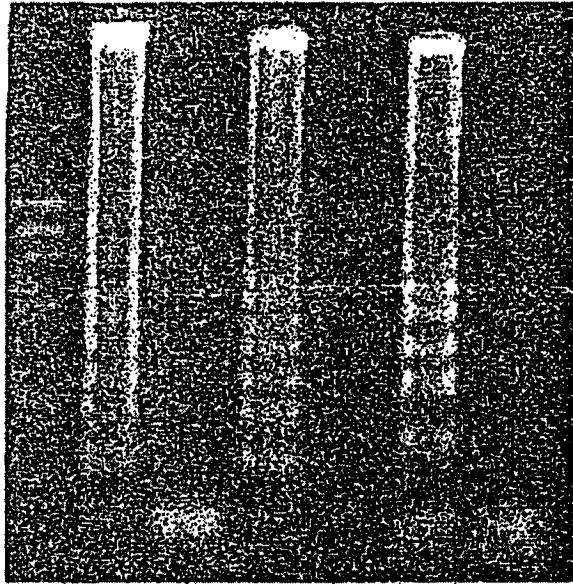
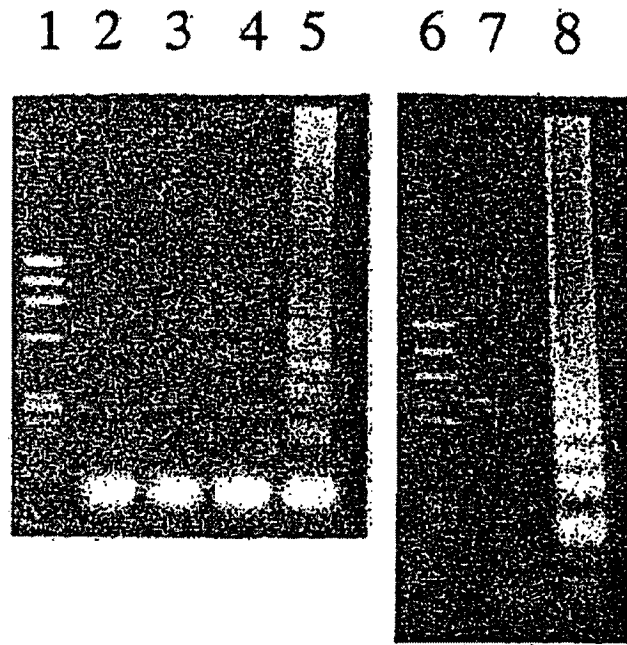


Figura 6



**Figura 7**

1 2 3 4



Figura 8

