

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 011 358**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/686 (2008.01)

B01L 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2013 E 21184359 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2025 EP 3957748**

54 Título: **PCR extrema**

30 Prioridad:

24.05.2012 US 201261651161 P

12.04.2013 US 201361811145 P

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

07.04.2025

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION
(100.00%)
590 Wakara Way
Salt Lake City, UT 84108, US**

72 Inventor/es:

**WITTWER, CARL T. y
FARRAR, JARED, STEVEN**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 011 358 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

PCR extrema

5 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica ampliamente utilizada en biología molecular. Obtiene su nombre de uno de sus componentes clave, una ADN polimerasa utilizada para amplificar un fragmento de ADN mediante replicación enzimática in vitro. A medida que avanza la PCR, el propio ADN generado (el amplicón) se utiliza como plantilla para la replicación. Esto pone en marcha una reacción en cadena en la que la plantilla de ADN se amplifica exponencialmente. Con la PCR, es posible amplificar una o más copias de un fragmento de ADN en varios órdenes de magnitud, generando millones o más copias del fragmento de ADN. La PCR emplea una polimerasa termoestable, dNTP y un par de cebadores.

15 La PCR se divide conceptualmente en 3 reacciones, cada una de las cuales se supone habitualmente que se produce con el tiempo a cada una de tres temperaturas. Dicho "paradigma de equilibrio" de PCR es fácil de entender en términos de tres reacciones (desnaturalización, hibridación y extensión) que se producen a 3 temperaturas durante 3 periodos de tiempo cada ciclo. Sin embargo, este paradigma de equilibrio no encaja bien con la realidad física. No se producen cambios de temperatura instantáneos; lleva tiempo cambiar la temperatura de la muestra. Además, las velocidades de reacción individuales varían con la temperatura, y una vez que se produce la hibridación de cebadores, la extensión de la polimerasa sigue inmediatamente. Más preciso, particularmente para la PCR rápida, es un paradigma cinético donde las velocidades de reacción y la temperatura siempre están cambiando. Mantener la temperatura constante durante la PCR no es necesario siempre que los productos se desnaturalicen y los cebadores hibriden. Bajo el paradigma cinético de la PCR, la desnaturalización del producto, la hibridación de cebadores y la extensión de la polimerasa pueden solaparse temporalmente y sus velocidades varían continuamente con la temperatura. Bajo el paradigma de equilibrio, un ciclo está definido por 3 temperaturas cada una mantenida durante un período de tiempo, mientras que el paradigma cinético requiere velocidades de transición y temperaturas diana. Los perfiles ilustrativos de tiempo/temperatura para los paradigmas de equilibrio y cinético se muestran en las figuras 15a-15b. Sin embargo, se entiende que estos perfiles de temperatura son solo ilustrativos y que, en algunas implementaciones de PCR, las etapas de hibridación y extensión se combinan de modo que solo se necesitan 2 temperaturas.

35 Los paradigmas no son correctos o incorrectos, pero su utilidad varía. El paradigma de equilibrio es simple de entender y se presta bien a la mentalidad de ingeniería y la fabricación de instrumentos. El paradigma cinético es más relevante para la bioquímica, la PCR de ciclo rápido y el análisis de la curva de fusión.

40 Cuando la PCR se popularizó por primera vez a finales de la década de 1980, el proceso fue lento. Un protocolo típico fue 1 minuto para la desnaturalización a 94 °C, 2 minutos para la hibridación a 55 °C y 3 minutos para la extensión a 72 °C. Cuando se incluyó el tiempo para la transición entre temperaturas, los ciclos de 8 minutos fueron típicos, lo que dio como resultado la finalización de 30 ciclos en 4 horas. El veinticinco por ciento del tiempo de ciclado se dedicó a transiciones de temperatura. A medida que aumentaban las velocidades de ciclado, la proporción de tiempo dedicado a las transiciones de temperatura también aumentaba y el paradigma cinético se hacía cada vez más relevante. Durante la PCR de ciclo rápido, la temperatura generalmente es cambiante. Para la PCR de ciclo rápido de productos cortos (<100 pb), el 100 % del tiempo se puede dedicar a la transición de temperatura y no son necesarios tiempos de mantenimiento. Para la PCR de ciclo rápido de productos más largos, se puede incluir un mantenimiento de la temperatura a una temperatura de extensión óptima.

50 En aislamiento, el término "PCR rápida" es relativo y vago. Una PCR de 1 hora es rápida en comparación con 4 horas, pero lenta en comparación con 15 minutos. Además, los protocolos de PCR se pueden acortar si se comienza con concentraciones de plantilla más altas o se utilizan menos ciclos. Una medida más específica es el tiempo requerido para cada ciclo. Por lo tanto, "PCR de ciclo rápido" (o "ciclado rápido") se definió en 1994 como 30 ciclos completados en 10-30 minutos (1), lo que da como resultado ciclos de 20-60 segundos cada uno. Este tiempo verdadero de cada ciclo es más largo que la suma de los tiempos programados a menudo para desnaturalización, hibridación y extensión, ya que se necesita tiempo para aumentar las temperaturas entre cada una de estas etapas. El trabajo inicial a principios de la década de 1990 estableció la viabilidad del ciclado rápido utilizando tubos capilares y aire caliente para el control de la temperatura. Con los años, los sistemas se han vuelto más rápidos y los requisitos cinéticos de desnaturalización, hibridación y extensión se han vuelto más claros.

65 En un sistema rápido temprano, un elemento calefactor y un ventilador de un secador de pelo, un termopar y muestras de PCR en tubos capilares se encerraron en una cámara (2). El ventilador creó un flujo rápido de aire calentado más allá del termopar y los capilares. Al hacer coincidir la respuesta térmica del termopar con la muestra, la temperatura del termopar siguió de cerca la temperatura de las muestras, incluso durante los cambios de temperatura. Aunque el aire tiene una baja conductividad térmica, el movimiento rápido del aire

5 contra la gran área superficial expuesta por los capilares fue adecuado para realizar ciclos de la muestra entre las temperaturas de desnaturalización, hibridación y extensión. Los controladores electrónicos monitorizaron la temperatura, ajustaron la potencia al elemento calefactor y proporcionaron el tiempo requerido y el número de ciclos. Para el enfriamiento, el controlador activó un solenoide que abrió un portal al aire exterior, introduciendo aire de enfriamiento en la cámara, de lo contrario, cerrada.

10 Las temperaturas se podían cambiar rápidamente utilizando el sistema de capilar/aire. Utilizando una cámara de baja masa térmica, aire circulante y muestras en capilares de vidrio, los productos de PCR >500 pb se visualizaron en geles teñidos con bromuro de etidio después de solo 10 minutos de PCR (30 ciclos de 20 segundos cada uno) (3). El rendimiento del producto se vio afectado por el tiempo de extensión y la concentración de polimerasa. Con tiempos de ciclo de 30 segundos (aproximadamente 10 segundos entre 70 y 80 °C para la extensión), la intensidad de la banda aumentó a medida que la concentración de polimerasa aumentó de 0,1 a 0,8 unidades por 10 µl de reacción. Se observa que las definiciones de unidades de polimerasa pueden ser confusas. Para la polimerasa Taq nativa, 0,4 U/10 µl es aproximadamente 1,5 nM en condiciones típicas de ciclado rápido (50).

20 Los protocolos rápidos utilizan mantenimientos momentáneos o de "0" segundos a las temperaturas de desnaturalización e hibridación. Es decir, los perfiles de temperatura-tiempo muestran picos de temperatura para desnaturalización e hibridación, sin mantener las temperaturas superior e inferior. La desnaturalización y la hibridación pueden producirse muy rápidamente.

25 El control rápido y preciso de la temperatura permitió el estudio analítico de las temperaturas y tiempos requeridos para la PCR. Para un fragmento ilustrativo de 536 pb de ADN genómico humano (β-globina), las temperaturas de desnaturalización entre 91 °C y 97 °C fueron igualmente efectivas, al igual que los tiempos de desnaturalización de <1 segundo a 16 segundos. Sin embargo, se descubrió que los tiempos de desnaturalización superiores a 16 segundos en realidad disminuían el rendimiento del producto. Se obtuvieron productos específicos con buen rendimiento con temperaturas de hibridación de 50-60 °C, siempre que el tiempo para la hibridación de cebadores fuera limitado. Es decir, la mejor especificidad se obtuvo mediante enfriamiento rápido desde la desnaturalización hasta la hibridación y un tiempo de hibridación de <1 segundo. El rendimiento fue mejor a temperaturas de extensión de 75-79 °C, y aumentó con el tiempo de extensión hasta aproximadamente 40 segundos.

35 Las conclusiones de este trabajo temprano fueron: 1) la desnaturalización de los productos de PCR es muy rápida sin necesidad de mantener la temperatura de desnaturalización, 2) la hibridación de los cebadores puede producirse muy rápidamente y las retenciones de la temperatura de hibridación pueden no ser necesarias, y 3) el tiempo de extensión requerido depende de la longitud del producto de PCR y la concentración de polimerasa. Además, la PCR de ciclo rápido no solo es más rápida, sino también mejor en términos de especificidad y rendimiento (4, 5) siempre que la temperatura se controle con precisión. La velocidad de la PCR no está limitada por la bioquímica disponible, sino por instrumentos que no controlan la temperatura de la muestra estrecha o rápidamente.

45 Sin embargo, la mayoría de los actuales instrumentos de PCR de laboratorio funcionan mal con tiempos de desnaturalización e hibridación momentáneos, y muchos ni siquiera permiten la programación de períodos de mantenimiento de "0" segundos. Los retrasos temporales de la transferencia térmica a través de las paredes de los tubos cónicos, las bajas relaciones de área superficial respecto a volumen y el calentamiento de muestras grandes obligan a la mayoría de los instrumentos a confiar en tiempos prolongados de desnaturalización e hibridación para garantizar que la muestra alcance las temperaturas deseadas. Con estos retrasos, la evolución temporal frente a temperatura exacta se vuelve indefinida. El resultado es una reproducibilidad limitada y una alta variabilidad entre productos comerciales (6). Muchos instrumentos muestran una marcada variación de temperatura durante las transiciones de temperatura (7, 8). El subimpulso y/o sobreimpulso de la temperatura es un problema crónico que rara vez se resuelve mediante un intento de predicción de software que depende del volumen de la muestra. Dichas dificultades se ven agravadas por las propiedades térmicas del instrumento que pueden cambiar con la edad.

55 Con el tiempo, los instrumentos convencionales de bloques de calor se han vuelto más rápidos, con mejoras graduales en los tubos de "pared delgada", una distribución de calor más conductiva entre las muestras, bloques de baja masa térmica y otras modificaciones "rápidas". Sin embargo, es inusual que estos sistemas realicen ciclos lo suficientemente rápidos como para completar un ciclo en menos de 60 segundos. Algunos sistemas de bloques de calor pueden lograr ciclos de <60 segundos, generalmente restringidos a ciclos de 2 temperaturas entre un intervalo limitado de temperaturas. Al aplanar el recipiente de la muestra, se puede lograr un ciclado rápido mediante calentamiento resistivo y enfriamiento por aire (9), o moviendo la muestra en un tubo flexible entre zonas de calentamiento mantenidas a una temperatura constante (Patente US. 6,706,617).

65 Las versiones comerciales del sistema de aire/capilar para PCR han estado disponibles desde 1991 (1) y

para PCR en tiempo real desde 1996 (10, 11). Las capacidades de ciclado rápido de otros instrumentos a menudo se comparan con el estándar de aire/capilar que demostró por primera vez ciclos de 20-60 segundos. Por extraño que parezca, ha habido una tendencia a hacer que los sistemas de capilar/aire sean más lentos a lo largo de los años, tal vez reflejando la incomodidad con la segunda desnaturalización "0" y los tiempos de hibridación de muchos usuarios. Además, las enzimas activadas por calor requieren largos períodos de activación, a menudo duplicando los tiempos de ejecución incluso cuando se utilizan enzimas de activación "rápida". Otro compromiso fuera del ciclado rápido es la utilización de capilares de plástico. Estos capilares no están ajustados térmicamente al instrumento, por lo que a menudo se requieren mantenimientos de 20 segundos en la desnaturalización y la hibridación para alcanzar las temperaturas diana (12).

Se ha producido algún progreso en la disminución adicional de los tiempos de ciclo para la PCR en microsistemas, donde se procesan de forma natural pequeños volúmenes (13, 14). Sin embargo, incluso con cámaras de muestra de alta área superficial respecto a volumen, los ciclos pueden ser largos si el elemento calefactor tiene una masa térmica alta y es externo a la cámara (15). Con calentadores resistivos de película delgada y sensores de temperatura cerca de las muestras, se puede lograr una amplificación de 10-30 minutos (16, 17).

Aunque el enfriamiento de los sistemas de baja masa térmica generalmente se realiza por difusión térmica pasiva y/o por aire forzado, se han desarrollado varios procedimientos de calentamiento interesantes. Se puede utilizar radiación infrarroja para calentar (18) con pirometría infrarroja calibrada para monitorización de temperatura (19). Como alternativa, películas metálicas delgadas en capilares de vidrio pueden servir como un elemento calefactor resistivo y un sensor de temperatura para ciclado rápido (20). Finalmente, el calentamiento directo de Joule y la monitorización de temperatura de la solución de PCR por resistencia electrolítica es posible y se ha implementado en capilares (21). Todos los procedimientos anteriores transfieren calor hacia y desde muestras fijas.

En lugar de la transferencia de calor hacia y desde muestras estacionarias, las muestras se pueden mover físicamente a baños de diferente temperatura, o a través de canales con zonas de temperatura fija. Los procedimientos microfluídicos se han vuelto populares, con el fluido de PCR pasando dentro de los canales a través de diferentes segmentos mantenidos a temperaturas de desnaturalización, hibridación y extensión. La PCR de flujo continuo se ha demostrado dentro de canales serpentina que pasan hacia delante y hacia atrás a través de 3 zonas de temperatura (22) y dentro de bucles de radio creciente o decreciente que pasan a través de 3 sectores de temperatura (23). Una variante con un diseño de serpentina utiliza gradientes térmicos estacionarios en lugar de zonas isotérmicas, para ajustarse más estrechamente al paradigma cinético de PCR (24). Para limitar la longitud del microcanal necesario para la PCR, algunos sistemas transfieren muestras hacia delante y hacia atrás entre zonas de temperatura mediante flujo impulsado por presión bidireccional (25), fuerzas neumáticas (26) o electrocinéticas (27). En lugar de la transferencia lineal de muestras, se puede utilizar un solo canal circular con movimiento de muestras impulsado como un ferrofluido magnético (28) o por convección (29). Una ventaja potencial de la PCR del microsistema, que incluye procedimientos de flujo continuo, es la velocidad de ciclado.

Aunque algunos microsistemas aún requieren ciclos de >60 segundos, muchos operan en el intervalo de ciclo de 20-60 segundos de PCR de ciclo rápido (13, 30). Se han descrito tiempos de ciclo mínimos que oscilan entre 16-37 segundos para el calentamiento por infrarrojos (18, 19). Los capilares recubiertos de metal han logrado ciclos de PCR de 40 segundos (20), mientras que el calentamiento electrolítico directo ha amplificado con ciclos de 21 segundos (20). Los tiempos de ciclo mínimos descritos para la PCR convectiva de bucle cerrado oscilan entre 24-42 segundos (29, 31). Varios grupos se han centrado en reducir los tiempos de ciclo de PCR a <20 segundos, más rápido que la definición original de PCR de ciclo rápido que se demostró por primera vez en 1990. El calentamiento resistivo de película delgada de muestras estacionarias ha reducido los tiempos de ciclo a 17 segundos para muestras de 25 μl (32) y 8,5 segundos para muestras de 100 nL (17). Los sistemas de flujo continuo han logrado ciclos de 12-14 segundos con PCR de gradiente térmico (24) y transferencia de muestra (26), mientras que un bucle de ferrofluido reivindica una PCR exitosa con ciclos de 9 segundos (28). Los sistemas de flujo continuo a través de sustratos de vidrio y plástico han logrado tiempos de ciclo de 6,9 segundos (22) y 5,2 segundos (23) para productos de PCR de diversos tamaños. Alternar la conducción de agua fría y caliente a través de un sustrato de aluminio amplificó gotas de 1 μl en aceite con ciclos de 5,25 segundos (33). De manera similar, la conducción de agua a través de un bloque de cobre poroso amplificó muestras de 5 μl con 4,6 segundos de ciclos (34). Un dispositivo de flujo continuo de tacos de reacción de 1 μl aumentado por la presión de vapor logró ciclos de 3 segundos (35). Adicionalmente, hay informes que reivindican amplificar un fragmento de 85 pb del bacteriófago Stx de E. coli en capilares con ciclos de 2,7 segundos por inmersión de los capilares en galio intercalados entre elementos de Peltier (36). Como alternativa, la amplificación por PCR en capilares ciclada por gases calientes y fríos presurizados obtuvo 2,6 segundos de ciclos (48).

La tabla 1 resume el trabajo para minimizar los tiempos de ciclo de PCR a menos de los ciclos de 20 segundos que definieron originalmente "PCR rápida". En los últimos 20 años, se han desarrollado nuevos prototipos de instrumentos que mejoran gradualmente la velocidad de ciclado. Sin embargo, el rendimiento

práctico de la PCR (eficiencia y rendimiento) a menudo es deficiente. Como regla general, a medida que los ciclos se vuelven cada vez más cortos, las reivindicaciones de una PCR exitosa se correlacionan con dianas de menor complejidad (bacterias, fagos, plásmidos multicopia o incluso productos de PCR) que se utilizan en concentraciones iniciales más altas (véase, por ejemplo, la Patente US 6,210,882, en la que se utilizaron 5 ng de amplicón como muestra de partida). De hecho, ninguno de los estudios enumerados en la tabla 1 con ciclos de <20 segundos utilizó ADN eucariota complejo tal como ADN humano. El número de copias iniciales de las moléculas de plantilla a menudo es muy alto (por ejemplo, 180.000.000 copias de fago lambda/ μ l), por lo que se necesita poca amplificación antes de reivindicar el éxito. Además, la falta de controles sin plantilla en muchos estudios plantea preguntas sobre la validez de los resultados positivos, especialmente en un entorno con altas concentraciones de plantilla. Un informe orientado a instrumentos se centra ampliamente en el diseño y modelización del dispositivo de ciclado térmico, con una breve demostración final de PCR utilizando una alta concentración de una diana de baja complejidad. Se han descrito velocidades de calentamiento y enfriamiento (hasta 175 °C/s) basándose en modelización y mediciones sin muestras de PCR presentes (17).

5

10

15

Tabla 1

Tiempo de ciclo más rápido (s)	[Plantilla] (Copias/ μ l)	Forma de plantilla	[Cebadores] (nM)	Polimerasa	[Polimerasa] (nM)	Longitud de producto (pb)	Cuantificación	Tendencia	Procedimiento	¿Sin control con plántilla?	Referencia
20	1.600	ADN humano	1.000	0,08 U/ μ l de Taq	3	536	Banda en gel débil	Aumenta con [Polimerasa]	Ciclado con aire en capilar	No	3
12	40.000	Fago Lambda	400	0,2U/ μ l de Taq	7,5	500	Electroforesis capilar	?	Calentamiento con IR, enfriamiento con aire presurizado	No	56
12	1.000.000	Producto de PCR de 230 pb ADNr 16S (genómico humano)	1.000	0,5 U/ μ l de Taq	19	220	Banda en gel buena	Dependiente del nº de ciclo y el nº de copia	Flujo continuo con IR de gotas en aceite	Si	55
9,25	4.700-470.000		1.800	Taq Gold	?	127	?	?	Flujo continuo con IR de gotas en aceite	No	54
9	10.000.000	Fago Lambda	2.000	0,025 U/ μ l de Taq	0,94	500	Banda en gel OK	La intensidad aumenta con el tiempo de ciclo	Flujo continuo con un taco de partículas ferrosas	No	38
8,5	?	ADNc	1.800	?	?	82	80 % de eficiencia	Eficiencia decreciente a ciclos más rápidos	Soporte en voladizo micromecanizado	?	17
7,0	10.000.000	Producto de PCR de 1 kb Plásmidos (E. anthracis)	2.000	0,25 U/ μ l de Taq 0,05 U/ μ l de Ex Taq HS	9,4 ?	176 134	7 % del control 55 % del control	50 % a ciclos de 15 s ?	Flujo continuo de un taco	Si	22
6,3	10.000		1.200							Si	53
5,2-5,7	160.000.000	Fago Lambda	400	0,07 U/ μ l de Taq	2,6	500/997	Bandas en gel débiles	Dependiente de los tiempos de ciclo	Flujo continuo	No	23
5,25	1.400.000	E. subtilis (ADN bacteriano)	500	0,025 U/ μ l de KOD plus	?	72	90 % de eficiencia (SYBR)	Desplazamiento único	Agua bombeada contra placa de aluminio	Si	35
4,6	34.000	E. hereticus (ADN bacteriano)	800	0,04 U/ μ l de KAPA2G	4	68/160	Bandas en gel débiles	El rendimiento aumenta con el nº de ciclos	Agua bombeada a través de cobre poroso	No	31

Tiempo de ciclo más rápido (s)	[Plantilla] (Copias/µl)	Forma de plantilla	[Cebadores] totales (nM)	Polimerasa	[Polimerasa] (nM)	Longitud de producto (pb)	Cuantificación	Tendencia	Procedimiento	¿Sin control con plantilla?	Referencia
4.2	50 ¹	E. subtilis (ADN bacteriano)	?	KOD plus	?	72	Cq = 33 (SYBR)	El mayor n° de copias reduce el Cq	IR laser	?	51
3.0	10.000	Plásmidos (E. anthracis)	1.200	0,05 U/µl de Ex Taq HS	?	134	15 % del control	80 % a ciclos de 7,5 s	Flujo constante con presión de vapor de veñal)	SI (5 % de veñal)	35
2.7	?	Fago stx (E. coli)	?	KOD	?	85	Banda apenas visible	Rendimiento decreciente a ciclos de 3,06 s a 2,69 s	Transferencia de Peltier a capilares	No	36
2.6	?	Fago stx (E. coli)	?	0.5 U/µl de Taq	19	85	Banda muy tenue	Constante a ciclos de 2,8 a 2,6 s	Gas presurizado y capilares	No	48

¹ Copia única presumida en una gota de 20 nl con Cq de 33 bajo monitorización SYBR Green, pero sin análisis de gel o fusión para confirmar la identidad del producto de PCR.

² Se ejecutó una muestra "en blanco", pero no está claro si se trataba de un control sin plantilla.

³ El artículo dice que [cebador] es 0.5 nmoI, la solicitud de patente (US 2009/0276014 A1) dice que [cebador] es 0.01-0.5 µM.

⁴ Dos pg de ADN de E. coli/µl, pero se desconoce el número de copias del fago en la preparación de ADN.

⁵ La disolución dice 0.5 µmol/10 µl (50 nM), la patente (US 6,472,186) dice 50 pmol/10 µl (5 µM).

La Patente EP05117712A describe procedimientos de PCR muy rápidos que utilizan ADN polimerasas termoestables.

5 Una manera de disminuir el tiempo de ciclo es introducir variaciones en el protocolo de PCR para facilitar los requisitos de ciclado de temperatura. Los cebadores más largos con T_m más altas permiten temperaturas de hibridación más altas. Al limitar la longitud del producto y su T_m , las temperaturas de desnaturalización pueden reducirse justo por encima de la T_m del producto. En combinación, las temperaturas de hibridación más altas y de desnaturalización más bajas disminuyen el intervalo de temperatura requerido para una
10 amplificación exitosa. Reducir el ciclado de 3 etapas (desnaturalización, hibridación y extensión) a 2 etapas (desnaturalización y una etapa combinada de hibridación/extensión) también simplifica los requisitos de ciclado de temperatura. Tanto el intervalo de temperatura disminuido como el ciclado de 2 etapas son típicos para los estudios en la tabla 1 con tiempos de ciclo <20 segundos. Sin embargo, el ciclado de dos etapas puede comprometer las velocidades de extensión de polimerasa si la etapa combinada de
15 hibridación/extensión se realiza a temperaturas inferiores a la temperatura óptima de 70 a 80 °C, donde la polimerasa es más activa. Las velocidades de extensión de polimerasa son logarítmicas lineales con temperatura hasta aproximadamente 70-80 °C, con un máximo descrito de 60-120 pb/s (50).

Incluso con variaciones de protocolo, la eficiencia y el rendimiento de amplificación son a menudo deficientes cuando los tiempos de ciclo son <20 segundos en comparación con las reacciones de control (22, 23). Estos esfuerzos hacia una PCR más rápida parecen dominados por la ingeniería con poco enfoque en la bioquímica. A medida que los tiempos de ciclo disminuyen de 20 segundos a 2 segundos, el rendimiento de PCR disminuye y finalmente desaparece, lo que refleja una falta de robustez incluso con dianas simples con un número de copias alto.

25 La instrumentación en diversas referencias descritas en la tabla 1 puede ser adecuada para PCR extremadamente rápida, si las condiciones de reacción son compatibles. Como se da a conocer en el presente documento, un enfoque en el aumento de las concentraciones de cebadores, polimerasa y Mg^{++} permite una "PCR extrema" (PCR con ciclos <20 segundos (30 ciclos en <10 min)), al tiempo que conserva la robustez y el rendimiento de la reacción.
30

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

35 La presente invención da a conocer un procedimiento para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra biológica durante la amplificación, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Las características adicionales de la presente divulgación resultarán evidentes para los expertos en la materia al considerar la siguiente descripción detallada de realizaciones preferentes que indican como ejemplo el mejor modo de llevar a cabo la presente invención tal como se percibe actualmente.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1a muestra un esquema para realizar PCR extrema.
La figura 1b es un dispositivo ilustrativo para realizar PCR extrema con capacidades en tiempo real para
45 monitorizar un tubo de muestra en un baño de agua.
La figura 1c es un dispositivo ilustrativo para realizar PCR extrema con ciclado de tres temperaturas.
La figura 1d es una vista en primer plano de la óptica del dispositivo en la figura 1b que también muestra el capilar de referencia de temperatura.
La figura 2a es un gráfico que superpone la ubicación del soporte de muestras (----) de la figura 1b con la temperatura de la muestra (-).
50 La figura 2b es un gráfico de temperatura de PCR extrema utilizando el dispositivo mostrado en la figura 1b.
La figura 2c es un gráfico de temperatura de PCR de ciclo rápido utilizando un carrusel LightCycler mostrado para comparación con la figura 2b.
La figura 3a muestra curvas de fusión derivadas de productos de PCR extrema (----) y productos de PCR de ciclo rápido (---), con controles negativos para ciclado extremo (-) y rápido (--), amplificados utilizando el perfil de temperatura de la figura 2b.
55 La figura 3b es un gel de agarosa SeaKem LE al 2 % de las mismas muestras de la figura 3a, los carriles 1 y 8 son marcadores de tamaño, los carriles 2 y 3 son productos que resultan de una PCR extrema de 30 segundos, el carril 4 es un control sin plantilla para PCR extrema de 30 segundos, los carriles 5 y 6 son productos resultantes de PCR de 12 min, y el carril 7 es el control sin plantilla para PCR de 12 min.
60 La figura 3c muestra un trazo de temperatura de PCR extrema (----) que amplificó los mismos productos mostrados en las figuras 3a y 3b, junto con la monitorización en tiempo real (-) de la misma reacción.
La figura 4a muestra un trazo de temperatura de PCR extrema que aumenta la velocidad de extensión mediante control de la temperatura.
65 La figura 4b muestra una porción ampliada de la figura 4a, que superpone la ubicación del soporte de muestras (-) de la figura 1b con la temperatura de la muestra (----).

- La figura 4c es una curva de fusión derivada negativa (-dF/dT) de un amplicón de 58 pb de IRL10RB, en la que se muestran los genotipos AA (-), AG (-_) y GG (----).
- La figura 5a es un gráfico tridimensional que representa la concentración de polimerasa frente a la concentración de cebador frente a la concentración de producto de PCR, utilizando PCR extrema.
- 5 La figura 5b es el trazo de temperatura de PCR extrema utilizada en la figura 5a.
- La figura 5c muestra curvas de fusión derivadas negativas de los productos de polimerasa KlenTaq (KT POL) 4 μ M de la figura 5a.
- La figura 5d es un gel de agarosa que muestra resultados de PCR extrema utilizando concentraciones variables de polimerasa a concentraciones de cebador de 10 μ M de la figura 5a.
- 10 La figura 6a es un trazo de temperatura de PCR extrema realizada en un tubo de acero inoxidable de calibre 19.
- La figura 6b es un gel de los productos de PCR producidos por los ciclos de temperatura extrema de la figura 6a.
- La figura 7a es un trazo de temperatura de PCR extrema con una etapa combinada de hibridación/extensión larga (1 segundo).
- 15 La figura 7b es un gráfico tridimensional que representa la concentración de polimerasa frente a la concentración de cebador frente a la concentración de producto de PCR, utilizando PCR extrema para un producto de 102 pb.
- La figura 8a muestra un perfil de temperatura de PCR extrema utilizada para amplificar un producto de 226 pb, utilizando una etapa combinada de hibridación/extensión de un segundo.
- 20 La figura 8b muestra un perfil de temperatura de PCR extrema utilizada para amplificar un producto de 428 pb, una etapa combinada de hibridación/extensión de cuatro segundos.
- La figura 8c muestra los resultados en tiempo real obtenidos de la figura 8a y un trazo de temperatura similar utilizando una etapa de hibridación/extensión de 2 segundos, que no incluye controles de plantilla para cada una.
- 25 La figura 8d muestra los resultados en tiempo real obtenidos de la figura 8b y un trazo de temperatura similar utilizando una etapa de hibridación/extensión de 5 segundos, que no incluye controles de plantilla para cada una.
- La figura 9a muestra curvas de amplificación de un fragmento de 45 pb de KCNE1 a diferentes concentraciones de partida.
- 30 La figura 9b es un gráfico de Cq frente a \log_{10} (copias de plantillas iniciales) de los datos de la figura 9a. Las reacciones se realizaron por quintuplicado. Las figuras 9c-9d son similares a las figuras 9a-9b, excepto que muestra la amplificación de un fragmento de 102 pb de NQO1.
- La figura 10a es un gráfico tridimensional que representa la concentración de polimerasa frente a la concentración de cebador frente a la concentración de producto de PCR, utilizando PCR extrema para un producto de 300 pb (20 ciclos, 4,9 segundos por ciclo).
- 35 La figura 10b muestra gráficos de fluorescencia frente al número de ciclos para la amplificación por PCR de una plantilla sintética de 500 pb utilizando polimerasa KAPA2G FAST y tiempos de extensión de 1-5 segundos.
- 40 La figura 10c es un gráfico de la longitud de extensión frente al tiempo de extensión mínimo para varias concentraciones de polimerasa KlenTaq y polimerasa KAPA2G FAST.
- Las figuras 11a-11e muestran gráficos de fluorescencia frente al número de ciclos para la amplificación por PCR de productos de tamaño: 100 pb (figura 11a), 200 pb (figura 11b), 300 pb (figura 11c), 400 pb (figura 11d) y 500 pb (figura 11e).
- 45 La figura 12a muestra curvas de fusión derivadas negativas de un fragmento de 60 pb de AKAP10 después de 35 ciclos de PCR extrema, utilizando concentraciones variables de magnesio.
- La figura 12b es un gel de los productos de PCR mostrados en las curvas de fusión derivadas negativas de la figura 12a.
- 50 La figura 13a muestra curvas de fusión derivadas negativas de un fragmento de 60 pb de AKAP10 después de 35 ciclos, utilizando tiempos de ciclo variables con Mg^{++} 5 mM. Los tiempos de ciclo fueron 0,32 segundos (-), 0,42 segundos (---), 0,52 segundos (-_) y 0,62 segundos (----). Los tiempos de ciclo incluyeron un mantenimiento de 0,1 a 0,4 segundos en un baño de 60 °C.
- La figura 13b es un gel de los productos de PCR mostrados en las curvas de fusión derivadas negativas de la figura 13a.
- 55 La figura 14a muestra curvas de fusión derivadas negativas de un fragmento de 60 pb de AKAP10, según se amplifica en tres instrumentos diferentes: (1) PCR extrema, (2) LightCycler (Roche) y (3) CFX96 (BioRad).
- La figura 14b es un gel de los productos de PCR mostrados en las curvas de fusión derivadas negativas de la figura 14a.
- 60 Las figuras 15a-15b muestran perfiles ilustrativos para un paradigma de equilibrio (figura 15a) y un paradigma cinético (figura 15b) de PCR. El negro puro representa la desnaturalización, el rayado representa la hibridación y el blanco puro representa la extensión de los ácidos nucleicos durante el ciclado térmico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 65 Como se utilizan en el presente documento, los términos “un”, “una” y “el/la” se definen para significar uno o más e incluir el plural a menos que el contexto sea inapropiado. Los intervalos pueden expresarse en el

presente documento como “aproximadamente” un valor particular y/o “aproximadamente” otro valor particular. El término “aproximadamente” se utiliza en el presente documento para significar de forma aproximada, en la región de, grosso modo, o alrededor de. Cuando el término “aproximadamente” se utiliza junto con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término “aproximadamente” se utiliza en el presente documento para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido en una variación del 5 %. Cuando se expresa dicho intervalo, otra realización incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante la utilización del antecedente “aproximadamente”, se entenderá que el valor particular forma otra realización. Se entenderá además que los valores extremos de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro valor extremo, como independientemente del otro valor extremo.

La palabra “o” como se utiliza en el presente documento significa cualquier miembro de una lista particular y también incluye cualquier combinación de miembros de esa lista.

Por “muestra” se entiende un animal; un tejido u órgano de un animal; una célula (ya sea dentro de un sujeto, tomada directamente de un sujeto, o una célula mantenida en cultivo o de una línea celular cultivada); un lisado celular (o fracción de lisado) o extracto celular; una solución que contiene una o más moléculas derivadas de una célula, material celular o material viral (por ejemplo, un polipéptido o ácido nucleico); o una solución que contiene un ácido nucleico de origen natural o no de origen natural, que se analiza cómo se describe en el presente documento. Una muestra también puede ser cualquier fluido o excreción corporal (por ejemplo, pero sin limitarse a los mismos, sangre, orina, heces, saliva, lágrimas, bilis) que contiene células, componentes celulares o ácidos nucleicos.

La frase “ácido nucleico”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido o polinucleótido de origen natural o sintético, ya sea ADN o ARN o híbrido ADN-ARN, monocatenario o bicatenario, sentido o antisentido, que es capaz de hibridación con un ácido nucleico complementario por emparejamiento de bases de Watson-Crick. Los ácidos nucleicos de la presente divulgación también pueden incluir análogos de nucleótidos (por ejemplo, BrdU, dUTP, 7-deaza-dGTP) y enlaces internucleosídicos no fosfodiéster (por ejemplo, ácido peptidonucleico (APN) o enlaces de tiodiéster). En particular, los ácidos nucleicos pueden incluir, sin limitación, ADN, ARN, ADNc, ADNg, ADNmc, ADNbc o cualquier combinación de los mismos.

Por “sonda”, “cebador” u “oligonucleótido” se entiende una molécula de ADN o ARN monocatenario de secuencia definida que puede emparejarse por bases con una segunda molécula de ADN o ARN que contiene una secuencia complementaria (la “diana”). La estabilidad del híbrido resultante depende de la longitud, el contenido de GC, la energía de apilamiento del vecino más cercano y el alcance del emparejamiento de bases que se produce. El alcance del emparejamiento de bases se ve afectado por parámetros tales como el grado de complementariedad entre la sonda y las moléculas diana y el grado de rigurosidad de las condiciones de hibridación. El grado de rigurosidad de la hibridación se ve afectado por parámetros tales como la temperatura, la concentración de sal y la concentración de moléculas orgánicas tales como formamida, y se determina mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia. Las sondas, los cebadores y los oligonucleótidos pueden marcarse de forma detectable, ya sea de forma radiactiva, fluorescente o no radiactiva, mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Los colorantes de unión a ADNbc (colorantes que fluorescen más intensamente cuando se unen a ADN bicatenario que cuando se unen a ADN monocatenario o libres en solución) pueden utilizarse para detectar ADNbc. Se entiende que un “cebador” está configurado específicamente para ser extendido por una polimerasa, mientras que una “sonda” u “oligonucleótido” puede o no estar configurado de esta manera.

Por “hibrida específicamente” se entiende que una sonda, cebador u oligonucleótido reconoce e interactúa físicamente (es decir, se empareja por bases) con un ácido nucleico sustancialmente complementario (por ejemplo, un ácido nucleico de muestra) en condiciones de alta rigurosidad, y no se empareja por bases sustancialmente con otros ácidos nucleicos.

Por “condiciones de alta rigurosidad” se entiende condiciones que permiten la hibridación comparable con la resultante de la utilización de una sonda de ADN de, como mínimo, 40 nucleótidos de longitud, en un tampón que contenía NaHPO₄ 0,5 M, pH 7.2, SDS al 7 %, EDTA 1 mM, y BSA al 1 % (fracción V), a una temperatura de 65 °C, o un tampón que contenía formamida al 48 %, 4,8X SSC, Tris-Cl 0,2 M, pH 7.6, solución de Denhardt 1X, sulfato de dextrano al 10 % y SDS al 0,1 %, a una temperatura de 42 °C. Los expertos en la materia de la biología molecular (47) conocen bien otras condiciones para la hibridación de alta rigurosidad, tales como para PCR, northern, Southern o hibridación in situ, secuenciación de ADN, etc.

En una realización ilustrativa, se dan a conocer procedimientos y kits para PCR con tiempos de ciclo de <20 segundos, con algunas realizaciones utilizando tiempos de ciclo de <10 segundos, <5 segundos, <2 segundos, <1 segundo y <0,5 segundos. Con estos tiempos de ciclo, se completa una PCR de 30 ciclos en <10 min, <5 min, <2,5 min, <1 min, <30 segundos y <15 segundos, respectivamente. A medida que las

velocidades de PCR se vuelven cada vez más rápidas, aumentan las concentraciones de cebador y polimerasa, conservando así la eficiencia y el rendimiento de PCR.

5 Comprometer cualquiera de las reacciones de 3 componentes de PCR (hibridación de cebadores, extensión de polimerasa y desnaturalización de plantilla) puede limitar la eficiencia y el rendimiento de la PCR. Por ejemplo, si los cebadores hibridan a solo el 95 % de la plantilla, la eficiencia de la PCR no puede ser superior al 95 %, incluso si el 100 % de las plantillas se desnaturalizan y el 100 % de las plantillas cebadas se extienden a productos de longitud completa. De manera similar, si la extensión es eficiente solo al 95 %, la máxima eficiencia de PCR posible es solo del 95 %. Para que la concentración del producto de PCR se duplique en cada ciclo, todos los componentes deben alcanzar el 100 % de finalización. La desnaturalización, la hibridación y la extensión se considerarán secuencialmente en los siguientes párrafos.

15 La desnaturalización inadecuada es una razón común para el fallo de la PCR, en ciclado de temperatura de PCR lento (ciclos de >60 segundos), rápido (ciclos de 20-60 segundos) y extremo (ciclos de <20 segundos). El objetivo es la desnaturalización completa en cada ciclo, proporcionando una disponibilidad de plantilla cuantitativa para la hibridación de cebadores. La desnaturalización inicial de la plantilla antes de la PCR, particularmente el ADN genómico, generalmente requiere condiciones más severas que la desnaturalización del producto de amplificación durante la PCR. La optimización original de la PCR de ciclo rápido (4) se realizó después de hervir la plantilla, una buena manera de garantizar la desnaturalización inicial del ADN genómico. 20 La desnaturalización inicial incompleta puede producirse con dianas de alta T_m , particularmente aquellas con regiones flanqueantes de alta estabilidad (37). Esto puede comprometer la PCR cuantitativa, de forma ilustrativa para inserciones o deleciones genómicas, particularmente si diferencias de temperatura menores durante la desnaturalización afectan a la eficiencia de la PCR (37-39). Si no se desea la digestión previa por ebullición o restricción (37), y las temperaturas de desnaturalización más altas comprometen la polimerasa, 25 se pueden utilizar adyuvantes que disminuyen la T_m del producto para ayudar con la desnaturalización.

Aunque a menudo se utilizan 94 °C como temperatura diana predeterminada para la desnaturalización, rara vez es óptima. Los productos de PCR se funden por encima de un intervalo de 40 °C, dependiendo principalmente del contenido de GC y de la longitud (43). Las bajas temperaturas diana de desnaturalización tienen una ventaja tanto de velocidad como de especificidad cuando el producto de PCR se funde a temperatura suficientemente baja como para que se pueda utilizar una temperatura de desnaturalización más baja. Cuanto más baja es la temperatura de desnaturalización, más rápido puede alcanzar la muestra la temperatura de desnaturalización, y más rápido se puede realizar la PCR. La especificidad añadida surge de la eliminación de todos los productos potenciales con temperaturas de desnaturalización más altas, ya que 35 estos productos potenciales permanecerán bicatenarios y no estarán disponibles para la hibridación de cebadores. Para amplificar productos de alta T_m , es posible que sea necesario aumentar la temperatura diana por encima de 94 °C. Sin embargo, la mayoría de las polimerasas termoestables actuales comienzan a desnaturalizarse por encima de 97 °C y la solución de PCR puede hervir entre 95 y 100 °C, dependiendo de la altitud, por lo que no hay mucho margen para aumentar la temperatura. Disminuir la concentración de sal monovalente y Mg^{++} disminuye la T_m del producto. De manera similar, la incorporación de dUTP y/o 7-deaza-dGTP también reduce la T_m del producto, pero puede disminuir las velocidades de extensión de polimerasa. La mayoría de los "potenciadores" de PCR patentados son compuestos orgánicos simples que reducen la T_m del producto, permitiendo la desnaturalización (y amplificación) de los productos de alta T_m . Los más populares entre estos son DMSO, betaína, glicerol, etilenglicol y formamida. Además de reducir la 45 T_m , algunos de estos aditivos también aumentan el punto de ebullición de la mezcla de PCR (particularmente útil a grandes altitudes). A medida que aumenta la concentración del potenciador, las T_m del producto disminuyen, pero la inhibición de la polimerasa puede aumentar.

50 Sin embargo, la desnaturalización no necesita limitar la velocidad, incluso en condiciones de ciclado extremo, porque el desenrollamiento de ADN es de primer orden y muy rápido (10-100 ms), incluso cuando la temperatura es solo ligeramente superior a la T_m del producto. La desnaturalización se produce tan rápidamente a 2-3 °C por encima de la T_m del producto de amplificación que es difícil de medir, pero la desnaturalización completa del amplicón probablemente se produce en menos de 0,1 segundo. Si el producto se funde en múltiples dominios, la temperatura de desnaturalización diana debe estar 2-3 °C por encima del dominio de fusión más alto. Siempre que la muestra alcance esta temperatura, la desnaturalización es muy rápida, incluso para productos largos. Utilizando capilares y baños de agua (40), la desnaturalización completa de los productos de PCR de más de 20 kB se produjo en menos de un segundo (52). Las T_m y dominios de fusión del producto se determinan de manera ilustrativa experimentalmente con colorantes de ADN y fusión de alta resolución (41). Aunque las estimaciones de T_m se pueden obtener mediante predicciones de software (42), su precisión es limitada. Además, las T_m observadas dependen en gran medida de las condiciones de reacción locales, tales como las concentraciones de sal y la presencia de cualquier colorante y adyuvante. Por lo tanto, las T_m observadas suelen ajustarse mejor a las condiciones de reacción.

65 Sin ningún efecto sobre la eficiencia, la velocidad de aproximación a la desnaturalización puede ser lo más

rápida posible, por ejemplo 200-400 °C/s, como se muestra en las figuras 2a y 6a. A estas velocidades, solo se requieren aproximadamente 0,1-0,2 segundos para alcanzar las temperaturas de desnaturalización. Sin embargo, una velocidad más lenta a medida que se acerca a la temperatura diana disminuye el riesgo de superar la temperatura diana y evita la posible inactivación de la polimerasa o la ebullición de la solución. Un procedimiento ilustrativo para lograr una temperatura de aproximación más lenta es sumergir la muestra en un baño caliente que exceda la temperatura diana en 5-10 °C. La diferencia de temperatura entre las temperaturas diana y del baño determina la curva de aproximación exponencial que se ralentiza automáticamente a medida que disminuye la diferencia. Al monitorizar continuamente la temperatura, la siguiente fase (enfriamiento hacia hibridación) se activa cuando se alcanza la diana de desnaturalización. En resumen, la desnaturalización completa del producto en la PCR requiere <0,2 s a temperaturas 2-3 °C por encima de la temperatura de dominio de fusión más alta del producto y la temperatura de desnaturalización se puede alcanzar lo más rápido posible, de forma ilustrativa a 40-400 °C/segundo. Dado que la desnaturalización es de primer orden, su velocidad depende solo de la concentración de producto, y la eficiencia (o porcentaje del producto que se desnaturaliza) es independiente de la concentración de producto.

La hibridación de cebadores incompleta y/o mal dirigida puede dar como resultado una PCR deficiente. Resulta una baja eficiencia si no todos los sitios de plantilla están cebados. Además, si se produce cebado en sitios no deseados, se pueden producir productos alternativos. El objetivo es esencialmente completar la hibridación de cebadores solo a los sitios deseados en cada ciclo, proporcionando una plantilla cebada cuantitativa para la extensión de la polimerasa.

Los protocolos de PCR rápida con ciclos de 20-60 segundos sugieren un tiempo de hibridación de <1 segundo a 5 °C por debajo de la T_m de los cebadores 500 nM (52). Las concentraciones de cebadores para instrumentos que intentan ciclos <20 segundos oscilan entre 200-1.000 nM cada una (tabla 1). Estas concentraciones son similares a las utilizadas en la PCR convencional (ciclos de >60 segundos), donde se utilizan tiempos de hibridación largos. La disminución de la concentración de cebadores a menudo se utiliza para mejorar la especificidad, y el aumento de la concentración de cebadores rara vez se considera debido a preocupaciones relacionadas con la amplificación inespecífica. Sin embargo, con el ciclado rápido, la especificidad mejorada se ha atribuido a tiempos de hibridación más cortos (5). Si esta tendencia continúa, se esperaría que tiempos de hibridación muy cortos de PCR extrema deberían tolerar altas concentraciones de cebadores. Para promover la hibridación, se recomienda una temperatura de hibridación 5 °C por debajo de la T_m del cebador durante ciclos de 20-60 segundos. Las T_m se miden mejor experimentalmente mediante análisis de fusión utilizando colorantes de ADN de saturación y oligonucleótidos en las mismas condiciones de tampón utilizadas para la amplificación. El cebador se combina con su diana complementaria con una extensión 5' como extremo colgante, para aproximarse mejor a la estabilidad de un cebador hibridado a su plantilla, y se realiza un análisis de fusión.

A diferencia de la desnaturalización, la eficacia de hibridación depende de la concentración de cebador. La hibridación de cebadores puede volverse limitante a velocidades de ciclo muy rápidas. La hibridación de cebadores es una reacción de segundo orden que depende de las concentraciones tanto de cebador como de diana. Sin embargo, durante la mayor parte de la PCR, la concentración de cebador es mucho más alta que la concentración de diana y la hibridación es efectivamente de pseudoprimer orden y depende solo de la concentración de cebador. En este caso, la fracción de producto que se ceba (la eficiencia de hibridación) depende solo de la concentración de cebador, no de la concentración del producto, de modo que las concentraciones de cebador más altas deberían permitir tiempos de hibridación más cortos. Además, sin querer quedar ligados a la teoría, se cree que la relación es lineal. A medida que el tiempo de hibridación se vuelve más y más corto, se hacen necesarias mayores concentraciones de cebador para mantener la eficiencia y el rendimiento de la PCR. Por ejemplo, el ciclado rápido permite aproximadamente 1-3 segundos para la hibridación a temperaturas de 5 °C por debajo de la T_m del cebador (3). Si este tiempo de hibridación (a o por debajo de T_m -5 °C) se reduce 10 veces en la PCR extrema, se esperaría una eficiencia de cebado similar si la concentración del cebador aumentara 10 veces. A medida que el tiempo de hibridación disponible se vuelve cada vez más corto, la concentración del cebador debería aumentarse cada vez más en aproximadamente el mismo múltiplo. Los protocolos típicos de PCR rápida utilizan 500 nM de cada cebador. Si el tiempo de hibridación en PCR extrema se reduce de 3 a 40 veces, las concentraciones de cebador requeridas para obtener la misma eficacia de cebado son 1.500 - 20.000 nM por cebador. Esto es equivalente a 3.000 - 40.000 nM cebadores totales, más alta que cualquier concentración de cebador en la tabla 1. Esto sugiere que una razón de la deficiente eficiencia en intentos previos a ciclos <20 segundos es la baja eficiencia de hibridación secundaria a concentraciones inadecuadas de cebador. En PCR extrema, las concentraciones de cebador se incrementan a 1,5-20 μ M cada una para obtener una excelente eficiencia de hibridación a pesar de los tiempos de hibridación de 0,05-0,3 segundos. Se pueden contemplar concentraciones de cebador cada vez mayores para tiempos de hibridación cada vez más cortos, utilizando mayores concentraciones de cebador para compensar los tiempos de hibridación disminuidos para obtener la misma eficiencia de hibridación. Se observa que la mayoría de los instrumentos comerciales requieren un tiempo de espera de, como mínimo, 1 segundo, mientras que algunos instrumentos permiten un tiempo de espera de "0" segundos, pero ningún instrumento comercial permite un tiempo de espera de un segundo

fraccional. Para algunos ejemplos ilustrativos de PCR extrema, pueden ser deseables tiempos de mantenimiento en incrementos de 0,1 o 0,01 segundos.

5 Otra manera de aumentar la velocidad de hibridación y acortar los tiempos de hibridación sin comprometer la eficiencia es aumentar la concentración de Mg^{++} . En la técnica se conoce que las velocidades de hibridación aumentan con el aumento de la fuerza iónica, y los cationes divalentes son particularmente efectivos para aumentar las velocidades de hibridación, incluyendo la hibridación de cebadores.

10 De forma ilustrativa, la velocidad de aproximación a la temperatura de hibridación diana puede ser lo más rápida posible. Por ejemplo, a 200-800 °C/s (figuras 2a y 6a), las temperaturas de hibridación se pueden alcanzar en 0,05-0,2 segundos. El enfriamiento rápido también minimiza la rehibridación del producto de longitud completa. En la medida en que el producto de amplificación dúplex se forma durante el enfriamiento, la eficiencia de la PCR se reduce porque los cebadores no pueden hibridar con el producto dúplex. Aunque esto es raro al principio de la PCR, a medida que aumenta la concentración del producto, se forman más y más dúplex durante el enfriamiento. La monitorización continua con SYBR® Green I sugiere que dicha rehibridación del producto puede ser una causa fundamental de la meseta de PCR (44).

20 La extensión de polimerasa también requiere tiempo y puede limitar la eficacia de la PCR cuando los tiempos de extensión son cortos. Se sabe que los productos más largos requieren tiempos de extensión más largos durante la PCR y a menudo se agrega una extensión final de varios minutos al final de la PCR, presumiblemente para completar la extensión de todos los productos. El enfoque habitual para productos largos es alargar el tiempo para la extensión. La utilización de temperaturas de extensión más bajas aumenta aún más los tiempos requeridos, como en algunos casos de ciclado de 2 etapas donde la hibridación de cebadores y la extensión de polimerasa se realizan a la misma temperatura.

25 Esencialmente, se requiere una extensión completa de la plantilla cebada en cada ciclo para una eficiencia de PCR óptima. La mayoría de las velocidades de extensión de polimerasa aumentan con la temperatura, hasta un cierto máximo. Para la polimerasa Taq, el máximo es de aproximadamente 100 nucleótidos/s a 75-80 °C y disminuye aproximadamente 4 veces por cada 10 °C que la temperatura se reduce (50). Para un producto de beta-globina de 536 pb, 76 °C se encontró óptima en la PCR de ciclo rápido (4). Recientemente se han presentado polimerasas más rápidas con reivindicaciones comerciales de que pueden reducir los tiempos generales de PCR, lo que sugiere que pueden ser capaces de eliminar o acortar los tiempos de mantenimiento de la extensión para productos más largos.

30 Como alternativa o complemento a velocidades de extensión de polimerasa más rápidas, se ha descubierto que aumentar la concentración de polimerasa reduce el tiempo de extensión requerido. Dada una concentración de polimerasa Taq estándar en PCR (0,04 U/μl) o 1,5 nM (49) con 500 nM de cada cebador, si cada cebador está unido a una plantilla, solo hay suficiente polimerasa para extender el 0,15 % de las plantillas de una vez, requiriendo el reciclado de la polimerasa una y otra vez a nuevas plantillas cebadas para extenderlas todas. Al aumentar la concentración de polimerasa, más de las plantillas cebadas disponibles se extienden simultáneamente, disminuyendo el tiempo requerido para extender todas las plantillas, presumiblemente no por velocidades de extensión más rápidas, sino al extender una mayor proporción de las plantillas cebadas en un momento dado.

45 Para una primera aproximación, para productos de PCR pequeños (<100 pb), el tiempo de polimerización requerido parece ser directamente proporcional a la velocidad de polimerización de la enzima (a su vez una función de la temperatura) y la concentración de polimerasa. El tiempo requerido también es inversamente proporcional a la longitud de la plantilla a extender (longitud del producto menos la longitud del cebador). Al aumentar la actividad de la polimerasa 20-300 veces respecto a la actividad estándar de 0,04 U/μl en la PCR, la PCR extrema con ciclos <20 segundos puede dar como resultado altos rendimientos de productos específicos. Es decir, las actividades de 0,8 - 12 U/μl (1-16 μM de KlenTaq) permiten una PCR extrema de dos etapas con tiempos de hibridación/extensión combinadas de 0,1-1,0 segundos. La mayor actividad de polimerasa utilizada anteriormente fue de 0,5 U/μl (tabla 1). Para la PCR de dos etapas que se utiliza en ejemplos ilustrativos de PCR extrema, una etapa de hibridación/extensión combinadas a 70-75 °C es ventajosa para velocidades de polimerización más rápidas. Además, debido a que simplifica el ciclado de temperatura, la PCR de dos etapas se utiliza típicamente en ejemplos ilustrativos de ciclado extremos (ciclos de <20 segundos) y deben producirse tanto hibridación rápida como extensión rápida durante la etapa de hibridación/extensión combinadas. Por lo tanto, tanto el aumento de las concentraciones de cebadores como el aumento de las concentraciones de polimerasa se utilizan en ejemplos ilustrativos, lo que da como resultado una PCR robusta en ciclado extremo de dos temperaturas. De forma ilustrativa, son necesarias concentraciones de cebadores de 1,5-20 μM cada una y concentraciones de polimerasa de 0,4 - 12 U/μl de cualquier polimerasa estándar (0,5-16 μM de KlenTaq) con tiempos de hibridación/extensión combinadas de 0,05-5,0 segundos a 50-75 °C, como se ilustra en los siguientes ejemplos. Debido a que solo hay un segmento de ciclado de PCR para la hibridación y la extensión, las condiciones de PCR extrema requieren la mejora de ambos procesos, de forma ilustrativa al aumentar las concentraciones tanto de los cebadores

como de la polimerasa.

También se prevé un ciclado extremo de tres temperaturas, donde las etapas de hibridación y extensión se mantienen separadas a diferentes temperaturas. En este caso, el tiempo asignado a las etapas de hibridación y extensión puede controlarse individualmente y adaptarse a necesidades específicas. Por ejemplo, si solo el tiempo de hibridación es corto (0,05 - 0,2 segundos) y el tiempo de extensión se mantiene comparativamente largo (de forma ilustrativa durante 1, 2, 5, 10 o 15 segundos), solo las concentraciones de cebadores deben incrementarse para una PCR eficiente. Como alternativa, si el tiempo de extensión es corto (< 1 segundo dentro de 70-80 °C), pero el tiempo de hibridación es largo, se cree que solo es necesario aumentar la concentración de polimerasa para obtener una PCR eficiente. Se entiende que la PCR eficiente tiene una eficiencia ilustrativa, como mínimo, del 70 %, de forma más ilustrativa, como mínimo, del 80 % e incluso, como mínimo, del 90 %.

Para productos de más de 100 pb, la extensión eficiente mediante PCR extrema puede necesitar una combinación de alta concentración de polimerasa y un tiempo de extensión aumentado. Si la polimerasa está en exceso, el tiempo mínimo, de forma ilustrativa, debería ser la longitud de extensión (definida como la longitud del producto menos la longitud del cebador) en bases dividida por la velocidad de extensión de la polimerasa en bases/segundo. Sin embargo, como se señaló anteriormente, la polimerasa habitualmente solo se satura al comienzo de la PCR, antes de que la concentración de plantilla aumente a mayor que la concentración de polimerasa. Una manera de disminuir el tiempo de ciclo es utilizar PCR de dos temperaturas cerca del máximo de temperatura de la polimerasa, típicamente 70-80 °C. El tiempo de extensión requerido se puede determinar experimentalmente utilizando PCR en tiempo real y monitorizando el ciclo de cuantificación o Cq. Por ejemplo, a una velocidad de extensión de polimerasa de 100 bases/segundo a 75 °C, se esperaría que un producto de 200 pb requiriera aproximadamente 2 segundos si la concentración de polimerasa es excesiva. De manera similar, se esperaría que un producto de 400 pb requiriera aproximadamente 4 segundos utilizando esta misma polimerasa siempre que su concentración sea mayor que la plantilla que se está extendiendo. Si la polimerasa no está en exceso, añadir más polimerasa permite extender más plantillas al mismo tiempo, disminuyendo el tiempo de extensión requerido en proporción a la concentración de polimerasa.

La utilidad de cualquier procedimiento de análisis de ADN depende de lo rápido se pueda realizar, cuánta información se obtenga y cuán difícil sea de realizar. En comparación con las técnicas de clonación convencionales, la PCR es rápida y simple. Las PCR de ciclo rápido y extrema se centran en la reducción continua del tiempo requerido. La PCR en tiempo real aumenta el contenido de la información adquiriendo datos en cada ciclo. El análisis de fusión se puede realizar durante o después de la PCR para monitorizar la hibridación de ADN continuamente a medida que aumenta la temperatura.

Volviendo a los paradigmas de equilibrio y cinético de PCR (figuras 15a-15b), la PCR extrema de productos <100 pb indica como ejemplo una buena aplicación del modelo cinético. Las temperaturas son siempre cambiantes y las velocidades de desnaturalización, hibridación y extensión dependen de la temperatura, por lo que solo se puede obtener una evaluación adecuada de la PCR integrando las velocidades de las reacciones de los componentes a través de la temperatura. Para productos de más de 100 pb, pueden ser necesarios tiempos de extensión más largos, y los componentes de los modelos tanto cinético como de equilibrio son apropiados.

Cuando las condiciones de reacción se configuran según, como mínimo, una realización en el presente documento, se ha descubierto que la PCR se puede realizar a velocidades muy rápidas, de manera ilustrativa con algunas realizaciones en menos de un minuto para una amplificación completa, con tiempos de ciclo de menos de dos segundos. De manera ilustrativa, se utilizan diversas combinaciones de concentraciones aumentadas de polimerasa y cebadores para esta PCR extrema. Sin estar vinculado a ninguna teoría en particular, se cree que un exceso de concentración de cebadores permitirá generalmente la hibridación completa de cebadores, aumentando así la eficiencia de la PCR. Además, sin estar vinculado a ninguna teoría en particular, se cree que un aumento en la concentración de polimerasa mejora la eficiencia de la PCR al permitir una extensión más completa. La concentración de polimerasa aumentada favorece la unión al cebador hibridado, y también favorece la unión de nuevo si una polimerasa se cae antes de la extensión completa. Los ejemplos a continuación muestran que la PCR extrema ha tenido éxito, incluso cuando comienza con ADN genómico eucariota complejo.

Aunque se utilizó KlenTaq en los ejemplos a continuación, se cree que cualquier polimerasa termoestable de actividad similar rendirá de manera similar en PCR extrema, con márgenes para velocidades de extensión de polimerasa. Por ejemplo, Herculase, Kapa2G FAST, KOD Phusion, polimerasa de *Therme aquaticus* natural o clonada, Platinum Taq, GoTaq y Fast Start son preparaciones comerciales de polimerasas que deberían permitir una PCR extrema cuando se utilizan en las concentraciones aumentadas presentadas aquí, de manera ilustrativa ajustadas por las diferencias en las velocidades de actividad enzimática.

Debido a que ningún instrumento comercial de PCR actual permite tiempos de ciclo de dos segundos, se

configuró un sistema 4 para ensayo preliminar de eficacia para PCR extrema. Sin embargo, se entiende que el sistema 4 es ilustrativo y otros sistemas que pueden termociclar rápidamente están dentro del alcance de la presente divulgación. Como se muestra en la figura 1a, se utilizan un baño de agua caliente 10 de 95,5 °C (la temperatura del agua hirviendo en Salt Lake City, UT, la ubicación donde se realizaron los presentes ejemplos) y un baño de agua fría 14 de 30-60 °C para cambiar la temperatura de 1-5 µl de muestras contenidas en un recipiente de muestra 20. Los baños de agua ilustrativos 10, 14 son frascos de acero inoxidable de 4,5 cuartos de galón (Lab Safety Supply, #41634), aunque se utilizaron vasos de precipitados de vidrio de 500 ml en algunos ejemplos, y se calientan en las placas calefactoras eléctricas 12, 16 con agitación magnética (placas calefactoras digitales Isotemp de Fisher Scientific (#11-300-49SHP). Sin embargo, se entiende que se pueden utilizar otros ejemplos para calentar y enfriar las muestras. En el ejemplo mostrado en la figura 1a, el recipiente de muestra 20 es un tubo de reacción compuesto de vidrio/plástico (BioFire Diagnostics #1720, 0,8 mm de DI y 1,0 mm de DE). Sin embargo, en otros ejemplos, agujas hipodérmicas (Becton Dickenson #305187, 0,042" DI, 0,075" DE) y tubos de reacción compuestos de acero inoxidable/plástico construidos a partir de tuberías de acero inoxidable (Small Parts, 0,042" DI/0,075" DE, 0,035" DI/0,042" DE, o 0,0265" DI/0,035" DE) y encajados en la parte superior de plástico de los tubos BioFire se utilizaron como recipiente de muestra 20. Aunque otros recipientes de muestra están dentro del alcance de esta divulgación, es deseable que los recipientes de muestra tengan una relación de área superficial respecto a volumen grande y tengan una velocidad de transferencia de calor rápida. Para ciertos ejemplos, el extremo abierto de la tubería de metal se selló calentándolo a un color rojo-blanco utilizando una llama de gas y comprimiéndolo en una prensa. Para la PCR en tiempo real, son deseables los tubos que son ópticamente transparentes o que tienen una porción ópticamente transparente. Las muestras se centrifugaron hasta el fondo de cada tubo mediante una breve centrifugación.

El recipiente de muestra 20 está sostenido por un soporte de tubos 22 unido a un eje del motor paso a paso 26 por el brazo 21. El soporte de tubos 22 fue mecanizado a partir de plástico Delrin negro para contener 2-5 recipientes de muestra 20 (solo un recipiente de muestra 20 es visible en la figura 1a, pero puede estar presente una fila de dichos recipientes de muestra 20) de modo que las soluciones de reacción se mantuvieron en un radio de 6,5 - 7,5 cm. Aunque no es visible en la figura 1a, se puede utilizar un termopar (termopar de alambre fino de precisión tipo T Omega #5SRTC-TT-T-40-36, 36" de plomo, 0,003' de diámetro con aislamiento de Teflón) para medir la temperatura. Con referencia a la figura 1d, que muestra un soporte de tubos y un brazo similares de la figura 1b con números similares representando componentes similares, está presente un soporte de tubos 222 diseñado para contener dos recipientes de muestra, con una ubicación en el soporte de tubos 222 ocupada por un termopar 228. Se entiende que se puede utilizar cualquier cantidad de recipientes de muestra 20 o 220 en cualquiera de los ejemplos descritos en el presente documento, con o sin un termopar, como se muestra en la figura 1d. La amplificación y linealización del termopar se realiza con un chip AD595 de Analog Devices (no se muestra). El voltaje del termopar se calculó primero a partir de la salida AD595 como voltaje Tipo T = (salida AD595/247,3) - 11 µV. A continuación, el voltaje del termopar se convirtió en temperatura utilizando los coeficientes del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología para la correlación voltaje/temperatura de termopares tipo T. La señal analógica se digitalizó (placa de adquisición PCIe-6363) y se procesó mediante el software LabView (versión 2010, National Instruments) instalado en la CPU 40 y se visualizó en la interfaz de usuario 42. El movimiento paso a paso se dispara dinámicamente de manera ilustrativa a 87-92 °C y 60-75 °C o puede mantenerse en cada baño de agua durante un período de tiempo controlado por ordenador. Típicamente se realizan entre treinta y cincuenta ciclos.

El motor paso a paso 24 (Applied Motion Products, #HT23-401, 3V, 3A) se coloca entre los baños de agua 10 y 14 para que todos los recipientes de muestra 20 en el soporte de tubos 22 puedan girar entre cada baño de agua 10 y 14, de modo que la porción de cada recipiente de muestra 20 que contiene muestras esté completamente sumergida. El motor paso a paso 24 está alimentado de manera ilustrativa por un 4SX-411 nuDrive (National Instruments, no se muestra) y controlado con un controlador de movimiento PCI-7344 y software NI-Motion (versión 8.2, National Instruments) instalado en la CPU 40. El motor paso a paso 24 gira entre los baños de agua 10 y 14 en aproximadamente 0,1 segundos. La figura 2a muestra un trazo de temperatura de muestra (-) yuxtapuesto sobre un trazo de la posición del recipiente de muestra 20 (----), para una carrera en la que se activó el movimiento paso a paso a 90 °C y 50 °C. Como se puede ver en la fig. 2, hay un sobreimpulso a una temperatura inferior a 50 °C, presumiblemente debido al tiempo requerido para mover el recipiente de muestra 20 fuera del baño de agua 14. Por lo tanto, como se discutió anteriormente, puede ser deseable activar el motor paso a paso 24 a una temperatura algo más alta. En los ejemplos a continuación, las temperaturas dadas corresponden a la temperatura de muestra alcanzada, no a la temperatura de activación. La velocidad de calentamiento máxima calculada a partir de la figura 2a es 385 °C/s y la velocidad de enfriamiento máxima 333 °C/s. De manera ilustrativa, la PCR extrema se puede realizar con velocidades de rampa de, como mínimo, 200 °C/s. En otros ejemplos, la velocidad de rampa puede ser 300 °C/s o mayor.

En algunos ejemplos, el sistema 4 también está configurado para monitorización en tiempo real. Como se muestra en la figura 1a, para la monitorización en tiempo real, una punta de fibra óptica 50 del bloque de

5 óptica 25 está montada sobre el recipiente de muestra 20, de modo que cuando el recipiente de muestra 20 se mueve desde el baño de agua caliente 10 al baño de agua fría mediante un motor paso a paso 24, el recipiente de muestra 20 pasa por la punta de fibra óptica 50, con o sin retención en esta posición de monitorización. En este ejemplo ilustrativo, la punta de fibra óptica se proporciona en aire por encima de los baños de agua. El dispositivo de termociclado 4 puede controlarse mediante la CPU 40 y verse en la interfaz de usuario 42.

10 La figura 1b muestra un ejemplo similar a la figura 1a. Se proporcionan placas calientes 212 y 216 para controlar la temperatura del baño de agua caliente 210 y el baño de agua fría 214. Se proporciona un motor paso a paso 224 para mover el recipiente de muestra 220 y el termopar 228 (mostrado en la figura 1d), moviendo el brazo 221 y el soporte de tubos 222, que de manera ilustrativa está hecho de aluminio. Sin embargo, en este ejemplo, la punta 250 del cable de fibra óptica 252 se mantiene en el baño de agua 214 situando el bloque 254. El cable de fibra óptica 252 entra en el baño de agua 214 a través del puerto 248 y proporciona señal al bloque de óptica 225. El dispositivo de termociclado 204 puede ser controlado por la CPU 240 y visto en la interfaz de usuario 242.

20 La luz de una fuente de luz LED LLS-455 de Ocean Optics 256 fue guiada por el cable de fibra óptica 252 (Ocean Optics P600-2-UV-VIS, diámetro del núcleo de fibra de 600 μm) en un bloque de óptica Hamamatsu 258 con un filtro de interferencia de excitación de 440 \pm 20 nm, un divisor de haz dicróico de 458 nm y un filtro de emisión de 490 \pm 5 nm (todo de Semrock, no se muestra). La iluminación epifluorescente del capilar se logró con otro cable de fibra óptica (no se muestra) colocado aproximadamente a 1-2 mm de distancia y en línea con el capilar de una muestra cuando se sitúa en el baño de agua más frío. La detección de emisiones se realizó con un PMT 62 de Hamamatsu.

25 La figura 1c muestra un sistema ilustrativo 304 para PCR a tres temperaturas. Se utilizan un baño de agua caliente 310 de 95,5 $^{\circ}\text{C}$, un baño de agua fría 314 de 30-60 $^{\circ}\text{C}$ y un baño de agua media 313 de 70-80 $^{\circ}\text{C}$ para cambiar la temperatura de las muestras de 1-5 μl contenidas en un recipiente de muestra 320 y se calientan en tres placas calefactoras eléctricas 312, 316 y 318 con agitación magnética. El recipiente de muestra 320 se sostiene mediante un soporte de tubos 322 unido a un motor paso a paso 324 por el brazo 321. El termopar 328 también se sostiene mediante el soporte de tubos 322. El brazo 321 puede elevarse a medida que gira el motor paso a paso 324. Una punta 350 de fibra óptica se proporciona de manera ilustrativa en un baño de agua media 313, aunque se entiende que puede colocarse en el aire, como con la figura 1a. Debido a la configuración de este ejemplo ilustrativo, no fue posible colocar los tres baños de agua, 310, 313 y 314 equidistantes entre sí.

35 Por consiguiente, el espacio más grande se colocó entre el baño de agua caliente 310 y el baño de agua fría 314, ya que es deseable enfriar la muestra entre estos baños, mientras que la muestra se mueve entre los otros baños de agua para calentarse. Sin embargo, se entiende que esta configuración es solo ilustrativa y que otras configuraciones están dentro del espíritu de la presente divulgación. Debido a que se utilizan dos motores paso a paso simultáneamente (uno para elevar el capilar fuera del agua y otro para transferir entre baños de agua), el movimiento angular de cada uno se puede minimizar para disminuir el tiempo de movimiento entre baños. En el sistema de 2 baños de agua, el movimiento angular requerido del paso a paso para transferir la muestra entre baños es mayor de 270 grados. Sin embargo, en el sistema de 3 baños de agua, el motor paso a paso que eleva las muestras necesita atravesar menos de 45 grados, mientras que el paso a paso que mueve las muestras entre baños de agua necesita moverse solo 90 grados o menos. Los baños de agua también se pueden configurar como sectores de un círculo (cuñas en forma de tarta) para limitar aún más el movimiento angular requerido. Minimizar el movimiento angular disminuye el tiempo de transferencia entre baños de agua. Se prevén tiempos de transferencia de menos de 100 ms o incluso menos de 50 ms. Otros componentes de este sistema 304 son similares a los sistemas 4, 204 mostrados en las figuras 1a-b y no se muestran en la figura 1c.

EJEMPLO 1

55 A menos que se indique lo contrario, la PCR se realizó en volúmenes de reacción de 5 μl que contenían Tris 50 mM (pH 8.3, a 25 $^{\circ}\text{C}$), MgCl_2 3 mM, 200 μM cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 500 $\mu\text{g/ml}$ de albúmina de suero bovino no acetilada (Sigma), glicerol al 2 % (v/v) (Sigma), 50 ng de ADN genómico humano purificado y 1X LCGreen® Plus (BioFire Diagnostics). La concentración de los cebadores y la polimerasa varió según los protocolos experimentales específicos. La ADN polimerasa KlenTaq1™ se obtuvo de AB Peptides, St. Louis, MO, o de Wayne Barnes en la Universidad de Washington (St. Louis). El peso molecular de KlenTaq es 62,1 kD con un coeficiente de extinción a 280 nm de 69.130 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, calculado a partir de la secuencia (Patente US 5,436,149). La espectrometría de masas confirmó un peso molecular predominante de 62 kD, y los geles de poliácridamida desnaturalizados mostraron que la banda principal tenía una pureza superior al 80 % por integración. La utilización de la absorbancia y la pureza para calcular la concentración indicó un stock de 80 μM en glicerol al 10 %. Las concentraciones finales de polimerasa fueron típicamente de 0,25-16 μM . Un μM de KlenTaq es el equivalente a 0,75 U/ μl , con una unidad definida como

10 nmol de producto sintetizado en 30 minutos a 72 °C con ADN de esperma de salmón activado. Los cebadores fueron sintetizados por la instalación central de la Universidad de Utah, se desalaron y las concentraciones se determinaron por A_{260} . Las concentraciones finales de cada cebador variaron típicamente de 2,5-20 μM .

5

Se amplificó un fragmento de 45 pb de *KCNE1* a partir de ADN genómico humano utilizando los cebadores CCCATTCAACGTCTACATCGAGTC (SEQ ID NO:1) y TCCTTCTCTTGCCAGGCAT (SEQ ID NO:2). Los cebadores encuadraron la variante rs#1805128 (c.253G>A) y amplificaron la secuencia: CCCATTCAACGTCTACATCGAGTCC(G/A)ATGCCTGGCAAGAGAAGGA (SEQ ID NO:3).

10

15

La figura 3a muestra una curva de fusión del producto de PCR generado por PCR extrema utilizando el dispositivo que se muestra en la figura 1a, donde se utilizaron KlenTaq 0,64 μM y 10 μM de cada cebador, y se ciclaron entre 91 °C y 50 °C, como se muestra en la figura 2b, durante 35 ciclos y un tiempo de amplificación total de 28 segundos. Cada ciclo requirió 0,8 segundos. En la figura 3a también se muestra una curva de fusión del mismo amplicón generado por un ciclo rápido en el LightCycler, donde se utilizaron KlenTaq 0,064 μM y 0,5 μM de cada cebador, y el ciclo estuvo entre 90 °C y 50 °C durante 35 ciclos y un tiempo de amplificación total de 12 minutos (figura 2c). Cada ciclo requirió 10,3 segundos. Nótese que, debido a las diferentes escalas de tiempo en las figuras 2b y 2c, todo el protocolo de PCR extrema de la figura 2b se completa en menos de 2 ciclos de su contrapartida de ciclo rápido. Ambas reacciones produjeron amplicones con T_m similares y bandas intensas en la electroforesis en gel (figura 3b), mientras que ningún control negativo mostró amplificación por análisis de fusión o electroforesis en gel. En este ejemplo ilustrativo, las condiciones de PCR extrema mostraron un mayor rendimiento que las condiciones de PCR de ciclo rápido cuando se analizaron en geles (figura 3b). Se cree que la diferencia de 0,5 °C en T_m en las curvas de fusión se debe a las diferentes cantidades de glicerol en cada reacción, que surgen del contenido de glicerol en el tampón de almacenamiento de polimerasa (la concentración final de glicerol en la PCR fue del 1,3 % en condiciones extremas y del 0,1 % en condiciones rápidas). La figura 3b también confirma que el tamaño de los amplicones era similar y como se predijo. Además, a pesar de las altas concentraciones de polimerasa y cebadores, la reacción parece específica sin indicación de productos inespecíficos. Sin embargo, el análisis de fusión de alta resolución no pudo distinguir los 3 genotipos. El porcentaje estequiométrico de la polimerasa respecto a la concentración total de cebadores fue del 3 % para PCR extrema y del 6,4 % para PCR de ciclo rápido.

20

25

30

35

La monitorización en tiempo real de la reacción de *KCNE1* de 45 pb se realizó utilizando polimerasa 1 μM , 10 μM de cada cebador y el 1,3 % de glicerol. La muestra se monitorizó cada ciclo en aire entre los 2 baños de agua utilizando el dispositivo de la figura 1a. La temperatura del aire de la cámara cerrada se mantuvo a 70 °C y la muestra se interrogó durante 0,2 segundos cada ciclo. Según lo medido por el capilar de referencia de temperatura, las muestras se ciclaron entre 60 y 90 °C, como se muestra en la figura 3c. El tiempo de ciclo aumentó de 0,8 segundos a 1,12 segundos debido al tiempo adicional para situación y medición. De este modo, se completaron cincuenta ciclos en 56 segundos. La amplificación fue evidente a partir de un aumento en la fluorescencia a aproximadamente 30 ciclos o después de aproximadamente 34 segundos (figura 3c). La temperatura permaneció cerca de 60 °C mientras la muestra estaba en el aire para la medición, limitando la velocidad de extensión de la polimerasa.

40

45

Como se ve en la figura 3c, esta reacción tiene un ciclo de cuantificación (C_q) de aproximadamente 25 ciclos, pero no parece estabilizarse hasta, como mínimo, 50 ciclos. Además, debido a que la reacción se detuvo después de 64 ciclos, es posible que la cantidad de amplicón continúe aumentando y no se estabilice hasta significativamente más tarde. Sin limitarse a la teoría, se cree que el aumento en la concentración del cebador permite un rendimiento mejorado y una meseta retrasada, de manera ilustrativa 20 ciclos después de C_q , y de manera más ilustrativa 25 ciclos o más después de C_q .

50

EJEMPLO 2

55

En este ejemplo, un fragmento de 58 pb que encuadra una variante A>G (rs#2834167) en el receptor beta de interleucina 10 se amplificó con los cebadores CTACAGTGGGAGTCACCTGC (SEQ ID NO:4) y GGTACTGAGCTGTGAAAGTCAGGTT (SEQ ID NO:5) para generar el siguiente amplicón: CTACAGTGGGAGTCACCTGCTTTTGCC(A/G)AAGGGAACCTGACTTTCACAGC TCAGTACC (SEQ ID NO:6). La PCR extrema se realizó como se describe en el ejemplo 1 utilizando el instrumento que se muestra en la figura 1a. Se utilizaron un μM de polimerasa, 10 μM cada cebador y el 1,3 % de glicerol (porcentaje de polimerasa al cebador total = 5 %). Para aumentar la temperatura para la extensión de polimerasa a 70-80 °C, donde la polimerasa tiene velocidades de extensión más altas, se utilizó un protocolo de situación diferente. Después de alcanzar la temperatura de hibridación, en lugar de situarla inmediatamente en el aire para la monitorización, la muestra se transfirió al baño de agua caliente hasta que se alcanzó la temperatura de extensión. Luego, la muestra se situó en el aire justo por encima del baño de agua caliente, produciendo los ciclos de temperatura que se muestran en las figuras 4a y 4b, y permitiendo

60

una extensión de polimerasa más rápida a temperaturas óptimas entre 70 y 77 °C. Los 3 genotipos diferentes se amplificaron cada uno por PCR extrema utilizando ciclos de 0,97 segundos, completando 39 ciclos en 38 segundos. Después de la PCR extrema, se obtuvieron curvas de fusión de alta resolución para cada genotipo en un instrumento HR-1 modificado para aceptar capilares LC24. La figura 4c revela que los tres genotipos se amplificaron y distinguieron, como se esperaba.

EJEMPLO 3

Las mezclas de reacción en el ejemplo 1 fueron las mismas tanto para la PCR extrema como para la PCR de ciclo rápido, excepto por las cantidades de polimerasa y cebadores, y una pequeña diferencia en la concentración de glicerol que aparentemente causó el cambio en la T_m visto en la figura 3a. En este y en todos los ejemplos futuros, la concentración de glicerol se mantuvo al 2 % igualando su concentración según sea necesario. Para la PCR extrema, se utilizaron polimerasa 1 μM y 10 μM de cada cebador, mientras que para la PCR de ciclo rápido, se utilizaron polimerasa 0,064 μM y 0,5 μM de cada cebador. Como se analizó anteriormente, se cree que tiempos de hibridación más rápidos proporcionan una especificidad de cebadores mejorada. Con esta especificidad mejorada, se pueden utilizar mayores concentraciones de cebadores, lo que se cree que favorece la unión del cebador y permite tiempos de hibridación reducidos. De manera similar, el aumento de las concentraciones de polimerasa favorece la unión al cebador hibridado, y también favorece la unión de nuevo al amplicón incompleto si una polimerasa se cae antes de la extensión completa. Además, debido a la mayor concentración de polimerasa, una mayor proporción de las plantillas cebadas puede extenderse de una vez, incluso tarde en la PCR, reduciendo el número de plantillas que una sola polimerasa debe extender y reduciendo el tiempo de extensión total.

La figura 5a resume los resultados del ciclado de PCR extrema con diversas concentraciones de polimerasa y cebadores. En este ejemplo, se amplificó un fragmento de 49 pb del receptor beta de interleucina 10 con los cebadores GGGAGTCACCTGCTTTTGCC (SEQ ID NO:7) y TACTGAGCTGTGAAAGTCAGGTTCC (SEQ ID NO:8) y MgCl_2 3 mM, para generar:

GGGAGTCACCTGCTTTTGCCAAAGGGAACCTGACTTTTCACAGCTCAGTA (SEQ ID NO:9).

Para cada reacción de PCR extrema, se utilizó el dispositivo que se muestra en las figuras 1b sin monitorización en tiempo real. La temperatura se sometió a un ciclo entre 90 °C y 63 °C durante 35 ciclos, para un tiempo de reacción total de poco menos de 26 segundos (ciclos de 0,73 segundos) como se muestra en la figura 5b. Las condiciones de reacción fueron como se analizó en el ejemplo 1, excepto que las cantidades de polimerasa y cebadores variaron, como se muestra en la figura 5a. El eje vertical en la figura 5a se cuantifica como el pico de la gráfica de derivada negativa de la curva de fusión, obtenida sin normalización en el instrumento HR-1. A polimerasa 0,5 μM , prácticamente no se observó amplificación a ningún nivel de concentración de cebadores. Sin embargo, a polimerasa 1,0 μM , se observaron niveles discernibles de amplificación a concentraciones de cebadores de 5 μM y superiores. A medida que aumentan los niveles de polimerasa, también lo hace la cantidad de amplicón, hasta niveles de aproximadamente 4 μM . A polimerasa 8 μM , la cantidad de amplicón se estabilizó o disminuyó, dependiendo de la concentración de cebadores, con una disminución significativa a 16 μM a concentraciones de cebador más bajas. Parece que en estas condiciones de ciclado de temperatura extrema para un producto de 49 pb, la polimerasa tiene un intervalo de concentración favorecido entre aproximadamente 1 y 8 μM , y más específicamente entre 2 y 8 μM , dependiendo de la concentración de cebadores.

De manera similar, se observó poca amplificación con concentraciones de cebadores de 2,5 μM . Sin embargo, la amplificación fue exitosa a 5 μM de cebador, con concentraciones de KlenTaq de 2-8 μM , y la amplificación continuó mejorando con concentraciones crecientes. Se logró una amplificación excelente con concentraciones de cebador de aproximadamente 10-20 μM de cebador. La figura 5c muestra curvas de fusión para diversas concentraciones de cebadores a KlenTaq 4 μM , mientras que la figura 5d verifica el tamaño del producto ya que la concentración de polimerasa varía mientras la concentración de cebador se mantiene a 10 μM . A pesar de las altas concentraciones de polimerasa y cebadores, no se observa amplificación inespecífica.

Sin estar vinculado a la teoría, parece que la relación entre la cantidad de enzima y la cantidad de cebador es importante para ciclado de PCR extrema, siempre que ambas estén por encima de una cantidad umbral. Se observa que las cantidades anteriores se proporcionan basándose en cada cebador. Dado que la polimerasa se une a cada uno de los cebadores duplicados, la concentración total de cebadores puede ser la más importante. Para KlenTaq, las proporciones adecuadas son 0,03-0,4 (3-40 % de enzima respecto a concentración total de cebadores), con una concentración mínima ilustrativa de KlenTaq de aproximadamente 0,5 μM , y de manera más ilustrativa aproximadamente 1,0 μM , para PCR extrema. Los cebadores pueden proporcionarse en cantidades equimolares, o uno puede proporcionarse en exceso, como para PCR asimétrica. El porcentaje polimerasa: cebador óptimo también puede depender de las condiciones de ciclado de temperatura y del tamaño del producto. Por ejemplo, el ciclado de temperatura estándar (lento) a menudo utiliza un porcentaje de polimerasa respecto a cebador mucho más bajo, típicamente 1,5 nM (0,04 U/ μl) de

cebador), mientras que el fragmento de BBS2 de 337 pb dio como resultado un producto de PCR de 428 pb que requería la extensión de 378 o 387 bases. La amplificación específica se verificó en geles de agarosa y por análisis de fusión. El perfil extremo de temperatura de PCR utilizado para el producto de 226 pb se muestra en la figura 8a, que incluía una hibridación/extensión combinadas de 1 segundo a 75 °C y desnaturalización a 87 °C. También se realizó una fase de hibridación/extensión de 2 segundos a la misma temperatura (no se muestra el trazo). Los resultados de PCR en tiempo real para estas amplificaciones se muestran en la figura 8c, revelando un desplazamiento de 5 ciclos a un Cq más alto con la extensión de 1 segundo en comparación con la extensión de 2 segundos, lo que presumiblemente refleja una disminución en la eficiencia a medida que disminuye el tiempo de extensión. El perfil de temperatura de PCR extrema utilizado para el producto de 428 pb se muestra en la figura 8b, que muestra una hibridación/extensión combinadas de 4 segundos a 75 °C y desnaturalización a 87 °C. También se realizó una fase de hibridación/extensión de 5 segundos a la misma temperatura (no se muestra el trazo). Los resultados de PCR en tiempo real para estas amplificaciones se muestran en la figura 8d, revelando un desplazamiento de 2 ciclos a un Cq más alto con la extensión de 4 segundos en comparación con la extensión de 5 segundos, lo que presumiblemente refleja una disminución en la eficiencia a medida que disminuye el tiempo de extensión.

EJEMPLO 7

El rendimiento cuantitativo de la PCR se evaluó utilizando el instrumento en tiempo real de la figura 1b para el fragmento de 102 pb de NQO1 del ejemplo 5 y el fragmento de 45 pb de KCNE1 del ejemplo 1 utilizando una serie de diluciones de ADN genómico humano, utilizando KlenTaq 2 µM y 8 µM de cada cebador para NQO1 y KlenTaq 8 µM y 20 µM de cada cebador para KNCE1. Con un intervalo dinámico de, como mínimo, 4 décadas, como se ve en las figuras 9a y 9b, las eficiencias de amplificación calculadas a partir de las curvas estándar fueron el 95,8 % para NQO1 y el 91,7 % para KCNE1. Las reacciones de control sin plantilla no amplificaron después de 50 ciclos y las réplicas de una sola copia (número medio de copias de 1,5 copias por reacción) fueron similares en forma e intensidad de la curva de amplificación a concentraciones más altas (figuras 9A y 9C). Con un número medio de copias de 0,15 copias/reacción, 2 reacciones de 17 fueron positivas (combinando los ensayos NQO1 y KCNE1), con una expectativa calculada de 0,13 copias/reacción por expansión binomial.

EJEMPLO 8

El tiempo de extensión requerido para diferentes longitudes de producto utilizando PCR en tiempo real (figuras 10a-c). Para controlar los posibles efectos de confusión de diferentes cebadores, plantillas sintéticas de 100-500 pb utilizando los siguientes cebadores comunes de alta Tm (77 °C):

ACTCGCACGAACTCACCGCACTCC (SEQ ID NO:18) y GCTCTCACTCGCACTCTCACGCACA (SEQ ID NO:19).

Las secuencias de plantillas sintéticas fueron:

Plantilla de 100 pb:

ACTCGCACGAACTCACCGCACTCCGGATGGATTGTGAAGAGGCCCAAGATAC
TGGTCATATTATCCTTTGATCTAGCTCTCACTCGCACTCTCACGCACA (SEQ ID
NO:20).

Plantilla de 200 pb:

ACTCGCACGAACTCACCGCACTCCTCAATGCTGACAAATCGAAAGAATAGGA
ATAGCGTAATTACTAGAGGACTCCAATATAGTATATTACCCTGGTGACCGCCT
GTACTGTAGGAACACTACCGCGTTATATTGACAGCTTAGCAATCTACCCTGT
TGGGATCTGTTTAAGTGGCTCTCACTCGCACTCTCACGCACA (SEQ ID NO:21).

Plantilla de 300 pb:

50

ACTCGCACGAACTCACCGCACTCCCCTTCGAATATAAAGTACGACATTACTAG
 CAATGACAGTTCAGGATTTAAGAAAGTAGTGTTCACATCAATGCATATCCA
 GTGAAAGCATAACGTCAAAAAAAGCCTGGCACCGTTCGCGATCTGGACTTAC
 TTAGATTTGTTGTAGTCAAGCCGGCTATCAGCGATTTATCCCGGAAACACATA
 CTAGTGAGTTATTTGTATGTTACCTAGAATAGCTGTCACGAATCACTAATACA
 TTCACCCACCAGCTCTCACTCGCACTCTCACGCACA (SEQ ID NO:22).

Plantilla de 400 pb:

ACTCGCACGAACTCACCGCACTCCTGAATACAAGACGACAGTCCTGATTATAT
 TTTCAATTAATTACGCCAATTTAATTATGATGAATATTAACGGAATTAATAT
 GTATTGATAAGTACTAAGTAATGGTTTACCCACGGCGATCTATATGCAAGGG
 AACATTAACAAATTTAAACATCTGATGTGGACAAAACCTTGTAATGTGGTAT
 AGTTAAAAATATAGGTTTCAGGGACACGTAAGTATCTATCTTGAATGTTTAAG
 TAGGTCCTGTCTACCATTCTGAAATTTAGAAAATCGCGTTCATCGGGCTGTCG
 GCTACACCTCAGAAAACCATTTTCGTGTTGCACAGGAGGAACTTTCGAGGGTTC
 5 GTATGAGCTCTCACTCGCACTCTCACGCACA (SEQ ID NO:23).

Plantilla de 500 pb:

ACTCGCACGAACTCACCGCACTCCACCGCTTGACGACGTAGGGTATTTGGTAT
 CTGAATCTACTCATTTACCTACATACTGAAGATTTTGCATCGTCTAATATATT
 GGACTAATGCCCGATTTCTGATCAATTACTCTAGGCGATACTTCATCGCTGGC
 CTTATTTGGATTTTGCTCAAGTGCTAAACTCTCTGCGCGTCAATACTAGTCTGA
 CATCAGTCAAGACCTGCTATCTGAAACTACTAGAGAGATATACCTAACAAAC
 TTTAGTGGATAAATCAGGCTCTGGAGATTGTCATATAATGCCACTAGGGTCAGA
 AGGCTGTGTCAAAGTTAGTGGTTAGTAGGTCTCCGCTCTGCGGTAATTTCTT
 ATATTCTCTTACTATGCATCAAACAAAATAGAATGCATAGACAAACCGCCTGC
 CAAGTTTACAAGATAACTTGCGTATAGGTTTATAAGGGTTCTTCTGTATCGCT
 CTCACCTCGCACTCTCACGCACA (SEQ ID NO:24).

10

Las concentraciones óptimas de cebadores y polimerasa se determinaron primero para el producto de 300 pb de longitud intermedia utilizando un segmento de hibridación/extensión combinadas de 4 segundos con 4,9 segundos por ciclo (figura 10a). A continuación se utilizaron concentraciones idénticas de cebadores (4 μ M) y polimerasa (2 μ M) para todas las longitudes del producto y se determinaron los tiempos mínimos de extensión (figura 11a-e). Dependiendo de la longitud del producto, el aumento de los tiempos de extensión dio como resultado una disminución de los ciclos de cuantificación fraccional (Cq) hasta que no se observó ningún cambio adicional, lo que refleja el tiempo de extensión mínimo requerido para una PCR eficiente. Por ejemplo, las curvas de amplificación que utilizan la polimerasa KAPA2G™ FAST (Kapa Biosystems) para el producto de 500 pb se muestran en la figura 10b. El tiempo mínimo de extensión utilizando polimerasa KAPA2G FAST fue de 3 s, en comparación con 7 s utilizando KlenTaq1 (un mutante de delección de polimerasa Taq, AB Peptides). Cuando la identidad de la polimerasa se mantiene constante, los productos más largos requieren tiempos de extensión más largos (figura 10c). Para la polimerasa KlenTaq1, se requiere aproximadamente 1 segundo por cada 60 pb, mientras que para KAPA2G FAST, se requiere 1 segundo por cada 158 pb. Se observa que estas dos polimerasas se eligieron porque están disponibles en el mercado a concentraciones suficientes, mientras que la mayoría de las otras polimerasas no están disponibles en el mercado a concentraciones tan altas. Se entiende que el tiempo requerido para la extensión depende directa

15

20

25

y linealmente de la longitud a extender, e inversamente de la concentración de polimerasa y la velocidad de la polimerasa. Se puede definir una constante de proporcionalidad (k_2) que relacione estos 3 parámetros:

$$\text{Tiempo de extensión requerido} = k_2 * (\text{longitud de extensión}) / ([\text{polimerasa}] * (\text{velocidad de polimerasa}))$$

EJEMPLO 9

Los tiempos de PCR extrema también se pueden reducir con altas concentraciones de Mg^{++} . Un fragmento de 60 pb de AKAP10 se amplificó con los cebadores: GCTTGGGAAGATTGCTAAAATGATAGTCAGTG (SEQ ID NO:25) y TTGATCATACTGAGCCTGCTGCATAA (SEQ ID NO:26), para generar el amplicón GCTTGGGAAGATTGCTAAAAT-GATAGTCAGTGAC(A/G)TTATGCAGCAGGCTCA GTATGATCAA (SEQ ID NO:27).

Cada reacción estaba en un volumen de 1 μ l con control basado en el tiempo (0,07 segundos en un baño de agua a 94 °C, 0,1-0,4 segundos en un baño de agua a 60 °C) durante 35 ciclos utilizando $MgCl_2$ 2-7 mM. El volumen de la muestra fue de 1 μ l, con 5 ng de ADN genómico humano, cebadores 20 μ M y polimerasa 8 μ M. Utilizando un protocolo de 0,42 segundos por ciclo, cuando el $MgCl_2$ era 2-3 mM, no se observó producto en las curvas de fusión (figura 12a) o geles (figura 12b). El producto mínimo estaba presente a 4 mM, pero se observó una gran cantidad de producto después de la amplificación con $MgCl_2$ 5-7 mM. A $MgCl_2$ 5 mM, no se observaron productos en las curvas de fusión (figura 13a) o geles (figura 13b) con tiempos de ciclo de 0,32 segundos, pero grandes cantidades de producto estaban presentes a tiempos de ciclo de 0,42 segundos, 0,52 segundos y 0,62 segundos, lo que demuestra que se pueden obtener productos específicos de alto rendimiento de 60 pb en la PCR realizada en menos de 15 segundos (35 ciclos en 14,7 segundos). Por lo tanto, las concentraciones ilustrativas de Mg^{++} son, como mínimo, 4 mM, como mínimo, 5 mM, como mínimo, 6 mM, como mínimo, 7 mM o más, y se entiende que estas concentraciones ilustrativas de Mg^{++} pueden utilizarse con cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento.

EJEMPLO 10

Las altas concentraciones de cebador y polimerasa utilizadas en PCR extrema pueden tener efectos perjudiciales cuando se utilizan a velocidades de ciclo más lentas. Se obtuvieron productos inespecíficos en ciclos rápidos o en instrumentos basados en bloques que son 32 o 106 veces más lentos, respectivamente. La figura 14a-b muestra los resultados que comparan la amplificación del producto AKAP10 de 60 pb utilizado en el ejemplo 9, en el que la amplificación se realizó utilizando 20 μ M de cada cebador, KlenTaq 8 μ M y 10 ng de ADN genómico humano durante 40 ciclos utilizando: (1) PCR extrema con tiempos establecidos de 0,5 s a 94 °C y 0,2 segundos a 60 °C dando un tiempo total de aproximadamente 17 segundos, (2) PCR de ciclo rápido (Roche LightCycler) utilizando tiempos establecidos de 10 s a 94 °C para una desnaturalización inicial, seguido por ciclos de 85 °C durante 0 segundos, y 60 °C durante 0 segundos, dando un tiempo total de aproximadamente 9 minutos, y (3) ciclado de temperatura tradicional (bloque) (BioRad CFX96) con una desnaturalización inicial de 10 s a 94 °C, siguiendo por ciclado de temperatura durante 0 s a 85 °C y 5 s a 60 °C con un tiempo total de aproximadamente 30 minutos. Como se puede ver, incluso el ciclado rápido del LightCycler dio como resultado una amplificación bastante inespecífica, mientras que las condiciones del ciclado extremo dieron como resultado un pico de fusión único y una amplificación mínima inespecífica en el gel.

También señaló que el rendimiento se mejora en PCR extrema, como resultado de altas concentraciones de cebadores y polimerasa. La PCR extrema produjo más de 30 veces la cantidad de producto en comparación con la PCR de ciclo rápido, utilizando una PCR cuantitativa para la comparación (datos no mostrados).

Los ejemplos 1 a 10 se realizaron todos utilizando uno o más de los dispositivos descritos en las figuras 1a - 1d, o variaciones menores en esas configuraciones. Sin embargo, se entiende que los procedimientos y reacciones descritos en el presente documento pueden tener lugar en una variedad de instrumentos. Los baños y tubos de agua utilizados en estos ejemplos permiten un cambio de temperatura suficientemente rápido para estudiar los efectos de concentraciones elevadas de cebadores y polimerasa. Sin embargo, otros ejemplos pueden ser más adecuados comercialmente. Los sistemas de microfluídica, con un volumen bajo y una alta relación de área superficial respecto a volumen, pueden ser adecuados para PCR extrema. Dichos sistemas permiten cambios rápidos de temperatura requeridos por las altas concentraciones de cebadores y polimerasa que se utilizan en PCR extrema. Los sistemas de microfluídica incluyen sistemas de micro-flujo (35, 53) que incorporan canales miniaturizados que transportan repetidamente las muestras a través de zonas de temperatura de desnaturalización, hibridación y extensión. Algunos de estos sistemas ya han demostrado una PCR efectiva con tiempos de ciclo tan rápidos como 3 segundos para dianas de menor complejidad. Se espera que las dianas más complejas puedan amplificarse en dichos sistemas si la polimerasa se proporciona a una concentración de, como mínimo, 0,5 μ M y los cebadores se proporcionan a una concentración de, como mínimo, 2 μ M. Los chips de PCR estacionarios y los sistemas de gotas de PCR (54) también pueden beneficiarse del aumento de las concentraciones de cebadores y sonda, ya que los volúmenes pueden ser tan pequeños como 1 nl o más pequeños y pueden ser lo suficientemente bajos como

para permitir un ciclado muy rápido. Se entiende que la instrumentación exacta no es importante para la presente invención, siempre que la temperatura de la instrumentación haga ciclos lo suficientemente rápidos como para aprovechar el aumento de las concentraciones de cebadores y polimerasa sin sufrir la pérdida de especificidad asociada con mayores concentraciones de cebadores a velocidades de ciclo más lentas.

5 Aunque todos los ejemplos anteriores emplean PCR, se entiende que la PCR es solo ilustrativa, y se prevén mayores concentraciones de cebadores y enzimas combinadas con tiempos de amplificación más cortos para procedimientos de amplificación de ácido nucleico distintos de la PCR. Las actividades enzimáticas ilustrativas cuya magnitud puede incrementarse incluyen polimerización (ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa inversa), ligadura, desenrollamiento helicoidal (helicasa) o actividad de exonucleasa (5' a 3' o 3' a 5'), desplazamiento de cadena y/o escisión, actividad de endonucleasa y digestión de ARN de un híbrido de ADN/ARN (ARNasa H). Las reacciones de amplificación incluyen, sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa, la reacción en cadena de la ligasa, la amplificación mediada por transcripción (incluyendo el sistema de amplificación basado en la transcripción, la replicación de secuencias autosostenida y la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico), la amplificación por desplazamiento de cadena, la amplificación del genoma completo, amplificación por desplazamiento múltiple, amplificación de ARN antisentido, amplificación mediada por bucle, amplificación de enlace lineal, amplificación de círculo rodante, amplificación de ramificación, amplificación de oligonucleótidos isotérmicos, reacción en cadena de la helicasa y amplificación por señal invasiva en serie.

20 En general, a medida que varía la actividad enzimática, el tiempo de amplificación varía inversamente por el mismo factor. Para reacciones que incluyen cebadores, a medida que varía la concentración de cebadores, el tiempo de amplificación varía inversamente por el mismo factor. Cuando se requieren tanto cebadores como enzimas para la amplificación, las concentraciones tanto de enzimas como de cebadores deben variarse para maximizar la velocidad de reacción. Si la hibridación del cebador se produce en un segmento único del ciclo de amplificación (por ejemplo, una temperatura única durante la PCR de 3 temperaturas), se espera que el tiempo requerido para completar satisfactoriamente la hibridación del cebador en ese segmento esté inversamente relacionado con la concentración del cebador. De manera similar, si se requiere la actividad enzimática en un segmento único del ciclo de amplificación (por ejemplo, una temperatura única durante la PCR de 3 temperaturas), se espera que el tiempo requerido para completar satisfactoriamente el proceso enzimático en ese segmento esté inversamente relacionado con la concentración de enzima dentro de un cierto intervalo. La variación de las concentraciones de cebadores o de enzimas se puede utilizar para cambiar los tiempos requeridos de sus segmentos individuales, o si ambos ocurren en las mismas condiciones (tal como en la PCR a 2 temperaturas o durante un proceso de reacción isotérmica), se espera que un cambio en ambas concentraciones puede ser necesario para evitar que una reacción limite la velocidad de reacción. El aumento de la concentración de Mg⁺⁺ también se puede utilizar en combinación con el aumento de las concentraciones de enzimas y cebadores para acelerar los procesos de amplificación. Las concentraciones más altas de Mg⁺⁺ tanto aumentan la velocidad de hibridación del cebador como reducen el tiempo de muchas reacciones enzimáticas utilizadas en la amplificación de ácidos nucleicos.

40 Las concentraciones más altas de Mg⁺⁺, enzimas y cebadores son particularmente útiles cuando van acompañadas de tiempos o segmentos de amplificación más cortos. Cuando se utilizan concentraciones más altas sin acortar tiempos, pueden producirse productos de amplificación inespecíficos en algunos casos, ya que se ha reducido la "rigurosidad" de la reacción. Reducir el tiempo de amplificación o el o los tiempos de segmento introduce una rigurosidad más alta que parece contrarrestar la pérdida de rigurosidad del aumento de las concentraciones de reactivo. Por el contrario, los costes de los reactivos pueden minimizarse reduciendo la concentración de los reactivos si estas concentraciones más bajas se compensan con el aumento de los tiempos de amplificación o los tiempos de segmento.

50 El aumento de las concentraciones de polimerasa puede reducir el tiempo necesario para la PCR de largo alcance, de manera ilustrativa donde la diana es de 5-50 kb. Típicamente, se utilizan períodos de extensión de 10 min a 30 min para amplificar dianas grandes porque la diana es tan larga que se necesitan dichos tiempos: 1) para que la polimerasa complete la extensión de una sola diana, y 2) para el reciclaje de enzimas para polimerizar plantillas cebadas adicionales. Este reciclaje de polimerasa no es necesario al comienzo de la PCR, cuando la enzima disponible supera en número a las moléculas de plantilla cebadas. Sin embargo, incluso antes de que termine la fase exponencial, el número de moléculas de polimerasa a menudo se vuelve limitante y es necesario el reciclaje de enzimas. Al aumentar la concentración de la polimerasa, el período de extensión requerido se puede reducir a menos de 5 minutos y posiblemente a menos de 2 minutos, mientras se mantiene un rendimiento aumentado debido a la alta concentración de cebador. Aunque la velocidad real de la enzima no aumenta, es necesario un menor reciclaje, lo que afecta al tiempo mínimo requerido, aproximadamente de manera lineal con la concentración de la enzima.

65 Los tiempos de secuenciación del ciclo también pueden reducirse aumentando las concentraciones de cebadores y polimerasa. Típicamente, en la secuenciación del ciclo estándar, las concentraciones de cebadores son de 0,16 μM y el período de hibridación/extensión combinadas es de 10 minutos a 50-60 grados C. Al aumentar las concentraciones de cebadores y polimerasa en 10 veces, el tiempo requerido para

ES 3 011 358 T3

hibridación/extensión se puede reducir aproximadamente 10 veces. Tanto en la PCR larga como en la secuenciación del ciclo, el tiempo esperado requerido es inversamente proporcional a la concentración de polimerasa o cebadores, lo que sea limitante.

- 5 La PCR de fragmentos con enlaces ligados que se utilizan como cebadores en preparación para la secuenciación paralela masiva se puede completar en mucho menos tiempo que la realizada actualmente combinando ciclado de temperatura extrema con concentraciones más altas de cebadores, polimerasa y/o Mg^{++} .
- 10 En todas las aplicaciones anteriores, se espera que la especificidad de la reacción se mantenga mediante tiempos de amplificación más cortos. Aunque los expertos en la materia esperan que las altas concentraciones de cebadores y polimerasa causen dificultades debido a la amplificación inespecífica, la minimización del tiempo de ciclo global y/o los tiempos de segmento individuales dan como resultado una alta especificidad y eficiencia de la PCR.

Tabla 3

	[Cebador] (μM)	[Polimerasa] (μM)	Velocidad de polimerasa (nt/s)	Longitud de extensión (pb)	Tiempo de ciclo (s)	Tiempo de Hibrid./Exten. (s)	[Mg ⁺⁺]
Estándar	0,05-0,5	0,0026-0,026	10-45	20-980	120-480	15-60	1,5
Ciclo rápido	0,2-1,0	0,063	55-90	20-480	20-60	1-10	3
Extrema	1-16	0,5-8	50-100	20-280	0,5-5	<0,1-5	3-7
Extrema opt. n°1	10	2,50	60	29	0,73	<0,1	3
Extrema opt. n°2	4	0,50	60	82	1,93	1	3
Extrema opt. n°3	4	0,75	60	280	4,9	4	3

Si el tiempo de hibridación requerido = $k1/[cebador]$

	[Cebador] (μM)	Tiempo de Hibrid./Exten. (s)	$k1$ (s * μM)	Intervalo de $k1$ (s* μM)
Min. Estándar	0,05	15	0,75	Estándar 0,75-30
Máx. Estándar	0,5	60	30	Ciclo rápido 0,2-10
Min. Ciclo rápido	0,2	1	0,2	Extrema 1-20
Max. Ciclo rápido	1	10	10	
Extrema opt. n°1	10	0,1	1	
Extrema opt. n°2	4	1	4	
Extrema opt. n°3	4	5	20	

Si el tiempo de extensión requerido = $k2 \cdot \text{longitud de producto} / (\text{velocidad de polimerasa} \cdot [\text{polimerasa}])$

	[Polimerasa] (μM)	Velocidad de polimerasa (nt/s)	Longitud de extensión (pb)	Tiempo de Hibrid./Exten. (s)	$k2$ (1/ μM)
Extrema opt. n°1	2,5	60	29	0,1	0,52
Extrema opt. n°2	0,5	60	82	1	0,37
Extrema opt. n°3	0,75	60	280	4	0,64

5 Las condiciones específicas para PCR extrema se muestran en la tabla 2. Todos los datos se presentan a excepción de los experimentos de optimización simultánea para las concentraciones de polimerasa y cebadores para 3 de las dianas. En la tabla 3, se detallan las relaciones cuantitativas entre variables. La proporcionalidad inversa que relaciona el tiempo de hibridación requerido con la concentración de cebador es aproximadamente constante ($k1$) y está definida por la ecuación (Tiempo de hibridación requerido) = $k1/[cebador]$. La utilización de un intervalo de valores típicos para estas variables en condiciones de PCR tradicional (estándar), PCR de ciclo rápido y PCR extrema produce intervalos para la constante de proporcionalidad inversa que se superponen en gran medida (tradicional 0,75 - 30, ciclo rápido 0,2 - 10 y extrema 1 - 20). Debido a esta proporcionalidad inversa constante, los tiempos de hibridación deseados fuera de los que se realizan actualmente pueden utilizarse para predecir las concentraciones de cebador

10

requeridas durante el tiempo deseado. Por ejemplo, utilizando una constante de 5 (s * μM), para un tiempo de hibridación de 0,01 s, se puede calcular una concentración de cebador de 500 μM . Por el contrario, si se deseara una concentración de cebador de 0,01 μM , el tiempo de hibridación requerido sería de 500 segundos. Aunque estas condiciones están fuera de los límites de la PCR tradicional y extrema, predicen una relación entre las concentraciones de cebadores y los tiempos de hibridación que son útiles para el éxito de la PCR. Los límites razonables para k_1 a través de PCR tradicional, de ciclo rápido y extrema son 0,5-20 (s x μM), más preferentes 1-10 (s x μM) y los más preferentes 3-6 (s x μM).

Se pueden realizar cálculos similares para relacionar los tiempos de extensión deseados con la concentración de polimerasa, la velocidad de la polimerasa y la longitud del producto a amplificar. Sin embargo, debido a muchas variables adicionales que afectan a la PCR entre PCR tradicional, de ciclo rápido y extrema (polimerasa, Mg^{++} , tampones), realizadas en diferentes laboratorios a lo largo del tiempo, puede ser lo mejor fijarse en las condiciones bien controladas de PCR extrema que se presentan aquí para establecer una proporcionalidad inversa entre variables. Esto permite una expresión cuantitativa entre la concentración de polimerasa, la velocidad de la polimerasa, la longitud del producto y el tiempo de extensión requerido en condiciones de PCR extrema. La ecuación definitoria es (Tiempo de extensión requerido) = $k_2(\text{longitud del producto})/([\text{polimerasa}] \cdot (\text{velocidad de polimerasa}))$. La k_2 determinada experimentalmente se define como la constante de proporcionalidad en la ecuación anterior en condiciones de temperatura, Mg^{++} , tipo de polimerasa, tampones, aditivos y concentración de colorante de ADNbc constantes. Para las 3 dianas de PCR extrema con optimización bidimensional de [polimerasa] y [cebador], la [polimerasa] en el borde de la amplificación exitosa se puede discernir entre las concentraciones de cebadores y relacionarse con las otras 3 variables. Como se muestra en la tabla 3, los valores de k_2 para estas 3 dianas diferentes varían en menos de un factor de 2, a partir de lo cual se infiere que k_2 es una constante y puede utilizarse para predecir una variable si se conocen las otras. El tiempo de extensión requerido es proporcional a la longitud de extensión (longitud del producto menos la longitud del cebador) e inversamente proporcional a la velocidad de la polimerasa y la concentración de polimerasa. k_2 tiene unidades de (1/ μM) y un valor óptimo para las condiciones de PCR extrema utilizadas aquí de 0,5 (1/ μM) con un intervalo de 0,3-0,7 (1/ μM). Se podrían derivar valores similares para k_2 para otras condiciones de reacción que varían en tipo de polimerasa, concentración de Mg^{++} o diferentes condiciones de tampón o colorante.

La PCR extrema se puede realizar en cualquier tipo de recipiente, siempre que la temperatura de la muestra se pueda cambiar rápidamente. Además de los tubos y capilares estándar, las microgotas de reacciones acuosas suspendidas en una corriente de aceite o finas obleas bidimensionales proporcionan un buen contacto térmico. La PCR de flujo continuo de una corriente de muestra (ya sea dispersada como gotas, separada por burbujas u otros medios para evitar la mezcla) más allá de segmentos espaciales a diferentes temperaturas es un buen procedimiento para el control de la temperatura necesario para las velocidades de la PCR extrema.

Referencias

1. Wittwer CT, Reed GB, Ririe KM. Rapid cycle DNA amplification. En: Mullis IK, Ferre F, Gibbs R, eds. The polymerase chain reaction, Vol. Deerfield Beach, FL: 174-181, 1994.
2. Wittwer CT, Fillmore GC, Hillyard DR. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 4353-7.
3. Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal Biochem* 1990; 186: 328-31.
4. Wittwer CT, Garling DJ. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques* 1991; 10: 76-83.
5. Wittwer CT, Marshall BC, Reed GH, Cherry JL. Rapid cycle allele-specific amplification: studies with the cystic fibrosis delta F508 locus. *Clin Chem* 1993; 39: 804-9.
6. Schoder D, Schmalwieser A, Schauburger G, Hoorfar J, Kuhn M, Wagner M. Novel approach for assessing performance of PCR cyclers used for diagnostic testing. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2724-8.
7. Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding KV. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin Chem* 2007; 53: 1544-8.
8. Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding KV. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem* 2006; 52: 494-503.
9. Raja S, El-Hefnawy T, Kelly LA, Chestney ML, Luketich JD, Godfrey TE. Temperature-controlled primer limit for multiplexing of rapid, quantitative reverse transcription-PCR assays: application to intraoperative cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002; 48: 1329-37.
10. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997; 22: 176-81.
11. Wittwer CT, Ririe KM, Rasmussen RP. Fluorescence monitoring of rapid cycle PCR for quantification. In: Ferre F, ed. *Gene Quantification*, New York: Birkhauser, 1998:129-44.
12. Elenitoba-Johnson O, David D, Crews N, Wittwer CT. Plastic vs glass capillaries for rapid-cycle PCR.

- Biotechniques 2008; 44: 487-8,490,492.
13. Roper MG, Easley CJ, Landers JP. Advances in polymerase chain reaction on microfluidic chips. *Anal Chem* 2005; 77: 3887-93.
14. Zhang C, Xing D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 4223-37.
15. Cheng J, Shoffner MA, Hvichia GE, Kricka LJ, Wilding P. Chip PCR. II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 380-5.
16. Woolley AT, Hadley D, Landre P, deMello AJ, Mathies RA, Northrup MA. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal Chem* 1996; 68: 4081-6.
17. Neuzil P, Zhang C, Pipper J, Oh S, Zhuo L. Ultra fast miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e77.
18. Oda RP, Strausbauch MA, Huhmer AF, Borson N, Jurens SR, Craighead J, et al. Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of DNA. *Anal Chem* 1998; 70: 4361-8.
19. Roper MG, Easley CJ, Legendre LA, Humphrey JA, Landers JP. Infrared temperature control system for a completely noncontact polymerase chain reaction in microfluidic chips. *Anal Chem* 2007; 79: 1294-300.
20. Friedman NA, Meldrum DR. Capillary tube resistive thermal cycling. *Anal Chem* 1998; 70: 2997-3002.
21. Heap DM, Herrmann MG, Wittwer CT. PCR amplification using electrolytic resistance for heating and temperature monitoring. *Biotechniques* 2000; 29: 1006-12.
22. Kopp MU, Mello AJ, Manz A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip. *Science* 1998; 280: 1046-8.
23. Hashimoto M, Chen PC, Mitchell MW, Nikitopoulos DE, Soper SA, Murphy MC. Rapid PCR in a continuous flow device. *Lab Chip* 2004; 4: 638-45.
24. Crews N, Wittwer C, Gale B. Continuous-flow thermal gradient PCR. *Biomed Microdevices* 2008; 10: 187-95.
25. Chiou JT, Matsudaira PT, Ehrlich DJ. Thirty-cycle temperature optimization of a closed-cycle capillary PCR machine. *Biotechniques* 2002; 33: 557-8,60,62.
26. Frey O, Bonneick S, Hierlemann A, Lichtenberg J. Autonomous microfluidic multi-channel chip for real-time PCR with integrated liquid handling. *Biomed Microdevices* 2007; 9: 711-8.
27. Chen J, Wabuyele M, Chen H, Patterson D, Hupert M, Shadpour H, et al. Electrokinetically synchronized polymerase chain reaction microchip fabricated in polycarbonate. *Anal Chem* 2005; 77: 658-66.
28. Sun Y, Kwok YC, Nguyen NT. A circular ferrofluid driven microchip for rapid polymerase chain reaction. *Lab Chip* 2007; 7: 1012-7.
29. Agrawal N, Hassan YA, Ugaz VM. A pocket-sized convective PCR thermocycler. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007; 46: 4316-9.
30. Zhang C, Xu J, Ma W, Zheng W. PCR microfluidic devices for DNA amplification. *Biotechnol Adv* 2006; 24: 243-84.
31. Wheeler EK, Benett W, Stratton P, Richards J, Chen A, Christian A, et al. Convectively driven polymerase chain reaction thermal cycler. *Anal Chem* 2004; 76: 4011-6.
32. Belgrader P, Benett W, Hadley D, Long G, Mariella R, Jr., Milanovich F, et al. Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument. *Clin Chem* 1998; 44: 2191-4.
33. Terazona H, Takei, H, Hattori A, Yasuda K. Development of a high-speed real-time polymerase chain reaction system using a circulating water-based rapid heat exchange. *Jap J Appl Phys* 2010; 49: 06GM05.
34. Wheeler EK, Hara CA, Frank J, Deotte J, Hall SB, Benett W, Spadaccini C, Beer NR. Under-three minute PCR: Probing the limits of fast amplification. *Analyst* 2011.
35. Fuchiwaki Y, Nagai H, Saito M, Tamiya E. Ultra-rapid flow-through polymerase chain reaction microfluidics using vapor pressure. *Biosens Bioelect* 2011; 27: 88-94.
36. Maltezos G, Johnston M, Taganov K, Srichantaratsamee C, Gorman J, Baltimore D, Chantratita W and Scherer A. *Appl. Phys. Lett.*, 2010, 97, 264101.
37. Wilhelm J, Hahn M, Pingoud A. Influence of DNA target melting behavior on real-time PCR quantification. *Clin Chem* 2000; 46: 1738-43.
38. Zuna J, Muzikova K, Madzo J, Krejci O, Trka J. Temperature non-homogeneity in rapid airflow-based cycler significantly affects real-time PCR. *Biotechniques* 2002; 33: 508,10, 12.
39. von Kanel T, Adolf F, Schneider M, Sanz J, Gallati S. Sample number and denaturation time are crucial for the accuracy of capillary-based LightCyclers. *Clin Chem* 2007; 53: 1392-4.
40. Wittwer CT, Herrmann MG. Rapid thermal cycling and PCR kinetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, eds. *PCR Methods Manual*, Vol. San Diego: Academic Press, 1999:211-29.
41. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003; 49: 853-60.
42. von Ahsen N, Wittwer CT, Schutz E. Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg(2+), deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin Chem* 2001; 47: 1956-61.
43. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154-60.
44. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997; 22: 130-1, 4-8.

45. Weis JH, Tan SS, Martin BK, Wittwer CT. Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends Genet* 1992; 8: 263-4.
46. Brown RA, Lay MJ, Wittwer CT. Rapid cycle amplification for construction of competitive templates. In: Horton RM, Tait RC, eds. *Genetic Engineering with PCR*, Vol. Norfolk: Horizon Scientific Press, 1998: 57-70.
- 5 47. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, 1998
48. Whitney SE, "Analysis of rapid thermocycling for the polymerase chain reaction," Ph.D. thesis, University of Nebraska, 2004.
49. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient of 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Meth Appl*. 1993; 2: 275-287.
- 10 50. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MAD. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1988; 85: 9436-40.
51. Terazono H, Hattori A, Takei H, Takeda K, Yasuda K. Development of 1480 nm photothermal high-speed real-time polymerase chain reaction system for rapid nucleotide recognition. *Jpn J Appl Phys*. 2008; 47: 5212-6.
- 15 52. Wittwer CT, Rasmussen RP, Ririe KM. Rapid PCR and melting curve analysis. In: *The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications*, Bustin SA, ed. Cambridge Univ Press, New York, 48-69, 2010.
53. Fuchiwaki Y, Saito M, Wakida S, Tamiya E, Nagai H. A practical liquid plug flow-through polymerase chain-reaction system based on a heat-resistant resin chip. *Anal Sci*. 2011; 27: 225-30.
- 20 54. Kim H, Dixit S, Green CJ, Faris GW. Nanodroplet real-time PCR system with laser assisted heating. *Optics Express* 2009; 17: 218-27.
55. Obeid PJ, Christopoulos TK, Crabtree HJ, Backhouse CJ. Microfabricated device for DNA and RNA amplification by continuous-flow polymerase chain reaction and reverse transcription-polymerase chain reaction with cycle number selection. *Anal Chem* 2003; 75: 288-95.
- 25 56. Giordano BC, Ferrance J, Swedberg S, Huhmer AFR, Landers JP. Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds. *Anal Biochem* 2001; 291: 124-132.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra biológica durante la amplificación que comprende las etapas de:
- 5 añadir una polimerasa termoestable y cebadores configurados para la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana a la muestra biológica, en el que la relación de la concentración de polimerasa a la concentración total de cebadores es de 0,03-0,4:1, y la concentración de polimerasa es de, como mínimo, 0,5 μ M; y
- 10 amplificar la secuencia de ácido nucleico diana por reacción en cadena de la polimerasa mediante ciclado térmico de la muestra biológica entre, como mínimo, una temperatura de desnaturalización y una temperatura de alargamiento a través de una pluralidad de ciclos de amplificación utilizando un perfil de ciclado de temperatura extrema en el que cada ciclo se completa en menos de 10 segundos.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que cada ciclo se completa en menos de 5 segundos.
- 15 3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que cada ciclo se completa en menos de 2 segundos.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana es ADN genómico.
- 20 5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica contiene ADN genómico eucariota.
6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la polimerasa es KlenTaq proporcionada a una concentración de, como mínimo, 1,0 μ M.
- 25 7. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la amplificación inespecífica está por debajo de niveles detectables.
8. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la concentración total de cebadores es de, como mínimo, 5 μ M.
- 30 9. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la polimerasa se selecciona entre KlenTaq, Herculase, Kapa2G FAST, KOD, Phusion, polimerasa de *Thermus aquaticus* natural o clonada, Platinum Taq, GoTaq y Fast Start.
- 35 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la polimerasa es KlenTaq.

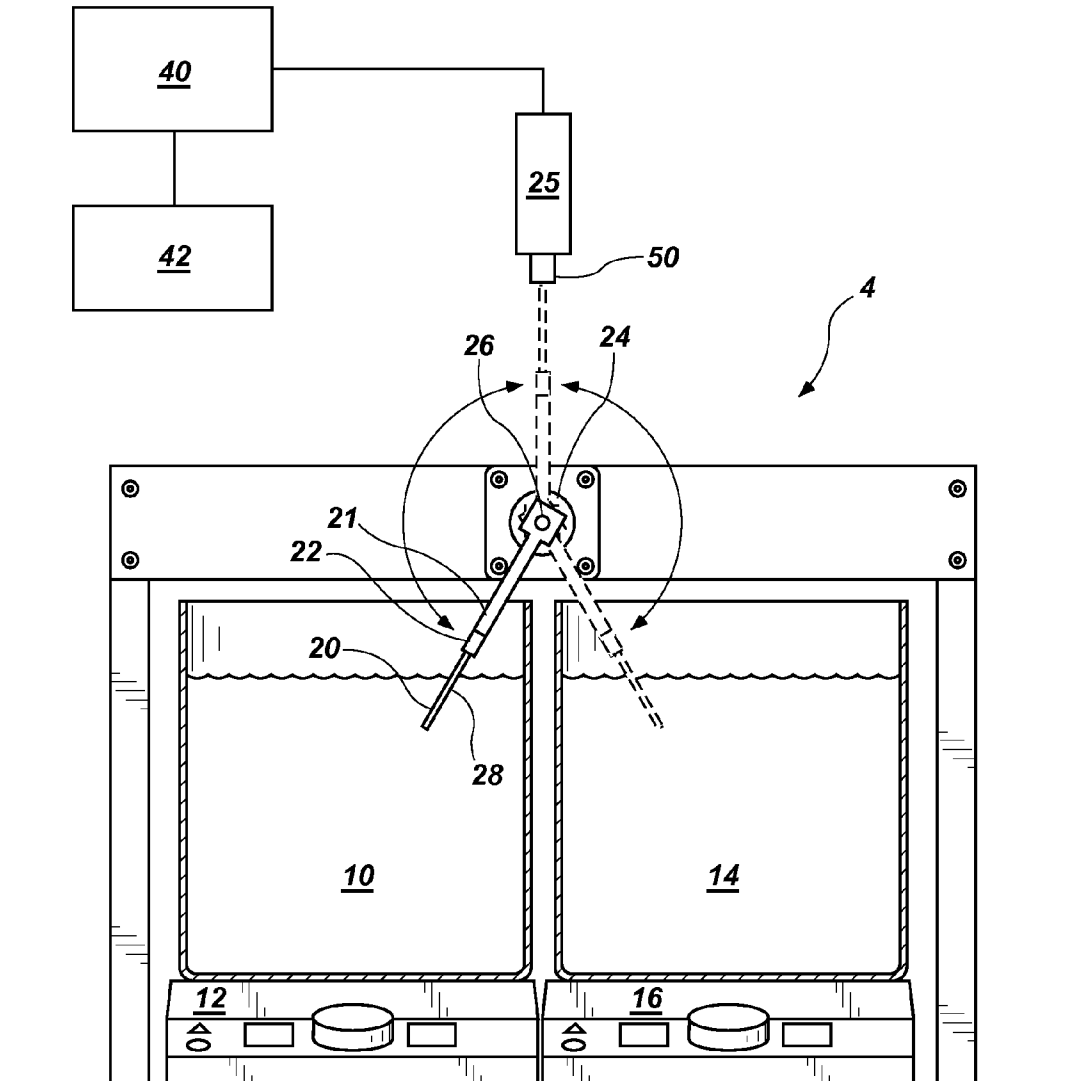


FIG. 1a

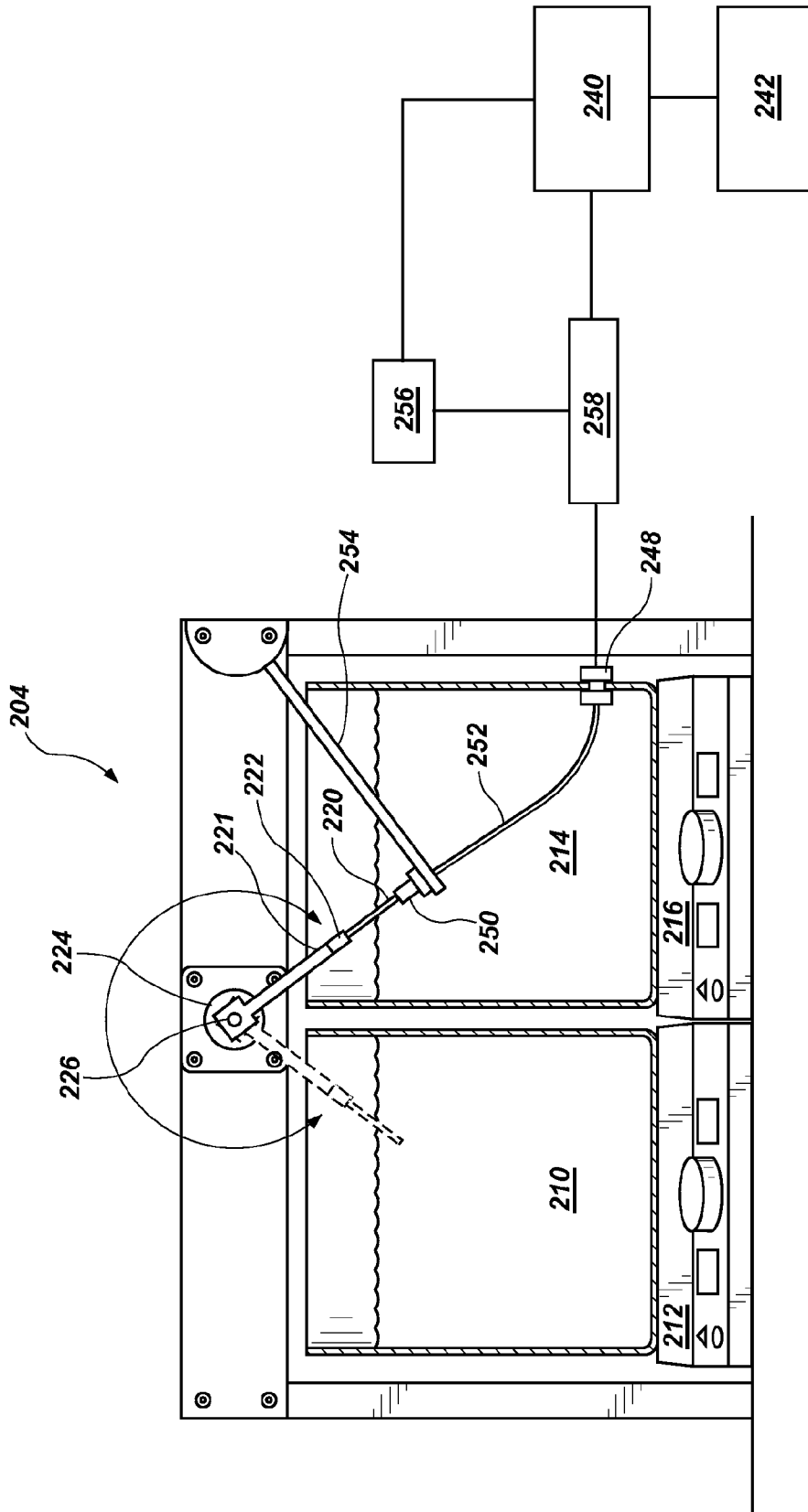


FIG. 1b

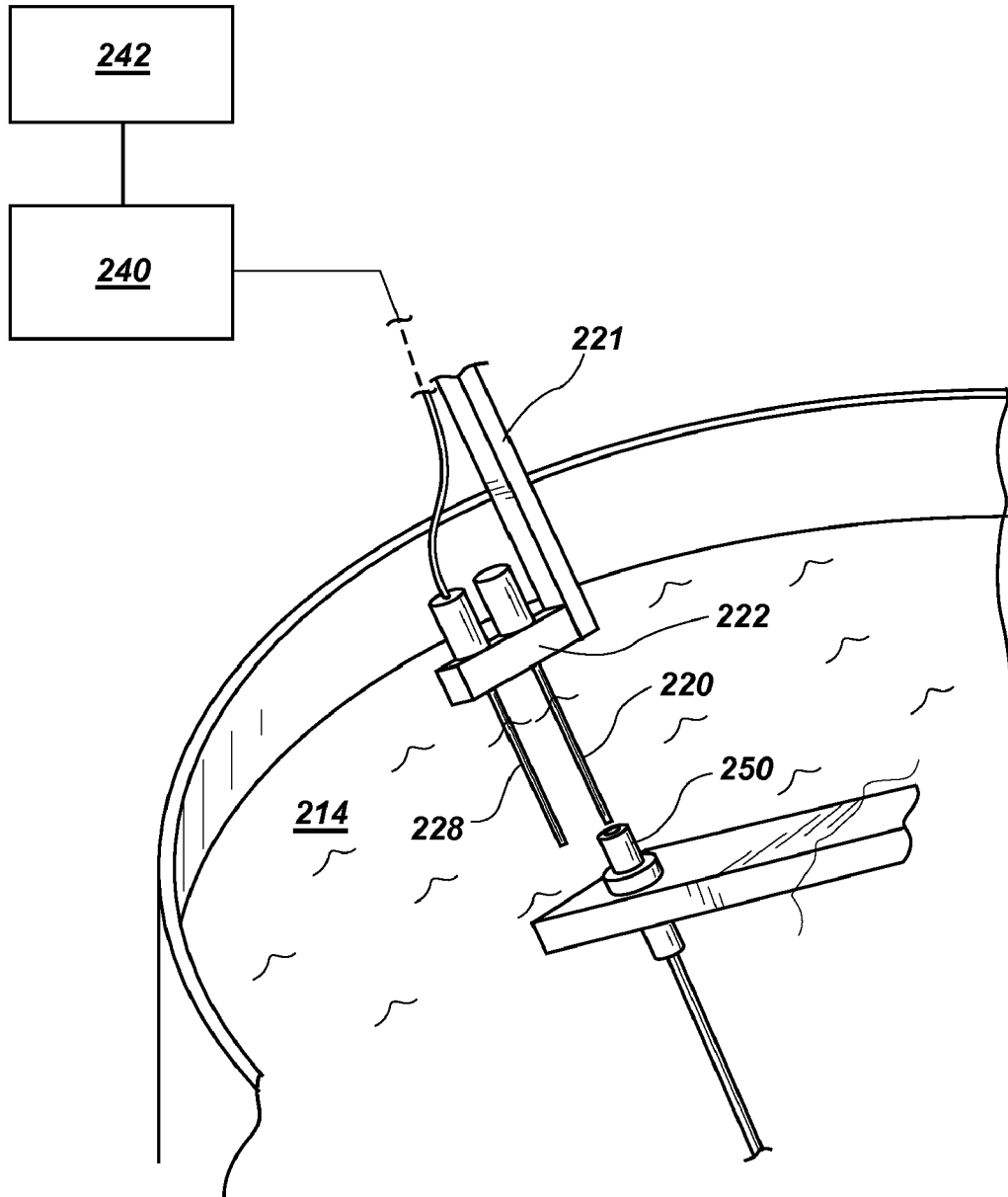


FIG. 1d

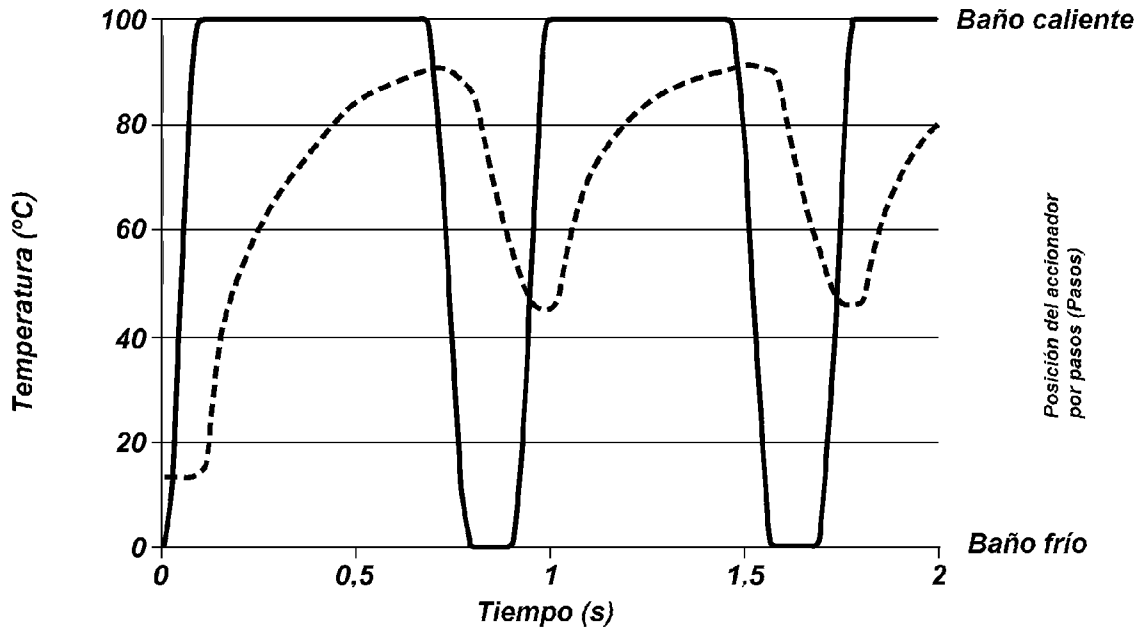


FIG. 2a

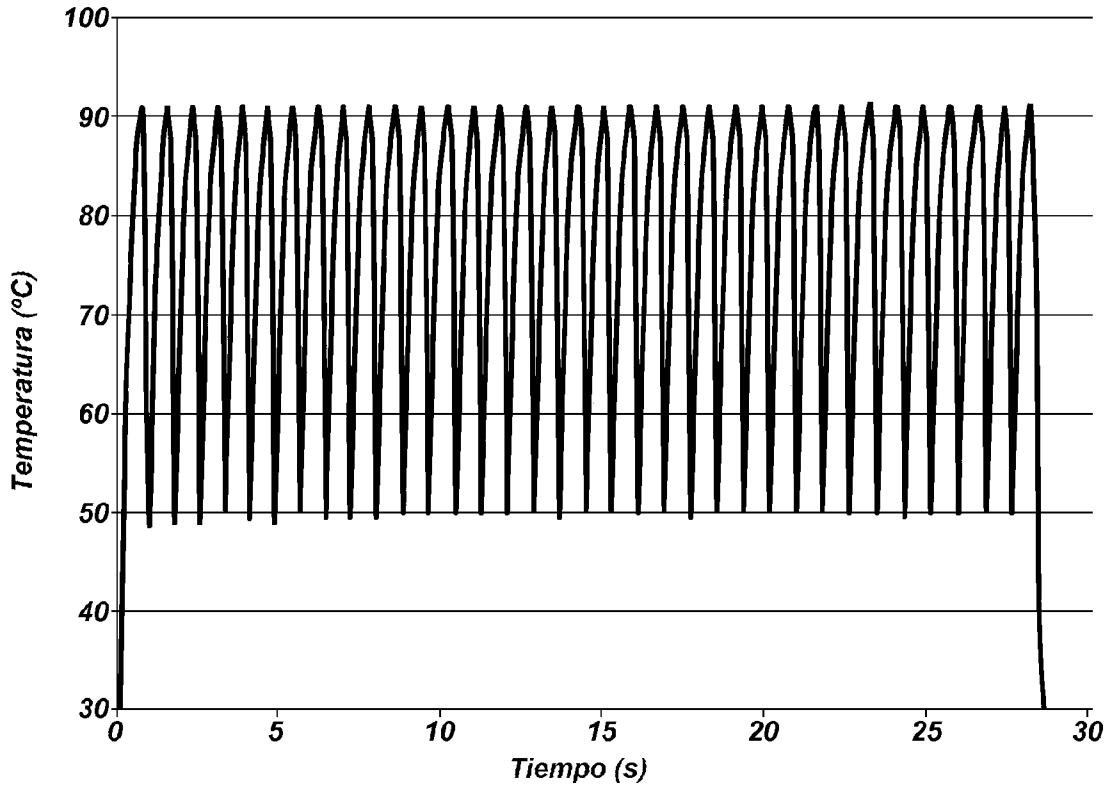


FIG. 2b

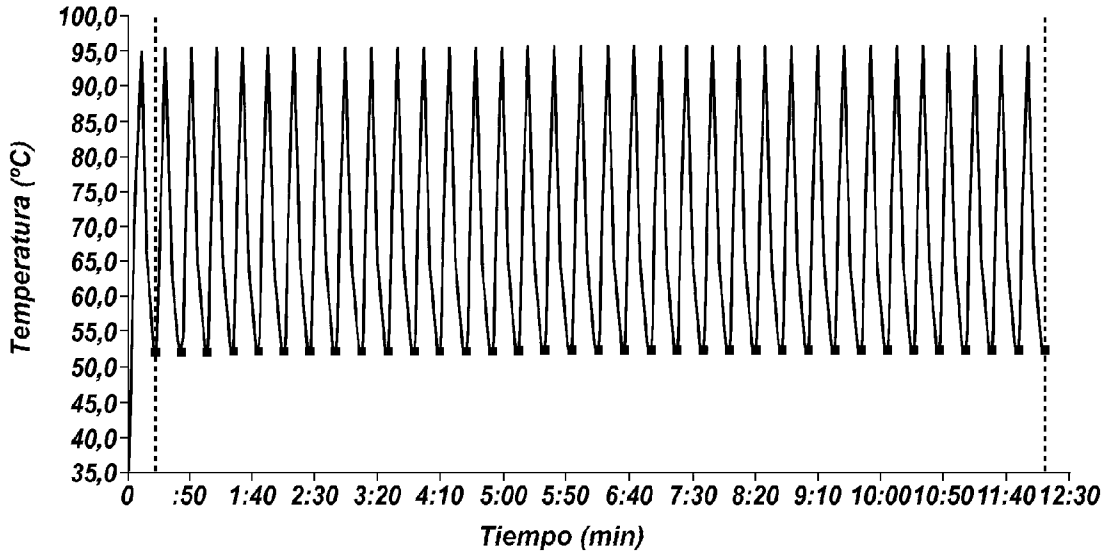


FIG. 2c

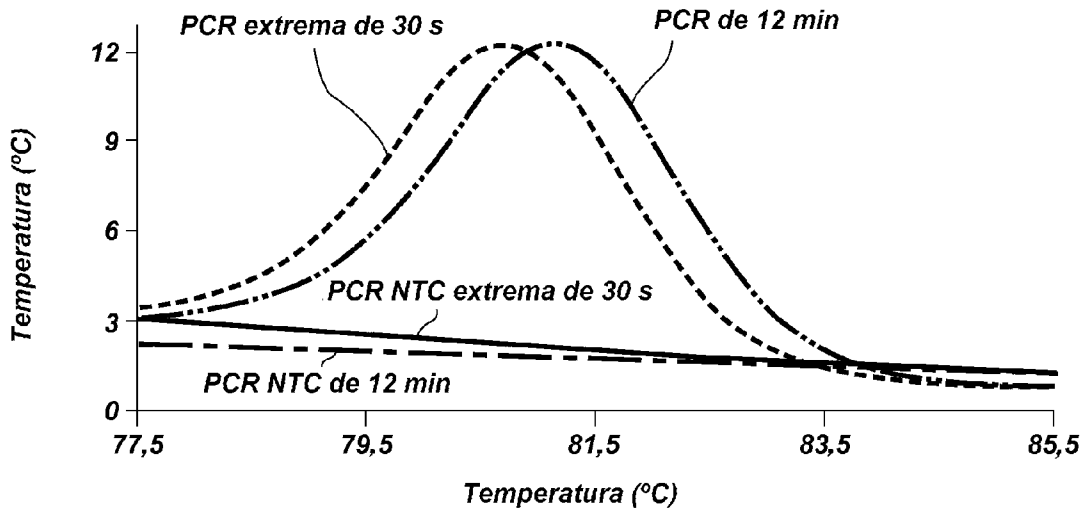


FIG. 3a

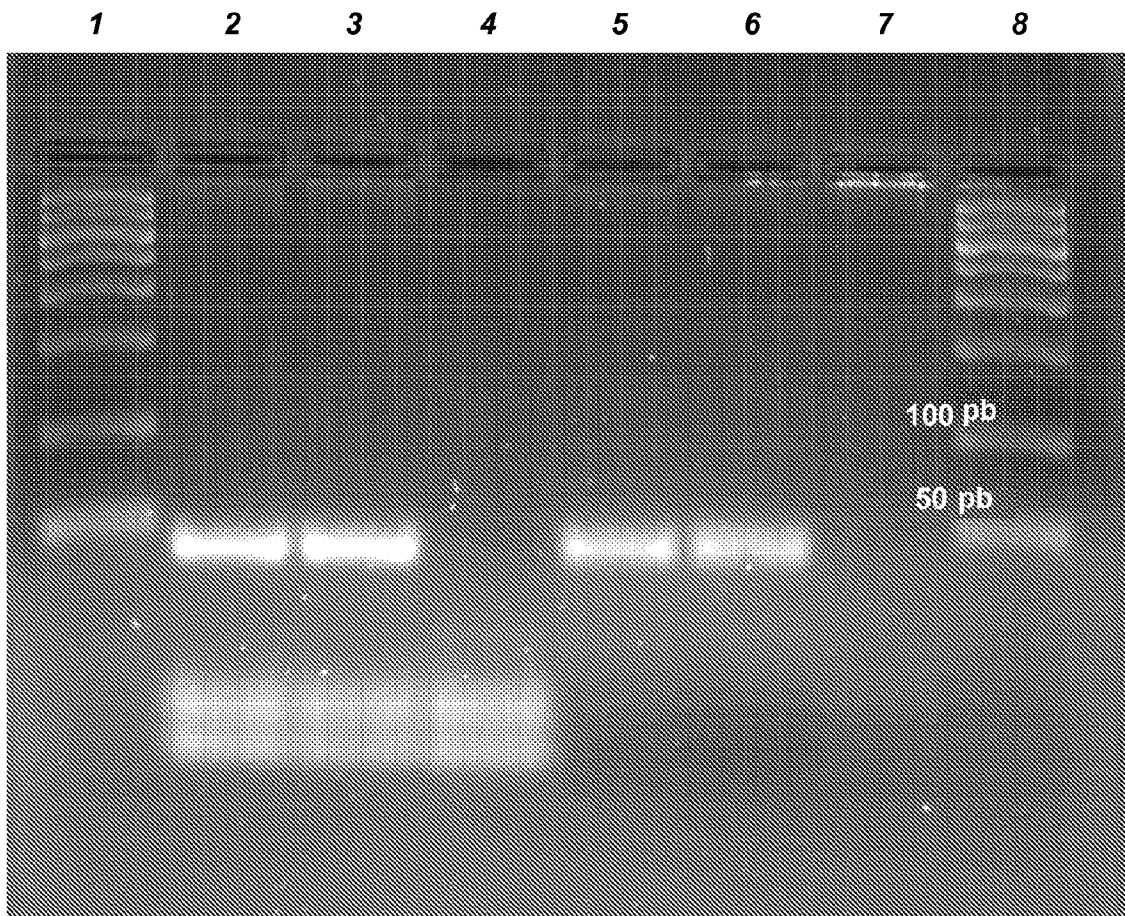


FIG. 3b

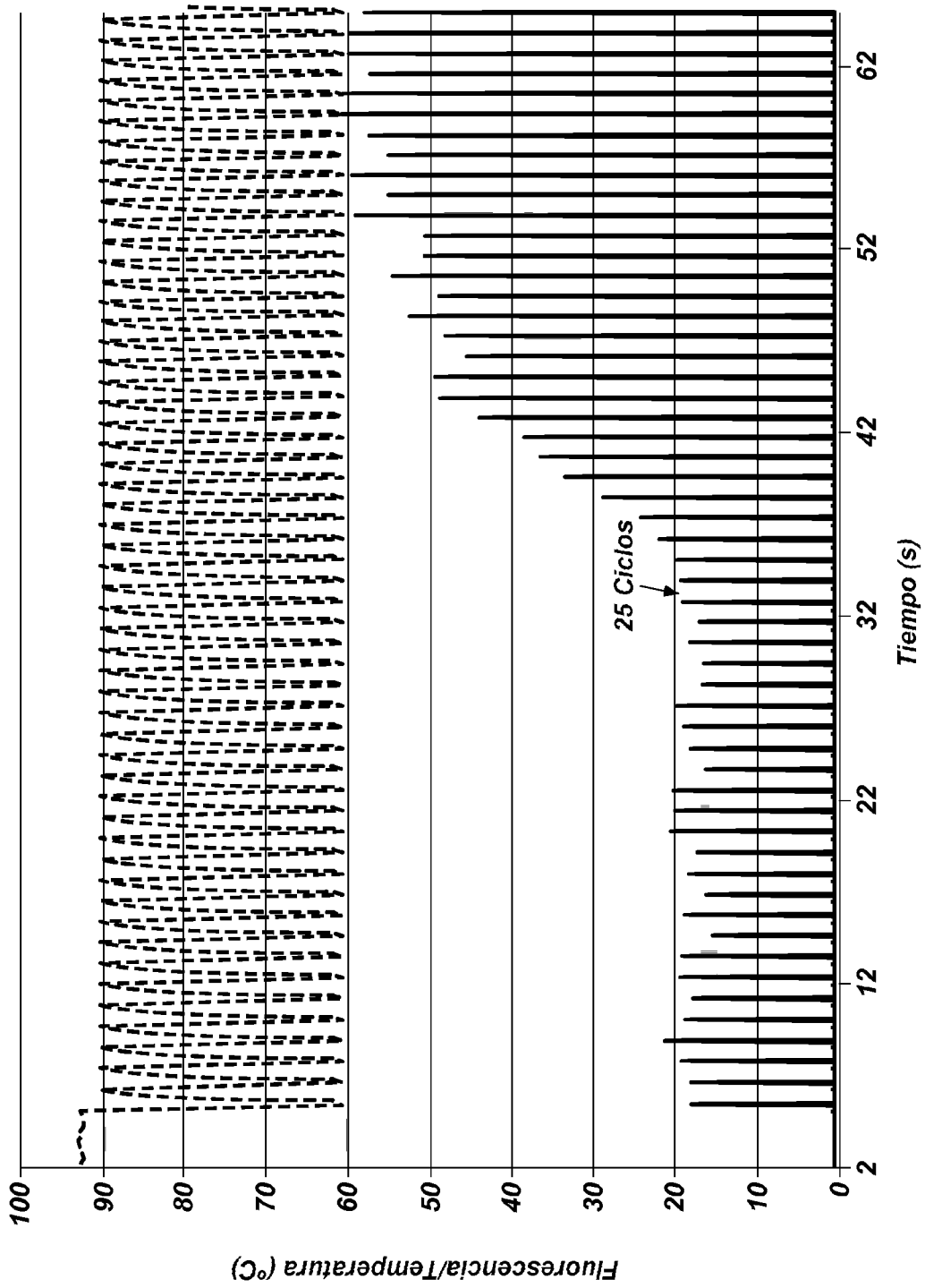


FIG. 3C

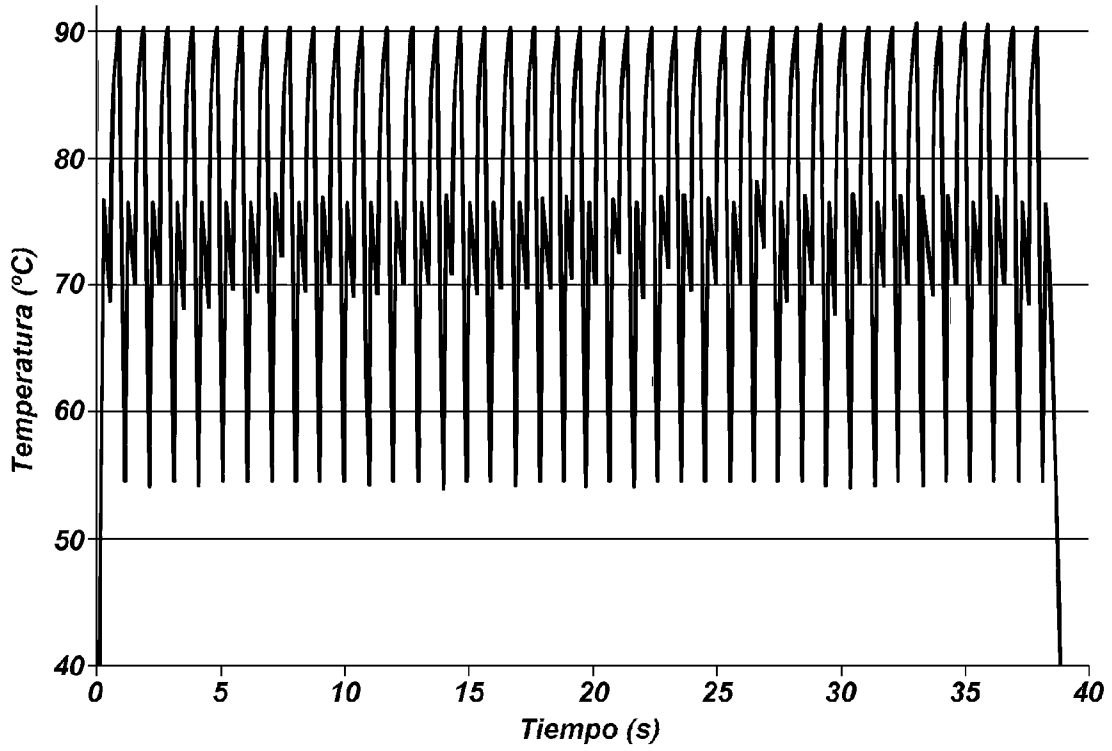


FIG. 4a

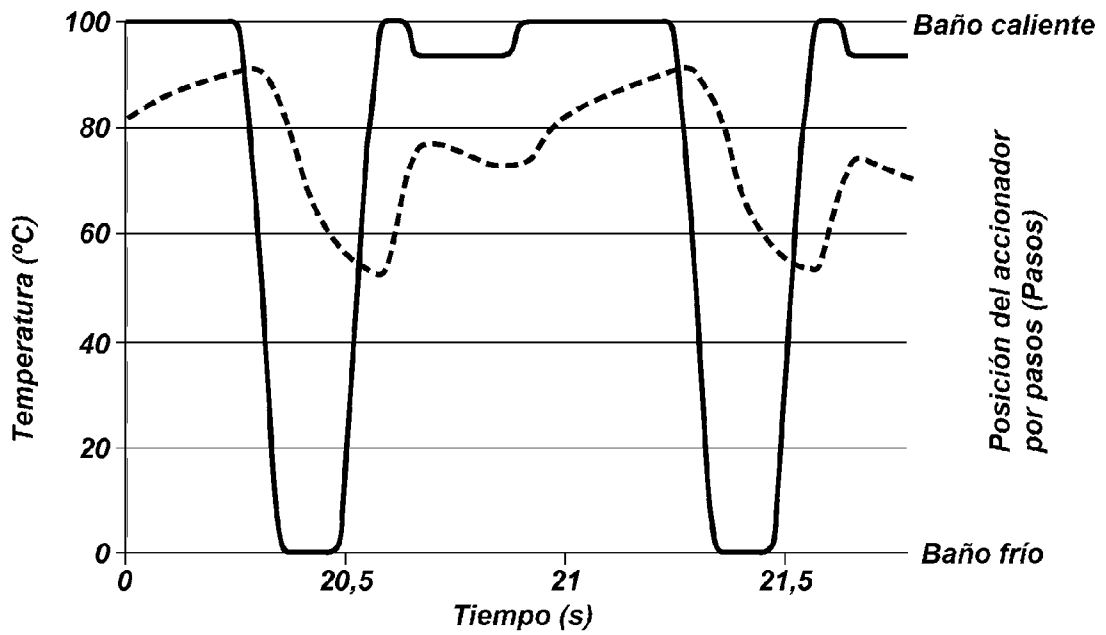


FIG. 4b

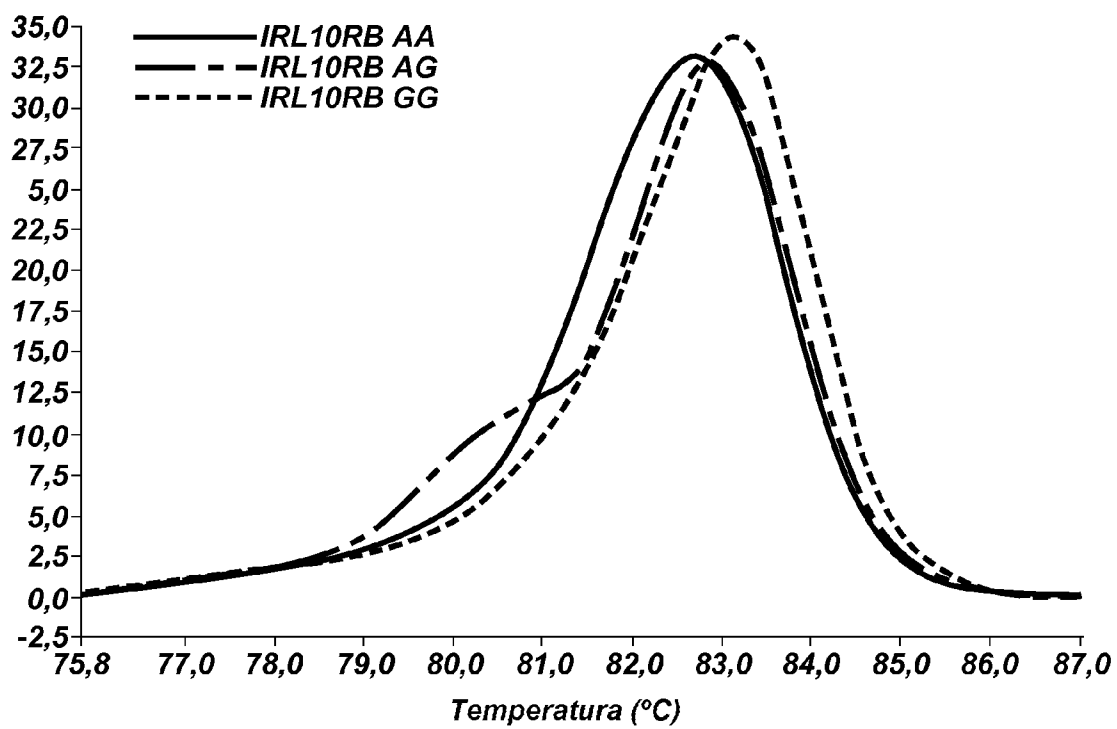


FIG. 4c

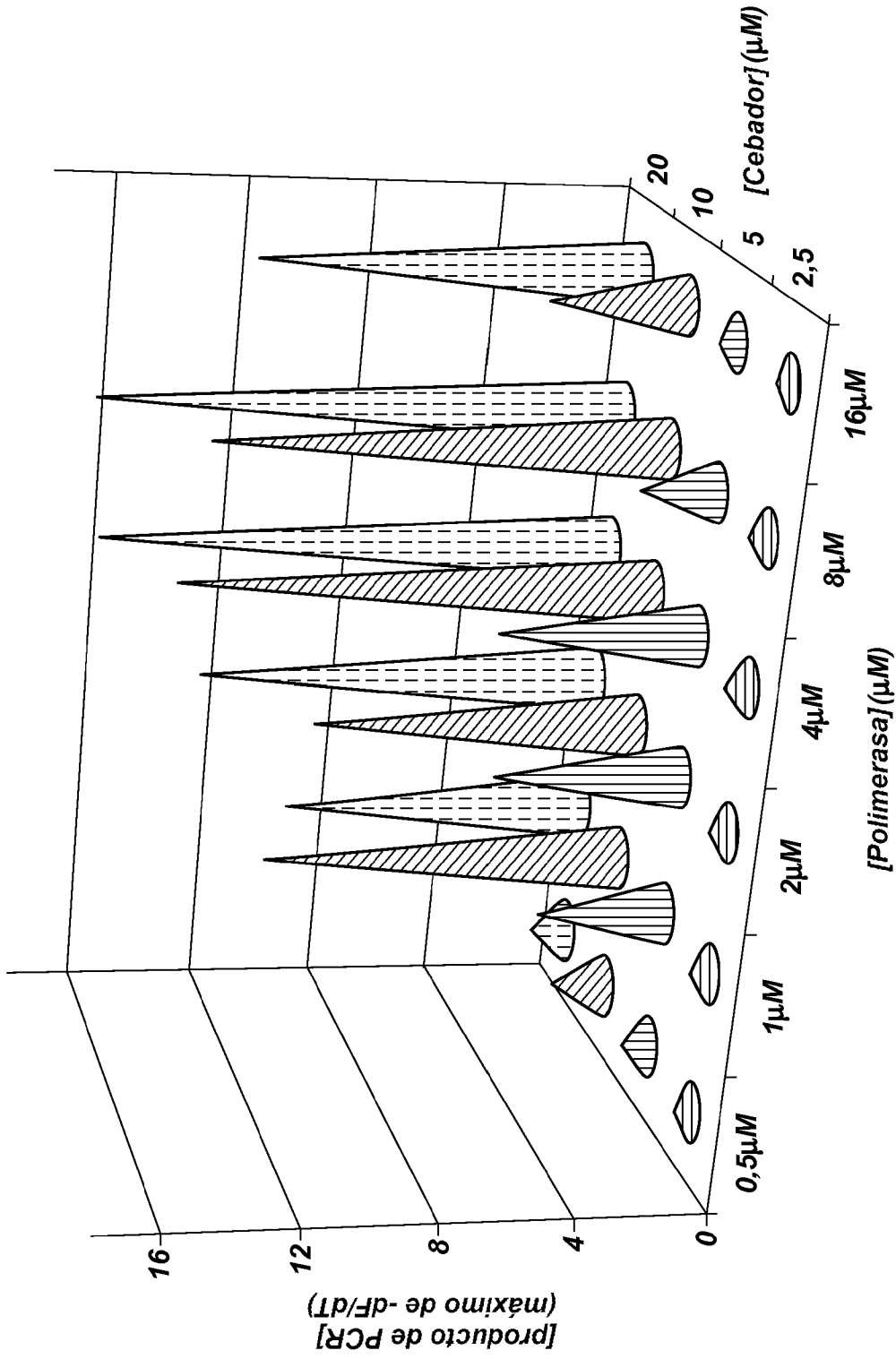
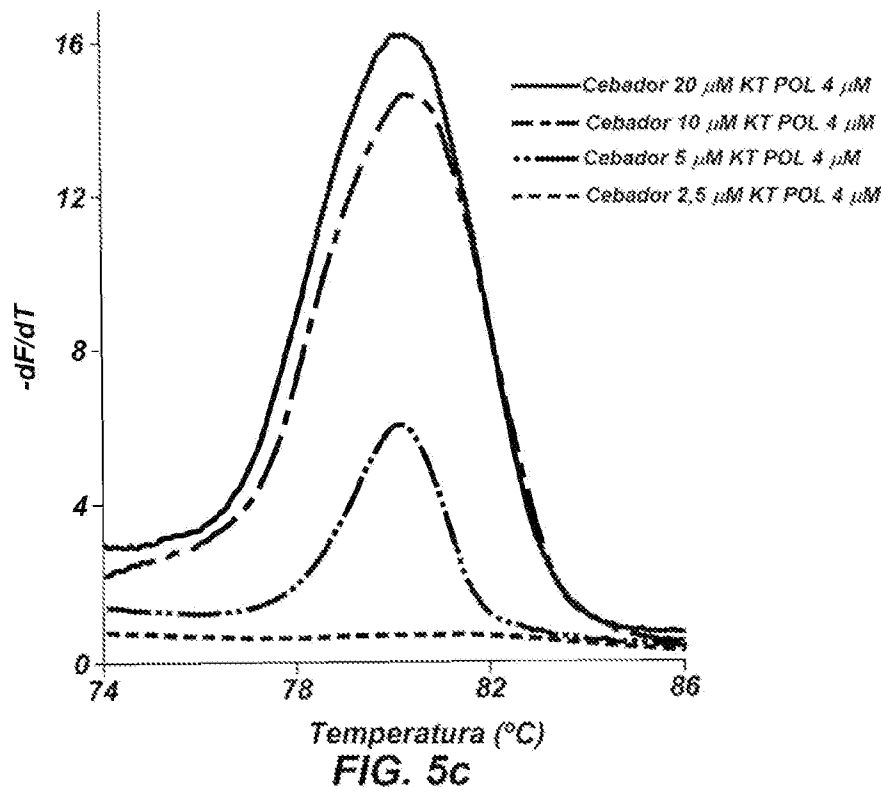
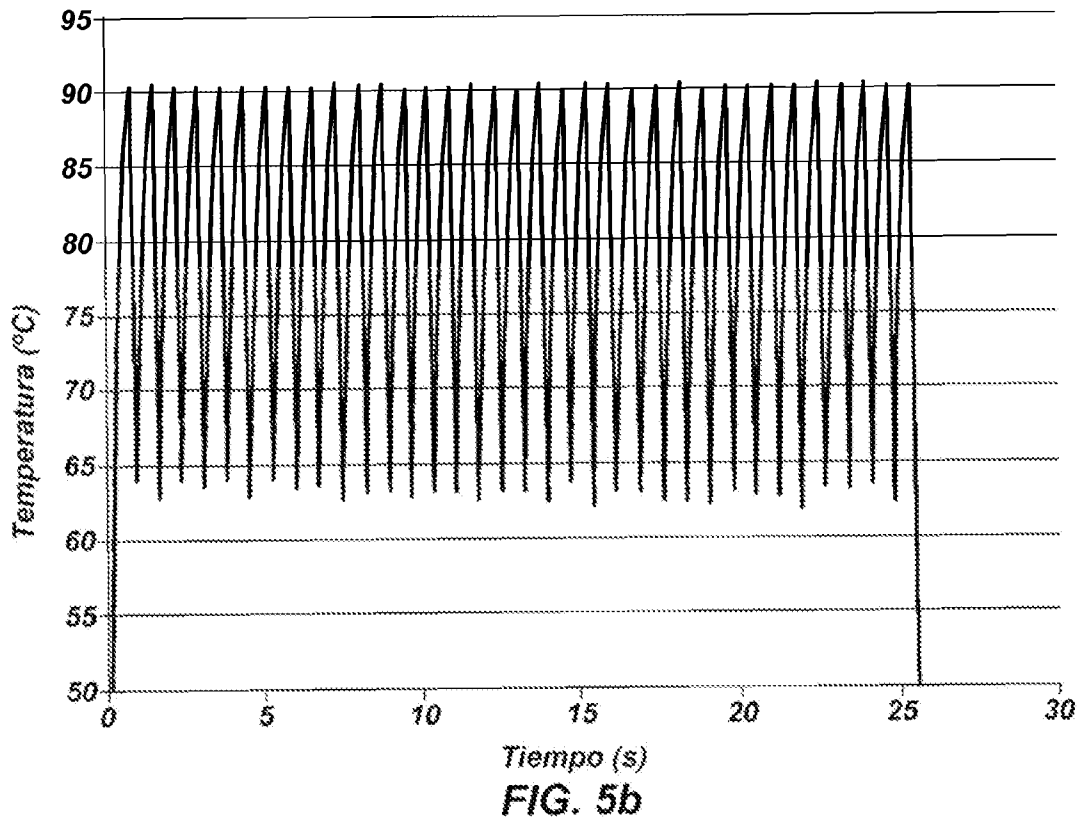


FIG. 5a



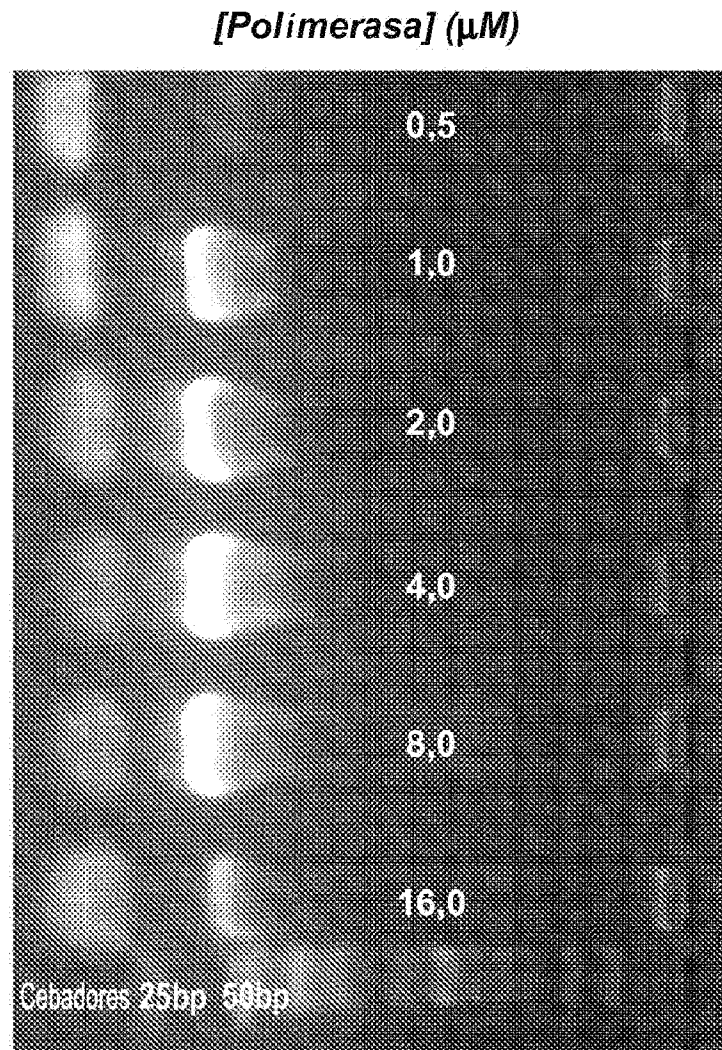


FIG. 5d

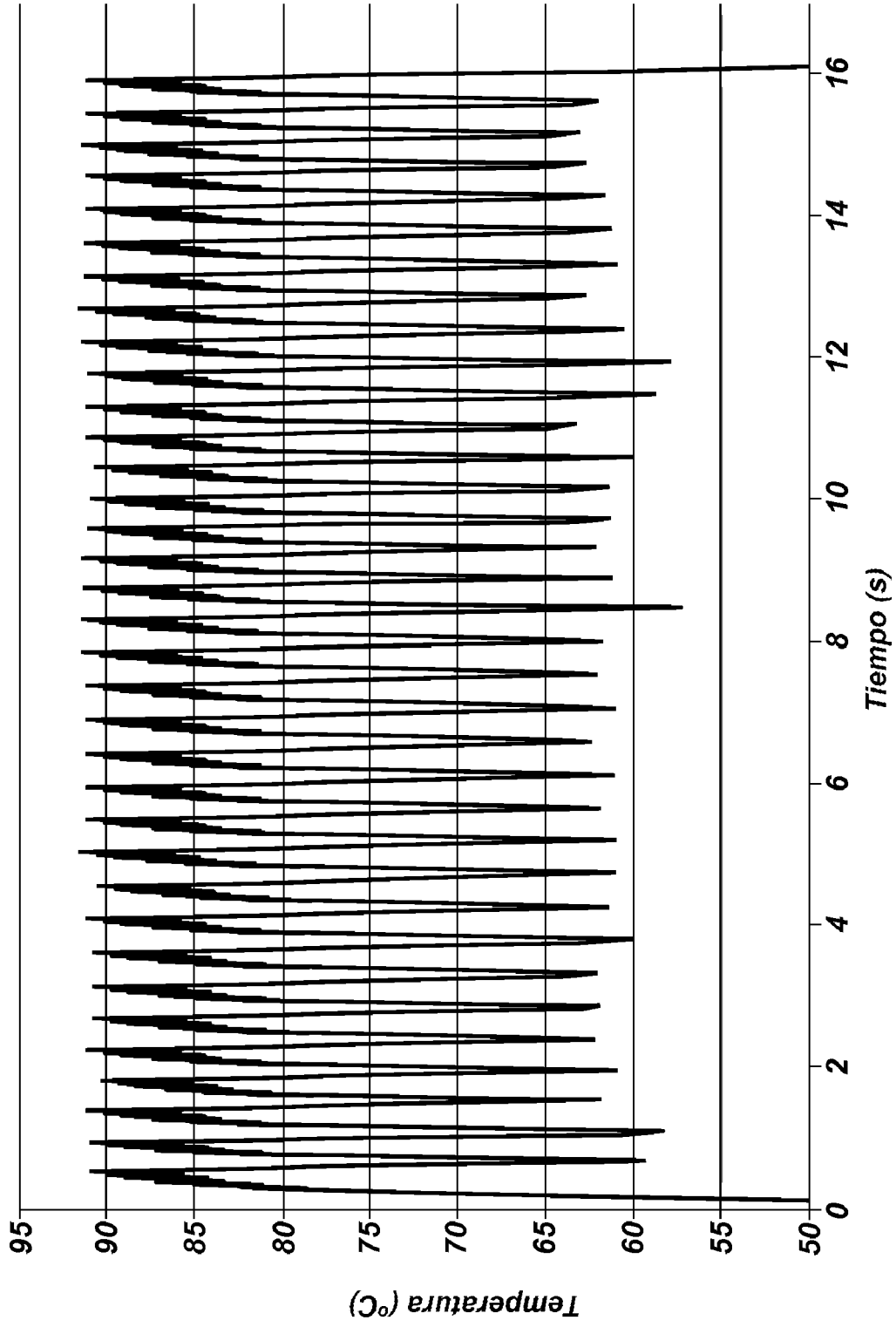


FIG. 6a

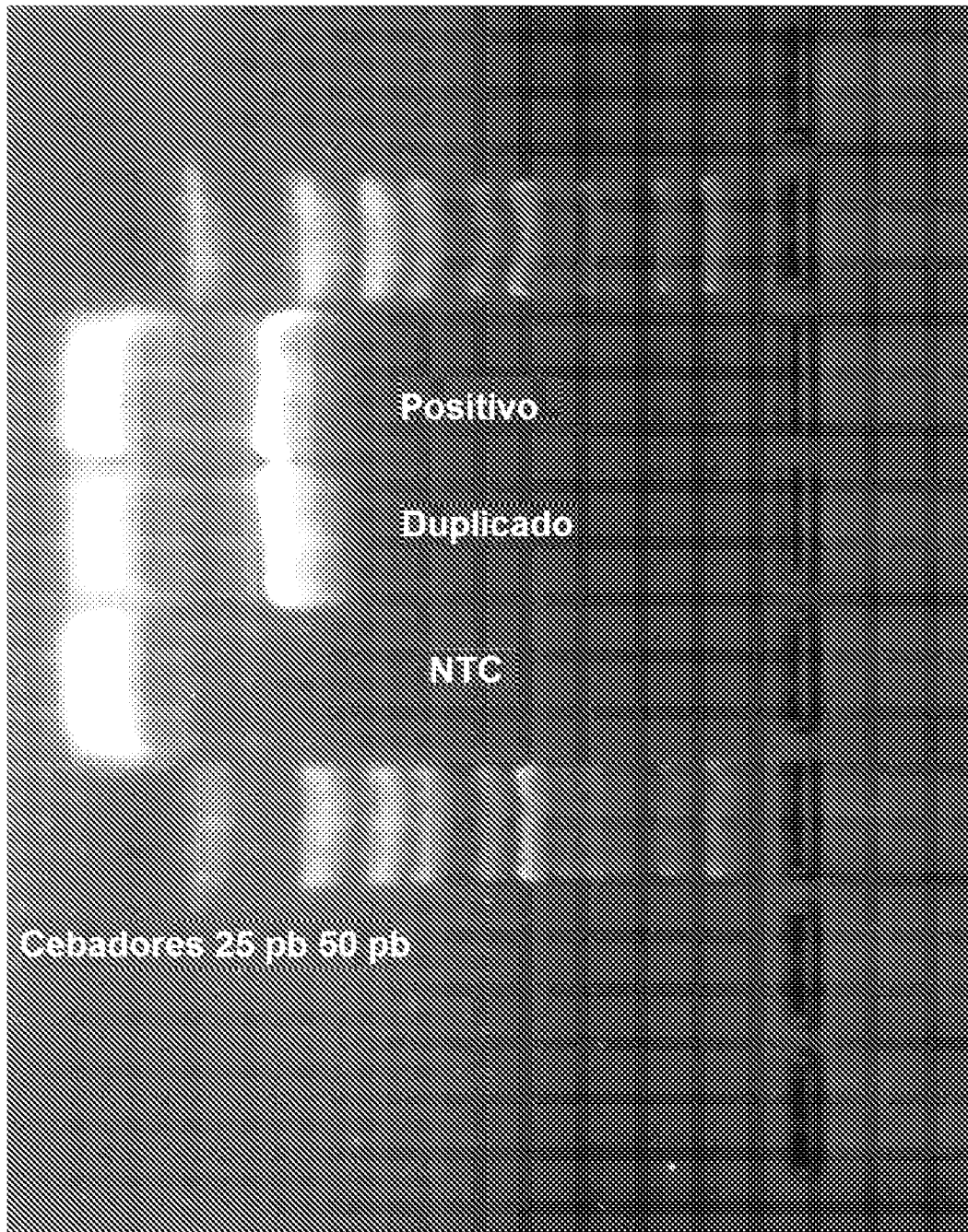


FIG. 6b

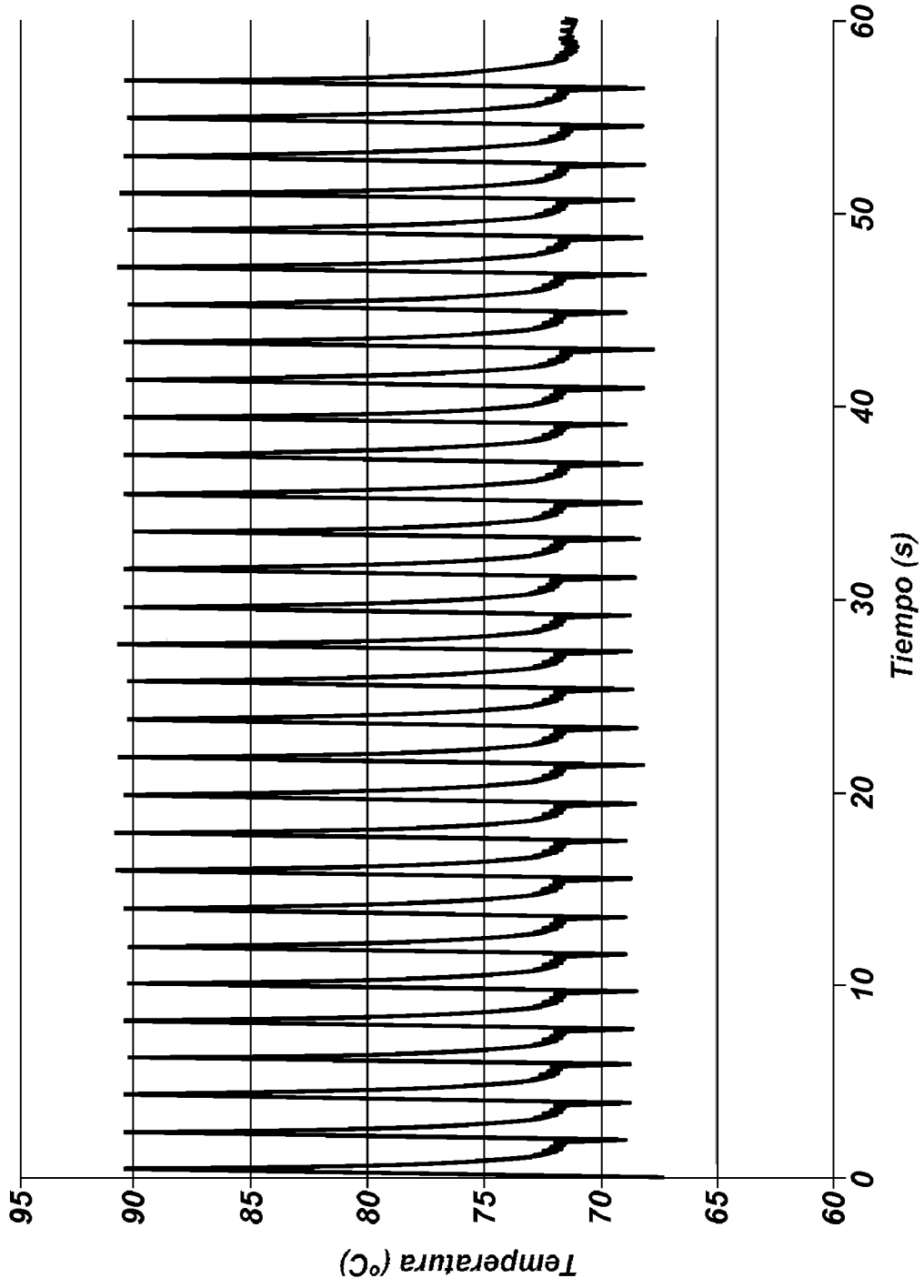


FIG. 7a

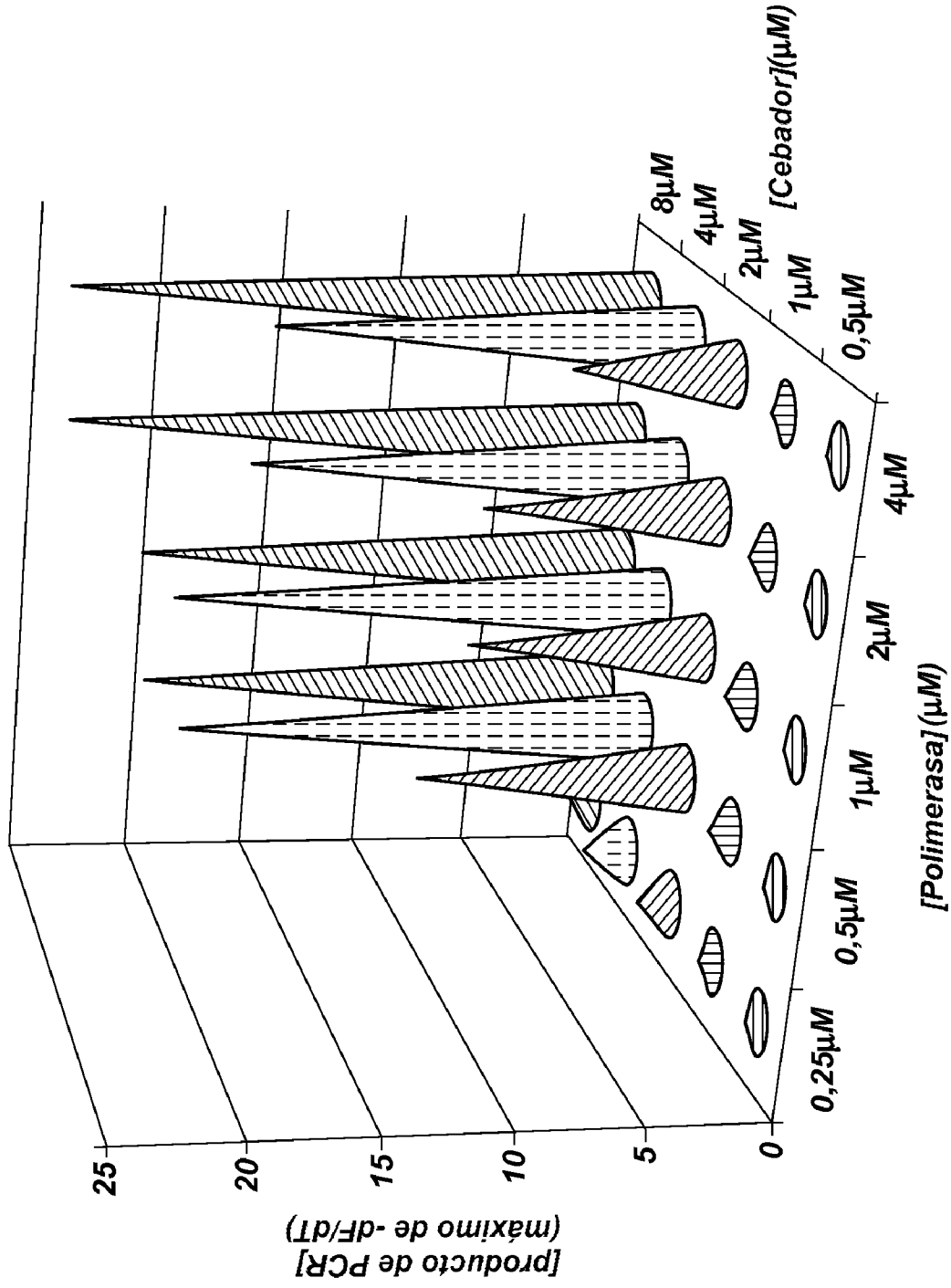


FIG. 7b

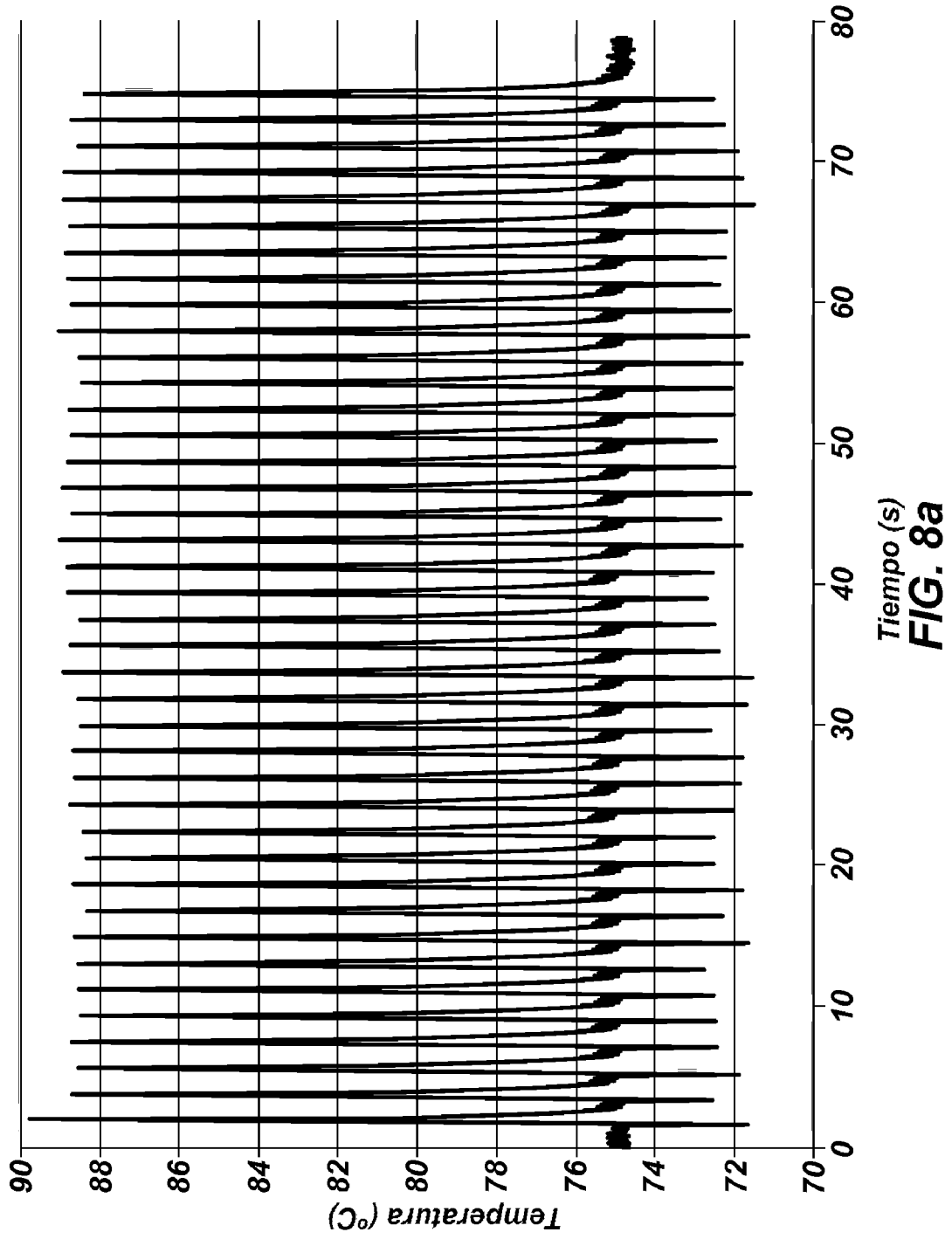


FIG. 8a

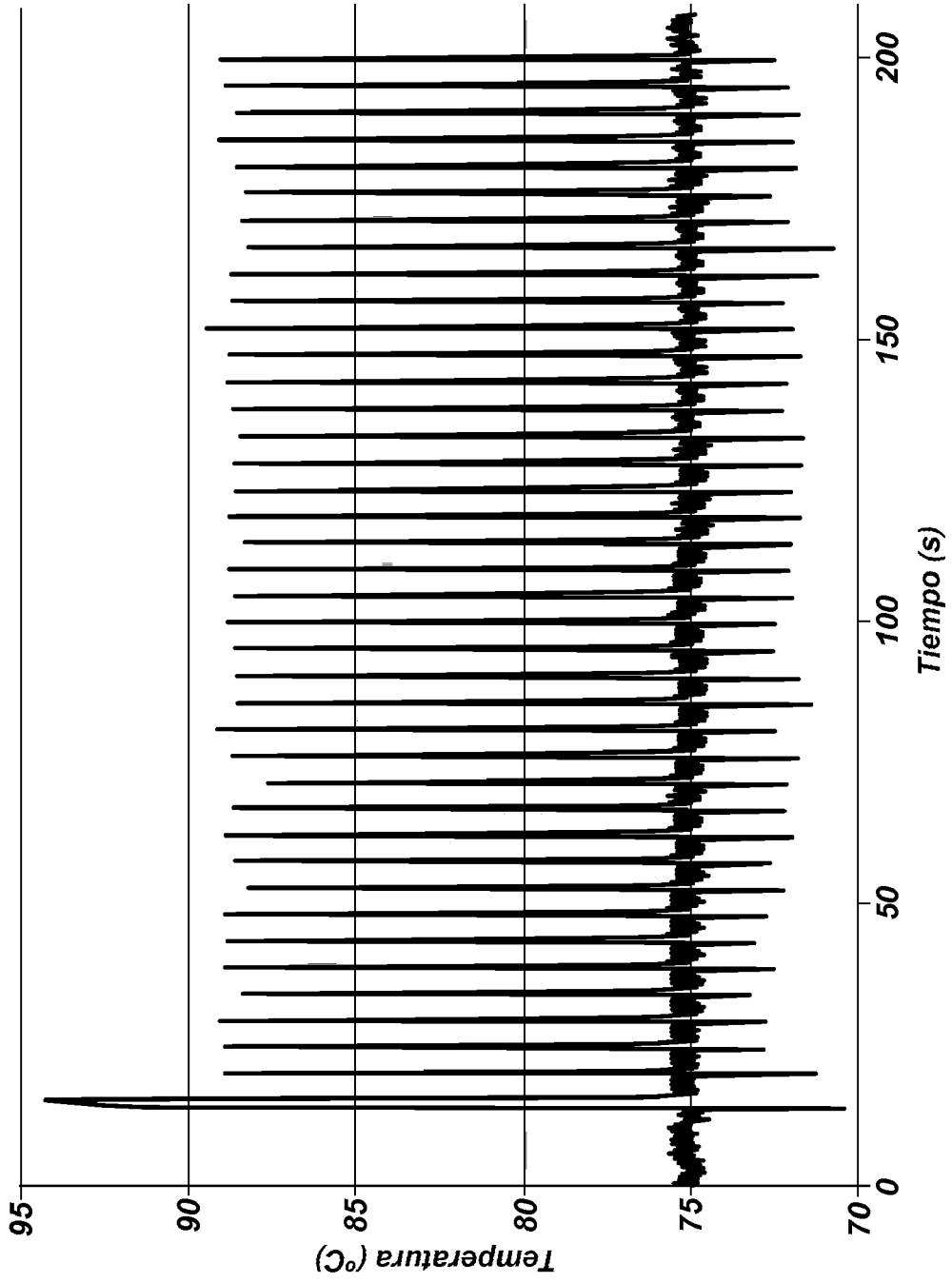
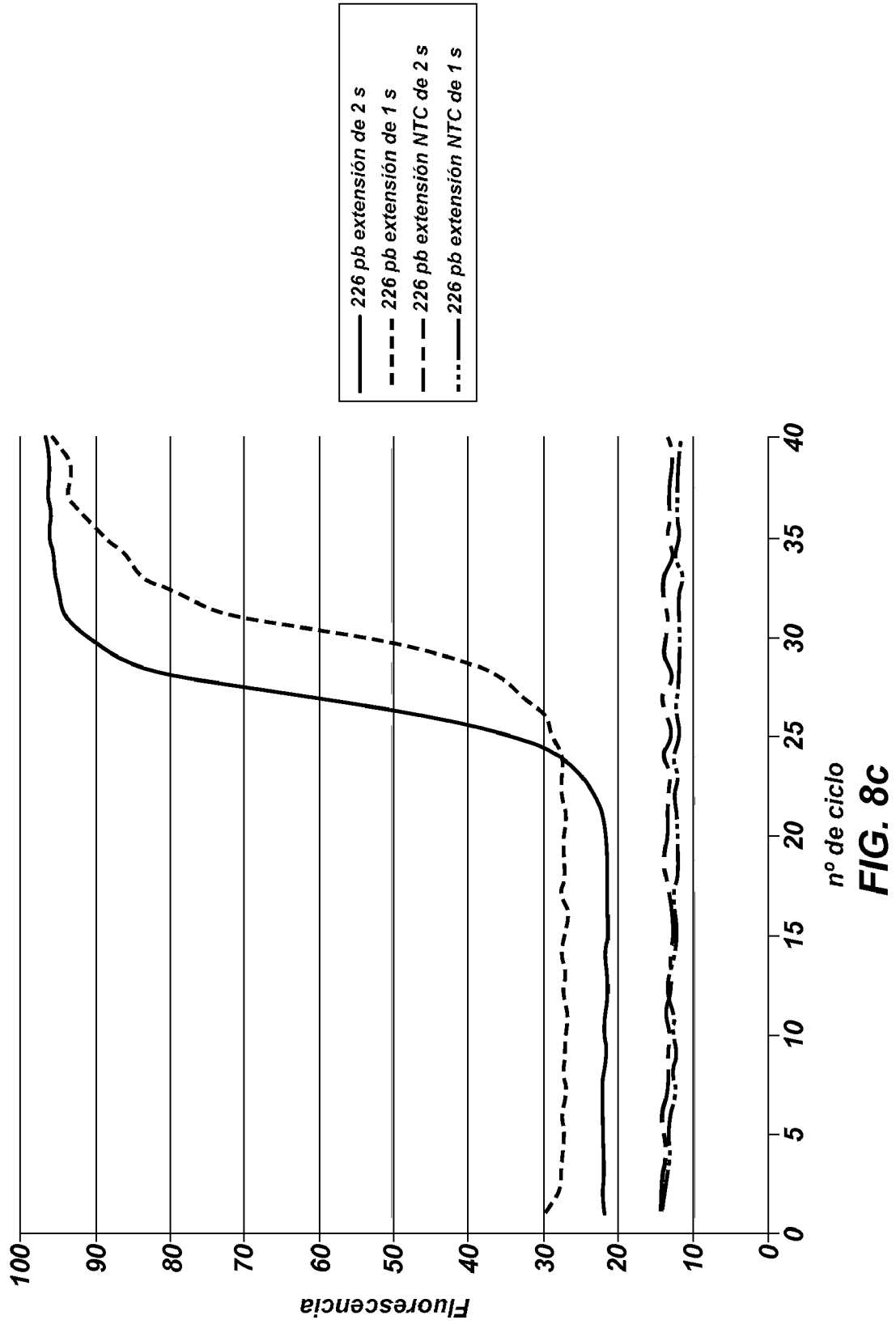
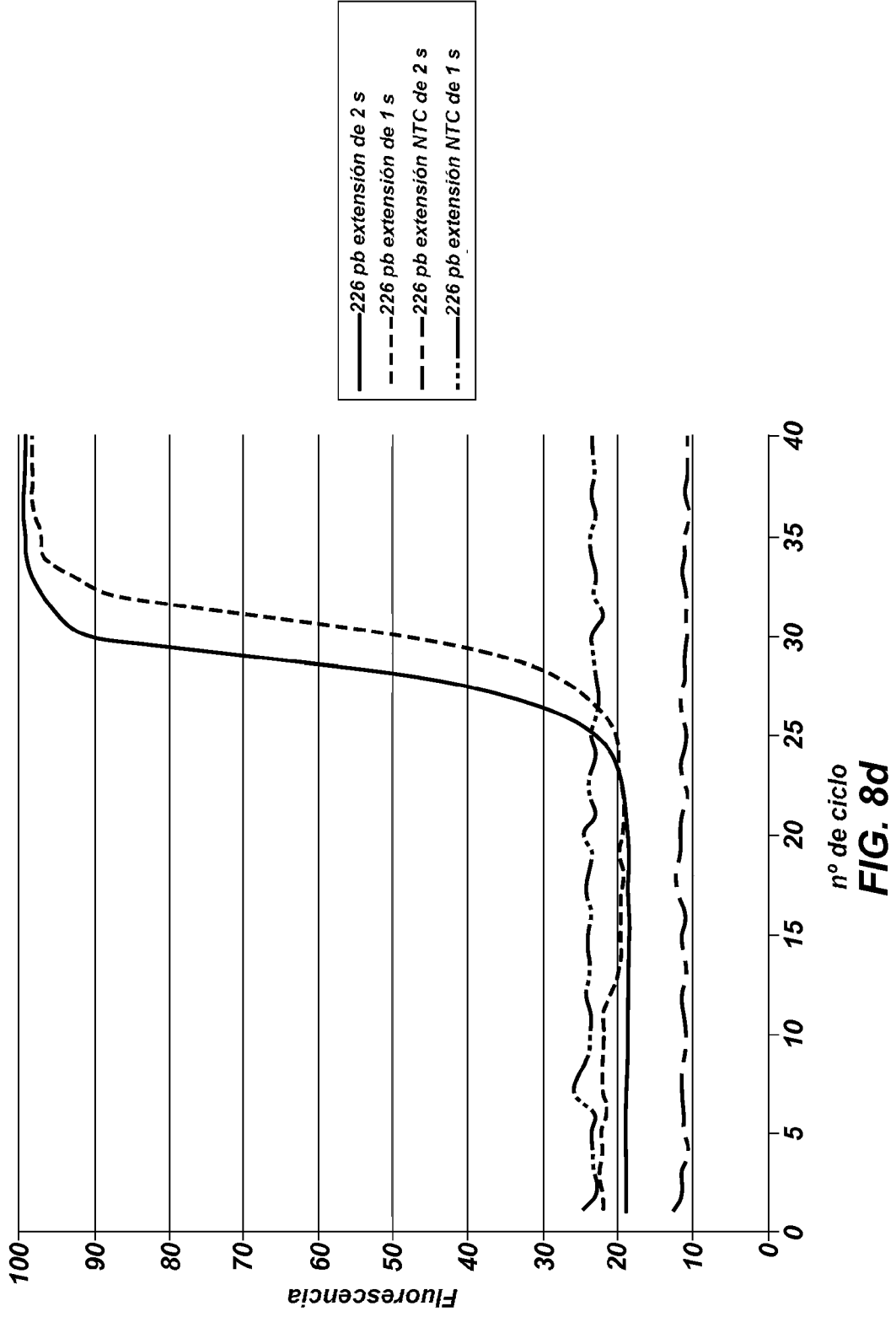


FIG. 8b





nº de ciclo
FIG. 8d

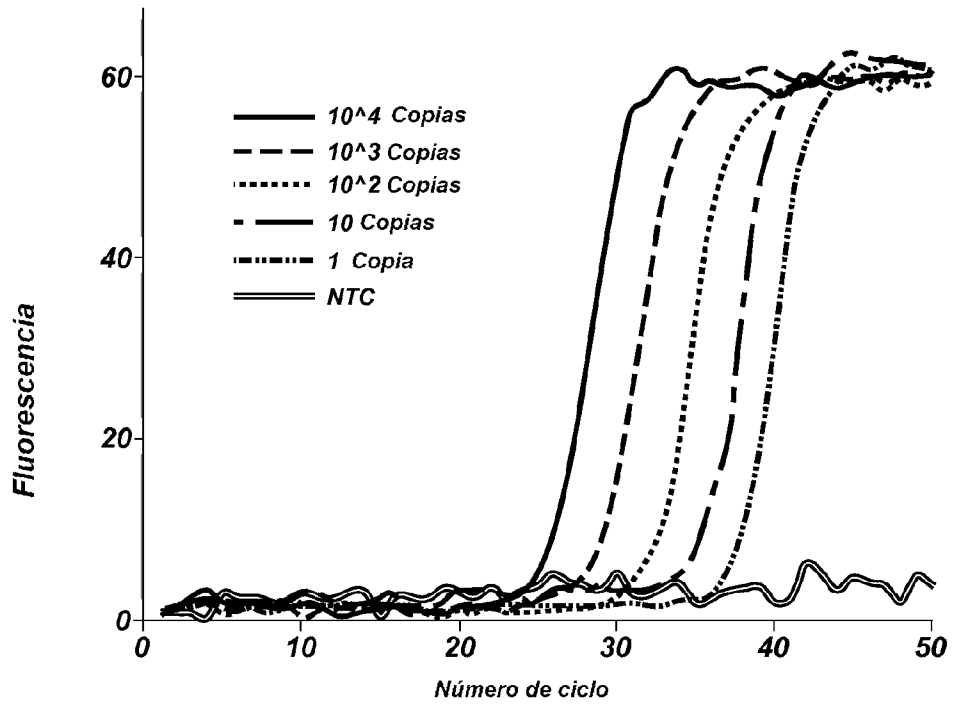


FIG. 9a

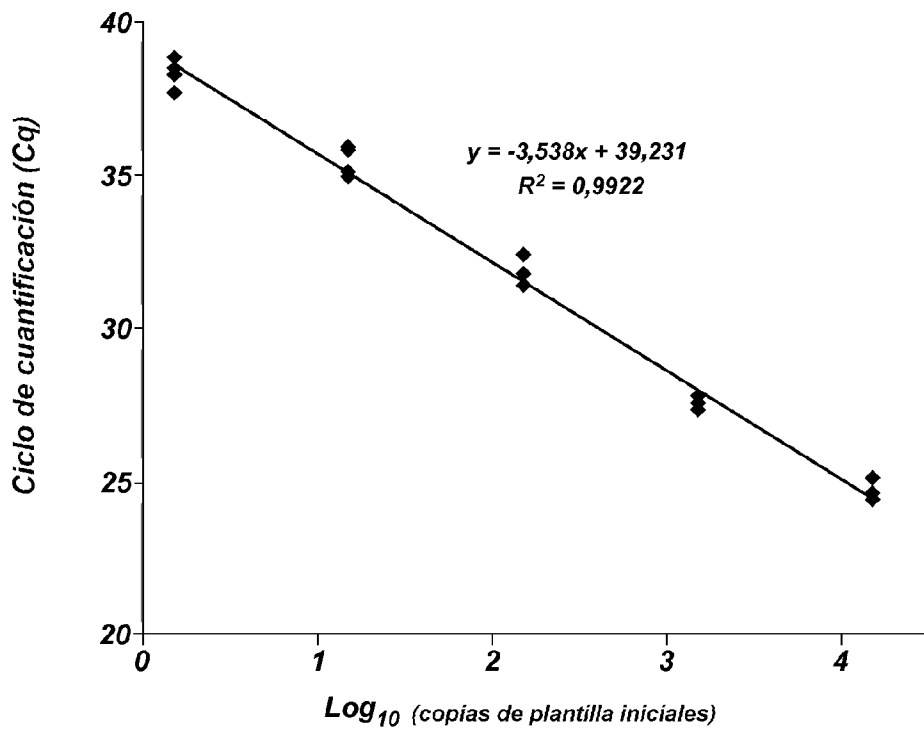


FIG. 9b

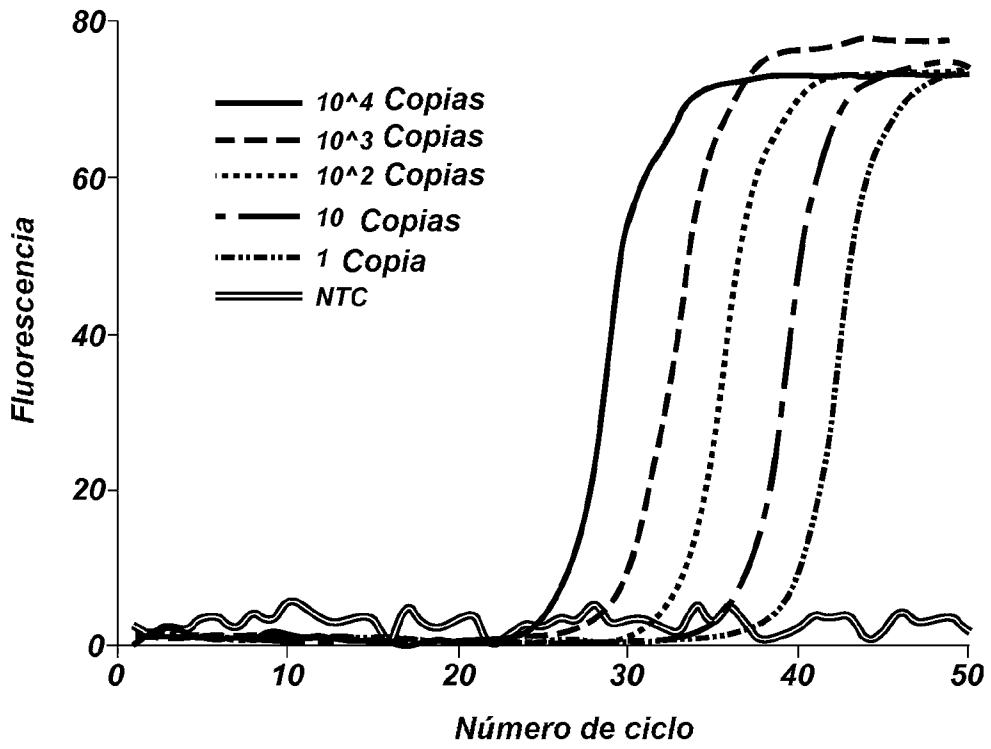


FIG. 9c

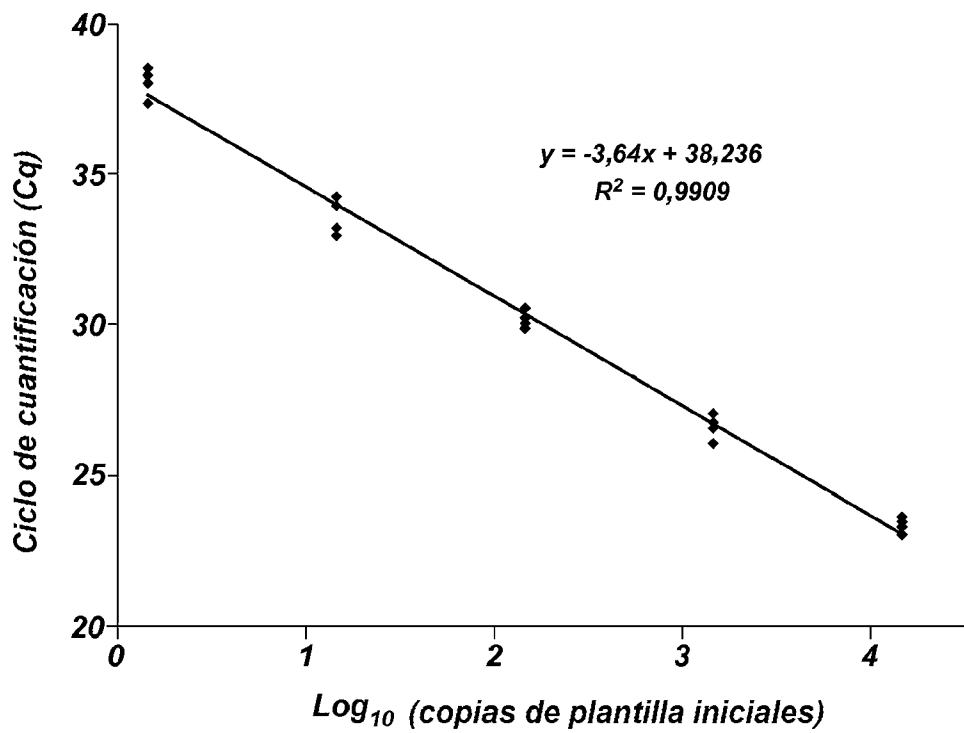


FIG. 9d

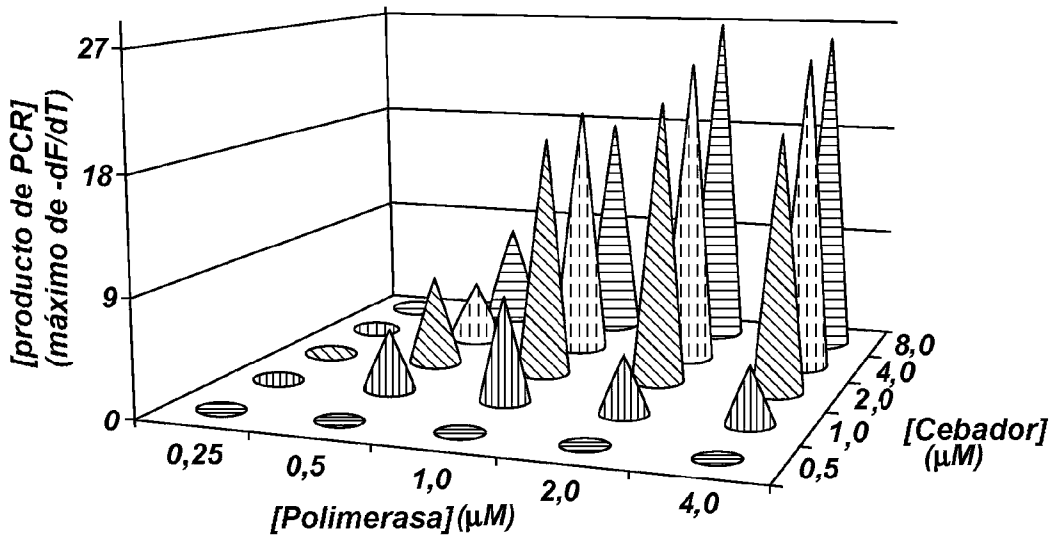


FIG. 10a

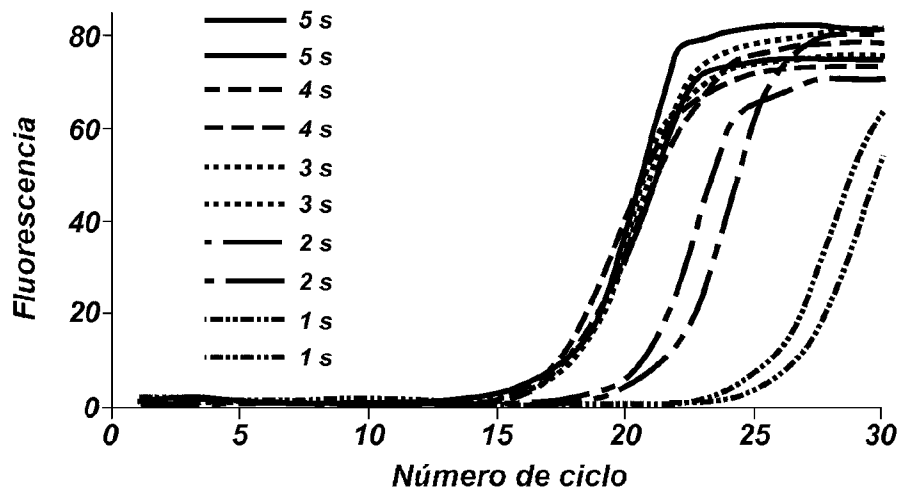


FIG. 10b

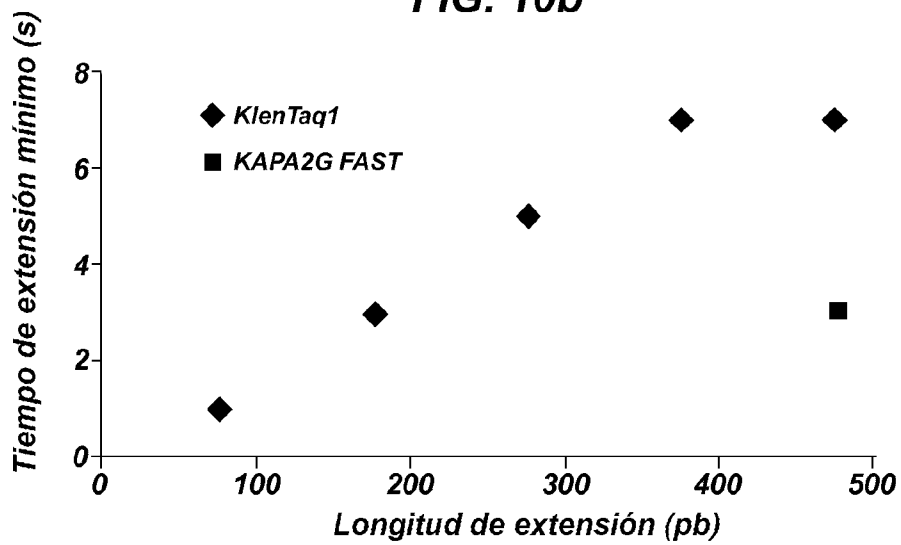


FIG. 10c

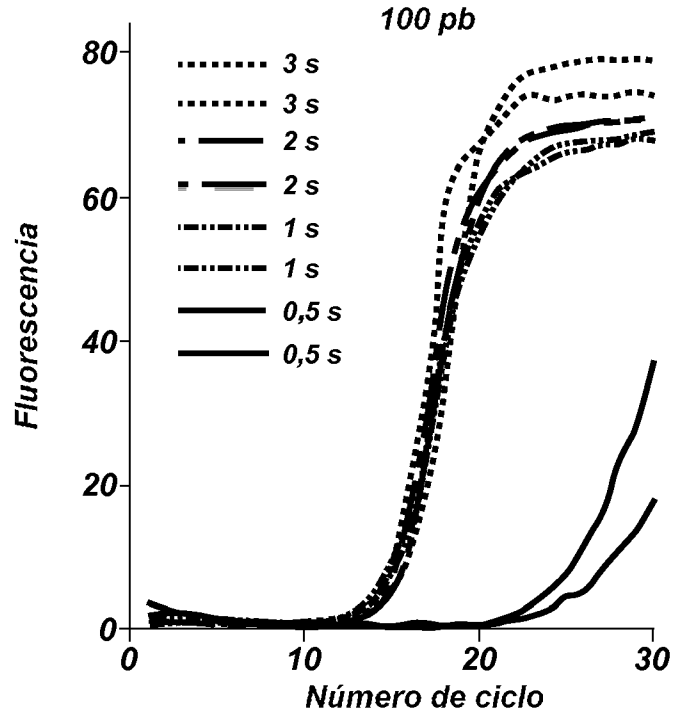


FIG. 11a

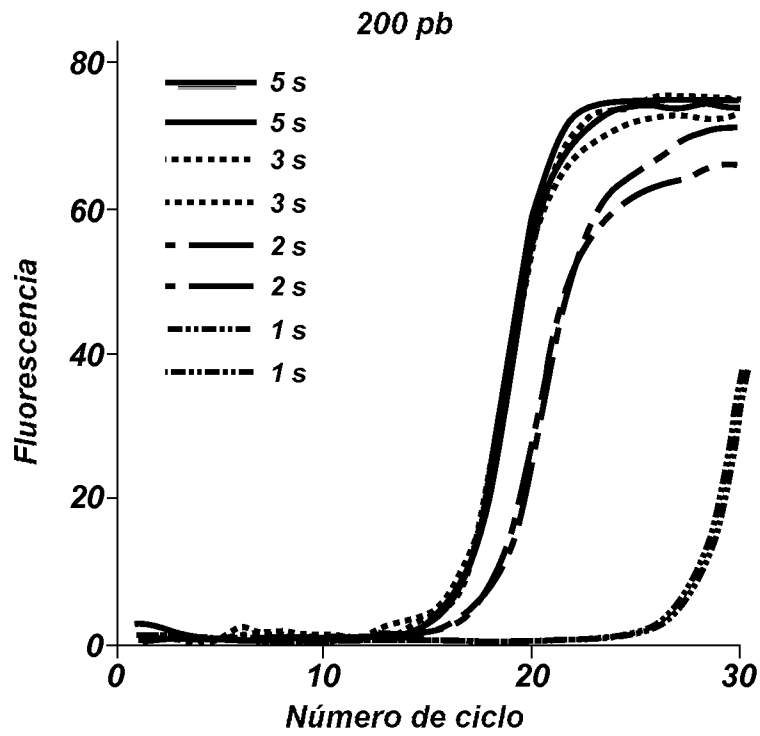


FIG. 11b

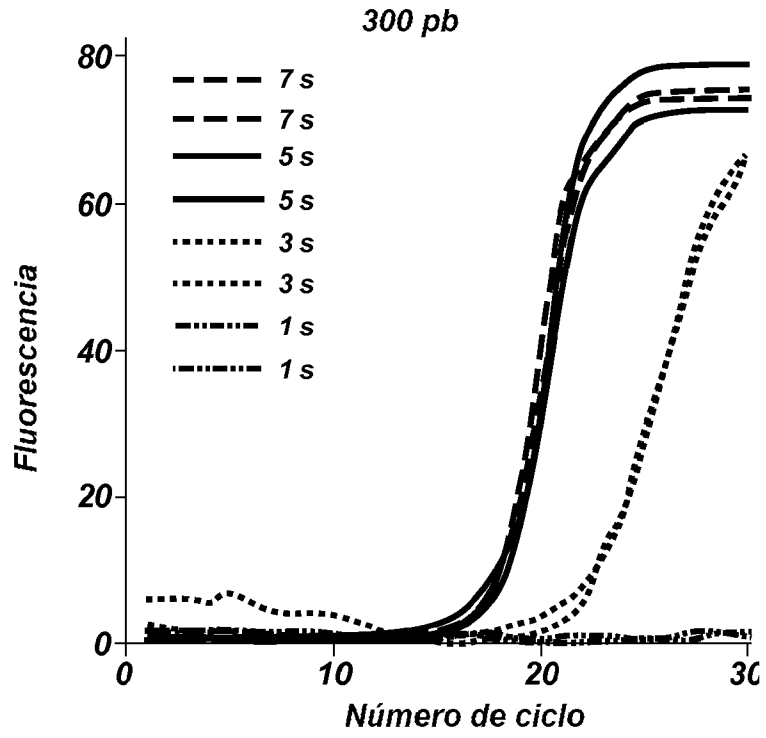


FIG. 11c

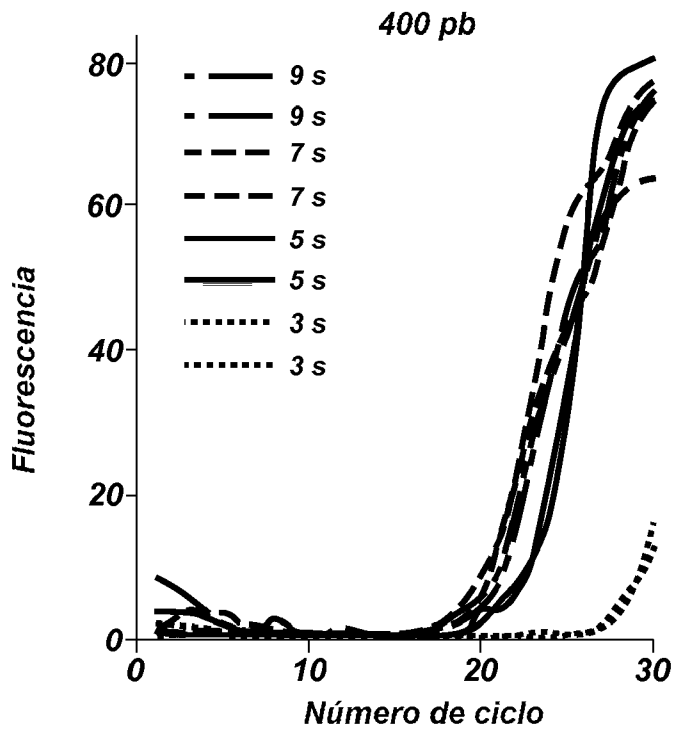


FIG. 11d

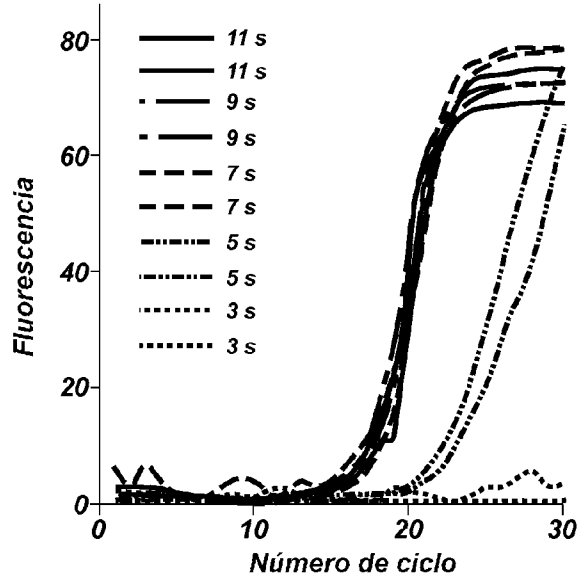


FIG. 11e

Optimización con Mg⁺⁺ para PCR a 0,42 s/ciclo

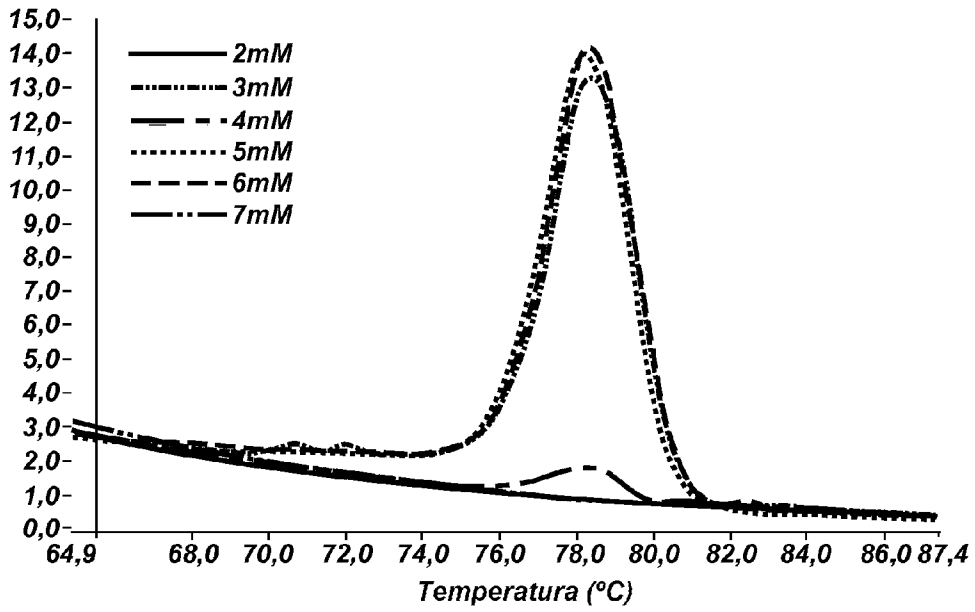


FIG. 12a

Optimización con Mg⁺⁺ para gel de PCR a 0,42 s/ciclo

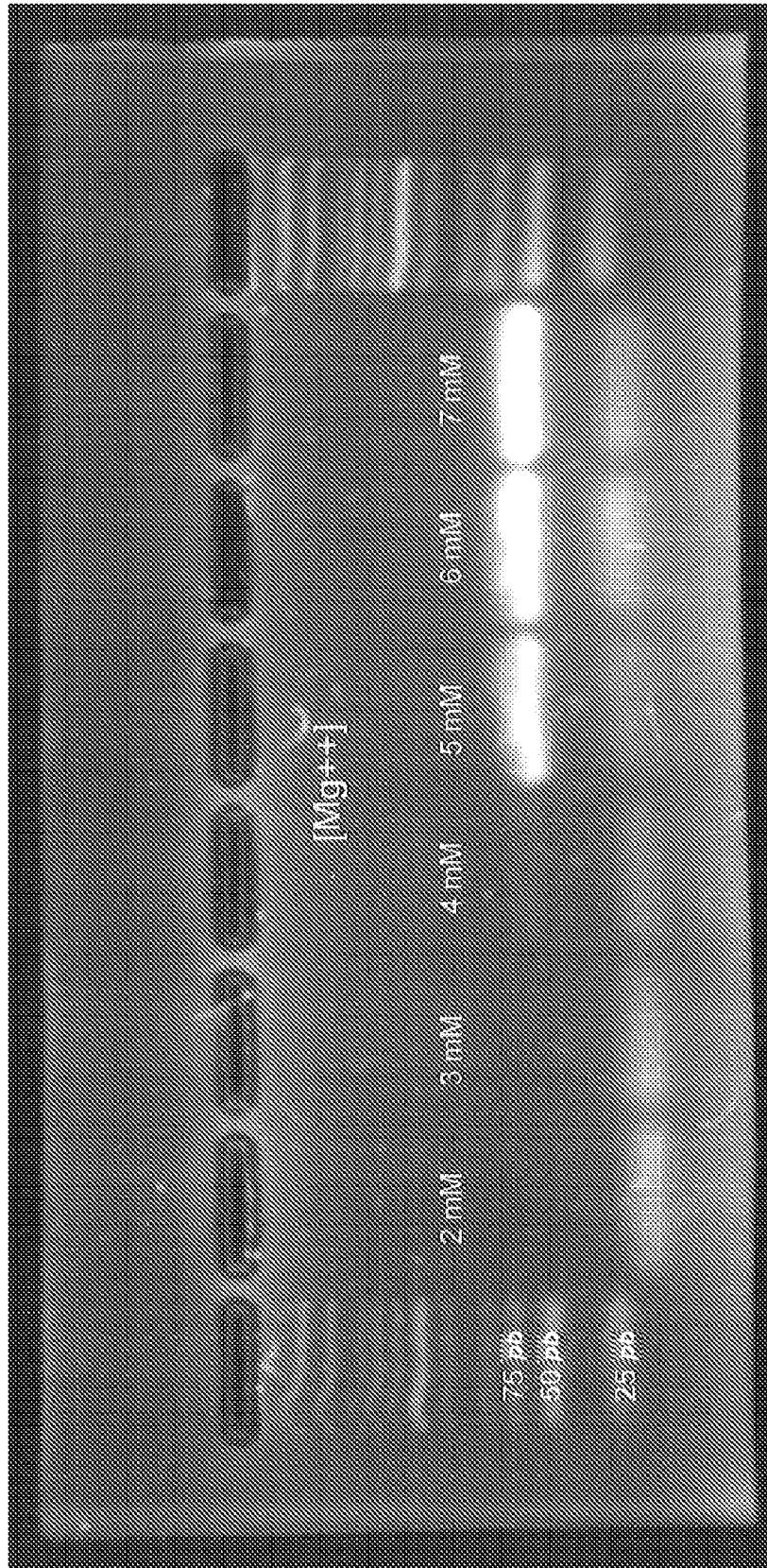


FIG. 12b

Optimización del tiempo de extensión de PRKA 60 pb con Mg⁺⁺ 5 mM

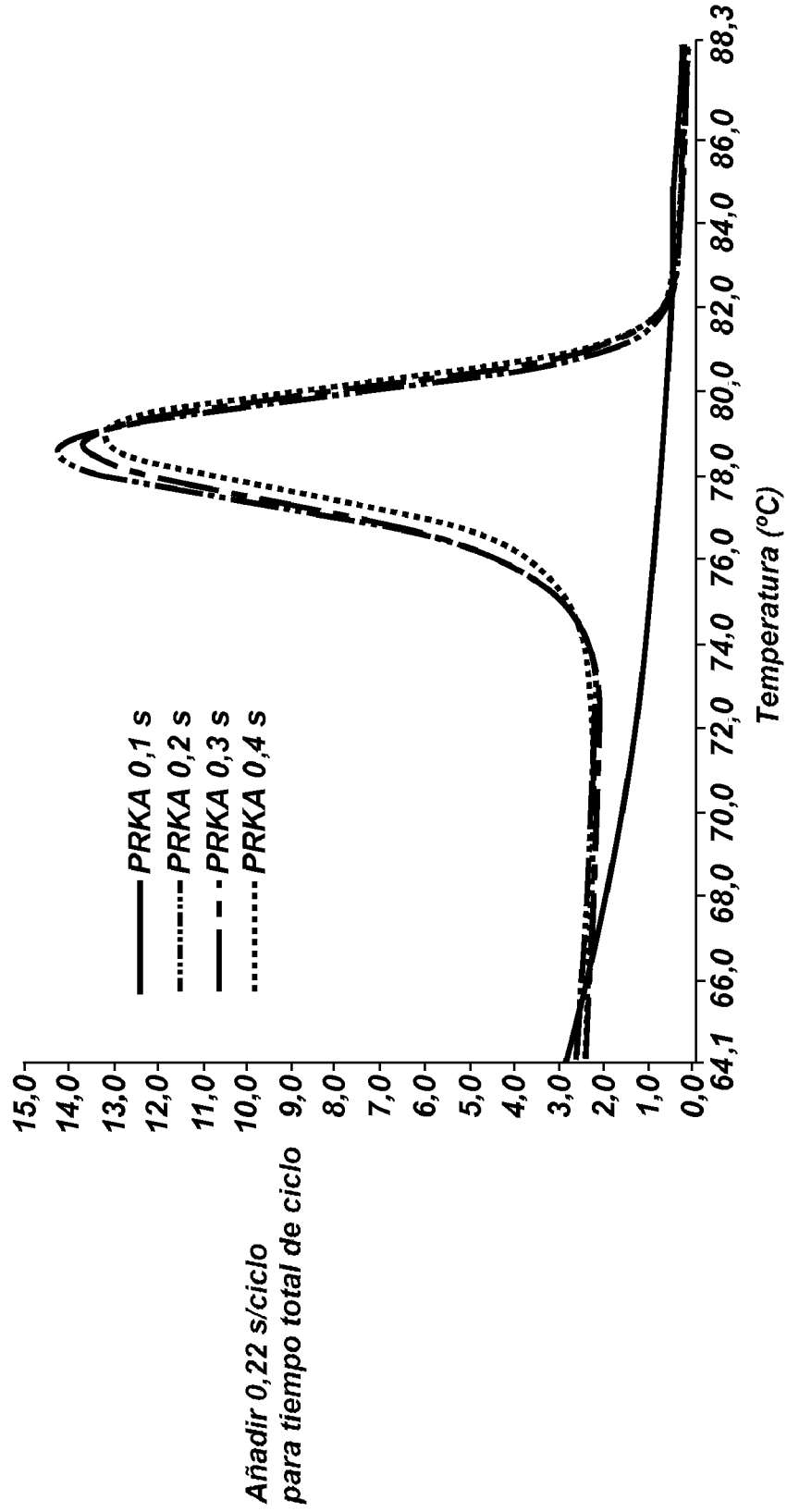


FIG. 13a

Optimización del tiempo de extensión con gel de Mg⁺⁺ 5 mM

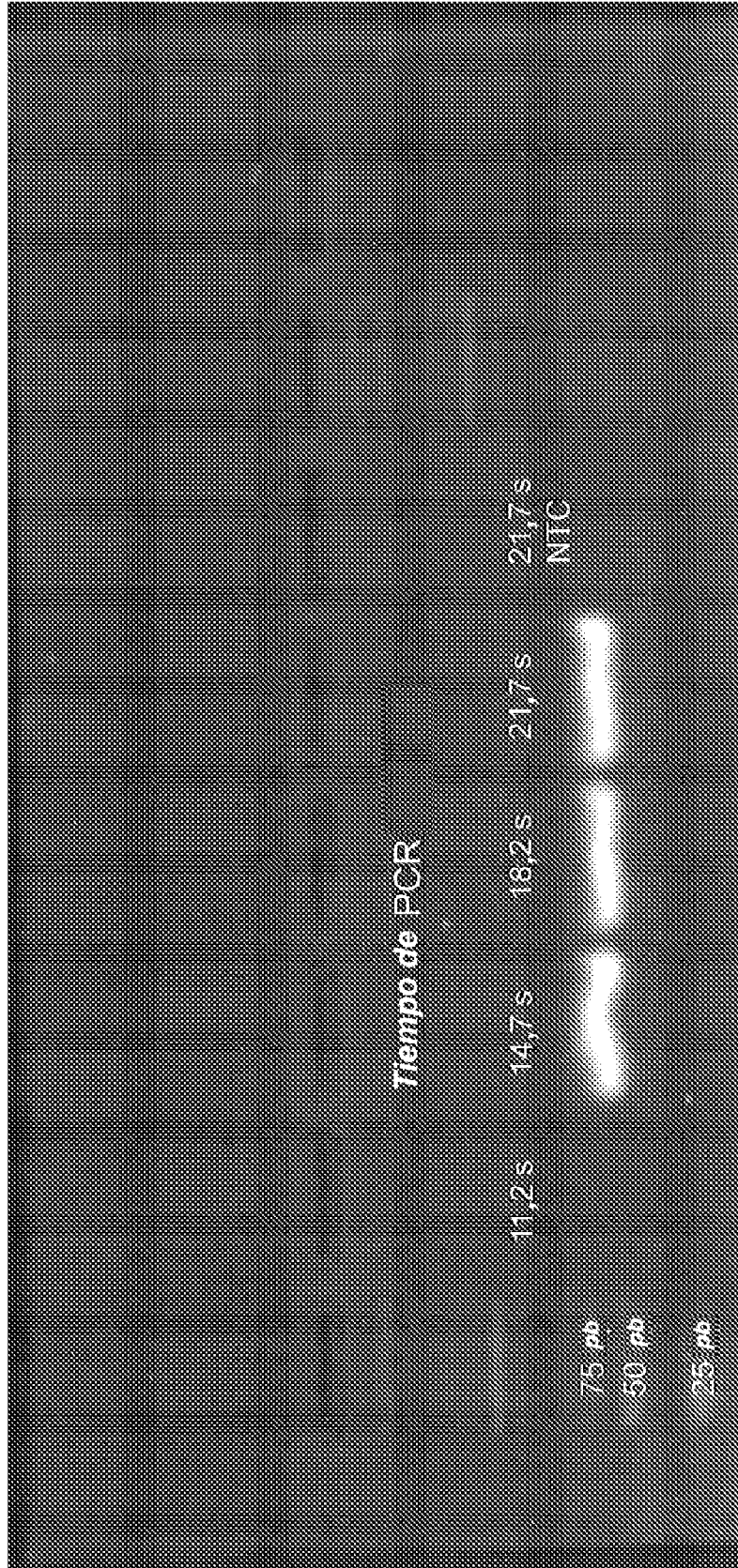


FIG. 13b

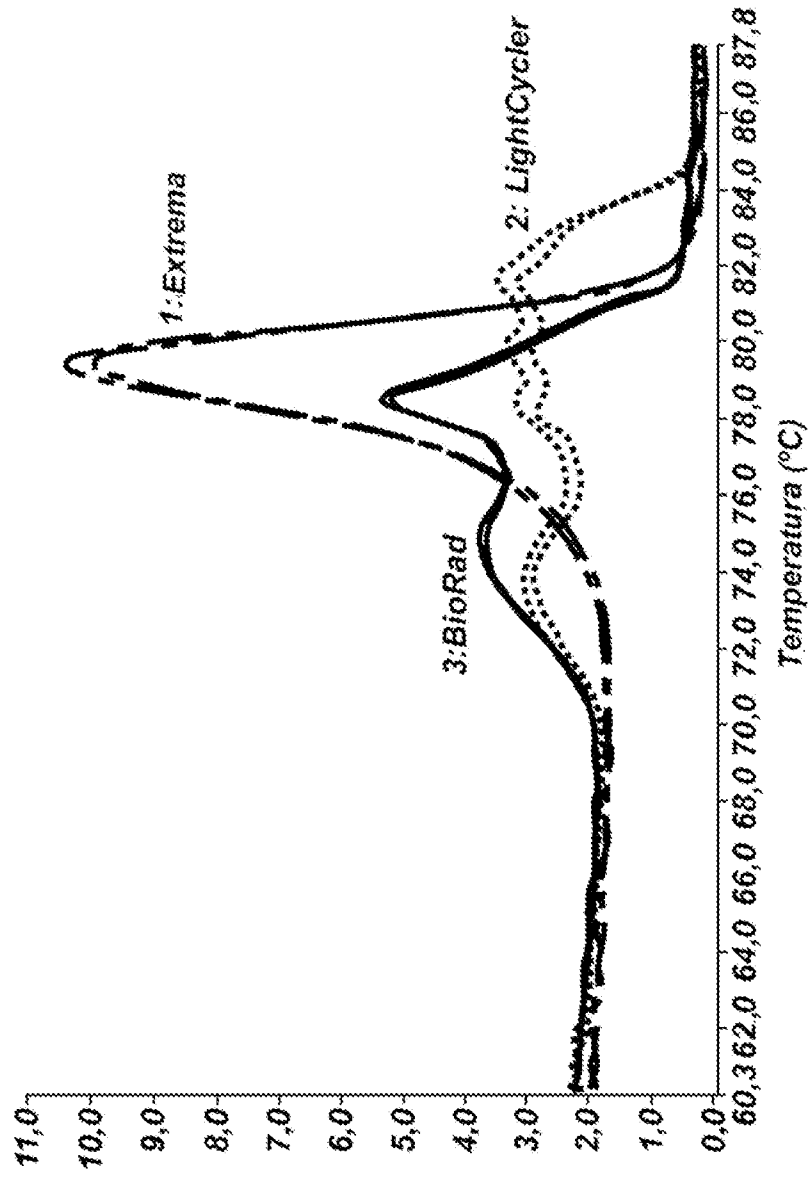


FIG. 14a

Diana: AKAP10-producto de 60 pb
[Cebador]: 20 uM
[Polimerasa]: 8 uM
10 ng de ADNgh/rxn

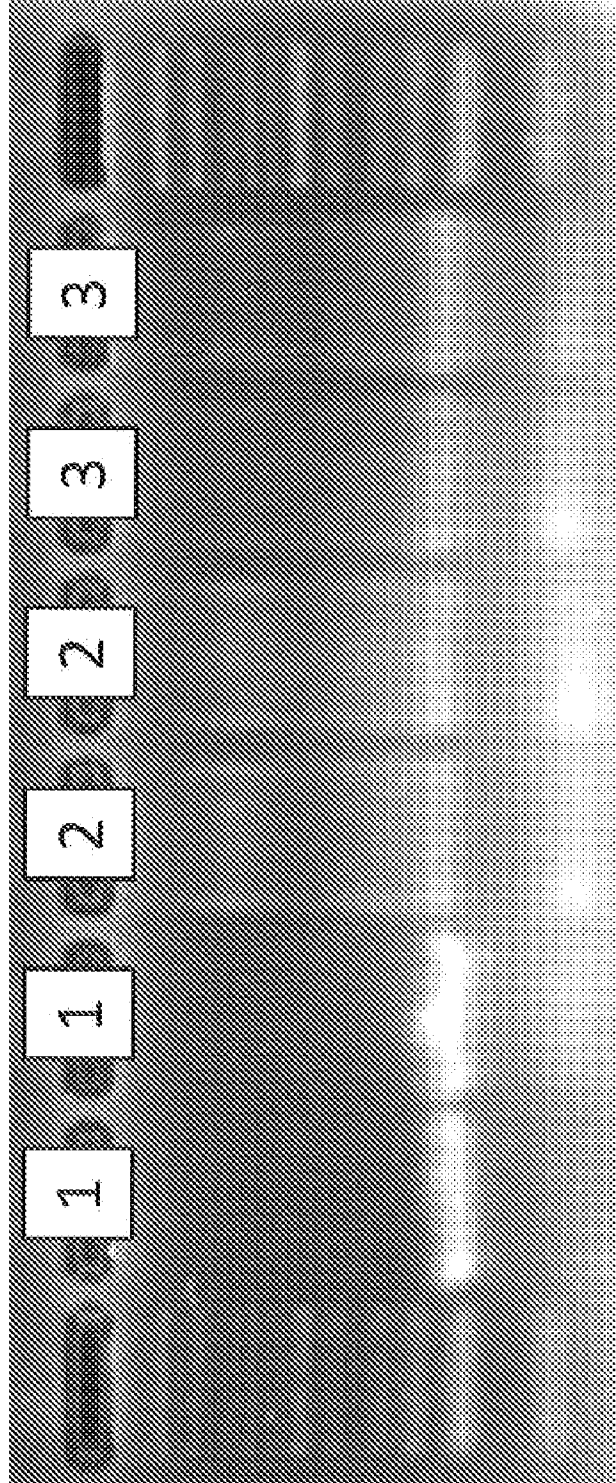


FIG. 14b

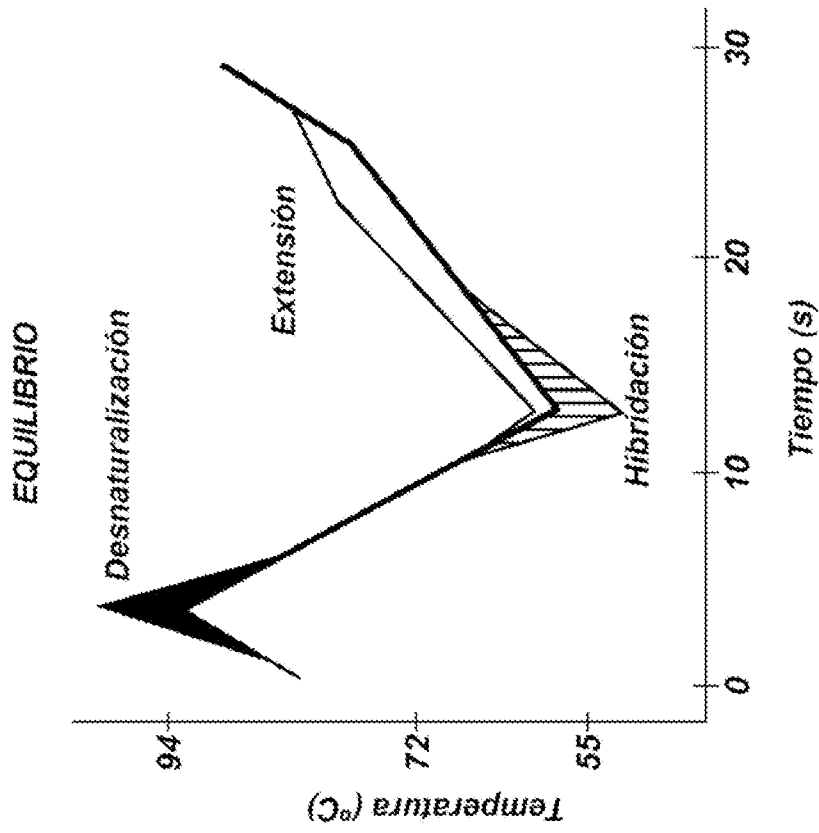


FIG. 15a

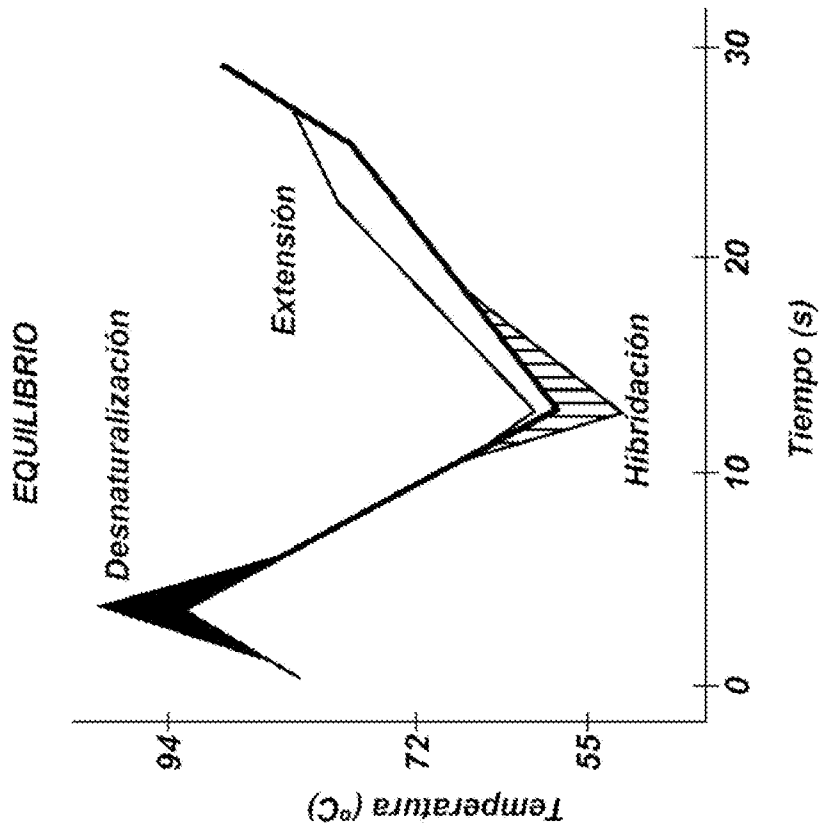


FIG. 15b