



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 355 191**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05810094 .2**

96 Fecha de presentación : **22.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1815013**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2007**

54 Título: **Composición para amplificar ácidos nucleicos.**

30 Prioridad: **22.11.2004 FR 04 12395**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.03.2011

73 Titular/es: **BIORAD PASTEUR**
3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette, FR

72 Inventor/es: **Savoye, Chantal y**
Sarfati, Patrice

74 Agente: **Espiell Volart, Eduardo María**

ES 2 355 191 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

La invención se refiere a una composición estable de reactivos para amplificar ácidos nucleicos.

La amplificación de ácidos nucleicos se usa habitualmente para detectar pequeñas cantidades de genes específicos en el campo diagnóstico, o en el campo de la medicina en particular.

Existen varias técnicas de amplificación: PCR (*polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa), RT-PCR (transcripción inversa seguida por PCR), SDA (*strand displacement amplification*, amplificación por desplazamiento de hebra), NASBA (nucleic acid sequence-based amplification, amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos), etc. Cada una de ellas requiere el uso de una mezcla de varios reactivos: uno o más cebadores oligonucleotídicos, dNTPs (trifosfatos de desoxinucleótidos), una o más enzimas (polimerasa, transcriptasa inversa, etc.), un tampón salino y, ventajosamente, una o más sondas fluorescentes.

La mezcla de estos reactivos implica un pipeteado meticuloso de cada uno de ellos, con objeto de conseguir los niveles de rendimiento de sensibilidad y especificidad, y para asegurar la reproducibilidad de los resultados de la amplificación. Además, la preparación de la mezcla de los reactivos de amplificación debe estar separada físicamente de la adición del ácido nucleico que se va a amplificar, de modo que se evite la contaminación de las disoluciones madre de los reactivos de amplificación con el ácido nucleico que se va a amplificar.

Estos reactivos se conservan generalmente a -20°C, y las sondas y los cebadores están muy habitualmente liofilizados de manera que se asegure un almacenamiento duradero a largo plazo.

Entonces pueden usarse agentes crioprotectores, por ejemplo, azúcares o polioles, de modo que se mantenga la integridad de los oligonucleótidos durante la liofilización (patente EP833667). Similarmente, se usa glicerol para proteger las enzimas (patente EP455744).

La patente EP455744 proporciona, además, un concentrado de reacción para la secuenciación de ácidos nucleicos, el cual comprende una polimerasa termoestable, dNTPs, un ddNTP, un agente reductor, glicerol, y opcionalmente, un cebador, evitando así la mezcla de estos reactivos en el momento de su utilización.

Además, la compañía ARTUS vende los kits de amplificación que contienen todos los reactivos requeridos para la amplificación. Sin embargo, estos kits deben conservarse imperativamente a -20°C. Adicionalmente, el proveedor indica que la conservación a 4°C no puede exceder las 5 horas.

No existe ninguna composición estable durante varios meses a 4°C, para amplificar ácidos nucleicos (denominada habitualmente una "mezcla"), que contenga todos los reactivos requeridos para la reacción de amplificación, y en particular, una o más sondas nucleotídicas fluorescentes.

El uso de las sondas nucleotídicas fluorescentes es particularmente ventajoso para detectar y controlar las reacciones de amplificación (tales como, en particular, una PCR o una RT-PCR en tiempo real). Esto es debido a que las pruebas de amplificación que usan sondas fluorescentes eliminan cualquier etapa manual de post-amplificación para la detección, lo que hace posible obtener un rápido resultado y evitar el riesgo de contaminaciones con aerosoles ("arrastre").

Ahora el problema que surge es el de la estabilidad de las sondas fluorescentes usadas, que se degradan rápidamente, sumándose a la inestabilidad de las enzimas y de los dNTPs usados para la amplificación.

Los autores de la presente invención se han esforzado por resolver estos problemas deseando al mismo tiempo evitar los inconvenientes de la mezcla extemporánea de los reactivos.

Los autores de la invención han demostrado pues que la presencia de polivinilpirrolidona (PVP), y opcionalmente de un poliol, hace posible estabilizar tanto las enzimas como las sondas fluorescentes en una composición líquida, o incluso también los dNTPs.

Un objeto de la invención es por tanto una composición líquida concentrada y tamponada para amplificar ácidos nucleicos que comprende al menos un dNTP, al menos una enzima requerida para la amplificación, al menos un cebador nucleotídico y al menos una sonda nucleotídica fluorescente, en presencia de polivinilpirrolidona (PVP) y opcionalmente de un poliol. En particular, cuando la composición líquida tamponada para amplificar ácidos nucleicos comprende tanto un poliol como PVP, el poliol es seleccionado preferiblemente del grupo formado por glicerol, sorbitol, pentaeritritol, inositol, dulcitol, manitol, propilenglicol o etilenglicol.

Dicha composición, también denominada comúnmente como "mezcla", ofrece la ventaja de ser estable en el tiempo independientemente de las condiciones de almacenamiento. Incluso después de la conservación durante varios meses a temperatura ambiente, las enzimas, las sondas fluorescentes o incluso también los dNTPs

permanecen estables. El nivel de sensibilidad y especificidad requerido para la amplificación y la detección del ácido nucleico está asegurada.

La composición no requiere el uso de ninguna manipulación adicional distinta a la adición de un diluyente, y por esta razón, puede considerarse como una mezcla de reacción lista para su uso.

5 Esta composición es útil independientemente del tipo de amplificación de ácido nucleico contemplada.

El término "amplificación" pretende significar el incremento en la concentración de una secuencia de ácido nucleico específica desde un ácido nucleico purificado o desde una mezcla de secuencias de ácidos nucleicos. Esta etapa de amplificación puede llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento convencional de amplificación enzimática de ADN o ARN, tal como, en particular, una PCR descrita por Saiki y col. (1988) y en las patentes EP200362 y 201184, las técnicas de TAS (*transcription-based amplification system*, sistema de amplificación basada en la transcripción) propuestas por Kwoh y col. (1989), la técnica de 3SR (*self-sustained sequence replication*, replicación de secuencia automantenida) descrita por Fahy y col. (1991), la técnica NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*, amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos) descrita en la patente EP329822, la técnica de amplificación mediada por transcripción (*transcription mediated amplification*, TMA) descrita en la patente US5.399.491, la técnica de amplificación por desplazamiento de hebra SDA (*strand displacement amplification*) descrita por Walker y col. (1992), la técnica de reacción en cadena de la ligasa (*ligase chain reaction* LCR, gap-LCR) descrita en la patente EP0320308, la técnica de amplificación en círculo rodante (*rolling circle amplification*, RCA) descrita en Nat. Genet. (1998) Jul; 19 (3) 225-232, o incluso la técnica de amplificación lineal enlazada (LLA, *linked linear amplification*) descrita en la patente US6.027.923.

20 Preferiblemente, la amplificación es una PCR en tiempo real o una RT-PCR en tiempo real.

Una composición preferida es una composición según se definió anteriormente para amplificar ácidos nucleicos mediante PCR, que comprende dATP, dCTP, dGTP y uno o más de dTTP o dUTP, y también al menos una enzima requerida para la PCR, al menos dos cebadores oligonucleotídicos, y al menos una sonda nucleotídica fluorescente, en presencia de PVP y opcionalmente de un poliol.

25 Otra composición preferida es una composición según se definió anteriormente para amplificar ácidos nucleicos mediante RT-PCR, que comprende dATP, dCTP, dGTP, y uno de dTTP o dUTP, y también al menos una enzima requerida para la RT-PCR, al menos dos cebadores oligonucleotídicos, y al menos una sonda nucleotídica fluorescente, en presencia de PVP y opcionalmente de un poliol.

Tampón:

30 La expresión "composición tamponada" pretende significar que el pH de la composición está controlado por la presencia de un tampón. Puede ser una disolución salina tamponada estándar, por ejemplo, que contenga una sal de tris-(hidroximetil)aminometano (TRIS®), preferiblemente el clorhidrato o el acetato, en agua, de manera que se alcance una concentración de TRIS® de 5 mM a 500 mM, preferiblemente de 7 mM a 400 mM.

A esta disolución de tampón puede añadirse una sal de magnesio y/o de manganeso (preferiblemente cloruro o sulfato) de tal modo que se proporcione una concentración de trabajo de 1 mM a 8 mM, preferiblemente de 1,5 a 5 mM. También puede añadirse a la disolución una sal potásica, preferiblemente cloruro potásico, a una concentración de trabajo de 5 mM a 1 M, preferiblemente de 7 mM a 800 mM. También puede añadirse una sal sódica, preferiblemente cloruro sódico, a una concentración de 5 mM a 500 mM, preferiblemente de 7 mM a 400 mM. También puede añadirse a la mezcla una sal de amonio, por ejemplo, sulfato amónico, a una concentración de trabajo de 2 mM a 100 mM, preferiblemente de 3,5 mM a 80 mM. También pueden usarse combinaciones de sulfato amónico y de cloruro potásico, o de otras sales, a unas concentraciones equivalentes a las ya mencionadas. También pueden añadirse otros compuestos, tales como etilendiaminotetraacetato (EDTA), ditiotreitól (DTT), tween-20, BSA (*bovine serum albumin*, albúmina sérica bovina) o triton X-100. El pH se ajusta de forma que se obtenga un valor de pH de entre 7,4 y 9,2, preferiblemente 7,8 y 8,8.

45 *Enzimas:*

La composición comprende al menos una enzima requerida para la amplificación. Puede ser una polimerasa de ADN, tal como una polimerasa de ADN *Taq*, VENTTM, DEEPVENTTM, Pfu, Pwo o Tth. También puede ser una polimerasa *Taq* "de inicio en caliente (*hot start*)", cuyo sitio enzimático puede ser bloqueado a baja temperatura mediante una inmunorreacción (patente EP592035), una reacción química (patentes US5.677.152; US5.773.258) o mediante una interacción iónica. Todas estas enzimas están disponibles comercialmente. Cuando sea apropiado, pueden utilizarse transcriptasas inversas, por ejemplo, transcriptasas inversas con actividad ARNasa H. Pueden añadirse otras enzimas, por ejemplo, UDG (uracil ADN glucosilasa). En particular puede usarse la enzima termolábil UDG.

Las enzimas, por ejemplo, la polimerasa de ADN Taq, la transcriptasa inversa y la UDG, se usan preferiblemente a unas concentraciones de entre 0,5 U y 8 U de polimerasa Taq por reacción, que se corresponden con de 10 U/ml a 8×10^3 U/ml. La expresión de la concentración de la enzima es bien conocida por el experto en la materia, siendo una unidad la cantidad de enzima que incorpora 10 nmol de dNTP en un material insoluble en ácido en un periodo de 30 minutos a 72°C. La transcriptasa inversa se utiliza preferiblemente a entre 1 U y 10^3 U por reacción, que se corresponde con de 20 U/ml a 10^6 U/ml. La unidad de transcriptasa inversa es la cantidad de enzima que incorpora un nmol de dTTP en productos insolubles en ácido en 10 minutos a 37°C con un molde de ARN poli-A y un cebador de oligo-dT₁₂₋₁₈. La UDG, cuando se añade a la composición, se usa preferiblemente a entre 0,1 y 2 U, que se corresponden con de 2 U/ml a 2×10^3 U/ml. Una unidad de UDG cataliza la liberación de un nmol de uracilo libre desde poli(dU) en una hora a 37°C.

dNTPs:

Los trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTPs) se proporcionan a una concentración preferiblemente al menos cinco veces mayor que la concentración de trabajo. Esto significa que cada dNTP se usa preferiblemente a entre 0,3 mM y 75 mM. Los dNTPs incluyen trifosfato de desoxiadenosina (dATP), trifosfato de desoxiguanosina (dGTP), trifosfato de desoxicitidina (dCTP) y trifosfato de desoxitimidina (dTTP). Preferiblemente, son utilizados estos cuatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en las composiciones de la invención. También pueden usarse otros dNTPs, tales como trifosfato de desoxiuridina (dUTP), y análogos de dNTP, junto con conjugados de dNTP, y están incluidos en el término "dNTP" usado aquí.

Cebadores:

Típicamente, los cebadores oligonucleotídicos tienen generalmente entre 12 y 25 nucleótidos de longitud. Sin embargo, también pueden usarse cebadores con menos de 12 nucleótidos o con más de 25 nucleótidos de longitud. La longitud del cebador no es esencial para implementar la invención. Generalmente, los cebadores oligonucleotídicos se sintetizan químicamente. Los cebadores oligonucleotídicos pueden estar formados por las bases A, T, G, C o U, o análogos de bases, por ejemplo, inosina o PNAs (*peptide nucleic acids*, ácidos nucleicos peptídicos).

Los cebadores oligonucleotídicos utilizados hibridan convencionalmente con la hebra complementaria del molde durante la reacción de amplificación.

Cada cebador se usa preferiblemente a una concentración de al menos 5 veces la concentración de trabajo, lo cual significa una concentración de aproximadamente 0,1 μ M a 200 μ M, preferiblemente de entre 1 μ M y 50 μ M.

Sondas:

La sonda nucleotídica puede comprender desde 8 hasta 40 nucleótidos de longitud. La longitud de la sonda no es esencial para el uso de la invención. Normalmente se utiliza para capturar o detectar una secuencia objetivo con la que hibrida.

El marcado de la sonda es particularmente ventajoso para facilitar la detección del ácido nucleico amplificado, en particular, en las reacciones de amplificación y detección en tiempo real, es decir, la secuencia objetivo es detectada y/o cuantificada mientras se está produciendo la reacción de amplificación.

La sonda se denomina "fluorescente" porque porta un marcaje fluorescente.

Estos marcajes fluorescentes incluyen, en particular, fluoresceína, Tamra, N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina; FAM, 5-carboxifluoresceína; JOE, 2',7'-dimetil-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína, ROX, 6-carboxi-X-rodamina; CY3; CY5; TET, tetraclorofluoresceína o HEX, hexaclorofluoresceína.

La detección del ácido nucleico amplificado puede llevarse a cabo en particular haciendo uso de la tecnología de "baliza molecular" (Tyagi y Kramer, 1996; Cayouette y col., 1999). Según esta tecnología, se unen un fluoróforo y un "extintor" a cada extremo de la secuencia de la sonda. En ausencia del ácido nucleico objetivo, las secuencias de los brazos hibridan entre sí de modo que se forma una estructura "en horquilla" que pone en contacto el fluoróforo con el extintor. En presencia de un ácido nucleico objetivo, la sonda y la secuencia objetivo hibridan. La estructura en horquilla no puede coexistir con la doble hélice rígida que se forma mediante esta hibridación, y el cambio conformacional resultante de la misma da lugar a la separación de las secuencias de los brazos, causando un distanciamiento entre el fluoróforo y el extintor. Cuando el fluoróforo y el extintor están separados, la señal del fluoróforo es detectable. Pueden usarse todos los marcajes fluorescentes indicados anteriormente. El extintor puede ser seleccionado preferiblemente de entre Dabcyl, Eclipse Dark Quencher y Black Hole Quenchers. Estas moléculas están fácilmente disponibles en Eurogentec, Biosearch Technology, Prologo.

Cada sonda fluorescente se usa preferiblemente a una concentración mayor de al menos 5 veces la concentración de trabajo, lo que significa entre 0,1 μM y 200 μM , preferiblemente entre 0,5 μM y 30 μM .

Polioles:

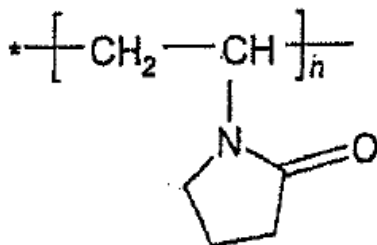
Los polioles que pueden usarse en la invención tienen una estructura lineal, ramificada o cíclica. Los polioles más adecuados incluyen glicerol, sorbitol o pentaeritritol. También pueden utilizarse otros polioles tales como inositol, dulcitol, manitol, propilenglicol o etilenglicol, y derivados de los mismos. También pueden usarse combinaciones de polioles.

Los polioles se disuelven preferiblemente en un tampón o en agua, y se utilizan preferiblemente en la composición a una concentración mayor de 1 mM, preferiblemente mayor de 250 mM, preferiblemente mayor de 500 mM, incluso más preferiblemente mayor de 1 M.

Preferiblemente se usa glicerol a una concentración mayor de 5 M, se usa sorbitol a una concentración mayor de 1 M, se usa inositol a una concentración mayor de 500 mM, y se usa pentaeritritol a una concentración mayor de 250 mM.

PVP:

La polivinilpirrolidona es un polímero de fórmula:



La PVP es un excipiente en la preparación de productos farmacéuticos, principalmente para la producción de comprimidos o gránulos. Las PVPs con un peso molecular medio de 2.500 a 750.000 están en el mercado con los siguientes nombres: Kollidon, Luviskol, Albigen A y Divergan (BASF); PVP y Plasdone (General Aniline and Film Corp); Collacral y Luviskol VA (copolímeros con ésteres de vinilo, BASF); PVP/VA (copolímeros con acetato de vinilo, General Aniline and Film Corp.).

La PVP se disuelve preferiblemente en un tampón o en agua. Se utiliza a una concentración mayor de 0,1 mM, en particular a una concentración desde 0,1 mM hasta 5 M, más particularmente a una concentración desde 1 mM hasta 1 M, e incluso más particularmente a una concentración desde 10 mM hasta 500 mM.

En el contexto de la invención, se hace uso preferiblemente de PVP con un peso molecular de 2.500 g/mol hasta 750.000 g/mol, más preferiblemente se hace uso de PVP con un peso molecular de 7.500 g/mol hasta 55.000 g/mol, e incluso más preferiblemente se hace uso de PVP-10, cuyo peso molecular es de 10.000 g/mol. La PVP-10 se usa preferiblemente a una concentración mayor de 30 mM, preferiblemente a una concentración desde 30 mM hasta 1 M, más preferiblemente a aproximadamente 300 mM.

Uso:

La composición contiene, en forma concentrada, los reactivos requeridos para una amplificación de ácidos nucleicos. La única etapa adicional requerida para comenzar la amplificación es la dilución de esta composición antes o después de que haya sido puesta en contacto con la muestra de ácido nucleico que se va a amplificar.

El diluyente es preferiblemente una disolución salina tamponada, que comprende opcionalmente sales de magnesio o sales de manganeso, entre otras sales. Las concentraciones del tampón y de la sal se ajustan de modo que se obtengan unas concentraciones finales de tampón y de sal que sean adecuadas para una reacción de amplificación. Puede ser una disolución salina tamponada que contenga al menos uno de los ingredientes elegidos de entre TRIS a una concentración de al menos 8 mM, una sal potásica o una sal sódica a una concentración de al menos 8 mM, una sal de amonio a una concentración de al menos 5 mM, y una sal de magnesio o una sal de manganeso a una concentración de al menos 0,8 mM, usándose los ingredientes individualmente o como una mezcla.

Puede ser, por ejemplo, una disolución salina tamponada estándar, que contiene una sal de

tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), preferiblemente el clorhidrato o el acetato, en agua, de modo que se alcance una concentración de TRIS de 8 mM a 2,5 M, preferiblemente de 10 mM a 125 mM. Puede añadirse una sal de magnesio y/o una sal de manganeso, preferiblemente cloruro o sulfato, a esta disolución tampón a una concentración de 0,85 mM a 400 mM, preferiblemente de 1 mM a 20 mM. También puede añadirse a la disolución una sal potásica, preferiblemente cloruro potásico, a una concentración de trabajo de 8 mM a 4,5 M, preferiblemente de 10 mM a 250 mM. También puede añadirse una sal sódica, preferiblemente cloruro, a una concentración de 8 mM a 2,5 M, preferiblemente de 10 mM a 125 mM. También puede añadirse a la mezcla una sal de amonio, por ejemplo, sulfato amónico, a una concentración de trabajo de 5 mM a 500 mM, preferiblemente de 5 mM a 25 mM. También pueden utilizarse combinaciones de sulfato amónico y de cloruro potásico, o de otras sales, a unas concentraciones equivalentes a las mencionadas anteriormente. También pueden usarse otros compuestos, tales como etilendiaminotetraacetato (EDTA), ditiotreitól (DTT), tween-20, BSA (*bovine serum albumin*, albúmina sérica bovina) o triton X-100. El pH se ajusta de manera que se obtenga un valor de pH de entre 7,4 y 9,2, preferiblemente 7,8 y 8,8.

Un ejemplo de un diluyente es un tampón para la polimerasa de ADN *Taq* a una concentración de $MgCl_2$ de entre 1 mM y 20 mM.

Son posibles varias formas de realización para la preparación de una mezcla de reacción completa para una amplificación de ácido nucleico.

5 Un aspecto preferido de la invención se dirige hacia un procedimiento para preparar una mezcla de reacción completa para amplificar ácidos nucleicos, que comprende:

(i) diluir una composición concentrada según se definió anteriormente en una disolución salina tamponada adecuada para amplificar ácidos nucleicos;

10 (ii) poner en contacto una muestra de ácidos nucleicos que se va a amplificar con un volumen deseado de la composición diluida en la etapa (i).

Preferiblemente, el procedimiento de preparación comprende las siguientes etapas:

(i₁) dispensar la composición concentrada en un recipiente y almacenarla de esta forma,

(i₂) añadir una disolución salina tamponada en el momento de su uso,

15 (ii) poner en contacto una muestra de ácidos nucleicos que se va a amplificar con la composición diluida en la etapa (i₂).

En la práctica, es posible, por ejemplo, tomar 5 µl de una composición concentrada según se definió anteriormente (mezcla), y añadir 35 µl del diluyente (tampón) y después 10 µl de una muestra de ácido nucleico, o si no tomar 5 µl de la composición concentrada (mezcla), y añadir 20 µl del diluyente (tampón) en 25 µl de muestra.

20 La puesta en contacto puede llevarse a cabo en cualquier recipiente adecuado para la amplificación, tal como tubos, pocillos de una microplaca, vasos capilares.

Alternativamente, otro procedimiento para preparar una mezcla de reacción completa para amplificar ácidos nucleicos comprende:

(i) mezclar una muestra de ácidos nucleicos que se va a amplificar en una disolución salina tamponada adecuada para amplificar ácidos nucleicos;

25 (ii) añadir la mezcla obtenida en la etapa (i) a un volumen deseado de la composición concentrada según se definió anteriormente.

Preferiblemente, este procedimiento comprende, en la práctica, dispensar la composición concentrada según se definió anteriormente en tubos, en los pocillos de una microplaca, o en cualquier otro recipiente adecuado para la amplificación, y después distribuir la composición concentrada de la muestra de ácido nucleico (mezclada de antemano con la disolución salina tamponada).

30 La amplificación puede comenzar espontáneamente o después de una incubación en caliente (95°C), por ejemplo, si se usa una polimerasa de "inicio en caliente".

La muestra de ácido nucleico puede ser de cualquier tipo. Preferiblemente procede de una muestra biológica tal como sangre, orina, saliva o una biopsia tisular, que ventajosamente ha sido tratada de antemano, de manera que se extraen los ácidos nucleicos de la misma, mediante cualquier procedimiento conocido por los

35

expertos en la materia.

La presente invención está dirigida por tanto también hacia un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos que comprende las etapas (i) y/o (ii) según se definió anteriormente, y (iii) el inicio de la reacción de amplificación de los ácidos nucleicos presentes en la muestra, amplificación que es detectable mediante el marcaje fluorescente portado por la(s) sonda(s).

Puede ser cualquier tipo de amplificación, según se describió anteriormente, por ejemplo, una RT-PCR en tiempo real o una PCR en tiempo real.

Kits:

La invención también proporciona un kit para amplificar y/o detectar ácidos nucleicos, que comprende al menos un recipiente que contiene la composición concentrada según se definió anteriormente, y opcionalmente, instrucciones para el uso del kit. Otros kits pueden comprender un primer recipiente que contiene la composición concentrada, según se definió anteriormente, y un segundo recipiente que contiene una disolución salina tamponada según se definió anteriormente.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: comparación de los valores de Ct obtenidos para la amplificación de 1.000 copias de ADN (A) y 10 copias de ADN (B) tras varios tiempos de incubación, a 37°C, de las mezclas de PCR que contienen ningún poliol (mezcla 1), glicerol 6,5 M (mezcla 2), inositol 750 mM (mezcla 3), pentaeritritol 530 mM (mezcla 4), sorbitol 1,5 M (mezcla 5).

Figura 2: comparación de los valores de Ct obtenidos a partir de la amplificación de 3 secuencias de ADN, tras varios tiempos de incubación, a 37°C, de las mezclas de PCR que no contienen ni un poliol ni PVP (mezcla 6), o que contienen PVP10 0,3 M (mezcla 7), glicerol 6,5 M (mezcla 8), PVP-10 0,3 M + glicerol 6,5 M (mezcla 9).

EJEMPLOS:

Ejemplo 1:

Este ejemplo muestra el efecto estabilizante de glicerol, de sorbitol, de pentaeritritol y de inositol sobre mezclas para PCR en tiempo real.

El estudio de la estabilidad del reactivo se lleva a cabo a 37°C. Según la ley de Arrhenius, se acepta que una enzima que es estable durante una semana a 37°C conserva su actividad durante 6 meses a 4°C.

Se preparan cinco composiciones para PCR en tiempo real. Cada composición (mezcla) contiene tampón 1X (Qiagen), 1,5 mM de MgCl₂, 5 µM de cada cebador (Eurobio Laboratoires), 2,5 mM de cada dNTP (Eurobio Laboratoires), 1 µM de sonda de baliza molecular marcada con Fam-Dabcyl (Eurogentec), 1 U de polimerasa Taq (Qiagen) y

sin poliol: mezcla 1,

6,8 M de glicerol (Prolabo): mezcla 2,

750 mM de inositol (Fluka): mezcla 3,

530 mM de pentaeritritol (Merck): mezcla 4,

1,5 de M sorbitol (Sigma): mezcla 5.

Se toman fracciones alícuotas de 45 µl de cada composición (mezcla) y se conservan a 37°C hasta la fecha del análisis.

Se prepara una disolución diluyente. Contiene tampón 1,29X y 6,93 mM de MgCl₂. Se toman fracciones alícuotas de 315 µl y se conservan a 37°C hasta la fecha del análisis.

El día del análisis se añade una fracción alícuota del diluyente a una fracción alícuota de la mezcla de PCR. Después de mezclar, se dispensan 40 µl de la disolución en los tubos de PCR, se añaden 10 µl de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* que contienen 1 copia/µl a tres tubos diferentes de PCR, se añaden 1,0 µl de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* que contiene 100 copias/µl a tres tubos diferentes, y se añaden 10 µl de agua a dos tubos diferentes.

Las reacciones de PCR se llevan a cabo el día 0, el día 3 $\pm$ 1, el día 6 ó 7, el día 13 y el día 21.

Las reacciones de PCR se llevan a cabo en el iQ icycler (Bio-Rad). Se llevan a cabo 50 ciclos consistentes en 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 59°C y 30 segundos a 72°C, después de una etapa inicial de 15 minutos a 95°C con objeto de activar la polimerasa “de inicio en caliente”.

5

Los análisis se llevan a cabo mediante el programa informático del iQ icycler. Los valores umbrales de ciclo (Ct) para cada reacción de PCR se determinan después del posicionamiento manual de la línea base entre los ciclos 4 y 25 y el posicionamiento manual del umbral a un valor constante de 50 unidades de fluorescencia relativa (*relative fluorescence units*, RFU). El Ct es el ciclo de la PCR en el que la fluorescencia medida es mayor que la del ruido de fondo.

10

Las medias de los valores de Ct para los triplicados obtenidos tras la amplificación de 10 copias/PCR y 1.000 copias/PCR con las mezclas (mezclas 1 a 5) incubadas a 37°C se muestran en la figura 1.

Todos los polioles presentados en este ejemplo hacen posible estabilizar todas las mezclas de reacción para PCR en tiempo real. Pentaeritritol y sorbitol son los estabilizantes más efectivos dado que incrementan la estabilidad de las mezclas en un factor al menos igual a 3,5 y 6,5, respectivamente.

15

Las mezclas 3, 4, 5 y 5' fueron ensayadas adicionalmente para comprobar su estabilidad a tres temperaturas (37°C, 4°C, -20°C). La mezcla 5' es idéntica a la mezcla 5 excepto por la concentración de MgCl₂ (3 mM) y la concentración de la sonda (2 μ M). Los resultados obtenidos para las mezclas 3, 4, 5 y 5' se presentan respectivamente en las Tablas 1 A, 1B, las Tablas 2A, 2B, las Tablas 3A, 3B, y las Tablas 4A, 4B, que siguen.

20

Tablas 1A y 1B: comparación de los valores de Ct obtenidos para la amplificación de 1.000 copias de ADN (A) y 10 copias de ADN (B) tras varios tiempos de incubación, a 37°C, 4°C y -20°C, de la mezcla de PCR 3 que contiene inositol 750 mM:

	Ct (1.000 copias / PCR)		
	37°C	4°C	-20°C
D0	30,3 $\pm$ 0,3	30,3 $\pm$ 1,3	30,3 $\pm$ 1,3
D4	29,0 $\pm$ 0,1	29,6 $\pm$ 0,3	NT
D7	> 50	NT	NT
10 meses	NT	30,5 $\pm$ 0,6	31,7 $\pm$ 1,4
	Ct (10 copias / PCR)		
	37°C	4°C	-20°C
D0	38,6 $\pm$ 1,3	38,6 $\pm$ 1,3	38,6 $\pm$ 1,3
D4	37,5 $\pm$ 1,1	NT	NT
D7	> 50	NT	NT
10 meses	NT	38,3 $\pm$ 0,6	39,2 $\pm$ 4,1

Tablas 2A y 2B: comparación de los valores de Ct obtenidos para la amplificación de 1.000 copias de ADN (A) y 10 copias de ADN (B) tras varios tiempos de incubación, a 37°C y 4°C, de la mezcla de PCR 4 que contiene pentaeritritol 530 mM:

	Ct (1.000 copias / PCR)	
	37°C	4°C
D0	29,9 ± 0,2	29,9 ± 0,2
D3	28,0 ± 0,7	NT
D7	29,3 ± 0,2	NT
D14	> 50	NT
10 meses	NT	30,0 ± 0,4
	Ct (10 copias / PCR)	
	37°C	4°C
D0	37,7 ± 0,1	37,7 ± 0,1
D3	35,8 ± 0,7	NT
D7	> 50	NT
D14	> 50	NT
10 meses	NT	37,5 ± 1,0

Tablas 3A y 3B: comparación de los valores de Ct obtenidos para la amplificación de 1.000 copias de ADN (A) y 10 copias de ADN (B) tras varios tiempos de incubación, a 37°C, 4°C y -20°C, de la mezcla de PCR 5 que contiene sorbitol 1,5 M y MgCl₂ 1,5 mM:

	Ct (1.000 copias / PCR)		
	37°C	4°C	-20°C
D0	29,9 ± 0,1	29,9 ± 0,1	29,9 ± 0,1
D4	28,9 ± 0,3	NT	NT
D7	29,2 ± 0,5	NT	NT
D13	29,0 ± 0,1	NT	NT
D21	> 50	NT	NT
6 meses	NT	30,2 ± 0,1	31,3 ± 0,6
12 meses	NT	29,8 ± 0,1	29,2 ± 0,7
	Ct (10 copias / PCR)		
	37°C	4°C	-20°C
D0	37,2 ± 0,9	37,2 ± 0,1	37,2 ± 0,1
D4	37,5 ± 1,5	37,3 ± 0,2	NT
D7	46,6 ± 1,4	NT	NT
D13	> 50	NT	NT
D21	> 50	NT	NT
6 meses	NT	37,8 ± 0,8	39 ± 0,7
12 meses	NT	37,5 ± 1,0	37,1 ± 1,1

Tablas 4A y 4B: comparación de los valores de Ct obtenidos para la amplificación de 1.000 copias de ADN (A) y 10 copias de ADN (B) tras varios tiempos de incubación, a 37°C, 4°C y -20°C, de la mezcla de PCR 5' que contiene sorbitol 1,5 M y MgCl₂ 3 mM:

	Ct (1.000 copias / PCR)		
	37°C	4°C	-20°C
D0	29,2 ± 0,2	29,2 ± 0,2	29,2 ± 0,2
D4	29,2 ± 0,3	NT	NT
D7	27,4 ± 0,4	NT	NT
D14	29,4 ± 0,3	NT	NT
D21	28,8 ± 0,1	NT	NT
D28	29,0 ± 0,3	NT	NT
6 meses	NT	28,8 ± 0,3	31,3 ± 0,6
12 meses	NT	27,97 ± 0,2	29,2 ± 0,7
	Ct (10 copias / PCR)		
	37°C	4°C	-20°C
D0	36,4 ± 0,4	36,4 ± 0,4	36,4 ± 0,4
D4	37,6 ± 1,1	NT	NT
D7	35,2 ± 0,8	NT	NT
D14	40,7 ± 1	NT	NT
D21	39,5 ± 2,4	NT	NT
D28	> 50	NT	NT
6 meses	NT	35,6 ± 0,7	38,9 ± 0,7
12 meses	NT	38,25 ± 1,8	37,1 ± 1,1

Como puede observarse, los polioles presentados en este ejemplo hacen posible estabilizar todas las mezclas de reacción para PCR en tiempo real durante más de 10 meses a 4°C o -20°C.

Ejemplo 2:

Este ejemplo demuestra el efecto estabilizante de glicerol y de PVP-10 sobre mezclas para PCR en tiempo real.

Se preparan cuatro composiciones concentradas para PCR en tiempo real. Cada composición ("mezcla") contiene tampón 1X (Quiagen), 5 mM de MgCl₂, 5 µM de cada cebador (Eurobio Laboratoires), 2,5 mM de cada dNTP (Eurobio Laboratoires), 2 µM de sonda de baliza molecular marcada con Fam-Dabcyl (Eurogentec), 4 µM de sonda de baliza molecular marcada con Tamra-Dabcyl (Eurogentec), 2 µM de sonda de baliza molecular marcada con Atto-590-Dabcyl (Eurogentec), 2 U de polimerasa Taq (Qiagen) y

- ni PVP ni un poliol: mezcla 6,
- PVP-10 0,3 M (sigma): mezcla 7,
- 6,5 M de glicerol (Prolabo): mezcla 8
- 6,5 M de glicerol y 0,3 M de PVP-10: mezcla 9
- 5 M de glicerol y 0,3 M de PVP-10: mezcla 10.

Se amplifican y detectan simultáneamente tres secuencias. Las secuencias 1 y 2 pertenecen al genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, y la secuencia 3 es un estándar interno.

La secuencia 1 es detectada por la sonda Fam, la secuencia 2 es detectada por la sonda Tamra y la secuencia 3 es detectada por la sonda Atto-590.

Se toman fracciones alícuotas de 45 µl de cada composición (mezcla) y se conservan a 37°C hasta la fecha del análisis.

Se prepara una disolución diluyente. Contiene tampón 1,15X y 5,75 mM de MgCl₂. Se toman fracciones alícuotas de 315 µl y se conservan a 37°C hasta la fecha del análisis.

El día del análisis se añade una fracción alícuota del diluyente a una fracción alícuota de la mezcla de PCR. Después de mezclar, se dispensan 40 µl de la disolución en los tubos de PCR.

Se añaden 10 µl de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* que contienen 1 copia/µl de la secuencia 2 a dos tubos diferentes de PCR, se añaden 10 µl de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* que contiene 100 copias/µl de la secuencia 2 a dos tubos diferentes, y se añaden 10 µl de agua a dos tubos diferentes.

Las reacciones de PCR se llevan a cabo el día 0, el día 3 ± 1, el día 6 ó 7, el día 13 y el día 21.

Las reacciones de PCR se llevan a cabo en el iQ icycler (Bio-Rad). Se llevan a cabo 50 ciclos consistentes en 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 59°C y 30 segundos a 72°C, después de una etapa inicial de 15 minutos a 95°C con objeto de activar la polimerasa “de inicio en caliente”.

Los análisis se llevan a cabo mediante el programa informático del iQ icycler.

Los valores de Ct para cada reacción de PCR correspondiente a la secuencia 1 (sonda Fam-DabcyI) se determinan después del posicionamiento manual de la línea base entre los ciclos 4 y 23 y el posicionamiento manual del umbral a un valor constante de 35 RFU.

Los valores de Ct para cada reacción de PCR correspondiente a la secuencia 2 (sonda Tamra-DabcyI) se determinan después del posicionamiento manual de la línea base entre los ciclos 4 y 30 y el posicionamiento manual del umbral a un valor constante de 20 RFU.

Los valores de Ct para cada reacción de PCR correspondiente a la secuencia 3 (sonda Atto-590-DabcyI) se determinan después del posicionamiento manual de la línea base entre los ciclos 4 y 30 y el posicionamiento manual del umbral a un valor constante de 10 RFU.

Las medias de los valores de Ct para los duplicados obtenidos tras la amplificación de 10 copias/PCR y 1.000 copias/PCR con las mezclas (mezclas 6 a 9) incubadas a 37°C se muestran en la Figura 2.

Adicionalmente, experimentos similares realizados con la mezcla 10 incubada a 37°C y 4°C se presentan en las siguientes Tabla 5 para la secuencia 1, Tabla 6 para la secuencia 2, y Tabla 7 para la secuencia 3.

Tabla 5: valores de Ct obtenidos a partir de la amplificación de la secuencia de ADN 1 (sonda Fam-DabcyI), tras varios tiempos de incubación, a 37°C y 4°C, de la mezcla de PCR 10 que contiene glicerol 5 M + PVP-10 0,3 M:

	Ct ($1,6 \cdot 10^2$ copias / PCR)		Ct ($1,6 \cdot 10^4$ copias / PCR)	
	37°C	4°C	37°C	4°C
D0	35,4	35,4	28,0	28,0
D7	35,8	NT	25,9	NT
D14	35,9	NT	25,7	NT
D21	38,4	NT	26,1	NT
D28	43,9	NT	26,0	NT
6 meses	NT	39,5	NT	28,2
12 meses	NT	41,8	NT	31,2

Tabla 6: valores de Ct obtenidos a partir de la amplificación de la secuencia de ADN 2 (sonda Tamra-Dabcyl), tras varios tiempos de incubación, a 37°C y 4°C, de la mezcla de PCR 10 que contiene glicerol 5 M + PVP-10 0,3 M:

	Ct (10 copias / PCR)		Ct (10 ³ copias / PCR)	
	37°C	4°C	37°C	4°C
D0	46,0	46,0	38,2	38,2
D7	44,4	NT	35,7	NT
D14	43,7	NT	35,8	NT
D21	44,4	NT	36,3	NT
D28	> 50	NT	37,4	NT
6 meses	NT	> 50	NT	39,6
12 meses	NT	> 50	NT	38,3

Tabla 7: valores de Ct obtenidos a partir de la amplificación de la secuencia de ADN 3 (sonda Atto-590-Dabcyl), tras varios tiempos de incubación, a 37°C y 4°C, de la mezcla de PCR 10 que contiene glicerol 5 M + PVP-10 0,3 M:

	Ct (10 ⁴ copias / PCR)	
	37°C	4°C
D0	35,11	35,11
D7	34,94	NT
D14	35,51	NT
D21	36,08	NT
D28	38,91	NT
6 meses	NT	37,2
12 meses	NT	36,8

El glicerol o la PVP-10 hacen posible estabilizar una mezcla para PCR en tiempo real que contiene diversas sondas fluorescentes.

La combinación de PVP-10 y glicerol hace posible incrementar esta estabilidad.

Ejemplo 3:

Este ejemplo compara la estabilidad de la misma composición conservada a tres temperaturas diferentes: 37°C, 20°C y 4°C.

Se prepara una composición para PCR en tiempo real. Contiene tampón 2X (Qiagen), 3 mM de MgCl₂, 6 µM de cada cebador (Eurogentec), 2 mM de dATP, 2 mM de dGTP, 2 mM de dCTP, 2 mM de dUTP, 1 mM de dTTP (Amersham), 6 µM de sonda de baliza molecular marcada con Fam-Dabcyl (Eurogentec), 2,5 U de polimerasa Taq (Qiagen), 0,25 U de UDG (Invitrogen), 6,5 M de glicerol (Prolabo) y 300 mM de PVP-10 (Sigma).

Se toman fracciones alícuotas de 45 µl de cada composición (mezcla) y se conservan a 37°C, a 20°C o a 4°C hasta la fecha del análisis.

Se prepara una disolución diluyente. Contiene tampón 2X y 14,25 mM de MgCl₂. Se toman fracciones alícuotas de 180 µl y se conservan a 37°C, a 20°C o a 4°C hasta la fecha del análisis.

El día del análisis se añade una fracción alícuota del diluyente a una fracción alícuota de la mezcla de PCR. Después de mezclar, se dispensan 25 µl de la disolución en los tubos de PCR.

Se añaden 25 µl de ADN del virus de la hepatitis B que contienen 1 copia/µl a dos tubos diferentes de PCR, se añaden 25 µl de ADN del virus de la hepatitis B que contienen 10 copias/µl a dos tubos diferentes, se añaden 25 µl de ADN del virus de la hepatitis B que contienen 100 copias/µl a dos tubos diferentes, y se añaden 25 µl de agua

a dos tubos diferentes.

Las reacciones de PCR se llevan a cabo el día 0, el día 21, el día 35, y después cada mes entre los meses 2 y 6, a los 9 meses y a los 12 meses.

5

Las reacciones de PCR se llevan a cabo en el iQ icycler (Bio-Rad). Se llevan a cabo 50 ciclos consistentes en 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 72°C, después de una etapa inicial de 10 minutos a 37°C con objeto de activar la UDG y de 15 minutos a 95°C con objeto de activar la polimerasa “de inicio en caliente”.

Los análisis se llevan a cabo mediante el programa informático del iQ icycler. Los valores de Ct para cada reacción de PCR se determinan después del posicionamiento manual de la línea base entre los ciclos 2 y 32 y el posicionamiento manual del umbral a un valor constante de 50 RFU.

10

Las medias de los valores de Ct para los duplicados obtenidos tras la amplificación de 25 copias/PCR, 250 copias/PCR y 2.500 copias/PCR de la composición conservada a 37°C, 20°C y 44°C se muestran en la Tabla 8, que sigue:

Tabla 8: comparación de los valores de Ct obtenidos para la amplificación de 25 copias de ADN, 250 copias de ADN y 2.500 copias de ADN tras varios tiempos de conservación de la composición, a 37°C, a 20°C y a 4°C.

	Ct (25 copias / PCR)			Ct (250 copias / PCR)			Ct (2.500 copias / PCR)		
	37°C	20°C	4°C	37°C	20°C	4°C	37°C	20°C	4°C
D0	41,0 + 0,7	41,0 + 0,7	41,0 + 0,7	37,4 + 0,0	37,4 + 0,0	37,4 + 0,0	34,7 + 0,0	34,7 + 0,0	34,7 + 0,0
021	41,1 + 3,7	39,7 + 0,0	40,3 + 0,2	4,9 + 0,0	36,0 + 0,8	37,0 + 0,1	32,0 + 0,0	33,0 + 0,6	33,9 + 0,1
035	48,4 + 1,61	40,0 + 0,2	41,2 + 0,3	34,6 + 0,6	35,0 + 0,7	36,3 + 0,0	30,4 + 0,3	32,7 + 0,0	33,4 + 0,3
2 meses	> 50	41,2 + 44	42,1 + 0,7	> 50	36,5 + 0,0	37,2 + 0,4	45 + 1,2	33,4 + 0,1	34,5 + 0,6
3 meses	NT	38,4 + 0,2	40,9 + 0,2	NT	35,0 + 0,2	36,8 + 0,3	>50	32,4 + 0,1	33,3 + 0,1
4 meses	NT	38,3 + 0,1	39,7 + 2,9	NT	35,4 + 0,5	36,8 + 0,0	NT	32,1 + 0,1	33,4 + 0,3
5 meses	NT	NT	39,8 + 0,1	NT	NT	37,3 + 6,5	NT	NT	34,5 + 0,5
6 meses	NT	40,6 + 0,7	40,0 + 0,6	NT	38,4 + 0,4	37,0 + 0,4	NT	34,6 + 0,2	34 + 0,4
9 meses	NT	> 50	40,2 + 0,5	NT	> 50	36,8 + 0,2	NT	> 50	33,9 + 0,2
12 meses	NT	NT	42 + 0,7	NT	NT	37,5 +	0,4 NT	NT	34,9 + 0,5

Una composición que es estable durante 21 días a 37°C es estable durante al menos 6 meses a temperatura ambiente, y al menos 12 meses a 4°C.

En conclusión, todos los resultados presentados demuestran una estabilidad de las composiciones de más de 6 meses a 20°C, y mayor de 1 año a 4°C, y una estabilidad más larga a -20°C.

BIBLIOGRAFÍA

- 5
 - Cayouette M, Sucharzuk A, Moores J, Tyagi S y Kramer FR (1999) Using molecular beacons to monitor PCR product formation. Strategies Newsl. 12: 85-88.
 - Fahy y col. (1991) PCR Meth. Appl., 1, 25-33
 - Kwoh y col (1989) PNAS, 86, 1173-1177
 - Saiki y col., (1988), Science, 239: 487
- 10
 - Tyagi S y Kramer FR (1996) Nature Biotechnol., 16, 303-308
 - Walker y col. (1992) P.N.A.S, 89, 392-396

REIVINDICACIONES

1. Una composición líquida concentrada y tamponada para amplificar ácidos nucleicos, que comprende al menos un dNTP, al menos una enzima requerida para la amplificación, al menos un cebador oligonucleotídico, al menos una sonda nucleotídica fluorescente y polivinilpirrolidona (PVP).
- 5 2. Una composición según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos un poliol.
3. Una composición según la reivindicación 2, en la que el poliol se selecciona de entre glicerol, sorbitol, inositol y pentaeritritol.
4. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente una sal de magnesio o una sal de manganeso.
- 10 5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para amplificar ácidos nucleicos mediante PCR, que comprende dATP, dCTP, dGTP, y uno de entre dTTP o dUTP, y también al menos una enzima requerida para la PCR, al menos dos cebadores oligonucleotídicos y al menos una sonda nucleotídica fluorescente.
- 15 6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para amplificar ácidos nucleicos mediante RT-PCR, que comprende dATP, dCTP, dGTP, y uno de entre dTTP o dUTP, y también al menos una enzima requerida para la RT-PCR, al menos dos cebadores oligonucleotídicos y al menos una sonda nucleotídica fluorescente.
7. Una composición según la reivindicación 3, que comprende al menos 5 M de glicerol.
8. Una composición según la reivindicación 3, que comprende al menos 1 M de sorbitol.
9. Una composición según la reivindicación 3, que comprende al menos 500 mM de inositol.
- 20 10. Una composición según la reivindicación 3, que comprende al menos 250 mM de pentaeritritol.
11. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la PVP es PVP-10.
12. Una composición según la reivindicación 11, que comprende al menos 30 mM de PVP-10.
13. Un procedimiento para preparar una mezcla de reacción completa para amplificar ácidos nucleicos, que comprende:
 - 25 (i) diluir una composición concentrada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en una disolución salina tamponada adecuada para amplificar ácidos nucleicos;
 - (ii) poner en contacto una muestra de ácidos nucleicos que se va a amplificar con el volumen deseado de la composición diluida en la etapa (i).
- 30 14. Un procedimiento para preparar una mezcla de reacción completa para amplificar ácidos nucleicos, que comprende:
 - (i) mezclar una muestra de ácidos nucleicos que se va a amplificar en una disolución salina tamponada adecuada para amplificar ácidos nucleicos;
 - (ii) añadir la mezcla obtenida en la etapa (i) a un volumen deseado de la composición concentrada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
- 35 15. Un procedimiento para amplificar ácidos nucleicos, que comprende las etapas (i) y (ii) según se define en la reivindicación 13 ó 14, y (iii) el comienzo de la reacción para amplificar los ácidos nucleicos presentes en la muestra, cuya amplificación es detectable mediante el marcaje fluorescente portado por la sonda.
16. Un procedimiento de amplificación según la reivindicación 15, que es una RT-PCR en tiempo real.
17. Un procedimiento de amplificación según la reivindicación 15, que es una PCR en tiempo real.
- 40 18. Un kit para amplificar y/o detectar ácidos nucleicos, que comprende al menos un recipiente que contiene la composición concentrada según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
19. Un kit para amplificar y/o detectar ácidos nucleicos según la reivindicación 18, que comprende un primer recipiente que contiene la composición concentrada según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y

que comprende adicionalmente un segundo recipiente que contiene una disolución salina tamponada adecuada para amplificar ácidos nucleicos.

- 5 20. Un kit según la reivindicación 19, en el que la disolución salina tamponada contiene al menos uno de los ingredientes elegidos de entre TRIS a una concentración de al menos 8 mM, una sal potásica o una sal sódica a una concentración de al menos 8 mM, una sal de amonio a una concentración de al menos 5 mM, y una sal de magnesio o una sal de manganeso a una concentración de al menos 0,8 mM, usándose los ingredientes individualmente o como una mezcla.
21. El uso de polivinilpirrolidona (PVP), y opcionalmente de un poliol, para estabilizar tanto las enzimas como las sondas nucleotídicas fluorescentes en una composición líquida.
- 10 22. El uso según la reivindicación 21, en el que la PVP, y opcionalmente el poliol, también estabiliza(n) los dNTPs.
23. El uso según la reivindicación 21 ó 22, en el que la composición líquida es una composición concentrada y tamponada para amplificar ácidos nucleicos, que comprende al menos un dNTP, al menos una enzima requerida para la amplificación, al menos un cebador oligonucleotídico, y al menos una sonda nucleotídica fluorescente.
- 15 24. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que el poliol se elige de entre glicerol, sorbitol, inositol y pentaeritritol.
25. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que la PVP es PVP-10.

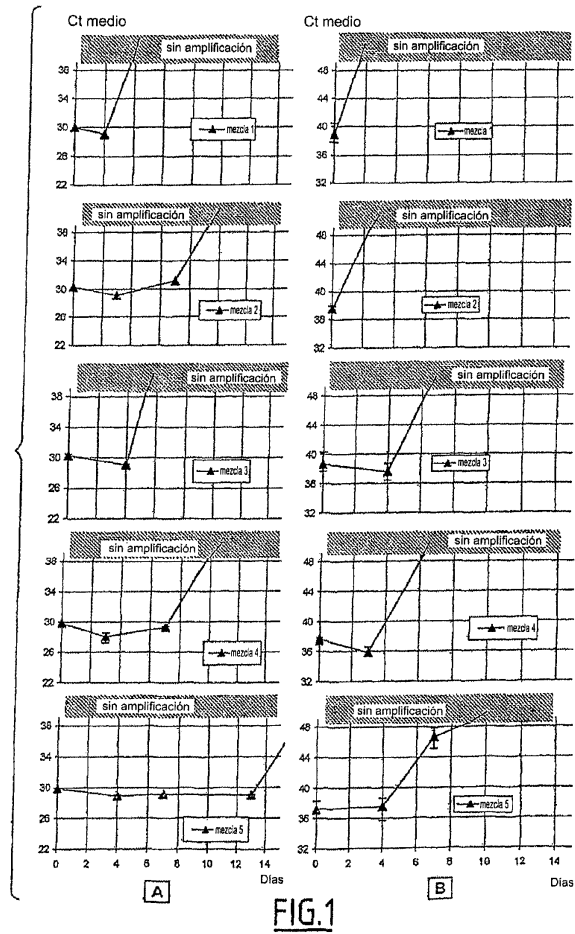


FIG.1

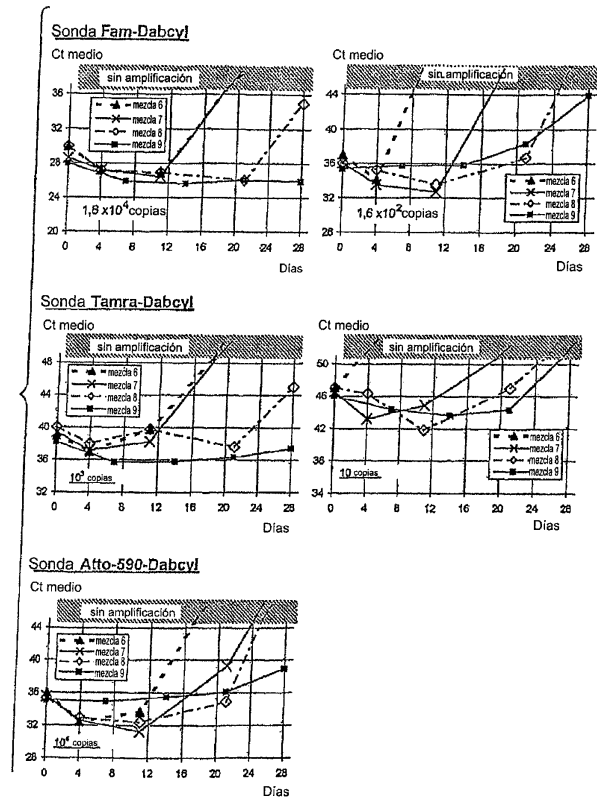


FIG.2

DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

5 **Documentos de patente indicados en la descripción**

- EP 833667 A [0006]
- EP 455744 A [0006] [0007]
- EP 200362 A [0018]
- EP 201184 A [0018]
- EP 329822 A [0018]
- US 5399491 A [0018]
- EP 0320308 A [0018]
- US 6027923 A [0018]
- EP 592035 A [0024]
- US 5677152 A [0024]
- US 5773258 A [0024]

10 **Literatura de patentes no citadas en la descripción**

- *Nat. Genet.*, July 1998, vol. 19 (3), 225-232 [0018]
- Cayouette M ; Sucharzuk A ; Moores J ; Tyagi S ; Kramer FR. Using molecular beacons to monitor PCR product formation. *Strategies Newsl.*, 1999, vol. 12, 85-88 [0103]
- Fahy et al. *PCR Meth. Appl.*, 1991, vol. 1, 25-33 [0103]
- Kwoh et al. *PNAS*, 1989, vol. 86, 1173-1177 [0103]
- Saiki et al. *Science*, 1988, vol. 239, 487 [0103]
- Tyagi S ; Kramer FR. *Nature Biotechnol.*, 1996, vol. 16, 303-308 [0103]
- Walker et al. *P.N.A.S.*, 1992, vol. 89, 392-396 [0103]