

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 526**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2017 E 22165594 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2024 EP 4053291**

54 Título: **Componentes y procedimientos de amplificación isotérmica**

30 Prioridad:

04.04.2016 US 201615090405

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

20.11.2024

73 Titular/es:

**NAT DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
11585 Sorrento Valley Rd. Ste. 107
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**MILLER, ANDREW P. y
ZHANG, HONGHUA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

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

ES 2 988 526 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

Componentes y procedimientos de amplificación isotérmica

5 **Campo**

La presente invención se define por las reivindicaciones. La tecnología se refiere en parte a métodos y composiciones para la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos.

10 **Antecedentes**

Los diagnósticos basados en ácido nucleico pueden ser útiles para la detección rápida de una infección, enfermedad y/o variaciones genéticas. Por ejemplo, la identificación de ácido nucleico bacteriano o vírico en una muestra puede ser útil para diagnosticar un tipo particular de infección. Otros ejemplos incluyen la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido para el manejo de enfermedades o investigación forense, e identificación de variaciones genéticas indicativas de productos alimenticios modificados genéticamente. A menudo, los ensayos de diagnóstico basados en ácidos nucleicos requieren la amplificación de una porción específica de ácido nucleico en una muestra. Una técnica común para la amplificación de ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica requiere normalmente un ciclado de temperaturas (es decir, termociclado) para avanzar a través de las etapas de desnaturalización (es decir, separación de las cadenas en el complejo de ADN bicatenario (ADNbc)), apareamiento de cebadores oligonucleotídicos (cadenas cortas de secuencias de ADN complementarias) y extensión del cebador a lo largo de una diana complementaria por una polimerasa. Tal termociclado puede ser un proceso que lleva mucho tiempo que generalmente requiere maquinaria especializada.

25 Se han propuesto previamente diversas estrategias dirigidas a abordar estos problemas. El documento de Tan E *et al.*, *Biochemistry*. 23 de septiembre de 2008; 47(38):9987-99 describió una reacción de amplificación exponencial (EXPAR) en la que oligonucleótidos cortos denominados desencadenantes se amplifican en condiciones isotérmicas por medio de actividades de polimerasa termoestable y endonucleasa de mellado.

30 Por lo tanto, existe la necesidad de métodos de amplificación de ácido nucleico más rápidos que puedan realizarse sin termociclado. Tales métodos pueden ser útiles, por ejemplo, para pruebas *in situ* y diagnósticos en el punto de atención.

35 **Sumario**

La presente invención se define por las reivindicaciones. En una primera realización, la invención se refiere a un método para determinar la presencia, la ausencia o la cantidad de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo el método: a) amplificar una secuencia de ácido nucleico diana que comprende una primera cadena y una segunda cadena complementarias entre sí en una condición de amplificación isotérmica, en el que la amplificación comprende poner en contacto un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico diana con: i) un primer cebador y un segundo cebador, en el que: el primer cebador es capaz de hibridarse con una secuencia de la primera cadena de la secuencia de ácido nucleico diana, y el segundo cebador es capaz de hibridarse con una secuencia de la segunda cadena de la secuencia de ácido nucleico diana; y ii) una enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila, generando de ese modo un producto de amplificación de ácido nucleico a niveles detectables en el plazo de 15 minutos, en el que el producto de amplificación de ácido nucleico comprende: 1) la secuencia del primer cebador o el complemento inverso de la misma, 2) la secuencia del segundo cebador o el complemento inverso de la misma, y 3) una secuencia espaciadora flanqueada por (1) la secuencia del primer cebador o el complemento inverso de la misma y (2) la secuencia del segundo cebador o el complemento inverso de la misma, en el que la secuencia espaciadora tiene de 1 a 10 bases de longitud; y en el que la amplificación no comprende usar ninguna enzima distinta de la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila, y b) detectar el producto de amplificación de ácido nucleico.

55 En una realización preferida del método, el ácido nucleico es a) un ácido nucleico genómico, un ácido nucleico plasmídico, un ácido nucleico mitocondrial, un ácido nucleico celular o un ácido nucleico extracelular; b) un ácido nucleico bacteriano o un ácido nucleico vírico; c) un ADN bicatenario; o d) un producto de reacción de transcripción inversa, opcionalmente un producto de reacción de transcripción inversa generado a partir de un ARN celular, un ARNm, un microARN, un ARN bacteriano o un ARN viral.

60 En otra realización preferida, el método comprende además generar el ácido nucleico mediante una reacción de transcripción inversa antes de la etapa de amplificación a).

65 En una segunda realización, la invención se refiere a un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo el método: a) poner en contacto una muestra en una muestra con una transcriptasa inversa y una enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila para generar un ADN bicatenario (ADNbc), en el que el ADNbc comprende una secuencia de ácido nucleico diana, y en el que la secuencia de ácido nucleico diana comprende una primera cadena y una segunda cadena complementarias entre sí; b) amplificar la

5 secuencia de ácido nucleico diana en una condición de amplificación isotérmica, en el que la amplificación comprende poner en contacto el ADNbc con: i) un primer cebador y un segundo cebador, en el que el primer cebador es capaz de hibridarse con una secuencia de la primera cadena de la secuencia de ácido nucleico diana, y el segundo cebador es capaz de hibridarse con una secuencia de la segunda cadena de la secuencia de ácido nucleico diana; y ii) la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila, generando de ese modo un producto de amplificación de ácido nucleico a niveles detectables en el plazo de 15 minutos, en el que el producto de amplificación de ácido nucleico comprende: 1) la secuencia del primer cebador, o el complemento inverso de la misma, 2) la secuencia del segundo cebador, o el complemento inverso de la misma, y 3) una secuencia espaciadora flanqueada por 1) la secuencia del primer cebador o el complemento inverso de la misma y 2) la secuencia del segundo cebador o el complemento inverso de la misma, en el que la secuencia espaciadora tiene de 1 a 10 bases de longitud; y c) detectar el producto de amplificación de ácido nucleico, en el que el método no comprende usar ninguna enzima distinta de la transcriptasa inversa y la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila.

15 En una realización preferida del método, el ARN de muestra es un ARN celular, un ARNm o un microARN, un ARN bacteriano, o un ARN viral.

20 En otra realización preferida del método, la detección del producto de amplificación de ácido nucleico comprende además determinar la cantidad del ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico diana, o la cantidad del ADNbc que comprende la secuencia de ácido nucleico diana, en la muestra.

En otra realización preferida, el método no comprende poner en contacto el ácido nucleico o el ADNbc con una proteína de unión a ADN monocatenario antes de, o durante, la etapa de amplificación.

25 En otra realización preferida del método, la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico bacteriano o una secuencia de ácido nucleico vírico.

30 En otra realización preferida del método, (1) la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila tiene una actividad transcriptasa inversa, y/o actividad exonucleasa baja o nula; o (2) la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o un fragmento funcional de la misma, y opcionalmente la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila es una polimerasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

35 En otra realización preferida del método, la muestra comprende ARN de procariotas o eucariotas, y opcionalmente la muestra comprende ARN de un virus o una bacteria.

40 En otra realización preferida del método, amplificar la secuencia de ácido nucleico diana se realiza a una temperatura constante entre aproximadamente 55 grados Celsius a aproximadamente 75 grados Celsius, y opcionalmente a una temperatura constante de aproximadamente 65 grados Celsius.

En otra realización preferida del método de la invención, el método comprende:

45 (i) el primer cebador, el segundo cebador, o ambos (i-a) tiene aproximadamente de 8 a 16 bases de longitud; (i-b) comprende una o más bases de ADN, bases de ADN modificadas, o una combinación de las mismas; o ambas;

(ii) el producto de amplificación de ácido nucleico tiene aproximadamente de 20 a 40 pares de bases de longitud; y/o

50 (iii) la secuencia espaciadora comprende una parte de la secuencia de ácido nucleico diana, y opcionalmente la secuencia espaciadora tiene de 1 a 5 bases de longitud.

En otra realización preferida del método, detectar el producto de amplificación de ácido nucleico comprende:

55 (a) poner en contacto el producto de amplificación de ácido nucleico con un oligonucleótido de generación de señal capaz de hibridarse con el producto de amplificación, en el que el oligonucleótido de generación de señal comprende un fluoróforo, un desactivador, o ambos; o

(b) detectar una señal fluorescente, y opcionalmente la señal fluorescente es de una baliza molecular.

60 En otra realización preferida del método, el método se realiza en un único recipiente de reacción.

En una realización preferida del método de la invención, la muestra comprende ARN y se pone en contacto con la transcriptasa inversa, la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila, y los cebadores primero y segundo simultáneamente.

65 Ciertas implementaciones se describen adicionalmente en la descripción, los ejemplos, las reivindicaciones y los dibujos siguientes.

Breve descripción de los dibujos

5 Los dibujos ilustran ciertas realizaciones de la tecnología y no son limitantes. Para mayor claridad y facilidad de ilustración, los dibujos no están hechos a escala y, en algunos casos, diversos aspectos pueden mostrarse exagerados o agrandados para facilitar la comprensión de realizaciones particulares.

10 La figura 1 muestra la detección en tiempo real de reacciones de amplificación de ADN genómico de clamidia realizadas por duplicado con tampón dH₂O o Tris-EDTA (TE) usado como control sin diana (NTC; control negativo).

15 La figura 2 muestra la detección por espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) de productos de ensayo de ADN genómico de clamidia.

20 La figura 3 muestra el límite de detección (*limit of detection*, LOD) de ADN genómico de clamidia por detección de baliza molecular de punto final.

La figura 4 muestra la detección en tiempo real de ADN genómico de clamidia por baliza molecular.

25 La figura 5 muestra un esquema de una reacción de amplificación isotérmica descrita en el presente documento.

Descripción detallada

25 En el presente documento, se proporcionan métodos y composiciones para amplificar ácido nucleico. Los métodos tradicionales de amplificación de ácidos nucleicos requieren normalmente un proceso de termociclado, desnaturalización de ácido nucleico, proteínas (por ejemplo, enzimas) que promueven el desenrollado de las cadenas, separación de las cadenas y/o intercambio de cadenas (por ejemplo, helicasas, recombinasas), y/o agentes de endonucleasa (por ejemplo, enzimas de restricción, enzimas de mellado), y a menudo requieren un tiempo de reacción mínimo de 20 a 30 minutos. Los métodos de amplificación de ácido nucleico proporcionados en el presente documento pueden realizarse sin termociclado, sin desnaturalización de ácido nucleico, sin proteínas añadidas (por ejemplo, enzimas) para promover el desenrollado de las cadenas, separación de las cadenas y/o intercambio de cadenas, sin agentes de endonucleasa y en el plazo de un tiempo de reacción de 10 minutos.

Ácido nucleico, sujetos, muestras y procesamiento de ácido nucleico

35 En el presente documento se proporcionan métodos y composiciones para amplificar ácido nucleico. Los términos "ácido nucleico" y "molécula de ácido nucleico" pueden usarse indistintamente en el presente documento. Los términos se refieren a ácidos nucleicos de cualquier composición, tales como ADN (por ejemplo, ADN complementario (ADNc), ADN genómico (ADNg) y similares), ARN (por ejemplo, ARN mensajero (ARNm), ARN inhibidor corto (ARNic), ARN ribosómico (ARNr), ARNt, microARN y/o análogos de ADN o ARN (por ejemplo, que contienen análogos de bases, análogos de azúcar y/o una cadena principal no nativa y similares), híbridos de ARN/ADN y ácidos nucleicos de poliamida (PNA), todos los cuales pueden estar en forma monocatenaria o bicatenaria y, a menos que se limite de otra forma, pueden abarcar análogos conocidos de nucleótidos naturales que pueden funcionar de manera similar a nucleótidos que se producen de manera natural. Un ácido nucleico puede ser, o puede ser a partir de, un plásmido, fago, secuencia de replicación autónoma (ARS), centrómero, cromosoma artificial, cromosoma u otro ácido nucleico capaz de replicarse o que se replica *in vitro* o en una célula huésped, una célula, un núcleo celular, una mitocondria o citoplasma de una célula en ciertos casos. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos que se producen de manera natural. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas de manera conservativa de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, pueden lograrse sustituciones de codones degenerados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye por residuos de base mixta y/o desoxiinosina. El término ácido nucleico puede usarse indistintamente con locus (lugar), gen, ADNc y ARNm codificado por un gen. El término también puede incluir, como equivalentes, derivados, variantes y análogos de ARN o ADN sintetizados a partir de análogos de nucleótidos, polinucleótidos monocatenarios ("sentido" o "antisentido", cadena "positiva" o cadena "negativa", marco de lectura "directo" o marco de lectura "inverso", cadena "directa" o cadena "inversa") y bicatenarios. El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; y generalmente incluye regiones que preceden y siguen a la región codificante (líder y remolque) implicadas en la transcripción/traducción del producto génico y la regulación de la transcripción/traducción, así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones). Un nucleótido o base generalmente se refiere a las unidades moleculares de purina y pirimidina de ácido nucleico (por ejemplo, adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C)). Para ARN, la base timina se reemplaza por uracilo. La longitud o el tamaño del ácido nucleico puede expresarse como un número de bases.

65

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, se amplifican una o más dianas de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos diana pueden denominarse secuencias diana, polinucleótidos diana y/o secuencias polinucleotídicas diana, y pueden incluir moléculas de ácido nucleico bicatenarias y monocatenarias. El ácido nucleico diana puede ser, por ejemplo, ADN o ARN. Cuando el ácido nucleico diana es una molécula de ARN, la molécula puede ser, por ejemplo, bicatenaria, monocatenaria, o la molécula de ARN puede comprender una secuencia diana que es monocatenaria. Cuando el ácido nucleico diana es bicatenario, el ácido nucleico diana generalmente incluye una primera cadena y una segunda cadena. Una primera cadena y una segunda cadena pueden denominarse cadena directa y cadena inversa y generalmente son complementarias entre sí. Cuando el ácido nucleico diana es monocatenario, puede generarse una cadena complementaria, por ejemplo, por polimerización y/o transcripción inversa, haciendo que el ácido nucleico diana sea bicatenario y que tenga una primera/cadena directa y una segunda/cadena inversa.

Una secuencia diana puede referirse a o bien la cadena sentido o bien antisentido de una secuencia de ácido nucleico, y también puede referirse a secuencias que existen en ácidos nucleicos diana, copias amplificadas o productos de amplificación, de la secuencia diana original. Una secuencia diana puede ser una subsecuencia dentro de un polinucleótido más grande. Por ejemplo, una secuencia diana puede ser una secuencia corta (por ejemplo, de 20 a 50 bases) dentro de un fragmento de ácido nucleico, un cromosoma, un plásmido, que se selecciona como diana para la amplificación. En algunos casos, una secuencia diana puede referirse a una secuencia en un ácido nucleico diana que es complementaria a un oligonucleótido (por ejemplo, cebador) usado para amplificar un ácido nucleico. Por lo tanto, una secuencia diana puede referirse a toda la secuencia seleccionada como diana para la amplificación o puede referirse a una subsecuencia en el ácido nucleico diana donde se une un oligonucleótido. Un producto de amplificación puede ser una molécula más grande que comprende la secuencia diana, así como al menos otra secuencia, u otros nucleótidos. En algunos casos, un producto de amplificación tiene aproximadamente la misma longitud que la secuencia diana. En algunos casos, un producto de amplificación tiene exactamente la misma longitud que la secuencia diana. En algunos casos, un producto de amplificación comprende la secuencia diana. En algunos casos, un producto de amplificación consiste en la secuencia diana.

La longitud de la secuencia diana, y/o la concentración (porcentaje) de guanosina-citosina (GC), puede depender, en parte, de la temperatura a la que se ejecuta una reacción de amplificación, y esta temperatura puede depender, en parte, de la estabilidad de la(s) polimerasa(s) usada(s) en la reacción. Pueden realizarse ensayos de muestra para determinar una longitud de secuencia diana y concentración de GC apropiadas para un conjunto de condiciones de reacción. Por ejemplo, cuando una polimerasa es estable hasta de 60 °C a 65 °C, entonces la secuencia diana puede tener, por ejemplo, de 19 a 50 nucleótidos de longitud, o, por ejemplo, de desde aproximadamente 40 a 50, de 20 a 45, de 20 a 40 o de 20 a 30 nucleótidos de longitud. La concentración de GC en estas condiciones puede ser, por ejemplo, menor del 60 %, menor del 55 %, menor del 50 % o menor del 45 %.

El ácido nucleico diana puede incluir, por ejemplo, ácido nucleico genómico, ácido nucleico plasmídico, ácido nucleico mitocondrial, ácido nucleico celular, ácido nucleico extracelular, ácido nucleico bacteriano y ácido nucleico vírico. El ácido nucleico diana puede incluir ADN genómico, ADN cromosómico, ADN plasmídico, ADN mitocondrial, un gen, cualquier tipo de ARN celular, ARN mensajero, ARN bacteriano, ARN viral o un oligonucleótido sintético. El ácido nucleico genómico puede incluir cualquier ácido nucleico de cualquier genoma, por ejemplo, incluyendo genomas animales, vegetales, de insectos, víricos y bacterianos, incluyendo, por ejemplo, genomas presentes en esporas. El ácido nucleico diana genómico puede estar dentro de un locus genómico particular o una pluralidad de loci (lugares) genómicos. Un locus genómico puede incluir cualquiera o una combinación de ADN en marco de lectura abierto, ADN no transcrito, secuencias intrónicas, secuencias extrónicas, secuencias promotoras, secuencias potenciadoras, secuencias flanqueantes, o cualquier secuencia que se considera asociada con un locus genómico dado.

En algunos casos, una secuencia diana comprende uno o más elementos repetitivos (por ejemplo, secuencias de repetición múltiple, secuencias de repetición invertida, secuencias palindrómicas, repeticiones en tándem, microsatélites, minisatélites, y similares). En algunos casos, una secuencia diana está presente dentro de un ácido nucleico de muestra (por ejemplo, dentro de un fragmento de ácido nucleico, un cromosoma, un genoma, un plásmido) como elemento repetitivo (por ejemplo, una secuencia de repetición múltiple, una secuencia de repetición invertida, una secuencia palindrómica, una repetición en tándem, una repetición de microsatélite, una repetición de minisatélite y similares). Por ejemplo, una secuencia diana puede aparecer múltiples veces como un elemento repetitivo y una, algunas, o todas las apariciones de la secuencia diana dentro de un elemento repetitivo pueden amplificarse (por ejemplo, usando un único par de cebadores) usando los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, una secuencia diana está presente dentro de un ácido nucleico de muestra (por ejemplo, dentro de un fragmento de ácido nucleico, un cromosoma, un genoma, un plásmido) como duplicación y/o paralogos.

El ácido nucleico diana puede incluir microARN. MicroARN, miARN o ARN temporales pequeños (ARN_{tp}) son secuencias de ARN cortas (por ejemplo, de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud) y monocatenarias implicadas en la regulación génica. Los microARN pueden interferir con la traducción de los ARN mensajeros y son parcialmente complementarios a los ARN mensajeros. El ácido nucleico diana puede incluir precursores de microARN tales como transcrito primario (pri-miARN) y ARN con estructura de tallo-bucle de pre-miARN que se procesa adicionalmente para dar miARN. El ácido nucleico diana puede incluir ARN interferentes cortos (ARN_{ic}), que son moléculas de ARN cortas (por ejemplo, de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos de longitud) y al menos parcialmente

bicatenarias implicadas en la interferencia por ARN (por ejemplo, regulación por disminución de la replicación viral o expresión génica).

5 El ácido nucleico utilizado en los métodos descritos en el presente documento puede obtenerse de cualquier muestra o espécimen biológico adecuado, y a menudo se aísla de una muestra obtenida de un sujeto. Un sujeto puede ser cualquier organismo vivo o no vivo, incluyendo, pero sin limitarse a, un ser humano, un animal no humano, una planta, una bacteria, un hongo, un virus o un protista. Puede seleccionarse cualquier animal humano o no humano, incluyendo, pero sin limitarse a, mamífero, reptil, ave, anfibio, pez, ungulado, rumiante, bovino (por ejemplo, ganado bovino), equino (por ejemplo, caballo), caprino y ovino (por ejemplo, oveja, cabra), porcino (por ejemplo, cerdo), camélido (por ejemplo, camello, llama, alpaca), mono, simio (por ejemplo, gorila, chimpancé), úrsido (por ejemplo, oso), ave de corral, perro, gato, ratón, rata, pez, delfín, ballena y tiburón. Un sujeto puede ser un hombre o una mujer, y un sujeto puede tener cualquier edad (por ejemplo, un embrión, un feto, lactante, niño, adulto).

15 Una muestra o muestra de prueba puede ser cualquier espécimen que se aisle o se obtenga de un sujeto o parte del mismo. Ejemplos no limitantes de especímenes incluyen fluido o tejido de un sujeto, incluyendo, sin limitación, sangre o un producto sanguíneo (por ejemplo, suero, plasma, o similares), sangre de cordón umbilical, médula ósea, vellosidades coriónicas, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, líquido espinal, fluido de lavado (por ejemplo, broncoalveolar, gástrico, peritoneal, ductal, del oído, artroscópico), muestra de biopsia, muestra de celocentesis, células (por ejemplo, células sanguíneas) o partes de las mismas (por ejemplo, mitocondriales, núcleo, extractos, o similares), lavados del tracto reproductor femenino, orina, heces, esputo, saliva, moco nasal, fluido prostático, lavado, semen, fluido linfático, bilis, lágrimas, sudor, leche materna, fluido mamario, tejidos duros (por ejemplo, hígado, bazo, riñón, pulmón u ovario), similares o combinaciones de los mismos. El término sangre abarca sangre completa, producto sanguíneo o cualquier fracción de la sangre, tal como suero, plasma, capa leucocitaria, o similares como se definen convencionalmente. El plasma sanguíneo se refiere a la fracción de la sangre completa resultante de la centrifugación de sangre tratada con anticoagulantes. El suero sanguíneo se refiere a la porción acuosa del fluido que queda después de que una muestra de sangre se haya coagulado. Las muestras de fluido o tejido a menudo se recogen según protocolos estándar que generalmente siguen los hospitales o clínicas. Para la sangre, a menudo se recoge una cantidad apropiada de sangre periférica (por ejemplo, entre 3-40 mililitros) y puede almacenarse según procedimientos estándar antes o después de su preparación.

20 Una muestra o muestra de prueba puede incluir muestras que contienen esporas, virus, células, ácido nucleico de procariontas o eucariotas, o cualquier ácido nucleico libre. Por ejemplo, un método descrito en el presente documento puede usarse para detectar ácido nucleico en el exterior de esporas (por ejemplo, sin la necesidad de lisis). Puede aislarse una muestra de cualquier material sospechoso de contener una secuencia diana, tal como de un sujeto descrito anteriormente. En ciertos casos, una secuencia diana puede estar presente en el aire, planta, suelo u otros materiales sospechosos de contener organismos biológicos.

25 Puede derivarse ácido nucleico (por ejemplo, aislarse, extraerse, purificarse) de una o más fuentes por métodos conocidos en la técnica. Puede usarse cualquier método adecuado para aislar, extraer y/o purificar ácido nucleico a partir de una muestra biológica, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen métodos de preparación de ADN en la técnica, y diversos reactivos o kits disponibles comercialmente, tales como el kit de ácido nucleico circulante QIAamp de Qiagen, QiaAmp DNA Mini Kit o QiaAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), kit de aislamiento de ADN en sangre GenomicPrep™ (Promega, Madison, Wis.), kit de purificación de ADN genómico en sangre GFX™ (Amersham, Piscataway, N.J.), y similares o combinaciones de los mismos.

30 En algunos casos, se realiza un procedimiento de lisis celular. La lisis celular puede realizarse antes del inicio de una reacción de amplificación descrita en el presente documento (por ejemplo, para liberar ADN y/o ARN de las células para la amplificación). Los procedimientos y reactivos de lisis celular se conocen en la técnica y generalmente pueden realizarse por métodos químicos (por ejemplo, detergente, disoluciones hipotónicas, procedimientos enzimáticos, y similares, o una combinación de los mismos), físicos (por ejemplo, prensa francesa, sonicación, y similares) o de lisis electrolítica. Puede utilizarse cualquier procedimiento de lisis adecuado. Por ejemplo, los métodos químicos generalmente emplean agentes de lisis para romper las células y extraer ácidos nucleicos de las células, seguido de tratamiento con sales caotrópicas. En algunos casos, la lisis celular comprende el uso de detergentes (por ejemplo, iónicos, no iónicos, aniónicos, zwitteriónicos). En algunos casos, la lisis celular comprende el uso de detergentes iónicos (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (SDS), laurilsulfato de sodio (SLS), desoxicolato, colato, sarcosilo). Métodos físicos tales como congelación/descongelación seguido de trituración, el uso de prensas de células y similares también pueden ser útiles. También pueden usarse procedimientos de lisis con alto contenido de sal. Por ejemplo, puede utilizarse un procedimiento de lisis alcalina. Este último procedimiento incorpora tradicionalmente el uso de disoluciones de fenol-cloroformo, y puede utilizarse un procedimiento alternativo sin fenol-cloroformo que implica tres disoluciones. En estos últimos procedimientos, una disolución puede contener Tris 15 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM y Rnasa A 100 µg/ml; una segunda disolución puede contener NaOH 0,2 N y SDS al 1 %; y una tercera disolución puede contener KOAc 3 M, pH 5,5, por ejemplo. En algunos casos, se usa un tampón de lisis celular junto con los métodos y componentes descritos en el presente documento.

35 Puede proporcionarse ácido nucleico para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento sin procesar la(s) muestra(s) que contiene(n) el ácido nucleico, en ciertos casos. Por ejemplo, en algunos casos, se proporciona

ácido nucleico para llevar a cabo los métodos de amplificación descritos en el presente documento sin purificación previa de ácido nucleico. En algunos casos, una secuencia diana se amplifica directamente de una muestra (por ejemplo, sin realizar ninguna etapa de extracción, aislamiento, purificación y/o purificación parcial de ácido nucleico). En algunos casos, se proporciona ácido nucleico para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento después del procesamiento de la(s) muestra(s) que contiene(n) el ácido nucleico. Por ejemplo, puede extraerse un ácido nucleico, aislarse, purificarse o purificarse parcialmente a partir de la(s) muestra(s). El término "aislado" generalmente se refiere a ácido nucleico retirado de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural, si se produce de manera natural, o una célula huésped si se expresa de forma exógena) y, por lo tanto, se altera por intervención humana (por ejemplo, "por la mano del hombre") con respecto a su entorno original. El término "ácido nucleico aislado" puede referirse a un ácido nucleico retirado de un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano). Un ácido nucleico aislado puede proporcionarse con menos componentes distintos de ácido nucleico (por ejemplo, proteínas, lípidos, hidratos de carbono) que la cantidad de componentes presentes en una muestra de la fuente. Una composición que comprende ácido nucleico aislado puede estar de aproximadamente el 50 % a más del 99 % libre de componentes distintos de ácido nucleico. Una composición que comprende ácido nucleico aislado puede estar aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más del 99 % libre de componentes distintos de ácido nucleico. El término "purificado" generalmente se refiere a un ácido nucleico proporcionado que contiene menos componentes distintos de ácido nucleico (por ejemplo, proteínas, lípidos, hidratos de carbono) que la cantidad de componentes distintos de ácido nucleico presente antes de someter el ácido nucleico a un procedimiento de purificación. Una composición que comprende ácido nucleico purificado puede estar aproximadamente el 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más del 99 % libre de otros componentes distintos de ácido nucleico.

Puede proporcionarse ácido nucleico para llevar a cabo los métodos descritos en el presente documento sin modificar el ácido nucleico. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, desnaturalización, digestión, mellado, desenrollado, incorporación y/o ligación de secuencias heterogéneas, adición de modificaciones epigenéticas, adición de marcadores (por ejemplo, radiomarcadores tales como ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I o ^{35}S ; marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina; marcadores fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC); u otros marcadores tales como biotina, avidina, digoxigenina, antígenos, haptenos, fluorocromos), y similares. Por consiguiente, en algunos casos, se amplifica un ácido nucleico no modificado.

Amplificación

En el presente documento se proporcionan métodos para amplificar ácido nucleico. Los ácidos nucleicos pueden amplificarse usando un proceso de amplificación adecuado. La amplificación de ácido nucleico implica normalmente la síntesis enzimática de amplicones de ácido nucleico (copias), que contienen una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótidos que está amplificándose. Puede realizarse un método de amplificación en un único recipiente, una única cámara y/o un único volumen (es decir, volumen contiguo). Un método de amplificación y un método de detección (por ejemplo, tal como un método de detección descrito en el presente documento) pueden realizarse en un único recipiente, una única cámara y/o un único volumen (es decir, volumen contiguo).

Los términos "amplificar", "amplificación", "reacción de amplificación" o "que amplifica" se refieren a cualquier proceso *in vitro* para multiplicar las copias de un ácido nucleico diana. La amplificación a veces se refiere a un aumento "exponencial" en el ácido nucleico diana. Sin embargo, "amplificar" también puede referirse a aumentos lineales en los números de un ácido nucleico diana, pero es diferente de una etapa de extensión de una sola vez, de un solo cebador. En algunos casos, puede realizarse una reacción de amplificación limitada, también conocida como preamplificación. La preamplificación es un método en el que se produce una cantidad limitada de amplificación debido a que se realiza un pequeño número de ciclos, por ejemplo 10 ciclos. La preamplificación puede permitir cierta amplificación, pero detiene la amplificación antes de la fase exponencial, y normalmente produce aproximadamente 500 copias de la(s) secuencia(s) de nucleótidos deseada(s). El uso de la preamplificación puede limitar las imprecisiones asociadas con el agotamiento de los reactivos en ciertas reacciones de amplificación, y también puede reducir los sesgos de amplificación debido a la abundancia de secuencias de nucleótidos o especies de la diana. En algunos casos, puede realizarse una extensión de cebador de una sola vez como preludio para la amplificación lineal o exponencial.

En el presente documento se presenta una descripción generalizada de un proceso de amplificación. Se ponen en contacto cebadores (por ejemplo, oligonucleótidos descritos en el presente documento) y ácido nucleico diana, y las secuencias complementarias se aparean o se hibridan entre sí, por ejemplo. Los cebadores pueden aparearse con un ácido nucleico diana, en o cerca (por ejemplo, adyacente a, colindante, y similares) una secuencia de interés. Un cebador apareado con una diana puede denominarse híbrido cebador-diana, cebador-diana hibridado o un dúplex de cebador-diana. Los términos cerca o adyacente a cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos de interés se refieren a una distancia (por ejemplo, número de bases) o región entre el extremo del cebador y el nucleótido o nucleótidos (por ejemplo, secuencia de nucleótidos) de una diana. Generalmente, adyacente está en el intervalo de aproximadamente 1 nucleótido a aproximadamente 50 nucleótidos (por ejemplo, 1 nucleótido, 2 nucleótidos, 3 nucleótidos, 4 nucleótidos, 5 nucleótidos, 6 nucleótidos, 7 nucleótidos, 8 nucleótidos, 9 nucleótidos, aproximadamente 10 nucleótidos, aproximadamente 20 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 40 nucleótidos, aproximadamente 50 nucleótidos) lejos de un nucleótido o secuencia de nucleótidos de interés. En algunos casos, los cebadores en un conjunto (por ejemplo, un par de cebadores, un cebador directo y uno inverso, un primer

oligonucleótido y un segundo oligonucleótido) se aparean dentro de aproximadamente 1 a 20 nucleótidos de un nucleótido o secuencia de nucleótidos de interés y producen productos amplificados. En algunos casos, los cebadores se aparean dentro de un nucleótido o una secuencia de nucleótidos de interés. Después del apareamiento, cada cebador se extiende a lo largo de la diana (es decir, cadena molde) por una polimerasa para generar una cadena complementaria. Pueden llevarse a cabo varios ciclos de apareamiento de cebadores y extensión, por ejemplo, hasta que se genera una cantidad detectable de producto de amplificación. En algunos casos, cuando un ácido nucleico diana es ARN, puede sintetizarse una copia de ADN (ADNc) del ARN diana antes de o durante la etapa de amplificación por transcripción inversa.

Los componentes de una reacción de amplificación pueden incluir, por ejemplo, uno o más cebadores (por ejemplo, cebadores individuales, pares de cebadores, conjuntos de cebadores, oligonucleótidos, conjuntos de cebadores múltiples para amplificación múltiple, y similares), diana(s) de ácido nucleico (por ejemplo, ácido nucleico diana de una muestra), una o más polimerasas, nucleótidos (por ejemplo, dNTP y similares) y un tampón adecuado (por ejemplo, un tampón que comprende un detergente, un agente reductor, iones monovalentes e iones divalentes). Una reacción de amplificación puede incluir además una transcriptasa inversa, en algunas realizaciones. Una reacción de amplificación puede incluir además uno o más agentes de detección, tales como uno o más de los agentes de detección descritos en el presente documento, en algunos casos. En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación consisten en cebadores, ácido nucleico diana, una polimerasa, nucleótidos y un tampón adecuado. En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación consisten en cebadores, ácido nucleico diana, una polimerasa, una transcriptasa inversa, nucleótidos y un tampón adecuado. En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación consisten en cebadores, ácido nucleico diana, una polimerasa, un agente de detección, nucleótidos y un tampón adecuado. En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación consisten en cebadores, ácido nucleico diana, una polimerasa, una transcriptasa inversa, un agente de detección, nucleótidos y un tampón adecuado. En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación consisten esencialmente en cebadores, ácido nucleico diana, una polimerasa, nucleótidos y un tampón adecuado. En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación consisten esencialmente en cebadores, ácido nucleico diana, una polimerasa, una transcriptasa inversa, nucleótidos y un tampón adecuado. En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación consisten esencialmente en ciertos componentes, pueden incluirse componentes o características adicionales que no tienen un efecto significativo sobre la amplificación y/o no son necesarios para generar un producto detectable. Por ejemplo, pueden incluirse componentes o características adicionales que no tienen un efecto significativo sobre la capacidad de los componentes y las condiciones en el presente documento para lograr la amplificación en condiciones isotérmicas y generar un producto de amplificación detectable en el plazo de aproximadamente 10 minutos o menos. Tales componentes o características adicionales pueden denominarse componentes no esenciales y pueden incluir componentes de reacción típicos y/o aditivos comunes tales como sales, tampones, detergentes, iones, aceites, proteínas, polímeros y similares.

La amplificación de ácido nucleico puede realizarse en presencia de nucleótidos nativos, tales como, por ejemplo, didesoxirribonucleósido trifosfatos (dNTP) y/o nucleótidos derivatizados. Un nucleótido nativo generalmente se refiere a ácido adenílico, ácido guanílico, ácido citidílico, ácido timidílico o ácido uridílico. Un nucleótido derivatizado generalmente es un nucleótido distinto de un nucleótido nativo. Los nucleótidos normalmente se designan de la siguiente manera. Un ribonucleósido trifosfato se denomina NTP o rNTP, donde N puede ser A, G, C, U. Un sustrato de desoxinucleósido trifosfato se denomina dNTP, donde N puede ser A, G, C, T o U. Las subunidades de nucleótidos monoméricas pueden indicarse como A, G, C, T o U en el presente documento sin referencia particular a ADN o ARN. En algunos casos, pueden usarse nucleótidos o análogos de nucleótidos que no se producen de manera natural, tales como análogos que contienen un marcador detectable (por ejemplo, marcador fluorescente o colorimétrico). Por ejemplo, la amplificación de ácidos nucleicos puede llevarse a cabo en presencia de dNTP marcados, tales como, por ejemplo, radiomarcadores tales como ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I o ^{35}S ; marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina; marcadores fluorescentes tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC); u otros marcadores tales como biotina, avidina, digoxigenina, antígenos, haptenos o fluorocromos. En algunos casos, la amplificación de ácido nucleico puede llevarse a cabo en presencia de dNTP modificados, tales como, por ejemplo, dNTP activados por calor (por ejemplo, dNTP CleanAmp™ de TriLink).

En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación pueden incluir componentes no enzimáticos y componentes enzimáticos. Los componentes no enzimáticos pueden incluir, por ejemplo, cebadores, nucleótidos, tampones, sales, agentes reductores, detergentes e iones; y generalmente no incluyen proteínas (por ejemplo, proteínas de unión a ácido nucleico), enzimas o proteínas que tienen actividad enzimática tales como, por ejemplo, polimerasas, transcriptasas inversas, helicasas, topoisomerasas, ligasas, exonucleasas, endonucleasas, enzimas de restricción, enzimas de mellado, recombinasas y similares. En algunos casos, un componente enzimático puede consistir en una polimerasa o puede consistir en una polimerasa y una transcriptasa inversa. Por consiguiente, tales componentes enzimáticos excluirían otras proteínas (por ejemplo, proteínas de unión a ácido nucleico y/o proteínas que tienen actividad enzimática) tales como, por ejemplo, helicasas, topoisomerasas, ligasas, exonucleasas, endonucleasas, enzimas de restricción, enzimas de mellado, recombinasas, y similares.

En algunos casos, las condiciones de amplificación comprenden una actividad enzimática. Normalmente, una actividad enzimática se proporciona por una polimerasa, y en ciertos casos, una actividad enzimática se proporciona por una polimerasa y una transcriptasa inversa. En algunos casos, una actividad enzimática consiste en una actividad de polimerasa. En algunos casos, una actividad enzimática consiste en una actividad de polimerasa y una actividad de transcriptasa inversa. Por consiguiente, en algunos casos, la actividad enzimática no incluye la actividad enzimática proporcionada por otras enzimas tales como, por ejemplo, helicasas, topoisomerasas, ligasas, exonucleasas, endonucleasas, enzimas de restricción, enzimas de mellado, recombinasas, y similares. En ciertos casos, se proporcionan una actividad de polimerasa y una actividad de transcriptasa inversa por enzimas separadas o tipos de enzimas separadas (por ejemplo, polimerasa(s) y transcriptasa(s) inversa(s)). En ciertos casos, se proporcionan una actividad de polimerasa y una actividad de transcriptasa inversa por una sola enzima o tipo de enzima (por ejemplo, polimerasa(s)).

En algunos casos, la amplificación del ácido nucleico comprende un tipo sin termociclado de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Según el método de la invención, la amplificación del ácido nucleico comprende un proceso de amplificación isotérmica. En algunos casos, la amplificación del ácido nucleico comprende una reacción en cadena de la polimerasa isotérmica (iPCR). La amplificación isotérmica generalmente es un proceso de amplificación realizado a una temperatura constante. Términos tales como condiciones isotérmicas, de manera isotérmica y temperatura constante generalmente se refieren a condiciones de reacción donde la temperatura de la reacción se mantiene esencialmente constante durante el transcurso de la reacción de amplificación. Las condiciones de amplificación isotérmica generalmente no incluyen un componente de termociclado (es decir, ciclado entre una temperatura superior y una temperatura inferior) en el proceso de amplificación. Cuando se amplifica en condiciones isotérmicas, la reacción puede mantenerse a una temperatura esencialmente constante, lo que significa que la temperatura puede no mantenerse exactamente a una temperatura. Por ejemplo, pueden producirse pequeñas fluctuaciones en la temperatura (por ejemplo, de ± 1 a 5 grados Celsius) en un proceso de amplificación isotérmica debido a, por ejemplo, variables ambientales o basadas en el equipo. A menudo, todo el volumen de reacción se mantiene a una temperatura esencialmente constante, y las reacciones isotérmicas en el presente documento generalmente no incluyen condiciones de amplificación que se basan en un gradiente de temperatura generado dentro de un recipiente de reacción y/o ciclado de temperatura basado en flujo convectivo.

Las reacciones de amplificación isotérmica en el presente documento pueden realizarse a una temperatura esencialmente constante. En algunas realizaciones, las reacciones de amplificación isotérmica en el presente documento se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 55 grados Celsius a una temperatura de aproximadamente 75 grados Celsius. Por ejemplo, las reacciones de amplificación isotérmica en el presente documento pueden realizarse a una temperatura de aproximadamente 55 grados Celsius, aproximadamente 56 grados Celsius, aproximadamente 57 grados Celsius, aproximadamente 58 grados Celsius, aproximadamente 59 grados Celsius, aproximadamente 60 grados Celsius, aproximadamente 61 grados Celsius, aproximadamente 62 grados Celsius, aproximadamente 63 grados Celsius, aproximadamente 64 grados Celsius, aproximadamente 65 grados Celsius, aproximadamente 66 grados Celsius, aproximadamente 67 grados Celsius, aproximadamente 68 grados Celsius, aproximadamente 69 grados Celsius, aproximadamente 70 grados Celsius, aproximadamente 71 grados Celsius, aproximadamente 72 grados Celsius, aproximadamente 73 grados Celsius, aproximadamente 74 grados Celsius o aproximadamente 75 grados Celsius. En algunos casos, las reacciones de amplificación isotérmica en el presente documento se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente 55 grados Celsius a una temperatura de aproximadamente 65 grados Celsius. Por ejemplo, las reacciones de amplificación isotérmica en el presente documento pueden realizarse a una temperatura de aproximadamente 60 grados Celsius. Las reacciones de amplificación isotérmica en el presente documento pueden realizarse a una temperatura de aproximadamente 65 grados Celsius. En algunos casos, un elemento de temperatura (por ejemplo, fuente de calor) se mantiene a una temperatura esencialmente constante. En algunos casos, un elemento de temperatura se mantiene a una temperatura esencialmente constante a o por debajo de aproximadamente 75 grados Celsius. En algunos casos, un elemento de temperatura se mantiene a una temperatura esencialmente constante a o por debajo de aproximadamente 70 grados Celsius. En algunos casos, un elemento de temperatura se mantiene a una temperatura esencialmente constante a o por debajo de aproximadamente 65 grados Celsius. En algunos casos, un elemento de temperatura se mantiene a una temperatura esencialmente constante a o por debajo de aproximadamente 60 grados Celsius.

Un proceso de amplificación en el presente documento puede realizarse durante un cierto período de tiempo. En algunos casos, se realiza un proceso de amplificación hasta que se genera un producto de amplificación de ácido nucleico detectable. Un producto de amplificación de ácido nucleico puede detectarse mediante cualquier proceso de detección adecuado y/o un proceso de detección descrito en el presente documento. En algunos casos, un proceso de amplificación se lleva a cabo durante un período de tiempo en el plazo de aproximadamente 20 minutos o menos. Por ejemplo, puede llevarse a cabo un proceso de amplificación en el plazo de aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 4 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 6 minutos, aproximadamente 7 minutos, aproximadamente 8 minutos, aproximadamente 9 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 11 minutos, aproximadamente 12 minutos, aproximadamente 13 minutos, aproximadamente 14 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 16 minutos, aproximadamente 17 minutos, aproximadamente 18 minutos, aproximadamente 19 minutos o aproximadamente 20

minutos. En algunos casos, un proceso de amplificación se lleva a cabo durante un período de tiempo en el plazo de aproximadamente 10 minutos o menos.

Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin exposición a agentes o condiciones que desnaturalizan el ácido nucleico. Los agentes o condiciones que desnaturalizan el ácido nucleico pueden incluir agentes o condiciones que promueven la separación de cadenas y/o promueven el desenrollado. Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin exposición a agentes o condiciones que promueven la separación de cadenas. Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin exposición a agentes o condiciones que promueven el desenrollado. Un ácido nucleico diana puede considerarse no desnaturalizado si no se ha expuesto a agentes o condiciones que desnaturalizan el ácido nucleico y/o promueven la separación de cadenas y/o promueven el desenrollado antes o durante la amplificación. Los agentes o condiciones que desnaturalizan el ácido nucleico y/o promueven la separación de cadenas y/o promueven el desenrollado pueden incluir, por ejemplo, condiciones térmicas (por ejemplo, altas temperaturas), condiciones de pH (por ejemplo, pH alto o bajo), agentes químicos, proteínas (por ejemplo, agentes enzimáticos), y similares.

Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin exposición a agentes o condiciones que desnaturalizan el ácido nucleico. La desnaturalización de ácido nucleico, o fusión, es el proceso por el cual el ácido nucleico bicatenario se desenrolla y se separa en cadenas individuales. Los agentes y condiciones que pueden promover la desnaturalización de ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, calor, pH alto, pH bajo y agentes desnaturalizantes (por ejemplo, formamida) combinados con calor. En algunos casos, la desnaturalización puede lograrse calentando una disolución que contiene ácido nucleico hasta una temperatura determinada, por ejemplo, una temperatura por encima de 75 grados Celsius, por encima de 80 grados Celsius, por encima de 90 grados Celsius, por encima de 95 grados Celsius, o superior. En algunos casos, la desnaturalización puede lograrse mediante la exposición a agentes desnaturalizantes, tales como, por ejemplo NaOH, HCl y formamida combinados con calor. Se describen métodos específicos para la desnaturalización del ADN, por ejemplo, en Singh *et al.*, (1977) *Chomosome* 60:377-389.

Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin exposición a agentes o condiciones que promueven la separación y/o desenrollado de cadenas. Por ejemplo, las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin exposición a una helicasa. Las helicasas son enzimas capaces de desenrollar y separar el ácido nucleico bicatenario en cadenas individuales. Ejemplos de helicasas incluyen ADN helicasas humanas (y sus equivalentes en otros organismos) tales como ADN helicasa Q1, proteína del síndrome de Bloom, proteína del síndrome de Werner, ADN helicasa Q4, ADN helicasa Q5, subunidad 1 de ADN helicasa 2, MCM2, MCM3, MCM, MCM5, MCM6, MCM7, MCM8, MCM9, MCM10, nucleolina, CHD2, CHD7, XPB, XPD, helicasa específica de tejido linfoide, hINO, tipo RuvB 1, tipo RuvB 2, PIF1, Twinckle, BACH1, RecQ5 alfa, RecQ5 beta, RecQ5 gamma y RTEL1; ARN helicasas humanas (y sus equivalentes en otros organismos) tales como ARN helicasa DDX1, ARN helicasa eIF4A-1, ARN helicasa eIF4A-2, ARN helicasa DDX3X, ARN helicasa DDX3Y, ARN helicasa DDX4, ARN helicasa DDX5, ARN helicasa DDX6, ARN helicasa DHX8, ARN helicasa A, ARN helicasa DDX10, ARN helicasa DDX11, ARN helicasa DDX12, helicasa SKI2W, ARN helicasa DHX15, ARN helicasa DHX16, ARN helicasa DDX17, ARN helicasa DDX18, ARN helicasa DDX19A, ARN helicasa DDX19B, ARN helicasa DDX20, ARN nucleolar helicasa 2, ARN helicasa DDX23, ARN helicasa DDX24, ARN helicasa DDX25, ARN helicasa DDX27, ARN helicasa DDX28, ARN helicasa DHX29, ARN helicasa DHX30, ARN helicasa DDX31, ARN helicasa DHX32, ARN helicasa DHX33, ARN helicasa DHX34, ARN helicasa DHX35, ARN helicasa DHX36, ARN helicasa DHX37, ARN helicasa PRP 16, ARN helicasa DDX39, ARN helicasa DHX40, ARN helicasa DDX41, ARN helicasa DDX42, ARN helicasa DDX43, ARN helicasa DDX46, ARN helicasa DDX47, ARN helicasa eIF4A-3, ARN helicasa DDX49, ARN helicasa DDX50, ARN helicasa DDX51, ARN helicasa DDX52, ARN helicasa DDX53, ARN helicasa DDX54, ARN helicasa DDX55, ARN helicasa DDX56, ARN helicasa DHX57, ARN helicasa DDX58, ARN helicasa DHX58, ARN helicasa DDX59, ARN helicasa DDX60, ARN de espliceosoma helicasa BAT1, U5.snRNP helicasa de 200 kDa, regulador de la transcripción ATRX helicasa, ARN helicasa SUPV3L1, actividad viralicida del superdestructor mitocondrial 2-similar a 2 y proteína del grupo J de anemia de Fanconi; y helicasas disponibles comercialmente. Las condiciones de amplificación que no incluyen el uso de una helicasa pueden denominarse en el presente documento condiciones de amplificación sin helicasa.

Según el método de la invención, las dianas de ácido nucleico se amplifican sin exposición a una recombinasa. Las recombinasas son enzimas implicadas en la recombinación genética y, a veces, están implicadas en la reparación de ácidos nucleicos (por ejemplo, reparación de ADN recombinacional). Las recombinasas pueden iniciar el intercambio de cadenas, por ejemplo. Las recombinasas pueden incluir, por ejemplo, recombinasa Cre, recombinasa Hin, recombinasa Tre, recombinasa FLP, RecA, RAD51, RadA, T4 uvsX. Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin exposición a una proteína accesoria de recombinasa, tales como, por ejemplo, un factor de carga de recombinasa (por ejemplo, T4 uvsY).

Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin exposición a una proteína de unión a ácido nucleico (por ejemplo, proteína de unión monocatenaria o proteína de unión a ADN monocatenario (SSB)). Las proteínas de unión monocatenarias generalmente funcionan impidiendo el apareamiento prematuro, protegiendo el ADN monocatenario de la digestión por nucleasas y/o eliminando la estructura secundaria del ADN (por ejemplo, desestabilizando los dúplex helicoidales) para permitir la acción de otras enzimas. Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin exposición a una proteína de unión a ADN monocatenario, tales como, por ejemplo, T4 gp32.

Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin exposición a una topoisomerasa. Las topoisomerasas son enzimas que regulan el superenrollamiento o subenrollamiento del ADN uniéndose a ADN o bien monocatenario o bien bicatenario y cortando la cadena principal de fosfato de ADN. Las condiciones de amplificación que no incluyen el uso de una topoisomerasa pueden denominarse en el presente documento condiciones de amplificación sin topoisomerasa.

Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse con o sin exposición a agentes o condiciones que desestabilizan el ácido nucleico. La desestabilización generalmente se refiere a una alteración en la organización global y la orientación geométrica de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, estructura de doble hélice) por uno o más de efectos de inclinación, enrollamiento, torsión, deslizamiento y volteo (por ejemplo, como se describe en Lenglet *et al.*, (2010) Journal of Nucleic Acids Volumen 2010, ID de artículo 290935, 17 páginas). La desestabilización generalmente no se refiere a la fusión o separación de cadenas de ácido nucleico, como se describió anteriormente para la desnaturalización. Puede lograrse la desestabilización del ácido nucleico, por ejemplo, por exposición a agentes tales como intercaladores o agentes alquilantes, y/o productos químicos tales como formamida, urea, dimetilsulfóxido (DMSO) o N,N,N-trimetilglicina (betaína). Los métodos de amplificación pueden incluir el uso de uno o más agentes desestabilizantes. En algunos casos, los métodos de amplificación excluyen el uso de agentes desestabilizantes.

Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin exposición a una ligasa. Las ligasas son enzimas que pueden catalizar la unión de moléculas de aminoácidos formando un nuevo enlace químico. Las condiciones de amplificación que no incluyen el uso de una ligasa pueden denominarse en el presente documento condiciones de amplificación sin ligasa.

Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin exposición a una ARN replicasa. Las ARN replicasas, ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) o RDR son enzimas que catalizan la replicación de ARN de un molde de ARN. Las condiciones de amplificación que no incluyen el uso de una ARN replicasa pueden denominarse en el presente documento condiciones de amplificación sin ARN replicasa.

Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin escisión o digestión, en ciertos casos. Por ejemplo, el ácido nucleico puede amplificarse sin exposición previa a uno o más agentes de escisión, y se amplifica ácido nucleico intacto. Según el método de la invención, el ácido nucleico se amplifica sin exposición a uno o más agentes de escisión durante la amplificación. En ciertos casos, el ácido nucleico se amplifica sin exposición a uno o más agentes de escisión después de la amplificación. Las condiciones de amplificación que no incluyen el uso de un agente de escisión pueden denominarse en el presente documento condiciones de amplificación sin agente de escisión. El término "agente de escisión" generalmente se refiere a un agente, a veces una sustancia química o una enzima que puede escindir un ácido nucleico en uno o más sitios específicos o no específicos. Los agentes de escisión específicos a menudo se escinden específicamente según una secuencia de nucleótidos particular en un sitio particular. Los agentes de escisión pueden incluir endonucleasas (por ejemplo, enzimas de restricción, enzimas de mellado, y similares); exonucleasas (ADNasas, ARNasas (por ejemplo, ARNasaH), exonucleasas 5' a 3' (por ejemplo exonucleasa II), exonucleasas 3' a 5' (por ejemplo exonucleasa I) y exonucleasas 3' a 5' específicas de poli(A)); y agentes de escisión química.

Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin el uso de enzimas de restricción y/o enzimas de mellado. Una enzima de restricción es una proteína que corta el ADN en un sitio específico y generalmente escinde ambas cadenas de un dúplex bicatenario, y una enzima de mellado es una proteína que se une al ADN bicatenario y escinde una cadena de un dúplex bicatenario. El ácido nucleico puede amplificarse sin exposición previa a enzimas de restricción y/o enzimas de mellado. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico se amplifica sin exposición a enzimas de restricción y/o enzimas de mellado durante la amplificación. El ácido nucleico puede amplificarse sin exposición a enzimas de restricción y/o enzimas de mellado después de la amplificación. Las condiciones de amplificación que no incluyen el uso de una enzima de restricción pueden denominarse en el presente documento condiciones de amplificación sin enzimas de restricción. Las condiciones de amplificación que no incluyen el uso de una enzima de mellado pueden denominarse en el presente documento condiciones de amplificación sin enzima de mellado.

Las dianas de ácido nucleico pueden amplificarse sin tratamiento con exonucleasa. Las exonucleasas son enzimas que funcionan escindiendo los nucleótidos uno cada vez desde el extremo de una cadena de polinucleótidos a través de una reacción de hidrolización que rompe los enlaces fosfodiéster en el extremo 3' o 5'. Las exonucleasas incluyen, por ejemplo, ADNasas, ARNasas (por ejemplo, ARNasaH), exonucleasas 5' a 3' (por ejemplo exonucleasa II), exonucleasas 3' a 5' (por ejemplo, exonucleasa I) y exonucleasas 3' a 5' específicas de poli(A). El ácido nucleico puede amplificarse sin tratamiento con exonucleasa antes de la amplificación. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico se amplifica sin tratamiento con exonucleasa durante la amplificación. El ácido nucleico puede amplificarse sin exonucleasa después de la amplificación. Las condiciones de amplificación que no incluyen el uso de una exonucleasa pueden denominarse en el presente documento condiciones de amplificación libres de exonucleasa. El ácido nucleico puede amplificarse sin tratamiento con ADNasa. El ácido nucleico puede amplificarse sin tratamiento con ARNasa. El ácido nucleico puede amplificarse sin tratamiento con ARNasaH. Las condiciones de amplificación que no incluyen el uso de ADNasa pueden denominarse en el presente documento condiciones de amplificación libres de ADNasa. Las condiciones de amplificación que no incluyen el uso de ARNasa pueden denominarse en el presente

documento condiciones de amplificación libres de ARNasa. Las condiciones de amplificación que no incluyen el uso de ARNasaH pueden denominarse en el presente documento condiciones de amplificación libres de ARNasaH.

Un ácido nucleico amplificado puede denominarse en el presente documento producto de amplificación de ácido nucleico o amplicón. En algunos casos, un producto de amplificación puede incluir nucleótidos que se producen de manera natural, nucleótidos que no se producen de manera natural, análogos de nucleótidos y similares y combinaciones de los anteriores. Un producto de amplificación normalmente tiene una secuencia de nucleótidos que es idéntica o sustancialmente idéntica con respecto a una secuencia en un ácido nucleico de muestra (por ejemplo, secuencia diana) o complemento de la misma. Una secuencia de nucleótidos "sustancialmente idéntica" en un producto de amplificación generalmente tendrá un alto grado de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de nucleótidos que está amplificándose o complemento de la misma (por ejemplo, aproximadamente el 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más del 99 % de identidad de secuencia), y las variaciones a veces son el resultado de la infidelidad de la polimerasa u otras variables.

En algunos casos, un producto de amplificación de ácido nucleico comprende un polinucleótido que es complementario de manera continua o sustancialmente idéntico a una secuencia diana en el ácido nucleico de muestra. En general, complementario de manera continua se refiere a una secuencia de nucleótidos en una primera cadena, por ejemplo, donde cada base en orden (por ejemplo, lectura 5' a 3') se empareja con una base ordenada correspondientemente en una segunda cadena, y no hay huecos, secuencias adicionales o bases desparejadas dentro de la secuencia considerada complementaria de manera continua. Dicho de otra manera, complementaria de manera continua generalmente se refiere a todas las bases contiguas de una secuencia de nucleótidos en una primera cadena que es complementaria a las bases contiguas correspondientes de una secuencia de nucleótidos en una segunda cadena. Por ejemplo, una primera cadena que tiene una secuencia 5'-ATGCATGCATGC-3' (SEQ ID NO:10) se consideraría complementaria de manera continua a una segunda cadena que tiene una secuencia 5'-GCATGCATGCAT-3' (SEQ ID NO:11), donde todas las bases contiguas en la primera cadena son complementarias a todas las bases contiguas correspondientes en la segunda cadena. Sin embargo, una primera cadena que tiene una secuencia 5'-ATGCATAAAAAAGCATGC-3' (SEQ ID NO:12) no se consideraría complementaria de manera continua a una segunda cadena que tiene una secuencia 5'-GCATGCATGCAT-3' (SEQ ID NO:11), debido a que la secuencia de seis adeninas (6 A) en el medio de la primera cadena no se emparejaría con bases en la segunda cadena. Una secuencia complementaria de manera continua a veces tiene de aproximadamente 5 bases contiguas a aproximadamente 25 bases contiguas de longitud, algunas veces es de aproximadamente 6 bases contiguas a aproximadamente 20 bases contiguas de longitud, algunas veces es de aproximadamente 7 bases contiguas a aproximadamente 18 bases contiguas de longitud, y a veces es de aproximadamente 8 bases contiguas a aproximadamente 16 bases contiguas de longitud. En algunos casos, un producto de amplificación de ácido nucleico consiste en un polinucleótido que es complementario de manera continua o sustancialmente idéntico a una secuencia diana en el ácido nucleico de muestra. Por consiguiente, en algunos casos, un producto de amplificación de ácido nucleico no incluye ninguna secuencia adicional (por ejemplo, en el extremo 5' y/o 3', o dentro del producto) que no son complementarias de manera continua o sustancialmente idénticas con respecto a una secuencia diana, tales como, por ejemplo, secuencias adicionales incorporadas en un producto de amplificación por medio de cebadores con cola o ligación, y/o secuencias adicionales que proporcionan sitios de reconocimiento de agentes de escisión (por ejemplo, sitios de reconocimiento de enzimas de mellado). Generalmente, a menos que una secuencia diana comprenda repeticiones en tándem, un producto de amplificación no incluye producto en forma de repeticiones en tándem.

Los productos de amplificación de ácido nucleico pueden comprender secuencias complementarias o sustancialmente idénticas con respecto a uno o más cebadores usados en una reacción de amplificación. En algunos casos, un producto de amplificación de ácido nucleico comprende una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria de manera continua o idéntica con respecto a una primera secuencia de cebador, y una segunda secuencia de nucleótidos que es complementaria de manera continua o idéntica con respecto a una segunda secuencia de cebador.

En algunos casos, los productos de amplificación de ácido nucleico comprenden una secuencia espaciadora. Generalmente, una secuencia espaciadora en un producto de amplificación es una secuencia (1 o más bases) complementaria de manera continua o sustancialmente idéntica con respecto a una porción de una secuencia diana en el ácido nucleico de muestra, y está flanqueado por secuencias en el producto de amplificación que son complementarias o sustancialmente idénticas con respecto a uno o más cebadores usados en una reacción de amplificación. Una secuencia espaciadora flanqueada por secuencias en el producto de amplificación generalmente se encuentra entre una primera secuencia (complementaria o sustancialmente idéntica con respecto a un primer cebador) y una segunda secuencia (complementaria o sustancialmente idéntica con respecto a un segundo cebador). Por lo tanto, un producto de amplificación normalmente incluye una primera secuencia seguida de secuencias espaciadoras seguidas de una segunda secuencia. Una secuencia espaciadora generalmente no es complementaria o sustancialmente idéntica con respecto a una secuencia en el/los cebador(es). Según el método de la invención, una secuencia espaciadora comprende de 1 a 10 bases. Por ejemplo, una secuencia espaciadora puede comprender 1 base, 2 bases, 3 bases, 4 bases, 5 bases, 6 bases, 7 bases, 8 bases, 9 bases o 10 bases. En algunos casos, una secuencia espaciadora comprende de aproximadamente 1 a 5 bases.

En algunos casos, un producto de amplificación de ácido nucleico consiste en una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria de manera continua o idéntica con respecto a una primera secuencia de cebador, una segunda secuencia de nucleótidos que es complementaria de manera continua o idéntica con respecto a una segunda secuencia de cebador, y una secuencia espaciadora. Por consiguiente, en algunos casos, un producto de amplificación de ácido nucleico no incluye ninguna secuencia adicional (por ejemplo, en el extremo 5' y/o 3'; o dentro del producto) que no son complementarias de manera continua o idénticas con respecto a una primera secuencia de cebador y una segunda secuencia de cebador, y no forman parte de una secuencia espaciadora, tales como, por ejemplo, secuencias adicionales incorporadas en un producto de amplificación por medio de cebadores con cola o en bucle, ligación u otro mecanismo.

En algunos casos, un producto de amplificación de ácido nucleico consiste esencialmente en una primera secuencia de nucleótidos que es complementaria de manera continua o idéntica con respecto a una primera secuencia de cebador, una segunda secuencia de nucleótidos que es complementaria de manera continua o idéntica con respecto a una segunda secuencia de cebador, y una secuencia espaciadora. Por consiguiente, en algunos casos, un producto de amplificación de ácido nucleico generalmente no incluye secuencias adicionales (por ejemplo, en el extremo 5' y/o 3'; o dentro del producto) que no son complementarias de manera continua o idénticas con respecto a una primera secuencia de cebador y una segunda secuencia de cebador, y no forman parte de una secuencia espaciadora, tales como, por ejemplo, secuencias adicionales incorporadas en un producto de amplificación por medio de cebadores con cola o en bucle, ligación u otro mecanismo. Sin embargo, en tales casos, un producto de amplificación de ácido nucleico puede incluir, por ejemplo, algunas bases apareadas erróneamente (es decir, bases no complementarias) o una o más bases adicionales (por ejemplo, en el extremo 5' y/o 3'; o dentro del producto) introducidas en el producto por error o promiscuidad en el proceso de amplificación.

Los productos de amplificación de ácido nucleico pueden tener hasta 50 bases de longitud. En algunos casos, un producto de amplificación de ácido nucleico tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 40 bases. Por ejemplo, un producto de amplificación de ácido nucleico puede tener 15 bases de longitud, 16 bases de longitud, 17 bases de longitud, 18 bases de longitud, 19 bases de longitud, 20 bases de longitud, 21 bases de longitud, 22 bases de longitud, 23 bases de longitud, 24 bases de longitud, 25 bases de longitud, 26 bases de longitud, 27 bases de longitud, 28 bases de longitud, 29 bases de longitud, 30 bases de longitud, 31 bases de longitud, 32 bases de longitud, 33 bases de longitud, 34 bases de longitud, 35 bases de longitud, 36 bases de longitud, 37 bases de longitud, 38 bases de longitud, 39 bases de longitud o 40 bases de longitud. En algunas realizaciones, un producto de amplificación tiene una longitud de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 bases. En algunos casos, un producto de amplificación tiene una longitud de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 bases. En algunos casos, los productos de amplificación de ácido nucleico para una secuencia diana dada tienen la misma longitud o sustancialmente la misma longitud (por ejemplo, dentro de 1 a 5 bases). Por consiguiente, los productos de amplificación de ácido nucleico para una secuencia diana dada pueden producir una sola señal (por ejemplo, banda en un gel de electroforesis) y generalmente no producen múltiples señales indicativas de múltiples longitudes (por ejemplo, un marcador de peso molecular o frotis en un gel de electroforesis). Para reacciones múltiples, los productos de amplificación de ácidos nucleicos para diferentes secuencias diana pueden tener diferentes longitudes.

Los métodos y componentes descritos en el presente documento pueden usarse para la amplificación múltiple. La amplificación múltiple generalmente se refiere a la amplificación de más de un ácido nucleico de interés (por ejemplo, amplificación o más de una secuencia diana). Por ejemplo, la amplificación múltiple puede referirse a la amplificación de múltiples secuencias de la misma muestra o la amplificación de una de varias secuencias en una muestra. La amplificación múltiple también puede referirse a la amplificación de una o más secuencias presentes en múltiples muestras, o bien simultáneamente o bien por etapas. Por ejemplo, puede usarse una amplificación múltiple para amplificar al menos dos secuencias diana que pueden amplificarse (por ejemplo, la reacción de amplificación comprende los cebadores y enzimas apropiados para amplificar al menos dos secuencias diana). En algunos casos, puede prepararse una reacción de amplificación para detectar al menos dos secuencias diana, pero solo una de las secuencias diana puede estar presente en la muestra que está sometiéndose a prueba, de modo que ambas secuencias son capaces de amplificarse, pero solo se amplifica una secuencia. En algunos casos, cuando están presentes dos secuencias diana, una reacción de amplificación puede dar como resultado la amplificación de ambas secuencias diana. Una reacción de amplificación múltiple puede dar como resultado la amplificación de una, algunas o todas las secuencias diana para las que comprende los cebadores y enzimas apropiados. En algunos casos, puede prepararse una reacción de amplificación para detectar dos secuencias con un par de cebadores, donde una secuencia es una secuencia diana y una secuencia es una secuencia de control (por ejemplo, una secuencia sintética capaz de amplificarse por los mismos cebadores que la secuencia diana y que tiene una base o secuencia espaciadora diferente a la diana). En algunos casos, puede prepararse una reacción de amplificación para detectar múltiples conjuntos de secuencias con pares de cebadores correspondientes, donde cada conjunto incluye una secuencia diana y una secuencia de control.

Cebadores

La amplificación de ácido nucleico generalmente se realiza en presencia de uno o más cebadores. Un cebador se caracteriza generalmente como un oligonucleótido que incluye una secuencia de nucleótidos capaz de hibridarse o aparearse con un ácido nucleico diana, en o cerca de (por ejemplo, adyacente a) una región específica de interés (es

decir, secuencia diana). Los cebadores pueden permitir la determinación específica de una secuencia de nucleótidos de ácido nucleico diana o la detección del ácido nucleico diana (por ejemplo, presencia o ausencia de una secuencia), o una característica del mismo, por ejemplo. Un cebador puede ser de origen natural o sintético. El término específico, o especificidad, generalmente se refiere a la unión o hibridación de una molécula a otra molécula, tal como un cebador para un polinucleótido diana. Es decir, específico o especificidad se refiere al reconocimiento, contacto y formación de un complejo estable entre dos moléculas, en comparación con sustancialmente menos reconocimiento, contacto o formación de complejos de cualquiera de esas dos moléculas con otras moléculas. El término aparear o hibridar generalmente se refiere a la formación de un complejo estable entre dos moléculas. Los términos cebador, oligo u oligonucleótido pueden usarse indistintamente en el presente documento, cuando se hace referencia a cebadores.

Puede diseñarse y sintetizarse un cebador usando procesos adecuados, y puede ser de cualquier longitud adecuada para hibridarse con una secuencia diana y realizar un proceso de amplificación descrito en el presente documento. Los cebadores a menudo se diseñan según una secuencia en un ácido nucleico diana. Un cebador, en algunos casos, puede tener de aproximadamente 5 bases de longitud a aproximadamente 30 bases de longitud. Por ejemplo, un cebador puede tener 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 bases de longitud. En algunos casos, un cebador tiene menos de 28 bases de longitud. En algunos casos, un cebador tiene de aproximadamente 8 a aproximadamente 16 bases de longitud. En algunos casos, un cebador tiene de aproximadamente 10 a aproximadamente 12 bases de longitud. Un cebador puede estar compuesto de nucleótidos que se producen de manera natural y/o que no se producen de manera natural (por ejemplo, nucleótidos modificados, nucleótidos marcados), o una mezcla de los mismos. Los cebadores adecuados para su uso con los métodos descritos en el presente documento pueden sintetizarse y marcarse usando cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, los cebadores pueden sintetizarse químicamente según el método de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por primera vez por Beaucage y Caruthers, *Tetrahedron Letts.*, 22:1859-1862, 1981, usando un sintetizador automatizado, como se describe en Needham-VanDevanter *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 12:6159-6168, 1984. Puede realizarse la purificación de cebadores, por ejemplo, por electroforesis en gel de acrilamida nativa o por cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio aniónico (HPLC), por ejemplo, como se describe en Pearson y Regnier, *J. Chrom.*, 255:137-149, 1983.

En algunos casos, un cebador comprende nucleótidos modificados. En algunos casos, un cebador consiste esencialmente en nucleótidos modificados. En algunos casos, un cebador consiste en nucleótidos modificados. Un nucleótido (o base) puede modificarse según cualquier modificación descrita en el presente documento o conocida en la técnica. Las modificaciones pueden incluir las hechas durante la síntesis del cebador y/o pueden incluir modificaciones tras la síntesis. Las modificaciones pueden incluir modificaciones internas, modificaciones en el extremo 3' de un cebador y/o modificaciones en el extremo 5' de un cebador. En algunos casos, un cebador comprende una mezcla de nucleótidos modificados y no modificados. En algunos casos, un cebador comprende nucleótidos no modificados. En algunos casos, un cebador consiste esencialmente en nucleótidos no modificados. En algunos casos, un cebador consiste en nucleótidos no modificados.

Las modificaciones y bases modificadas pueden incluir, por ejemplo, fosforilación, (por ejemplo, fosforilación 3', fosforilación 5'); química de unión o modificaciones de ligadores (por ejemplo, Acrydite™, adenilación, azida (éster NHS), digoxigenina (éster NHS), colesteril-TEG, I-Linker™, modificadores de amino (por ejemplo, modificador de amino C6, modificador de amino C12, modificador de amino C6 dT, modificador de amino Uni-Link™), alquinos (por ejemplo, 5' hexinilo, 5-octadecil dU), biotinilación (por ejemplo, biotina, biotina (azida), biotina dT, biotina-TEG, biotina doble, PC biotina, destiobiotina-TEG), modificaciones de tiol (por ejemplo, modificador de tiol C3 S-S, ditiol, modificador de tiol C6 S-S); fluoróforos (por ejemplo, colorantes Freedom™, colorantes Alexa Fluor®, colorantes LI-COR IR®, colorantes ATTO™, colorantes de rodamina, colorantes WellRED, 6-FAM (azida), Texas Red®-X (éster NHS), Lightcycler® 640 (éster NHS), Dy 750 (éster NHS)); modificaciones de desactivadores oscuros Iowa Black® (por ejemplo, Iowa Black® FQ, Iowa Black® RQ); modificaciones de desactivadores oscuros (por ejemplo, Black Hole Quencher®-1, Black Hole Quencher®-2, Dabcyl); espaciadores (espaciador C3, espaciador de PC, hexanodiol, espaciador 9, separador 18, 1',2'-didesoxirribosa (dSpacer); bases modificadas (por ejemplo, 2-aminopurina, 2,6-diaminopurina (2-amino-dA), 5-bromo dU, desoxiuridina, dT invertida, didesoxi-T invertida, didesoxi-C, 5-metilo dC, desoxilnosina, Super T®, Super G®, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), 5-nitroindol, bases de ARN de 2'-O-metilo, dC de hidroxmetilo, ácido nucleico no bloqueado UNA (por ejemplo, UNA-A, UNA-U, UNA-C, UNA-G), Iso-dC, Iso-dG, Fluoro C, Fluoro U, Fluoro A, Fluoro G); modificaciones de enlaces de fosforotioato (por ejemplo, bases de ADN con fosforotioato, bases de ARN con fosforotioato, bases de 2' O-metilo con fosforotioato, bases de LNA con fosforotioato); y modificaciones de química de clic. En algunos casos, las modificaciones y bases modificadas incluyen bases de uracilo, bases de ribonucleótidos, bases de O-metil ARN, enlaces de fosforotioato, grupos 3' fosfato, bases espaciadoras (tales como espaciador C3 u otras bases espaciadoras). Por ejemplo, un cebador puede comprender una o más bases de O-metil ARN (por ejemplo, bases de 2'-O-metil ARN). El 2'-O-metil ARN generalmente es una modificación postranscripcional del ARN encontrado en el ARNt y otros ARN pequeños. Pueden sintetizarse directamente cebadores que incluyen bases de 2'-O-metil ARN. Esta modificación puede, por ejemplo, aumentar la Tm de los dúplex de ARN:ARN y proporcionar estabilidad en presencia de ribonucleasas y ADNasas monocatenarias. Las bases de 2'-O-metil ARN pueden incluirse en cebadores, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y la afinidad de unión a una secuencia diana. En algunos casos, un cebador puede comprender uno o más enlaces fosforotioato (por ejemplo, modificaciones del enlace fosforotioato). Un enlace fosforotioato (PS) sustituye un átomo de azufre por un oxígeno que no forma puentes en la cadena principal de fosfato de un cebador. Esta modificación normalmente

hace que el enlace internucleotídico sea resistente a la degradación por nucleasas. Pueden introducirse enlaces de fosforotioato entre aproximadamente los últimos 3 a 5 nucleótidos en el extremo 5' o el extremo 3' de un cebador para inhibir la degradación por exonucleasa, por ejemplo. Los enlaces de fosforotioato incluidos en todo un cebador completo pueden ayudar a reducir el ataque por endonucleasas, en ciertos casos. En algunos casos, un cebador puede comprender un grupo fosfato 3'. La fosforilación 3' puede inhibir la degradación por ciertas 3'-exonucleasas y puede usarse para bloquear la extensión por las ADN polimerasas, en ciertos casos. En algunos casos, un cebador puede comprender una o más bases espaciadoras (por ejemplo, uno o más espaciadores C3). Puede incorporarse internamente una fosforamidita espaciadora C3 o en el extremo 5' de un cebador. Pueden añadirse múltiples espaciadores C3 en cualquier extremo de un cebador para introducir un brazo espaciador hidrófilo largo para la unión de fluoróforos u otros grupos colgantes, por ejemplo.

En algunos casos, un cebador comprende bases de ADN. En algunos casos, un cebador comprende bases de ARN. En algunos casos, un cebador comprende una mezcla de bases de ADN y bases de ARN. Las bases de ADN pueden estar modificadas o no modificadas. Las bases de ARN pueden estar modificadas o no modificadas. En algunos casos, un cebador consiste esencialmente en bases de ADN (por ejemplo, bases de ADN modificadas y/o bases de ADN no modificadas). En algunos casos, un cebador consiste en bases de ADN (por ejemplo, bases de ADN modificadas y/o bases de ADN no modificadas). En algunos casos, un cebador consiste esencialmente en bases de ADN no modificadas. En algunos casos, un cebador consiste en bases de ADN no modificadas. En algunos casos, un cebador consiste esencialmente en bases de ADN modificadas. En algunos casos, un cebador consiste en bases de ADN modificadas y/o bases de ARN (por ejemplo, bases de ARN modificadas y/o bases de ARN no modificadas). En algunos casos, un cebador consiste en bases de ARN (por ejemplo, bases de ARN modificadas y/o bases de ARN no modificadas). En algunos casos, un cebador consiste esencialmente en bases de ARN no modificadas. En algunos casos, un cebador consiste en bases de ARN no modificadas. En algunos casos, un cebador consiste esencialmente en bases de ARN modificadas. En algunos casos, un cebador consiste en bases de ARN modificadas.

En algunos casos, un cebador no comprende bases de ARN. En algunos casos, un cebador no comprende bases de ARN en el extremo 3'. En algunos casos, un cebador comprende una base de ADN (o base de ADN modificada) en el extremo 3'. En algunos casos, un cebador no es un cebador quimérico. Un cebador quimérico es un cebador que comprende bases de ADN y ARN. En algunos casos, un cebador es un cebador homogéneo. En algunos casos, un cebador es un cebador de ADN homogéneo. Un cebador de ADN homogéneo puede comprender bases de ADN no modificadas, bases de ADN modificadas, o una mezcla de bases de ADN modificadas y bases de ADN no modificadas, y generalmente no incluyen bases de ARN.

En algunos casos, un cebador no comprende sitios de reconocimiento de agentes de escisión. Por ejemplo, un cebador en el presente documento puede no comprender sitios de reconocimiento de enzimas de mellado. En algunos casos, un cebador no comprende cola. En algunos casos, un cebador no comprende cola que comprenda un sitio de reconocimiento de enzima de mellado.

Toda o una porción de una secuencia de cebador puede ser complementaria o sustancialmente complementaria a un ácido nucleico diana, en algunos casos. Sustancialmente complementaria con respecto a las secuencias generalmente se refiere a secuencias de nucleótidos que se hibridarán entre sí. La rigurosidad de las condiciones de hibridación puede alterarse para tolerar cantidades variables de apareamientos erróneos de secuencias. En algunos casos, las secuencias diana y de cebador son al menos el 75 % complementarias entre sí. Por ejemplo, las secuencias diana y de cebador pueden ser el 75 % o más, 76 % o más, 77 % o más, 78 % o más, 79 % o más, 80 % o más, 81 % o más, 82 % o más, 83 % o más, 84 % o más, 85 % o más, 86 % o más, 87 % o más, 88 % o más, 89 % o más, 90 % o más, 91 % o más, 92 % o más, 93 % o más, 94 % o más, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más o 99 % o más complementarias entre sí.

Los cebadores que son sustancialmente complementarios a una secuencia de ácido nucleico diana normalmente también son sustancialmente idénticos al complemento de la secuencia de ácido nucleico diana. Es decir, los cebadores son sustancialmente idénticos a la cadena antisentido del ácido nucleico. Sustancialmente idénticos con respecto a las secuencias generalmente se refiere a secuencias de nucleótidos que son al menos el 75 % idénticas entre sí. Por ejemplo, los cebadores que son sustancialmente idénticos a la cadena antisentido de un ácido nucleico diana pueden ser el 75 % o más, 76 % o más, 77 % o más, 78 % o más, 79 % o más, 80 % o más, 81 % o más, 82 % o más, 83 % o más, 84 % o más, 85 % o más, 86 % o más, 87 % o más, 88 % o más, 89 % o más, 90 % o más, 91 % o más, 92 % o más, 93 % o más, 94 % o más, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más o 99 % o más idénticos entre sí. Una prueba para determinar si dos secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es determinar el porcentaje de secuencias de nucleótidos idénticas compartidas.

En algunos casos, los cebadores comprenden un par de cebadores. Un par de cebadores puede incluir un cebador directo y un cebador inverso (por ejemplo, cebadores que se unen a las cadenas sentido y antisentido de un ácido nucleico diana). En algunos casos, los cebadores consisten en un par de cebadores (es decir, un cebador directo y un cebador inverso). Por consiguiente, en algunos casos, la amplificación de una secuencia diana se realiza usando un par de cebadores y no se incluyen cebadores u oligonucleótidos adicionales en la amplificación de la secuencia diana (por ejemplo, los componentes de reacción de amplificación no comprenden pares de cebadores adicionales para una

secuencia diana dada, ni cebadores anidados, ni cebadores amortiguadores, ni oligonucleótidos distintos de los cebadores, ni sondas, y similares). En algunos casos, los cebadores consisten en un par de cebadores, sin embargo, en ciertos casos, una reacción de amplificación puede incluir pares de cebadores adicionales para amplificar diferentes secuencias diana, tal como en una amplificación múltiple. En algunos casos, los cebadores consisten en un par de cebadores, sin embargo, en ciertos casos, una reacción de amplificación puede incluir cebadores, oligonucleótidos o sondas adicionales para un proceso de detección que no se consideran parte de la amplificación.

En algunos casos, los cebadores se usan en conjuntos. Un conjunto de cebadores de amplificación puede incluir un par de cebadores directo e inverso para una secuencia diana dada. Para la amplificación múltiple, los cebadores que amplifican una primera secuencia diana se consideran un conjunto de cebadores, y los cebadores que amplifican una segunda secuencia diana se consideran un conjunto de cebadores diferente.

En algunos casos, los componentes de reacción de amplificación comprenden un primer cebador (primer oligonucleótido) complementario a una secuencia diana en una primera cadena (por ejemplo, cadena sentido, cadena directa) de una muestra de ácido nucleico, y un segundo cebador (segundo oligonucleótido) complementario a una secuencia diana en una segunda cadena (por ejemplo, cadena antisentido, cadena inversa) de una muestra de ácido nucleico. En algunos casos, un primer cebador (primer oligonucleótido) comprende un primer polinucleótido complementario de manera continua a una secuencia diana en una primera cadena de ácido nucleico de muestra, y un segundo cebador (segundo oligonucleótido) comprende un segundo polinucleótido complementario de manera continua a una secuencia diana en una segunda cadena de ácido nucleico de muestra. Complementario de manera continua para un cebador-diana generalmente se refiere a una secuencia de nucleótidos en un cebador, donde cada base en orden se empareja con una base ordenada correspondientemente en una secuencia diana, y no hay huecos, secuencias adicionales o bases desparejadas dentro de la secuencia considerada complementaria de manera continua. Dicho de otra manera, complementaria de manera continua en general se refiere a todas las bases contiguas de una secuencia de nucleótidos en un cebador que son complementarias a las bases contiguas correspondientes de una secuencia de nucleótidos en una diana.

En algunos casos, un primer cebador (primer oligonucleótido) consiste en un primer polinucleótido complementario de manera continua a una secuencia diana en una primera cadena de ácido nucleico de muestra, y un segundo cebador (segundo oligonucleótido) consiste en un segundo polinucleótido complementario de manera continua a una secuencia diana en la segunda cadena del ácido nucleico de muestra. Por consiguiente, en algunos casos, un cebador no incluye ninguna secuencia adicional (por ejemplo, en el extremo 5' y/o 3', o dentro del cebador) que no son complementarias de manera continua a una secuencia diana, tales como, por ejemplo, secuencias adicionales presentes en cebadores con cola o en bucle, y/o secuencias adicionales que proporcionan sitios de reconocimiento de agentes de escisión (por ejemplo, sitios de reconocimiento de enzimas de mellado). En algunos casos, los componentes de reacción de amplificación no comprenden cebadores que comprenden secuencias adicionales (es decir, secuencias distintas de la secuencia que es complementaria de manera continua a una secuencia diana) tales como, por ejemplo, cebadores con cola, cebadores en bucle, cebadores capaces de formar estructuras de tallo-bucle, estructuras de horquilla y/o secuencias adicionales que proporcionan sitios de reconocimiento de agentes de escisión (por ejemplo, sitios de reconocimiento de enzimas de mellado), y similares.

En algunos casos, un primer cebador (primer oligonucleótido) consiste esencialmente en un primer polinucleótido complementario de manera continua a una secuencia diana en una primera cadena de ácido nucleico de muestra, y un segundo cebador (segundo oligonucleótido) consiste esencialmente en un segundo polinucleótido complementario de manera continua a una secuencia diana en la segunda cadena del ácido nucleico de muestra. Por consiguiente, en algunos casos, un cebador generalmente no incluye ninguna secuencia adicional (por ejemplo, en el extremo 5' y/o 3', o dentro del cebador) que no son complementarias de manera continua a una secuencia diana, tales como, por ejemplo, secuencias adicionales presentes en cebadores con cola o en bucle, y/o secuencias adicionales que proporcionan sitios de reconocimiento de agentes de escisión (por ejemplo, sitios de reconocimiento de enzimas de mellado). Sin embargo, en tales casos, un cebador puede incluir una o más bases adicionales (por ejemplo, en el extremo 5' y/o 3', o dentro del cebador) que no añaden una característica funcional al cebador. Por ejemplo, secuencias adicionales presentes en cebadores con cola o en bucle añaden generalmente una característica funcional y se excluirían de los cebadores en tales casos.

Un cebador, en ciertos casos, puede contener una modificación tal como una o más inosinas, sitios abásicos, ácidos nucleicos bloqueados, agentes de unión al surco menor, estabilizadores del dúplex (por ejemplo, acridina, espermidina), modificadores de Tm o cualquier modificador que cambie las propiedades de unión del cebador. Un cebador, en ciertos casos, puede contener una molécula o entidad detectable (por ejemplo, un fluoróforo, radioisótopo, agente colorimétrico, partícula, enzima y similares).

Polimerasa

Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una o más polimerasas. Las polimerasas son proteínas capaces de catalizar la incorporación específica de nucleótidos para extender un extremo hidroxilo 3' terminal de una molécula de cebador, tal como, por ejemplo, un cebador de amplificación descrito en el presente documento, contra una secuencia diana de ácido nucleico (por ejemplo, a la que se aparee un cebador). Las

5 polimerasas pueden incluir, por ejemplo, polimerasas termófilas o hipertermófilas que pueden tener actividad a una temperatura de reacción elevada (por ejemplo, por encima de 55 grados Celsius, por encima de 60 grados Celsius, por encima de 65 grados Celsius, por encima de 70 grados Celsius, por encima de 75 grados Celsius, por encima de 80 grados Celsius, por encima de 85 grados Celsius, por encima de 90 grados Celsius, por encima de 95 grados Celsius, por encima de 100 grados Celsius). Una polimerasa hipertermófila puede denominarse polimerasa hipertermófila. Puede hacerse referencia a una polimerasa que tiene actividad polimerasa hipertermófila como que tiene actividad polimerasa hipertermófila. Una polimerasa puede tener o no capacidades de desplazamiento de cadena. En algunos casos, una polimerasa puede incorporar de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 nucleótidos en una única síntesis. Por ejemplo, una polimerasa puede incorporar aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos en una única síntesis. En algunos casos, una polimerasa, puede incorporar de 20 a 40 nucleótidos en una única síntesis. En algunos casos, una polimerasa, puede incorporar hasta 50 nucleótidos en una única síntesis. En algunos casos, una polimerasa, puede incorporar hasta 40 nucleótidos en una única síntesis. En algunos casos, una polimerasa, puede incorporar hasta 30 nucleótidos en una única síntesis. En algunos casos, una polimerasa, puede incorporar hasta 20 nucleótidos en una única síntesis.

15 Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una o más ADN polimerasas. Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una o más ADN polimerasas seleccionadas de las siguientes: ADN polimerasa 9^oN; ADN polimerasa 9^oNmTM; ADN polimerasa ThermoTerminatorTM; ADN polimerasa ThermoTerminatorTM II; ADN polimerasa ThermoTerminatorTM III; ADN polimerasa ThermoTerminatorTM γ; ADN polimerasa Bst; ADN polimerasa Bst (fragmento grande); ADN polimerasa Phi29, ADN polimerasa I (*E. coli*), ADN polimerasa I, fragmento grande (Klenow); fragmento Klenow (3'-5' exo-); ADN polimerasa T4; ADN polimerasa T7; ADN polimerasa Deep VentRTM (exo-); ADN polimerasa Deep VentRTM; ADN polimerasa DyNAzymeTM EXT; ADN polimerasa DyNAzymeTM II Hot Start; ADN polimerasa de alta fidelidad PhusionTM; ADN polimerasa VentR[®]; ADN polimerasa VentR[®] (exo-); ADN polimerasa RepliPhiTM Phi29; ADN polimerasa rBst, fragmento grande (ADN polimerasa IsoThermTM); ADN polimerasa MasterAmpTM AmpliThermTM; ADN polimerasa Tag; ADN polimerasa Tth; ADN polimerasa Tf1; ADN polimerasa Tgo; ADN polimerasa SP6; ADN polimerasa Tbr; ADN polimerasa Beta; y ADN polimerasa ThermoPhi.

30 Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una o más ADN polimerasas hipertermófilas. Generalmente, las ADN polimerasas hipertermófilas son termoestables a altas temperaturas. Por ejemplo, una ADN polimerasa hipertermófila puede tener una semivida de aproximadamente 5 a 10 horas a 95 grados Celsius y una semivida de aproximadamente 1 a 3 horas a 100 grados Celsius. Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una o más ADN polimerasas hipertermófilas de *Archaea*. Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una o más ADN polimerasas hipertermófilas de *Thermococcus*. Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una o más ADN polimerasas hipertermófilas de *Thermococcaceaeen archaean*. Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una o más ADN polimerasas hipertermófilas de *Pyrococcus*. Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una o más ADN polimerasas hipertermófilas de *Methanococcaceae*. Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una o más ADN polimerasas hipertermófilas de *Methanococcus*. Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una o más ADN polimerasas hipertermófilas de *Thermus*. En los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una o más ADN polimerasas hipertermófilas de *Thermus thermophiles*.

45 Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una ADN polimerasa hipertermófila o fragmento funcional de la misma. Un fragmento funcional generalmente conserva una o más funciones de una polimerasa de longitud completa tales como, por ejemplo, la capacidad de polimerizar ADN (por ejemplo, en una reacción de amplificación). En algunos casos, un fragmento funcional realiza una función (por ejemplo, polimerización de ADN en una reacción de amplificación) a un nivel que es al menos aproximadamente el 50 % del nivel de función para una polimerasa de longitud completa. En algunos casos, un fragmento funcional realiza una función (por ejemplo, polimerización de ADN en una reacción de amplificación) a un nivel que es al menos aproximadamente el 75 % del nivel de función para una polimerasa de longitud completa. En algunos casos, un fragmento funcional realiza una función (por ejemplo, polimerización de ADN en una reacción de amplificación) a un nivel que es al menos aproximadamente el 90 % del nivel de función para una polimerasa de longitud completa. En algunos casos, un fragmento funcional realiza una función (por ejemplo, polimerización de ADN en una reacción de amplificación) a un nivel que es al menos aproximadamente el 95 % del nivel de función para una polimerasa de longitud completa. Pueden evaluarse los niveles de actividad de polimerasa, por ejemplo, usando un método de amplificación de ácido nucleico detectable, tal como, por ejemplo, un método de amplificación de ácido nucleico detectable descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, los componentes de una reacción de amplificación comprenden una ADN polimerasa hipertermófila que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o un fragmento funcional de SEQ ID NO:8. En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación comprenden una ADN polimerasa hipertermófila que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o un fragmento funcional de SEQ ID NO:9.

65 En algunas realizaciones, los componentes de una reacción de amplificación comprenden una polimerasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 90 % idéntica con respecto a una polimerasa hipertermófila o un fragmento funcional de la misma (es decir, un fragmento funcional como se describe en el presente documento de una polimerasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos

aproximadamente el 90 % idéntica con respecto a una polimerasa hipertermófila). Puede determinarse el grado de identidad de secuencia, por ejemplo, realizando un alineamiento de secuencia de aminoácidos. En algunas realizaciones, los componentes de una reacción de amplificación comprenden una polimerasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 90 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o un fragmento funcional de la misma (es decir, un fragmento funcional como se describe en el presente documento de una polimerasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 90 % idéntica con respecto a SEQ ID NO:8). Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una polimerasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 95 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o un fragmento funcional de la misma. Los componentes de una reacción de amplificación pueden comprender una polimerasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 99 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8 o un fragmento funcional de la misma. En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación comprenden una polimerasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 90 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o un fragmento funcional de la misma (es decir, un fragmento funcional como se describe en el presente documento de una polimerasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 90 % idéntica con respecto a SEQ ID NO:9). En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación comprenden una polimerasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 95 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o un fragmento funcional de la misma. En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación comprenden una polimerasa que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 99 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 o un fragmento funcional de la misma.

En algunas realizaciones, una polimerasa puede poseer capacidades de transcripción inversa. En tales casos, una reacción de amplificación puede amplificar dianas de ARN, por ejemplo, en una sola etapa sin el uso de una transcriptasa inversa separada. Ejemplos no limitantes de polimerasas que poseen capacidades de transcriptasa inversa incluyen Bst (fragmento grande), ADN polimerasa 9^oN, ADN polimerasa 9^oNmTM, TherminatorTM, TherminatorTM II, y similares). En algunos casos, los componentes de una reacción de amplificación comprenden una o más transcriptasas inversas separadas. En algunos casos, puede incluirse más de una polimerasa en una reacción de amplificación. Por ejemplo, una reacción de amplificación puede comprender una polimerasa que tiene actividad de transcriptasa inversa y una segunda polimerasa que no tiene actividad de transcriptasa inversa.

En algunos casos, una o más polimerasas que tienen actividad de exonucleasa se usan durante la amplificación. En algunas realizaciones, una o más polimerasas que no tienen actividad de exonucleasa se usan durante la amplificación. En algunas realizaciones, una o más polimerasas que tienen baja actividad de exonucleasa se usan durante la amplificación. En ciertos casos, una polimerasa que no tiene actividad de exonucleasa o tiene baja actividad de exonucleasa comprende una o más modificaciones (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos) que reducen o eliminan la actividad de exonucleasa de la polimerasa. Una polimerasa modificada que tiene baja actividad de exonucleasa puede tener un 10 % o menos de actividad de exonucleasa en comparación con una polimerasa no modificada. Por ejemplo, una polimerasa modificada que tiene baja actividad de exonucleasa puede tener menos de aproximadamente el 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o 1 % de actividad de exonucleasa en comparación con una polimerasa no modificada. En algunos casos, una polimerasa no tiene actividad de exonucleasa 5' a 3' o es baja. En algunos casos, una polimerasa no tiene actividad de exonucleasa dependiente de una sola cadena o es baja. En algunos casos, una polimerasa no tiene actividad de exonucleasa dependiente de cadena doble o es baja. Ejemplos no limitantes de ciertas modificaciones que pueden reducir o eliminar la actividad de exonucleasa para una polimerasa incluyen una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 141 y/o 143 y/o 458 de SEQ ID NO:8, o en una posición correspondiente a la posición 141 y/o 143 y/o 458 de SEQ ID NO:8. Una posición de aminoácidos correspondiente a una posición en SEQ ID NO:8 puede identificarse, por ejemplo, realizando un alineamiento de secuencia de aminoácidos. En algunos casos, modificación/modificaciones incluye(n) una sustitución del aminoácido nativo en la posición 141 por una alanina. En algunos casos, la(s) modificación/modificaciones incluye(n) D141A. En algunos casos, la(s) modificación/modificaciones incluye(n) una sustitución del aminoácido nativo en la posición 143 por una alanina. En algunos casos, la(s) modificación/modificaciones incluye(n) E143A. En algunos casos, la(s) modificación/modificaciones incluye(n) una sustitución del aminoácido nativo en la posición 143 por un aspartato. En algunos casos, la(s) modificación/modificaciones incluye(n) E143D. En algunos casos, la(s) modificación/modificaciones incluye(n) una sustitución del aminoácido nativo en la posición 485 por una leucina. En algunos casos, la(s) modificación/modificaciones incluye(n) A485L. En algunos casos, las modificaciones incluyen D141A, E143A y A485L.

60 *Detección y cuantificación*

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además detectar y/o cuantificar un producto de amplificación de ácido nucleico. Un producto de amplificación puede detectarse y/o cuantificarse mediante cualquier método de detección y/o cuantificación adecuado que incluye, por ejemplo, cualquier método de detección o método de cuantificación descrito en el presente documento. Ejemplos no limitantes de métodos de detección y/o cuantificación incluyen baliza molecular (por ejemplo, tiempo real, punto final), flujo lateral, transferencia de energía

por resonancia de fluorescencia (FRET), polarización de fluorescencia (FP), captura de superficie, sondas de hidrólisis de exonucleasa 5' a 3' (por ejemplo, TAQMAN), colorantes intercalantes/de unión, métodos de absorbancia (por ejemplo, colorimétricos, turbidez), electroforesis (por ejemplo, electroforesis en gel, electroforesis capilar), espectrometría de masas, secuenciación de ácidos nucleicos, amplificación digital, un método de extensión de cebador (por ejemplo, iPLEX™), tecnología de sonda de inversión molecular (MIP) de Affymetrix, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (análisis de RFLP), análisis de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO), PCR específica de metilación (MSPCR), análisis de pirosecuenciación, análisis de acicloprima, transferencia puntual inversa, micronealinearos de GeneChip, hibridación específica de alelos dinámica (DASH), sondas de ácido nucleico peptídico (PNA) y ácidos nucleicos bloqueados (LNA), AlphaScreen, SNPstream, análisis de bits genéticos (GBA), minisequenciación múltiple, SNaPshot, ensayo GOOD, minisec. de microalineamientos, extensión de cebadores en alineamientos (APEX), extensión de cebadores en microalineamientos, alineamientos de etiquetas, microesferas codificadas, incorporación dirigida por molde (TDI), ensayo de ligación de oligonucleótidos colorimétrico (OLA), OLA codificada por secuencia, ligación de microalineamientos, reacción en cadena de la ligasa, sondas de candado, ensayo de invasor, hibridación usando al menos una sonda, hibridación usando al menos una sonda marcada con fluorescencia, clonación y secuenciación, el uso de sondas de hibridación y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR), secuenciación de nanoporos, chips y combinaciones de los mismos. En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de un método de detección en tiempo real (es decir, el producto se detecta y/o monitoriza de manera continua durante un proceso de amplificación). En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de un método de detección de punto final (es decir, el producto se detecta después de completar o detener un proceso de amplificación). Los métodos de detección de ácidos nucleicos también pueden emplear el uso de nucleótidos marcados incorporados directamente en una secuencia diana o en sondas que contienen secuencias complementarias a una diana. Tales marcadores pueden ser de naturaleza radiactiva y/o fluorescente y pueden resolverse de cualquiera de las maneras comentadas en el presente documento. La cuantificación de un producto de amplificación de ácido nucleico puede lograrse usando ciertos métodos de detección descritos a continuación. En ciertos casos, puede usarse un método de detección junto con una medición de la intensidad de la señal, y/o generación de (o referencia a) una curva patrón y/o tabla de consulta para la cuantificación de un producto de amplificación de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de tecnología de baliza molecular. El término baliza molecular generalmente se refiere a una molécula detectable, donde la propiedad detectable de la molécula es detectable en ciertas condiciones, permitiendo de ese modo que la molécula funcione como una señal específica e informativa. Ejemplos no limitantes de propiedades detectables incluyen propiedades ópticas (por ejemplo, fluorescencia), propiedades eléctricas, propiedades magnéticas, propiedades químicas y tiempo o velocidad a través de una abertura de tamaño conocido. Las balizas moleculares para detectar moléculas de ácido nucleico pueden ser, por ejemplo, oligonucleótidos en forma de horquilla que contienen un fluoróforo en un extremo y un colorante desactivador en el extremo opuesto. El bucle de la horquilla puede contener una secuencia de sonda que es complementaria a una secuencia diana y el tallo se forma mediante el apareamiento de secuencias de brazo complementarias ubicadas a cada lado de la secuencia de sonda. Un fluoróforo y una molécula desactivadora pueden unirse covalentemente en extremos opuestos de cada brazo. En condiciones que evitan que los oligonucleótidos se hibriden con su diana complementaria o cuando la baliza molecular está libre en disolución, las moléculas fluorescentes y desactivadoras están próximas entre sí evitando la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Cuando la baliza molecular se encuentra con una molécula diana (por ejemplo, un producto de amplificación de ácido nucleico), puede producirse hibridación, y la estructura del bucle se convierte en una conformación más rígida estable que provoca la separación de las moléculas de fluoróforo y desactivadoras conduciendo a la fluorescencia (Tyagi *et al.* Nature Biotechnology 14: marzo de 1996, 303-308). Debido a la especificidad de la sonda, la generación de fluorescencia generalmente se debe exclusivamente a la síntesis del producto amplificado previsto. En algunos casos, una secuencia de sonda de baliza molecular se hibrida con una secuencia en un producto de amplificación que es idéntica o complementaria a una secuencia en un ácido nucleico diana. En algunos casos, una secuencia de sonda de baliza molecular se hibrida con una secuencia en un producto de amplificación que no es idéntica o complementaria a una secuencia en un ácido nucleico diana (por ejemplo, se hibrida con una secuencia añadida a un producto de amplificación por medio de un cebador de amplificación con cola o ligación).

Las balizas moleculares son altamente específicas y pueden discernir un polimorfismo de un solo nucleótido. También pueden sintetizarse balizas moleculares con fluoróforos de diferentes colores y diferentes secuencias diana, permitiendo la detección simultánea de varios productos en la misma reacción (por ejemplo, en una reacción múltiple). Para procesos cuantitativos de amplificación, las balizas moleculares pueden unirse específicamente a la diana amplificada después de cada ciclo de amplificación, y debido a que las balizas moleculares no hibridadas son oscuras, no es necesario aislar los híbridos sonda-diana para determinar cuantitativamente la cantidad de producto amplificado. La señal resultante es proporcional a la cantidad de producto amplificado. La detección usando balizas moleculares puede hacerse en tiempo real o como un método de detección de punto final. En algunos casos, ciertas condiciones de reacción pueden optimizarse para cada conjunto de cebador/sonda para garantizar la precisión y exactitud.

En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de flujo lateral. El uso de flujo lateral normalmente incluye el uso de un dispositivo de flujo lateral. Estos dispositivos generalmente incluyen una trayectoria de flujo permeable a fluido en fase sólida a través de la cual el fluido fluye a su través por la fuerza

capilar. Dispositivos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ensayos de tira reactiva y placas cromatográficas de capa fina con diversos recubrimientos apropiados. Inmovilizados en la trayectoria de flujo se encuentran diversos reactivos de unión para la muestra, parejas de unión o conjugados que implican parejas de unión para la muestra y sistemas productores de señales. La detección puede lograrse de varias maneras, incluyendo, por ejemplo, detección enzimática, detección por nanopartículas, detección colorimétrica y detección de fluorescencia. La detección enzimática puede implicar sondas marcadas con enzimas que se hibridan con dianas auxiliares nucleicas complementarias en la superficie del dispositivo de flujo lateral. El complejo resultante puede tratarse con marcadores apropiados para desarrollar una señal legible. La detección con nanopartículas implica tecnología de perlas que puede usar oro coloidal, látex y/o nanopartículas paramagnéticas. En un ejemplo, las perlas pueden conjugarse con un anticuerpo anti-biotina. Las secuencias diana pueden estar directamente biotiniladas, o las secuencias diana pueden hibridarse con sondas biotiniladas específicas de secuencia. El oro y el látex dan lugar a señales colorimétricas visibles a simple vista, y las partículas paramagnéticas dan lugar a una señal no visual cuando se excitan en un campo magnético y pueden interpretarse por un lector especializado. También pueden usarse métodos de detección de flujo lateral basados en fluorescencia e incluyen, por ejemplo, métodos de sonda doble de fluoresceína y oligo marcado con biotina, UPT-N ALP utilizando indicadores de fósforo con nanopartículas de conversión ascendente compuestos por elementos de lantánidos incrustados en un cristal (Corstjens *et al.*, *Clinical Chemistry*, 47:10, 1885-1893, 2001), y el uso de puntos cuánticos.

Los ácidos nucleicos pueden capturarse en dispositivos de flujo lateral. Los medios de captura pueden incluir métodos dependientes de anticuerpos e independientes de anticuerpos. La captura dependiente de anticuerpos generalmente comprende una línea de captura de anticuerpos y una sonda marcada de secuencia complementaria a la diana. La captura independiente de anticuerpos generalmente usa interacciones no covalentes entre dos parejas de unión, por ejemplo, la alta afinidad y la unión irreversible entre una sonda biotinilada y una línea de estreptavidina. Las sondas de captura pueden inmovilizarse directamente en membranas de flujo lateral. Pueden usarse tanto métodos dependientes de anticuerpos como independientes de anticuerpos, por ejemplo, para detectar productos de amplificación generados en una reacción múltiple.

En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). FRET es un mecanismo de transferencia de energía entre dos cromóforos: una molécula donadora y una aceptora. Brevemente, se excita una molécula de fluoróforo donadora a una longitud de onda de excitación específica. La emisión posterior de la molécula donadora a medida que vuelve a su estado fundamental puede transferir energía de excitación a la molécula aceptora a través de una interacción dipolo-dipolo de largo alcance. La intensidad de emisión de la molécula aceptora puede monitorizarse y es una función de la distancia entre el donador y el aceptor, el solapamiento del espectro de emisión del donador y el espectro de absorción del aceptor y la orientación del momento dipolar de emisión del donador y el momento dipolar de absorción del aceptor. FRET puede ser útil para cuantificar la dinámica molecular, por ejemplo, en interacciones de ADN-ADN como se describe para balizas moleculares. Para monitorizar la producción de un producto específico, una sonda puede marcarse con una molécula donadora en un extremo y una molécula aceptora en el otro. La hibridación de sonda-diana conlleva un cambio en la distancia u orientación del donador y el aceptor y se observa un cambio de FRET.

En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de polarización de fluorescencia (FP). Las técnicas de polarización de fluorescencia generalmente se basan en el principio de que un compuesto marcado con fluorescencia, cuando se excita por luz polarizada linealmente, emitirá fluorescencia que tiene un grado de polarización inversamente relacionado con su velocidad de rotación. Por lo tanto, cuando una molécula tal como un conjugado de trazador-ácido nucleico, por ejemplo, que tiene un marcador fluorescente, se excita con luz polarizada linealmente, la luz emitida permanece altamente polarizada porque el fluoróforo está restringido con respecto a rotación entre el momento en el que la luz se absorbe y se emite. Cuando un compuesto trazador libre (es decir, no unido a un ácido nucleico) se excita por luz polarizada linealmente, su rotación es mucho más rápida que el conjugado de trazador-ácido nucleico correspondiente y las moléculas están orientadas más aleatoriamente, por lo tanto, la luz emitida está despolarizada. Por lo tanto, la polarización de fluorescencia proporciona un medio cuantitativo para medir la cantidad de conjugado de trazador-ácido nucleico producido en una reacción de amplificación.

En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de captura de superficie. Esto puede lograrse mediante la inmovilización de oligonucleótidos específicos en una superficie que produce un biosensor que es altamente sensible y selectivo. Las superficies de ejemplo que pueden usarse incluyen oro y carbono, y un método de captura de superficie puede usar una serie de métodos de acoplamiento covalente o no covalente para unir una sonda a la superficie. La detección posterior de un ácido nucleico diana puede monitorizarse mediante una variedad de métodos.

En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de sondas de hidrólisis de exonucleasa 5' a 3' (por ejemplo, TAQMAN). Las sondas TAQMAN, por ejemplo, son sondas de hidrólisis que pueden aumentar la especificidad de un método de amplificación cuantitativo (por ejemplo, PCR cuantitativa). El principio de la sonda TAQMAN se basa en 1) la actividad de exonucleasa 5' a 3' de la polimerasa Taq para escindir una sonda de doble marcaje durante la hibridación con una secuencia diana complementaria y 2) la detección basada en fluoróforo. Una señal de fluorescencia resultante permite mediciones cuantitativas de la acumulación de producto

de amplificación durante las etapas exponenciales de amplificación, y la sonda TAQMAN puede aumentar significativamente la especificidad de la detección.

5 En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de colorantes intercalantes y/o de unión. En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de colorantes que tiñen específicamente el ácido nucleico. Por ejemplo, los colorantes intercalantes presentan fluorescencia mejorada tras la unión al ADN o al ARN. Los colorantes pueden incluir fluoróforos intercalantes de ADN o ARN y pueden incluir, por ejemplo, SYTO® 82, naranja de acridina, bromuro de etidio, colorantes Hoechst, PicoGreen®, yoduro de propidio, SYBR® I (un colorante de cianina asimétrico), SYBR® II, TOTO (un dímero naranja de tiaxol) y YOYO (un dímero amarillo de oxazol). Los colorantes proporcionan una oportunidad para aumentar la sensibilidad de la detección de ácidos nucleicos cuando se usan junto con diversos métodos de detección. Por ejemplo, puede usarse bromuro de etidio para teñir ADN en geles de agarosa después de la electroforesis en gel; pueden usarse yoduro de propidio y Hoechst 33258 en citometría de flujo para determinar la ploidía del ADN de las células; puede usarse SYBR® Green 1 en el análisis de ADN bicatenario mediante electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser; y puede usarse PicoGreen® para mejorar la detección de ADN bicatenario después de la cromatografía de polinucleótidos de pares de iones emparejados.

20 En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de métodos de absorbancia (por ejemplo, colorimétricos, turbidez). En algunos casos, la detección y/o cuantificación del ácido nucleico puede lograrse mediante la absorbancia de conversión directa (por ejemplo, mediciones de absorbancia UV a 260 nm) en concentración, por ejemplo. La medición directa del ácido nucleico puede convertirse en concentración usando la ley de Beer Lambert que relaciona la absorbancia con la concentración usando la longitud de trayectoria de la medición y un coeficiente de extinción. En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de un método de detección colorimétrica. Puede usarse cualquier detección colorimétrica adecuada, y ejemplos no limitantes incluyen ensayos que usan nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas metálicas, nanopartículas modificadas, nanopartículas no modificadas) y/o sondas de ácido nucleico peptídico (PNA). Por ejemplo, ciertos métodos basados en nanopartículas de oro normalmente se basan en un acoplamiento cuantitativo entre el reconocimiento de diana y la agregación de las nanopartículas que, a su vez, puede conducir a un cambio en las propiedades fotónicas (por ejemplo, color) de una disolución de nanopartículas.

30 En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de electroforesis (por ejemplo, electroforesis en gel, electroforesis capilar). La electroforesis en gel implica la separación de ácidos nucleicos a través de una matriz, generalmente un polímero reticulado, usando una fuerza electromotriz que tira de las moléculas a través de la matriz. Las moléculas se mueven a través de la matriz a diferentes velocidades provocando una separación entre productos que pueden visualizarse e interpretarse a través de una serie de métodos que incluyen, pero no se limitan a; autorradiografía, obtención de imágenes de fósforo y tinción con colorantes quelantes de ácido nucleico. La electroforesis en gel capilar (CGE) es una combinación de electroforesis en gel tradicional y cromatografía de líquidos que emplea un medio tal como poliacrilamida en un capilar de calibre estrecho para generar separaciones rápidas y de alta eficiencia de moléculas de ácido nucleico con resolución de hasta una sola base. La CGE puede combinarse con la detección de fluorescencia inducida por láser (LIF) donde pueden detectarse tan solo seis moléculas de ADN teñido. La detección de CGE/LIF generalmente implica el uso de colorantes fluorescentes intercalantes del ADN que incluyen bromuro de etidio, YOYO y SYBR® Green 1, y también puede implicar el uso de derivados fluorescentes de ADN donde el colorante fluorescente está unido covalentemente al ADN. Puede hacerse la identificación simultánea de varias secuencias diana diferentes (por ejemplo, productos de una reacción múltiple) usando este método.

50 En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de espectrometría de masas. La espectrometría de masas es una técnica analítica que puede usarse para determinar la estructura y cantidad de un ácido nucleico y puede usarse para proporcionar un análisis rápido de mezclas complejas. Después de la amplificación, las muestras pueden ionizarse, los iones resultantes se separan en campos eléctricos y/o magnéticos según su razón de masa con respecto a carga, y un detector mide la razón de masa con respecto a carga de los iones (Crain, P. F. y McCloskey, J. A., Current Opinion in Biotechnology 9: 25-34 (1998)). Los métodos de espectrometría de masas incluyen, por ejemplo, MALDI, MALDI-TOF o electropulverización. Estos métodos pueden combinarse con cromatografía de gases (GC/MS) y cromatografía de líquidos (LC/MS). La espectrometría de masas (por ejemplo, espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI MS)) puede ser de alto rendimiento debido a la adquisición de señales a alta velocidad y al análisis automatizado fuera de las superficies sólidas.

60 En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de secuenciación de ácido nucleico. Puede determinarse la secuencia completa o una secuencia parcial de un producto de amplificación, y la secuencia de nucleótidos determinada puede denominarse lectura. Por ejemplo, los productos de amplificación lineal pueden analizarse directamente sin amplificación adicional en algunos casos (por ejemplo, mediante el uso de la metodología de secuenciación de moléculas individuales). En ciertos casos, los productos de amplificación lineal pueden someterse a amplificación adicional y luego analizarse (por ejemplo, usando metodología de secuenciación por ligación o pirosecuenciación). Las lecturas pueden someterse a diferentes tipos de análisis de secuencia. Puede utilizarse cualquier método de secuenciación adecuado para detectar, y en algunos casos determinar la cantidad de, productos detectables generados por los métodos de amplificación descritos en el presente documento. Ejemplos no

limitantes de métodos de secuenciación incluyen secuenciación de un solo extremo, secuenciación de extremos emparejados, secuenciación basada en terminador reversible, secuenciación por ligación, pirosecuenciación, secuenciación por síntesis, secuenciación de moléculas individuales, secuenciación múltiple, secuenciación de un solo nucleótido en fase sólida y secuenciación de nanoporos.

En algunos casos, detectar un producto de amplificación de ácido nucleico comprende el uso de amplificación digital (por ejemplo, PCR digital). La PCR digital, por ejemplo, aprovecha la amplificación de ácido nucleico (ADN, ADNc o ARN) en un nivel de molécula individual, y ofrece un método altamente sensible para cuantificar ácido nucleico con bajo número de copias. Están disponibles sistemas para la amplificación digital y el análisis de ácidos nucleicos (por ejemplo, Fluidigm® Corporation).

Kits

Los kits pueden comprender, por ejemplo, una o más polimerasas y uno o más cebadores, y opcionalmente una o más transcriptasas inversas, como se describe en el presente documento. Cuando se amplifica una diana, puede incluirse un par de cebadores (directo e inverso) en el kit. Cuando se amplifican múltiples secuencias diana, puede incluirse una pluralidad de pares de cebadores en el kit. Un kit puede incluir un polinucleótido de control, y cuando se amplifican múltiples secuencias diana, puede incluirse una pluralidad de polinucleótidos de control en el kit.

Los kits también pueden comprender uno o más de los componentes en cualquier número de depósitos, cámaras, recipientes, paquetes, tubos, viales, placas de microtitulación separados y similares, o los componentes pueden combinarse en diversas combinaciones en tales recipientes. Los componentes del kit pueden, por ejemplo, estar presentes en uno o más recipientes. En algunos casos, todos los componentes se proporcionan en un recipiente. En algunos casos, las enzimas (por ejemplo, la(s) polimerasa(s) y/o transcriptasa(s) inversa(s)) pueden proporcionarse en un recipiente separado de los cebadores. Los componentes pueden, por ejemplo, liofilizarse, secarse por congelación o en un tampón estable. En un ejemplo, la(s) polimerasa(s) y/o transcriptasa(s) inversa(s) está(n) en forma liofilizada en un único recipiente, y los cebadores están o bien liofilizados, o bien secados por congelación o bien en tampón, en un recipiente diferente. En algunos casos, la(s) polimerasa(s) y/o transcriptasa(s) inversa(s), y los cebadores están, en forma liofilizada, en un único recipiente.

Los kits pueden comprender además, por ejemplo, dNTP usados en la reacción, o nucleótidos modificados, depósitos, cubetas u otros recipientes usados para la reacción, o un vial de agua o tampón para rehidratar componentes liofilizados. El tampón usado puede, por ejemplo, ser apropiado tanto para la actividad de polimerasa como de apareamiento de cebadores.

Los kits también pueden comprender instrucciones para realizar uno o más métodos descritos en el presente documento y/o una descripción de uno o más componentes descritos en el presente documento. Las instrucciones y/o descripciones pueden estar en forma impresa y pueden incluirse en un inserto de kit. Un kit también puede incluir una descripción escrita de una ubicación de Internet que proporciona tales instrucciones o descripciones.

Los kits pueden comprender además reactivos usados para métodos de detección, tales como, por ejemplo, reactivos usados para FRET, dispositivos de flujo lateral, tiras reactivas, colorante fluorescente, partículas de oro coloidal, partículas de látex, una baliza molecular o perlas de poliestireno.

Ejemplos

Los ejemplos expuestos a continuación ilustran ciertas realizaciones y no limitan la tecnología.

Ejemplo 1: Detección de Chlamydia trachomatis mediante tecnología de amplificación isotérmica

En este ejemplo, se realiza la detección de ácido nucleico de *Chlamydia trachomatis* usando tecnología de amplificación isotérmica.

Detección en tiempo real de ADN genómico de clamidia

Se sometió a prueba un ensayo en tiempo real para la detección de ADN genómico de clamidia con colorante de ADN fluorescente. En este ensayo, se usó SYTO 82, que es una tinción de ácido nucleico fluorescente naranja que presenta fluorescencia naranja brillante tras la unión a ácidos nucleicos. Se prepararon disoluciones de mezcla maestra con Tris-HCl 20 mM pH 8,8 a 25 °C, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 4 mM, Triton® X-100 al 0,1%, DTT 1 mM, SYTO 82 2 μM, dNTP 0,25 mM y 1 unidad por reacción de ADN polimerasa 9 grados norte (del inglés, 9 *Degrees North DNA polymerase*) (9°Nm™) modificada (New England BioLabs, Ipswich, MA). La secuencia de aminoácidos de la ADN polimerasa 9°Nm™ se expone en el presente documento como SEQ ID NO:9. Se usó un conjunto de cebadores que selecciona como diana una secuencia específica dentro de los 7.500 pares de bases del ADN plasmídico críptico de *C. trachomatis*, que incluía un cebador directo de 11 nucleótidos (es decir, Ct_F11: 5'-GGCTTATGGAG-3' (SEQ ID NO:1)) y un cebador inverso de 10 nucleótidos (es decir, Ct_R10: 5'-ATACCGCTTA-3' (SEQ ID NO:2)). El ensayo se diseñó para generar productos de ADN de 22 bases que incluyen un espaciador de una base. El espaciador es un

nucleótido entre los extremos 3' de los cebadores, y este nucleótido no está presente en ninguna de las secuencias de cebadores. Los cebadores se usaron cada uno a una concentración final de 500 nM, y se mezclaron con 2000 copias de ADN genómico de clamidia o tampón Tris-EDTA (TE) como control sin diana (NTC). En ciertos casos, se usó dH₂O como NTC. Las mezclas de cebadores se colocaron en pocillos de reacción separados de las disoluciones de mezcla maestra. Los componentes del ensayo se incubaron a 65 °C durante 2 minutos, y después se combinaron para iniciar la reacción isotérmica. Los resultados de la reacción de amplificación isotérmica se presentan en la figura 1.

Confirmación por espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) de generación de producto específico a partir de reacciones de amplificación isotérmica

Los productos de amplificación generados a partir de las reacciones de amplificación isotérmica descritas anteriormente se sometieron a prueba mediante espectrometría de masas de ionización por electropulverización (ESI-MS) para verificar la especificidad del ensayo. Los cebadores descritos anteriormente se usaron cada uno a una concentración final de 500 nM, y se mezclaron con o bien 20.000 copias de ADN genómico de clamidia o bien tampón Tris-EDTA (TE) como control sin diana (NTC). En ciertos casos, se usó dH₂O como NTC. El ADN genómico de clamidia se amplificó a 65 °C durante 10 minutos en las condiciones descritas anteriormente. Después de la amplificación, las reacciones se inactivaron con Tris-EGTA (Tris-EGTA 20 mM final, pH 8,5). Las reacciones se desalaron entonces y se liofilizaron antes del análisis por ESI-MS.

Como se muestra en la figura 2, los resultados de ESI-MS confirmaron que los productos dominantes de la amplificación isotérmica del ADN genómico eran productos específicos de 22 bases (es decir, producto directo de 22 bases y producto inverso de 22 bases). En comparación, la reacción de NTC generó productos no específicos con mucha menos intensidad que aquellas con productos específicos.

Límite de detección (LOD) para la detección de ADN genómico de clamidia

La sensibilidad de la detección de ADN genómico de clamidia se sometió a prueba usando un ensayo de amplificación isotérmica. Bajo este enfoque, se usó un ensayo de cebador de 10 nucleótidos en condiciones de amplificación asimétrica para la detección de balizas moleculares de punto final. Se preparó una disolución de mezcla maestra con Tris-HCl 20 mM pH 8,8 a 25 °C, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 4 mM, Triton® X-100 al 0,1%, DTT 1 mM, dNTP 0,25 mM y 1 unidad por reacción de ADN polimerasa 9 grados norte (9°Nm™) modificada (New England BioLabs, Ipswich, MA). Se usó un conjunto de cebadores que selecciona como diana una secuencia específica dentro de los 7.500 pares de bases del ADN plasmídico críptico de *C. trachomatis*, que incluía un cebador directo de 10 nucleótidos (es decir, Ct_F10: 5'-GCTTATGGAG-3' (SEQ ID NO:3)) y un cebador inverso de 10 nucleótidos (es decir, Ct_R10: 5'-ATACCGCTTA-3' (SEQ ID NO:2)). El ensayo se diseñó para generar un producto de ADN de 21 bases, que incluía un espaciador de una base. El espaciador es un nucleótido entre los extremos 3' de los cebadores, y este nucleótido no está presente en ninguna de las secuencias de cebadores. Los cebadores (es decir, cebador directo 750 nM y cebador inverso 200 nM) se mezclaron con TE como NTC o diferentes cantidades de ADN genómico de clamidia (es decir, 20 copias, 200 copias, 1.000 copias, 2.000 copias) y se colocaron en pocillos de reacción separados de las disoluciones de mezcla maestra. En ciertos casos, se usó dH₂O como NTC. Los componentes de ensayo se incubaron a 65 °C durante 2 minutos, después se combinaron para iniciar la reacción isotérmica. Las reacciones se llevaron a cabo durante 10 minutos a 65 °C, y después se inactivaron colocando en hielo y añadiendo EGTA. Una baliza molecular (es decir, Ct_FP_MB5.18: Fam-CTGGCTACCGCTTA ACTCCATAAGCCAG-3BHQ1 (SEQ ID NO:4)) que contiene una secuencia de 20 bases complementaria al producto directo específico de 21 bases se añadió entonces a cada pocillo de reacción. Los productos de reacción se detectaron mediante lecturas de fluorescencia de punto final de la baliza molecular. Como se muestra en la figura 3, la reacción isotérmica puede amplificar 20 copias de ADN genómico de clamidia a niveles detectables en 10 minutos a 65 °C usando detección de punto final de una baliza molecular.

Detección de ADN genómico de clamidia en tiempo real por baliza molecular

Otro enfoque para la detección en tiempo real del ADN genómico de clamidia es usar balizas moleculares para la detección. Bajo este enfoque, se usó un ensayo de cebador de 10 nucleótidos en condiciones de amplificación asimétrica para la detección de balizas moleculares en tiempo real con dH₂O o TE usado como control sin diana (NTC). Se prepararon mezclas maestras usando Tris-HCl 20 mM pH 8,8 a 25 °C, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 4 mM, Triton®X-100 al 0,1%, fMB2 3PS 50 nM (baliza molecular), dNTP 0,25 mM y 1 unidad/reacción de ADN polimerasa 9 grados norte (9°Nm™) modificada (New England BioLabs, Ipswich, MA). La mezcla maestra incluía una baliza molecular (es decir, Ct_3PSMB.2: Fam-cgcgcgagccttATACCGCTTA ACTCg*c*g*g-IBFQ (SEQ ID NO:7)) que contenía una secuencia de 14 bases complementaria a una parte del producto directo (la secuencia de 14 bases se muestra en letras mayúsculas). Los nucleótidos marcados con * son bases de ADN modificadas con fosfortioato. Se usó un conjunto de cebadores que selecciona como diana una secuencia específica dentro de los 7.500 pares de bases del ADN plasmídico críptico de *C. trachomatis*, que incluía un cebador directo de 10 nucleótidos (es decir, Ct_F10+2: 5'-AGGCTTATGG-3' (SEQ ID NO:5)) y un cebador inverso de 10 nucleótidos (es decir, Ct_R10-2: 5'-TTATACCGCT-3' (SEQ ID NO:6)). El ensayo se diseñó para generar un producto de ADN de 25 bases, que incluía un espaciador de 5 bases. El espaciador incluye 5 nucleótidos entre los extremos 3' de cada cebador, y estos 5

nucleótidos no están presentes en ninguna de las secuencias de cebadores. Los cebadores (es decir, cebador directo 750 nM y cebador inverso 200 nM) se combinaron con TE como NTC o 20.000 copias de ADN genómico de clamidia en pocillos de reacción. En ciertos casos, se usó dH₂O como NTC. Todos los componentes se incubaron a 65 °C durante 2 minutos, después se combinaron para iniciar la reacción isotérmica llevada a cabo a 65 °C. Los productos de reacción se detectaron en diversos puntos de tiempo mediante lecturas de fluorescencia en tiempo real de la baliza molecular, como se muestra en la figura 4.

Ejemplo 2: Ejemplos de secuencias

10 A continuación en el presente documento se proporcionan ejemplos no limitantes de ciertas secuencias de nucleótidos y aminoácidos.

Tabla 1: Ejemplos de secuencias			
SEQ ID NO	Nombre	Tipo	Secuencia
1	Ct F11	NA	GGCTTATGGAG
2	Ct R10	NA	ATACCGCTTA
3	Ct F10	NA	GCTTATGGAG
4	Ct FP MB5.18	NA	CTGGCTACCGCTTAACTCCATAAGCCAG
5	Ct F10 +2	NA	AGGCTTATGG
6	Ct R10 -2	NA	TTATACCGCT
7	Ct_3PSM B.2	NA	cgcgagccttATACCGCTTAACTCg*c*g*g
8	9°N	AA	MILDTDYITENGGKPVIRVFKKENGFEFKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEDVKK VTAKRHGTVVVKVRAEKVQKKFLGRPIEVWKL YFNHPQDVP AIRDRIRAH P AVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEEL TMLAFDIETLYHEGEEFGTGPIL MISYADGSEARVITWKKIDL PYVDVVSTEKEMIKRFLRVVREKDPDLITYN GDNFDFAYLKKRCEELGIKFTLGRD GSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDL Y PVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGKPK EKVYAEI AQAWESGEGLERVARYSM EDAKVTYELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSSTGNLVEWFLLRKAYK RNELAPNKPDERELARRRGGYAGGYVKEPERGLWONIVYLDFRSLYPSIIIT HNVSPDTLNREGCKEYDVAPEVGHKFKDFPGFIPSLLDLLEERQKIKRK MKATVDPLEKLLDYRQRAIKILANSFYGYGYAKARWYCKECAESVTAW GREYIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKKAKEFLKYINP KLPGLLELEYEGFYVRGFFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKET QARVLEAILKHGDVEEA VRIVKEVTEKLSKYEVPEKLVHEQITRDLRDYKA TGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADEFDPTKHRY DAEYYIENQVLP AVERILKAFGYRKEDLRYQKTKQVGLGAWLVKVGKK
9	9°Nm TM	AA	MILDTDYITENGGKPVIRVFKKENGFEFKIEYDRTFEPYFYALLKDDSAIEDVKK VTAKRHGTVVVKVRAEKVQKKFLGRPIEVWKL YFNHPQDVP AIRDRIRAH P AVVDIYEYDIPFAKRYLIDKGLIPMEGDEEL TMLAFDIETLYHEGEEFGTGPIL MISYADGSEARVITWKKIDL PYVDVVSTEKEMIKRFLRVVREKDPDLITYN GDNFDFAYLKKRCEELGIKFTLGRD GSEPKIQRMGDRFAVEVKGRIFDL Y PVIRRTINLPTYTLEAVYEAVFGKPK EKVYAEI AQAWESGEGLERVARYSM EDAKVTYELGREFFPMEAQLSRLIGQSLWDVSRSSSTGNLVEWFLLRKAYK RNELAPNKPDERELARRRGGYAGGYVKEPERGLWONIVYLDFRSLYPSIIIT HNVSPDTLNREGCKEYDVAPEVGHKFKDFPGFIPSLLDLLEERQKIKRK MKATVDPLEKLLDYRQRAIKILANSFYGYGYAKARWYCKECAESVTAW GREYIEMVIRELEEKFGFKVLYADTDGLHATIPGADAETVKKKAKEFLKYINP KLPGLLELEYEGFYVRGFFVTKKKYAVIDEEGKITTRGLEIVRRDWSEIAKET QARVLEAILKHGDVEEA VRIVKEVTEKLSKYEVPEKLVHEQITRDLRDYKA TGPHVAVAKRLAARGVKIRPGTVISYIVLKGSGRIGDRAIPADEFDPTKHRY DAEYYIENQVLP AVERILKAFGYRKEDLRYQKTKQVGLGAWLVKVGKK

* indica bases de ADN modificadas con fosforotato

15 La mención de las patentes, solicitudes de patente, publicaciones y documentos anteriores no es una admisión de que cualquiera de los anteriores es la técnica anterior pertinente, ni constituye ninguna admisión en cuanto al contenido o la fecha de estas publicaciones o documentos. Su mención no es una indicación de una búsqueda de divulgaciones relevantes. Todas las declaraciones con respecto a la(s) fecha(s) o contenido de los documentos se basan en información disponible y no es una admisión en cuanto a su exactitud o corrección.

20

5 La tecnología descrita ilustrativamente en el presente documento puede ponerse en práctica adecuadamente en
ausencia de cualquier elemento o elementos no dados a conocer específicamente en el presente documento. Por lo
tanto, por ejemplo, en cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos “que comprende”, “que consiste
esencialmente en” y “que consiste en” puede reemplazarse por cualquiera de los otros dos términos. El término “un”
o “una” puede referirse a uno de o una pluralidad de los elementos que modifica (por ejemplo, “un reactivo” puede
significar uno o más reactivos) a menos que esté contextualmente claro que se describe uno cualquiera de los
elementos o más de uno de los elementos. El término “aproximadamente”, como se usa en el presente documento,
se refiere a un valor dentro del 10 % del parámetro subyacente (es decir, más o menos 10 %), y el uso del término
10 “aproximadamente” al comienzo de una cadena de valores modifica cada uno de los valores (es decir,
“aproximadamente 1, 2 y 3” se refiere a aproximadamente 1, aproximadamente 2 y aproximadamente 3). Por ejemplo,
un peso de “aproximadamente 100 gramos” puede incluir pesos entre 90 gramos y 110 gramos. Además, cuando se
describe una lista de valores en el presente documento (por ejemplo, aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %
u 86 %) el listado incluye todos los valores intermedios y fraccionarios de los mismos (por ejemplo, el 54 %, 85,4 %).

15 Ciertas realizaciones de la tecnología se exponen en la(s) reivindicación/reivindicaciones que sigue(n).

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo el método:
- 5
- (a) amplificar una secuencia de ácido nucleico diana que comprende una primera cadena y una segunda cadena complementarias entre sí en una condición de amplificación isotérmica, en el que la amplificación comprende poner en contacto un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico diana con:
- 10
- i) un primer cebador y un segundo cebador, en el que el primer cebador es capaz de hibridarse con una secuencia de la primera cadena de la secuencia de ácido nucleico diana, y el segundo cebador es capaz de hibridarse con una secuencia de la segunda cadena de la secuencia de ácido nucleico diana; y
- 15
- ii) una enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila, generando de ese modo un producto de amplificación de ácido nucleico a niveles detectables en el plazo de 15 minutos, en el que el producto de amplificación de ácido nucleico comprende:
- (1) la secuencia del primer cebador, o el complemento inverso de la misma,
- 20
- (2) la secuencia del segundo cebador, o el complemento inverso de la misma, y
- (3) una secuencia espaciadora flanqueada por (1) la secuencia del primer cebador o el complemento inverso de la misma y (2) la secuencia del segundo cebador o el complemento inverso de la misma, en el que la secuencia espaciadora tiene de 1 a 10 bases de longitud; y
- 25
- en el que la amplificación no comprende usar ninguna enzima distinta de la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila; y
- (b) detectar el producto de amplificación de ácido nucleico.
- 30
2. El método según la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico es:
- (a) un ácido nucleico genómico, un ácido nucleico plasmídico, un ácido nucleico mitocondrial, un ácido nucleico celular, o un ácido nucleico extracelular;
- 35
- (b) un ácido nucleico bacteriano o un ácido nucleico vírico;
- (c) un ADN bicatenario; o
- 40
- (d) un producto de reacción de transcripción inversa, opcionalmente un producto de reacción de transcripción inversa generado a partir de un ARN celular, un ARNm, un microARN, un ARN bacteriano, o un ARN viral.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, que comprende además generar el ácido nucleico mediante una reacción de transcripción inversa antes de la etapa de amplificación (a).
- 45
4. Un método para detectar una secuencia de ácido nucleico diana en una muestra, comprendiendo el método:
- (a) poner en contacto un ARN de muestra en una muestra con una transcriptasa inversa y una enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila para generar un ADN bicatenario (ADNbc), en el que el ADNbc comprende una secuencia de ácido nucleico diana, y en el que la secuencia de ácido nucleico diana comprende una primera cadena y una segunda cadena complementarias entre sí;
- 50
- (b) amplificar la secuencia de ácido nucleico diana en una condición de amplificación isotérmica, en el que la amplificación comprende poner en contacto el ADNbc con:
- 55
- (i) un primer cebador y un segundo cebador, en el que el primer cebador es capaz de hibridarse con una secuencia de la primera cadena de la secuencia de ácido nucleico diana, y el segundo cebador es capaz de hibridarse con una secuencia de la segunda cadena de la secuencia de ácido nucleico diana; y
- 60
- (ii) la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila, generando de ese modo un producto de amplificación de ácido nucleico a niveles detectables en el plazo de 15 minutos, en el que el producto de amplificación de ácido nucleico comprende:
- (1) la secuencia del primer cebador, o el complemento inverso de la misma,
- 65

(2) la secuencia del segundo cebador, o el complemento inverso de la misma, y

(3) una secuencia espaciadora flanqueada por (1) la secuencia del primer cebador o el complemento inverso de la misma y (2) la secuencia del segundo cebador o el complemento inverso de la misma, en el que la secuencia espaciadora tiene de 1 a 10 bases de longitud; y

(c) detectar el producto de amplificación de ácido nucleico,

en el que el método no comprende usar ninguna enzima distinta de la transcriptasa inversa y la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila.

5. El método según la reivindicación 4, en el que el ARN de muestra es un ARN celular, un ARNm o un microARN, un ARN bacteriano, o un ARN viral.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que detectar el producto de amplificación de ácido nucleico comprende además determinar la cantidad del ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico diana, o la cantidad del ADNbc que comprende la secuencia de ácido nucleico diana, en la muestra.

7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el método no comprende poner en contacto el ácido nucleico o el ADNbc con una proteína de unión a ADN monocatenario antes de, o durante, la etapa de amplificación.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la secuencia de ácido nucleico diana es una secuencia de ácido nucleico bacteriano o una secuencia de ácido nucleico vírico.

9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que (1) la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila tiene una actividad transcriptasa inversa, y/o actividad exonucleasa baja o nula; o (2) la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 90 % idéntica con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o un fragmento funcional de la misma, y opcionalmente la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila es una polimerasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la muestra comprende ARN de procariontas o eucariotas, y opcionalmente la muestra comprende ARN de un virus o una bacteria.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana se realiza a una temperatura constante entre aproximadamente 55 grados Celsius a aproximadamente 75 grados Celsius, y opcionalmente a una temperatura constante de aproximadamente 65 grados Celsius.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que

(i) el primer cebador, el segundo cebador, o ambos (i-a) tiene aproximadamente de 8 a 16 bases de longitud, (i-b) comprende una o más bases de ADN, bases de ADN modificadas, o una combinación de las mismas; o ambas;

(ii) el producto de amplificación de ácido nucleico tiene aproximadamente de 20 a 40 pares de bases de longitud; y/o

(iii) la secuencia espaciadora comprende una parte de la secuencia de ácido nucleico diana, y opcionalmente la secuencia espaciadora tiene de 1 a 5 bases de longitud.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que detectar el producto de amplificación de ácido nucleico comprende:

(a) poner en contacto el producto de amplificación de ácido nucleico con un oligonucleótido de generación de señal capaz de hibridarse con el producto de amplificación, en el que el oligonucleótido de generación de señal comprende un fluoróforo, un desactivador, o ambos; o

(b) detectar una señal fluorescente, y opcionalmente la señal fluorescente es de una baliza molecular.

14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que el método se realiza en un único recipiente de reacción.

15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 4-14, en el que la muestra comprende ARN y se pone

en contacto con la transcriptasa inversa, la enzima que tiene una actividad polimerasa hipertermófila, y los cebadores primero y segundo simultáneamente.

FIG. 1

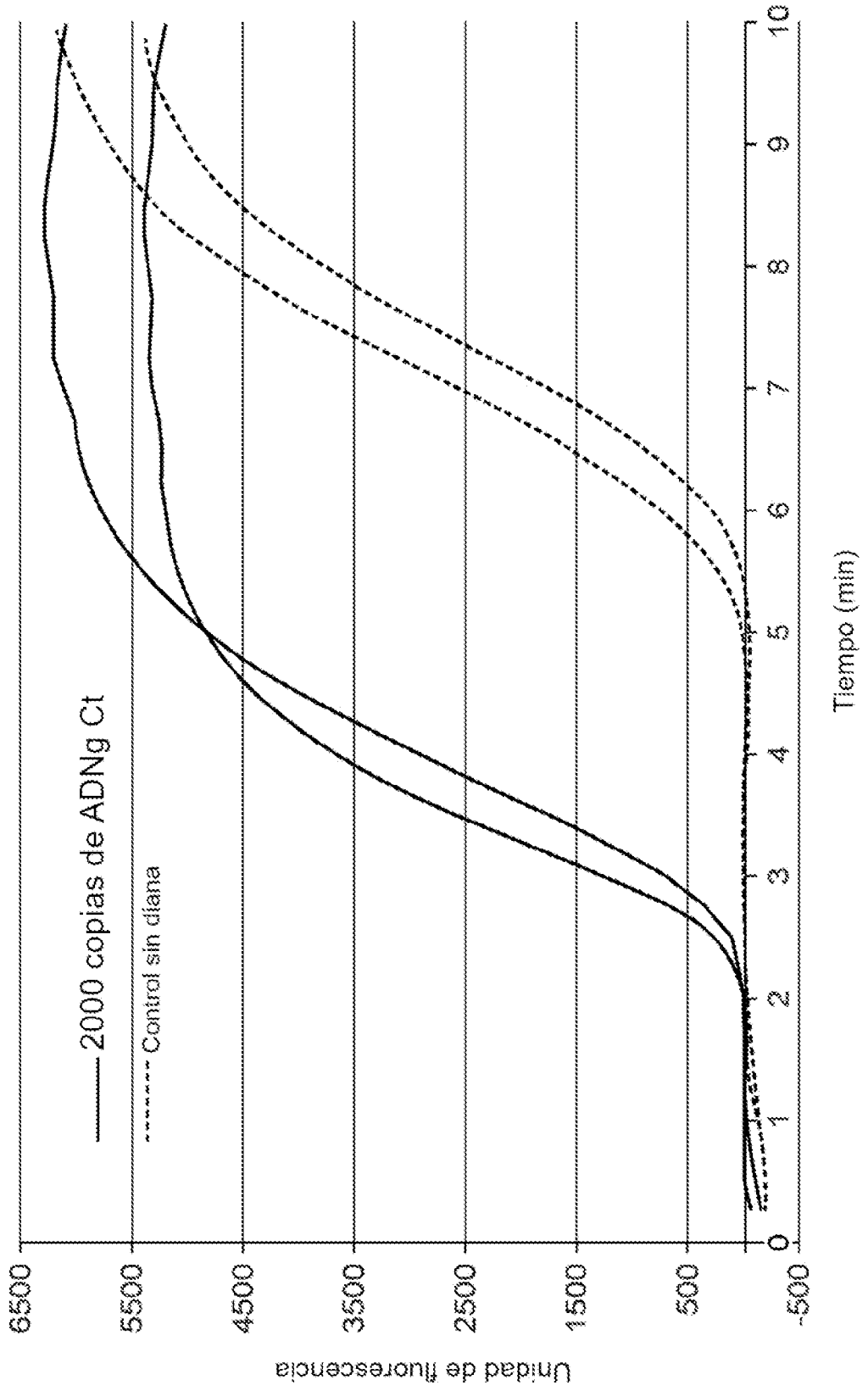


FIG. 2

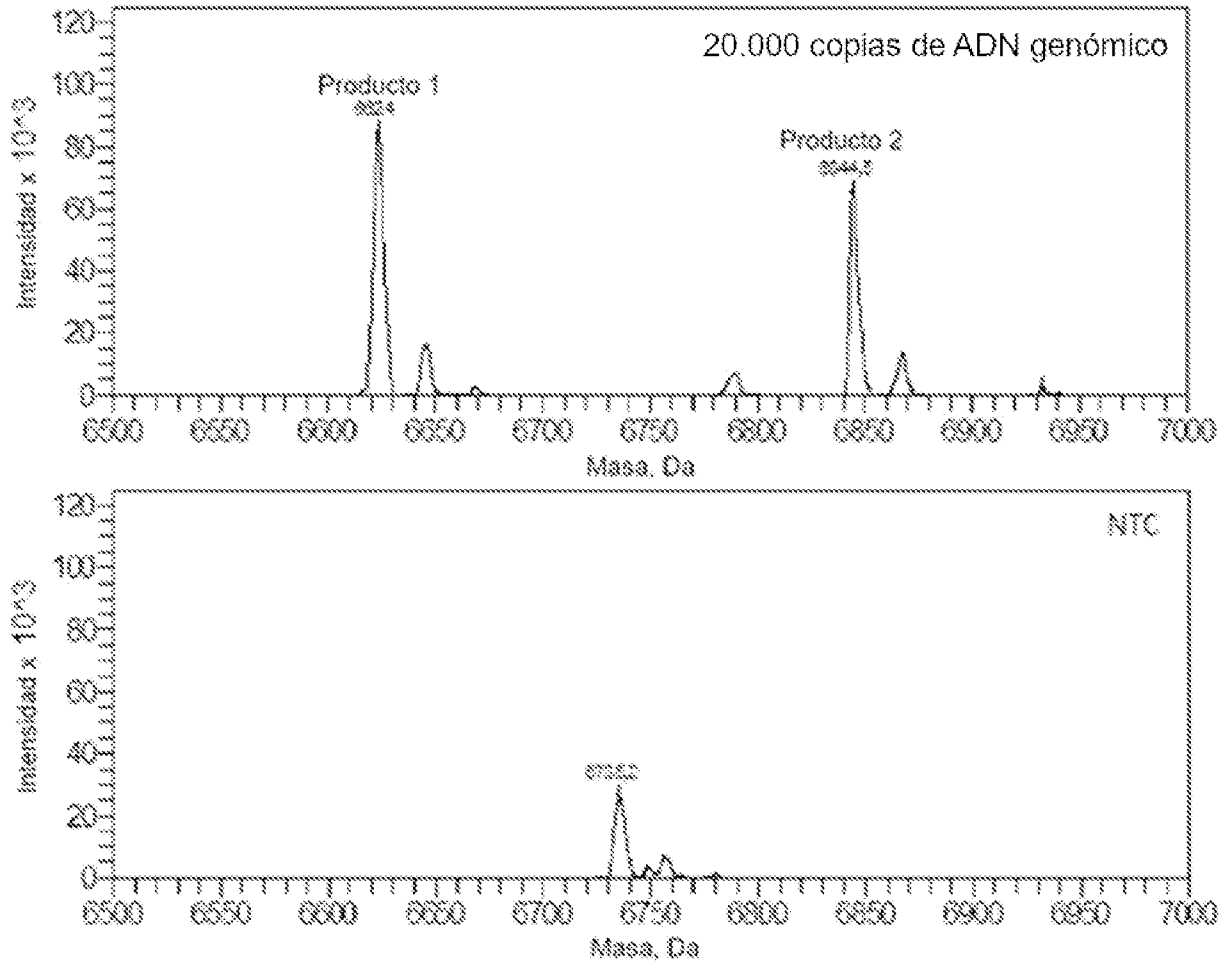


FIG. 3

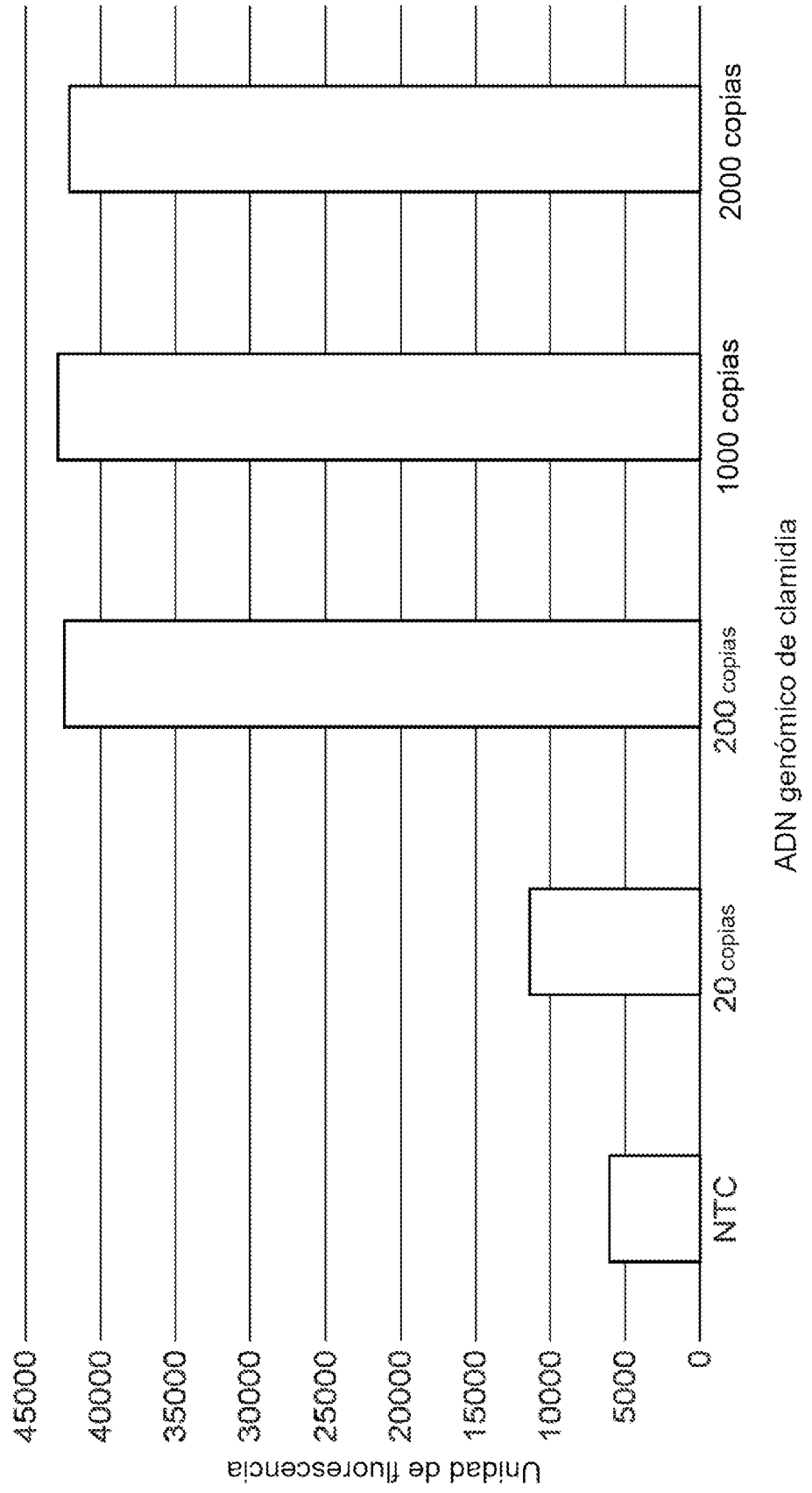


FIG. 4

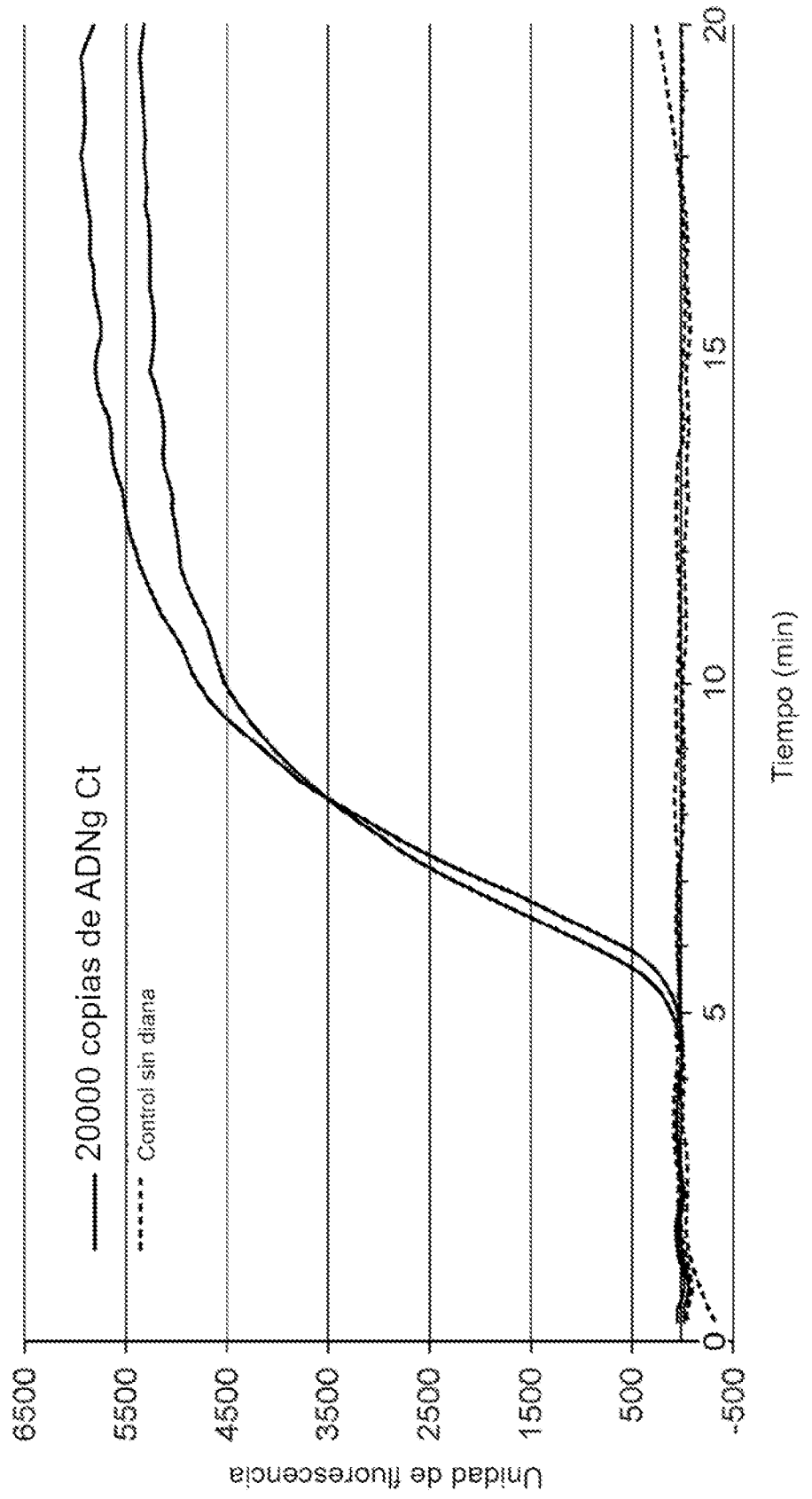


FIG. 5

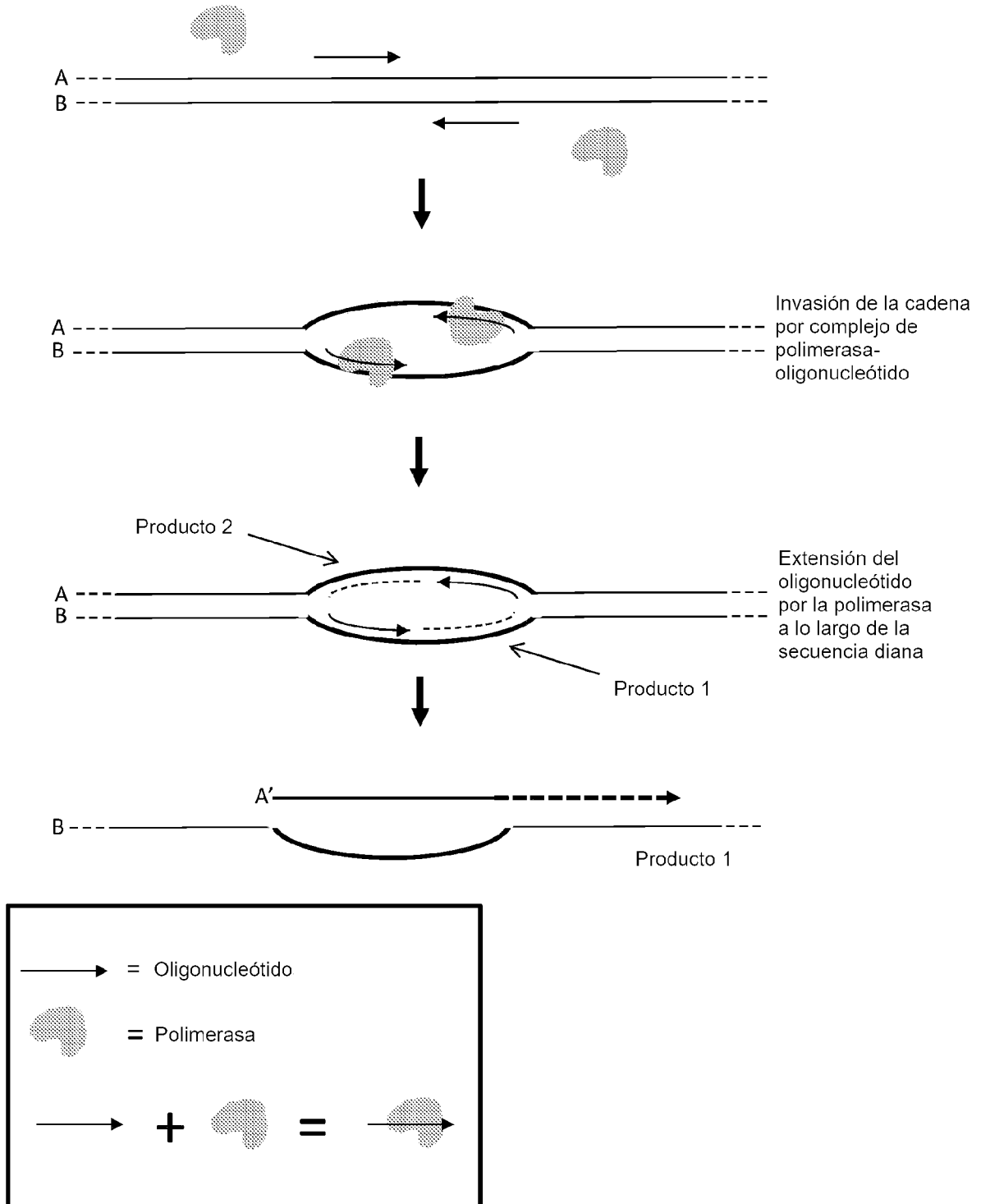


FIG. 5 (cont.)

