

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 621 390**

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)  
**C12Q 1/48** (2006.01)  
**C12P 19/34** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA  
TRAS OPOSICIÓN

T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2012** **PCT/US2012/034589**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012** **WO12145725**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012** **E 12773717 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **22.01.2020** **EP 2699698**

---

(54) Título: **Reacción de amplificación oscilante para ácidos nucleicos**

(30) Prioridad:

**20.04.2011 US 201161477437 P**  
**20.04.2011 US 201161477357 P**

(73) Titular/es:

**MESA BIOTECH, INC. (100.0%)**  
**6181 Cornerstone Court, Suite 101**  
**San Diego, California 92121-4727, US**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:  
**06.10.2020**

(72) Inventor/es:

**CAI, HONG y**  
**COBB, NATHAN J.**

(74) Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo**

## DESCRIPCIÓN

Reacción de amplificación oscilante para ácidos nucleicos

**Referencia a una lista de secuencias, una tabla o programa informático**

5 El solicitante presenta por la presente una lista de secuencias como un archivo de texto titulado 041812\_ST25.txt  
creado el 20 de abril de 2012 que tiene 10 mil kbytes que es compatible con ASCII y se incorpora en el presente documento por referencia.

**Antecedentes de la invención**

**Campo de la invención (Campo técnico):**

10 Las realizaciones de la presente invención se refieren a procedimientos y aparatos para la amplificación dependiente de plantilla de secuencias diana de ácido nucleico por temperatura de reacción oscilante en un pequeño intervalo, preferentemente no más de 20 °C durante cualquier ciclo de polimerización térmica dado.

**Antecedentes técnicos:**

15 Obsérvese que el siguiente análisis se refiere a varias publicaciones y referencias. El análisis de dichas publicaciones en el presente documento se da para unos antecedentes más completos de los principios científicos y no debe interpretarse como una admisión de que dichas publicaciones son técnica anterior para los propósitos de determinación de patentabilidad.

20 La amplificación de ácidos nucleicos está entre las muchas técnicas indispensables en biológica molecular, usada ampliamente en investigación, ensayo genético, agricultura y medicina forense. El procedimiento de amplificación más común es dar reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en que la prevalencia de una secuencia diana de ácido nucleico específica se aumenta exponencialmente en solución (véanse, las patentes de Estados Unidos n.º 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159). Una reacción de PCR emplea dos cebadores oligonucleotínicos que hibridan en hebras opuestas de la doble hélice de ADN cadena arriba (5') o cadena abajo (3') de la secuencia diana a amplificarse. Se usa una ADN polimerasa (generalmente termoestable) para ampliar los cebadores hibridados en la dirección 5' → 3' añadiendo trifosfatos de desoxinucleósido (dNTP) para "copiar" la secuencia diana y generar productos de ADN bicatenarios. Ciclando la temperatura de la mezcla de reacción (típicamente en 95 °C Celsius), las dos hebras de ADN pueden separarse a alta temperatura permitiéndoles servir como plantilla para la unión adicional del cebador y polimerización a temperaturas más bajas (por ejemplo, 55 °C y 60 °C). Después de repetir este procedimiento muchas veces, puede amplificarse una única secuencia diana en billones de copias.

30 Aunque la PCR es la metodología de amplificación por excelencia en un laboratorio bien equipado, es bastante complejo, requiriendo instrumentación de ciclado térmico caro y sofisticado con elementos de calentamiento activo y calentamiento por enfriamiento y un control preciso de la temperatura, y técnicos formados para reunir resultados significativos. Por ejemplo, la mayoría de las reacciones de PCR requiere un ciclado rápido y preciso entre al menos dos temperaturas (por ejemplo, 95 grados y 57 grados), que típicamente provoca el uso de un motor Peltier caro y energéticamente ineficaz (mecanismo de enfriamiento termoeléctrico) y elementos de control preciso de la temperatura. Dichas limitaciones inherentes hacen que la PCR sea incompatible con el desarrollo de un diagnóstico rentable de los ácidos nucleicos en el punto de atención útil donde la infraestructura de laboratorio de apoyo está ausente. En un esfuerzo por eliminar algunos de los requisitos que consumen más recursos de PCR, se han desarrollado diversas técnicas de amplificación "isotérmicas" en las pasadas décadas. En dichas reacciones, los ácidos nucleicos pueden amplificarse a una única temperatura, eliminando las necesidades del costoso termociclador y haciéndolas más susceptibles para su uso en dispositivos de diagnóstico de bajo coste. Los ejemplos incluyen amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA), amplificación mediada por helicasa, amplificación por desplazamiento de hebra, amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) etc. Sin embargo, estos procedimientos de amplificación isotérmicos a menudo requieren 60-90 minutos de tiempo de amplificación (debido al lento proceso enzimático cinético *in vitro*) y el control preciso de la temperatura en el único punto de temperatura para acomodar las reacciones de amplificación extremadamente rigurosas, careciendo de nuevo de la robustez y velocidad deseadas para la aplicación de diagnóstico en el punto de uso.

40 45 50 55 La amplificación de ácido nucleico dependiente de plantilla es la piedra angular del diagnóstico molecular basado en ácido nucleico. Un diagnóstico robusto, de bajo coste, rápido, en el punto de atención de los ácidos nucleicos es una necesidad urgente en la asistencia sanitaria, la agricultura y en el contexto del terrorismo y la guerra biológicos. Sin embargo, las estrategias químicas de ensayo asociadas con la PCR existente o la amplificación isotérmica poseen limitaciones significativas de diseño y robustez que hacen que dichos enfoques de amplificación sean caros e impracticables para los entornos de recursos limitados donde la parte molecular basada en ácido nucleico podría tener el máximo impacto para la prevención y control de enfermedades emergentes. Aún deben hacerse mejoras considerables en la amplificación de ácidos nucleicos para conseguir un diagnóstico asequible y robusto en entornos desprovistos de infraestructura específica de laboratorio.

La PCR convencional depende del ciclado térmico altamente específico y rápido, habitualmente variando la

temperatura en como mucho 40 °C. Dicha metodología de amplificación requiera instrumentación cara para calentar rápidamente y (particularmente) enfriar la mezcla de reacción de PCR, además de mantener de forma precisa las temperaturas de la solución. Los procedimientos de amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, aunque eliminan la necesidad de la compleja instrumentación de ciclado térmico, generalmente son lentos (al menos 60 minutos de tiempo de reacción), no fiables y requieren un calibrado preciso de la temperatura.

En un procedimiento de ciclado térmico de PCR, un ciclador de PCR debe tener un buen control de la temperatura para mantener la uniformidad de la temperatura dentro de la muestra y una tasa de calentamiento típica de la muestra (y/o enfriamiento) de al menos 2 °C por segundo. El control de la temperatura se consigue típicamente por un sistema de bucle de retroalimentación, mientras que la uniformidad de la temperatura se consigue por materiales altamente conductores térmicamente, pero voluminosos tales como el cobre. Una alta tasa de calentamiento se consigue por la implementación de un procedimiento de control de derivada integrada proporcional (PID) limitado por la energía máxima disipada y la capacitancia térmica. Una alta tasa de enfriamiento es bastante difícil de conseguir y los sistemas voluminosos requieren enfriamiento forzado por un elemento termoeléctrico (P. Wilding, M. A. Shoffner y L. J. Kricka, Clin. Chem., 1994, 40, 1815-1817) (a menudo llamado elemento Peltier) o por otros medios, tales como agua (J. B. Findlay, S. M. Atwood, L. Bergmeyer, J. Chemelli, K. Christy, T. Cummins, W. Donish, T. Ekeze, J. Falvo, D. Patterson, J. Puskas, J. Quenin, J. Shah, D. Sharkey, J. W. H. Sutherland, R. Sutton, H. Warren y J. Wellman, Clin. Chem., 1993, 39, 9, 1927-1933). Estas máquinas de PCR son dispositivos complicados y que consumen mucha energía. Como los sistemas son voluminosos, sus constantes térmicas de tiempo son en minutos en lugar de en segundos lo que provoca tiempos de transición largos y subproductos indeseados de la PCR. El consumo de alta energía elimina la posibilidad de fabricar un sistema de PCR accionado por pilas y portátil.

El documento WO1994/023055 A1 indica un procedimiento para realizar una reacción de extensión de cebador ciclada poniendo en contacto un ADN plantilla con un cebador en ausencia de suficiente glicerol o etilenglicol para disminuir la temperatura de los híbridos de ADN plantilla y cebador por debajo de 70 °C y una ADN polimerasa en condiciones en que la ADN polimerasa puede causar extensiones del cebador y es estable a la temperatura a la que se calienta la mezcla de reacción para desnaturalizar el producto de extensión de cebador a partir del ácido nucleico plantilla; y un kit adecuado para su uso en la reacción de extensión de cebador cíclica que incluye los cebadores necesarios, los tampones y las enzimas requeridos para el procedimiento, y glicerol.

Con los recientes avances del micromecanizado basado en tecnología del silicio y los sistemas microelectromecánicos biológicos (bioMEMS), muchos grupos en todo el mundo han iniciado el desarrollo de micro-PCR ( $\mu$ PCR), que son una parte central de un lab-on-a-chip o microsistemas de análisis total ( $\mu$ TAS). Los investigadores siguen dos enfoques básicos: un sistema estacionario con ciclado de la temperatura y un sistema de flujo con tres zonas a diferentes temperaturas. Ambos sistemas tienen sus ventajas y desventajas. Los sistemas estacionarios ciclan la temperatura de la cámara para modificar la temperatura de la solución de PCR. No requieren un sistema de bombeo u otro medio para mover la muestra de PCR alrededor. Los sistemas de flujo directo típicamente tienen zonas a tres temperaturas constantes. Solamente la muestra cambia la temperatura moviéndose entre zonas de diferentes temperaturas. Este tipo de sistema de PCR es más rápido que el primero, pero requiere una implementación de un mecanismo para mover la muestra alrededor. En ambos casos, los calentadores están integrados con el sistema de PCR, de modo que no es económico desechar el dispositivo para evitar contaminación cruzada después de realizar solamente un único ensayo. Las ventajas principales demostradas por estos dos formatos son un tiempo reducido de ciclo con el uso de un volumen reducido de muestra en comparación con un dispositivo convencional. Sin embargo, estos chips de PCR usan materiales de sustrato tales como silicio que requieren el empleo de procedimientos de fabricación caros y sofisticados, lo que conduce a un precio unitario muy alto. Además, como resultado del volumen de reacción extremadamente pequeño ( $<\mu$ l) para conseguir una relación aumentada de superficie a volumen y el tipo de materiales usados en los chips de  $\mu$ PCR, algunos efectos no muy comunes con las PCR convencionales se vuelven significativos, incluyendo la absorción no específica de muestras biológicas, inhibición, evaporación de muestra y formación de burbujas. Otro esfuerzo actual también implica el desarrollo de un microchip de reacción de ciclado de la temperatura que integra PCR de cámara estacionaria y de flujo continuo para realizar un ciclado eficaz de la temperatura del chip de PCR de microcanal de flujo directo con la flexibilidad del número de ciclos variable y la cantidad de zonas de temperatura en el chip de PCR de cámara estacionaria. Sin embargo, la eficacia del dispositivo de PCR híbrido aún se está validando y las cuestiones relacionadas con la inhibición de la muestra, la adsorción y la formación de burbujas asociadas con dicho enfoque de chip de  $\mu$ PCR siguen teniendo una rigurosidad significativa en todo el procedimiento previo de preparación de la muestra/aislamiento del ácido nucleico, y los reactivos de amplificación y las condiciones de reacción, por ejemplo, concentración ultra alta de polimerasa, concentraciones del cebador de PCR, etc.

### Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Una realización de la presente invención proporciona un procedimiento para amplificar una plantilla de secuencia diana de ácido nucleico contenido en una muestra. El procedimiento incluye poner en contacto la muestra con una mezcla de reacción de amplificación que contiene un cebador complementario a la plantilla de la secuencia diana de ácido nucleico. Una temperatura de la reacción se oscila entre una temperatura superior y una temperatura inferior, en la que el cambio en la temperatura es no mayor de aproximadamente 20 °C durante una pluralidad de ciclos de temperatura. La plantilla de la secuencia diana de ácido nucleico se amplifica.

Una realización de la presente invención proporciona que el cambio en la temperatura no sea mayor de aproximadamente 15 °C durante una pluralidad de ciclos de temperatura. Otra realización proporciona que el cambio en la temperatura sea no mayor de aproximadamente 10 °C durante una pluralidad de ciclos de temperatura. Otra realización más proporciona que el cambio en la temperatura sea no mayor de aproximadamente 5 °C durante una pluralidad de ciclos de temperatura. La temperatura puede fluctuar en (+/-2 °C) para una temperatura dada y/o intervalo de acuerdo con una realización de la presente invención.

5 Otra realización de la presente invención proporciona que, tras alcanzar la temperatura superior o la temperatura inferior, la temperatura se mantenga durante un periodo establecido de tiempo dentro de una fluctuación de temperatura. Como alternativa, tras alcanzar una temperatura superior o inferior dentro del intervalo de temperatura, 10 la temperatura se varía hasta la otra temperatura. En una realización, la temperatura inferior es no menor de aproximadamente 50 °C. En otra realización, la temperatura superior es no mayor de aproximadamente 85 °C. La temperatura superior e inferior puede variar en aproximadamente +/-5 °C de acuerdo con una realización.

15 De acuerdo con una realización de la presente invención, la plantilla de la secuencia diana de ácido nucleico puede ser ADN o ARN monocatenario, ADN o ARN bicatenario, ARN, ADN o cualquier combinación de los mismos. La longitud del ácido nucleico diana puede ser menor de 1000 pb, menor de 250 pb, menor de 150 pb o menor de 100 pb.

20 Una o más de las realizaciones pueden comprender un par de cebadores que se unen a hebras opuestas de la plantilla de ácido nucleico. El par de cebadores puede tener una longitud y un contenido de GC de modo que la temperatura de fusión sea  $\geq 65$  °C. En otra realización el par de cebadores tiene una longitud y un contenido de GC de modo que la temperatura de fusión es  $\geq 70$  °C. Por ejemplo, cada cebador del par de cebadores tiene independientemente una longitud entre 35-70 pares de bases. De acuerdo con una realización de la presente invención, la temperatura de fusión de cada cebador del par de cebadores es 70-80 °C. En una realización preferida, el par de cebadores incluye 25 un cebador directo y un cebador inverso que tiene cada uno una longitud de entre 40-47 pares de bases.

30 Otra realización más de presente invención proporciona un procedimiento para amplificar una plantilla de la secuencia diana de ácido nucleico contenido en una muestra. El procedimiento incluye poner en contacto la muestra con una mezcla de reacción de amplificación que comprende un cebador o un par de cebadores que tiene una longitud entre 35-70 pares de bases y complementario a la plantilla de la secuencia diana de ácido nucleico y en el que la temperatura de fusión de cada cebador del par de cebadores es entre 70-80 °C. La mezcla de reacción de amplificación también 35 incluye DMSO, catión monovalente, catión divalente, dNTP y ADN polimerasa. Una temperatura de la reacción se oscila entre una temperatura superior y una temperatura inferior, en la que el cambio en la temperatura es no mayor de aproximadamente 20 °C durante una pluralidad de ciclos de temperatura y que amplifica la plantilla de la secuencia diana de ácido nucleico. En una realización preferida, el catión divalente se selecciona del grupo que consiste en magnesio, manganeso, cobre, zinc o cualquier combinación de los mismos y el catión monovalente se selecciona del grupo que consiste en sodio, potasio, litio, rubidio, cesio, amonio o cualquier combinación de los mismos. En otra 40 realización preferida, la mezcla de reacción de amplificación comprende un agente desestabilizante de ácidos nucleicos. En una realización más preferida, la reacción comprende una ADN polimerasa que puede ser una ADN polimerasa termoestable. La ADN polimerasa puede seleccionarse del grupo que consiste en ADN polimerasa TAQ, ADN polimerasa VentR y ADN polimerasa DeepVentR, pero no se limita a ello, ya que pueden incluirse otras polimerasas divulgadas en el presente documento y conocidas en la técnica. La ADN polimerasa puede incluir una actividad de desplazamiento de hebra. En otra realización, la ADN polimerasa no tiene actividad exonucleasa 3'  $\rightarrow$  5'. En otra realización, el procedimiento para amplificar una plantilla comprende adicionalmente añadir una transcriptasa inversa y una ADN polimerasa. Por ejemplo, la transcriptasa inversa es una transcriptasa inversa termoestable. La transcriptasa inversa puede seleccionarse de AMV-RT, transcriptasa inversa Superscript II, transcriptasa inversa Superscript III o MML-RT, pero no se limita a ello, ya que pueden usarse otras transcriptas inversas conocidas en 45 la técnica. Otra realización de la presente invención comprende adicionalmente la adición de una proteína de unión a una hebra a la mezcla de reacción, como se divulga. Por ejemplo, la proteína de unión a una hebra es una proteína de unión a una hebra termoestable o la proteína de unión a una hebra es una proteína de unión a una hebra no termoestable.

50 Otra realización más de la presente divulgación proporciona una mezcla que incluye un agente desestabilizante de ácido nucleico monocatenario o bicatenario. Por ejemplo, puede añadirse dimetilsulfóxido (DMSO) o formamida, pero no se limita a ello, ya que pueden añadirse otros agentes tales como glicerol para el mismo propósito.

Otra realización de la presente divulgación proporciona un procedimiento en el que la muestra no está libre de alcohol y/o la muestra no está libre de sal.

55 Otra realización más de la presente invención proporciona un procedimiento para amplificar una plantilla de la secuencia diana de ácido nucleico contenido en una muestra, en el que la mezcla de reacción de amplificación comprende un desestabilizante de ácido nucleico monocatenario o bicatenario; catión monovalente; catión divalente; dNTP y ADN polimerasa tamponada a un pH para soportar la actividad.

Otra realización de la presente divulgación proporciona un tampón de mezcla de reacción de amplificación que comprende uno o más de los siguiente: desestabilizante de ácido nucleico monocatenario o bicatenario; catión

- monovalente; catión divalente; dNTP y ADN polimerasa tamponada a un PH para soportar la actividad. La ADN polimerasa puede ser una ADN polimerasa termoestable. La ADN polimerasa puede seleccionarse del grupo que consiste en ADN polimerasa TAQ, ADN polimerasa VentR y ADN polimerasa DeepVentR, aunque no se limita a ello. La ADN polimerasa puede tener una actividad de desplazamiento de hebra. La ADN polimerasa puede seleccionarse para que no tenga actividad exonucleasa 3'→ 5'. La mezcla también puede incluir uno o más de los siguientes: una proteína de unión a una hebra, un agente desestabilizante que es dimetilsulfóxido (DMSO) o formamida; un catión divalente que puede ser una sal seleccionada del grupo que consiste en magnesio, manganeso, cobre, zinc o cualquier combinación de las mismas, y un catión monovalente que es una sal seleccionada del grupo que consiste en sodio, potasio, litio, rubidio, cesio amonio o cualquier combinación de las mismas.
- 5 10 Los objetivos, ventajas y características novedosas, y el alcance adicional de la aplicabilidad de la presente invención se establecerán en parte en la siguiente descripción detallada, tomada junto con los dibujos adjuntos, y en parte llegar a ser evidente para los expertos en la materia tras examinar lo siguiente, o puede aprenderse por la práctica de la invención. Los objetivos y ventajas de la invención pueden lograrse y obtenerse mediante instrumentalidades y combinaciones particularmente indicadas en las reivindicaciones adjuntas.
- 15 **Breve descripción de los dibujos**
- Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y forman parte de la memoria descriptiva, ilustran una realización de la presente invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. Los dibujos son solamente para propósitos de ilustración de una realización preferida de la invención y no deben interpretarse como limitantes de la invención. Los dibujos:
- 20 FIG. 1. Ilustra un diagrama esquemático de una reacción de amplificación de PCR oscilante de acuerdo con una realización de la presente invención con el panel A, una señal representativa de las fluctuaciones térmicas observadas durante varios ciclos de OPCRar (línea gris), en comparación con una reacción de PCR de dos fases convencional (línea negra) y panel B que ilustra un procedimiento para la amplificación de nucleótidos de acuerdo con una realización de la presente invención.
- 25 FIG. 2. Los paneles A-E representan una serie de fotos de geles de acrilamida que ilustran diferentes polimerasas usadas para generar un producto de 153 pares de bases (pb) de acuerdo con una realización de la presente invención.
- FIG. 3. Los paneles A-B representan una serie de fotos de geles de acrilamida que ilustran un efecto de etanol sobre la amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención.
- 30 FIG. 4. Es una foto de un gel de acrilamida que ilustra diferencias en la temperatura de hibridación y temperatura de fusión del cebador para soportar una amplificación eficaz de acuerdo con una realización de la presente invención.
- FIG. 5. Es una foto de un gel de acrilamida que ilustra un efecto de la ADN polimerasa de inicio caliente en la formación de dímeros de cebadores de acuerdo con una realización de la presente invención.
- 35 FIG. 6. Es una foto de un gel de acrilamida que ilustra un efecto de las fijaciones GC y AT sobre la formación de dímeros de cebadores de acuerdo con una realización de la presente invención.
- FIG. 7. Es una foto de un gel de acrilamida que ilustra un efecto de la proteína de unión a una hebra sobre la formación de producto de acuerdo con una realización de la presente invención.
- 40 FIG. 8. Los paneles A-B representan fotos de geles de acrilamida que ilustran una reducción en la cantidad de formación de dímeros de cebador por proteína del gen 32 de T4 de acuerdo con una realización de la presente invención.
- FIG. 9. Es una foto de un gel de acrilamida que ilustra una secuencia diana específica presente en ADN bicatenario amplificado de acuerdo con una realización de la presente invención.
- 45 FIG. 10. Es una foto de un gel de acrilamida que ilustra la amplificación de una secuencia diana específica presente en ADNmc de acuerdo con una realización de la presente invención.
- FIG. 11. Es una foto de un gel de acrilamida que ilustra la amplificación de una secuencia diana específica presente en ADN plasmídico de acuerdo con una realización de la presente invención.
- FIG. 12. Es una foto de un gel e acrilamida que ilustra la amplificación de un ARN monocatenario de acuerdo con una realización de la presente invención.
- 50 FIG. 13. Es una foto de un gel de acrilamida que ilustra la amplificación de una secuencia diana específica en ADN genómico bacteriano de acuerdo con una realización de la presente invención.
- FIG. 14. Es una foto de un gel de acrilamida que ilustra la amplificación de una secuencia diana específica presente

en ADN de cloroplasto de acuerdo con una realización de la presente invención.

FIG. 15. Es una foto de un gel de acrilamida que ilustra la amplificación de dos secuencias diana de acuerdo con una realización de la presente invención.

5 FIG. 16. El panel A-B representa fotos de geles de acrilamida que ilustran la amplificación de una secuencia diana en presencia de SSB a temperaturas de fusión inferiores de acuerdo con una realización de la presente invención.

FIG. 17. El panel A-B representa fotos de geles de acrilamida que ilustran la amplificación de una diana con un control preciso de la temperatura y/o parámetros rápidos de rampa necesarios en un termocicador típico de PCR.

FIG. 18. Es una foto de un gel de acrilamida que ilustra la amplificación de un Rbcl diana amplificado en el calentador de bajo coste sin rampa o control preciso de la temperatura.

10 **Descripción detallada de la invención**

Como se usa durante toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la expresión "*ácido nucleico*" significa ADN monocatenario o bicatenario, ARN o moléculas híbridas de ADN/ARN. Los ácidos nucleicos monocatenarios pueden tener estructura secundaria, tal como elementos de horquilla, de bucle y tronco. Los ácidos nucleicos bicatenarios o monocatenarios pueden ser lineales o circulares. Los ácidos nucleicos bicatenarios pueden estar intactos o mellados.

15 Las moléculas bicatenarias pueden tener extremos romos o tener extremos salientes monocatenarios. Las moléculas de ácido nucleico pueden aislarse de las células o virus y pueden incluir ADN cromosómico, ADN extracromosómico incluyendo ADN plasmídico, ADN recombinante, fragmentos de ADN, ARN mensajero, ARN ribosómico, ARN de transferencia ARN bicatenario u otros ARN que se producen en células o virus. El ácido nucleico puede aislarse de cualquiera de varias fuentes tales como agricultura, alimentos, ambiente, fermentaciones o fluidos biológicos tales como saliva, sangre, aspirados nasales o pulmonares, fluido cefalorraquídeo, esputo, heces, leche, frotis de tejidos mucosos, muestras tisulares o células. El ácido nucleico puede aislarse, clonarse o sintetizarse *in vitro*. Dentro de los ácidos nucleicos descritos anteriores, los nucleótidos individuales pueden someterse a modificación o alteraciones químicas tales como metilación. Estas modificaciones o alteraciones pueden surgir de forma natural o por síntesis *in vitro*.

20 25 Como se usa durante toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las expresiones "*ácido nucleico diana*" o "*ácido nucleico plantilla*" significan un fragmento o secuencia de ADN o ARN monocatenario o bicatenario que se pretende amplificar selectivamente. El tamaño del ácido nucleico a amplificarse se define por los límites cadena arriba (5') y cadena abajo (3') y puede ser de menos de 500 pb, preferentemente de menos de 250 pb y más preferentemente de menos de 150 pb y más preferentemente de menos de 100 pb. El ácido nucleico diana puede ser un fragmento contenido dentro de un ácido nucleico bicatenario o monocatenario más largo o puede ser un ácido nucleico bicatenario o monocatenario completo.

Como se usa durante toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "*dúplex*" significa una molécula de ácido nucleico de ADN o ARN que es bicatenaria en su totalidad o en parte.

30 35 Como se usa durante toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la expresión "*ciclo térmico*" significa la fluctuación repetida de la temperatura necesaria para que se produzca la amplificación del ácido nucleico. El ciclo térmico puede incluir, aunque sin limitación, una etapa de fusión o desnaturalización a alta temperatura, y una etapa de atemperado o hibridación a baja temperatura.

40 45 Como se usa durante toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, los términos "*fusión*" o "*desnaturalización*" significan separar todo o parte de dos hebras complementarias de un dúplex de ácido nucleico con alta temperatura. La temperatura de fusión o desnaturalización puede verse influida por la longitud y secuencia del cebador oligonucleotídico, la concentración de reactivos desestabilizantes del dúplex tales como DMSO y formamida, y la fuerza iónica o pH de la solución.

50 55 Como se usa durante toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, los términos "*atemperado*" o "*hibridación*" significan la unión específica de secuencia de un cebador oligonucleotídico a una plantilla de ácido nucleico monocatenario. El cebador puede unirse solamente a su secuencia complementaria en una de las hebras plantilla y no a otra región de la plantilla. La especificidad del atemperado o hibridación puede verse influida por la longitud y secuencia del cebador oligonucleotídico, la temperatura a la que se forma la unión, la concentración de reactivos desestabilizantes del dúplex tales como DMSO y formamida, y la fuerza iónica o pH de la solución.

Como se usa durante toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "*cebador*" significa un ácido nucleico u oligonucleótido monocatenario capaz de unirse a una región monocatenaria en un ácido nucleico diana de un modo específico de secuencia que permite la replicación dependiente de polimerasa del ácido nucleico diana.

55 Como se usa durante toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "*OPCRar*" significa reacción de amplificación por PCR oscilante que es una técnica *in vitro* para amplificar ácidos nucleicos usando variaciones en la temperatura menores de las de las técnicas típicas de amplificación, por ejemplo, menores de 20 °C, preferentemente menores de 15 °C y más preferentemente menores de 10 °C entre la temperatura de desnaturalización y la temperatura

de hibridación.

Como se usa durante toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la expresión "*proteína accesoria*" se refiere a cualquier proteína capaz de estimular la actividad, por ejemplo, una proteína de unión a una hebra (SSB) termoestable, por ejemplo, rec A o RPA (proteína A de replicación) pero sin limitarse a ello.

- 5 En una realización de la invención, se proporciona un procedimiento para amplificar de forma exponencial una diana de ácido nucleico específica por ciclado térmico donde la variación de la temperatura es preferentemente menor de 20 °C, más preferentemente menor de 15 °C e incluso más preferentemente menor de 10 °C. Esto incluye las etapas de proporcionar una plantilla monocatenaria del ácido nucleico a amplificar, cebadores oligonucleotídicos para la hibridación con la plantilla de ácido nucleico, usar los cebadores oligonucleotídicos hibridados para sintetizar un producto de extensión bicatenario que sea complementario a la hebra plantilla mediante una ADN polimerasa y repetir las etapas anteriores para amplificar exponencialmente una diana de ácido nucleico seleccionada.
- 10

Con referencia ahora a la **figura 1A**, se ilustra un diagrama esquemático de una reacción de amplificación por PCR oscilante (OPCRar) de acuerdo con una realización de la presente invención mostrando el panel A una señal representativa de las fluctuaciones térmicas observadas durante varios ciclos de OPCRar (línea gris), en comparación con una reacción de PCR de dos fases convencional (línea negra). Obsérvese la drástica reducción en la variación de la temperatura en OPCRar. La **figura 1B** ilustra que el ácido nucleico diana bicatenario entra en la fase de fusión donde, dependiendo de las temperaturas, puede producir desnaturalización parcial o completa del dúplex de acuerdo con una realización de la presente invención. El desenrollado del dúplex comienza en los extremos de la diana y el ácido nucleico monocatenario se une y estabiliza por proteínas de unión a una hebra (círculos). La reacción se enfriá 20 y entra en la fase de hibridación/polimerización donde los cebadores hibridan de un modo específico con los extremos 5' de cada hebra del dúplex diana. Después de la hibridación de los cebadores, la ADN polimerasa (cuadrados) se une al dúplex de plantilla/cebador y extiende el cebador en la dirección 5' → 3' por incorporación de dNTP, copiando la hebra plantilla de ADN. Si la polimerasa usada tiene actividad de desplazamiento de hebra, será capaz de desplazar la hebra opuesta en el complejo parcialmente desnaturalizado. Tras la generación del nuevo ADN dúplex, el ciclo térmico se repite muchas veces para producir amplificación exponencial de la secuencia de ácido nucleico diana.

25

En realizaciones adicionales de la invención, el ciclado térmico implica la oscilación o ciclado de la temperatura entre dos temperaturas con una  $\Delta T$  de preferentemente no más de 20 °C, más preferentemente no más de 15 °C e incluso más preferentemente menores de 10 °C. La más alta de las dos temperaturas puede ser suficiente para desnaturalizar el ADN diana bicatenario, o para producir preferentemente desnaturalización solamente parcial de la diana de ADN bicatenario. Tras alcanzar la temperatura alta o baja, dicha temperatura se mantiene durante un periodo establecido de tiempo o, preferentemente, se varía inmediatamente a la otra temperatura.

30

En realizaciones adicionales de la invención, la diana de ácido nucleico puede ser un ácido nucleico bicatenario tal como ADN bicatenario, o un ácido nucleico monocatenario tal como ARN o ADN monocatenario. Si el ácido nucleico diana es bicatenario, debe desnaturalizarse completa o parcialmente por calor, o enzimáticamente, para formar una plantilla o región plantilla monocatenaria necesaria para la actividad de la ADN polimerasa y la amplificación. La longitud del ácido nucleico diana puede ser menor de 1000 pb, preferentemente menor de 250 pb y más preferentemente menor de 150 pb.

35

En realizaciones adicionales de la invención, los cebadores oligonucleotídicos usados para la amplificación del ácido nucleico diana son un par de cebadores que se unen a hebras opuestas de un ácido nucleico diana bicatenario específico, donde un cebador se une cadena arriba en el extremo 5', y un cebador se une cadena abajo en el extremo 3' de la diana. En condiciones de combinación, puede usarse más de un par de cebadores oligonucleotídicos para amplificar simultáneamente múltiples dianas de ácido nucleico en la misma mezcla de reacción. Los cebadores oligonucleotídicos pueden tener una longitud y contenido de GC de modo que la temperatura de fusión sea mayor de 65 °C en condiciones universalmente aceptadas de tampón de PCR, preferentemente mayor de 70 °C.

40

45 En realizaciones adicionales de la invención, la ADN polimerasa usada se selecciona preferentemente de ADN polimerasa TAQ, ADN polimerasa VentR, ADN polimerasa DeepVentR y ADN polimerasas termoestables similares. Preferentemente, la ADN polimerasa posee una actividad de desplazamiento de hebra y no contiene una actividad exonucleasa 3' → 5' (véase la **figura 1B**). Además, si el ácido nucleico plantilla es ARN monocatenario, la transcriptasa inversa usada se seleccionará de AMV-RT, transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA), transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen) y enzimas termoestables similares.

50

Otras posibilidades de polimerasa termófila

ADN polimerasa termófila

ADN polimerasa (Vender)

VentR® (NEB)

55 VentR (exo-)® (NEB)

- Deep Vent (NEB)
- Deep VentR (exo-) (NEB)
- Tag (NEB)
- PyroScript (Lucigen)
- 5 PyroPhage® 3173, WildTIPO (Lucigen)
- LongAmp Tag (NEB)
- Polimerasa Bst
- Phire Hot Start II (NEB)
- ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (NEB)
- 10 Phusion (NEB)
- Phusion® Flash (NEB)
- 9 Nm (NEB)
- DyNAzyme II Hot Start (NEB)
- DyNAzyme EXT (NEB)
- 15 DreamTag (Fermentas)
- Tag (native) (Fermentas)
- Maxima® Hot Start Tag (Fementas)
- Pfu (recombinante), (Fermentas)
- Bsm (fragmento grande), (Fermentas)
- 20 TrueStart™ Hot Start Tag (Fermentas)
- Tfi (invitrogen)
- AmpITag® (Invitrogen)
- AmpliTaq Gold® (Invitrogen)
- Platinum ® Pfx
- 25 En realizaciones adicionales de la invención, la mezcla de reacción preferentemente comprende una proteína de unión a una hebra (SSB) tal como la proteína del gen 32 de T4, o SSB termoestable aislada y clonada a partir de un organismo termófilo.
- Adicionalmente, la preparación enzimática incluye un agente desestabilizante de ácido nucleico mono o bicatenario tal como dimetilsulfóxido (DMSO) o formamida, preferentemente a una concentración del 8-15 % del volumen de reacción total. Como alternativa, pueden utilizarse otros reactivos tales como glicerol desaza-dGTP, 3-desazapurina, dITP en solitario o en combinación entre sí o la lista previa de agentes.
- 30 Las realizaciones de la presente invención son idealmente adecuadas para su uso en diagnóstico de ácido nucleico de bajo coste, en el punto de atención en que una capa microfluida se posiciona sobre un elemento de calentamiento. Reduciendo el intervalo de temperatura los requisitos de ciclado, el calentamiento relativamente simple con 35 mecanismos de enfriamiento pasivo puede usarse para ciclar rápidamente la temperatura de una solución de reacción. Las temperaturas máximas inferiores durante el ciclado térmico minimizan la evaporación de fluido que puede impactar negativamente sobre la reacción de amplificación global. De forma más importante, la robustez de la amplificación se mejora enormemente en comparación con el procedimiento de PCR convencional dando un nuevo procedimiento que es capaz de acomodar una fluctuación de temperatura (control impreciso de la temperatura) durante un procedimiento 40 de amplificación. Se demostró que la química de reacción específica de la invención funcionaba sobre un amplio intervalo de temperaturas de fusión (por ejemplo, 70-105 °C, esencialmente insensible a burbujeo) e hibridación, eliminando la necesidad de una temperatura uniforme en todo el volumen de reacción completo. Finalmente, las realizaciones de la invención funcionan bien en presencia de alcohol y sal (por ejemplo, etanol ~10 %), reduciendo 45 enormemente la rigurosidad de las metodologías previas de aislamiento de ácido nucleico a través de la eliminación de una etapa de centrifugación, secado por calor o de vacío entre el lavado basado en alcohol (por ejemplo, etanol o

isopropanol) y la etapa de elución de ácido nucleico implicada en la química de extracción convencional de ácido nucleico.

Las realizaciones de la presente invención incluyen la detección de patógenos en una muestra biológica donde un ácido nucleico del patógeno es el ácido nucleico diana. Como alternativa, la invención puede usarse para detectar

5 diferencias en ADN cromosómico, donde un fragmento de ADN cromosómico es el ácido nucleico diana. De este modo, pueden detectarse polimorfismo de un único nucleótido en el ácido nucleico diana de la misma o diferente fuente.

Las realizaciones de la tecnología de amplificación de la presente invención se mencionan como "reacción de

10 amplificación por PCR oscilante" (OPCRar). OPCRar se basa en, aunque sin limitación, el uso combinado de agentes desestabilizantes de doble hebra con inferior temperatura de fusión de la reacción y cebadores oligonucleotídicos de

temperatura de fusión (Tm) inusualmente alta para elevar la temperatura de hibridación en un ciclo térmico dado. De este modo, la amplificación *in vitro* de un ácido nucleico diana puede realizarse por ciclado térmico rápido entre

15 temperaturas que difieren preferentemente en 20 °C, más preferentemente menos de 15 °C e incluso más preferentemente menos de 10 °C (**figura 1A**). Los cebadores oligonucleotídicos específicos para regiones cadena

20 arriba (5') y cadena abajo (3') del ácido nucleico diana hibridan con la plantilla permitiendo la extensión de la ADN polimerasa para amplificar la diana. Si la ADN polimerasa usada es una polimerasa de desplazamiento de hebra sin actividad exonucleasa, será innecesaria la desnaturización térmica completa del ácido nucleico diana bicatenario,

25 funcionando junto con agentes desestabilizante de dúplex para disminuir la temperatura de fusión requerida. El procedimiento de ciclado de la temperatura se repite y produce una amplificación exponencial de la secuencia diana de ácido nucleico específica (**figura 1B**). En OPCRar, el ácido nucleico diana bicatenario entre en la fase de fusión donde, dependiente de las temperaturas, puede producir la desnaturización parcial o completa del dúplex. El

desenrollado del dúplex empieza en los extremos de la diana y el ácido nucleico monocatenario se une y estabiliza por una proteína de unión a una hebra (círculos). La reacción se enfriá y entra en la fase de hibridación/polimerización donde los cebadores hibridan de un modo específico con los extremos 5' de cada hebra del dúplex diana. Después

25 de la hibridación de los cebadores, la ADN polimerasa (cuadrados) se une al dúplex de plantilla/cebador y extiende el cebador en la dirección 5' → 3' por incorporación de dNTP, copiando la hebra plantilla de ADN. Si la polimerasa usada tiene actividad de desplazamiento de hebra, será capaz de desplazar la hebra opuesta en el completo parcialmente desnaturizado. Tras la generación del nuevo ADN dúplex, el ciclo térmico se repite muchas veces para producir la

amplificación exponencial de la secuencia de ácido nucleico diana.

30 El procedimiento de OPCRar se basa en, aunque sin limitación, el uso combinado de agentes desestabilizantes de ácido nucleico que disminuyen la temperatura de fusión de la reacción, y dos cebadores oligonucleotídicos de temperatura de fusión (Tm) inusualmente alta para elevar la temperatura de hibridación durante el ciclado térmico.

35 Para un ácido nucleico diana dado, un cebador oligonucleotídico preferentemente hibrida con el extremo 5' de la hebra con sentido que contiene la secuencia diana, y un cebador preferentemente hibrida con el extremo 5' de la hebra

40 antisentido que contiene la secuencia diana complementaria inversa. La OPCRar preferentemente utiliza, aunque sin limitación, el uso de una ADN polimerasa con desplazamiento de hebra sin actividad exonucleasa para disminuir adicionalmente la temperatura de fusión o desnaturización necesaria para una amplificación de ácido nucleico diana eficaz. La OPCRar puede amplificar un ácido nucleico diana en presencia o ausencia de una proteína accesoria. Puede optimizarse cualquier sistema de OPCRar específico por adición, sustracción o sustitución de componentes dentro de la mezcla.

45 Esta tecnología de amplificación tiene características mejoradas sobre otras metodologías de amplificación presentadas en la técnica anterior en el contexto de diagnóstico de ácido nucleico de bajo coste, rápido, en el punto de atención. A diferencia de las metodologías de amplificación de ácidos nucleicos descritas anteriormente, el sistema

50 OPCRar, posibilitado por su proceso enzimático robusto, es robusto, rápido y tolerante a fluctuaciones de temperatura de un dispositivo de calentamiento de bajo coste, por tanto, idealmente adecuado para aplicaciones de bajo coste en el punto de atención. Minimizando los diferenciales de temperatura encontrados durante el ciclado térmico, OPCRar combina la velocidad y fiabilidad de la PCR con menos requisitos instrumentales de las metodologías de amplificación isotérmica.

55 El requisito de ciclado térmico simplificado del sistema OPCRar es idealmente adecuado para instrumentación de enfriamiento pasivo, donde puede aplicarse calor a una superficie de una cámara y el enfriamiento se produce a través

de la disipación del calor a la atmósfera en la superficie opuesta. Dicho enfriamiento pasivo disminuye drásticamente el coste y complejidad de cualquier dispositivo de diagnóstico de ácidos nucleicos. El enfriamiento pasivo se ha

55 presentado previamente para su uso en dispositivos de diagnóstico, sin embargo, estos dispositivos han empleado química de ensayo de ciclado de PCR convencional para amplificar ácidos nucleicos diana que limitan la velocidad de reacción (Luo y col., Nuc Acids Res. 2005; Wilding y col., Nuc. Acids. Res. 1996; Burke y col., Science 1998;). Otra

reventaja de OPCRar es que puede producirse una amplificación de ácido nucleico eficaz sobre un amplio intervalo de temperaturas de fusión e hibridación y, por consiguiente, requiere un mecanismo de control de la temperatura menos riguroso. En la construcción de un diagnóstico de ácido nucleico en miniatura, el mantenimiento de la temperatura

60 uniforme en todo el volumen de reacción completo puede ser difícil, produciéndose un gradiente de temperatura particularmente alto entre los lados caliente y sin calentar de la cámara de reacción. Dicha variación de la temperatura puede producir una amplificación ineficaz usando PCR convencional o químicas de reacción isotérmicas. OPCRar, a través del uso de la combinación de una polimerasa robusta, un reactivo desestabilizante y otros factores accesorios

de polimerasa, está diseñado para minimizar los problemas asociados con la regulación y el mantenimiento precisos de la temperatura; siempre que las regiones más frías de la cámara de reacción cumplan la posible temperatura de fusión mínima y la máxima temperatura de hibridación posible para una diana de ácido nucleico dado, la reacción progresará de forma eficaz, incluso si otras regiones del volumen de reacción varían en >10 °C. Además, la naturaleza robusta de OPCRar de la química de amplificación junto con el consumo mínimo de potencia/energía posibilita una reacción de amplificación rápida y eficaz a un volumen mucho más grande (por ejemplo, 20  $\mu$ l en lugar de sub  $\mu$ l en un chip típico de  $\mu$ PCR) relajó enormemente la rigurosidad del procedimiento de preparación de la muestra/aislamiento de ácido nucleico previo (en términos de obtener sub  $\mu$ l de plantilla de entrada que es ácido nucleico altamente concentrado y ultra puro libre de cualquier contaminante traza, por ejemplo, sal o etanol remanente y sustancia inhibidora) y el requisito de concentración ultra alta y ultra pura de las enzimas de PCR y biorreactivos.

#### Reactivos disolventes

Los disolventes tales como DMSO y formamida son conocidos por disminuir la temperatura de fusión de ácidos nucleicos dúplex en ~0.5-0.7 °C por cada 1 % de volumen añadido. Estos reactivos a menudo se usan para mejorar la eficacia de amplificación de los ácidos nucleicos diana que contienen un alto contenido de GC y, por tanto, una alta  $T_m$  para facilitar la desnaturización completa de plantillas bicanarias difíciles de fundir. Habitualmente, las temperaturas de ciclado térmico de PCR se mantienen constantes tras la incorporación de agentes desestabilizantes de dúplex en reacciones de PCR. En contraste, la OPCRar utiliza preferentemente la adición de concentraciones excepcionalmente elevadas de DMSO para disminuir drásticamente la temperatura de fusión del ciclo térmico. En PCR convencional, raramente se usa DMSO por encima del 10 % v/v debido a la perdida de actividad polimerasa asociada con altas concentraciones de estos reactivos junto con las altas temperaturas (generalmente mayores de 90 °C) de la fase de fusión. El sistema y el procedimiento de OPCRar, por el otro lado, usa preferentemente concentraciones de DMSO entre el 10 y el 15 %. Inesperadamente, esta cantidad de DMSO no produce pérdida significativa de la actividad polimerasa.

Con referencia ahora a la **figura 2**, la amplificación de acuerdo con una realización de la presente invención es compatible con una diversidad de ADN polimerasas, dependiendo de las condiciones. El ácido ribonucleico aislado de aspirado nasal que contiene virus de la gripe A (0,3 ng/ $\mu$ l) se usó como plantilla de ácido nucleico en múltiples condiciones de OPCRar con transcripción inversa usando polimerasa VentR. Los cebadores de OPCRar FP3 y RP4 se usaron para generar un producto de 153 pb que se visualizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12 % teñido con bromuro de etidio. Todas las reacciones contenían transcriptasa inversa Superscript III, donde se realizó una fase inicial de generación de ADNc durante 5 minutos a 55 °C antes del ciclado térmico. Los carriles del gel se marcan con la concentración de DMSO y las temperaturas de la fase de fusión e hibridación usadas; las reacciones se ciclaron 40 veces.

La enzima de PCR convencional, por ejemplo, la mezcla de reacción de ADN polimerasa TAQ es extremadamente sensible a cualquier cantidad traza de alcohol, por ejemplo, etanol, mientras que en una realización de la invención la novedosa mezcla de reacción es extremadamente resistente a la inhibición por etanol. Con referencia ahora a la **figura 3**, se demuestra el efecto del etanol sobre la amplificación de ácidos nucleicos de acuerdo con una realización de la presente invención. El ácido nucleico total aislado de tejido foliar infectado por *Candidatus Liberibacter asiaticus* (3,4 ng/ $\mu$ l) se usó como plantilla de partida. Las reacciones se realizaron en condiciones de OPCRar usando ADN polimerasa VentR (exo-) Et SSB y los cebadores hyvl\_For y hyvl\_Rev, en presencia de DMSO al 15 % (**figura 3A**) o condiciones de PCR convencional usando polimerasa TAQ y los cebadores HLBas-P2 y HLBa-P1 (**figura 3B**). Las soluciones de OPCRar se calentaron a 85 °C durante 2 minutos para desnaturizar la plantilla y después se ciclaron 40 veces, oscilando entre 76 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 10 segundos para generar un producto de 139 pb. Las reacciones convencionales de PCR se calentaron hasta 95 °C durante 2 minutos y después se ciclaron 40 veces, variando entre 95 °C durante 10 segundos y 58 °C durante 40 segundos para generar un producto de 130 pb. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de acrilamida al 12 %, teñido con bromuro de etidio. Se muestran las concentraciones de etanol incluidas en la mezcla de reacción de amplificación. Es evidente que la formulación de OPCRar (**figura 3A**) es drásticamente más resistente a la inactivación por etanol en comparación con PCR convencional (**figura 3B**).

El uso de ADN polimerasa VentR (exo-) y Et SSB en condiciones típicas de OPCRar no provoca pérdida de actividad hasta el 10 % de etanol. Este es un descubrimiento significativo pero sorprendente respecto a la aplicación de OPCRar a dispositivos de bajo coste en el punto de atención. El conocimiento convencional de PCR y amplificación isotérmica típicamente advierte a los usuarios proporcionar el ácido nucleico altamente purificado introducido libre de alcohol y sal. Como resultado, casi todos los investigadores están empleando algún tipo de etapa de secado al vacío, secado al aire, centrifugación o calentamiento entre los lavados basados en alcohol y la elución del ácido nucleico diana de las microperlas de afinidad por ácido nucleico, frita de vidrio, matriz o filtro, etc., antes de procesar la muestra a través del procedimiento de amplificación por PCR. Por ejemplo, un dispositivo de diagnóstico integrado del punto de atención, además de la amplificación y la detección de los ácidos nucleicos, los dispositivos también deben aislar rápidamente los ácidos nucleicos diana. Generalmente, esto se realiza uniendo el ácido nucleico a una matriz de fibra de vidrio y lavando en presencia de concentraciones significativas de sal y etanol, eluyendo posteriormente en tampón que contiene sal mínima y nada de etanol. Antes de la elución, el tampón de lavado retenido en la matriz de unión se retira para evitar sobrecontaminación del volumen de elución, en kits comerciales de aislamiento de ácidos nucleicos esto se realiza típicamente por centrifugación. La mezcla enzimática específica de OPCRar elimina esta necesidad de

retirar cuidadosamente el etanol durante el aislamiento del ácido nucleico, haciendo que esta realización de la invención esté adaptada para diagnóstico integrado de bajo coste que no requiere un componente de vacío, centrifuga, secado al aire o secado por calentamiento.

#### Cebadores

5 Los cebadores oligonucleotídicos como se describe en el presente documento pueden sintetizarse y purificarse por procedimientos conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.214.587). En las presentes realizaciones, se usan dos cebadores específicos de secuencia, que representan un par de cebadores para amplificar exponencialmente una secuencia de ácido nucleico diana. El primer cebador hibrida con la región 5' cadena arriba del ácido nucleico diana, y el segundo cebador hibrida con la región 3' cadena abajo de la secuencia diana. Los 10 cebadores hibridan con el extremo 5' de una hebra presente en el dúplex diana, y los cebadores se extienden por una polimerasa en una dirección 5' a 3' usando la secuencia de nucleótidos diana como plantilla (**figura 1B**). Las condiciones de hibridación son convencionales como se describe en "Molecular Cloning and Laboratory Manual", 2.<sup>a</sup> ed. Sambrook, Rich and Maniatis, pub. Cold Spring Harbor (2003). Para conseguir una amplificación específica de una 15 secuencia diana dada, se prefiere un cebador homólogo, donde cada nucleótido en el cebador es complementario a la secuencia diana. Los cebadores pueden incluir, sin embargo, bases que son no homólogas con respecto al ácido nucleico plantilla, o secuencias 5' que son no complementarias a la secuencia o secuencias de nucleótidos diana. Pueden usarse múltiples pares de cebadores en un único experimento de OPCRar para amplificar múltiples dianas de 20 ácido nucleico simultáneamente en la misma mezcla de reacción. La llamada combinación es una técnica comúnmente usada en análisis de polimorfismos de un único nucleótido, en la detección de patógenos y para incorporación de controles internos en una reacción individual. Un mayor nivel de combinación también puede conseguirse a través del uso de una secuencia de marca universal 5' introducida en cada región 3' específica de diana que permite la amplificación universal de todas las secuencias diana con diferentes secuencias internas de patógeno.

25 El diseño de cebadores oligonucleotídicos implica varios parámetros tales como la temperatura de fusión y la alineación de secuencia intra o intercebador. La temperatura de fusión está gobernada por factores tales como la longitud del cebador y el contenido de GC. Los complementos de secuencia intercebador pueden producir estructuras 30 de horquilla, que pueden impedir una amplificación eficaz, mientras que la homología intracebador puede producir productos de amplificación indeseados denominados dímeros de cebadores. Cuando se diseña un cebador, es importante seleccionar una secuencia dentro de la diana que sea específica para la molécula de ácido nucleico a amplificar y que interaccione mínimamente consigo misma u otros cebadores presentes en la reacción de amplificación.

35 En la mayoría de estrategias de amplificación de ácidos nucleicos, la temperatura de fusión de un cebador preferentemente es aproximadamente 10 a 30 °C mayor que la temperatura a la que tiene lugar la hibridación y la amplificación. Siendo la temperatura de la fase o fases de hibridación/polimerización de 55-60 °C en una reacción de PCR, los cebadores típicamente son de 18-30 pares de bases de longitud. Esta longitud específica de oligonucleótidos 40 se minimiza para permitir una fácil unión del cebador sin pérdida de especificidad de secuencia. En el sistema OPCRar, sin embargo, los cebadores se diseñan preferentemente para que sean inusualmente largos de 35-55 pares de bases, con una temperatura de fusión preferentemente entre 70-80 °C para elevar la temperatura de la fase de hibridación. Considerando los niveles del agente desestabilizante de dúplex, DMSO, usado en una reacción típica de OPCRar (~10-15 %), la Tm calculada de los cebadores de OPCRar preferentemente es solamente <10 °C por encima de la 45 temperatura de hibridación usada durante el ciclado térmico. En experimentos y con la longitud extrema de los cebadores de OPCRar, la amplificación eficaz se produce a pesar de una diferencia mínima en la Tm del cebador (que compensa la concentración de DMSO) y la temperatura de hibridación/elongación).

50 Con referencia ahora a la **figura 4**, los cebadores de OPCRar requieren una diferencia mínima entre la temperatura de la fase de hibridación y la Tm del cebador para soportar una amplificación eficaz de acuerdo con una realización de la presente invención. Un plásmido que contiene la secuencia génica *hyvl* (12 ng/μl) se amplificó usando los cebadores *hyvl\_For* y *hyvl\_Rev* para generar un producto de 139 pb, que se visualizó por electroforesis en un gel de acrilamida al 12 % teñido con bromuro de etidio. Después de una etapa de fusión a 85 °C de 2 minutos inicial, todas las reacciones se ciclaron 40 veces, 10 segundos en cada una de las temperaturas de fusión e hibridación indicadas. La Tm calculada para los cebadores *hyvl\_For* y *hyvl\_Rev* es 72,2 °C y 70,9 °C, respectivamente. La reacción se realizó 55 en DMSO al 10 % disminuyendo la Tm eficaz en 7 °C asumiendo una reducción de 0,7 °C por un 1 % de volumen. Incluso con una diferencia insignificante entre la Tm del cebador y la temperatura de hibridación, se observa que la reacción de amplificación prosigue tan eficazmente como si la diferencia de la temperatura fuera mucho menor.

60 Con referencia ahora a la **figura 5**, el efecto de la ADN polimerasa de inicio caliente sobre la formación de dímeros de cebador usando OPCRar. Se realizaron reacciones de control que no contenían plantilla de ácido nucleico con Superscript III RT, y ADN polimerasa Taq, o Platinum Taq en presencia del par de cebadores FP3 y RP4 (8 μM cada uno) y DMSO al 15 %. Los parámetros de ciclado fueron 55 °C durante 5 minutos, 85 °C durante 2 minutos y 40 ciclos de 80 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 15 segundos. Después de la electroforesis en un gel de acrilamida al 12 %, los productos de OPCRar se visualizaron teñido con bromuro de etidio. Platinum Taq es una enzima de inicio caliente disponible en el mercado (Invitrogen, Carlsbad, CA) que está conjugada a un anticuerpo que se disocia tras calentamiento de la solución de reacción hasta 94 °C en condiciones normales de PCR. En presencia del ácido nucleico plantilla, este par de cebadores producirá un producto de 153 pb. Está claro que esta preparación de inicio

caliente no es mejor que la Taq convencional en la reducción de la formación de dímeros de cebador de <110 pb durante OPCRar. Una complicación de cebadores largos usados en la reacción de OPCRar es que son más propensos a producir productos de amplificación no específicos e indeseados conocidos como dímeros de cebador. Los dímeros de cebador se forman cuando los extremos 3' de los oligonucleótidos cebadores se unen transitoriamente entre sí durante el aumento inicial de la temperatura en el inicio de una reacción de amplificación. Durante este periodo de tiempo crítico, la ADN polimerasa puede extender estos complejos transitorios produciendo productos que compiten con la amplificación de la diana específica durante el ciclado térmico, particularmente si la concentración de ácido nucleico plantilla de partida es muy baja. Una técnica habitualmente empleada para reducir la formación de dímeros de cebador durante la PCR es utilizar las llamadas ADN polimerasas "de inicio caliente". Estas enzimas disponibles en el mercado están unidas no covalentemente a una molécula inhibidora tal como un anticuerpo. Cuando la temperatura de reacción aumenta por encima de 90 °C, la molécula inhibidora se disocia liberando la polimerasa para funcionar como es debido. Sin embargo, sorprendentemente, en nuestras manos la enzima de inicio caliente ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) no logró reducir apreciablemente la abundancia de amplificación de dímeros de cebador, lo que indica que esta metodología habitualmente usada es insuficiente para OPCRar, indicando que el procedimiento de OPCRar es un procedimiento de amplificación mucho más eficaz que la PCR tradicional que posibilita la formación de dímeros originados por colisiones cinéticas transitorias de homo y heterodímeros que no se producen típicamente en el procedimiento de PCR convencional.

Con referencia ahora a la **figura 6**, se presenta un gel que ilustra el efecto de fijaciones GC y AT sobre la formación de dímeros de cebadores durante la OPCRar de acuerdo con una realización de la presente invención. Se usaron cebadores diseñados para amplificar el gen de factor de elongación de *C. Liberibacter asiaticus* en ausencia de una plantilla de partida (3,5 ng/μl) para determinar la propensión a la formación de dímeros de cebador. En presencia de la plantilla, los tamaños de producto para los diversos conjuntos de cebadores variarían entre 140-155 pb. Las secuencias de los cebadores pueden observarse a la derecha, con las fijaciones AT o GC en gris. Para conjuntos de cebadores "mod", cada cebador contiene una base no homóloga con respecto a la plantilla (subrayado), que aumenta la homología con el segundo cebador. Todas las reacciones se realizaron usando ADN polimerasa VenR (exo-), Et SSB, en presencia de DMSO al 15 %. Las soluciones se calentaron a 85 °C durante 2 minutos para desnaturizar la plantilla y después se ciclaron 30 o 40 veces, oscilando entre 80 °C durante 15 segundos, y 65 °C durante 15 segundos. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de acrilamida al 12 %, teñido con bromuro de etidio. Como se observa claramente, los conjuntos de cebadores de fijación GC producen una formación significativa de dímeros de cebador mientras que los cebadores de fijación AT no producen formación de dímeros de cebador.

Para minimizar el potencial de formación de dímeros de cebador, pueden diseñarse cebadores de OPCRar para emplear varias estrategias que difieren de las usadas para generar cebadores de PCR convencional. En primer lugar, los cebadores de PCR generalmente poseen un extremo 3' rico en GC llamado una "fijación GC" que provoca una mayor unión específica con la secuencia diana. Los cebadores de OPCRar, sin embargo, se ha observado que un alto contenido en GC en la región 3' del cebador provoca mayor formación de dímeros de cebador, por tanto, los cebadores de OPCRar se preparan para que contengan regiones 3' ricas en AT para reducir energéticamente la afinidad de las interacciones de cebador 3'-3' que producen estos productos de amplificación indeseados (**figura 6**). Una segunda estrategia para el diseño de cebadores de OPCRar es diseñar cebadores que contengan secuencias 5' o internas complementarias de al menos 5 nucleótidos consecutivos. Los oligonucleótidos diseñados de este modo dirigirán cualquier hibridación de cebador durante el aumento inicial en la temperatura de reacción hacia estructuras dúplex que no son competentes para la extensión por la polimerasa. Si no pueden encontrarse secuencias complementarias adecuadas dentro de la secuencia de ácido nucleico diana, pueden usarse bases no homólogas o mutadas para generarlas dentro de los cebadores de OPCRar. La longitud excepcional de los cebadores de OPCRar supera el mal apareamiento minoritario entre el cebador y la diana durante los primeros ciclos de una reacción de amplificación. Los conjuntos de cebadores son

#### EU AT

Directo

GTTCTTGTAG CGTTGCAGTC TTCTGCGGAA GATAAGGAAT TGCTTT (SEQ ID NO: 21)

Inverso

50 GGGCACGTTT ATTAGCAACA ATAGAAGGAT CAAGCCTCTG CACAGAAAT (SEQ ID NO: 22)

#### EU GC

Directo

CTTGTAGCGT TGCAGTCTTC TGCGGAAGAT AAGGAATTGC TTTCTGCG (SEQ ID NO: 23)

Inverso

55 CACGTTTATT AGCAACAATA GAAGGATCAA GCATCTGCAC AGAAATCACCG (SEQ ID NO: 24)

EU-Atmod

Directo

GGTGTCTTG TATCGTTGCA GTCTTCTGCG GAAGATAAGG AATTGCTTT (SEQ ID NO: 25)

Inverso

5 GTAATGGGCA CGTTTATTAG CAACGATAGA AGGATCAAGC AACTGCACAG AAAT (SEQ ID NO: 26)

EU GCmod

Directo

CTTGTATCGT TGCAGTCTTC TGCGGAAGAT AAGGAATTGC TTTCTGCG (SEQ ID NO: 27)

Inverso

10 GGCACGTTA TTAGCAACGA TAGAAGGATC AAGCATCTGC ACAGAAATCA CCG (SEQ ID NO: 28)

Los cebadores de OPCRar pueden incluir cualquiera de las bases desoxirribonucleotídicas adenina "A", timina "T", guanina "G" o citosina "C" y/o una o más bases ribonucleotídicas, A, C, uracilo "U", G. Además, los cebadores de OPCRar pueden contener una o más bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas modificas donde la modificación no evita la hibridación del cebador con el ácido nucleico diana, la elongación del cebador por la polimerasa o la desnaturización del ácido nucleico dúplex. Los cebadores de OPCRar pueden modificarse con grupos químicos tales como metilfosfonatos o fosforotioatos, con enlazadores no nucleotídicos, con biotina o con marcadores fluorescentes tales como éster de fluoresceína amina reactiva de carboxifluoresceína. Dichas modificaciones pueden potenciar el funcionamiento del cebador o facilitar la detección y caracterización de los productos de amplificación.

Polimerasas

20 Después de que la región de ácido nucleico plantilla monocatenaria haya hibridado con un cebador durante OPCRar, se produce una etapa de polimerización. Si el ácido nucleico diana es ADN, se selecciona un ADN polimerasa que actúa sobre la diana para extender los cebadores hibridados a lo largo de la plantilla de ácido nucleico en presencia de las cuatro bases nucleotídicas dNTP para formar un producto bicatenario donde la hebra recién sintetizada es complementaria a la secuencia de nucleótidos de la plantilla (**figura 1**). Si la diana inicial es ARN, primero se usa una transcriptasa inversa para copiar la plantilla de ARN en una molécula de ADNc, que se amplifica adicionalmente durante OPCRar por una ADN polimerasa.

Puede seleccionarse una diversidad de ADN polimerasas para OPCRar basándose en la termoestabilidad y procesabilidad, especialmente en presencia de un agente desestabilizante y alcohol (**figura 2**). Aunque no se requiere, las polimerasas que presentan actividad de desplazamiento de hebra y que carecen de una actividad exonucleasa se ha descubierto que mejoran significativamente las reacciones de OPCRar (**figura 2**). Los ejemplos de ADN polimerasas adecuadas incluyen polimerasa Taq, ADN polimerasa Klen Taq (AB Peptides, (St Louis, MO)), fragmento grande de ADN polimerasa Bst (New England Biolabs, Beverly, MA), VentR o VentR (exo-) (New England BioLabs), DeepVentR o DeepVentR (exo-) (New England BioLabs), y enzimas similares. Las transcriptas inversas termoestables adecuadas incluyen Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA), Superscript III (Invitrogen), y enzimas similares. Debe apreciarse que la mezcla de polimerasa de amplificación convencional por PCR publicada no logra funcionar en OPCRar debido al requisito de robustez único de la amplificación de OPCRar. Todos los componentes seleccionados de polimerasa y biorreactivos deben evaluarse cuidadosamente y ensayarse experimentalmente antes de su uso.

Proteínas de unión a una hebra

40 El sistema de OPCRar minimiza preferentemente el diferencial de temperatura entre las fases de fusión e hibridación del ciclado térmico, donde este diferencial de temperatura es el más bajo si es innecesaria la desnaturización completa del ácido nucleico dúplex. Aunque una ADN polimerasa de desplazamiento de hebra ayuda a este respecto, pueden usarse proteínas accesorias para disminuir adicionalmente los requisitos térmicos para una amplificación eficaz. Las proteínas de unión a una hebra (SSB) son conocidas por estabilizar un ácido nucleico monocatenario para evitar la hibridación de la formación de dúplex bicatenarios, y han demostrado aumentar la eficacia de las reacciones de amplificación de ácido nucleico. La adición de una SSB termoestable a los procedimientos de OPCRar de acuerdo con una realización de la presente invención se ha descubierto que provoca una actividad mejorada (**figura 7**). Como un ejemplo, una Et SSB (BioHelix Corporation, Beverly, MA), aunque la elección de SSB no está limitada a una proteína específica y puede incluir SSB aisladas y clonadas de un organismo termófilo, o modificada por ingeniería a partir de una SSB precursora no termoestable.

Con referencia ahora a la **figura 7**, se ilustra un gel que muestra el efecto de la proteína de unión a una hebra sobre la formación de producto de OPCRar de acuerdo con una realización de la presente invención. Se amplificó una plantilla de ADN monocatenario de gripe A universal (1E6 copias/μl, Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA) usando

los cebadores de OPCRar FP3 y RP3 para generar un producto de 133 pb, que se visualizó por electroforesis en un gel de acrilamida al 12 % teñido con bromuro etidio. La OPCRar de acuerdo con una realización de la presente invención se realizó en presencia o ausencia de SSB termoestable en las siguientes condiciones: *i*) DMSO al 15 %; *ii*) DMSO al 15 %, glicerol al 5 %; *iii*) DMSO al 15 %, betaina 0,25 M. Los parámetros de ciclado usados para todas las reacciones fueron 75 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 15 segundos, repetidos 45 veces.

Además de las SSB de termoestables para ayudar a la OPCRar, las SSB no termoestables tales como SSB del bacteriófago T4 (New England BioLabs) pueden usarse para reducir la formación de dímeros de cebador en el calentamiento inicial de la solución de OPCRar (**figura 8**). Preincubando los cebadores de OPCRar en presencia de un exceso molar de la proteína del gen 32 de T4 y después añadiéndolos a la mezcla de reacción, se ha observado que la amplificación indeseada de dímeros de cebador se minimiza durante OPCRar. Estas SSB supuestamente se unen a los cebadores oligonucleotídicos monocatenarios, reduciendo el potencial de emparejamiento 3'-3' y, por tanto, la formación de dímeros de cebador. Tras calentar la solución por encima de 65 °C, la SSB de T4 se desnaturala y libera los cebadores para una reactividad normal durante el ciclado térmico. Con referencia ahora a la **figura 8**, un gel ilustra la reducción en la cantidad de dímeros de cebador, formados durante una realización de la presente invención con preincubación de los cebadores con proteína del gen 32 de T4. Antes de la adición de la mezcla de reacción, los cebadores de OPCRar se incubaron con el exceso estequiométrico indicado de unidades activas de proteína del gen 32 de T4 (SSB de T4) a 25 °C durante 5 minutos en presencia de tampón ThermoPol 1x (New England BioLabs, Beverly, MA). Se amplificó una plantilla de ADN de Flu A universal sintético (1E6 copias/μl, Biosearch Technologies, Inc.) usando los cebadores FP3 y RP3 para generar una secuencia del producto de 133 pb. Las reacciones se mantuvieron a 85 °C durante 2 minutos seguido por 50 ciclos de 75 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 15 segundos. Los productos de reacción se visualizaron por electroforesis en un gel de acrilamida al 12 % teñido con bromuro de etidio. El experimento descrito en la **figura 7** se repitió en un día diferente por un investigador diferente para evaluar la reproducibilidad de los datos y se muestra en la **figura 8**. Puede observarse claramente que la preincubación de los cebadores con SSB de T4 aumenta la cantidad de producto amplificado y disminuye la intensidad de la banda de dímeros de cebador (-100 pb), respecto a la ausencia de preincubación (carriles más a la derecha).

El procedimiento de OPCRar es particularmente muy adecuado para su uso con un dispositivo tal como el descrito en la solicitud de patente provisional del mismo propietario que la presente, presentada en la misma fecha que la presente, titulada "DISPOSITIVO INTEGRADO PARA LA DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS". La configuración de ciertas realizaciones de ese dispositivo posibilita que la temperatura de una solución se cicle rápidamente mientras la solución permanece en la misma cámara, preferentemente sin enfriamiento activo. Por ejemplo, la temperatura podría aumentarse o disminuirse suficientemente para realizar OPCRar en menos de o igual a 20 segundos, o más referentemente menos de o igual a 15 segundos, o más preferentemente menos de o igual a aproximadamente 8 segundos, o más preferentemente menos de o igual a aproximadamente 4 segundos. Por tanto, podría realizarse un ciclo de temperatura de OPCRar en tan poco, o incluso más rápido de, 8 segundos.

### 35 Ejemplo 1: Procedimiento de amplificación de un dúplex diana de ADN por OPCRar

Para demostrar que la OPCRar es capaz de amplificar una secuencia diana específica presente en un analito de ADN bicatenario, se usaron dos cebadores de OPCRar, el cebador HLB (Huang Long Bing) ForSh y el cebador HLBRevSh, para generar una secuencia de 140 pb a partir de un fragmento amplificado por PCR del gen de factor de elongación de *C. Liberibacter asiaticus* por el sistema de OPCRar. El tampón de OPCRar (10x) era prefabricado y contenía Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y Triton X-100 al 0,25 %. Se preparó una solución de OPCRar de 20 μl mezclando:

8,4 μl de agua  
 2,0 μl de tampón de OPCRar 10x  
 3,0 μl de DMSO  
 45 0,4 μl de cloruro de potasio (2 M)  
 0,5 μl cloruro de magnesio (100 mM)  
 0,5 μl de ditiotreitol (100 mM)  
 0,5 μl de dNTP (10 mM)  
 2,0 μl del conjunto de cebadores HLBForSh y HLBRevSh (4 μM cada uno)

50 0,5 μl de ADN polimerasa VentR (exo-) (2 U/μl)  
 0,2 μl de Et SSB, proteína de unión a una hebra termoestable extrema (500 μg/ml)  
 2,0 μl de dilución del producto de PCR (0,6 a 0,0006 ng/μl de concentración de partida)

La reacción se calentó a 85 °C durante 2 minutos para desnaturizar la plantilla y después se cicló 40 veces, oscilando

entre 80 °C durante 5 segundos y 65 °C durante 5 segundos. Después de completarse las reacciones, se mezclaron 5  $\mu$ l del producto de OPCRar con 2  $\mu$ l de tampón de carga de muestra 6x (New England BioLabs) y 1  $\mu$ l de formamida, se procesaron en un gel de acrilamida al 12 % y se visualizaron con bromuro de etidio. Se observó claramente un producto de 140 pb a todas las diluciones mostradas, y coincide con la longitud predicha de la secuencia diana de OPCRar (**figura 9**).

Con referencia ahora a la **figura 9**, se muestra en un gel la amplificación de una secuencia diana específica presente en un ADN bicatenario de acuerdo con una realización de la presente invención. Se usaron diluciones en serie de un fragmento amplificado por PCR del gen del factor de elongación de *C. Liberibacter asiaticus* (0,6 a 0,0006 ng/ $\mu$ l) como plantilla de partida. La reacción se realizó usando ADN polimerasa VentR (exo-), Et SSB y los cebadores HLBForSh y HLBRevSh para generar una secuencia de 140 pb en presencia de DMSO al 15 %. Las reacciones se calentaron a 85 °C durante 2 minutos para desnaturalizar la plantilla y después se ciclaron 40 veces, oscilando entre 80 °C durante 5 segundos y 65 °C durante 5 segundos. Los productos de OPCRar se visualizaron en un gel de acrilamida al 12 % teñido con bromuro de etidio. Se observó claramente un producto de 140 pb que coincide con la longitud predicha de la secuencia diana a todas las diluciones mostradas.

#### 15 **Ejemplo 2: Procedimiento de amplificación de una diana de ADN monocatenario por OPCRar**

Para demostrar que la OPCRar es capaz de amplificar una secuencia diana específica a partir de una plantilla de ADN monocatenario, se usaron los cebadores de OPCRar FP3 y RP4 para generar una secuencia de 153 pb a partir de una plantilla de gripe A universal disponible en el mercado (Biosearch Technologies, Inc.) por el sistema OPCRar. El tampón OPCRar 10x contiene Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y Triton X-100 al 0,25 %. Se preparó una solución de OPCRar de 20  $\mu$ l mezclando:

2,4  $\mu$ l de agua

2,0  $\mu$ l de tampón de OPCRar 10x

3,0  $\mu$ l de DMSO

0,4  $\mu$ l de cloruro de potasio (2 M)

25 0,5  $\mu$ l cloruro de magnesio (100 mM)

0,5  $\mu$ l de ditiotreitol (100 mM)

0,5  $\mu$ l de dNTP (10 mM)

2,0  $\mu$ l del conjunto de cebadores FP3 y RP4 (8  $\mu$ M cada uno)

0,5  $\mu$ l de ADN polimerasa VentR (exo-) (2 U/ $\mu$ l)

30 0,2  $\mu$ l de Et SSB, proteína de unión a una hebra termoestable extrema (500  $\mu$ g/ml)

2,0  $\mu$ l de plantilla de ADN monocatenario (1 E9 a 1 E2 copias/ $\mu$ l).

Como una comparación de la sensibilidad, se procesó una reacción de PCR a tiempo real usando concentraciones idénticas de plantilla a las usadas para las OPCRar anteriores. ThermoPol 10x (New England BioLabs) contiene Tris-HCl 200 mM (pH 8,8), sulfato de amonio 100 mM, cloruro de potasio 100 mM, sulfato de magnesio 20 mM y Triton X-100 al 1 %. Se preparó una solución de RT-PCR de 15  $\mu$ l combinando:

9,7  $\mu$ l de agua

1,5  $\mu$ l de tampón ThermoPol 10x

0,4  $\mu$ l de dNTP (10 mM)

40 1,5  $\mu$ l de conjunto de cebadores UniAfCDC/UniArCDC (4  $\mu$ M cada uno) incluyendo la sonda TaqMan UniApCDC (1  $\mu$ M)

0,4  $\mu$ l de polimerasa Taq (5 U/ $\mu$ l)

1,5  $\mu$ l de plantilla de ADN monocatenario (1 E9 a 1 E2 copias/ $\mu$ l)

Se amplificó una dilución en serie de plantilla de ADN monocatenario de gripe A universal entre 1 E9 a 1 E2 copias/ $\mu$ l por OPCRar en presencia de DMSO al 15 % y PCR a tiempo real usando una sonda TaqMan. Las reacciones de OPCRar se calentaron primero hasta 85 °C durante 2 minutos, después se ciclaron entre 80 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 15 segundos, repetido 40 veces. Las reacciones de RT-PCR se calentaron hasta 95 °C durante 2 minutos, después se ciclaron 45 veces entre 95 °C durante 10 segundos y 58 °C durante 40 segundos. Después de completarse las reacciones se mezclaron 5  $\mu$ l del producto de OPCRar con 2  $\mu$ l de tampón de carga de muestra 6x

(New England BioLabs) y 1  $\mu$ l de formamida, se procesaron en un gel de acrilamida al 12 % y se visualizaron con bromuro de etidio. Se observó claramente un producto de 153 pb para todas las muestras (**figura 10**) y coincide con la longitud predicha de la secuencia diana de OPCRar.

Con referencia ahora a la **figura 10**, se presenta un gel que muestra una secuencia diana presente en una plantilla de ADN monocatenario amplificado de acuerdo con una realización de la presente invención. Se amplificó una dilución en serie de plantilla de ADN monocatenario de gripe A universal (1 E9 a 1 E2 copias/ $\mu$ l Biosearch Technologies, Inc.) por OPCRar usando los cebadores FP3 y RP4 en presencia de DMSO al 15 % para generar un producto de 153 pb, que se visualizó por electroforesis en un gel de acrilamida al 12 % teñido con bromuro de etidio (panel de la izquierda). Como comparación se usaron diluciones idénticas como plantilla de partida para PCR a tiempo real usando el conjunto de cebadores UniAfCDC/UniArCDC y la sonda TaqMan UniApCDC (panel de la derecha). Las reacciones de OPCRar se calentaron primero hasta 85 °C durante 2 minutos, después se ciclaron entre 80 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 15 segundos, repetido 40 veces. Las reacciones de RT-PCR se calentaron hasta 95 °C durante 2 minutos, después se ciclaron 45 veces entre 95 °C durante 10 segundos y 58 °C durante 40 segundos. Es evidente que la OPCRar tiene una sensibilidad similar a las reacciones convencionales de PCR cuando se optimizan apropiadamente.

**15 Ejemplo 3: Procedimiento de amplificación de una secuencia específica presente en ADN plasmídico por OPCRar**

Para demostrar que la OPCRar es capaz de amplificar una secuencia diana específica presente en un ADN plasmídico bicatenario, se usaron dos cebadores de OPCRar el cebador *hyvl*\_For y el cebador *hyvl*\_Rev, para general una secuencia de 139 pb a partir de un plásmido que contenía el gen *hyvl* de *C. Liberibacter asiaticus* por el sistema OPCRar. El tampón OPCRar (10x) era prefabricado y contenía Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y Triton X-100 al 0,25%. Se preparó una solución de OPCRar mezclando:

9,4  $\mu$ l de agua  
 2,0  $\mu$ l de tampón de OPCRar 10x  
 2,0  $\mu$ l de DMSO  
 25 0,4  $\mu$ l de cloruro de potasio (2 M)  
 0,5  $\mu$ l cloruro de magnesio (100 mM)  
 0,5  $\mu$ l de ditiotreitol (100 mM)  
 0,5  $\mu$ l de dNTP (10 mM)  
 2,0  $\mu$ l del conjunto de cebadores *hyvl*\_For y *hyvl*\_Rev (8  $\mu$ M cada uno)  
 30 0,5  $\mu$ l de ADN polimerasa VentR (exo-) (2 U/ $\mu$ l)  
 0,2  $\mu$ l de Et SSB, proteína de unión a una hebra termoestable extrema (500  $\mu$ g/ml)  
 2,0  $\mu$ l de ADN extraído de tejido sano e infectado con *C. Liberibacter* (17,2 ng/ $\mu$ l)

Se realizó una valoración con DMSO del 13-8 % v/v. La reacción se calentó a 85 °C durante 2 minutos para desnaturalizar la plantilla y después se cicló 40 veces, oscilando entre 80 °C durante 10 segundos y 65 °C durante 10 segundos. Después de que las reacciones estuvieron completas, se mezclaron 5  $\mu$ l de producto de OPCRar con 2  $\mu$ l de tampón de carga de muestra 6x (New England BioLabs) y 1  $\mu$ l de formamida, se procesaron en un gel de acrilamida al 12 % y se visualizaron con bromuro de etidio. Se observó claramente un producto de 139 pb para todas las muestras (**figura 11**) y coincide con la longitud predicha de la secuencia diana de OPCRar.

Con referencia ahora a la **figura 11**, se presenta un gel de una secuencia diana específica presente en el ADN plasmídico amplificado de acuerdo con una realización de la presente invención. Se usó un plásmido que contenía el gen *hyvl* de *C. Liberibacter asiaticus* (17,2 ng/ $\mu$ l) como plantilla de partida, y se valoró la concentración de DMSO del 13-8 % v/v. Todas las reacciones se realizaron usando ADN polimerasa VentR (exo-), Et SSB y los cebadores *hyvl*\_For y *hyvl*\_Rev. Las reacciones se calentaron a 85 °C durante 2 minutos para desnaturalizar la plantilla y después se ciclaron 40 veces, oscilando entre 80 °C durante 10 segundos y 65 °C durante 10 segundos. Los productos de OPCRar se visualizaron en un gel de acrilamida al 12 %, teñido con bromuro de etidio. Se observó claramente un producto de 139 pb que coincide con la longitud predicha de la secuencia diana a todas las concentraciones de DMSO ensayadas.

**Ejemplo 4: Procedimiento de amplificación de una secuencia diana de ARN de un virus patogénico humano presente en aspirado nasal por OPCRar**

Para demostrar que la OPCRar es capaz de amplificar una secuencia diana específica presente en una plantilla de ARN monocatenario, se usó el par de cebadores de OPCRar FP3 y RP4, para generar una secuencia de 153 pb a partir de ácido ribonucleico aislado de aspirados nasales clínicos infectados o no infectados con virus de la gripe A. El

tampón de OPCRar (10x) era prefabricado y contenía Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y Triton X-100 al 0,25 %. Se preparó una solución de OPCRar de 20  $\mu$ l combinando:

- 9,3  $\mu$ l de agua
- 2,0  $\mu$ l de tampón de OPCRar 10x
- 5 3,0  $\mu$ l de DMSO
- 0,4  $\mu$ l de cloruro de potasio (2 M)
- 0,5  $\mu$ l cloruro de magnesio (100 mM)
- 0,5  $\mu$ l de ditiotreitol (100 mM)
- 0,5  $\mu$ l de dNTP (10 mM)
- 10 2,0  $\mu$ l del conjunto de cebadores FP3 y RP4 (8  $\mu$ M cada uno)
- 0,5  $\mu$ l de ADN polimerasa VentR (exo-) (2 U/ $\mu$ l)
- 0,2  $\mu$ l de Et SSB, proteína de unión a una hebra termoestable extrema (500  $\mu$ g/ml)
- 0,1  $\mu$ l de transcriptasa inversa Superscript III (200 U/ $\mu$ l)
- 2,0  $\mu$ l de ácido nucleico aislado de aspirado nasal clínico (0,3 ng/ $\mu$ l)
- 15 La reacción se incubó a 55 °C durante 5 minutos para generar ADNc, se calentó hasta 85 °C durante 2 minutos para desnaturar la plantilla y después se cicló 40 veces oscilando entre 80 °C durante 10 segundos y 65 °C durante 10 segundos. Después de completarse las reacciones, se mezclaron 5  $\mu$ l de producto de OPCRar con 2  $\mu$ l de tampón de cargo de muestra 6x (New England BioLabs) y 1  $\mu$ l de formamida, se procesaron en un gel de acrilamida al 12 % y se visualizaron con bromuro de etidio. Se observó claramente un producto de 153 pb en la muestra clínica positiva, pero no en la negativa (**figura 12**), y coincide con la longitud predicha de la secuencia diana de OPCRar.
- 20 Con referencia ahora a la **figura 12**, se ilustra un gel que ilustra una secuencia diana específica presente en ARN monocatenario amplificado de acuerdo con una realización de la presente invención. Se usó ácido ribonucleico aislado de aspirados nasales infectados o no infectados con virus de la gripe A (0,3 ng/ $\mu$ l) como plantilla. Todas las reacciones se realizaron usando transcriptasa inversa Superscript III, ADN polimerasa VentR (exo-), Et SSB y los cebadores FP3 y RP4, en presencia de DMSO al 15 %. La reacción se incubó a 55 °C durante 5 minutos para general ADNc, se calentó hasta 85 °C durante 2 minutos para desnaturar la plantilla y después se cicló 40 veces, oscilando entre 80 °C durante 10 segundos y 65 °C durante 10 segundos. Los productos de OPCRar se visualizaron en un gel de acrilamida al 12 %, teñido con bromuro de etidio. Se observó claramente un producto de 153 pb que coincide con la longitud predicha de la secuencia diana en la muestra clínica positiva, pero no en la negativa.
- 25 30 **Ejemplo 5: Procedimiento de amplificación de una secuencia diana a partir de una bacteria patogénica de plantas por OPCRar**
- 35 Para demostrar que la OPCRar es capaz de amplificar una secuencia diana específica presente en un genoma bacteriano patogénico, se usó el par de cebadores de OPCRar EU523377-F-57 y EU523377-R-56, para generar un fragmento de 213 pb del gen del factor de elongación de *C. Liberibacter asiaticus* a partir del ácido nucleico total aislado de tejido vegetal infectado. El tampón de OPCRar (10x) era prefabricado y contenía Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y Triton X-100 al 0,25 %. Se preparó una solución de OPCRar de 20  $\mu$ l combinando:
- 40 8,4  $\mu$ l de agua
- 2,0  $\mu$ l de tampón de OPCRar 10x
- 3,0  $\mu$ l de DMSO
- 0,4  $\mu$ l de cloruro de potasio (2 M)
- 0,5  $\mu$ l cloruro de magnesio (100 mM)
- 0,5  $\mu$ l de ditiotreitol (100 mM)
- 0,5  $\mu$ l de dNTP (10 mM)
- 45 2,0  $\mu$ l del conjunto de cebadores EU523377-F-57 y EU523377-R-56 (4  $\mu$ M cada uno), el cebador EU523377-F-57 estaba biotinilado (5') o no biotinilado

0,5  $\mu$ l de ADN polimerasa VentR (exo-) (2 U/ $\mu$ l)

0,2  $\mu$ l de Et SSB, proteína de unión a una hebra termoestable extrema (500  $\mu$ g/ml)

2,0  $\mu$ l de ácido nucleico total aislado de tejido vegetal infectado con *C. Liberibacter asiaticus* (1,1 ng/ $\mu$ l)

Para demostrar que las modificaciones de los cebadores son compatibles con OPCRar, el cebador directo EU523377-F-57 se biotiniló en el extremo 5' en algunas reacciones. Las soluciones de OPCRar se calentaron a 85 °C durante 2 minutos para desnaturalizar la plantilla y después se ciclaron 40 veces oscilando entre 80 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 15 segundos. Después de completarse las reacciones se mezclaron 5  $\mu$ l de producto de OPCRar con 2  $\mu$ l de tampón de carga de muestra 6x (New England BioLabs) y 1  $\mu$ l de formamida, se procesaron en un gel de acrilamida al 12 % y se visualizaron con bromuro de etidio. Se observó claramente un producto de 213 pb para todas las muestras y coincide con la longitud predicha de la secuencia diana de OPCRar (**figura 13**).

Con referencia ahora a la **figura 13**, se presenta un gel de una secuencia diana específica presente en ADN genómico bacteriano amplificado de acuerdo con una realización de la presente invención. El ácido nucleico total aislado de tejido foliar infectado con *C. Liberibacter asiaticus* (1,1 ng/ $\mu$ l) se usó como plantilla de partida. Todas las reacciones se realizaron usando la ADN polimerasa VentR (exo-), Et SSB y los cebadores EU523377-F-57 y EU523377-R-56, en presencia de DMSO al 15 %. El cebador EU523377-F-57 estaba biotinilado en el extremo 5' del oligonucleótido o sin modificar. Las soluciones de OPCRar se calentaron a 85 °C durante 2 minutos para desnaturalizar la plantilla y después se ciclaron 40 veces, oscilando entre 80 °C durante 15 segundos y 65 °C durante 15 segundos. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de acrilamida al 12 %, teñido con bromuro de etidio. Se observó claramente un producto de 213 pb para todas las muestras positivas y no para las muestras negativas, que coincide con la longitud predicha de a secuencia diana de OPCRar.

#### Ejemplo 6: Procedimiento de amplificación de una secuencia específica en ADN de orgánulos

Para demostrar que la OPCRar es capaz de amplificar una secuencia diana específica presente en ADN de orgánulos, en este caso ADN de cloroplastos se usó el par de cebadores de OPCRar *rbcL*\_For y *rbcL*\_Rev para generar un fragmento de 137 pb del gen *rbcL* de la planta a partir del ácido nucleico total aislado del tejido vegetal infectado o no infectado con *C. Liberibacter asiaticus*. El tampón de OPCRar (10x) era prefabricado y contenía Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y Triton X-100 al 0,25 %. Se preparó una solución de OPCRar de 20  $\mu$ l combinando:

8,4  $\mu$ l de agua

2,0  $\mu$ l de tampón de OPCRar 10x

3,0  $\mu$ l de DMSO

0,4  $\mu$ l de cloruro de potasio (2 M)

0,5  $\mu$ l cloruro de magnesio (100 mM)

0,5  $\mu$ l de ditiotreitol (100 mM)

0,5  $\mu$ l de dNTP (10 mM)

35 2,0  $\mu$ l del conjunto de cebadores *rbcL*\_For y *rbcL*\_Rev (2 o 4  $\mu$ M cada uno)

0,5  $\mu$ l de ADN polimerasa VentR (exo-) (2 U/ $\mu$ l)

0,2  $\mu$ l de Et SSB, proteína de unión a una hebra termoestable extrema (500  $\mu$ g/ml)

2,0  $\mu$ l de ácido nucleico total aislado de tejido foliar (3,3 ng/ $\mu$ l)

40 Se usaron dos concentraciones diferentes del par de cebadores *rbcL*\_For y *rbcL*\_Rev para determinar un umbral para la concentración de cebador necesaria para amplificar de forma eficaz el fragmento génico *rbcL*. La reacción se calentó a 85 °C durante 2 minutos para desnaturalizar la plantilla y después se cicló 40 veces, oscilando entre 76 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 10 segundos. Después de completarse las reacciones, se mezclaron 5  $\mu$ l del producto de OPCRar con 2  $\mu$ l de tampón de carga de muestra 6x (New England BioLabs) y 1  $\mu$ l de formamida, se procesaron en un gel de acrilamida al 12 % y se visualizaron con bromuro de etidio. Se observó claramente un producto de 137 pb para muestra tanto infectadas como no infectadas, y coincide con la longitud predicha de la secuencia diana de OPCRar (**figura 14**).

45 Con referencia ahora a la **figura 14**, se presenta la amplificación de una secuencia diana específica presente en ADN de cloroplastos de acuerdo con una realización de la presente invención en un gel. El ácido nucleico total aislado de tejido foliar infectado (*i*) o no infectado (*ii*) con *C. Liberibacter asiaticus* (3,3 ng/ $\mu$ l) se usó como plantilla de partida. Todas las reacciones se realizaron usando la ADN polimerasa VentR (exo-), Et SSB y los cebadores *rbcL*\_For y

5 *rbcL\_Rev* en presencia de DMSO al 10 %. Las soluciones de OPCRar se calentaron a 85 °C durante 2 minutos para desnaturalizar la plantilla y después se ciclaron 40 veces, oscilando entre 76 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 10 segundos. Los productos amplificados se visualizaron en un gel de acrilamida al 12 %, teñido con bromuro de etidio. Se observó claramente un producto de 137 pb para todas las muestras positivas y coincide con la longitud predicha de la secuencia diana de OPCRar.

**Ejemplo 7: Procedimiento de amplificación combinada de una secuencia diana y control positivo por OPCRar**

10 Para demostrar que la OPCRar es capaz de amplificar múltiples secuencias diana específicas, se amplificó el ácido nucleico extraído de un tejido vegetal infectado con *C. Liberibacter asiaticus* con los pares de cebadores de OPCRar *hyvl\_For*/*hyvl\_Rev*, y *rbcL\_For*/*rbcL\_Rev*. Estos conjuntos de cebadores generan productos de 139 y 137 pb, respectivamente. El tampón de OPCRar (10x) era prefabricado y contenía Tris-HCl 400 mM (pH 8,4), sulfato de amonio 10 mM, cloruro de potasio 100 mM y Triton X-100 al 0,25 %. Se preparó una solución de OPCRar de 20  $\mu$ l combinando:

- 6,4  $\mu$ l de agua
- 2,0  $\mu$ l de tampón de OPCRar 10x
- 3,0  $\mu$ l de DMSO
- 15 0,4  $\mu$ l de cloruro de potasio (2 M)
- 0,5  $\mu$ l cloruro de magnesio (100 mM)
- 0,5  $\mu$ l de ditiotreitol (100 mM)
- 0,5  $\mu$ l de dNTP (10 mM)
- 2,0  $\mu$ l del conjunto de cebadores *rbcL\_For* y *rbcL\_Rev* (2 o 3  $\mu$ M cada uno)
- 20 2,0  $\mu$ l del conjunto de cebadores *hyvl\_For* y *hyvl\_Rev* (8  $\mu$ M cada uno)
- 0,5  $\mu$ l de ADN polimerasa VentR (exo-) (2 U/ $\mu$ l)
- 0,2  $\mu$ l de Et SSB, proteína de unión a una hebra termoestable extrema (500  $\mu$ g/ml)
- 2,0  $\mu$ l de ácido nucleico total aislado de tejido foliar (3,3 ng/ $\mu$ l)

25 Se usaron dos concentraciones diferentes del par de cebadores *rbcL\_For* y *rbcL\_Rev* para determinar un umbral para la concentración de cebador necesaria para amplificar de forma eficaz el fragmento génico *rbcL* en presencia de cebadores 800 nM específicos para el fragmento génico *hyvl*. La reacción se calentó a 85 °C durante 2 minutos para desnaturalizar la plantilla y después se cicló 40 veces, oscilando entre 76 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 10 segundos. Después de completarse las reacciones, se mezclaron 5  $\mu$ l del producto de OPCRar con 2  $\mu$ l de tampón de carga de muestra 6x (New England BioLabs) y 1  $\mu$ l de formamida, se procesaron en un gel de acrilamida al 12 % y se visualizaron con bromuro de etidio. Se observaron claramente ambos productos de 139 pb y 137 pb, que coinciden con la longitud predicha de las secuencias dianas de OPCRar. Por motivos de claridad, los productos de OPCRar generados usando ambos pares de cebadores en solitario (Ejemplos 3 y 6) se procesaron junto con las reacciones combinadas (figura 15).

35 Con referencia ahora a la figura 15, se presenta un gel que ilustra los productos de amplificación de la combinación de dos secuencias diana de acuerdo con una realización de la presente invención. Se usó el ácido nucleico total aislado de tejido foliar infectado con *C. Liberibacter asiaticus* (3,3 ng/ $\mu$ l) como material de partida. Todas las reacciones se realizaron usando la ADN polimerasa VentR (exo-), Et SSB y los conjuntos de cebadores *hyvl\_For*/*hyvl\_Rev* y *rbcL\_For*/*rbcL\_Rev* a las concentraciones indicadas en presencia de DMSO al 10 %. Las soluciones de OPCRar combinada se calentaron a 85 °C durante 2 minutos para desnaturalizar la plantilla y después se ciclaron 40 veces, oscilando entre 76 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 10 segundos. Los productos combinados se visualizaron en un gel de acrilamida al 12 %, teñido con bromuro de etidio. Cuando se comparan con los productos de OPCRar generados del primer conjunto en solitario (véanse las figuras 11 y 15), se observaban claramente ambos productos de 139 y 137 pb.

45 Con referencia ahora a la figura 16, se ilustra un producto de amplificación resultante de una reacción en presencia de Et SSB de acuerdo con una realización de la presente invención. SSB potencia la eficacia de amplificación a temperaturas de fusión inferiores usando el sistema y procedimiento de la presente invención. Se investigó el uso de la proteína de unión a una hebra termoestable extrema "ET SSB" para demostrar que ayuda en el funcionamiento de la OPCRar a ciertas temperaturas de fusión. La reacción de OPCRar se realizó para la diana patogénica HLB con ADN de muestra foliar purificado que contiene genes de la enfermedad HLB. La plantilla era ADN purificado de hojas de cítrico de un árbol infectado con *C. Liberibacter asiaticus*. Los cebadores fueron *hyvl\_For*/ y *hyvl\_Rev*. Las condiciones del termociclador fueron: Fusión inicial de 85 °C durante 2 minutos, seguida por 40 ciclos de desnaturalización de 76 °C o 74 °C durante 10 segundos e hibridación a 60 °C durante 10 segundos. Los resultados

indicaron que en presencia de Et SSB se producía amplificación de la diana de *C. Liberibacter asiaticus* a todos los 5 regímenes de temperatura ensayados. El experimento de OPCRar comparativo se hizo por duplicado en presencia de proteína ET SSB y sin ET SSB. Se usó un termociclador de PCR convencional con control preciso de la temperatura para permitir la evaluación del rendimiento de la amplificación con y sin SSB. Los resultados indicaron que en presencia de ET SSB se recoge HLB amplificado a 74 °C y sin ET SSB no era observable.

Con referencia ahora a la **figura 17**, se muestra la electroforesis en gel de reacciones de OPCRar realizadas, usando 10 los cebadores *hyvl*\_For y *hyvl*\_Rev y ADN de *C. Liberibacter* purificado aislado de las hojas de un árbol infectado de acuerdo con una realización de la presente invención en la que la reacción no incluye parámetros de rampa implicados en un termociclador típico de PCR **figura 17A** o incluye tiempo de rampa para ciclar la temperatura **figura 17B**. Rampa, 15 como se usa en el presente documento, es una referencia al calentamiento (por ejemplo, en cada ciclado térmico, el procedimiento de calentamiento para elevar la temperatura de la reacción de amplificación desde la temperatura de hibridación hasta la de desnaturalización se llama elevación en rampa o el enfriamiento de la temperatura de desnaturalización hasta la temperatura de hibridación se llama disminución en rampa. Todos los cicladores convencionales y procedimientos de PCR tienen un diseño controlado de calentamiento donde la elevación en rampa es de aproximadamente >3 grados/segundo y la tasa de disminución en rampa es de aproximadamente >1 grado/segundo. El tiempo de rampa no se incluye en los perfiles de ciclado típicos, el instrumento no empieza a contar la duración de tiempo durante la fase de desnaturalización, hibridación y extensión hasta que se alcanza la temperatura deseada. Por ejemplo, el tiempo de desnaturalización es de 10 segundos a 90 grados, el instrumento no empezará a contar el tiempo de 10 segundos hasta que se alcancen 90 grados. En contraste, un sistema y procedimiento de la 20 presente invención proporciona un dispositivo de calentamiento de bajo coste que está diseñado, por ejemplo, los 80 grados durante 10 segundos significa que el tiempo empieza a contar cuando empieza el procedimiento de calentamiento (en lugar de empezar hasta que se alcance la temperatura de desnaturalización deseada). **Figura 17A**: Se examinó la amplificación por OPCRar de una diana de enfermedad HLB (un patógeno de enfermedad de la ecología de cítricos Huang Long Bing) en un motor del calentador térmico (sin enfriamiento activo y control preciso 25 de la temperatura,  $> \pm 2$  grados de fluctuación, (véanse, por ejemplo, los sistemas y aparatos divulgados en el documento 61/477,357). Se realizaron reacciones de OPCRar de 20  $\mu$ l en cámaras de reacción de microcalentador bajo el control del microprocesador en un dispositivo desarrollado por Mesa Tech International, Inc. (MTI Device) o en un termociclador de PCR tradicional (PCR Thermocycler) de modo que se calcularon tiempos de permanencia de 10 segundos para cada segmento de temperatura del programa empezando inmediatamente después de ejecutar la 30 orden de cambiar las temperaturas por el microprocesador (es decir, sin tiempo de rampa **figura 17A**). Esto está en contraste con los tiempos de permanencia de 10 segundos para cada segmento de temperatura del programa calculado empezando inmediatamente después de que se detecte la temperatura diana por el detector de temperatura localizado en el pocillo de reacción (es decir, tiempo de rampa **figura 17B**). Las condiciones del termociclador de PCR fueron las siguientes: Fusión inicial: 85 °C durante 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 80 °C durante 10 segundos y 35 60 °C durante 10 segundos. Las condiciones del dispositivo MTI fueron las siguientes: Fusión inicial: 85 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de 82 °C durante 10 segundos y 59 °C durante 20 segundos.

**Figura 17A:** Primer carril, amplificación por OPCRar (reacción de 20  $\mu$ l) sin rampa separada. Desde la izquierda: 40 escala de tamaño de ADN convencional de 50 pb; segundo y tercer carril: reacción de amplificación por OPCRar (por duplicado 2.º y 3.º carril) en un motor termociclador de PCR convencional donde la etapa de rampa y el control preciso de la temperatura están acomodados. Fusión inicial: 85 °C durante 2 minutos, ciclado entre desnaturalización de 80 °C durante 10 segundos e hibridación de 60 °C durante 10 segundos con 40 ciclos. El 4.º y 5.º carril: amplificación por 45 OPCRar realizada en un motor térmico de bajo coste sin enfriamiento activo y/o un control de rampa separado. El motor térmico desciende a 80 °C de desnaturalización o disminuye descendiendo hasta la temperatura de hibridación de 60 °C desde las temperaturas de campo ambientales (~ 25 grados) en comparación con no tener ninguna fase de rampa para la temperatura de desnaturalización o hibridación. Se realizó OPCRar de HLB con ADN vegetal purificado 50 que contenía secuencias diana de enfermedad HLB en una reacción de 20  $\mu$ l. Se usó el termociclador de PCR para un control positivo para el ensayo del dispositivo MTI. Las condiciones de termociclador de PCR fueron las siguientes: Las condiciones del termociclador de dispositivo MTI sin rampa fueron las siguientes: Fusión inicial: 85 °C durante 2 minutos, ciclado entre desnaturalización de 82 °C durante 10 segundos e hibridación de 59 °C durante 20 segundos. El ciclado se repitió 40 veces. El termociclador del dispositivo MTI para las fases de elevación en rampa fueron las 55 mismas condiciones excepto que la fase de elevación en rampa < 10 segundos y la fase de disminución en rampa < 20 segundos. Los datos sugirieron que la OPCRar de HLB aún podía amplificar el amplicón de HLB incluso sin las fases de elevación en rampa y disminución en rampa. La comparación de 17A y 17B revela una mejora significativa en el rendimiento del producto de amplificación cuando se proporciona un tiempo de rampa.

55 Con referencia ahora a la **figura 18**, se ilustran reacciones de OPCRar combinadas de acuerdo con una realización de la presente invención que contiene dos conjuntos de cebadores en el dispositivo de amplificación de bajo coste basado en resistencia térmica de MTI como se describe anteriormente: 1) cebadores *hyvl*\_For y *hyvl*\_Rev específicos para una diana de ADN de *C. Liberibacter* y 2) cebadores *rbcl* (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa) For y *rbcl*\_Rev específico para un producto de amplificación del gen constitutivo de cítricos *rbcl* en el gel. Los productos de 60 reacción resultantes de la amplificación por PCR como se describe y realiza en un calentador de bajo coste sin rampa (por ejemplo 5 grados/segundo en el dispositivo de PCR) y sin control preciso de la temperatura se procesaron en un gel. Se ensayó el control positivo interno de RbCL con los cebadores de HLB en el termociclador de PCR y el dispositivo MTI (con rampa o sin programa de rampa). Se realizó una reacción de 40  $\mu$ l con muestra de HLB purificada.

Las condiciones del termociclador de PCR fueron las siguientes: Fusión inicial: 85 °C durante 2 minutos, ciclador entre desnaturalización de 80 °C durante 10 segundos e hibridación de 60 °C durante 10 segundos. Las condiciones de amplificación con el dispositivo MTI fueron las siguientes: Fusión inicial: 90 °C durante 2 minutos, ciclador entre desnaturalización de 82 °C durante 10 segundos e hibridación de 59 °C durante 20 segundos. Se descubrió que sin rampa aún se podía amplificar ambas secuencias de cebadores de HLB y RbCL. El producto de HLB de aproximadamente - 147 pb y el producto de RbCL de - 140 pb. El dispositivo MTI para ambas condiciones fue comparable con el producto amplificado por el termociclador de PCR. El cebador directo para esta reacción es ccagccttga tcgttacaaa gggcgatgct acaacatt (SEQ ID NO: 9) (Tm de aproximadamente 73,9 °C (DMSO al 10 %, 76/60 °C) y el cebador inverso es catgttagta acagaacctt cttcaaaaag gtctaacggg taa (SEQ ID NO: 10) (Tm de aproximadamente 71,2 °C (DMSO al 10 %, 76/60 °C). Las reacciones de OPCR se realizaron con o sin la inclusión de tiempos de rampa en los tiempos de permanencia de temperatura (como se describe para las figuras 16 y 17) según se indica. Se realizaron reacciones de 40 µl usando ADN foliar de cítrico purificado de un árbol infectado con *C. Liberibacter*. Las condiciones de control del termociclador de PCR fueron las siguientes: Fusión inicial: 85 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de 80 °C durante 10 segundos y 60 °C durante 10 segundos. Las condiciones de amplificación con el dispositivo MTI fueron las siguientes: Fusión inicial: 90 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de 82 °C durante 10 segundos y 59 °C durante 20 segundos. Los resultados revelaron que sin la inclusión de tiempos de rampa en el cálculo del tiempo de permanencia, el dispositivo MTI era capaz de amplificar ambas secuencias de *C. Liberibacter* y *rbcL*. El producto de *C. Liberibacter* es de aproximadamente 147 pb (HLB) y el producto de *rbcL* (RbCL) es de aproximadamente 140 pb.

20 Todas las temperaturas de fusión (Tm) de los cebadores se calcularon usando IDT OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA) usando el software de cálculo de Tm Primer 3 donde los parámetros de sal, dNTP, Mg, concentración de cebador se consideran usando los siguientes parámetros:

25 Concentración de oligonucleótido: 0,25 µM; concentración de Na+: 50 mM; concentración de Mg++ = 2,5 mM; concentración de dNTP = 0,25 µM. Símbolo "a" significa adenina, "g" significa guanina, "c" significa citosina, "t" significa timina, "u" significa uracilo, "r" significa purina, "y" significa pirimidina, "m" significa amino, "k" significa ceto, "n" significa cualquiera de a o g o c o t/u, desconocido u otro.

(SEQ ID NO: 1)

**NÚMERO DE ACCESO:** CY087034

30 **TIPO:** ARN vírico

**LONGITUD:** 987

**ORGANISMO:** virus de la gripe A (H1N1)

**OTRA INFORMACIÓN:** genes de proteína 2 de matriz (M2) y proteína 1 de matriz (M1)

(SEQ ID NO: 2)

35 **TIPO:** cebador directo

**NOMBRE:** FP3

**LONGITUD:** 46

**Tm:** media de 75 °C

(SEQ ID NO: 3)

40 **TIPO:** cebador inverso

**NOMBRE:** RP3

**LONGITUD:** 45

**Tm:** media de 77,8 °C

(SEQ ID NO: 4)

45 **TIPO:** cebador inverso

**NOMBRE:** RP4

**LONGITUD:** 46

**Tm:** media de 74,7 °C

(SEQ ID NO: 5)

**TIPO:** cebador directo

**NOMBRE:** UniAfCDC

**LONGITUD:** 22

5 **Tm:** media de 65,0 °C

(SEQ ID NO: 6)

**TIPO:** cebador inverso

**NOMBRE:** UniArCDC

**LONGITUD:** 24

10 **Tm:** media de 66,6 °C

(SEQ ID NO: 7) FAM-tgcagtccctc gctcactggg cacg-BHQ

**TIPO:** sonda TaqMan

**NOMBRE:** UniApCDC

**LONGITUD:** 24

15 **Tm:** 73,4 °C

(SEQ ID NO: 8)

**NUMERO DE ACCESO:** AB505957

**TIPO:** ADN de cloroplasto

**LONGITUD:** 1326

20 **ORGANISMO:** *Citrus sinensis*

**OTRA INFORMACIÓN:** rbcL, subunidad grande de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa

(SEQ ID NO: 9)

**TIPO:** cebador directo

**NOMBRE:** rbcL\_For

25 **LONGITUD:** 38

**Tm:** 73,9 °C

(SEQ ID NO: 10)

**TIPO:** cebador inverso

**NOMBRE:** rbcL\_Rev

30 **LONGITUD:** 43

**Tm:** 71,2 °C

(SEQ ID NO: 11)

**NUMERO DE ACCESO:** de EU523377

**TIPO:** ADN bacteriano

35 **LONGITUD:** 890

**ORGANISMO:** *Candidatus Liberibacter asiaticus*

**OTRA INFORMACIÓN:** factor de elongación Ts

(SEQ ID NO: 12)

**TIPO:** cebador director

**NOMBRE:** NBEU523377-F-57

**LONGITUD:** 57

5 **Tm:** 75,8 °C

(SEQ ID NO: 13) [biotina-5]tcttcgtatc ttcatgcttc tccttctgag ggtttaggat cgattgggt tcttgta

**TIPO:** cebador directo biotinilado

**NOMBRE:** EU523377-F-57

**LONGITUD:** 57

10 **Tm:** 75,8 °C

(SEQ ID NO: 14)

**TIPO:** cebador directo

**NOMBRE:** HLBForSh

**LONGITUD:** 47

15 **Tm:** 75,6 °C

(SEQ ID NO: 15)

**TIPO:** cebador inverso

**NOMBRE:** EU523377-R-56

**LONGITUD:** 56

20 **Tm:** 75,8 °C

(SEQ ID NO: 16)

**TIPO:** cebador inverso

**NOMBRE:** HLBRevSh

**LONGITUD:** 49

25 **Tm:** 75,5 °C

(SEQ ID NO: 17)

**DIANA:** ARN ribosómico 16S de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

**TIPO:** cebador directo (subrayado), contiene secuencia de detección 5'

**NOMBRE:** HLBas-P2

30 **LONGITUD:** 39

**Tm:** 62,7 °C

(SEQ ID NO: 18)

**DIANA:** ARN ribosómico 16S de *Candidatus Liberibacter asiaticus*

**TIPO:** cebador inverso (subrayado), contiene promotor T7 5'

35 **NOMBRE:** HLBr-P1

**LONGITUD:** 56

**Tm:** 64,5 °C

(SEQ ID NO: 19)

**TIPO:** cebador directo

**NOMBRE:** hyvl\_For

**LONGITUD:** 45

5 **Tm:** 72,2 °C

(SEQ ID NO: 20)

**TIPO:** cebador inverso

**NOMBRE:** hyvl\_Rev

**LONGITUD:** 51

10 **Tm:** 70,9 °C

Aunque la invención se ha descrito en detalle con referencia particular a las realizaciones descritas, otras realizaciones pueden conseguir los mismos resultados. Serán obvias para los expertos en la materia variaciones y modificaciones de la presente invención y se pretende que cubra todas estas modificaciones equivalentes. Las divulgaciones completas de todas las patentes y publicaciones citadas anteriormente se incorporan por la presente por referencia.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Mesa Tech International, Inc.

<120> Reacción de amplificación oscilante para ácidos nucleicos

20 <130> 33106-PCT2

<140> 61/477.357

<141> 20-04-2011

25 <150> 61/477,437

<151> 20-04-2011

<160> 28

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1010

35 <212> ADN

<213> Virus de la gripe A

<220>

<221> misc\_feature  
 <222> (993)..(993)  
 <223> n es a, c, g o t

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1002)..(1002)  
 <223> n es a, c, g o t

10 <400> 1

|            |             |             |             |            |            |      |
|------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|------|
| taaagatgag | tcttctaacc  | gaggtcgaaa  | cgtacgttct  | ttctatcatc | ccgtcaggcc | 60   |
| ccctcaaago | cgagatcgcg  | cagagactgg  | aaagtgttctt | tgcaggaaag | aacacagatc | 120  |
| ttgaggctct | catggaatgg  | ctaaagacaa  | gaccaatctt  | gtcacctctg | actaaggaa  | 180  |
| ttttaggatt | tgtgttcacg  | ctcacccgtgc | ccagtgagcg  | aggactgcag | cgttagacgt | 240  |
| ttgtccaaaa | tgcctaaat   | ggaaatgggg  | acccgaacaa  | catggataga | gcagttaaac | 300  |
| tatacaagaa | gctcaaagga  | gaaaataacgt | tccatggggc  | caaggaggtg | tcactaagct | 360  |
| ttcaactggt | gcacttgcca  | gttgcattggg | cctcatatac  | aacaggatgg | gaacagtgac | 420  |
| cacagaagct | gttttggtc   | tagtgtgtgc  | cacttgtgaa  | cagattgctg | attcacagca | 480  |
| tcggtctcac | agacaaatgg  | ctactaccac  | caatccacta  | atcaggcatg | aaaacagaat | 540  |
| ggtgctggct | agcaactacgg | caaaggctat  | ggaacagatg  | gctggatcga | gtgaacaggc | 600  |
| agcagaggcc | atggagggtt  | ctaattcagac | taggcagatg  | gtacatgcaa | tgagaactat | 660  |
| tggactcat  | cctagctcca  | gtgctggct   | gaaagatgac  | cttcttgaaa | atttgcaggc | 720  |
| ctaccagaag | cgaatggag   | tgcagatgca  | gcgattcaag  | tgatectctc | gtcattgcag | 780  |
| caaatatcat | tgggatctt   | cacctgat    | tgtggattac  | tgatcgtt   | tttttcaa   | 840  |
| gtatttatcg | tcgctttaaa  | tacggtttga  | aaagagggcc  | ttctacggaa | ggagtgcctg | 900  |
| agtccatgag | ggaagaatat  | caacaggaac  | agcagagtgc  | tgtggatgtt | gacgatggtc | 960  |
| attttgc    | catagagcta  | gagtaataga  | cgnnttgcc   | anaatgccct |            | 1010 |

<210> 2  
 15 <211> 46  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo diseñado para la SEQ ID NO 1

<400> 2

5 ywctcatgga rtggctaaag acaagaccra tcctgtcacc tctgac 46

<210> 3

<211> 40

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso diseñado para la SEQ ID NO 1

15 <400> 3

agggcattt ggacaaakcg tctacgtygc agtccycgt 40

<210> 4

<211> 46

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso para la SEQ ID NO 1

25 <400> 4

tttggcattt cattttttt tagggcattt tggacaaakc gtctat 46

<210> 5

30 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo UniAfCDC para la SEQ ID NO 1

35 <400> 5

gaccratcct gtcacacctg ac 22

<210> 6

<211> 24

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso UniArCDC diseñado para la SEQ ID NO 1

10

<400> 6

agggcattt ggacaaakcg tcta 24

<210> 7

<211> 24

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sonda TaqMan UniApCDC

20

<400> 7

tgcagtcctc gctcactggg cacg 24

<210> 8

25 <211> 1326

<212> AND

<213> *Citrus sinensis*

<400> 8

30

|   |      |
|---|------|
| tgttggattc aaggccggtg ttaaagatta taaattgact tattatactc ctgactatgt   | 60   |
| aaccaaagat actgatatct tggcagcatt ccgagtaact cctcagcccg gagttccacc   | 120  |
| cgaggaagcg ggggctgcgg tagctgcgga atcttctact ggtacctgga cagctgttg    | 180  |
| gaccgatggg cttaccagcc ttgatcgta caaaggcga tgctacaaca ttgagccgt      | 240  |
| tgctggagaa gagaatcaat atatatgtta tgttagttac ccgttagacc ttttgaaga    | 300  |
| aggttctgtt actaacatgt ttacttccat tgtggtaat gtattggtt tcaaagcact     | 360  |
| gogcgcctcta cgtctagagg atctacgaat ccotcctgog tatactaaaa ottccaaagg  | 420  |
| ccgcgcctcac ggcatccaaag ttgagagaga taaattgaac aagtatggcc gtcccccttt | 480  |
| gggatgtact attaaaccta aactggggtt atccgcgaag aattatggta gggcggttta   | 540  |
| tgaatgtcta cgtggtggac ttgactttac caaagatgtat gagaacgtga actcccaacc  | 600  |
| atttatgcgt tggagggacc gtttcttatt ttgtgcggaa gctcttata aagcgcaagc    | 660  |
| tgaaacaggt gaaatcaaag gtcattactt gaatgctact gcagggacat gcgaagaaat   | 720  |
| gctaaaaagg gctgtcttg ccagagagtt gggagttcct atcgtaatgc atgactactt    | 780  |
| aacaggggaa ttcaccgcaa atactacctt ggctcattat tgccgagata atggctact    | 840  |
| tcttcacatc caccgtgcaa tgcattgcagt tattgataga cagaagaatc atggatgc    | 900  |
| ctttcgtgta ctagctaaag ctttcgtct gtctggtgga gatcatattc acgccccgtac   | 960  |
| agtagtaggt aaacttgagg gggaaagaga cataaccttggatttttttgcgtatgc        | 1020 |
| tgtatgattt gttaaaaag atcgaagccg cggatattat ttcactcaag attgggtctc    | 1080 |
| tataccaggt gttatacccg tggctccgg gggatttcac gtttggcata tgcctgcgtt    | 1140 |
| gacagagatc tttggagatg attccgtatt acaatttggt ggaggaactt taggacaccc   | 1200 |
| ttggggaaat gcacccggcg ctgtagctaa tcgagtagct ctagaagcat gtgtacaagc   | 1260 |
| tcgtaatgaa ggacgcgatc ttgcgtgaa aggtatgaa attatccggg aggctagcaa     | 1320 |
| atggag  | 1326 |

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 38

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Cebador directo rbcL\_For

10

&lt;400&gt; 9

ccagccttga tcgttacaaa gggcgatgct acaacatt 38

<210> 10  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>

<400> 10  
catgttaqta acagaaccctt cttcaaaaaaq qtctaacqqq taa 43

Highly Programmatic Programming Languages

<210> 11  
<211> 890  
<212> ADN  
<213> *Candidatus Liberibacter asiaticus*

15 <213> *Candidatus Liberibacter asiaticus*

|  |     |
|--|-----|
| atgagtaagg tatctgcgtg tgcgttaaag gagttacgtg ggaaaactgg tgcaggtatc    | 60  |
| ttggactgca agaatgcctt tttggaggct aagggtgata gtgaatttgc gattgatatt    | 120 |
| ttgcgcacta aaggagctat ggcagctagt aagagagagg gtagaaaagggt ttcaagagggg | 180 |
| cttataggaa ttgctcgta tggatataag aaggcatcga ttgtagaagt caatgtttag     | 240 |
| accgatagtt tggcaaaaaa cactgatttt cagagtcttg tttctaataat tgccggatt    | 300 |
| gctctttcca ccgatggttc tttggacaat gttcttgcga tgccatttga ccatagtggg    | 360 |
| attactgtgg gggatggaaat taagcagcag attgctatca ccggtaatg tattaagctg    | 420 |
| aggcgttccg ctcttctgtg tgtttggaa ggggtcatct ctgcgtatct tcattgtttct    | 480 |
| ccttctgagg gtttaggatc gattgggttt cttgtacgt tgcaagtcttgc tgccgaaat    | 540 |
| aaggaattgc ttctgcgat tggagagaag attgcagtgc atgtaatgct ggcttctccct    | 600 |
| tcggtgattt ctgtgcagat gcttgatcct tctattgttg ctaataaacg tgcccattac    | 660 |
| atgacagaag cacttgattc tggaaaatca gtaatattt tgaaaagat cgtaaatggaa     | 720 |
| aagatgcataa gctttgttaa ggaatgtgtt ctttgatcctt aggggtttgt tggtgtatcct | 780 |
| tccaaaactg tatcagattt tttgaaaagaa tctgaaaaat caatcggtgc ttctattgaa   | 840 |
| attattggat tatctcattt tattttatgtt aaaaatgtt atgatgttta 890           |     |

20

<210> 12

<211> 57  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador directo NBEU523377-F-57

<400> 12  
tcttcgtatc ttcatgcttc tccttctgag ggtttaggat cgattggtgt tcttgta 57

10 <210> 13  
<211> 57  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador directo biotinilado EU523377-F-57

<400> 13  
tcttcgtatc ttcatgcttc tccttctgag ggtttaggat cgattggtgt tcttgta 57

20 <210> 14  
<211> 47  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Cebador directo HLBForSh

<400> 14  
cgattggtgt tctttagcgt ttgcagtctt ctgcggaaaga taaggaa 47

30 <210> 15  
<211> 56  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Cebador inverso EU523377-R-56

<400> 15

tgcttctgtc atgtaatggg cacgtttatt agcaacaata gaaggatcaa gcatct 56

5

<210> 16

<211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Cebador inverso HLBRevSh

<400> 16

15

aacaatagaa ggatcaagca tctgcacaga aatcaccgaa ggagaagcc 49

<210> 17

<211> 39

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo (subrayado), contiene secuencia de detección 5' HLBas-P2

25

<400> 17

gatgcaaggt cgcatatgag gagcgcgtat gcaatacga 39

<210> 18

<211> 56

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso (subrayado), contiene promotor T7 5' HLBr-P1

35

<400> 18

aattctaata cgactcacta tagggagaag ggcgttatcc cgtaaaaaa ggtaga 56

<210> 19  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Cebador directo hyv1\_For

<400> 19

10 ggccgttta acacaaaaga tgaatatcat agatgggta gtcaa 45

<210> 20  
<211> 51  
<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso hyvl\_Rev

20 <400> 20  
cggccattt agataaatca atttgttcta gtttagatac atcaattgt t 51

<210> 21  
<211> 46

25 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador directo

30 <400> 21  
gttctttag cgttgcagtc ttctgcggaa gataaggaat tgctt 46

<210> 22  
<211> 49

35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso

<400> 22

5 gggcacgtt attagcaaca atagaaggat caagcatctg cacagaaat 49

<210> 23

<211> 48

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo

15 <400> 23

ctttagcgt tgcagtcttc tgccgaagat aaggaattgc ttctgcg 48

<210> 24

<211> 51

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso

25 <400> 24

cacgtttatt agcaacaata gaaggatcaa gcatctgcac agaaatcacc g 51

<210> 25

30 <211> 49

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Cebador directo

<400> 25

ggtgttcttg tatcgttgca gtcttcgca gaagataagg aattgctt 49

<210> 26

<211> 54

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso

10

<400> 26

gtaatgggca cgtttattag caacgataga aggatcaagc aactgcacag aaat 54

<210> 27

15 <211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador directo

<400> 27

cttgtatcgt tgcagtcttc tgccgaagat aaggaattgc ttctgcg 48

25 <210> 28

<211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Cebador inverso

<400> 28

ggcacgtta ttagcaacga tagaaggatc aagcatctgc acagaaatca ccg 53

35

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de amplificación de una plantilla de secuencia diana de ácido nucleico contenido en una muestra, que comprende:

5      poner en contacto la muestra con una mezcla de reacción de amplificación que contiene un cebador complementario a la plantilla de secuencia diana de ácido nucleico y un agente desestabilizante de ácido nucleico que comprende al menos uno de DMSO, y formamida a una concentración del 8-15 por ciento en volumen, teniendo el cebador una temperatura de fusión  $\geq 65^{\circ}\text{C}$ ;

10     oscilar una temperatura de la reacción entre una temperatura de desnaturalización superior y una temperatura de hibridación inferior, en el que un cambio en la temperatura es no mayor de  $20^{\circ}\text{C}$  durante una pluralidad de ciclos de temperatura, siendo la temperatura de desnaturalización superior suficientemente alta para desnaturalizar completamente la plantilla; y

amplificar la plantilla de la secuencia diana de ácido nucleico,

en el que la temperatura superior es no mayor de  $85^{\circ}\text{C}$ .

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cambio en la temperatura es no mayor de  $15^{\circ}\text{C}$ .

15     3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que tras alcanzar la temperatura superior o la temperatura inferior, la temperatura se mantiene durante un periodo establecido de tiempo dentro de una fluctuación de temperatura.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que tras alcanzar una temperatura superior o inferior dentro del intervalo de temperatura, la temperatura se varía hasta la otra temperatura.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura inferior es no menor de  $50^{\circ}\text{C}$ .

20     6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la plantilla de la secuencia diana de ácido nucleico es ADN o ARN monocatenario o bicatenario.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la longitud del ácido nucleico diana puede ser menor de 1000 pb.

25     8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la mezcla de reacción de amplificación comprende un par de cebadores que se unen a hebras opuestas de la plantilla de ácido nucleico.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el par de cebadores tiene una longitud y un contenido de GC de modo que la temperatura de fusión sea  $\geq 65^{\circ}\text{C}$ .

10. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el par de cebadores tiene una longitud entre 35-70 pares de bases, preferentemente una longitud entre 40-47 pares de bases.

30     11. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la mezcla de reacción de amplificación comprende:

DMSO como agente desestabilizante;

cátion monovalente;

cátion divalente;

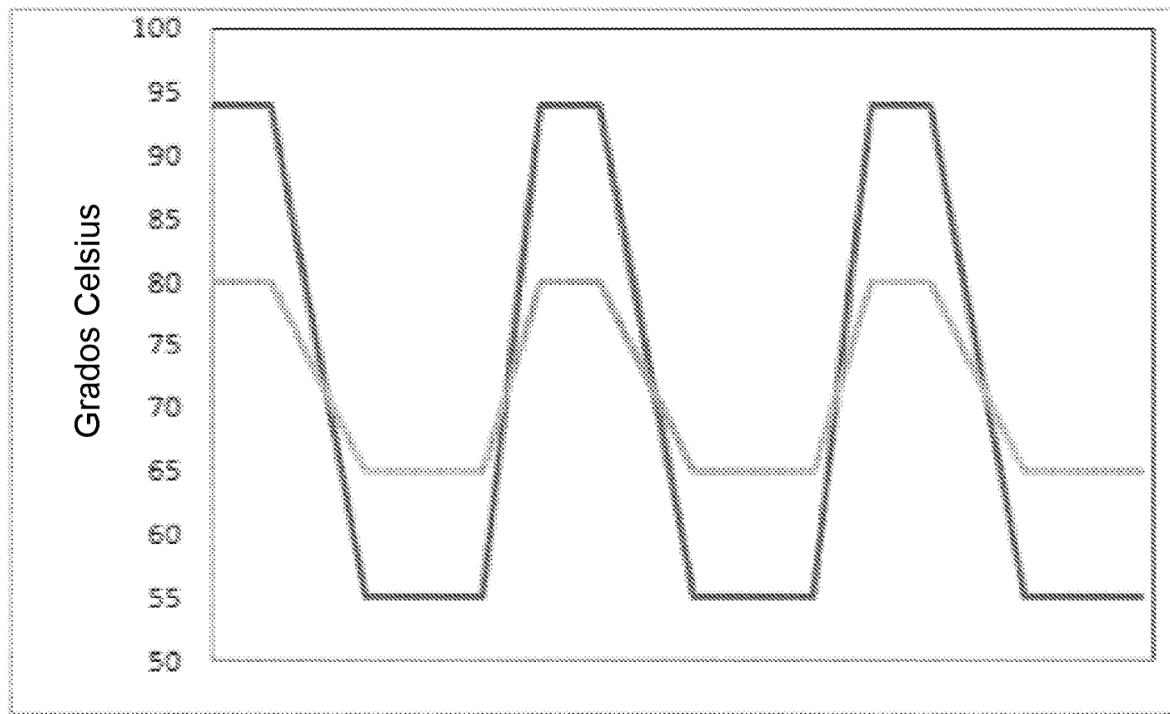
35     dNTP; y

ADN polimerasa.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el cátion divalente es una sal seleccionada del grupo que consiste en magnesio, manganeso, cobre, zinc o cualquier combinación de los mismos.

40     13. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el cátion monovalente es una sal seleccionada del grupo que consiste en sodio, potasio, litio, rubidio, cesio, amonio o cualquier combinación de los mismos.

14. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la ADN polimerasa es una ADN polimerasa termoestable.



**FIG. 1A**

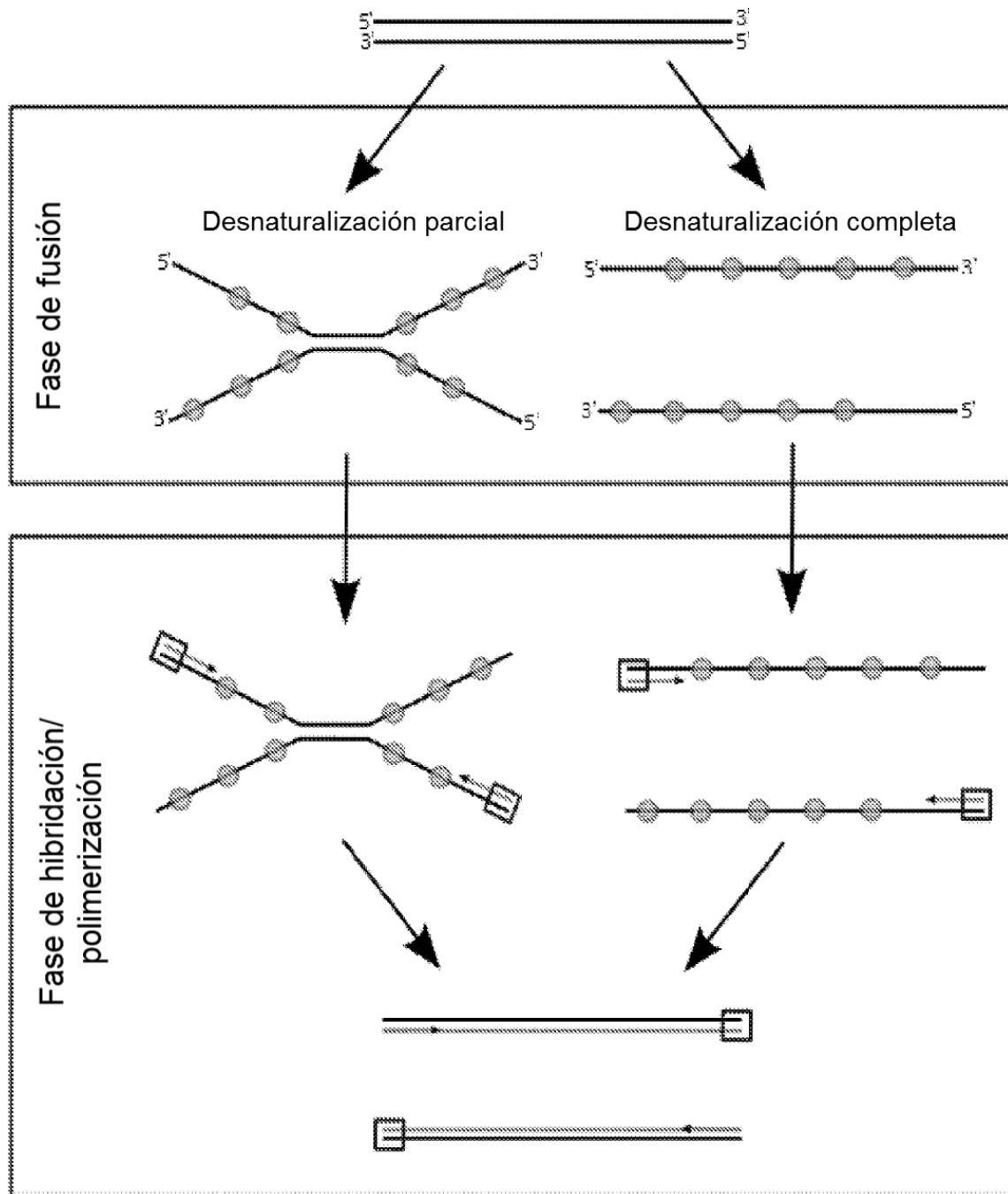


FIG. 1B

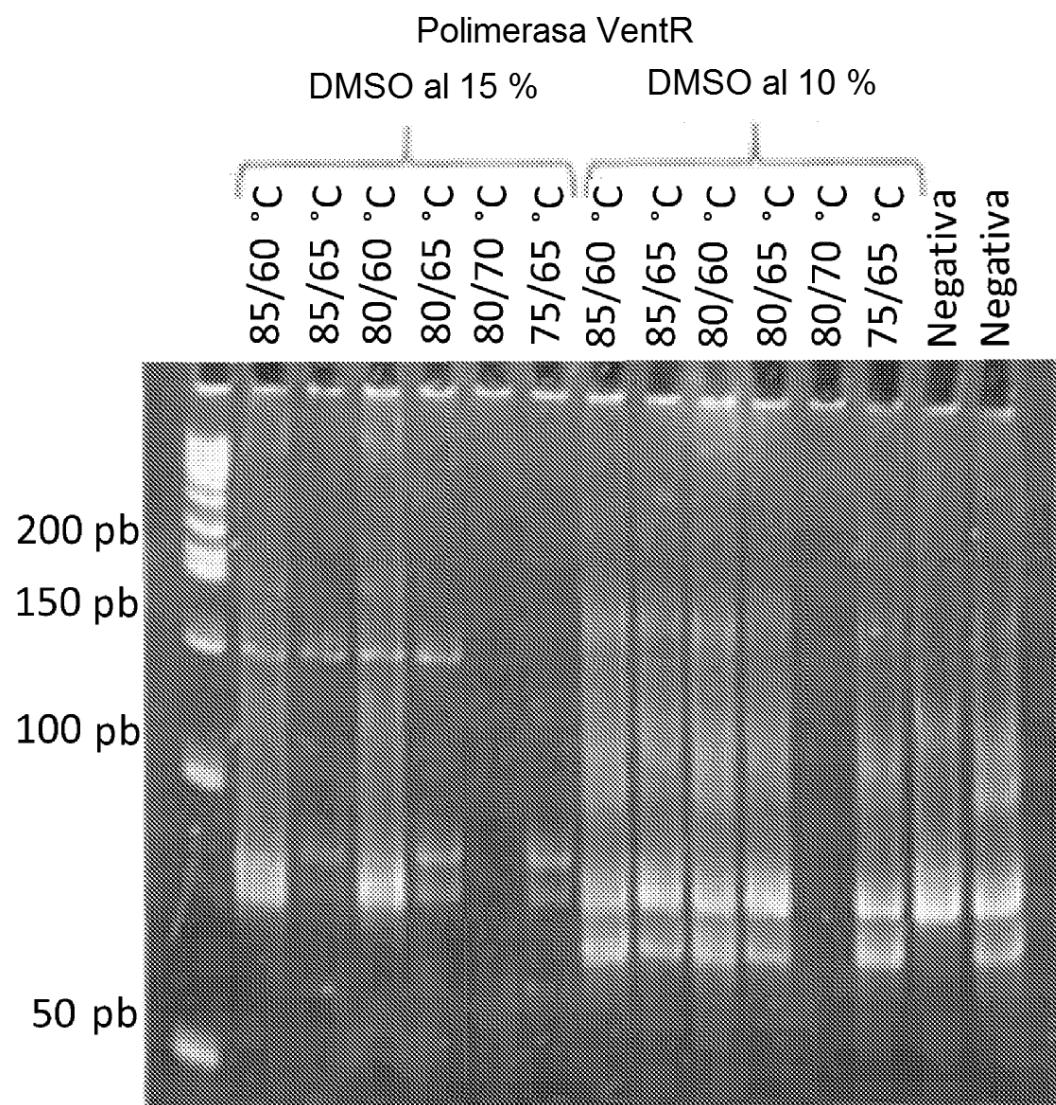


FIG. 2A

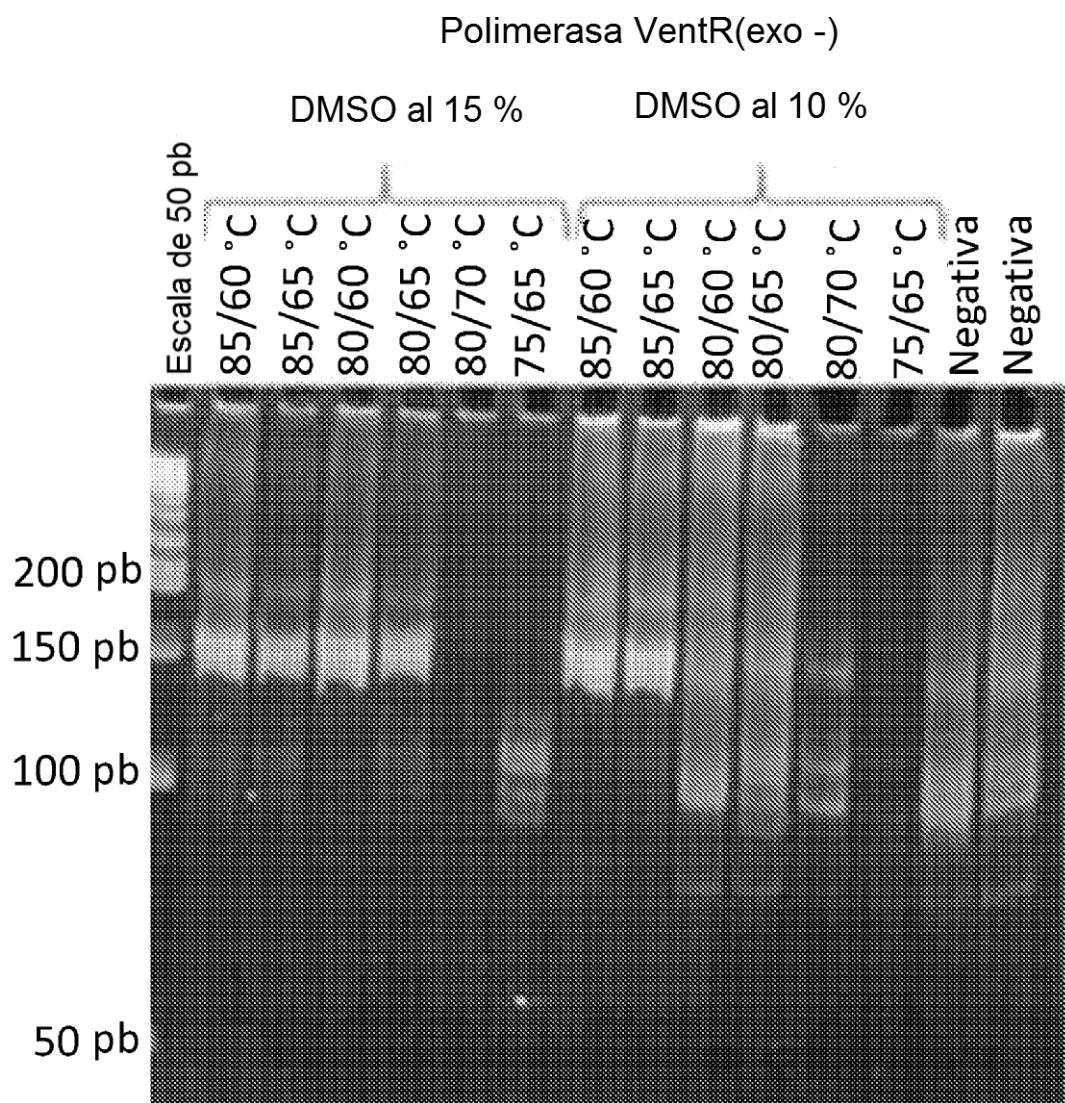


FIG. 2B

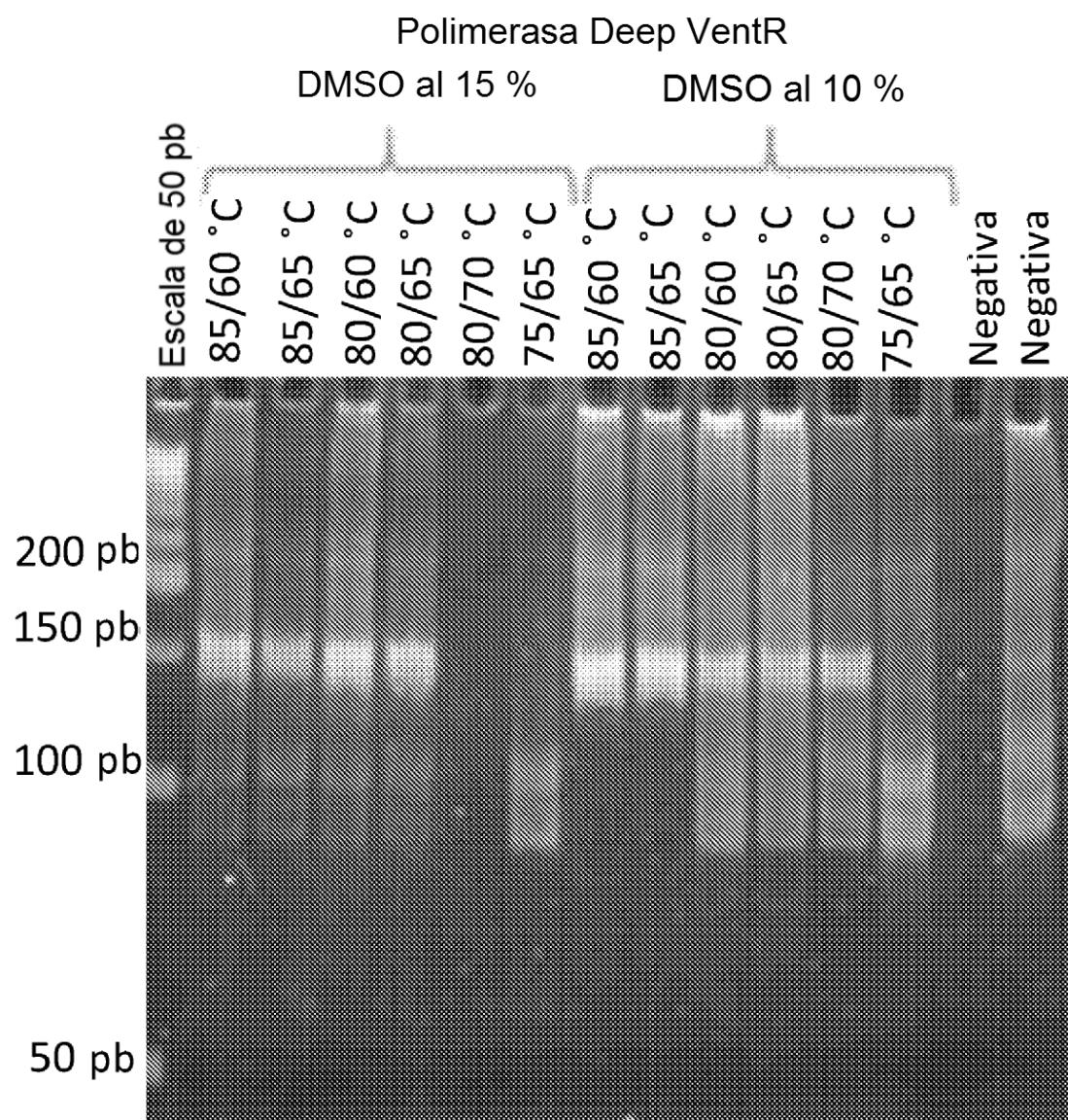


FIG. 2C

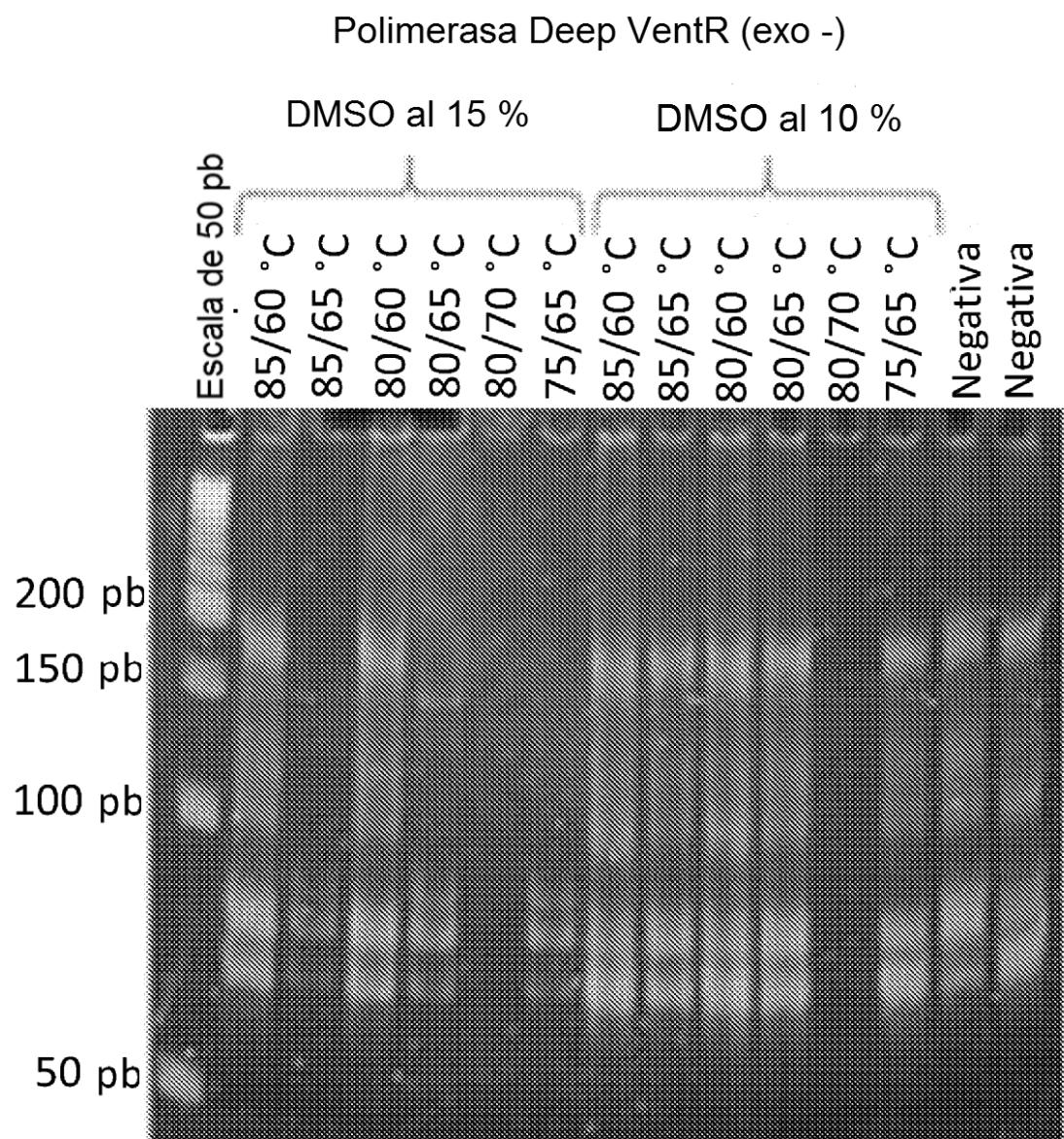
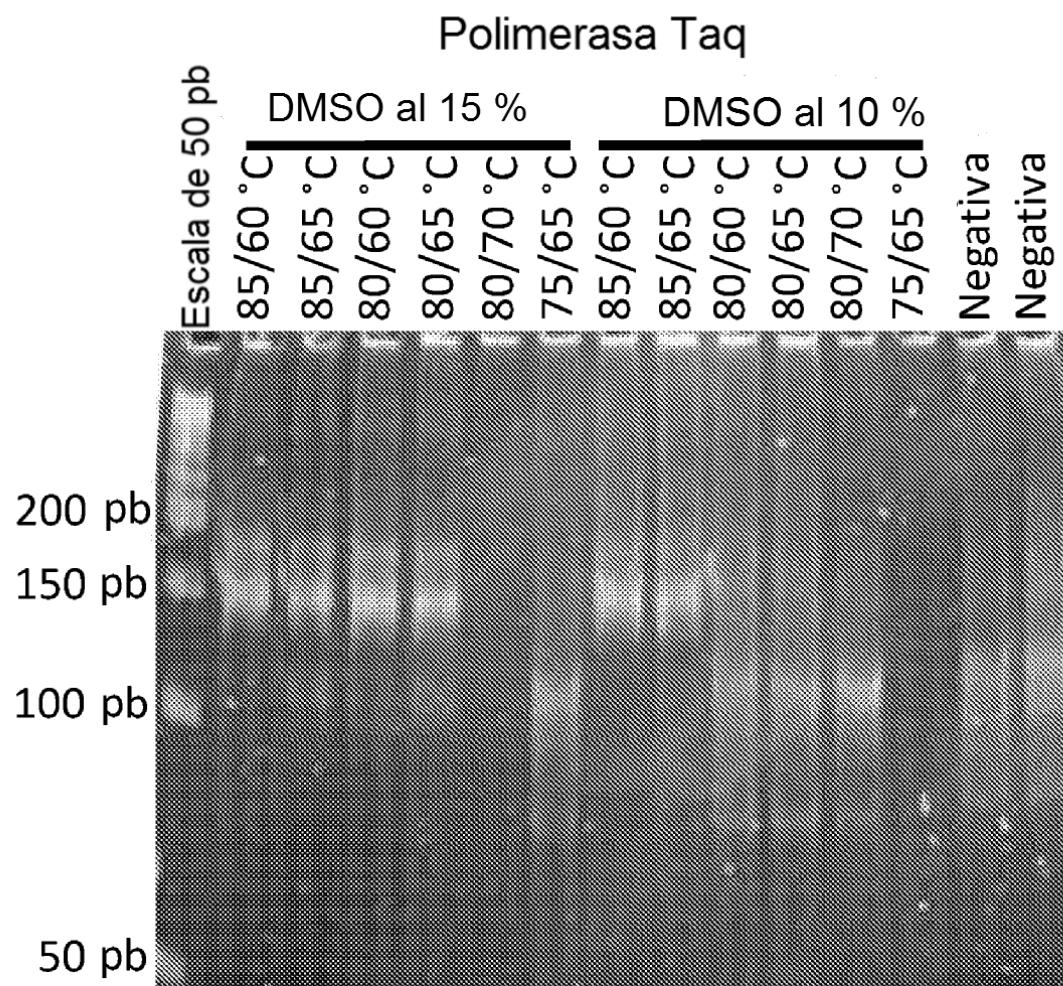


FIG. 2D



**FIG. 2E**

VentR (exo-) + ET SSB

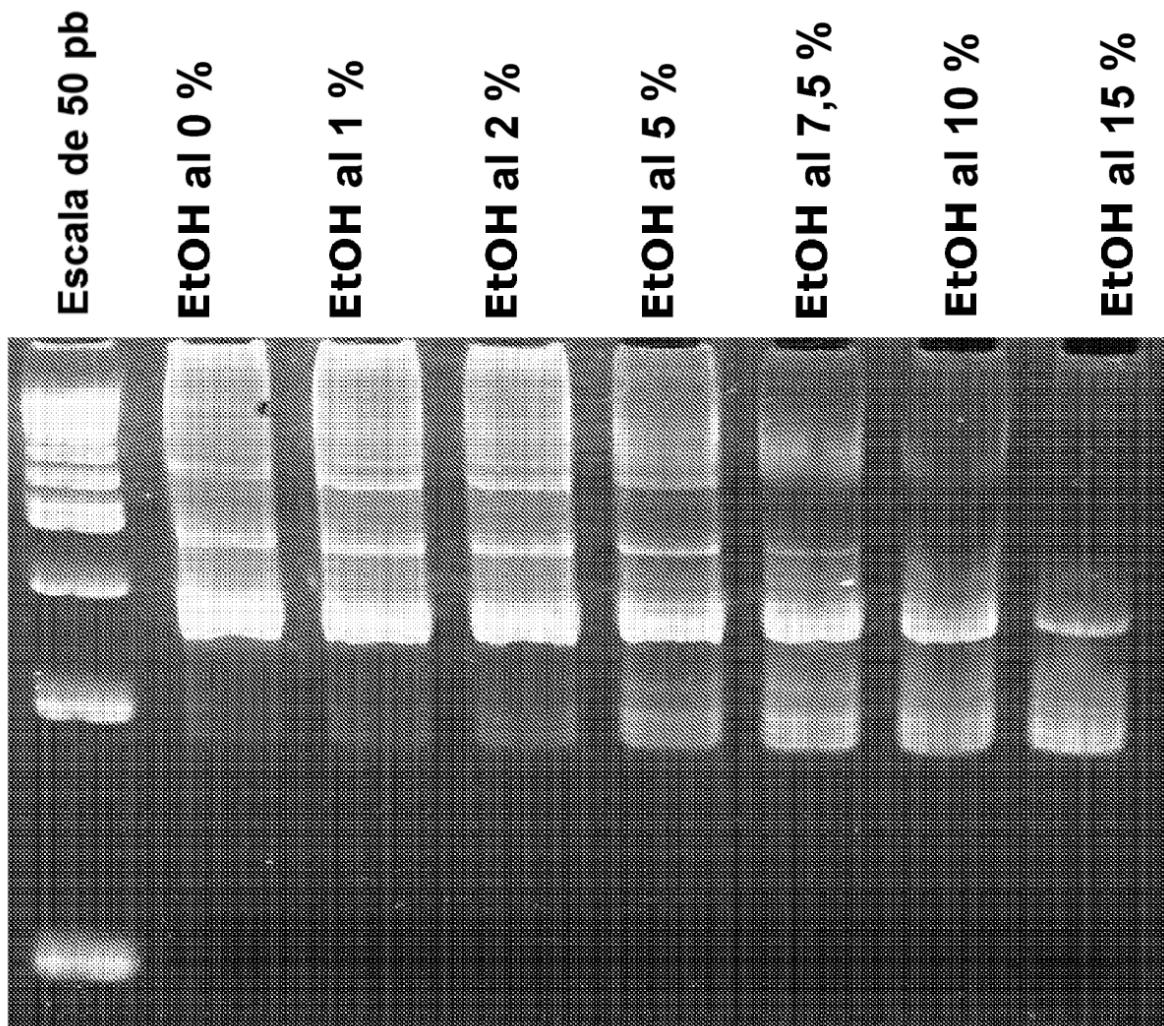


FIG. 3A

Polimerasa Taq

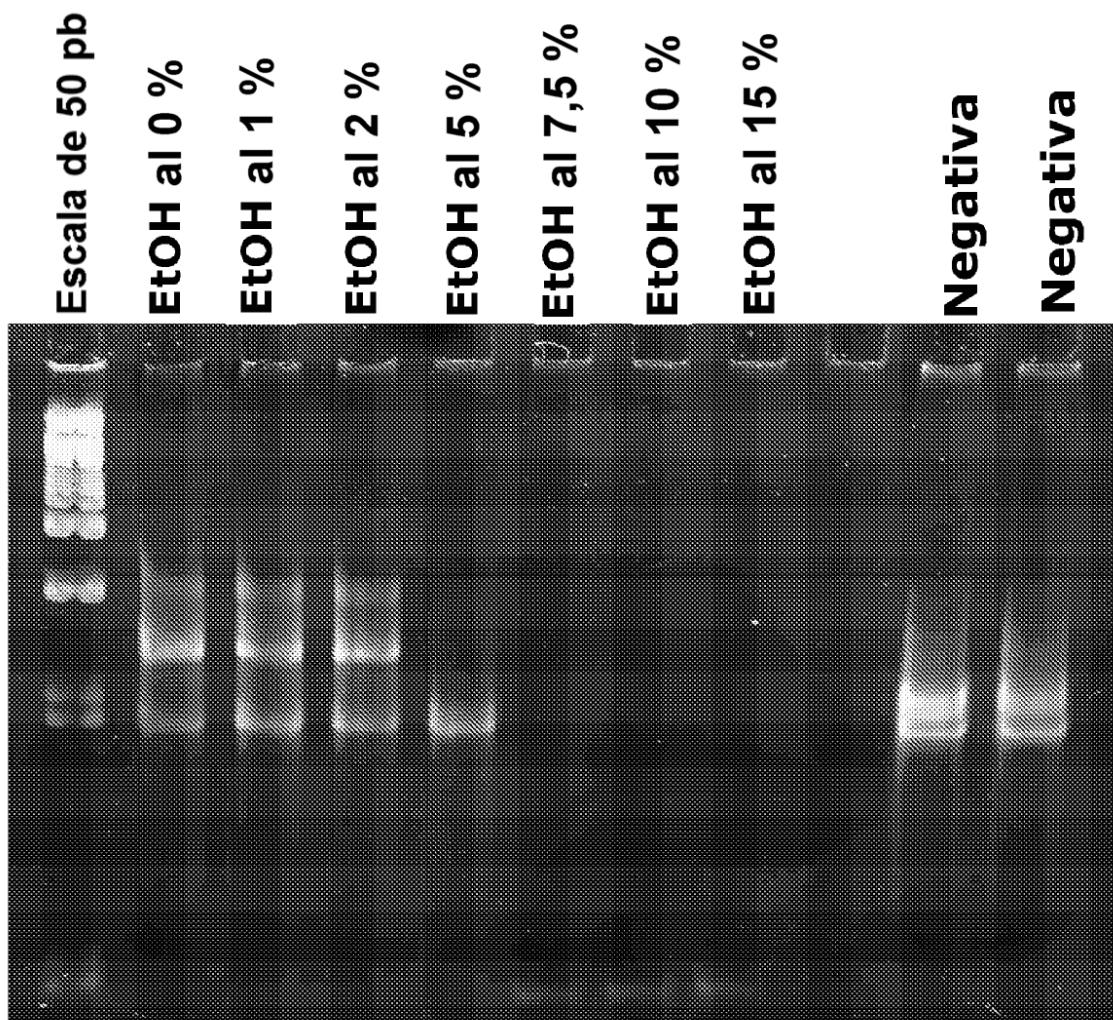


FIG. 3B

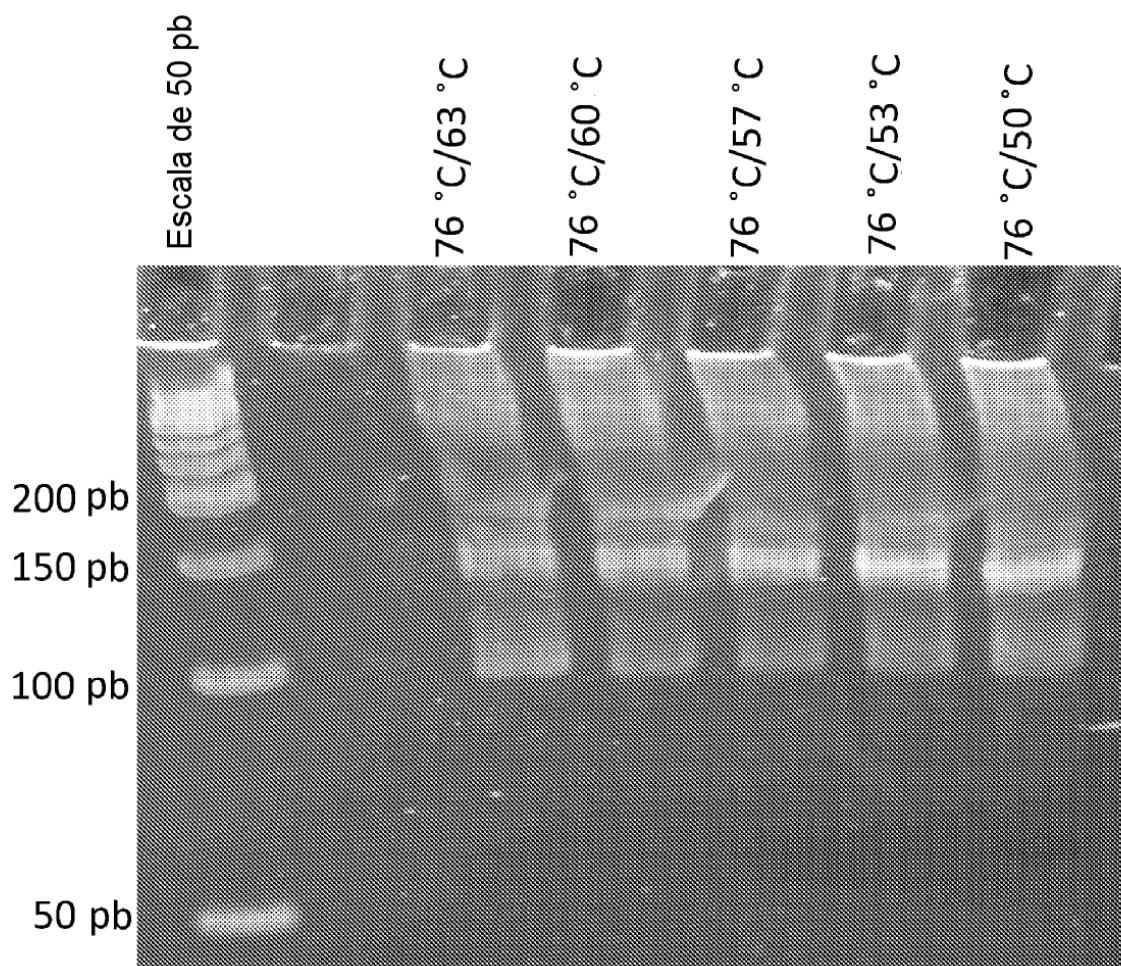


FIG. 4

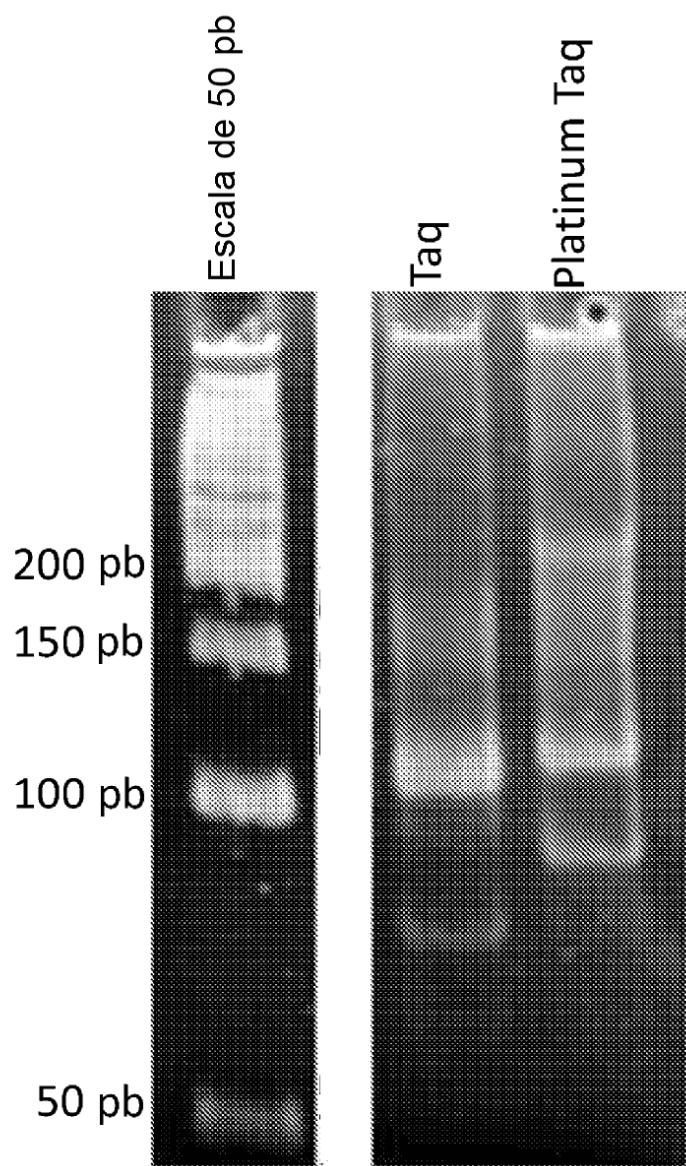


FIG. 5

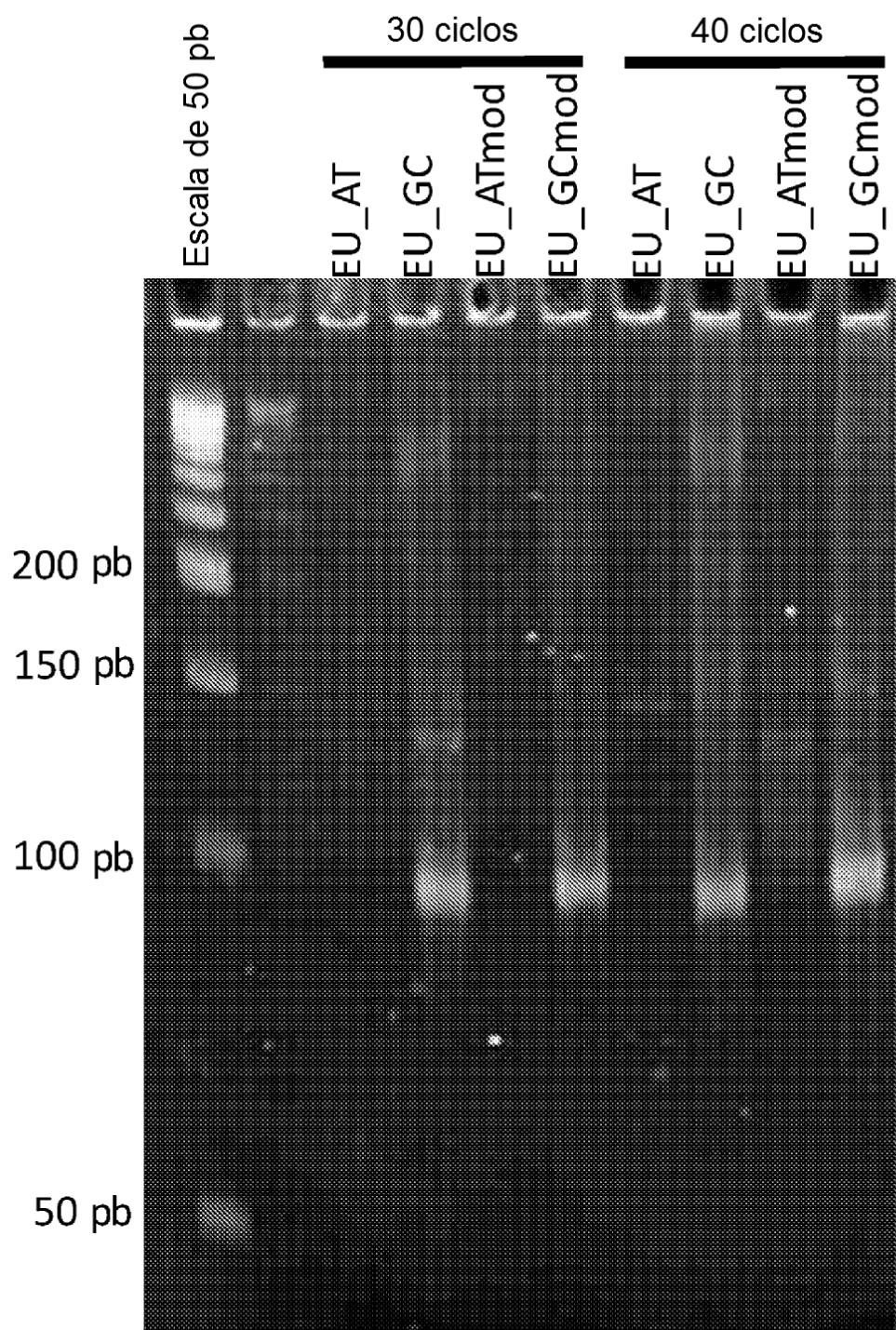


FIG. 6

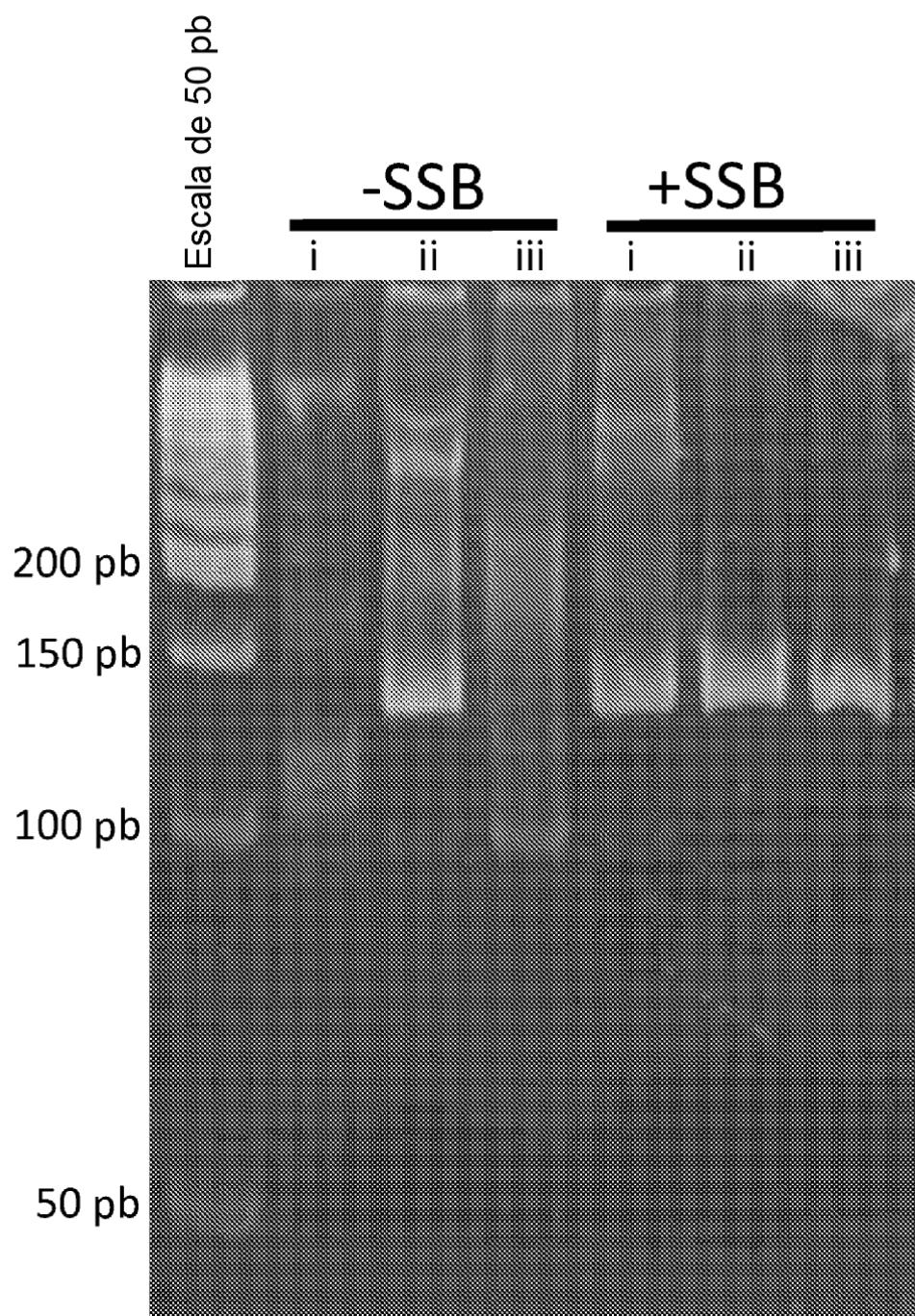


FIG. 7

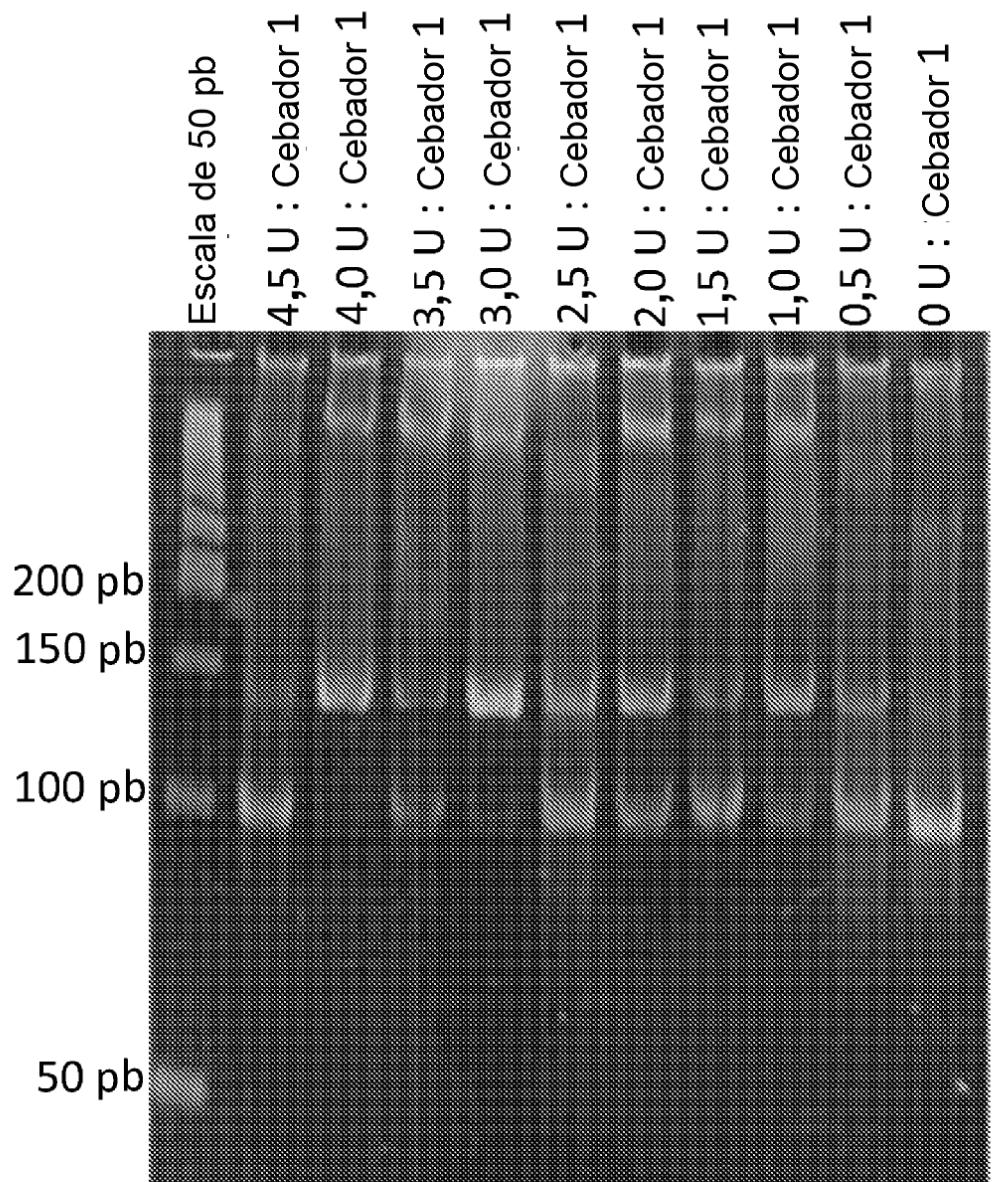


FIG. 8A

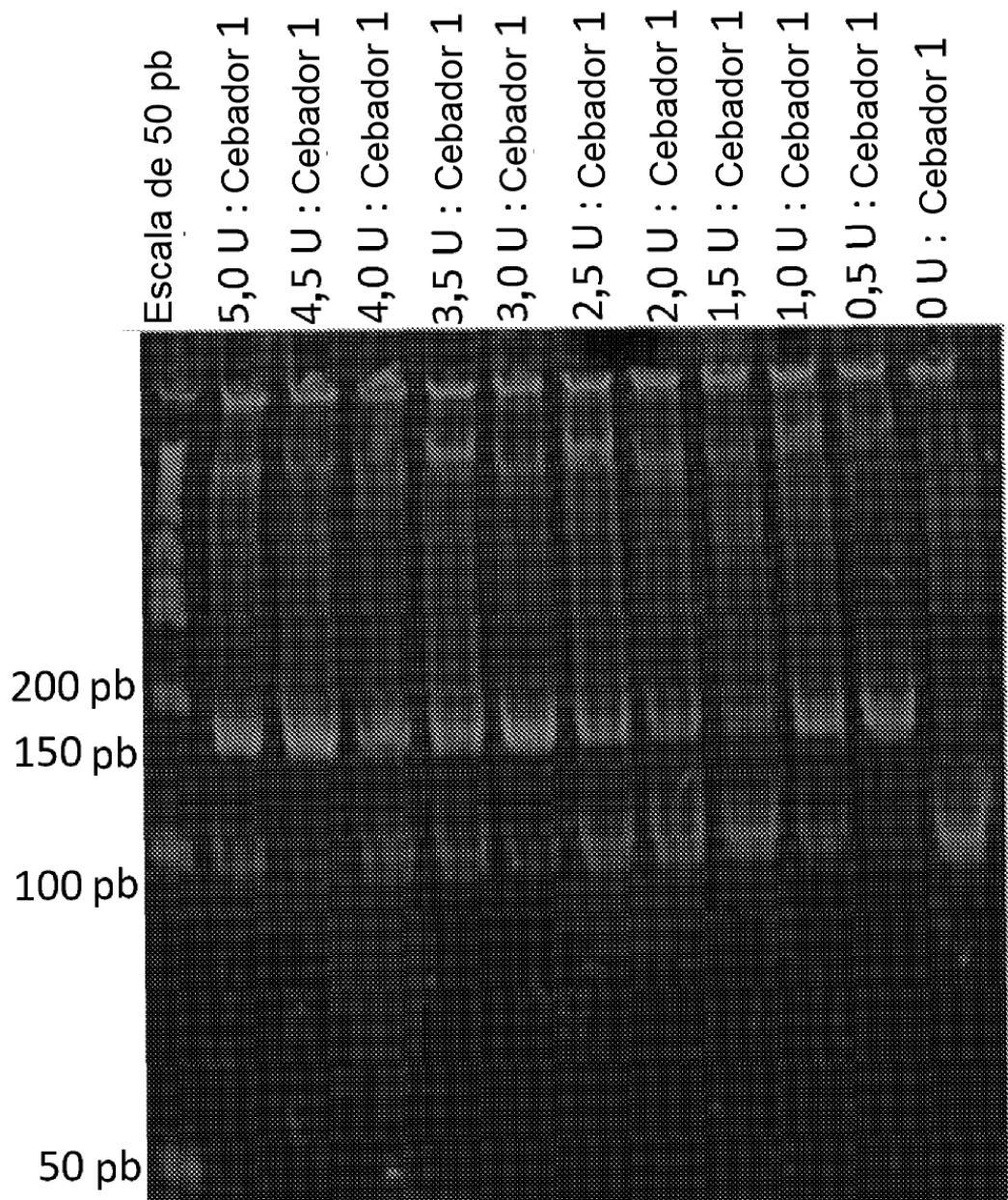


FIG. 8B

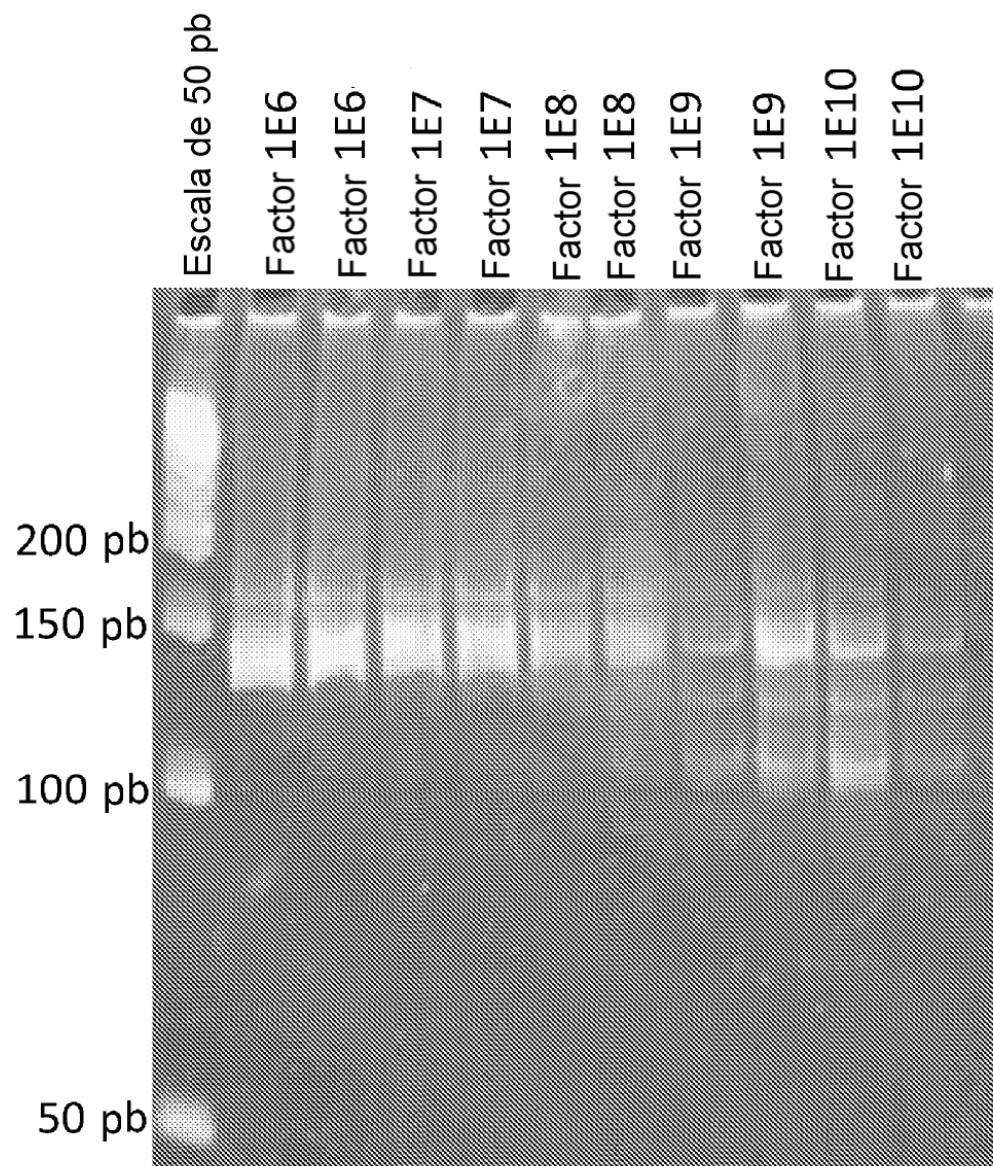


FIG. 9

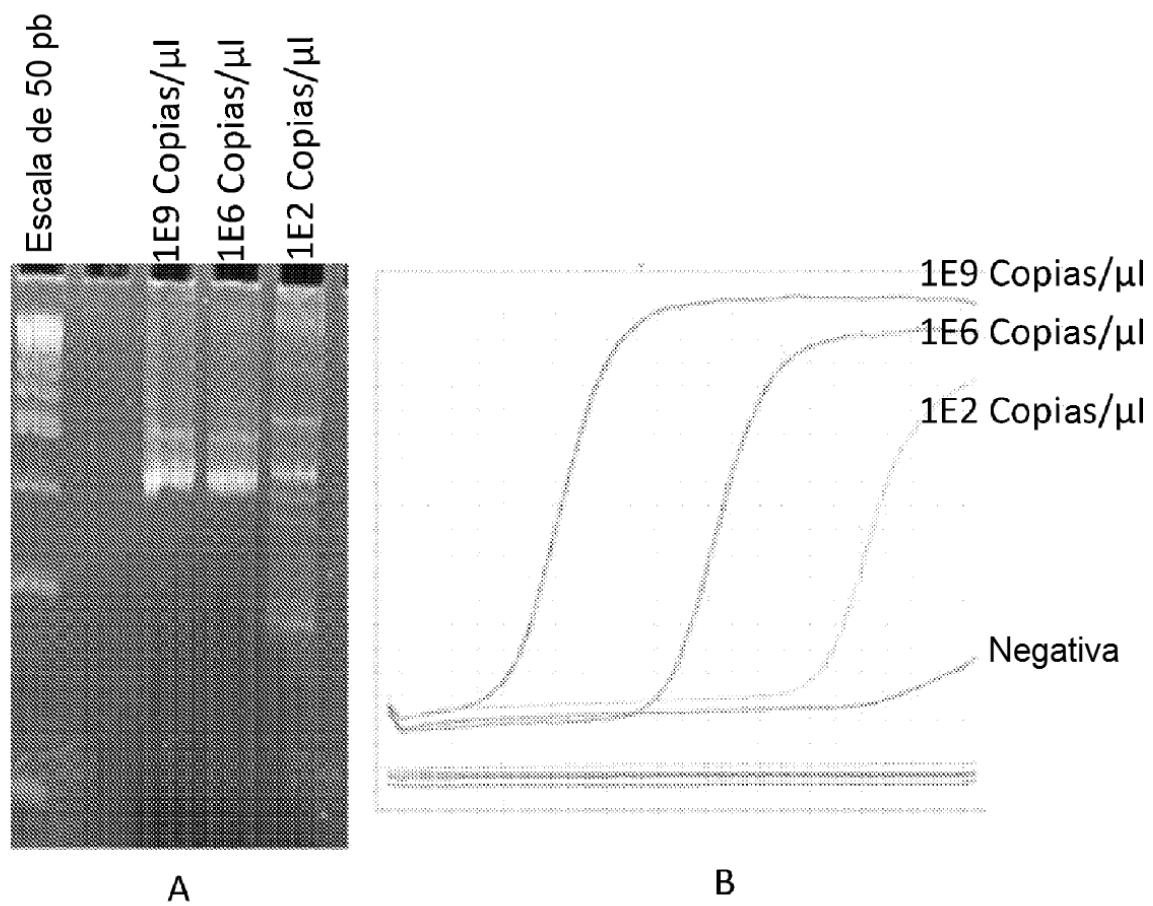


FIG. 10

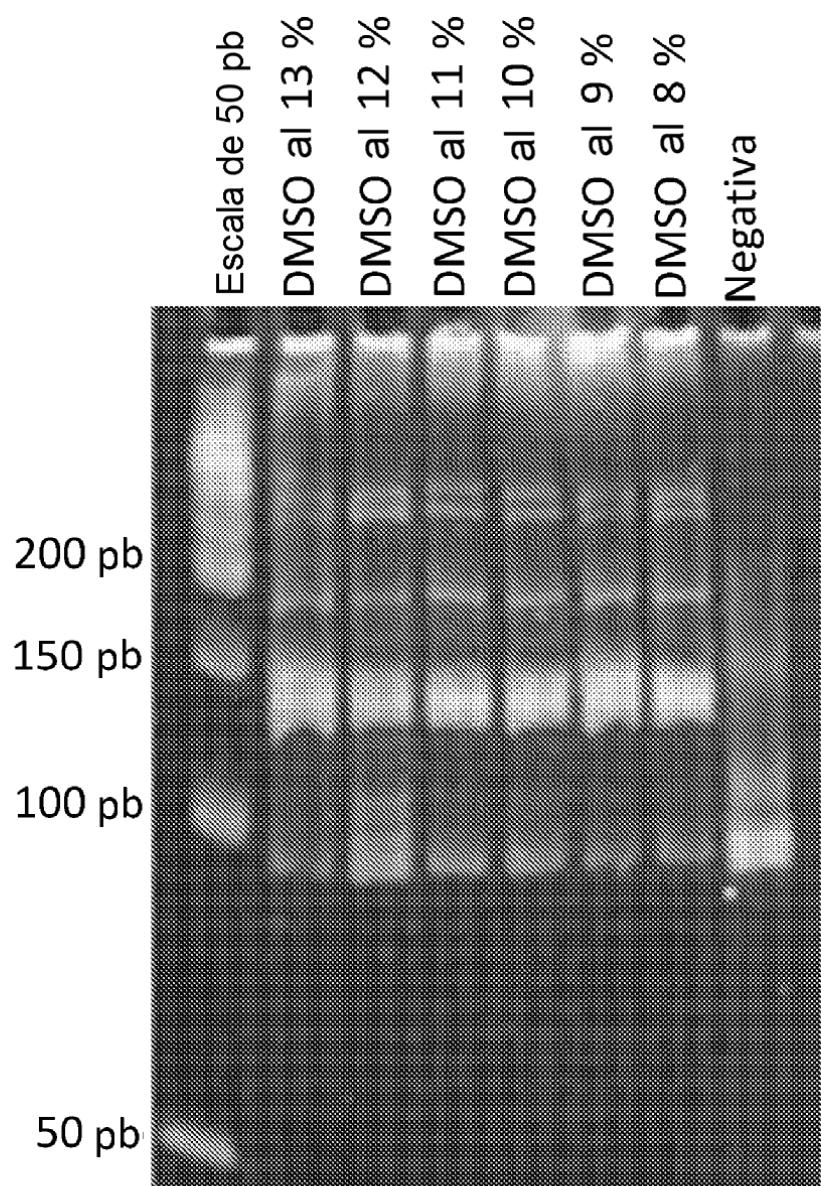


FIG. 11

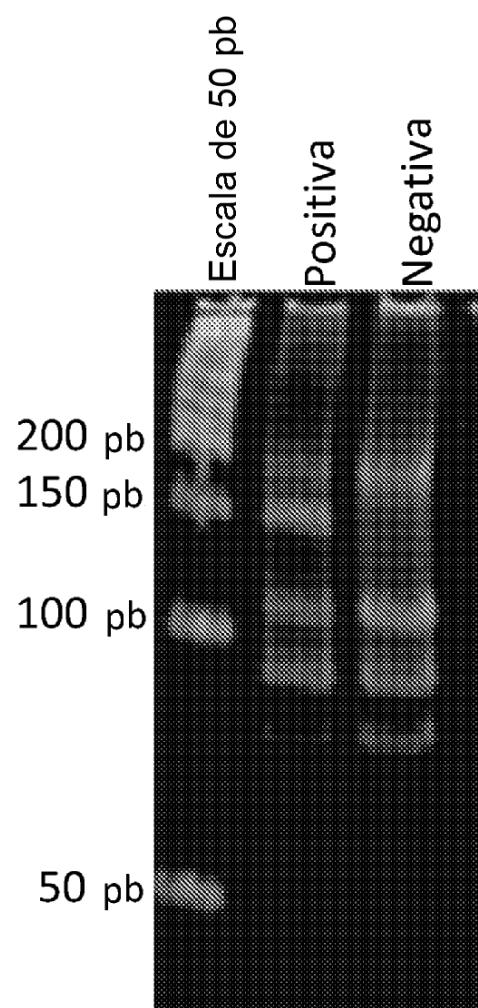


FIG. 12

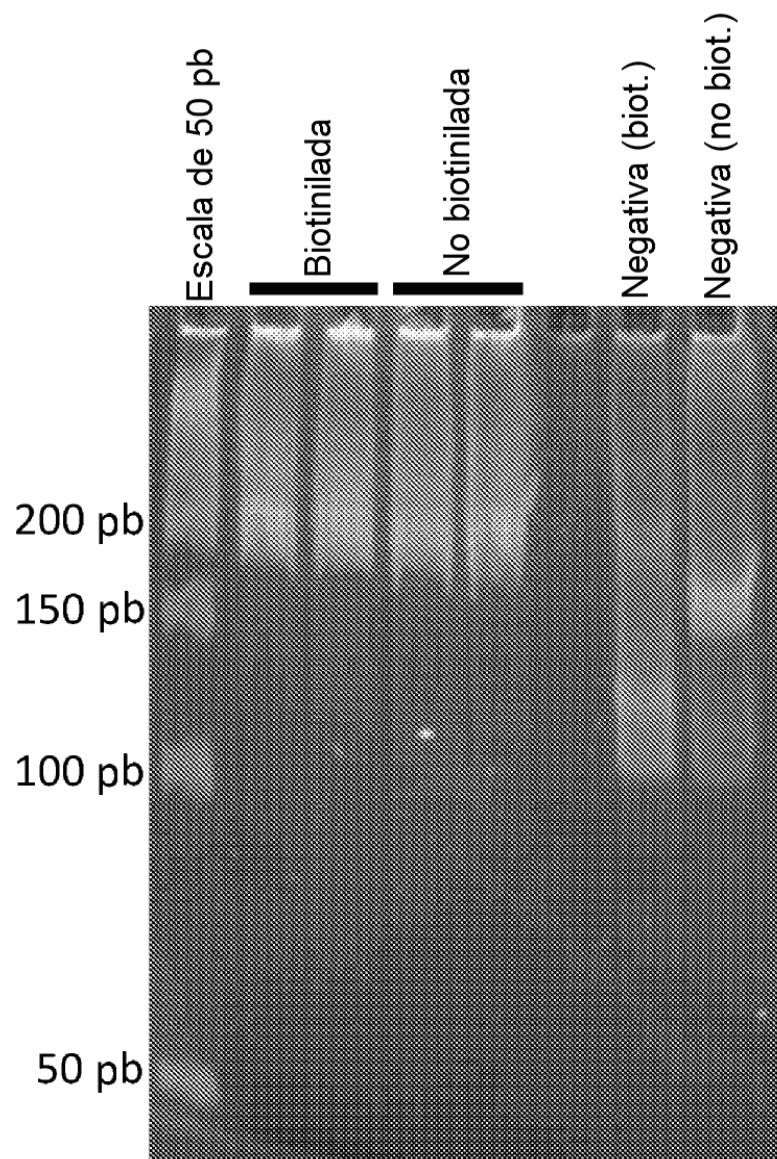


FIG. 13

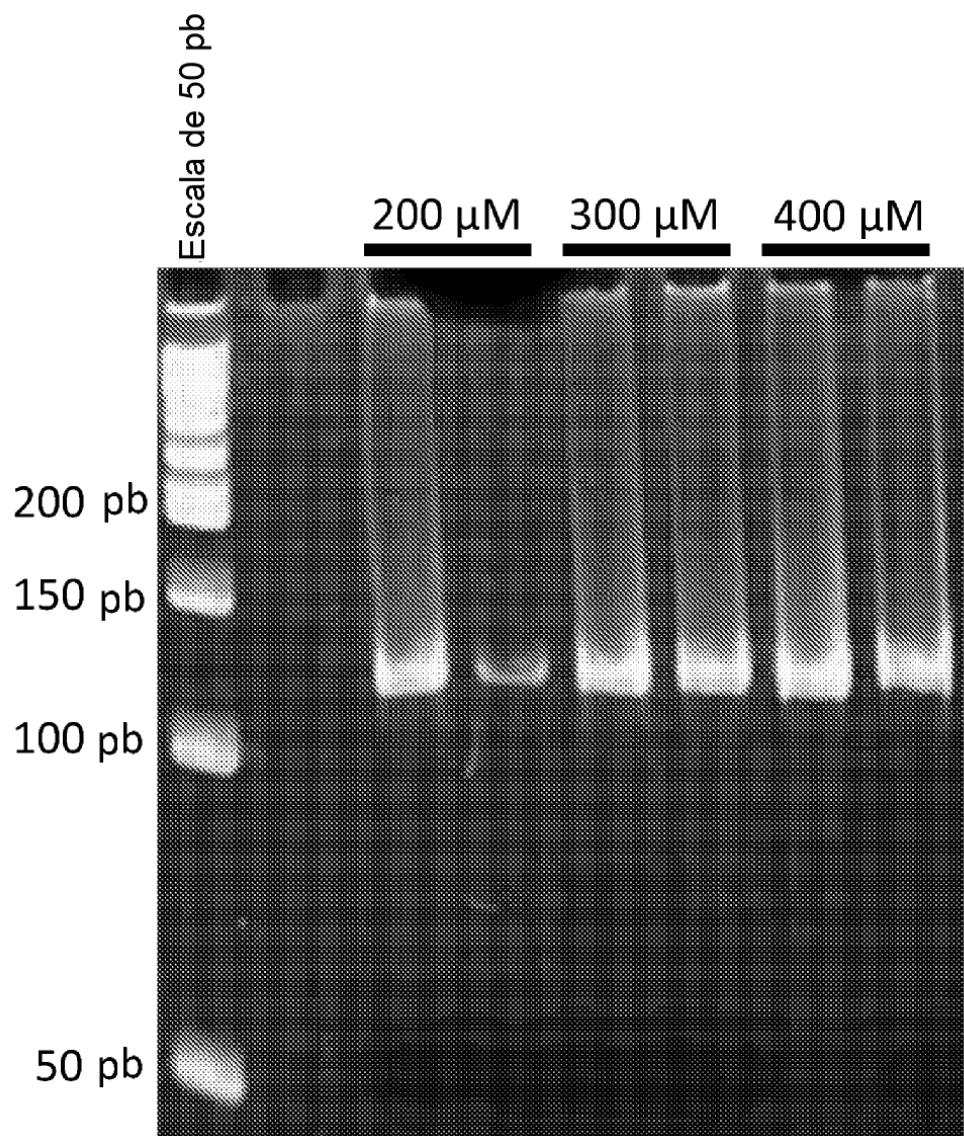


FIG. 14

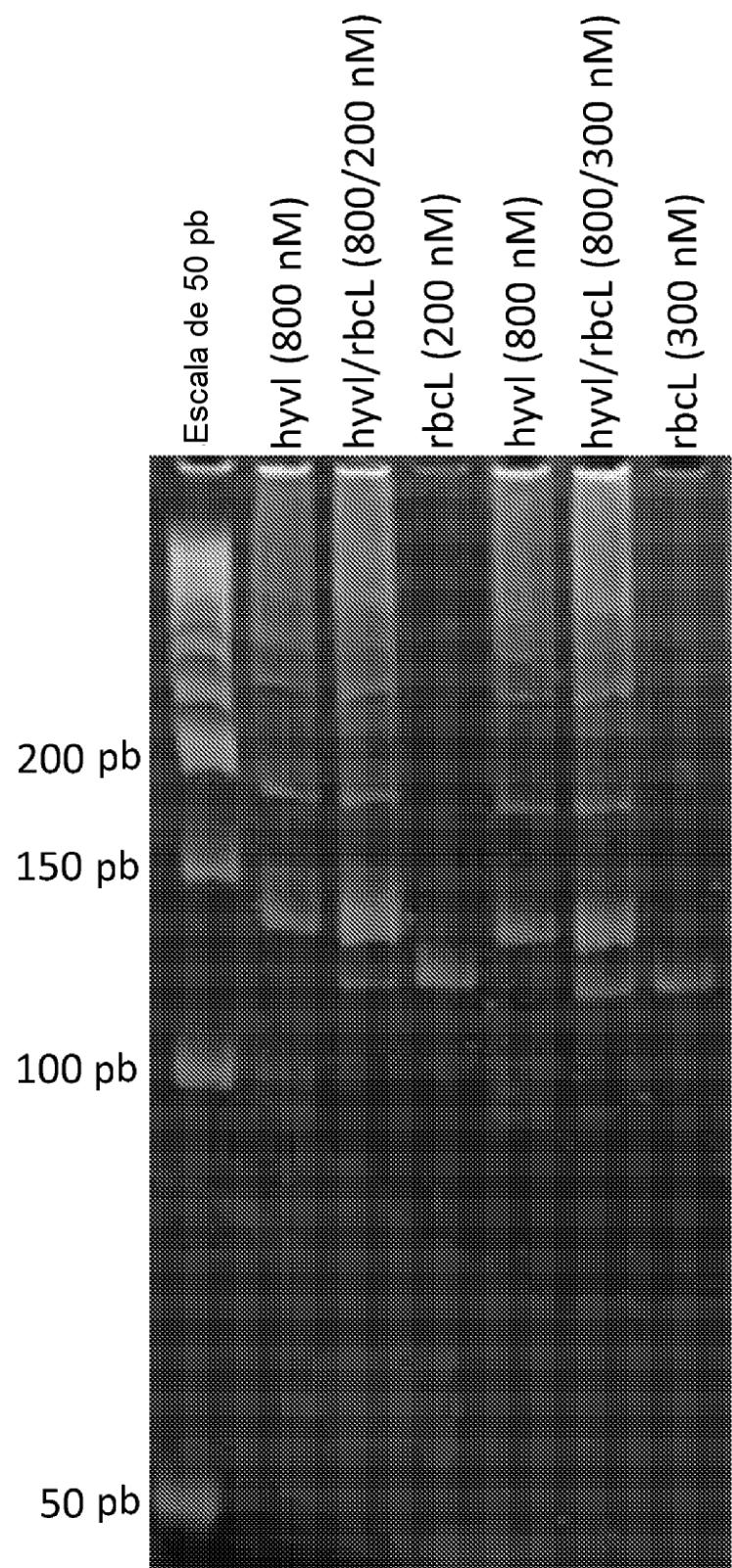


FIG. 15

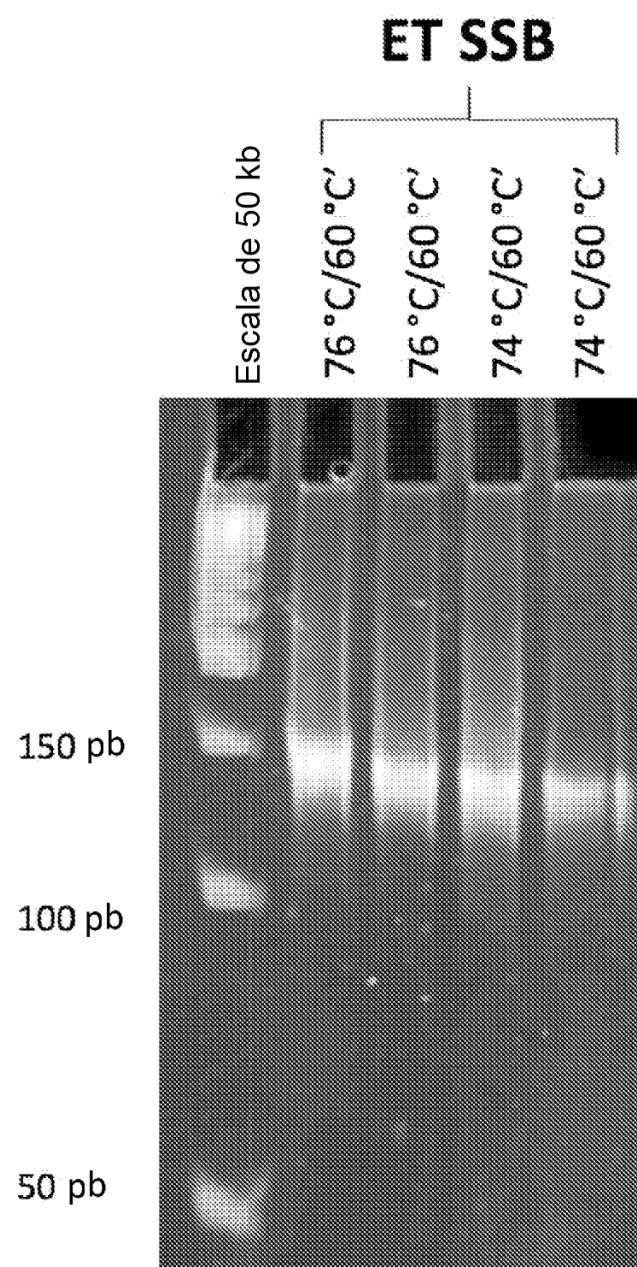


FIG. 16A

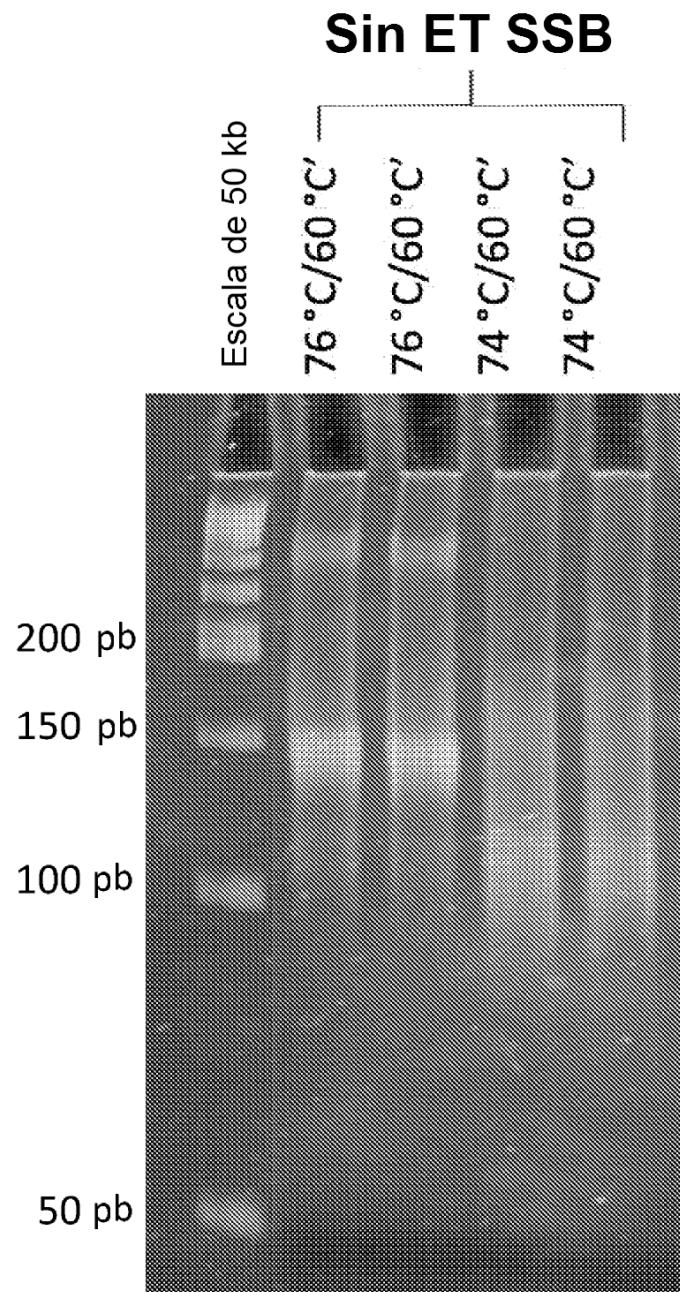
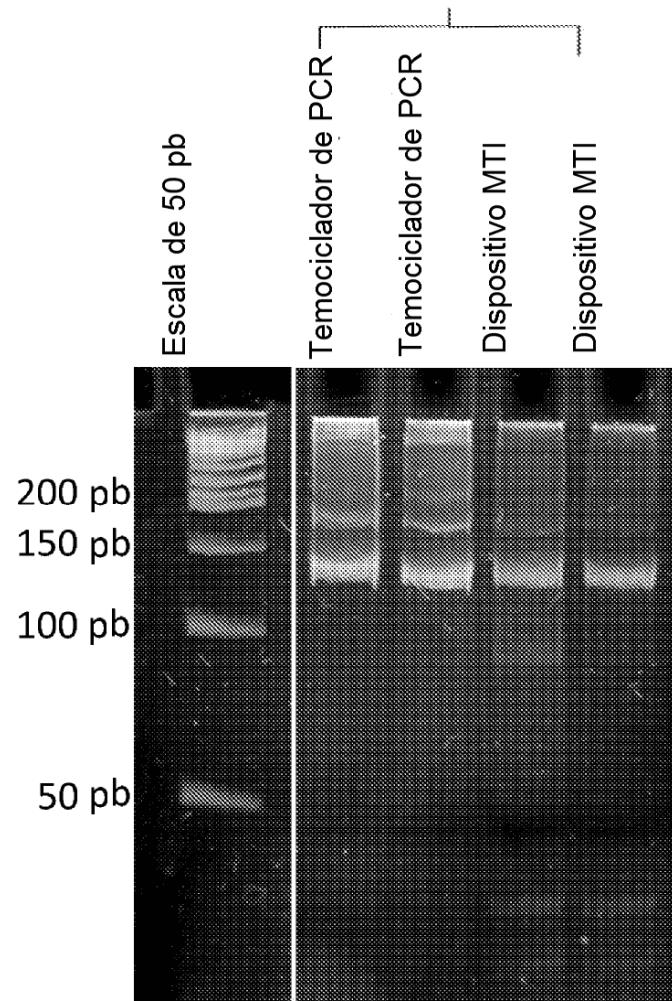


FIG. 16B

**Sin tiempo de rampa  
para ciclar la temperatura**



**FIG. 17A**

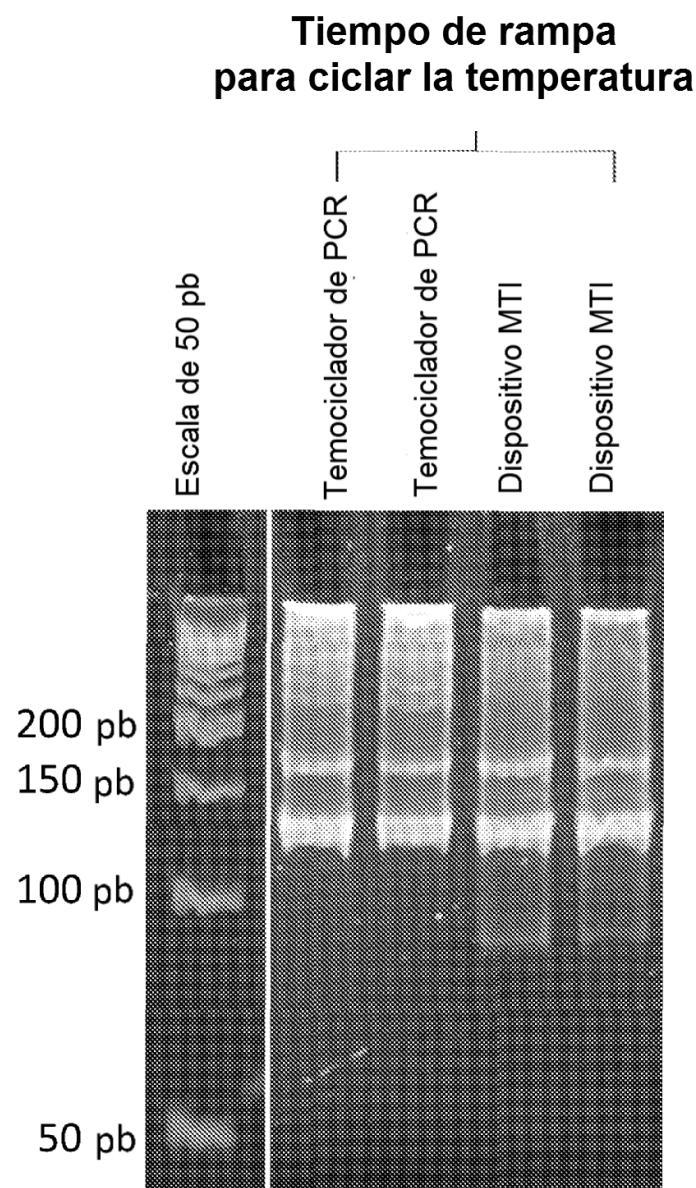


FIG. 17B

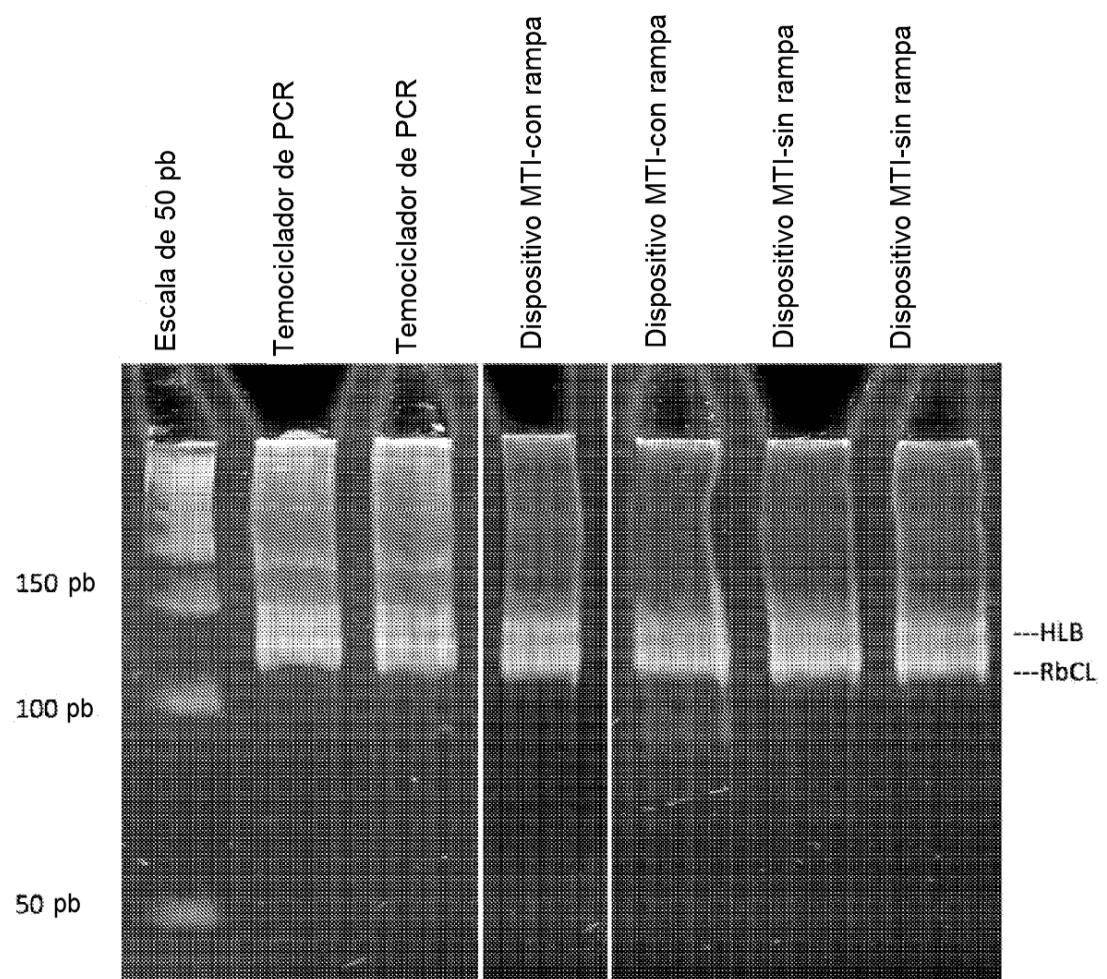


FIG. 18