

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 916 153**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/686**

(2008.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016 PCT/US2016/060650**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17079636**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016 E 16863087 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.02.2022 EP 3337615**

54 Título: **PCR extrema para transcripción inversa**

30 Prioridad:

**05.11.2015 US 201562251400 P**

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

**28.06.2022**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION  
(100.0%)**

**615 Arapeen Drive, Suite 310  
Salt Lake City, UT 84108, US**

72 Inventor/es:

**WITTWER, CARL T.;  
QUACKENBUSH, JOHN FRANCIS y  
HOUSKEEPER, JESSICA ANNE**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

ES 2 916 153 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

PCR extrema para transcripción inversa

## 5 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

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

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

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

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

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

En un sistema rápido temprano, un elemento calefactor y un ventilador de un secador de pelo, un termopar y muestras de PCR en tubos capilares se encerraron en una cámara (2). El ventilador creó un flujo rápido de aire calentado más allá del termopar y los capilares. Al hacer coincidir la respuesta térmica del termopar con la muestra, la temperatura del termopar siguió de cerca la temperatura de las muestras, incluso durante los cambios de temperatura. Aunque el aire tiene una baja conductividad térmica, el movimiento rápido del aire contra la gran área superficial expuesta por los capilares fue adecuado para realizar ciclos de la muestra entre las temperaturas de desnaturalización, hibridación y extensión. Los controladores electrónicos monitorizaron la temperatura, ajustaron la



potencia al elemento calefactor y proporcionaron el tiempo requerido y el número de ciclos. Para el enfriamiento, el controlador activó un solenoide que abrió un portal al aire exterior, introduciendo aire de enfriamiento en la cámara, de lo contrario, cerrada.

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

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

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

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

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

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

Las versiones comerciales del sistema de aire/capilar para PCR han estado disponibles desde 1991 (1) y para PCR en tiempo real desde 1996 (10, 11). Las capacidades de ciclado rápido de otros instrumentos a menudo se comparan con el estándar de aire/capilar que demostró por primera vez ciclos de 20-60 segundos. Por extraño que parezca, ha habido una tendencia a hacer que los sistemas de capilar/aire sean más lentos a lo largo de los años, tal vez reflejando la incomodidad con la segunda desnaturalización "0" y los tiempos de hibridación de muchos usuarios. Además, las enzimas activadas por calor requieren largos períodos de activación, a menudo duplicando los tiempos de ejecución incluso cuando se utilizan enzimas de activación "rápida". Otro compromiso fuera del ciclado rápido es la utilización de capilares de plástico. Estos capilares no están ajustados térmicamente al

instrumento, por lo que a menudo se requieren mantenimientos de 20 segundos en la desnaturalización y la hibridación para alcanzar las temperaturas diana (12).

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

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

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

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

La tabla 1 resume el trabajo para minimizar los tiempos de ciclo de PCR a menos de los ciclos de 20 segundos que definieron originalmente "PCR rápida". En los últimos 20 años, se han desarrollado nuevos prototipos de instrumentos que mejoran gradualmente la velocidad de ciclado. Sin embargo, el rendimiento práctico de la PCR (eficiencia y rendimiento) a menudo es deficiente. Como regla general, a medida que los ciclos se vuelven cada vez más cortos, las reivindicaciones de una PCR exitosa se correlacionan con dianas de menor complejidad (bacterias, fagos, plásmidos multicopia o incluso productos de PCR) que se utilizan en concentraciones iniciales más altas (véase, por ejemplo, la Patente US 6,210,882, en la que se utilizaron 5 ng de amplicón como muestra de partida). De hecho, ninguno de los estudios enumerados en la tabla 1 con ciclos de <20 segundos utilizó ADN eucariota complejo tal como ADN humano. El número de copias iniciales de las moléculas de plantilla a menudo es muy alto (por ejemplo, 180.000.000 copias de fago lambda/µl), por lo que se necesita poca amplificación antes de reivindicar el éxito. Además, la falta de controles sin plantilla en muchos estudios plantea preguntas sobre la validez de los resultados positivos, especialmente en un entorno con altas concentraciones de plantilla. Un informe orientado a instrumentos se centra ampliamente en el diseño y modelización del dispositivo de ciclado térmico, con una breve

demostración final de PCR utilizando una alta concentración de una diana de baja complejidad. Se han descrito velocidades de calentamiento y enfriamiento (hasta 175 °C/s) basándose en modelización y mediciones sin muestras de PCR presentes (17).

Tabla 1

Tiempo de ciclo más rápido (s)	[Plantilla] (Copias/ $\mu$ l)	Forma de plantilla	[Cebadores] totales (nM)	Polimerasa	[Polimerasa] (nM)	Longitud de producto (pb)	Cuantificación	Tendencia	Procedimiento	¿Sin control con plantilla?	Referencia
20	1.600	ADN humano	1.000	0,08 U/ $\mu$ l de Taq	3	536	Banda en gel débil	Aumenta con [Polimerasa]	Ciclado con aire en capilar	No	3
12	40.000	Fago Lambda	400	0,2 U/ $\mu$ l de Taq	7,5	500	Electroforesis capilar	?	Calentamiento con IR, enfriamiento con aire presurizado	No	56
12	1.000.000	Producto de PCR de 230 pb ADNr 18S (genómico humano)	1.000	0,5 U/ $\mu$ l de Taq	19	230	Banda en gel buena	Dependiente del nº de ciclo y el nº de copia	Flujo continuo con IR de gotas en aceite	Sí	55
9,25	4.700-470.000		1.800	Taq Gold	?	187	?	?	Calentamiento con IR de gotas en aceite	No	54
9	18.000.000	Fago Lambda	2.000	0,025 U/ $\mu$ l de Taq	0,94	500	Banda en gel OK	La intensidad aumenta con el tiempo de ciclo	Flujo continuo con un taco de partículas ferrosas	No	28
8,5	?	ADNc	1.800	?	?	82	80 % de eficiencia	Eficiencia decreciente a ciclos más rápidos	Soporte en voladizo micromecanizado	?	17
7,0	10.000.000	Producto de PCR de 1 KB	2.000	0,25 U/ $\mu$ l de Taq	9,4	176	7 % del control	50 % a ciclos de 15 s	Flujo continuo	Sí	22
6,3	10.000	Plásmidos (B. anthracis)	1.200	0,05 U/ $\mu$ l de Ex Taq HS	?	134	55 % del control	?	Flujo continuo de taco	Sí	53
5,2/9,7	180.000.000	Fago Lambda	400	0,07 U/ $\mu$ l de Taq	2,6	500/997	Bandas en gel débiles	Dependiente de los tiempos de ciclo	Flujo continuo	No	23
5,25	1.400.000	B. subtilis (ADN bacteriano)	500	0,025 U/ $\mu$ l de KOD plus	?	72	90 % de eficiencia (SYBR)	Desplazamiento único	Agua bombeada contra placa de aluminio	Sí	33
4,6	34.000	E. herbicola (ADN bacteriano)	800	0,04 U/ $\mu$ l de KAPA2G	4	58/160	Bandas en gel débiles	El rendimiento aumenta con el nº de ciclos	Agua bombeada a través de cobre poroso	No	31

Tiempo de ciclo más rápido (s)	[Plantilla] (Copias/ $\mu$ l)	Forma de plantilla	[Cebadores] totales (nM)	Polimerasa	[Polimerasa] (nM)	Longitud de producto (pb)	Cuantificación	Tendencia	Procedimiento	¿Sin control con plantilla?	Referencia
4,2	50 <sup>1</sup>	B. subtilis (ADN bacteriano)	?	KOD plus 0,05 U/ $\mu$ l de Ex Taq	?	72	C <sub>q</sub> = 33 (SYBR)	El mayor n° de copias reduce el C <sub>q</sub>	IR laser	? <sup>2</sup>	51
3,0	10.000	Plásmidos (B. anthracis)	1.200	HS	?	134	15 % del control	80 % a ciclos de 7,5 s	Flujo constante con presión de vapor	Sí (5 % de señal)	35
2,7	?	Fago stx (E. coli)	? <sup>3</sup>	KOD	?	85	Banda apenas visible	Rendimiento decreciente a ciclos de 3,06 s a 2,69 s	Transferencia de Peltier a capilares	No	36
2,6	? <sup>4</sup>	Fago stx (E. coli)	? <sup>5</sup>	0,5 U/ $\mu$ l de Taq	19	85	Banda muy tenue	Constante a ciclos de 2,8 a 2,6 s	Gas presurizado y capilares	No	48

<sup>1</sup> Copia única presumida en una gota de 20 nl con C<sub>q</sub> de 33 bajo monitorización SYBR Green, pero sin análisis de gel o fusión para confirmar la identidad del producto de PCR.

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

<sup>3</sup> El artículo dice que [cebador] es 0,5 mmol, la solicitud de patente (US 2009/0275014 A1) dice que [cebador] es 0,01-0,5  $\mu$ M.

<sup>4</sup> Dos pg de ADN de E. coli/ $\mu$ l, pero se desconoce el número de copias del fago en la preparación de ADN.

<sup>5</sup> La disertación dice 0,5  $\mu$ mol/10  $\mu$ l (50 mM), la patente (US 6,472,186) dice 50 pmol/10  $\mu$ l (5  $\mu$ M).

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

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

La instrumentación en diversas referencias descritas en la tabla 1 puede ser adecuada para PCR extremadamente rápida, si las condiciones de reacción son compatibles. Como se da a conocer en el presente documento, el foco en concentraciones aumentadas de cebadores, polimerasa y  $Mg^{++}$  permite una "PCR extrema" (PCR con ciclos <20 segundos (30 ciclos en <10 min)), al tiempo que conserva la robustez y el rendimiento de la reacción. Además, como se da a conocer en el presente documento, el foco en concentraciones aumentadas de cebadores, transcriptasa inversa y la inclusión de un azúcar, tal como trehalosa, permite una transcripción inversa (RT, *reverse transcription*) más rápida para la utilización en una PCR de transcripción inversa (RT-PCR)

## CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

En una realización de la presente divulgación, se dan a conocer procedimientos para amplificar un ARN diana en una muestra biológica durante la amplificación, que comprende las etapas de proporcionar una mezcla de reacción que comprende la muestra biológica, una enzima de transcripción inversa, una polimerasa termoestable y cebadores configurados para la amplificación del ARN diana a la muestra biológica, en el que la polimerasa se proporciona a una concentración de, como mínimo, 0,5  $\mu M$  y los cebadores se proporcionan, cada uno, a una concentración de, como mínimo, 2  $\mu M$ ; transcribir de manera inversa el ARN a ADN mediante la incubación durante no más de 5 minutos, y amplificar el ADN por reacción en cadena de la polimerasa mediante ciclado térmico de la muestra biológica entre, como mínimo, una temperatura de desnaturalización y una temperatura de alargamiento a través de una pluralidad de ciclos de amplificación utilizando un perfil de ciclado de temperatura extrema en el que cada ciclo se completa en un tiempo de ciclado de menos de 20 segundos por ciclo.

En el presente documento también se dan a conocer kits y mezclas de reacción, pero no forman parte de la presente invención.

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

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1a muestra un esquema para realizar PCR extrema.

La figura 1b es un dispositivo ilustrativo para realizar PCR extrema con capacidades en tiempo real para monitorizar un tubo de muestra en un baño de agua.

La figura 1c es un dispositivo ilustrativo para realizar PCR extrema con ciclado de tres temperaturas.

La figura 1d es una vista en primer plano de la óptica del dispositivo en la figura 1b que también muestra el capilar de referencia de temperatura.

La figura 2a es un gráfico que superpone la ubicación del soporte de muestras (----) de la figura 1b con la temperatura de la muestra (-).

La figura 2b es un gráfico de temperatura de PCR extrema utilizando el dispositivo mostrado en la figura 1b.

La figura 2c es un gráfico de temperatura de PCR de ciclo rápido utilizando un carrusel LightCycler (Roche) mostrado para comparación con la figura 2b.

5 La figura 3a muestra curvas de fusión derivadas de productos de PCR extrema (-----) y productos de PCR de ciclo rápido (----), con controles negativos para ciclado extremo (-) y rápido (-- -), amplificados utilizando el perfil de temperatura de la figura 2b.

10 La figura 3b es un gel de agarosa SeaKem LE al 2 % de las mismas muestras de la figura 3a, los carriles 1 y 8 son marcadores de tamaño, los carriles 2 y 3 son productos que resultan de una PCR extrema de 30 segundos, el carril 4 es un control sin plantilla para PCR extrema de 30 segundos, los carriles 5 y 6 son productos resultantes de PCR de 12 min, y el carril 7 es el control sin plantilla para PCR de 12 min.

15 La figura 3c muestra un trazo de temperatura de PCR extrema (-----) que amplificó los mismos productos mostrados en las figuras 3a y 3b, junto con la monitorización en tiempo real (-) de la misma reacción.

La figura 4a muestra un trazo de temperatura de PCR extrema que aumenta la velocidad de extensión mediante control de la temperatura.

20 La figura 4b muestra una porción ampliada de la figura 4a, que superpone la ubicación del soporte de muestras (-) de la figura 1b con la temperatura de la muestra (-----).

25 La figura 4c es una curva de fusión derivada negativa (-dF/dT) de un amplicón de 58 pb de IRL1 0RB, en la que se muestran los genotipos AA (-), AG (- - -) y GG (-----).

La figura 5a es un gráfico tridimensional que representa la concentración de polimerasa frente a la concentración de cebador frente a la concentración de producto de PCR, utilizando PCR extrema.

30 La figura 5b es el trazo de temperatura de PCR extrema utilizada en la figura 5a.

La figura 5c muestra curvas de fusión derivadas negativas de los productos de polimerasa KlenTaq (KT POL) 4  $\mu$ M de la figura 5a.

35 La figura 5d es un gel de agarosa que muestra resultados de PCR extrema utilizando concentraciones variables de polimerasa a concentraciones de cebador de 10  $\mu$ M de la figura 5a.

La figura 6a es un trazo de temperatura de PCR extrema realizada en un tubo de acero inoxidable de calibre 19.

40 La figura 6b es un gel de los productos de PCR producidos por los ciclos de temperatura extrema de la figura 6a.

La figura 7a es un trazo de temperatura de PCR extrema con una etapa combinada de hibridación/extensión larga (1 segundo).

45 La figura 7b es un gráfico tridimensional que representa la concentración de polimerasa frente a la concentración de cebador frente a la concentración de producto de PCR, utilizando PCR extrema para un producto de 102 pb.

La figura 8a muestra un perfil de temperatura de PCR extrema utilizada para amplificar un producto de 226 pb, utilizando una etapa combinada de hibridación/extensión de un segundo.

50 La figura 8b muestra un perfil de temperatura de PCR extrema utilizada para amplificar un producto de 428 pb, una etapa combinada de hibridación/extensión de cuatro segundos.

55 La figura 8c muestra los resultados en tiempo real obtenidos de la figura 8a y un trazo de temperatura similar utilizando una etapa de hibridación/extensión de 2 segundos, que no incluye controles de plantilla para cada una.

La figura 8d muestra los resultados en tiempo real obtenidos de la figura 8b y un trazo de temperatura similar utilizando una etapa de hibridación/extensión de 5 segundos, que no incluye controles de plantilla para cada una.

60 La figura 9a muestra curvas de amplificación de un fragmento de 45 pb de KCNE1 a diferentes concentraciones de partida.

65 La figura 9b es un gráfico de Cq frente a  $\log_{10}$  (copias de plantillas iniciales) de los datos de la figura 9a. Las reacciones se realizaron por quintuplicado. Las figuras 9c-9d son similares a las figuras 9a-9b, excepto que muestra la amplificación de un fragmento de 102 pb de NQO1.

La figura 10a es un gráfico tridimensional que representa la concentración de polimerasa frente a la concentración de cebador frente a la concentración de producto de PCR, utilizando PCR extrema para un producto de 300 pb (20 ciclos, 4,9 segundos por ciclo).

- 5 La figura 10b muestra gráficos de fluorescencia frente al número de ciclos para la amplificación por PCR de una plantilla sintética de 500 pb utilizando polimerasa KAPA2G FAST y tiempos de extensión de 1-5 segundos.

La figura 10c es un gráfico de la longitud de extensión frente al tiempo de extensión mínimo para varias concentraciones de polimerasa KlenTaq y polimerasa KAPA2G FAST.

- 10 Las figuras 11a-11e muestran gráficos de fluorescencia frente al número de ciclos para la amplificación por PCR de productos de tamaño: 100 pb (figura 11a), 200 pb (figura 11b), 300 pb (figura 11c), 400 pb (figura 11d) y 500 pb (figura 11e).

- 15 La figura 12a muestra curvas de fusión derivadas negativas de un fragmento de 60 pb de AKAP10 después de 35 ciclos de PCR extrema, utilizando concentraciones variables de magnesio.

La figura 12b es un gel de los productos de PCR mostrados en las curvas de fusión derivadas negativas de la figura 12a.

- 20 La figura 13a muestra curvas de fusión derivadas negativas de un fragmento de 60 pb de AKAP10 después de 35 ciclos, utilizando tiempos de ciclo variables con  $Mg^{++}$  5 mM. Los tiempos de ciclo fueron 0,32 segundos (-), 0,42 segundos (- - -), 0,52 segundos (- - -) y 0,62 segundos (-). Los tiempos de ciclo incluyeron un mantenimiento de 0,1 a 0,4 segundos en un baño de 60 °C.

- 25 La figura 13b es un gel de los productos de PCR mostrados en las curvas de fusión derivadas negativas de la figura 13a.

- 30 La figura 14a muestra curvas de fusión derivadas negativas de un fragmento de 60 pb de AKAP10, según se amplifica en tres instrumentos diferentes: (1) PCR extrema, (2) LightCycler y (3) CFX96 (Bio-Rad).

La figura 14b es un gel de los productos de PCR mostrados en las curvas de fusión derivadas negativas de la figura 14a.

- 35 Las figuras 15a-15b muestran perfiles ilustrativos para un paradigma de equilibrio (figura 15a) y un paradigma cinético (figura 15b) de PCR. El negro puro representa la desnaturalización, el rayado representa la hibridación y el blanco puro representa la extensión de los ácidos nucleicos durante el ciclado térmico.

- 40 Las figuras 16a-16c muestran un perfil de amplificación (figura 16a), un perfil de fusión (figura 16b) y picos de fusión (figura 16c) de AKAP10 y ACTB en un protocolo de RT-PCR para doble cadena. Se muestran dos ejecuciones.

La figura 17 muestra el porcentaje de RT en tiempos de incubación más cortos en comparación con un tiempo de incubación de 30 minutos.

- 45 La figura 18 es un gel de productos de PCR de RT-PCR utilizando varias temperaturas y tiempos para la etapa de RT. Los carriles 1-3 muestran una incubación a 45 °C durante 15, 20 y 25 segundos, respectivamente, los carriles 4-6 muestran una incubación a 47,5 °C durante 15, 20 y 25 segundos, respectivamente, los carriles 7-9 muestran una incubación a 50 °C durante 15, 20 y 25 segundos, respectivamente, y los carriles 10-11 muestran una incubación a 55 °C durante 15 y 20 segundos, respectivamente,

- 50 Las figuras 19a-19b son gráficos que muestran el efecto de trehalosa 0,6 M sobre la etapa de RT a varias temperaturas de incubación de RT, utilizando iScript con trehalosa (-) y sin trehalosa (- - -) (figura 19a), y con iScript (-) y RocketScript (- - -), ambos con trehalosa (figura 19b).

- 55 La figura 20 es un gráfico que muestra los efectos de la concentración de cebador inverso sobre la RT-PCR de dos etapas, con una incubación de 20 segundos (- - -) y 60 segundos (-).

La figura 21 es un gel que muestra la amplificación por RT-PCR de una etapa del ARN del VRS a 5.000, 500, 50 o 5 copias (de izquierda a derecha, por triplicado).

- 60 La figura 22 es un gel que muestra una RT-PCR con tiempos de incubación de 10 ms a 20 segundos.

La figura 23 muestra los resultados en tiempo real de una RT-PCR de una etapa utilizando 5.000 copias de plantilla inicial de ARN del VRS con una etapa de RT de 5 segundos y 45 ciclos de PCR.

- 65



La figura 24 es un gel que muestra tiempos muy cortos para una etapa de RT ilustrativa. De izquierda a derecha, los controles negativos (CN) son los dos carriles de la izquierda, las muestras preparadas en frío con una incubación de 0, 1 y 5 segundos a 56 °C en los siguientes tres carriles, y un minuto a temperatura ambiente con una incubación de 0, 1, y 5 segundos a 56 °C en los tres últimos carriles.

5 La figura 25 es un gel que compara el efecto de la trehalosa en una etapa de RT ilustrativa. El grupo de trehalosa está a la izquierda, con (de izquierda a derecha) el control sin plantilla, blanco, 1, 2, 5 y 10 segundos de incubación, seguido de sin trehalosa en el mismo orden.

10 La figura 26 es un gel que muestra una RT-PCR de una etapa realizada con AMV como enzima, a 42 °C con tiempo y concentración de Mg<sup>++</sup> variables. Mg<sup>++</sup> se incluyó como MgCl<sub>2</sub> 3 (arriba a la izquierda), 6 (arriba a la derecha), 10 (abajo a la izquierda) y 13 (abajo a la derecha) mM, cada uno con tiempos de RT de 1, 2, 5 y 10 segundos (de izquierda a derecha).

15 La figura 27 es un gel que muestra los resultados de un protocolo ilustrativo de RT-PCR de una etapa realizada con KCl 0, 10, 20, 40 y 75 mM (de derecha a izquierda) con una etapa de RT a 42 °C que dura 1 (arriba izquierda), 5 (arriba a la derecha) y 10 (abajo a la izquierda) segundos.

20 La figura 28 es un gel que muestra los resultados de un protocolo ilustrativo de RT-PCR de una etapa realizada con DTT 0, 10 o 38 mM y KCl 0 o 40 mM (tal como se indica) con una incubación de RT de 1 segundo (arriba a la izquierda), 5 segundos (arriba derecha) y 10 segundos (abajo a la izquierda) a 42 °C.

La figura 29 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de MMLV y el tiempo de RT sobre C<sub>q</sub>.

25 La figura 30 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de AMV sobre C<sub>q</sub> en un tiempo de reacción de RT de 2 segundos.

30 La figura 31 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de MMLV y AMV sobre C<sub>q</sub>, con reacciones que utilizan AMV que contiene Mg<sup>++</sup> 8 mM, tiempo de reacción de 2 segundos a 48 °C, y reacciones que utilizan MMLV que contiene Mg<sup>++</sup> 3,8 mM, tiempo de reacción de 2,5 segundos a 45 °C.

La figura 32 es un gráfico que muestra el efecto de la temperatura y el tiempo de RT sobre C<sub>q</sub>.

35 La figura 33 es un gráfico que muestra el efecto de la temperatura de RT sobre C<sub>q</sub>, con AMV como enzima de RT.

La figura 34 es un gráfico que muestra el efecto de la temperatura de RT sobre C<sub>q</sub>, mostrando los resultados utilizando tanto MMLV como AMV, en el que los círculos no rellenos representan MMLV y los círculos rellenos representan AMV.

40 La figura 35 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de Mg<sup>++</sup> sobre C<sub>q</sub> utilizando AMV con un tiempo de reacción de RT de 2 segundos.

45 La figura 36 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de Mg<sup>++</sup> sobre C<sub>q</sub> utilizando MMLV con tiempos de reacción de RT de 2 segundos y 5 segundos, en el que la línea sólida (círculos rellenos) representa RT de 2 segundos y la línea discontinua (círculos no rellenos) representa RT de 5 segundos.

50 La figura 37 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de Mg<sup>++</sup> sobre C<sub>q</sub> utilizando MMLV a 1,25 U/μl a 45 °C durante 2 segundos (rombos rellenos) y AMV a 0,31 U/μl a 45 °C durante 2 segundos (cuadrados no rellenos).

La figura 38 es un gráfico que muestra el efecto del tiempo de reacción de RT sobre C<sub>q</sub> utilizando MMLV a 1,25 U/μl a 45 °C durante 2 segundos con MgCl<sub>2</sub> 7,4 mM.

55 La figura 39 es un gráfico que muestra el efecto del tiempo de reacción de RT sobre C<sub>q</sub> utilizando AMV a 0,31 U/μl a 45 °C durante 2 segundos con MgCl<sub>2</sub> 11 mM.

La figura 40 es un gráfico que combina los resultados mostrados en las figuras 38-39, con AMV (círculos no rellenos) y MMLV (círculos rellenos).

60 La figura 41 es un gráfico que muestra la diferencia entre los C<sub>q</sub> utilizando la técnica de congelación con y sin plantilla de Zika (dos barras de la izquierda) y con y sin plantilla de VRSh (dos barras de la derecha).

65 La figura 42 es un gráfico que compara diferentes partes congeladas y enfriadas utilizando la técnica de congelación, en el que los experimentos n° 1, n° 2 y n° 3 se describen en el ejemplo 26 y el experimento n° 1 corresponde a la tabla 4, el experimento n° 2 corresponde a la tabla 5 y el experimento n° 3 corresponde a la tabla 6.

La figura 43 es un gráfico que muestra el efecto de la temperatura sobre Cq de los controles positivo y negativo utilizando la técnica de congelación descrita en el ejemplo 26.

5 La figura 44 es un gráfico del efecto del aptámero Trnc.2-30 sobre el Cq de controles positivos, controles negativos y su diferencia (delta Cq) utilizando ADN genómico humano y PCR de ciclo rápido, en el que los rombos representan el Cq para el control negativo, los cuadrados representan el Cq para el control positivo y los triángulos representan la delta Cq.

10 La figura 45 es un gráfico que compara el efecto de diferentes aptámeros de ADN, con y sin bloqueadores en 3', en el que Ninguno es sin bloqueador, Fos tiene un fosfato en 3' y Amino está modificado con un modificador terminal amino C6 en el extremo 3'.

15 La figura 46 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de aptámero de ADN sobre Cq, en el que los rombos representan el Cq para el control negativo, los cuadrados representan el Cq para el control positivo y los triángulos representan la delta Cq.

20 La figura 47 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de aptámero de ARN sobre Cq, en el que los rombos representan el Cq para el control negativo, los cuadrados representan el Cq para el control positivo y los triángulos representan la delta Cq.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

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

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

40 Tal como se utiliza en el presente documento, la frase de transición “que consiste esencialmente en” significa que el alcance de una reivindicación debe interpretarse que abarca los materiales o las etapas especificados mencionados en la reivindicación, “y aquellos que no afectan de manera material a la característica o características básicas y novedosas”. Véase, en re Herz, 537 F.2d 549, 551-52, 190 U.S.P.Q. 461, 463 (CCPA 1976) (énfasis en el original); véase también MPEP § 2111.03. De este modo, el término “que consiste esencialmente en” cuando se utiliza en una reivindicación de la presente invención no pretende interpretarse como equivalente a “que comprende”.

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

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

65 Por “sonda”, “cebador” u “oligonucleótido” se entiende una molécula de ADN o ARN monocatenario de secuencia definida que puede emparejarse por bases con una segunda molécula de ADN o ARN que contiene una secuencia complementaria (la “diana”). La estabilidad del híbrido resultante depende de la longitud, el contenido de GC, la

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

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

Por “condiciones de alta rigurosidad” se entiende, habitualmente, que tienen lugar a aproximadamente la temperatura de fusión ( $T_m$ ) menos 5 °C (es decir, 5 ° por debajo de la  $T_m$  de la sonda). De manera funcional, las condiciones de alta rigurosidad se utilizan para identificar secuencias de ácido nucleico que tienen una identidad de secuencia, como mínimo, del 80 %.

En una realización ilustrativa, se dan a conocer procedimientos y kits para PCR con tiempos de ciclo de <20 segundos, con algunas realizaciones utilizando tiempos de ciclo de <10 segundos, <5 segundos, <2 segundos, <1 segundo y <0,5 segundos. Con estos tiempos de ciclo, se completa una PCR de 30 ciclos en <10 min, <5 min, <2,5 min, <1 min, <30 segundos y <15 segundos, respectivamente. A medida que las velocidades de PCR se vuelven cada vez más rápidas, aumentan las concentraciones de cebador o polimerasa, o ambas, conservando así la eficiencia y el rendimiento de PCR.

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

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

Aunque a menudo se utilizan 94 °C como temperatura diana predeterminada para la desnaturalización, rara vez es óptima. Los productos de PCR se funden por encima de un intervalo de 40 °C, dependiendo principalmente del contenido de GC y de la longitud (43). Las bajas temperaturas diana de desnaturalización tienen una ventaja tanto de velocidad como de especificidad cuando el producto de PCR se funde a temperatura suficientemente baja como para que se pueda utilizar una temperatura de desnaturalización más baja. Cuanto más baja es la temperatura de desnaturalización, más rápido puede alcanzar la muestra la temperatura de desnaturalización, y más rápido se puede realizar la PCR. La especificidad añadida surge de la eliminación de todos los productos potenciales con temperaturas de desnaturalización más altas, ya que estos productos potenciales permanecerán bicatenarios y no estarán disponibles para la hibridación de cebadores. Para amplificar productos de alta  $T_m$ , es posible que sea necesario aumentar la temperatura diana por encima de 94 °C. Sin embargo, la mayoría de las polimerasas termoestables actuales comienzan a desnaturalizarse por encima de 97 °C y la solución de PCR puede hervir entre 95 °C (o inferior) y 100 °C, dependiendo de la altitud, por lo que no hay mucho margen para aumentar la temperatura. Disminuir la concentración de sal monovalente y  $Mg^{++}$  disminuye la  $T_m$  del producto. De manera

similar, la incorporación de dUTP y/o 7-deaza-dGTP también reduce la  $T_m$  del producto, pero puede disminuir las velocidades de extensión de polimerasa. La mayoría de los “potenciadores” de PCR patentados son compuestos orgánicos simples que reducen la  $T_m$  del producto, permitiendo la desnaturalización (y amplificación) de los productos de alta  $T_m$ . Los más populares entre estos son DMSO, betaína, glicerol, etilenglicol y formamida. Además de reducir la  $T_m$ , algunos de estos aditivos también aumentan el punto de ebullición de la mezcla de PCR (particularmente útil a grandes altitudes). A medida que aumenta la concentración del potenciador, las  $T_m$  del producto disminuyen, pero la inhibición de la polimerasa puede aumentar.

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

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

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

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

A diferencia de la desnaturalización, la eficacia de hibridación depende de la concentración de cebador. La hibridación de cebadores puede volverse limitante a velocidades de ciclo muy rápidas. La hibridación de cebadores es una reacción de segundo orden que depende de las concentraciones tanto de cebador como de diana. Sin embargo, durante la mayor parte de la PCR, la concentración de cebador es mucho más alta que la concentración de diana y la hibridación es efectivamente de pseudoprimer orden y depende solo de la concentración de cebador.

En este caso, la fracción de producto que se cebe (la eficiencia de hibridación) depende solo de la concentración de cebador, no de la concentración del producto, de modo que las concentraciones de cebador más altas deberían permitir tiempos de hibridación más cortos. Además, sin querer quedar ligados a la teoría, se cree que la relación es lineal. A medida que el tiempo de hibridación se vuelve más y más corto, se hacen necesarias mayores concentraciones de cebador para mantener la eficiencia y el rendimiento de la PCR. Por ejemplo, el ciclado rápido permite aproximadamente 1-3 segundos para la hibridación a temperaturas de 5 °C por debajo de la  $T_m$  del cebador (3). Si este tiempo de hibridación (a o por debajo de  $T_m - 5$  °C) se reduce 10 veces en la PCR extrema, se esperaría una eficiencia de cebado similar si la concentración del cebador aumentara 10 veces. A medida que el tiempo de hibridación disponible se vuelve cada vez más corto, la concentración del cebador debería aumentarse cada vez más en aproximadamente el mismo múltiplo. Los protocolos típicos de PCR rápida utilizan 500 nM de cada cebador. Si el tiempo de hibridación en PCR extrema se reduce de 3 a 40 veces, las concentraciones de cebador requeridas para obtener la misma eficacia de cebado son 1.500-20.000 nM por cebador. Esto es equivalente a 3.000-40.000 nM cebadores totales, más alta que cualquier concentración de cebador en la tabla 1. Esto sugiere que una razón de la deficiente eficiencia en intentos previos a ciclos <20 segundos es la baja eficiencia de hibridación secundaria a concentraciones inadecuadas de cebador. En PCR extrema, las concentraciones de cebador se incrementan a 1,5-20 µM cada una para obtener una excelente eficiencia de hibridación a pesar de los tiempos de hibridación de 0,05-0,3 segundos. Se pueden contemplar concentraciones de cebador cada vez mayores para tiempos de hibridación incluso cada vez más cortos, utilizando mayores concentraciones de cebador para compensar los tiempos de hibridación disminuidos para obtener la misma eficiencia de hibridación. Se observa que la mayoría de los instrumentos comerciales requieren un tiempo de espera de, como mínimo, 1 segundo, mientras que algunos instrumentos permiten un tiempo de espera de "0" segundos, pero ningún instrumento comercial permite un tiempo de espera de un segundo fraccional. Para algunos ejemplos ilustrativos de PCR extrema, pueden ser deseables tiempos de mantenimiento en incrementos de 0,1 o 0,01 segundos.

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

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

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

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

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

Para una primera aproximación, para productos de PCR pequeños (<100 pb), el tiempo de polimerización requerido

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

También se prevé un ciclado extremo de tres temperaturas, donde las etapas de hibridación y extensión se mantienen separadas a diferentes temperaturas. En este caso, el tiempo asignado a las etapas de hibridación y extensión puede controlarse individualmente y adaptarse a necesidades específicas. Por ejemplo, si solo el tiempo de hibridación es corto (0,05-0,2 segundos) y el tiempo de extensión se mantiene comparativamente largo (de forma ilustrativa durante 1, 2, 5, 10 o 15 segundos), solo las concentraciones de cebadores deben incrementarse para una PCR eficiente. Como alternativa, si el tiempo de extensión es corto (<1 segundo dentro de 70-80 °C), pero el tiempo de hibridación es largo, se cree que solo es necesario aumentar la concentración de polimerasa para obtener una PCR eficiente. Se entiende que la PCR eficiente tiene una eficiencia ilustrativa, como mínimo, del 70 %, de forma más ilustrativa, como mínimo, del 80 % y, de la forma más ilustrativa, como mínimo, del 90 %, pudiéndose alcanzar una eficiencia > 95 % en muchos casos.

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

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

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

Cuando las condiciones de reacción se configuran según, como mínimo, una realización en el presente documento, se ha descubierto que la PCR se puede realizar a velocidades muy rápidas, de manera ilustrativa con algunas realizaciones en menos de un minuto para una amplificación completa, con tiempos de ciclo de menos de dos

segundos. De manera ilustrativa, se utilizan diversas combinaciones de concentraciones aumentadas de polimerasa y cebadores para esta PCR extrema. Sin estar vinculado a ninguna teoría en particular, se cree que un exceso de concentración de cebadores permitirá generalmente la hibridación completa de cebadores, aumentando así la eficiencia de la PCR. Además, sin estar vinculado a ninguna teoría en particular, se cree que un aumento en la concentración de polimerasa mejora la eficiencia de la PCR al permitir una extensión más completa. La concentración de polimerasa aumentada favorece la unión al cebador hibridado, y también favorece la unión de nuevo si una polimerasa se cae antes de la extensión completa. Los ejemplos a continuación muestran que la PCR extrema ha tenido éxito, incluso cuando comienza con ADN genómico eucariota complejo y dianas de una sola copia.

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

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

El recipiente de muestra 20 está sostenido por un soporte de tubos 22 unido a un eje del motor paso a paso 26 por el brazo 21. El soporte de tubos 22 fue mecanizado a partir de plástico Delrin negro para contener 2-5 recipientes de muestra 20 (solo un recipiente de muestra 20 es visible en la figura 1a, pero puede estar presente una fila de dichos recipientes de muestra 20) de modo que las soluciones de reacción se mantuvieron en un radio de 6,5-7,5 cm. Aunque no es visible en la figura 1a, se puede utilizar un termopar (termopar de alambre fino de precisión tipo T Omega #5SRTC-TT-T-40-36, 36" de plomo, 0,003" de diámetro con aislamiento de Teflón) para medir la temperatura. Con referencia a la figura 1d, que muestra un soporte de tubos y un brazo similares de la figura 1b con números similares representando componentes similares, está presente un soporte de tubos 222 diseñado para contener dos recipientes de muestra, con una ubicación en el soporte de tubos 222 ocupada por un termopar 228. Se entiende que se puede utilizar cualquier cantidad de recipientes de muestra 20 o 220 en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, con o sin un termopar, como se muestra en la figura 1d. La amplificación y linealización del termopar se realiza con un chip AD595 de Analog Devices (no se muestra). El voltaje del termopar se calculó primero a partir de la salida AD595 como voltaje Tipo T = (salida AD595/247,3) - 11 µV. A continuación, el voltaje del termopar se convirtió en temperatura utilizando los coeficientes del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología para la correlación voltaje/temperatura de termopares tipo T. La señal analógica se digitalizó (placa de adquisición PCle-6363) y se procesó mediante el software LabView (versión 2010, National Instruments) instalado en la CPU 40 y se visualizó en la interfaz de usuario 42. El movimiento paso a paso se dispara dinámicamente de manera ilustrativa a 87-92 °C y 60-75 °C o puede mantenerse en cada baño de agua durante un período de tiempo controlado por ordenador. Típicamente se realizan entre treinta y cincuenta ciclos.

El motor paso a paso 24 (Applied Motion Products, #HT23-401, 3V, 3A) se coloca entre los baños de agua 10 y 14 para que todos los recipientes de muestra 20 en el soporte de tubos 22 puedan girar entre cada baño de agua 10 y 14, de modo que la porción de cada recipiente de muestra 20 que contiene muestras esté completamente sumergida. El motor paso a paso 24 está alimentado de manera ilustrativa por un 4SX-411 nuDrive (National Instruments, no se muestra) y controlado con un controlador de movimiento PCI-7344 y software NI-Motion (versión 8.2, National Instruments) instalado en la CPU 40. El motor paso a paso 24 gira entre los baños de agua 10 y 14 en

aproximadamente 0,1 segundos. La figura 2a muestra un trazo de temperatura de muestra (----) yuxtapuesto sobre un trazo de la posición del recipiente de muestra 20 (-), para una carrera en la que se activó el movimiento paso a paso a 90 °C y 50 °C. Como se puede ver en la figura 2a, hay un sobreimpulso a una temperatura inferior a 50 °C, presumiblemente debido al tiempo requerido para mover el recipiente de muestra 20 fuera del baño de agua 14. Por lo tanto, como se discutió anteriormente, puede ser deseable activar el motor paso a paso 24 a una temperatura algo más alta. En los ejemplos a continuación, las temperaturas dadas corresponden a la temperatura de muestra alcanzada, no a la temperatura de activación. La velocidad de calentamiento máxima calculada a partir de la figura 2a es 385 °C/s y la velocidad de enfriamiento máxima 333 °C/s. De manera ilustrativa, la PCR extrema se puede realizar con velocidades de rampa de, como mínimo, 200 °C/s. En otras realizaciones, la velocidad de rampa puede ser 300 °C/s o mayor.

En algunos ejemplos, el sistema 4 también está configurado para monitorización en tiempo real. Como se muestra en la figura 1a, para la monitorización en tiempo real, una punta de fibra óptica 50 del bloque de óptica 25 está montada sobre el recipiente de muestra 20, de modo que cuando el recipiente de muestra 20 se mueve desde el baño de agua caliente 10 al baño de agua fría mediante un motor paso a paso 24, el recipiente de muestra 20 pasa por la punta de fibra óptica 50, con o sin retención en esta posición de monitorización. En esta realización ilustrativa, la punta de fibra óptica se proporciona en aire por encima de los baños de agua. El dispositivo de termociclado 4 puede controlarse mediante la CPU 40 y verse en la interfaz de usuario 42.

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

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

La figura 1c muestra un sistema ilustrativo 304 para PCR a tres temperaturas. Se utilizan un baño de agua caliente 310 de 95,5 °C, un baño de agua fría 314 de 30-60 °C y un baño de agua media 313 de 70-80 °C para cambiar la temperatura de las muestras de 1-5 µl contenidas en un recipiente de muestra 320 y se calientan en tres placas calefactoras eléctricas 312, 316 y 318 con agitación magnética. El recipiente de muestra 320 se sostiene mediante un soporte de tubos 322 unido a un motor paso a paso 324 por el brazo 321. El termopar 328 también se sostiene mediante el soporte de tubos 322. El brazo 321 puede elevarse a medida que gira el motor paso a paso 324. Una punta 350 de fibra óptica se proporciona de manera ilustrativa en un baño de agua media 313, aunque se entiende que puede colocarse en el aire, como con la figura 1a. Debido a la configuración de esta realización ilustrativa, no fue posible colocar los tres baños de agua, 310, 313 y 314 equidistantes entre sí. Por consiguiente, el espacio más grande se colocó entre el baño de agua caliente 310 y el baño de agua fría 314, ya que es deseable enfriar la muestra entre estos baños, mientras que la muestra se mueve entre los otros baños de agua para calentarse. Sin embargo, se entiende que esta configuración es solo ilustrativa y que otras configuraciones están dentro del alcance de la presente divulgación.

Debido a que se utilizan dos motores paso a paso simultáneamente (uno para elevar el capilar fuera del agua y otro para transferir entre baños de agua), el movimiento angular de cada uno se puede minimizar para disminuir el tiempo de movimiento entre baños. En el sistema de 2 baños de agua, el movimiento angular requerido del paso a paso para transferir la muestra entre baños es mayor de 270 grados. Sin embargo, en el sistema de 3 baños de agua, el motor paso a paso que eleva las muestras necesita atravesar menos de 45 grados, mientras que el paso a paso que mueve las muestras entre baños de agua necesita moverse solo 90 grados o menos. Los baños de agua también se pueden configurar como sectores de un círculo (cuñas en forma de tarta) para limitar aún más el movimiento angular requerido. Minimizar el movimiento angular disminuye el tiempo de transferencia entre baños de agua. Se prevén tiempos de transferencia de menos de 100 ms o incluso menos de 50 ms. Otros componentes de este sistema 304 son similares a los sistemas 4, 204 mostrados en las figuras 1a-b y no se muestran en la figura 1c. También se contempla la extensión a un sistema de 4 baños de agua. Las utilidades para el cuarto baño de agua incluyen un baño de agua helada para garantizar un inicio en frío para limitar la cantidad de extensión antes de la desnaturalización inicial de la PCR y un baño de agua a 37-56 °C para la transcripción inversa antes de la PCR (RT-PCR). Si se necesitan tanto un inicio en frío como una transcripción inversa, se podría utilizar un sistema de 5 baños de agua.



**EJEMPLOS****EJEMPLO 1**

A menos que se indique lo contrario, la PCR se realizó en volúmenes de reacción de 5 µl que contenían Tris 50 mM (pH 8,3, a 25 °C), MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 200 µM cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 500 µg/ml de albúmina de suero bovino no acetilada (Sigma), glicerol al 2 % (v/v) (Sigma), 50 ng de ADN genómico humano purificado y 1X LCGreen® Plus (BioFire Diagnostics). La concentración de los cebadores y la polimerasa varió según los protocolos experimentales específicos. La ADN polimerasa KlenTaq1TM se obtuvo de AB Peptides, St. Louis, MO, o de Wayne Barnes en la Universidad de Washington (St. Louis). El peso molecular de KlenTaq es 62,1 kD con un coeficiente de extinción a 280 nm de 69.130 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>, calculado a partir de la secuencia (Patente US5,436,149). La espectrometría de masas confirmó un peso molecular predominante de 62 kD, y los geles de poliacrilamida desnaturalizados mostraron que la banda principal tenía una pureza superior al 80 % por integración. La utilización de la absorbancia y la pureza para calcular la concentración indicó un stock de 80 µM en glicerol al 10 %. Las concentraciones finales de polimerasa fueron típicamente de 0,25-16 µM. Un µM de KlenTaq es el equivalente a 0,75 U/µl, con una unidad definida como 10 nmol de producto sintetizado en 30 minutos a 72 °C con ADN de esperma de salmón activado. Los cebadores fueron sintetizados por la instalación central de la Universidad de Utah, se desalaron y las concentraciones se determinaron por A<sub>260</sub>. Las concentraciones finales de cada cebador variaron típicamente de 2,5-20 µM.

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

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

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

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

**EJEMPLO 2**

En este ejemplo, un fragmento de 58 pb que encuadra una variante A>G (rs#2834167) en el receptor beta de

interleucina 10 se amplificó con los cebadores CTACAGTGGGAGTCACCTGC (SEQ ID NO: 4) y GGTACTGAGCTGTGAAAGTCAGGTT (SEQ ID NO: 5) para generar el siguiente amplicón: CTACAGTGGGAGTCACCTGCTTTTGCC(A/G)AAGGGAACCTGACTTTCACAGCTC AGTACC (SEQ ID NO:6). La PCR extrema se realizó como se describe en el ejemplo 1 utilizando el instrumento que se muestra en la figura 1a. Se utilizaron un  $\mu\text{M}$  de polimerasa, 10  $\mu\text{M}$  cada cebador y el 1,3 % de glicerol (porcentaje de polimerasa al cebador total = 5 %). Para aumentar la temperatura para la extensión de polimerasa a 70-80 °C, donde la polimerasa tiene velocidades de extensión más altas, se utilizó un protocolo de situación diferente. Después de alcanzar la temperatura de hibridación, en lugar de situarla inmediatamente en el aire para la monitorización, la muestra se transfirió al baño de agua caliente hasta que se alcanzó la temperatura de extensión. Luego, la muestra se situó en el aire justo por encima del baño de agua caliente, produciendo los ciclos de temperatura que se muestran en las figuras 4a y 4b, y permitiendo una extensión de polimerasa más rápida a temperaturas óptimas entre 70 y 77 °C. Los 3 genotipos diferentes se amplificaron cada uno por PCR extrema utilizando ciclos de 0,97 segundos, completando 39 ciclos en 38 segundos. Después de la PCR extrema, se obtuvieron curvas de fusión de alta resolución para cada genotipo en un instrumento HR-1 modificado para aceptar capilares LC24. La figura 4c revela que los tres genotipos se amplificaron y distinguieron, como se esperaba.

### EJEMPLO 3

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

La figura 5a resume los resultados del ciclado de PCR extrema con diversas concentraciones de polimerasa y cebadores. En este ejemplo, se amplificó un fragmento de 49 pb del receptor beta de interleucina 10 con los cebadores GGGAGTCACCTGCTTTTGCC (SEQ ID NO: 7) y TACTGAGCTGTGAAAGTCAGGTTCC (SEQ ID NO: 8) y  $\text{MgCl}_2$  3 mM, para generar: GGGAGTCACCTGCTTTTGCCAAAGGGAACCTGACTTTCACAGCTCAGTA (SEQ ID NO: 9). Para cada reacción de PCR extrema, se utilizó el dispositivo que se muestra en las figuras 1b sin monitorización en tiempo real. La temperatura se sometió a un ciclo entre 90 °C y 63 °C durante 35 ciclos, para un tiempo de reacción total de poco menos de 26 segundos (ciclos de 0,73 segundos) como se muestra en la figura 5b. Las condiciones de reacción fueron como se analizó en el ejemplo 1, excepto que las cantidades de polimerasa y cebadores variaron, como se muestra en la figura 5a. El eje vertical en la figura 5a se cuantifica como el pico de la gráfica de derivada negativa de la curva de fusión, obtenida sin normalización en el instrumento HR-1. A polimerasa 0,5  $\mu\text{M}$ , prácticamente no se observó amplificación a ningún nivel de concentración de cebadores. Sin embargo, a polimerasa 1,0  $\mu\text{M}$ , se observaron niveles discernibles de amplificación a concentraciones de cebadores de 5  $\mu\text{M}$  y superiores. A medida que aumentan los niveles de polimerasa, también lo hace la cantidad de amplicón, hasta niveles de aproximadamente 4  $\mu\text{M}$ . A polimerasa 8  $\mu\text{M}$ , la cantidad de amplicón se estabilizó o disminuyó, dependiendo de la concentración de cebadores, con una disminución significativa a 16  $\mu\text{M}$  a concentraciones de cebador más bajas. Parece que en estas condiciones de ciclado de temperatura extrema para un producto de 49 pb, la polimerasa tiene un intervalo de concentración favorecido entre aproximadamente 1 y 8  $\mu\text{M}$ , y más específicamente entre 2 y 8  $\mu\text{M}$ , dependiendo de la concentración de cebadores.

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

Sin estar vinculado a la teoría, parece que la relación entre la cantidad de enzima y la cantidad de cebador es importante para ciclado de PCR extrema, siempre que ambas estén por encima de una cantidad umbral. Se observa que las cantidades anteriores se proporcionan basándose en cada cebador. Dado que la polimerasa se une a cada uno de los cebadores duplicados, la concentración total de cebadores puede ser la más importante. Para KlenTaq,

las proporciones adecuadas son 0,03-0,4 (3-40 % de enzima respecto a concentración total de cebadores), con una concentración mínima ilustrativa de KlenTaq de aproximadamente 0,5  $\mu\text{M}$ , y de manera más ilustrativa aproximadamente 1,0  $\mu\text{M}$ , para PCR extrema. Los cebadores pueden proporcionarse en cantidades equimolares, o uno puede proporcionarse en exceso, como para PCR asimétrica. El porcentaje polimerasa:cebador óptimo también puede depender de las condiciones de ciclado de temperatura y del tamaño del producto. Por ejemplo, el ciclado de temperatura estándar (lento) a menudo utiliza un porcentaje de polimerasa respecto a cebador mucho más bajo, típicamente 1,5 nM (0,04 U/ $\mu\text{l}$ ) de polimerasa (49) y una concentración total de cebadores de 1.000 nM, para un porcentaje del 0,15 %, más de 10 veces menor que los porcentajes encontrados efectivos para PCR extrema.

#### EJEMPLO 4

La misma diana de PCR que en el ejemplo 3 se amplificó con polimerasa 8  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  cada cebador en una aguja hipodérmica de acero de calibre 19, para aumentar la transferencia térmica y las velocidades de ciclado. El porcentaje de polimerasa respecto a cebadores total fue del 20 %. La amplificación se realizó en el instrumento de la figura 1b y se completó en 16 segundos utilizando 35 ciclos de 0,46 segundos cada uno (figura 6a), ciclando entre 91 °C y 59-63 °C. La velocidad máxima de calentamiento durante el ciclado fue de 407 °C/s y la velocidad máxima de enfriamiento fue de 815 °C/s, lo que demuestra que la PCR puede producirse con velocidades de rampa superiores a 400 °C/s sin mantenimientos. El análisis de los productos en un gel de agarosa NuSieve 3:1 al 4 % reveló intensas bandas específicas del tamaño correcto (figura 6b). El control sin plantilla no mostró producto a 49 pb, pero sí mostró una banda de cebador prominente similar a las muestras positivas.

#### EJEMPLO 5

Se amplificó un fragmento de 102 pb del gen NQO1 utilizando los cebadores CTCTGTGCTTTCTGTATCCTCAGAGTGGCATTCT (SEQ ID NO: 10) y CGTCTGCTGGAGTGTGCCAATGCTATA (SEQ ID NO: 11) y el instrumento de la figura 1b sin los componentes en tiempo real. La concentración de polimerasa varió entre 0,25 y 4  $\mu\text{M}$ , mientras que la concentración de cada cebador varió entre 0,5 y 8  $\mu\text{M}$ . Los cebadores se diseñaron para hibridar a temperaturas más altas (apenas por encima de 70 grados) de modo que la extensión en una fase combinada de hibridación/extensión estaría a una temperatura más óptima para la polimerasa. Se esperaba que mayores velocidades de polimerización a estas temperaturas permitieran la amplificación de productos más largos. El baño de agua más fría se controló a 72 °C y el final de la fase de hibridación/extensión se activó por tiempo (1 segundo), en lugar de temperatura. El ciclado entre 72 y 90 °C durante 30 ciclos requirió 58 segundos utilizando ciclos de 1,93 segundos (figura 7a). Como se ve en la figura 7a, la temperatura de la muestra cae aproximadamente 3 °C por debajo de la temperatura de hibridación/extensión mientras viaja por el aire hasta el baño de agua caliente. La figura 7b muestra la cantidad de producto amplificado cuantificando las curvas de fusión como en la figura 5a. El análisis de la curva de fusión mostró solo un único producto de  $T_m$  84 °C. Se observó muy poco producto a polimerasa 0,25  $\mu\text{M}$  o a 1  $\mu\text{M}$  de cada cebador. Alguna amplificación ocurre a 2  $\mu\text{M}$  de cada cebador, con la mejor amplificación a polimerasa 2-4  $\mu\text{M}$  y 8  $\mu\text{M}$  de cada cebador. A concentraciones de cebador de 2-4  $\mu\text{M}$ , el rendimiento disminuye a medida que aumenta la concentración de polimerasa, aunque esto no se observó a una concentración de cebador de 8  $\mu\text{M}$ . Aunque el ciclado térmico y la longitud diana son diferentes del ejemplo 3, la mejor amplificación se produce en las concentraciones de polimerasa respecto a cebador total del 3,1 al 50 %.

#### EJEMPLO 6

Se utilizó PCR extrema para amplificar fragmentos de 135 pb y 337 pb del gen BBS2 utilizando el instrumento que se muestra en la figura 1b con monitorización en tiempo real. Para estudiar el efecto de la longitud del producto en la PCR extrema y controlar los posibles efectos de confusión de diferentes cebadores, los fragmentos se amplificaron primero a partir de ADN genómico utilizando cebadores con extensiones comunes de extremo 5'. Para el fragmento de 135 pb, los cebadores fueron ACACACACACACACACACACACACACACACACAAAAATTCAGTGGCATTAAATACG (SEQ ID NO:12) y GAAAAACAGAGCTAAAGGGAAG (SEQ ID NO:13). Para el fragmento de 337 pb, los cebadores fueron ACACACACACACACACACACACACACACACACAAAAAGCTGGTGTCTGC TATAGAACTGATT (SEQ ID NO:14) y GAAAAAGTTGCCAGAGCTAAAGGGAAGG (SEQ ID NO:15). Después de la amplificación por PCR estándar a partir de ADN genómico, los cebadores y los dNTP se degradaron mediante ExoSAP-IT (Affymetrix, CA), seguido de la purificación del producto por PCR utilizando el kit de purificación de PCR QuickStep™ 2 (nº de catálogo 33617, Edge BioSystems, Gaithersburg, MD). Los productos de PCR se diluyeron aproximadamente 1 millón de veces y se ajustaron a concentraciones iguales igualando el Cq obtenido por PCR estándar en tiempo real para obtener un Cq de 25 ciclos (aproximadamente 10.000 copias/10  $\mu\text{l}$  de reacción).

La PCR extrema se realizó en 1.000 copias de las plantillas amplificadas en un volumen total de 5  $\mu\text{l}$  utilizando los cebadores comunes ACACACACACACACACACACACACACACACACAAAAA (SEQ ID NO: 16) y GAAAAA (SEQ ID NO: 17) cada uno a 2  $\mu\text{M}$

con polimerasa 2  $\mu$ m y glicerol al 2 %. El fragmento de BBS2 de 135 pb dio como resultado un producto de 226 pb que requería la extensión de 176 o 185 bases (dependiendo del cebador), mientras que el fragmento de BBS2 de 337 pb dio como resultado un producto de PCR de 428 pb que requería la extensión de 378 o 387 bases. La amplificación específica se verificó en geles de agarosa y por análisis de fusión. El perfil extremo de temperatura de PCR utilizado para el producto de 226 pb se muestra en la figura 8a, que incluía una hibridación/extensión combinadas de 1 segundo a 75 °C y desnaturalización a 87 °C. También se realizó una fase de hibridación/extensión de 2 segundos a la misma temperatura (no se muestra el trazo). Los resultados de PCR en tiempo real para estas amplificaciones se muestran en la figura 8c, revelando un desplazamiento de 5 ciclos a un Cq más alto con la extensión de 1 segundo en comparación con la extensión de 2 segundos, lo que presumiblemente refleja una disminución en la eficiencia a medida que disminuye el tiempo de extensión. El perfil de temperatura de PCR extrema utilizado para el producto de 428 pb se muestra en la figura 8b, que muestra una hibridación/extensión combinadas de 4 segundos a 75 °C y desnaturalización a 87 °C. También se realizó una fase de hibridación/extensión de 5 segundos a la misma temperatura (no se muestra el trazo). Los resultados de PCR en tiempo real para estas amplificaciones se muestran en la figura 8d, revelando un desplazamiento de 2 ciclos a un Cq más alto con la extensión de 4 segundos en comparación con la extensión de 5 segundos, lo que presumiblemente refleja una disminución en la eficiencia a medida que disminuye el tiempo de extensión.

#### EJEMPLO 7

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

#### EJEMPLO 8

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

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

Las secuencias de plantillas sintéticas fueron:

Plantilla de 100 pb:

ACTCGCACGAACTCACCGCACTCCGGATGGATTGTGAAGAGGCCCAAGATAC  
TGGTCATATTATCCTTTGATCTAGCTCTCACTCGCACTCTCACGCACA (SEQ ID  
NO:20).

Plantilla de 200 pb:

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

Plantilla de 300 pb:

ACTCGCACGAACTCACCGCACTCCCCCTTCGAATATAAAGTACGACATTACTAG  
CAATGACAGTTCCAGGATTTAAGAAAGTAGTGTTCCACATCAATGCATATCCA  
GTGAAAGCATAACGTCAAAAAAAGCCTGGCACC GTTCGCGATCTGGACTTAC  
TTAGATTTGTTGTAGTCAAGCCGGCTATCAGCGATTTATCCCGGAAACACATA  
CTAGTGAGTTATTTGTATGTTACCTAGAATAGCTGTCACGAATCACTAATACA  
TTCACCCACCAGCTCTCACTCGCACTCTCACGCACA (SEQ ID NO:22).

Plantilla de 400 pb:

ACTCGCACGAACTCACCGCACTCCTGAATACAAGACGACAGTCCTGATTATAT  
TTTCATTTAATTACGCCAATTTAATTATGATGAATATTAACGGAATTAAATAT  
GTATTGATAAGTACTAAGTAATGGTTTACCCACGGCGATCTATATGCAAGGG  
AAACATTAACAAATTTAAACATCTGATGTGGACAAAACCTTGTAATGTGGTAT  
AGTTAAAAATATAGGTTTCAGGGACACGTAAGTATCTATCTTGAATGTTTAAG  
TAGGTCCTGTCTACCATTCTGAAATTTAGAAAATCGCGTTCATCGGGCTGTCTG  
GCTACACCTCAGAAAACCATTTTCGTGTTGCACAGGAGGAACCTTTCGAGGGTTC  
GTATGAGCTCTCACTCGCACTCTCACGCACA (SEQ ID NO:23).

Plantilla de 500 pb:

ACTCGCACGAACTCACCGCACTCCACCGCTTGACGACGTAGGGTATTTGGTAT  
CTGAATCTACTCATTTACCTACATACTGAAGATTTTGCGATCGTCTAATATATT  
GGACTAATGCCCGATTTCTGATCAATTACTCTAGGCGATACTTCATCGCTGGC  
CTTATTTGGATTTTGCTCAAGTGCTAAACTCTCTGCGCGTCAATACTAGTCTGA  
CATCAGTCAAGACCTGCTATCTGAAAACCTACTAGAGAGATATACCTAACAAC  
TTTAGTGGATAAATCAGGTCTGGAGATTGTCATATAATGCCACTAGGGTCAGA  
AGGCTGTGTCAAAGTTAGTGGTTAGTAGGTCTCCGCTCTGCGGTACTATTCTT  
ATATTCTCTTACTATGCATCAAACAAAATAGAATGCATAGACAAACCGCCTGC  
CAAGTTTACAAGATAACTTGCGTATAGGTTTATAAGGGTTCTTCTGTATCGCT  
CTCACTCGCACTCTCACGCACA (SEQ ID NO:24).

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



disponibles en el mercado a concentraciones suficientes, mientras que la mayoría de las otras polimerasas no están disponibles en el mercado a concentraciones tan altas. Se entiende que el tiempo requerido para la extensión depende directa y linealmente de la longitud a extender, e inversamente de la concentración de polimerasa y la velocidad de la polimerasa. Se puede definir una constante de proporcionalidad ( $k_2$ ) que relacione estos 3 parámetros:

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

## EJEMPLO 9

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

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

## EJEMPLO 10

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

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

Los ejemplos 1 a 17 se realizaron todos utilizando uno o más de los dispositivos descritos en las figuras 1a-1d, o variaciones menores en esas configuraciones, con determinadas etapas realizadas en el LightCycler para confirmar los resultados de qPCR. Sin embargo, se entiende que los procedimientos y reacciones descritos en el presente documento pueden tener lugar en una variedad de instrumentos. Los baños y tubos de agua utilizados en estos ejemplos permiten un cambio de temperatura suficientemente rápido para estudiar los efectos de concentraciones elevadas de cebadores y polimerasa. Sin embargo, otras realizaciones pueden ser más adecuadas comercialmente. Los sistemas de microfluídica, con un volumen bajo y una alta relación de área superficial respecto a volumen, pueden ser adecuados para PCR extrema. Dichos sistemas permiten cambios rápidos de temperatura requeridos por las altas concentraciones de cebadores y polimerasa que se utilizan en PCR extrema. Los sistemas de microfluídica incluyen sistemas de micro-flujo (35, 53) que incorporan canales miniaturizados que transportan repetidamente las muestras a través de zonas de temperatura de desnaturalización, hibridación y extensión. Algunos de estos sistemas ya han demostrado una PCR efectiva con tiempos de ciclo tan rápidos como 3 segundos para dianas de menor complejidad. Se espera que las dianas más complejas puedan amplificarse en dichos sistemas si la polimerasa se proporciona a una concentración de, como mínimo, 0,5  $\mu$ M y los cebadores se proporcionan a una concentración de, como mínimo, 2  $\mu$ M. Los chips de PCR estacionarios y los sistemas de gotas de PCR (54)

también pueden beneficiarse del aumento de las concentraciones de cebadores y sonda, ya que los volúmenes pueden ser tan pequeños como 1 nl o más pequeños y pueden ser lo suficientemente bajos como para permitir un ciclado muy rápido. Se entiende que la instrumentación exacta no es importante para la presente invención, siempre que la temperatura de la instrumentación haga ciclos lo suficientemente rápidos como para aprovechar el aumento de las concentraciones de cebadores y polimerasa sin sufrir la pérdida de especificidad asociada con mayores concentraciones de cebadores a velocidades de ciclo más lentas.

Las actividades enzimáticas ilustrativas cuya magnitud puede incrementarse incluyen polimerización (ADN polimerasa, ARN polimerasa o transcriptasa inversa), ligadura, desenrollamiento helicoidal (helicasa) o actividad de exonucleasa (5' a 3' o 3' a 5'), desplazamiento de cadena y/o escisión, actividad de endonucleasa y digestión de ARN de un híbrido de ADN/ARN (ARNasa H). Las reacciones de amplificación incluyen, sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa, la reacción en cadena de la ligasa, la amplificación mediada por transcripción (incluyendo el sistema de amplificación basado en la transcripción, la replicación de secuencias autosostenida y la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico), la amplificación por desplazamiento de cadena, la amplificación del genoma completo, amplificación por desplazamiento múltiple, amplificación de ARN antisentido, amplificación mediada por bucle, amplificación de enlace lineal, amplificación de círculo rodante, amplificación de ramificación, amplificación de oligonucleótidos isotérmicos, reacción en cadena de la helicasa y amplificación por señal invasiva en serie.

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

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

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

Los tiempos de secuenciación del ciclo también pueden reducirse aumentando las concentraciones de cebadores y polimerasa. Típicamente, las concentraciones de cebadores en la secuenciación del ciclo estándar son de 0,16  $\mu M$  y el período de hibridación/extensión combinadas es de 10 minutos a 50-60 grados C. Al aumentar las concentraciones de cebadores y polimerasa en 10 veces, el tiempo requerido para hibridación/extensión se puede reducir aproximadamente 10 veces. Tanto en la PCR larga como en la secuenciación del ciclo, el tiempo esperado requerido es inversamente proporcional a la concentración de polimerasa o cebadores, lo que sea limitante.

La PCR de fragmentos con enlazadores ligados que se utilizan como cebadores en preparación para la secuenciación paralela masiva se puede completar en mucho menos tiempo que la realizada actualmente combinando ciclado de temperatura extrema con concentraciones más altas de cebadores, polimerasa y/o  $Mg^{++}$ .

5 En todas las aplicaciones anteriores, se espera que la especificidad de la reacción se mantenga mediante tiempos de amplificación más cortos. Aunque los expertos en la materia esperan que las altas concentraciones de cebadores y polimerasa causen dificultades debido a la amplificación inespecífica, la minimización del tiempo de ciclo global y/o los tiempos de segmento individuales dan como resultado una alta especificidad y eficiencia de la PCR.

10



Tabla 2. Condiciones de PCR extrema para diferentes dianas

Diana	KONE1	KONE1	IRL10RB	IRL10RB	IRL10RB	IRL10RB	IRL10RB	IRL10RB	AK4P10	Sintética	Sintética	Sintética	Sintética	Sintética	Sintética	Sintética	Sintética
Tamaño de amplicón (pb)	45	45	49	49	49	58	102	60	100	Sintética	Sintética	Sintética	Sintética	Sintética	Sintética	Sintética	Sintética
Polimerasa	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1	KlenTaq1
[Polimerasa]	1	8	4	8	8	2	2	8	2	2	2	2	2	2	2	2	2
[Cebadores]	10	20	10	20	20	10	8	20	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Nº de ciclos	35	RT	35	35	35	39	30	35	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT	RT
Tiempo de ciclo (s)	0,8	0,91	0,73	0,45	0,45	0,97	1,93	0,42	1,9	3,9	4,9	5,9	7,9	7,9	7,9	7,9	3,9
Tiempo de PCR (s)	28	RT	26	16	16	38	58	14,7	RT	RT	98	RT	RT	RT	RT	RT	RT
Temp. del agua caliente (°C)	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5	95,5
Temp. del agua fría (°C)	20	58	30	30	30	30	72	59	76	76	76	76	76	76	76	76	76
Temp. del activador caliente (°C)	90	85	90	90	90	90	90	Tiempo	92	92	92	92	92	92	92	92	92
Temp. del activador frío (°C)	70	62	70	70	70	70	Tiempo	Tiempo	Tiempo	Tiempo	Tiempo	Tiempo	Tiempo	Tiempo	Tiempo	Tiempo	Tiempo
Desnaturalización (°C)	90	85	90	90	90	90	90	(82-85) w/TC	92	92	92	92	92	92	92	92	92
Híbrido/Ext. (°C)	60	60	65	65	65	65	72	60	76	76	76	76	76	76	76	76	76
Tiempo de Hibrid./Ext. (s)	0	0	0	0	0	0	1	0,1-0,4	0,5-3	1-5	4	1-7	3-9	3-11	3-11	1-5	1-5
Figura	9a	9a	5a	5a	5a	4c	7a	12a	11a	11b	10a, 11c	11c	11d	11e	11e	10b	10b
Tm	81	81	80	80	80	83	85	79	85	85	85	85	85	84	84	84	84
Mg ++	3	3	3	3	3	3	3	2-7	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Tiempo = el control de segmento basado en el tiempo no tiene un activador de temperatura RT = adquisición en tiempo real																	

**Tabla 3.** Obtención de las constantes de velocidad ( $k_1$  para la hibridación del cebador y  $k_2$  para la extensión de la polimerasa) utilizando A) intervalos históricos, B) la ecuación para la hibridación del cebador y C) la ecuación para la extensión de la polimerasa

A)	[Cebador] ( $\mu\text{M}$ )	[Polimerasa] ( $\mu\text{M}$ )	Velocidad de polimerasa (nt/s)	Longitud de extensión (pb)	Tiempo de ciclo (s)	Tiempo de Hibrid./Exten. (s)	[Mg <sup>++</sup> ]
Estándar	0,05-0,5	0,0026-0,026	10-45	20-980	120-480	15-60	1,5
Ciclo rápido	0,2-1,0	0,063	55-90	20-480	20-60	1-10	3
Extrema	1-16	0,5-8	50-100	20-280	0,5-5	<0,1-5	3-7
Extrema opt. nº1	10	2,50	60	29	0,73	<0,1	3
Extrema opt. nº2	4	0,50	60	82	1,93	1	3
Extrema opt. nº3	4	0,75	60	280	4,9	4	3

B) Si el tiempo de hibridación requerido =  $k_1/[\text{cebador}]$

	[Cebador] ( $\mu\text{M}$ )	Tiempo de Hibrid./Exten. (s)	$k_1$ (s * $\mu\text{M}$ )	Intervalo de $k_1$ (s* $\mu\text{M}$ )
Min. Estándar	0,05	15	0,75	Estándar 0,75-30
Máx. Estándar	0,5	60	30	Ciclo rápido 0,2-10
Min. Ciclo rápido	0,2	1	0,2	Extrema 1-20
Max. Ciclo rápido	1	10	10	
Extrema opt. nº1	10	0,1	1	
Extrema opt. nº2	4	1	4	
Extrema opt. nº3	4	5	20	

C) Si el tiempo de extensión requerido =  $k_2 \cdot \text{longitud de producto} / (\text{velocidad de polimerasa} \cdot [\text{polimerasa}])$

	[Polimerasa] ( $\mu\text{M}$ )	Velocidad de polimerasa (nt/s)	Longitud de extensión (pb)	Tiempo de Hibrid./Exten. (s)	$k_2$ (1/ $\mu\text{M}$ )
Extrema opt. nº1	2,5	60	29	0,1	0,52
Extrema opt. nº2	0,5	60	82	1	0,37
Extrema opt. nº3	0,75	60	280	4	0,64

- 5 Las condiciones específicas para PCR extrema se muestran en la tabla 2. Todos los datos se presentan a excepción de los experimentos de optimización simultánea para las concentraciones de polimerasa y cebadores para 3 de las dianas. En la tabla 3, se detallan las relaciones cuantitativas entre variables. La proporcionalidad inversa que relaciona el tiempo de hibridación requerido con la concentración de cebador es aproximadamente constante ( $k_1$ ) y está definida por la ecuación (Tiempo de hibridación requerido) =  $k_1/[\text{cebador}]$ . La utilización de un intervalo de
- 10 valores típicos para estas variables en condiciones de PCR tradicional (estándar), PCR de ciclo rápido y PCR extrema produce intervalos para la constante de proporcionalidad inversa que se superponen en gran medida (tradicional 0,75-30, ciclo rápido 0,2-10 y extrema 1-20). Debido a esta proporcionalidad inversa constante, los tiempos de hibridación deseados fuera de los que se realizan actualmente pueden utilizarse para predecir las concentraciones de cebador requeridas durante el tiempo deseado. Por ejemplo, utilizando una constante de 5
- 15 (s\* $\mu\text{M}$ ), para un tiempo de hibridación de 0,01 s, se puede calcular una concentración de cebador de 500  $\mu\text{M}$ . Por el

contrario, si se deseara una concentración de cebador de 0,01  $\mu\text{M}$ , el tiempo de hibridación requerido sería de 500 segundos. Aunque estas condiciones están fuera de los límites de la PCR tradicional y extrema, predicen una relación entre las concentraciones de cebadores y los tiempos de hibridación que son útiles para el éxito de la PCR. Los límites razonables para  $k_1$  a través de PCR tradicional, de ciclo rápido y extrema son 0,5-20 ( $\text{s} \times \mu\text{M}$ ), más preferentes 1-10 ( $\text{s} \times \mu\text{M}$ ) y los más preferentes 3-6 ( $\text{s} \times \mu\text{M}$ ).

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

La PCR extrema se puede realizar en cualquier tipo de recipiente, siempre que la temperatura de la muestra o las muestras se pueda cambiar rápidamente y, de manera preferente, de manera homogénea. En muchas aplicaciones es muy importante la homogeneidad dentro de la propia muestra y entre muestras diferentes, de manera ilustrativa, para una PCR cuantitativa, en la que diferentes eficiencias de la PCR de diferentes muestras se traducen directamente en errores de cuantificación. Además de los tubos y capilares estándar, las microgotas de reacciones acuosas suspendidas en una corriente de aceite o finas obleas bidimensionales proporcionan un buen contacto térmico. La PCR de flujo continuo de una corriente de muestra (ya sea dispersada como gotas, separada por burbujas u otros medios para evitar la mezcla) más allá de segmentos espaciales a diferentes temperaturas es un buen procedimiento para el control de la temperatura necesario para las velocidades de la PCR extrema. El calentamiento por inducción, tal como se describe en la Patente WO2015/069743, puede proporcionar procedimientos y dispositivos adecuados para la PCR extrema.

#### EJEMPLO 11

Aunque la PCR es un procedimiento fundamental en la investigación y el diagnóstico clínico para la detección y cuantificación de fragmentos de ADN específicos, el ARN no puede amplificarse directamente mediante la PCR. El ARN primero debe transcribirse de forma inversa en ADN. Habitualmente, esto se realiza enzimáticamente por enzimas denominadas "transcriptasas inversas". Las reacciones enzimáticas necesitan tiempo y una cantidad habitual de tiempo recomendada para la transcripción inversa es de 30 a 50 minutos (véase, por ejemplo, el prospecto del producto para la transcriptasa inversa Superscript II, MAN0001342, fecha de revisión: 20 de mayo de 2010, Invitrogen/Life Technology/ThermoFisher).

Existen muchas situaciones en las que una transcripción inversa (RT) rápida sería útil, por ejemplo, en el diagnóstico clínico en el punto de atención para virus de ARN, en el que un tiempo rápido para obtener resultados aumenta el valor de las pruebas y puede ser crítico para el paciente o en la amplificación de una cadena, doble cadena o múltiples cadenas de un transcrito de ARNm específico con o sin un gen de referencia. Tal como se ha descrito anteriormente, la PCR extrema es una tecnología capaz de amplificar el ADN en tan solo 15 segundos o menos. Sin embargo, la PCR en menos de un minuto no es tan útil cuando la transcripción inversa de un ARNm o ARN viral tarda 30 minutos o más. Sería deseable una RT-PCR más rápida y sería particularmente deseable tener un protocolo de RT-PCR de una etapa, en el que las etapas de RT y PCR tuvieran lugar en la misma mezcla de reacción.

En este ejemplo, se realiza una reacción de doble cadena de RT-PCR rápida de una etapa con el gen de referencia común ACTB. Dos transcritos humanos (AKAP10 y ACTB) se transcribieron de manera inversa y se amplificaron en una etapa con cebadores para AKAP10 (GCTTGGGAAGATTGCTAAATGATAGTCAGTG (SEQ ID NO: 25) y TTGATCATACTGAGCCTGCTGCATAA (SEQ ID NO: 26)) y ACTB (TTCCTGGGCATGGAGTC (SEQ ID NO: 28) y CAGGTCTTTGCGGATGC (SEQ ID NO: 29)). En las reacciones de 10  $\mu\text{l}$  se incluyeron 0,5  $\mu\text{M}$  de cada cebador, 60 ng de ARN total extraído de leucocitos de sangre humana, 300 unidades de transcriptasa inversa Superscript II

(ThermoFisher) y ditiotreitól 0,1 M en una solución maestra de PCR rápida (1X colorante LCGreen Plus, 0,2 µM de cada dNTP, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Tris 50 mM, pH 8,3, albúmina de suero bovino 25 ng/µl, 0,4 unidades de ADN polimerasa KlenTaq (AB peptides) y 64 ng de anticuerpo contra Taq (eEnzyme). Las muestras se colocaron en un tubo capilar LightCycler (Roche), se incubaron a 45 °C durante 5 minutos para la transcripción inversa y, a continuación, se ciclaron durante 40 ciclos entre 94 y 55 °C (sin mantenimientos) para la amplificación en tiempo real en un LightCycler en carrusel (figura 16a). A continuación, las muestras se fundieron en el LightCycler mediante desnaturalización momentánea a 95 °C, enfriamiento hasta 60 °C y, finalmente, obtención de fluorescencia mediante calentamiento hasta 95 °C a 0,2 °C/s (figuras 16b-16c). El pico a 79 °C es el amplicón AKAP10 y el pico a 83 °C es ACTB. Estos resultados muestran que se pueden utilizar tiempos de RT más rápidos, tiempos que son muy inferiores a 30 minutos (por ejemplo, 5 minutos) para amplificar el ARN, incluyendo las dianas de doble cadena.

## EJEMPLO 12

La consistencia y la calidad de la RT-PCR dependen de muchas cosas, que incluyen el tipo específico de enzima de RT (60). Habitualmente se utilizan dos tipos de enzimas de RT para la RT-PCR, una de un virus de leucemia de ratón (virus de la leucemia murina Maloney - MMLV) y otra de un virus de aves (virus del mieloblastoma aviar - AMV), aunque en la técnica se conocen otras enzimas de RT, y las variantes modificadas genéticamente de MMLV que tienen una actividad de ARNasa H más baja (o más elevada) y una mayor estabilidad a la temperatura están disponibles en el mercado. Bustin (60) probó la consistencia y el rendimiento de varias transcriptasas inversas, y determinó que una de las mejores enzimas es una MMLV comercializada como iScript (Bio-Rad).

Tal como se utiliza en el presente documento, una "unidad" de RT es la cantidad de enzima requerida para incorporar 1 nmol de dTTP en material precipitable con ácido en 10 minutos a 37 °C utilizando poli(rA)/oligo (dT)<sub>25</sub> como plantilla/cebador. El tampón utilizado para determinar la actividad en unidades de MMLV es Tris 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y DTT 10 mM (ditiotreitól). El tampón utilizado para determinar la actividad en unidades de AMV es acetato de potasio 75 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), acetato de magnesio 8 mM y DTT 10 mM. El número de unidades utilizadas para las reacciones de RT de MMLV (10 U/µl) es habitualmente 10 veces mayor que el de las reacciones de RT de AMV (1 U/µl). Las enzimas de RT utilizadas aquí incluyen: 1) MMLV nativo clonado (New England Biolabs), 2) Superscript II (un MMLV modificado con baja actividad de ARNasa H y estabilidad térmica aumentada, ThermoFisher), 3) iScript (un MMLV modificado con fuerte actividad de ARNasa H, Bio-Rad), 4) RocketScript (un MMLV modificado con actividad de ARNasa H aumentada y estabilidad térmica aumentada, Bioneer) y 5) AMV nativo clonado (New England Biolabs). Para la mayoría de estas enzimas, el fabricante indica claramente la definición de unidad y la concentración de enzima. Las excepciones son RocketScript, donde la actividad se determina mediante titulación frente a una enzima de actividad conocida, e iScript, donde el fabricante no describe la concentración utilizada. Sin embargo, incluso en el caso de iScript, el procedimiento sugerido (1 µl de enzima en un volumen de reacción de RT de 20 µl) es idéntico a los procedimientos de las otras enzimas de RT, lo que sugiere que la concentración de iScript es una solución madre de 200 U/µl, diluida a 10 U/µl en una reacción de RT, las concentraciones proporcionadas y sugeridas por los demás fabricantes.

El tiempo de incubación recomendado para MMLV iScript es de 30 minutos. Para estudiar la evolución temporal de la reacción de RT, se realizó una RT-PCR de dos etapas. Con este procedimiento de dos etapas, la RT se realizó por separado en tubos de microcentrífuga en un baño de agua durante diferentes períodos de tiempo y, a continuación, se realizó una PCR en tiempo real en un LightCycler capilar. La etapa de RT se realizó durante tiempos variables (de 1 minuto a 30 minutos) a 45 °C con el cebador inverso ACTB enumerado en el ejemplo 11. Se combinaron dos µl de MMLV iScript (presuntamente para una concentración final de 10 U/µl) con inhibidor de ARNasa con una mezcla de reacción que incluía hexámeros aleatorios, oligo (dT), estabilizadores, dNTP y un tampón no especificado. La mezcla de reacción de 40 µl incluía 256 ng de ARN total de leucocitos y el cebador inverso ACTB a 0,25 µM. Después de la incubación a 45 °C, la reacción se detuvo mediante calentamiento hasta 85 °C durante 5 minutos y la mezcla se diluyó 3 veces con agua. La qPCR se realizó como en el ejemplo 11, excepto que se utilizaron 2 µl de la plantilla de ADNc diluida y solo cebadores ACTB. Se utilizó el ciclo de cuantificación (Cq) de cada curva, en relación con el Cq del control de 30 minutos, para calcular las concentraciones relativas de ADNc de ACTB, suponiendo una eficacia de amplificación del 100 %. Los resultados se muestran en la figura 17. Aproximadamente el 60 % del ADNc se formó en los primeros 5 minutos, con un 80 % a los 10 minutos y un 100 % a los 20 minutos. Estudios adicionales que variaban el tiempo de incubación (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 30 minutos) y la concentración del cebador (0,125, 0,25, 0,5, 1 µM) mostraron que el aumento de la concentración del cebador compensa los tiempos de incubación más bajos. No fue posible estudiar tiempos más rápidos que 0,5 minutos con tubos de microcentrífuga debido al equilibrado lento de la temperatura.

Tal como se describió anteriormente, la PCR extrema combina un ciclado rápido de temperaturas con altas concentraciones de cebador y polimerasa para permitir la PCR en 2 minutos o menos. Los tiempos de hibridación se pueden reducir porque las altas concentraciones de cebador aceleran la reacción en proporción directa al aumento de la concentración de cebador. De manera similar, una concentración elevada de enzima debería acelerar de manera proporcional la etapa de extensión cuando la cantidad de enzima es limitante. La analogía con la RT sugiere que concentraciones más elevadas de cebador y enzima también podrían ayudar a acelerar las reacciones de RT. Sin embargo, es difícil combinar la etapa de RT y la etapa de PCR en una reacción con dos enzimas

diferentes. En general, no se cree que las condiciones de reacción de la transcriptasa inversa y la ADN polimerasa sean compatibles. Por ejemplo, se utiliza KCl en reacciones de RT, pero está ausente de la solución maestra de la PCR rápida del ejemplo 11 porque el KCl inhibe la actividad de la polimerasa en un 80 % con KCl 50 mM (61). Tal como se muestra a continuación, se cree que las concentraciones de KCl de 0 a 10 mM pueden ser apropiadas en una reacción de RT-PCR de una etapa. En general, se utilizan en RT concentraciones más elevadas de dNTP que las que se utilizan en PCR (0,5 - 1,0 mM para cada uno (RT) frente a 0,2 mM para cada uno (PCR)) y Mg<sup>++</sup> (3-15 mM (RT) frente a 1,5-5 mM (PCR)). Una solución a este problema es utilizar una enzima que tenga actividad tanto de transcriptasa inversa como de ADN polimerasa, tal como rTth, una ADN polimerasa recombinante estable al calor que también puede utilizar ARN como plantilla (62). Sin embargo, dichas enzimas tienen sus limitaciones y, por diversas razones, a menudo se prefiere la utilización de dos enzimas. Cuando dos enzimas se combinan en una reacción, deben encontrarse condiciones que funcionen con ambas enzimas. Las condiciones para la PCR extrema (tampón, [Mg<sup>++</sup>], sales, [dNTP], pH, [cebadores], [enzima]) pueden no funcionar para la RT y viceversa. Sin embargo, en el presente documento se presentan condiciones compatibles con la RT y la PCR, y la solución maestra de la PCR rápida del ejemplo 11 (a veces con suplementos de Mg<sup>++</sup> y ditiotritol) se utilizó en muchos de los ejemplos adicionales del presente documento, en lugar de la mezcla de reacción comercializada con iScript.

### EJEMPLO 13

El ARN tiene más estructura secundaria que el ADN, y se cree que una estructura secundaria fuerte inhibe la RT. El aumento de la temperatura es una forma de liberar la estructura secundaria en el ARN, de manera que sea más fácil de transcribir de forma inversa. Sin embargo, se cree que las enzimas RT utilizadas habitualmente son termolábiles, de manera que existe un límite en cuanto a cuánto se puede calentar la muestra para desplegar la estructura secundaria sin inactivar la transcriptasa inversa. Se esperaría que tiempos de reacción más cortos conservaran más del ácido nucleico generado para la PCR, limitando el tiempo de exposición a cualquier ARNasa y limitando la degradación química.

Utilizando un instrumento de PCR con baño de agua/motor paso a paso similar al que se muestra en la figura 1c, se realizó una RT-PCR de una etapa utilizando concentraciones de cebador 8 veces superiores a las normales en menos de 1 minuto. La RT-PCR de una etapa de 5 µl contenía 4 µM de cada cebador ACTB, 25 ng de ARN leucocitario total, 50 U de RT iScript (concentración final de 10 U/µl) similares al ejemplo 12, excepto que no se incluyeron hexámeros aleatorios ni poli(dT), y KlenTaq 2 µM, todo en la solución maestra de PCR rápida del ejemplo 11, con la excepción del anticuerpo contra Taq. Las muestras se incubaron en un baño de agua 310 fijado a 45, 47,5, 50 o 55 °C, cada uno durante 15, 20 o 24 segundos y, a continuación, se ciclaron entre 55 °C y 94 °C utilizando los baños de agua 313 y 314. Cada ciclo requirió 1,05 segundos e incluyó dos transferencias entre los baños de agua 313 y 314, requiriendo cada transferencia 125 ms y dos mantenimientos estacionarios de 400 ms en cada uno de los baños de agua 313 y 314, durante 35 ciclos. El tiempo total para la RT y la PCR para las muestras con 15 segundos de RT fue de 53 segundos. Todas las muestras parecían amplificarse por igual según lo medido mediante geles de agarosa (figura 18). Aunque no se describen los estabilizadores presentes en iScript, se cree que incluyen DTT.

### EJEMPLO 14

La trehalosa es un azúcar que se ha utilizado para termoestabilizar y termoactivar enzimas RT y puede utilizarse como potenciador de la PCR (63). El perfil de temperaturas de MMLV iScript con y sin trehalosa 0,6 M se midió mediante RT-PCR de dos etapas. Las condiciones fueron las mismas que en el ejemplo 13, excepto que la fuente de ARN fue una muestra de ARN total de referencia humana obtenida de múltiples tejidos (Stratagene) incluida a 5 ng/µl, y la incubación de la transcripción inversa fue durante 20 segundos a temperaturas de 42-69 °C. La RT se realizó en capilares en un baño de agua a temperaturas variables, con inactivación inmediata de la RT moviendo los capilares en 125 ms a un baño de agua a 85 °C durante 60 segundos. A continuación, las muestras se diluyeron y se transfirieron a un LightCycler capilar para qPCR, tal como se describe en el ejemplo 12. Los controles sin plantilla fueron negativos y las muestras se compararon con un control positivo con la acción de RT a 42 °C durante 30 minutos. Desde 55 hasta 63 °C en la etapa de RT, la trehalosa tuvo un efecto protector, aumentando la cantidad de producto medida mediante qPCR en un 20-40 % (figura 19a).

En un experimento similar, se comparó RT de MMLV iScript con RT de MMLV RocketScript (Bioneer). La configuración y el análisis fueron los mismos, excepto que la RT RocketScript se realizó en una reacción de 10 µl con 100 U de RT (concentración final de 10 U/µl), ditiotritol 10 mM, 0,25 mM de cada dNTP y 0,5 U de inhibidor de ARNasa. Se obtuvieron resultados muy similares (figura 19B) para las dos enzimas en el intervalo de temperaturas probado, lo que sugiere que estos mutantes de MMLV modificados genéticamente pueden ser enzimas iguales o similares. Ambos fabricantes afirman que sus mutantes de MMLV son más estables que la enzima nativa y tienen actividad de ARNasa H.

**EJEMPLO 15**

Utilizando trehalosa 0,6 M y 56 °C para la transcripción inversa, tal como se determina en el ejemplo 14, se estudiaron concentraciones de cebador de 1-8  $\mu$ M mediante RT-PCR de dos etapas. La transcripción inversa se realizó a 56 °C durante 20 o 60 segundos, siguiendo el procedimiento del ejemplo 14. Con 60 segundos de RT, la cantidad relativa aumentó mediante 4  $\mu$ M de cebador, a continuación, se estabilizó entre 4-8  $\mu$ M (figura 20). Con 20 segundos de RT, la cantidad relativa continuó aumentando a través del cebador 8  $\mu$ M, lo que sugiere que los tiempos más cortos pueden compensarse con concentraciones más elevadas del cebador de RT.

En otro grupo de experimentos utilizando la misma trehalosa 0,6 M, la incubación de RT durante 20 segundos a 56 °C con cebador inverso 6  $\mu$ M, la cantidad de enzima RT de MMLV iScript se varió de 10 U/ $\mu$ l (normal) a 40 U/ $\mu$ l. El Cq disminuyó a medida que aumentaba la concentración de enzima, lo que indica que, en estas condiciones, concentraciones más elevadas de enzima daban lugar a un mayor rendimiento de ADNc.

En experimentos adicionales utilizando trehalosa 0,6 M y las concentraciones más elevadas de RT (40 U/ $\mu$ l) y cebadores (6  $\mu$ M), los tiempos de RT de 0,5, 1, 2, 4, 8 y 16 segundos se compararon con 30 minutos a 42 °C. La PCR cuantitativa no reveló diferencias entre los tiempos de incubación de RT de 4, 8 y 16 segundos a 56 °C y el control de 30 minutos a 42 °C, lo que indica que, en estas condiciones, 4 segundos son suficientes para la RT-PCR del ARN total.

**EJEMPLO 16**

Los experimentos anteriores amplificaron transcritos de ARNm específicos a partir del ARN total. Otra aplicación muy común de la RT-PCR es la detección y cuantificación de virus de ARN. Por ejemplo, los ensayos de carga viral para el VIH y el VHC tienen una gran demanda, al igual que la detección de virus respiratorios, tales como el virus respiratorio sincitial (VRS).

Se realizó una amplificación mediante RT-PCR de una etapa del ARN del VRS en menos de 56 segundos. Se obtuvo ARN del VRS de la ATCC (American Type Culture Collection), catálogo nº VR-3233SD. Los cebadores del VRS fueron directo: TGGGCAAATATGTCACGAAG (SEQ ID NO: 30) e inverso: CCATTTAAGCAATGACCTCGAATTTCA (SEQ ID NO: 31), con una longitud de amplicón resultante de 63 pb. La transcripción inversa y la PCR se realizaron en 5  $\mu$ l con 6  $\mu$ M de cada cebador, RT iScript (40 U/ $\mu$ l), KlenTaq 2  $\mu$ M, trehalosa 0,6 M y 5.000, 500, 50 o 5 copias de ARN del VRS recién diluido en la solución maestra de la PCR rápida del ejemplo 11 con la excepción del anticuerpo contra Taq. La transcripción inversa se realizó durante 20 segundos a 56 °C, seguida de 35 ciclos de PCR, tal como se describe en el ejemplo 13. En la figura 21 se muestran geles de los productos de PCR (por triplicado) con diferentes números de copias de la plantilla inicial. Se observan bandas intensas de cebadores y productos en los carriles izquierdos con 5.000 y 500 copias iniciales de la plantilla. Las bandas del producto están ligeramente disminuidas a las 50 copias y son definitivamente menos intensas a las 5 copias iniciales, demostrando una sensibilidad, como mínimo, de hasta 5 copias. Puede ser posible detectar copias individuales utilizando este protocolo ilustrativo de RT-PCR de una etapa.

**EJEMPLO 17**

Se realizó una amplificación mediante RT-PCR de una etapa del ARN de VRS con incubaciones de transcripción inversa de menos de un segundo. La RT-PCR se realizó como en el ejemplo 16, con 5.000 copias de la plantilla inicial del ARN de VRS. Todas las soluciones se mezclaron en hielo para limitar cualquier transcripción inversa antes del inicio de la reacción a 56 °C. El tiempo de RT a 56 °C se varió desde 20 segundos hasta menos de 1 segundo. El período de tiempo más corto, marcado como "10 ms", indica el tiempo en el baño de agua a 56 °C cuando el capilar estaba estacionario. Es posible que el tiempo que incluye la transición dentro y fuera del baño de agua y el mantenimiento estacionario de 10 ms no haya sido una exposición adecuada a 56 °C para que la muestra alcance la temperatura. De manera sorprendente, todas las muestras mostraron productos de PCR específicos fuertes con tiempos de RT de 20, 10, 5, 2, 1 segundos y "10 ms", mientras que el CSP (control sin plantilla) permaneció negativo (figura 22). La monitorización en tiempo real de la muestra con una etapa de RT de 5 segundos se muestra en la figura 23.

Para investigar más a fondo, se compararon tiempos muy cortos para incubaciones de RT de 5, 1 y 0 segundos, donde la incubación de "0 s" evitó el baño de agua a 56 °C. Es decir, la muestra preparada se amplificó directamente mediante PCR extrema sin una incubación de RT a una temperatura determinada. Todas las reacciones se ensamblaron en hielo y se realizó la breve centrifugación final (20 segundos) en una centrífuga regulada a 2 °C. Un grupo de muestras se procesó inmediatamente mediante PCR extrema y el otro grupo se dejó a temperatura ambiente durante 60 segundos para simular menos cuidado en el mantenimiento de una temperatura fría durante la preparación. Los resultados mostraron controles negativos sin plantilla y sin RT, con bandas fuertes en todos los tiempos y condiciones (figura 24). De izquierda a derecha, los controles negativos son los dos carriles de la izquierda, los siguientes tres carriles son las muestras preparadas en frío con una incubación de 0, 1 y 5 segundos a

56 °C, y los últimos tres carriles son los carriles a temperatura ambiente de 1 minuto con una incubación de 0, 1 y 5 segundos.

#### EJEMPLO 18

Se examinó adicionalmente el efecto de la trehalosa y la sacarosa sobre la RT. Utilizando las condiciones del ejemplo 17, se probaron incubaciones de RT de 1, 2, 5 y 10 segundos con y sin trehalosa 0,6 M con ARN de VRS a 5.000 copias por reacción y 45 ciclos de PCR de una etapa. Los resultados se muestran en la figura 25. En la figura 25, el grupo de trehalosa está a la izquierda, con (de izquierda a derecha) el control sin plantilla, blanco, 1, 2, 5 y 10 segundos de incubación, seguido del grupo sin trehalosa en el mismo orden. Aunque el gel se toma en el punto final, parece que la trehalosa aumenta el rendimiento final. Cuando se comparó la trehalosa con la sacarosa a 0,2, 0,4 y 0,6 M de sacarosa, todas las muestras se amplificaron bien, indicando un análisis de fusión que la sacarosa 0,4 M produjo el mayor rendimiento (datos no mostrados). La sacarosa parece ser tan buena o mejor que la trehalosa, lo que sugiere que otros azúcares, que incluyen glucosa y fructosa, pueden tener efectos similares. También se pueden utilizar otros estabilizadores.

#### EJEMPLO 19

La RT de AMV de New England Biolabs es una RT nativa clonada que habitualmente se ejecuta a 42 °C en presencia de un agente reductor, tal como ditiotreitól (10-250 mM), concentraciones elevadas de  $Mg^{++}$  (8-13 mM) y concentración elevada de KCl (75 mM). El tampón del fabricante (concentración final en la reacción) fue: Tris 50 mM, pH 8,3, acetato de K 75 mM, acetato de Mg 8 mM y DTT 10 mM. Esta mezcla se complementó con BSA (concentración final en la reacción de 500 µg/ml) para la compatibilidad con tubos capilares de vidrio. Este tampón se comparó con la solución maestra de la PCR rápida del ejemplo 11 complementada con DTT 10 mM y  $Mg^{++}$  10 mM ( $Mg^{++}$  13 mM total) en la reacción final. La principal diferencia entre los dos tampones es que no había  $K^+$  en la mezcla de la PCR rápida, mientras que el tampón del fabricante incluía  $K^+$  75 mM. La presencia de iones de potasio se ha considerado previamente crítica para las reacciones de RT (64). Se realizaron reacciones de RT-PCR de dos etapas. A cada tampón, se añadieron 250 copias de ARN de VRS/µl, RT de AMV 2,5 U/µl y cebador inverso de VRS 15 µM y se realizó la RT a 42 °C durante 1 segundo, 5 segundos, 20 segundos, 1 minuto o 10 minutos. Después de la RT, la transcriptasa inversa se inactivó a 93 °C durante 60 segundos, se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó 1:10 para PCR en un LightCycler capilar. Cada PCR de 10 µl incluía cebadores de VRS 0,5 µM y 2 µl de ADNc 1:10 en la solución maestra de PCR rápida. La PCR en tiempo real se realizó ciclando durante 45 ciclos entre 94 y 55 °C (sin mantenimientos). A continuación, las muestras se fundieron en el LightCycler mediante desnaturalización momentánea a 95 °C, enfriamiento hasta 60 °C y, finalmente, obtención de fluorescencia mediante calentamiento hasta 95 °C a 0,2 °C.

Los resultados en tiempo real, las curvas de fusión y el análisis de gel revelaron que todas las reacciones amplificaron un único producto con una  $T_m$  de 79 °C. Se observaron resultados similares a lo largo del tiempo (1 segundo, 2 segundos, 20 segundos, 1 minuto, 20 minutos) para cada tampón (datos no mostrados). Sin embargo, todas las amplificaciones en el tampón comercial (que incluía  $K^+$  75 mM) se retrasaron un promedio de 4,6 ciclos en comparación con las amplificaciones realizadas en la solución maestra de la PCR rápida complementada. Es decir, los ciclos de cuantificación ( $C_q$ ) en la solución de PCR rápida sin  $K^+$  fueron 4,6 ciclos menos que los  $C_q$  en el tampón comercial, lo que sugiere una inhibición severa de la PCR por  $K^+$ , a pesar de su supuesta necesidad en la reacción de RT.

A continuación, se realizó una RT-PCR de una etapa con AMV a 42 °C para estudiar los efectos del tiempo de RT y la concentración de  $Mg^{++}$ . Se incluyó  $Mg^{++}$  a 3, 6, 10 y 13 mM, cada uno con tiempos de RT de 1, 2, 5 y 10 segundos. La reacción de una etapa incluyó la solución maestra de la PCR rápida del ejemplo 11 (sin anticuerpo contra Taq), 2,5 U/µl de RT de AMV, 250 copias/µl de ARN de VRS, 4 µM de cada cebador de VRS y DTT 10 mM. Las condiciones de ciclado fueron como en el ejemplo 13. Los resultados se muestran en la figura 26. Los paneles incluyen  $MgCl_2$  a 3 (arriba a la izquierda), 6 (arriba a la derecha), 10 (abajo a la izquierda) y 13 (abajo a la derecha) mM. Dentro de cada panel, los tiempos de RT fueron de 1, 2, 5 y 10 segundos, de izquierda a derecha. No se observó producto para RT de AMV a  $MgCl_2$  3 mM, se observaron productos de intensidad variable con  $MgCl_2$  6 y 10 mM sin ninguna tendencia clara para el tiempo de incubación de RT, y se observaron bandas intensas en todos los tiempos de RT para  $MgCl_2$  13 mM. Se produjo una amplificación excelente con  $MgCl_2$  13 mM, incluso en ausencia total de  $K^+$ , contrariamente a las expectativas de la técnica anterior que sugiere que no hay amplificación sin  $K^+$ . De este modo, se pueden obtener buenos resultados utilizando un protocolo de RT-PCR de una etapa, en el que la mezcla de reacción está sustancialmente libre de potasio.

#### EJEMPLO 20

Se comparó el MMLV nativo de NEB con el MMLV modificado genéticamente iScript de Bio-Rad. El fabricante de iScript afirma que tiene una mayor actividad de ARNasa H y una mayor estabilidad al calor. Los estudios iniciales utilizando la solución maestra de PCR rápida del ejemplo 11 con ARN de VRS y 5 segundos de RT a 56 °C en trehalosa 0,6 M mostraron buenas curvas de fusión específicas cuando se utilizó iScript (10 U/µl), pero no hubo

amplificación con MMLV nativo ( 2,5 U/μl). Se encontraron resultados similares cuando cada enzima se incrementó 4 veces. Finalmente, la temperatura de RT se redujo a 37, 42 o 47 °C con una etapa de RT de 20 segundos. Los resultados fueron los mismos con iScript mostrando una buena amplificación, pero el MMLV nativo no mostró amplificación. Las reacciones no contenían ni DTT ni K+.

Se realizó un experimento de dos etapas similar al del ejemplo 19 con 2 tampones diferentes, uno basado en el tampón del fabricante (Tris 50 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, KCl 75 mM y DTT 10 mM) complementado con BSA (500 μg/ml) y dNTP (500 μM cada uno) y el otro basado en la solución maestra de la PCR rápida del ejemplo 11 (Tris 50 mM, pH 8,3, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, 200 μM de cada dNTP y BSA 250 μg/ml) complementado con DTT 10 μM y KCl 75 mM. En lugar de AMV, se utilizaron 20 U/μl de MMLV en cada reacción, así como cebador de VRS inverso 6 μM. Cada reacción también incluyó 250 copias de ARN de VRS/μl. Tanto el DTT como el KCl estaban presentes en ambos tampones a la misma concentración, aunque hubo ligeras diferencias en las concentraciones de dNTP y BSA que no se esperaba que afectaran a los resultados. La RT se realizó a 42 °C durante 1 segundo, 10 segundos, 1 minuto o 10 minutos. Después de la RT, la transcriptasa inversa se inactivó a 93 °C durante 60 segundos, se enfrió hasta temperatura ambiente y se diluyó 1:20 para PCR en un LightCycler capilar. Cada PCR de 10 μl incluía cebadores de VRS 0,5 μM y 2 μl de ADNc 1:20 en la solución maestra de la PCR rápida del ejemplo 11. La PCR en tiempo real y la fusión se realizaron como en el procedimiento de dos etapas detallado en el ejemplo 19.

Todos los puntos de tiempo de ambos tampones revelaron curvas de fusión específicas y se amplificaron con Cq dentro de 3 ciclos entre sí. Sin embargo, el Cq promedio (29,4) estaba muy retrasado en comparación con las muestras del ejemplo 19 que no incluían KCl (Cq promedio = 20), lo que sugiere una fuerte inhibición de la RT-PCR con K+. Sin estar ligado a la teoría, se cree que el KCl es la causa de la inhibición durante la PCR.

Para demostrar la inhibición con KCl, se realizó una RT-PCR de una etapa con KCl 0, 10, 20, 40 y 75 mM con una etapa de RT a 42 °C que duró 1, 5 o 10 segundos. A la solución maestra de la PCR rápida se incluyeron 250 copias/μl de ARN de VRS, 20 U/μl de MMLV, 4 μM de cada cebador de VRS, DTT 10 mM y 2 μM de KlenTaq, junto con concentraciones variables de KCl. La amplificación se realizó como en el protocolo de una etapa del ejemplo 19. Los geles de agarosa se muestran en la figura 27 para tiempos de RT de 1 (arriba a la izquierda), 5 (arriba a la derecha) y 10 (abajo a la izquierda) segundos, con concentraciones crecientes de KCl dentro de cada panel. Se produjo una fuerte amplificación a los tiempos de 1, 5 o 10 segundos con KCl 0 mM. Las bandas resultantes de las reacciones con KCl 10 y 20 mM fueron más débiles que con KCl 0 mM, pero aumentaron con el aumento de los tiempos de incubación de RT. No se observó amplificación con KCl 40 o 75 mM.

El DTT es un poderoso agente reductor de sulfhidrilo requerido por algunas enzimas que tienen grupos sulfhidrilo libres. Se realizó una RT-PCR de una etapa similar al párrafo anterior con DTT 0, 10 o 38 mM y KCl 0 o 40 mM con una incubación de RT de 1, 5 o 10 segundos a 42 °C. Los resultados (figura 28) muestran paneles de 1 segundo (arriba a la izquierda), 5 segundos (arriba a la derecha) y 10 segundos (abajo a la izquierda) con los diferentes tratamientos de DTT/KCl de izquierda a derecha (KCl 0 mM/DTT 0 mM, KCl 0 mM/DTT 10 mM, KCl 0 mM/DTT 38 mM, KCl 40 mM/DTT 0 mM, KCl 40 mM/DTT 10 mM y KCl 40 mM/DTT 38 mM). Cuando no se añaden ni DTT ni KCl, no suele producirse la amplificación, aunque el panel de 5 segundos muestra una banda débil. El efecto activador del DTT se observa claramente en todos los paneles con distintas bandas de DTT 10 mM que son aún más brillantes a 38 mM. Siempre que esté presente KCl a 40 mM, no hay amplificación visible, incluso cuando hay DTT presente. Estos datos indican que el DTT activa y el KCl suprime la amplificación por RT-PCR. Otros agentes reductores, de manera ilustrativa el beta-mercaptoetanol y otros, también pueden activar la amplificación.

## EJEMPLO 21

Cuando los productos de PCR se analizan mediante geles o análisis de fusión después de 45 ciclos de PCR extrema (figuras 21, 22, 24 y 25), se pierde la mayor parte de la información cuantitativa. Aunque las bandas de gel pueden parecer iguales después de una serie de tiempos de transcripción inversa (RT), esto puede deberse a concentraciones limitantes de los componentes de la PCR que pueden igualar cualquier diferencia cuantitativa entre muestras. Para obtener resultados cuantitativos, la PCR en tiempo real suele ser mucho mejor que los geles o el análisis de fusión. El ciclo de cuantificación (Cq) que se deriva de cada curva en tiempo real es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración de plantilla inicial. Por lo tanto, un Cq bajo indica una cantidad elevada de plantilla inicial, que, en la transcripción inversa, es equivalente a la cantidad de ADNc generado por la reacción de transcripción inversa.

Se tituló el MMLV nativo clonado de New England Biolabs para examinar el número de unidades necesarias para maximizar la amplificación mediante RT-PCR, tal como indica el valor de Cq más bajo. El protocolo del fabricante sugiere 10 unidades/μl de MMLV para la reacción de RT. Sin embargo, los resultados iniciales sugirieron que las cantidades más bajas eran óptimas en la RT-PCR extrema de una etapa, por lo que se examinaron 5, 2,5, 1,25, 0,625 y 0,313 unidades/μl con tiempos de incubación de RT variables (2,5, 5, 10, 20, 40, y 80 segundos) a 45 °C.

Se realizaron reacciones de RT-PCR de una etapa con ARN de VRS obtenido de ATCC, catálogo n° VR-26D. Los cebadores de VRS fueron TGGGCAATATGTCACGAAG (SEQ ID NO: 30) y CCATTTAAGCAATGACCTCGA (SEQ



ID NO: 31). La transcripción inversa y la PCR se realizaron en capilares de vidrio en un volumen de 5 µl con 5 µM de cada cebador y una solución maestra para la PCR extrema (1X colorante LCGreen Plus, 0,2 µM de cada dNTP, Tris 50 mM (pH 8,3), ADN polimerasa KlenTaq 1,65 µM y albúmina de suero bovino 25 ng/µl) con MgCl<sub>2</sub> 3,8 mM. Cada muestra positiva incluía 6000 copias de plantilla VRS en 5 µl. Las muestras negativas no incluían plantilla (controles sin plantilla).

Todas las soluciones se mezclaron en hielo para restringir cualquier actividad enzimática antes del comienzo de la reacción. La temperatura de las muestras se controló con el sistema de 3 baños de agua (figura 1c), primero transfiriendo las muestras a un baño de agua a la temperatura de RT deseada durante el tiempo deseado y, a continuación, alternando entre los otros 2 baños de agua establecidos a 95 °C y 55 °C con mantenimientos de 400 ms en cada baño de agua. Las muestras se ciclaron 33 veces con monitorización de la fluorescencia en cada ciclo, lo que llevó aproximadamente 30 segundos para completar la PCR.

Los resultados mostraron una disminución menor en Cq (<2 ciclos) con tiempos de RT crecientes (figura 29). Sin embargo, en el tiempo más corto (2,5 segundos), concentraciones elevadas de MMLV inhibieron fuertemente (hasta 10 ciclos) la reacción general. A los 2,5 segundos, 1,25 U/µl parecían óptimas, una disminución de 8 veces de la concentración recomendada de 10 U/µl. Con el objetivo de reducir el tiempo total para la RT-PCR, 2,5 segundos es poco en comparación con el tiempo de la PCR de aproximadamente 30 segundos, contribuyendo solo con <10 % del tiempo total. Es preferente que el tiempo de RT sea inferior al 50 % del tiempo total en la RT-PCR extrema, de manera más preferente, que sea inferior al 20 % del tiempo total y, de la manera más preferente, que sea inferior al 10 % del tiempo total. El tiempo de RT más corto minimiza la degradación del ARN a temperaturas elevadas y concentraciones de magnesio elevadas. Para productos más largos, tanto el tiempo de RT como el de PCR pueden incrementarse de manera proporcional. Además, la cantidad de transcriptasa inversa se puede aumentar de manera proporcional a medida que aumenta la longitud del producto deseado, pero en las longitudes pequeñas utilizadas aquí, son óptimas cantidades más bajas de RT. Se ha descrito que la transcriptasa inversa inhibe las ADN polimerasas, tal como la polimerasa Taq, otra razón para limitar la concentración de RT en las reacciones de RT-PCR de una etapa.

## EJEMPLO 22

Se diluyó AMV en la forma nativa clonada (NEB) para determinar la concentración óptima determinada mediante valores bajos de Cq. La concentración recomendada de AMV en la RT-PCR por el fabricante es de 1,25 U/µl. Sin embargo, los experimentos iniciales indicaron que las concentraciones óptimas eran más bajas. Las reacciones se probaron a concentraciones de AMV de 1,25, 0,63, 0,31, 0,156, 0,078 y 0,039 U/µl.

Se realizaron reacciones de RT-PCR de una etapa con ARN de VRS como en el ejemplo 21, excepto que se utilizó AMV (a las concentraciones anteriores) con MgCl<sub>2</sub> 8 mM y la reacción de RT se produjo durante 2 segundos a 48 °C. Las muestras se analizaron por triplicado a cada concentración de AMV.

El AMV tuvo mejor comportamiento a una concentración de 0,31 U/µl, 4 veces menor que la concentración recomendada de 1,25 U/µl (figura 30), aunque se pueden utilizar cantidades mayores, de manera ilustrativa 0,5, 0,8 y 1,0 unidades/µl, en particular para amplicones más grandes. La figura 31 combina los resultados de los ejemplos 21 y 22, con las concentraciones recomendadas por el fabricante indicadas.

## EJEMPLO 23

Se analizó la RT-PCR extrema de una etapa utilizando MMLV en un intervalo de temperaturas (37, 42, 45 y 48 °C) y tiempos de mantenimiento (2,5, 5, 10, 20, 40 y 80 segundos) para la etapa de RT. La RT-PCR siguió el ejemplo 21, excepto que la concentración de MgCl<sub>2</sub> fue de 7,4 mM y se utilizó MMLV 1,25 U/µl. En general, el Cq disminuía a medida que aumentaba el tiempo de RT, aunque no siempre (figura 32). Además, no se pudo determinar una temperatura óptima para MMLV.

Seleccionando un tiempo de RT de 2 segundos, se probó AMV en un intervalo de temperaturas (39, 42, 45, 48, 51, 54 y 57 °C) utilizando Cq como una medida de la cantidad de ADNc generado. Se siguió el procedimiento del ejemplo 22 con 0,31 U/µl de AMV. Las mediciones por triplicado mostraron mucha variación (figura 33), lo que dificulta identificar la mejor temperatura. El Cq promedio más bajo fue de 45 °C, la cual es también la temperatura recomendada por el fabricante para RT utilizando AMV. La figura 34 combina los datos de MMLV y AMV. Las temperaturas óptimas no son evidentes. De hecho, aparece una actividad de RT similar en un amplio intervalo de temperaturas.

## EJEMPLO 24

Debido al potencial catalítico del magnesio para reducir los tiempos de reacción, se estudiaron las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> con MMLV y AMV. Se realizó una RT-PCR de una etapa con VRS, tal como se ha descrito anteriormente

(ejemplos 21 y 22). Todas las muestras se trataron con una RT a 45 °C mantenida durante 2 segundos (AMV) o 2 y 5 segundos (MMLV), seguido inmediatamente de una amplificación por PCR durante 33 ciclos.

Las muestras incluían plantilla de VRS y AMV a 0,31 U/μl en 1X tampón de PCR como en el ejemplo 22. La concentración de MgCl<sub>2</sub> se analizó en incrementos variables entre 3 mM y 20 mM. El valor de C<sub>q</sub> más bajo se midió a 11 mM (figura 35). Las reacciones con menos de 11 mM de MgCl<sub>2</sub> rápidamente se volvieron menos eficaces, mientras que el C<sub>q</sub> solo aumentó lentamente entre 11 y 20 mM.

Las muestras de RT-PCR de una etapa que contenían MMLV se realizaron con 1X tampón de PCR (ejemplo 21) y 1,25 unidades/μl de RT. Se tituló MgCl<sub>2</sub> entre 2 mM y 15 mM para determinar la concentración óptima. En este caso, se estudiaron tiempos de RT de 2 y 5 segundos. El C<sub>q</sub> más bajo se encontró entre 8 y 11 mM de MgCl<sub>2</sub>, dependiendo del tiempo de RT (figura 36), aunque entre 6 y 12 mM, el MgCl<sub>2</sub> era eficaz. El C<sub>q</sub> aumentó aproximadamente 1 ciclo pasando de 5 segundos a 2 segundos de tiempo de RT. Ambas enzimas se comparan en la figura 37 con tiempos de RT de 2 segundos. MMLV fue más activo que AMV en todas las concentraciones de Mg<sup>++</sup>.

### EJEMPLO 25

El restablecimiento del mantenimiento de RT crítico mínimo necesario para la RT-PCR de una etapa se realizó en condiciones de reacción de AMV y MMLV determinadas en los ejemplos anteriores. Habiendo optimizado la mayoría de la reacción de RT-PCR para AMV y MMLV, se analizó nuevamente el efecto del tiempo de mantenimiento de RT sobre C<sub>q</sub>. Ambas reacciones de transcriptasa inversa se realizaron con una temperatura de RT de 45 °C y ciclando 33 veces entre 95 °C y 55 °C.

Las reacciones de MMLV contenían 1,25 U/μl de enzima, 1X tampón de PCR (ejemplo 21) y MgCl<sub>2</sub> 7,4 mM. Los resultados se muestran por duplicado en la figura 38 con un eje X logarítmico. Hay una gran caída de C<sub>q</sub> entre 1 y 2 segundos y una diferencia de menos de 1 ciclo entre 2 y 40 segundos. La mayoría del ADNc parece estar producido dentro de los primeros segundos de RT.

Las reacciones de AMV contenían 0,31 U/μl de enzima, 1X tampón de PCR y MgCl<sub>2</sub> 11 mM. Los resultados se muestran por triplicado en la figura 39 con un eje X logarítmico. Una vez más, la mayor parte de la caída de C<sub>q</sub> aparece a los 2 segundos, lo que sugiere que, en estas condiciones, la mayor parte del ADNc parece producirse en los primeros segundos de RT.

Los datos combinados de MMLV y AMV se muestran en la figura 40. Aunque todavía se genera algo de ADNc sin un mantenimiento de RT, aumentar el tiempo de mantenimiento a 2 segundos estimula sustancialmente la síntesis de ADNc, con solo ganancias menores a partir de entonces. Nuevamente, MMLV parece más eficaz que AMV en la generación de ADNc en la mayoría de los puntos de tiempo. La capacidad de realizar la transcripción inversa en 2 segundos o menos reduce de manera significativa los tiempos de reacción de la RT, lo que es especialmente útil en la PCR de una sola etapa, en la que no es necesario añadir reactivos, lo que es particularmente útil en las pruebas de diagnóstico.

### EJEMPLO 26

La sensibilidad de la RT-PCR de una etapa en condiciones extremas con concentraciones aumentadas de cebador y polimerasa puede verse limitada debido a la baja especificidad. Dependiendo de la diana, se puede observar una amplificación aparente de los controles sin plantilla, con poca diferencia en el C<sub>q</sub> entre los controles sin plantilla y muestras positivas con un bajo número de copias. Además, los dímeros de cebadores generados en dichas reacciones pueden fundirse a la temperatura de fusión específica del producto o próxima a la misma, lo que hace que sea difícil distinguir los dímeros de cebadores del producto deseado. Para mitigar estos efectos, se consideraron técnicas de inicio en caliente. Las polimerasas, los cebadores y los dNTP activados por calor están disponibles en el mercado, pero todos tardan unos minutos en activarse, más tiempo que el tiempo necesario para la RT-PCR extrema, y estas técnicas de inicio en caliente pueden reducir gran parte del valor del procedimiento. Los anticuerpos contra las polimerasas también están disponibles, pero la cantidad de anticuerpo necesaria y el coste son elevados cuando la concentración de polimerasa aumenta entre 10 y 20 veces, como en la PCR extrema. Otra opción es mezclar los componentes dentro de un instrumento que mantiene las soluciones a una temperatura elevada durante la mezcla, tal como FilmArray (BioFire Diagnostics, LLC). La temperatura elevada reduce o elimina la unión del cebador antes del inicio de la reacción, pero esto requiere un instrumento especializado que puede no ser necesario para muchas aplicaciones.

Cuando todos los componentes de la RT-PCR están presentes, puede tener lugar una amplificación no específica de la plantilla o una amplificación sin plantilla (dímero del cebador) a temperatura ambiente durante la preparación. Por lo tanto, los componentes críticos de la reacción, como la polimerasa o los dNTP, en general, se retienen de la mezcla de reacción durante la preparación durante el mayor tiempo posible. La formación de dímeros de cebadores tiene lugar más fácilmente con altas concentraciones de cebador y polimerasa que se encuentran en la PCR

extrema. Sin embargo, los dímeros de cebadores no se producen cuando solo se expone un cebador a una polimerasa; son necesarios dos cebadores diferentes para la formación de dímeros de cebadores (65). El trabajo de los presentes inventores demuestra que la formación de dímeros de cebadores en la RT-PCR extrema se puede reducir separando los cebadores en dos semirreacciones que se mezclan inmediatamente antes de la RT. El Cq de las reacciones de control sin plantilla fue más elevado (mejor especificidad y, por tanto, mejor sensibilidad) cuando los cebadores se separaron en dos semirreacciones hasta justo antes de la RT-PCR que cuando se prepararon juntos.

Los dímeros de cebadores también se pueden reducir o prevenir manteniendo frías las reacciones completamente mezcladas y limitando la cantidad de tiempo después de mezclar antes de la RT-PCR. Por ejemplo, se ha descubierto que mantener las muestras en hielo después de mezclarlas y centrifugarlas en frío antes de la PCR aumentaba los Cq de los controles sin plantilla. En general, se pueden obtener mejores resultados minimizando tanto el tiempo como la temperatura después de la mezcla final, pero antes de la RT-PCR. Además, el aumento rápido de la temperatura desde la temperatura de mezclado (de manera ilustrativa, de 0 a 25 °C) hasta la temperatura de RT (de 37 a 90 °C) reduce la formación de dímeros de cebadores. El cambio de temperatura después de la mezcla hasta la temperatura de RT se puede realizar, de manera ilustrativa, en menos de un segundo, de manera más ilustrativa, en menos de 0,5 segundos y, de la manera más ilustrativa, en menos de 200 ms. A diferencia de otros estudios, el trabajo de los presentes inventores muestra que a tiempos de RT cortos, existe un intervalo amplio de temperaturas de RT aceptables.

Además, cuando tanto una polimerasa, tal como KlenTaq, como una transcriptasa inversa, están presentes en el mismo tubo de reacción, puede tener lugar la inhibición de la PCR (66-68). El trabajo de los presentes inventores muestra que la separación de la polimerasa dirigida por ADN (por ejemplo, KlenTaq) y la polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa) en las dos semirreacciones separadas también reduce los dímeros de cebadores, tal como se pone de manifiesto con el aumento en la delta Cq, la diferencia en Cq entre las amplificaciones del control positivo y el control negativo. Experimentos adicionales han mostrado mejores resultados cuando la semirreacción que contiene la transcriptasa inversa contiene el cebador inverso, es decir, el cebador que puede hibridarse con cualquier plantilla presente y extender el cebador si dNTP y Mg<sup>++</sup> están presentes.

En resumen, el control de los dímeros de cebadores se obtuvo mediante la separación de la preparación de RT-PCR de una etapa en dos semirreacciones. En una realización, la primera semirreacción contiene la polimerasa dirigida por ADN (por ejemplo, KlenTaq), el cebador que no se hibrida con la plantilla (el cebador directo) y 1X tampón (por ejemplo, Tris, BSA y 1X colorante fluorescente, por ejemplo, LCGreen plus). La segunda semirreacción contiene la transcriptasa inversa, el cebador que se hibrida con la plantilla (el cebador inverso), 1X tampón, Mg<sup>++</sup>, dNTP y plantilla). Después de mezclar, la solución se mantiene lo más fría posible (de manera ilustrativa <25 °C, de manera más ilustrativa, <5 °C y, de la manera aún más ilustrativa, <2) durante el menor tiempo posible (de manera ilustrativa <60 segundos, de manera más ilustrativa, <30 segundos y, de manera aún más ilustrativa, <10 segundos) antes de la reacción de RT y se elevó lo más rápido posible hasta la temperatura de RT (de manera ilustrativa <1 segundo, de manera más ilustrativa, <500 ms y, de manera aún más ilustrativa, <200 ms).

Una RT-PCR de una etapa de ejemplo incluía componentes separados en una primera semirreacción congelada y una segunda semirreacción enfriada (pero líquida). Las dos partes de las semirreacciones se combinaron inmediatamente antes de ejecutar la RT-PCR de una etapa, en lo sucesivo denominada técnica de congelación ("glaciate").

La demostración de la técnica de congelación utilizó ARN de VRS obtenido de la ATCC, catálogo nº VR-26D. Los cebadores de VRS fueron directo: TGGGCAAATATGTCACGAAG (SEQ ID NO: 30) e inverso: CCATTAAAGCAATGACCTCGA (SEQ ID NO: 31). Las dos semirreacciones contenían 1X colorante LCGreen Plus, Tris 50 mM (pH 8,3) y albúmina de suero bovino 25 ng/μl. Trabajando en hielo, la semirreacción a congelar contenía, además, 0,2 mM de cada dNTP, KlenTaq 3,2 mM y cebador directo 10 μM. Se pipetearon dos μl y medio de esta muestra en cada capilar de vidrio y se centrifugaron brevemente (<5 segundos) y se congelaron a -20 °C durante un mínimo de 20 minutos.

Aunque la parte congelada de la reacción estuvo en el congelador a -20 °C, la parte enfriada se preparó en hielo. La parte enfriada incluía cebador inverso 10 μM, MgCl<sub>2</sub> 12 mM, MMLV 2,5 unidades/μl y 2400 copias/μl de VRS. No se añadió MMLV a la solución enfriada hasta justo antes de la adición a los capilares congelados. Se sacaron del congelador dos o tres capilares de reacción congelados y se colocaron inmediatamente en un baño de agua con hielo. A continuación, se pipeteó la adición de 2,5 μl de la solución enfriada en la parte superior de cada capilar y se pulsó rápidamente en una centrífuga de mesa (<3 segundos) y se volvió a colocar rápidamente en el baño de hielo. A continuación, se realizó la RT-PCR con un mantenimiento de la RT de 2 segundos a 50 °C y se cicló 45 veces entre 95 °C y 55 °C.

Este mismo experimento también se realizó con ARN del virus Zika inactivado obtenido de la ATCC (catálogo nº VR-1838DQ). El cebador directo de Zika fue CAGGTTGGAGTGGGAGTCAT (SEQ ID NO: 32) y el cebador inverso fue

TTTGTAACGTGCCACATGGT (SEQ ID NO: 33). Se utilizaron 1250 copias de ARN de Zika por cada 5 µl de reacción de RT-PCR.

Los resultados de los experimentos con los virus VRS y Zika mostraron un aumento sustancial en la  $\Delta C_q$  (aproximadamente de 10 ciclos o un aumento de la sensibilidad de 1000) para los controles sin plantilla de las reacciones de RT-PCR realizadas mediante las técnicas de congelación en comparación con los mezclados en hielo (figura 41). Además, las curvas de fusión de los controles sin plantilla se desplazaron a temperaturas más bajas y se distinguieron fácilmente de las muestras positivas.

Se realizó una serie de tres experimentos para determinar el efecto de colocar  $MgCl_2$  y dNTP en las partes congeladas o enfriadas del procedimiento de RT-PCR de congelación (tablas 4-6). Las muestras se prepararon congelando 2,5 µl de una semirreacción a -20 °C en capilares. A continuación, la muestra congelada se colocó en un baño de hielo en el que se añadieron 2,5 µl de la solución enfriada como en el ejemplo 26. En todos los experimentos, los 2 cebadores se separaron en diferentes soluciones y se separaron KlenTaq y MMLV. El cebador inverso se combinó con el ARN y MMLV, de manera que pudieran unirse antes de mezclar las 2 soluciones. Esto produjo mejores resultados que combinar el cebador directo con MMLV y ARN.

**Tabla 4**

Solución de congelación		Solución de enfriamiento	
Colorante, tampón, BSA	1X colorante, Tris 50 mM, pH 8,3, BSA 25 ng/µl	Colorante, tampón, BSA	1X colorante, Tris 50 mM, pH 8,3, BSA 25 ng/µl
Cebador directo	10 µM	Cebador inverso	10 µM
KlenTaq	3,2 µM	$MgCl_2$	6 mM
dNTP totales	1,6 mM	MMLV	2,5 unidades/µl
$MgCl_2$	6 mM	ARN (+/-)	2400 copias/µl

**Tabla 5**

Solución de congelación		Solución de enfriamiento	
Colorante, tampón, BSA	1X colorante, Tris 50 mM, pH 8,3, BSA 25 ng/µl	Colorante, tampón, BSA	1X colorante, Tris 50 mM, pH 8,3, BSA 25 ng/µl
Cebador directo	10 µM	Cebador inverso	10 µM
KlenTaq	3,2 µM	$MgCl_2$	12 mM
dNTP totales	1,6 mM	MMLV	2,5 unidades/µl
		ARN (+/-)	2400 copias/µl

**Tabla 6**

Solución de congelación		Solución de enfriamiento	
Colorante, tampón, BSA	1X colorante, Tris 50 mM, pH 8,3, BSA 25 ng/µl	Colorante, tampón, BSA	1X colorante, Tris 50 mM, pH 8,3, BSA 25 ng/µl
Cebador directo	10 µM	Cebador inverso	10 µM
KlenTaq	3,2 µM	dNTP totales	1,6 mM
		$MgCl_2$	12 mM
		MMLV	2,5 unidades/µl

En el experimento 1 (tabla 4), el  $MgCl_2$  se incluyó por igual en ambas soluciones. En el experimento 2 (tabla 5), todo el  $MgCl_2$  se colocó en la semirreacción enfriada para ver si la separación del  $Mg^{++}$  del KlenTaq reduciría la amplificación del control sin plantilla. Finalmente, en el experimento 3 (tabla 6), tanto los dNTP como el  $MgCl_2$  se colocaron en la solución enfriada. Hipotéticamente, si la transcriptasa inversa fuera responsable de la amplificación del control sin plantilla, dicha amplificación podría aumentar en presencia de dNTP y  $MgCl_2$ . De manera alternativa, si la amplificación del control sin plantilla estaba mediada por KlenTaq, no estarían disponibles ni el  $Mg^{++}$  ni los dNTP para la extensión mediante KlenTaq, aunque las muestras positivas tendrían condiciones perfectas para la síntesis de ADNc. Basándose en los valores de  $\Delta C_q$  de las reacciones de RT-PCR de una etapa, los parámetros experimentales descritos en el experimento 3 conducen a condiciones óptimas (figura 42).

## EJEMPLO 27

Se estudió el efecto de la temperatura de la RT sobre la RT-PCR con la técnica de congelación utilizando 2 segundos de RT. Se realizó el procedimiento descrito en el experimento 3 del ejemplo 26 utilizando cebadores de Zika y analizando controles positivos (1250 copias por cada 5 µl de RT-PCR) y controles sin plantilla en un intervalo de temperaturas de RT de 30 a 90 °C. Los valores de  $C_q$  fueron muy constantes en un intervalo de temperaturas de 60 °C con  $\Delta C_q$ s de 4-8 ciclos (figura 43). El óptimo fue de 50-60 °C para MMLV utilizando condiciones extremas de RT-PCR. Incluso utilizando la técnica de congelación, todavía hay margen de mejora.  $\Delta C_q$  más grandes entre controles positivos y sin plantilla mejorarían adicionalmente la sensibilidad.

**EJEMPLO 28**

Se investigaron aptámeros como un medio para disminuir la amplificación del "dímero de cebador" del control sin plantilla en la RT-PCR extrema. Los aptámeros se han utilizado en el pasado para inhibir las reacciones de polimerización, de manera específica, tanto las polimerasas de ADN dirigidas por ADN (69-70) como las polimerasas de ADN dirigidas por ARN (71). Los aptámeros se obtienen mediante selección evolutiva in vitro. Las secuencias básicas de los aptámeros estudiados en el presente documento se enumeran a continuación (5'-3'):

Secuencias de aptámeros Taq (70):

6-10: CAAGACGGGCGGGTGTGGTAGGCGCCCGTG (SEQ ID NO: 34)  
4-1: ACTTGATGGCGGGTGTGGTAGGCGCCATCT (SEC ID NO: 35)

Secuencias de aptámeros Stoffel (KlenTaq) (69):

Trnc.A-30: AAGACCAGACAATGTACAGTATTGGCCTGA (SEQ ID NO: 36)  
Trnc.2-30: GCCGGCCAATGTACAGTATTGGCCGGC (SEQ ID NO: 37)  
Tctw.A-30: CCGGACAATGTACAGTATTGCCCGG (SEQ ID NO: 38)

Secuencias de aptámeros MuLV (71):

dm.1.1: UUACCACGCGCUCUUAACUGCUAGCGCCAUGGC (SEQ ID NO: 39)  
m.1.1: CUUACCACGCGCUCUUAACUGCUAGCGCCAUGGCCAAAACU (SEQ ID NO: 40).

Cada uno de los aptámeros de ADN anteriores se sintetizó mediante la síntesis estándar de fosforoamidita en 3 formas: el primero no se modificó en el extremo 3', el segundo se modificó con un 3'-fosfato y el tercero se modificó con un modificador terminal amino C6 en el extremo 3' (Glen Research). Los nombres de cada uno de estos oligonucleótidos, junto con su plantilla, bloqueador en 3' y referencia bibliográfica se indican en la tabla 7. Los bloqueadores en 3' se añadieron para evitar una posible extensión de los aptámeros de ADN. Aunque el presente documento describe el bloqueo de aptámeros con grupos fosfato y amino C6, se contemplan bloqueadores en 3' adicionales, que incluyen modificadores de amino con longitudes diferentes de la cadena de carbono, de manera ilustrativa aquellos con enlazadores de dos carbonos (C2), tres carbonos (C3) y hasta doce carbonos (C12). También se contempla cualquier bloqueador en 3' con una carga positiva y se cree que aumenta la unión y la eficacia de los aptámeros descritos en el presente documento, aunque se pueden utilizar otros bloqueadores. Los oligonucleótidos Tctw.A-30, Tctw.A-30 Fos y Tctw.A-30 amino son aspectos novedosos de esta aplicación porque mantienen el bucle en horquilla y el bucle interno asimétrico del tallo en horquilla del aptámero Trnc.A-30, añadiendo a la vez estabilidad al cambiar uno de los pares de bases del tallo de A::T a G::C y aumentar la longitud del tallo en un par de bases G::C adicional. Además, se espera que otras modificaciones de Trnc.A-30 que mantengan su estructura secundaria (bucle en horquilla y bucle interno asimétrico), a la vez que aumentan la estabilidad del tallo, produzcan aptámeros útiles con o sin un modificador 3'-amino para las aplicaciones descritas en el presente documento. Las estructuras secundarias de Trnc.A-30 y Trnc.2-30 han sido publicadas (69). Los aptámeros de ARN para MMLV no están bloqueados porque no deben extenderse por las ADN polimerasas.

**Tabla 7**

Nombre	Plantilla	Bloqueador en 3'	Referencia
6-10	ADN	Ninguno	70
6-10 Fos		Fosfato	
6-10 Amino		Amino C6	
4-1	ADN	Ninguno	70
4-1 Fos		Fosfato	
4-1 Amino		Amino	
Trnc.2-30	ADN	Ninguno	69
Trnc.2-30 Fos		Fosfato	
Trnc.2-30 Amino		Amino	
Tctw.A-30	ADN	Ninguno	Nueva
Tctw.A-30 Fos		Fosfato	
Tctw.A-30 Amino		Amino	
dm.1.1	ARN	Ninguno	71
m.1.1	ARN	Ninguno	71

Los aptámeros de ADN se probaron primero con PCR de ciclado rápido. La diana de ADN genómico humano se definió mediante los siguientes cebadores *PUM1* (intrón 2): AGGTAGGTGAGGAGACTTAAG (SEQ ID NO: 41) y TAACCAGCTGGTGGTGA (SEQ ID NO: 42). En reacciones de 10 µl, estaban presentes 50 ng de plantilla de ADN con 0,5 µM de cada cebador en MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Tris 50 mM, pH 8,3, 200 µM de cada dNTP, BSA 500 µg/ml, 1X LCGreen Plus, ADN polimerasa KlenTaqI 0,064 µM y cantidades variables de aptámero Trnc.2-30. Las muestras se

mezclaron a temperatura ambiente sin enfriamiento ni ningún otro medio de prevención de dímeros de cebadores. Las muestras se amplificaron mediante calentamiento hasta 95 °C durante 5 segundos para la desnaturalización genómica, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 0 segundos y 55 °C durante 0 segundos para determinar los valores del ciclo de cuantificación (Cqs) en un LightCycler 1.5 capilar (Roche). A continuación, los productos de PCR se fundieron de 60 a 95 °C a 0,2 °C/s con obtención de fluorescencia continua.

El efecto sobre Cq de diferentes concentraciones de Trnc.2-30 se muestra en la figura 44. Se utiliza delta Cq ( $\Delta Cq$ ) como medida de la sensibilidad; en la que cuanto mayor sea la  $\Delta Cq$ , mejor será la sensibilidad del ensayo. En ausencia de aptámero, la  $\Delta Cq$  es de aproximadamente 14 ciclos, aumentando a 26 ciclos a 0,25  $\mu M$ . A concentraciones más elevadas, aunque el Cq del control positivo se mantiene aproximadamente constante, el Cq del control negativo disminuye, y también disminuye  $\Delta Cq$ .

Utilizando la concentración de aptámeros óptima aparente de 0,25  $\mu M$  determinada anteriormente, se determinó la  $\Delta Cq$  de todos los aptámeros de ADN en la tabla 7 utilizando el mismo ensayo de PCR LightCycler con *PUM1*. Los controles positivos variaron menos de 1,4 ciclos con Cqs alrededor de 24-25 ciclos, mientras que los controles negativos variaron ampliamente (datos no mostrados). Los resultados de los valores de  $\Delta Cq$  se muestran en la figura 45. La adición de los aptámeros 6-10 y 4-1 no proporcionó resultados mucho mejores que el negativo (control sin aptámero). Los mejores aptámeros fueron los terminados en amino C6 en el extremo 3', siendo el aptámero con la  $\Delta Cq$  más elevada Tctw.A-30 amino. Este aptámero es único en la bibliografía publicada en su terminación amino C6 y su secuencia (69).

Utilizando el aptámero Tctw.A-30 Amino que se encontró que era óptimo para PCR LightCycler de 15 minutos, su concentración se optimizó para PCR extrema. Dado que las concentraciones de cebador, en algunas realizaciones, son 10 veces más elevadas en la RT-PCR extrema que en los experimentos con LightCycler, es posible que sea necesario aumentar la concentración de aptámero. Se utilizaron las condiciones de amplificación con *PUM1* (intrón 2) anteriores, excepto por la química extrema (cebadores 5  $\mu M$  y polimerasa 1,6  $\mu M$ ) y la amplificación extrema (ciclos de aproximadamente 1 segundo entre 90 °C y 60 °C). Los resultados se muestran en la figura 46. El Cq de las reacciones de control positivo aumentó lentamente a medida que aumentaba la concentración de aptámero de ADN, mientras que el Cq de los controles negativos y la  $\Delta Cq$  aumentaron rápidamente entre 0 y 1,25  $\mu M$  y, a continuación, parecieron estabilizarse. La concentración óptima de TctwA-30 en condiciones extremas parecía ser de aproximadamente 2  $\mu M$ . Debido a que ciertos aptámeros de ADN inhiben parcialmente algunas transcriptasas inversas, que incluye MMLV (72), se podría utilizar un aptámero de ADN para inhibir ambas enzimas en la RT-PCR. Como alternativa, en la RT-PCR se pueden utilizar dos aptámeros, uno específico para la transcriptasa inversa y otro específico de la polimerasa dirigida por ADN.

Dado que los aptámeros de ARN específicos están disponibles para inhibir MMLV, los aptámeros de ARN dm1.1 y m.1.1, enumerados en la tabla 7, se utilizaron para inhibir la formación de dímeros de cebadores en la RT-PCR. En primer lugar, estos aptámeros de ARN se estudiaron sin ningún aptámero de ADN. Las condiciones siguieron la amplificación con *PUM1* (intrón 2) anterior, con 2 segundos de RT a 60 °C. Los resultados para m.1.1 se muestran en la figura 47, que muestra el efecto de la concentración de aptámero sobre Cq. Tanto el control negativo como  $\Delta Cq$  fueron máximos a 3  $\mu M$  de aptámero. A continuación, se comparó el aptámero m.1.1 con el aptámero dm1.1, cada uno a 3  $\mu M$ , utilizando el mismo sistema. La  $\Delta Cq$  para m.1.1 (9,0) fue superior a la  $\Delta Cq$  para dm1.1 (7,5). Por lo tanto, cuando se utilizan los aptámeros de ARN de forma aislada (sin aptámeros de ADN) en la RT-PCR, los dímeros de cebadores se pueden reducir y el aptámero m.1.1 es una buena opción.

Cuando los aptámeros de ARN y ADN se optimizaron por separado en condiciones extremas, del grupo probado, la mejor opción para el aptámero de ARN fue m.1.1 a 3  $\mu M$  y la mejor opción para el aptámero de ADN fue Tctw.A-30 amino a 2  $\mu M$ . En experimentos preliminares, cuando ambos aptámeros se probaron juntos y se compararon con controles de solo un aptámero y sin ningún aptámero, los valores de  $\Delta Cq$  fueron los más elevados cuando ambos aptámeros estaban presentes. Se anticipa que las condiciones en las que las  $\Delta Cq$  resultantes de los aptámeros de ARN y ADN serán aditivas o sinérgicas, aumentará en gran medida la resistencia a la formación de dímeros de cebadores en la RT-PCR extrema.

## REFERENCIAS

1. Wittwer CT, Reed GB, Ririe KM. Rapid cycle DNA amplification. En: Mullis IK, Ferre F, Gibbs R, eds. The polymerase chain reaction, Vol. Deerfield Beach, FL: 174-181, 1994.
2. Wittwer CT, Fillmore GC, Hillyard DR. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. Nucleic Acids Res 1989; 17: 4353-7.
3. Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. Anal Biochem 1990; 186: 328-31.

4. Wittwer CT, Garling DJ. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques* 1991; 10: 76-83.
5. Wittwer CT, Marshall BC, Reed GH, Cherry JL. Rapid cycle allele-specific amplification: studies with the cystic fibrosis delta F508 locus. *Clin Chem* 1993; 39: 804-9.
6. Schoder D, Schmalwieser A, Schaubberger G, Hoorfar J, Kuhn M, Wagner M. Novel approach for assessing performance of PCR cyclers used for diagnostic testing. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2724-8.
10. Herrmann MG, Durtschi JD, Wittwer CT, Voelkerding KV. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin Chem* 2007; 53: 1544-8.
15. Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding KV. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem* 2006; 52: 494-503.
9. Raja S, El-Hefnawy T, Kelly LA, Chestney ML, Luketich JD, Godfrey TE. Temperature-controlled primer limit for multiplexing of rapid, quantitative reverse transcription-PCR assays: application to intraoperative cancer diagnostics. *Clin Chem* 2002; 48: 1329-37.
20. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997; 22: 176-81.
11. Wittwer CT, Ririe KM, Rasmussen RP. Fluorescence monitoring of rapid cycle PCR for quantification. In: Ferre F, ed. *Gene Quantification*, New York: Birkhauser, 1998:129-44.
25. Elenitoba-Johnson O, David D, Crews N, Wittwer CT. Plastic vs. glass capillaries for rapid-cycle PCR. *Biotechniques* 2008; 44: 487-8,490,492.
13. Roper MG, Easley CJ, Landers JP. Advances in polymerase chain reaction on microfluidic chips. *Anal Chem* 2005; 77: 3887-93.
30. Zhang C, Xing D. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 4223-37.
35. Cheng J, Shoffner MA, Hvichia GE, Kricka LJ, Wilding P. Chip PCR. II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 380-5.
16. Woolley AT, Hadley D, Landre P, deMello AJ, Mathies RA, Northrup MA. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal Chem* 1996; 68: 4081-6.
40. Neuzil P, Zhang C, Pipper J, Oh S, Zhuo L. Ultra fast miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e77.
18. Oda RP, Strausbauch MA, Huhmer AF, Borson N, Jurens SR, Craighead J, et al. Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of DNA. *Anal Chem* 1998; 70: 4361-8.
45. Roper MG, Easley CJ, Legendre LA, Humphrey JA, Landers JP. Infrared temperature control system for a completely noncontact polymerase chain reaction in microfluidic chips. *Anal Chem* 2007; 79: 1294-300.
50. Friedman NA, Meldrum DR. Capillary tube resistive thermal cycling. *Anal Chem* 1998; 70: 2997-3002.
21. Heap DM, Herrmann MG, Wittwer CT. PCR amplification using electrolytic resistance for heating and temperature monitoring. *Biotechniques* 2000; 29: 1006-12.
55. Kopp MU, Mello AJ, Manz A. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip. *Science* 1998; 280: 1046-8.
23. Hashimoto M, Chen PC, Mitchell MW, Nikitopoulos DE, Soper SA, Murphy MC. Rapid PCR in a continuous flow device. *Lab Chip* 2004; 4: 638-45.
60. Crews N, Wittwer C, Gale B. Continuous-flow thermal gradient PCR. *Biomed Microdevices* 2008; 10: 187-95.
25. Chiou JT, Matsudaira PT, Ehrlich DJ. Thirty-cycle temperature optimization of a closed-cycle capillary PCR machine. *Biotechniques* 2002; 33: 557-8,60,62.
65. Frey O, Bonneick S, Hierlemann A, Lichtenberg J. Autonomous microfluidic multi-channel chip for real-time PCR with integrated liquid handling. *Biomed Microdevices* 2007; 9: 711-8.

27. Chen J, Wabuyele M, Chen H, Patterson D, Hupert M, Shadpour H, et al. Electrokinetically synchronized polymerase chain reaction microchip fabricated in polycarbonate. *Anal Chem* 2005; 77: 658-66.
- 5 28. Sun Y, Kwok YC, Nguyen NT. A circular ferrofluid driven microchip for rapid polymerase chain reaction. *Lab Chip* 2007; 7: 1012-7.
29. Agrawal N, Hassan YA, Ugaz VM. A pocket-sized convective PCR thermocycler. *Angew Chem Int Ed Engl* 2007; 46: 4316-9.
- 10 30. Zhang C, Xu J, Ma W, Zheng W. PCR microfluidic devices for DNA amplification. *Biotechnol Adv* 2006; 24: 243-84.
31. Wheeler EK, Benett W, Stratton P, Richards J, Chen A, Christian A, et al. Convectively driven polymerase chain reaction thermal cycler. *Anal Chem* 2004; 76: 4011-6.
- 15 32. Belgrader P, Benett W, Hadley D, Long G, Mariella R, Jr., Milanovich F, et al. Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument. *Clin Chem* 1998; 44: 2191-4.
33. Terazona H, Takei, H, Hattori A, Yasuda K. Development of a high-speed real-time polymerase chain reaction system using a circulating water-based rapid heat exchange. *Jap J Appl Phys* 2010; 49: 06GM05.
34. Wheeler EK, Hara CA, Frank J, Deotte J, Hall SB, Benett W, Spadaccini C, Beer NR. Under-three minute PCR: Probing the limits of fast amplification. *Analyst* 2011; 136(16):3707-12.
- 25 35. Fuchiwaki Y, Nagai H, Saito M, Tamiya E. Ultra-rapid flow-through polymerase chain reaction microfluidics using vapor pressure. *Biosens Bioelect* 2011; 27: 88-94.
36. Maltezos G, Johnston M, Taganov K, Srichantaratsamee C, Gorman J, Baltimore D, Chantaratita W and Scherer A, Exploring the limits of ultrafast polymerase chain reaction using liquid for thermal heat exchange: A proof of principle. *Appl. Phys. Lett.*, 2010, 97, 264101.
- 30 37. Wilhelm J, Hahn M, Pingoud A. Influence of DNA target melting behavior on real-time PCR quantification. *Clin Chem* 2000; 46: 1738-43.
- 35 38. Zuna J, Muzikova K, Madzo J, Krejci O, Trka J. Temperature non-homogeneity in rapid airflow-based cycler significantly affects real-time PCR. *Biotechniques* 2002; 33: 508,10, 12.
39. von Kanel T, Adolf F, Schneider M, Sanz J, Gallati S. Sample number and denaturation time are crucial for the accuracy of capillary-based LightCyclers. *Clin Chem* 2007; 53: 1392-4.
- 40 40. Wittwer CT, Herrmann MG. Rapid thermal cycling and PCR kinetics. In: Innis M, Gelfand D, Sninsky J, eds. *PCR Methods Manual*, Vol. San Diego: Academic Press, 1999:211-29.
41. Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, Pryor RJ. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem* 2003; 49: 853-60.
- 45 42. von Ahsen N, Wittwer CT, Schutz E. Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg(2+), deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin Chem* 2001; 47: 1956-61.
- 50 43. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154-60.
44. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997; 22: 130-1, 4-8.
- 55 45. Weis JH, Tan SS, Martin BK, Wittwer CT. Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends Genet* 1992; 8: 263-4.
- 60 46. Brown RA, Lay MJ, Wittwer CT. Rapid cycle amplification for construction of competitive templates. In: Horton RM, Tait RC, eds. *Genetic Engineering with PCR*, Vol. Norfolk: Horizon Scientific Press, 1998: 57-70.
47. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, 1998
- 65 48. Whitney SE, "Analysis of rapid thermocycling for the polymerase chain reaction," Ph.D. thesis, University of



Nebraska, 2004.

49. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient of 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Meth Appl*. 1993; 2: 275-287.

50. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MAD. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1988; 85: 9436-40.

51. Terazono H, Hattori A, Takei H, Takeda K, Yasuda K. Development of 1480 nm photothermal high-speed real-time polymerase chain reaction system for rapid nucleotide recognition. *Jpn J Appl Phys*. 2008; 47: 5212-6.

52. Wittwer CT, Rasmussen RP, Ririe KM. Rapid PCR and melting curve analysis. In: *The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications*, Bustin SA, ed. Cambridge Univ Press, New York, 48-69, 2010.

53. Fuchiwaki Y, Saito M, Wakida S, Tamiya E, Nagai H. A practical liquid plug flow-through polymerase chain-reaction system based on a heat-resistant resin chip. *Anal Sci*. 2011; 27: 225-30.

54. Kim H, Dixit S, Green CJ, Faris GW. Nanodroplet real-time PCR system with laser assisted heating. *Optics Express* 2009; 17: 218-27.

55. Obeid PJ, Christopoulos TK, Crabtree HJ, Backhouse CJ. Microfabricated device for DNA and RNA amplification by continuous-flow polymerase chain reaction and reverse transcription-polymerase chain reaction with cycle number selection. *Anal Chem* 2003; 75: 288-95.

56. Giordano BC, Ferrance J, Swedberg S, Huhmer AFR, Landers JP. Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds. *Anal Biochem* 2001; 291: 124-132.

57. Pal, D., Venkataraman, V., Mohan, K. N., Chandra, H. S., & Natarajan, V. (2004). A power-efficient thermocycler based on induction heating for DNA amplification by polymerase chain reaction. *Review of Scientific Instruments*, 75(9), 2880-2883.

58. Yuanzhi Lao, F. E. H., Tay, F. E. H., Guolin Xu, Hartono, D., & Lee, Y. Y. (2003). A Non-Contact Micro Thermocycling Chip for Polymerase Chain Reactions. *International Journal of Computational Engineering Science*, 4(3), 651-654.

59. Shen F, Sun, B, Kreutz JE, Davydova EK, Du W, Reddy PL, Joseph LJ, and Ismagilov RF. Multiplexed Quantification of Nucleic Acids with Large Dynamic Range Using Multivolume Digital RT-PCR on a Rotational SlipChip Tested with HIV and Hepatitis C Viral Load. *J. Am. Chem. Soc*. 2011, 133, 17705-17712.

60. Bustin, S. et al., Variability of the reverse transcription step: practical implications, *Clinical Chemistry* 61, 201-12, 2015.

61. JL Montgomery and CT Wittwer, Influence of PCR reagents on DNA polymerase extension rates measured on real-time PCR instruments, *Clin Chem* 60:334-340 (2014).

62. S Mijatovic-Rustempasic et al., Sensitive and specific quantitative detection of rotavirus A by one-step real-time reverse transcription-PCR assay without antecedent double-stranded-RNA denaturation, *J Clin Microbiol* (2013), 51, 3047-54.

63. P Carninci et al., Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA, *PNAS*, 1998;95:520-4 and AN Spiess et al., Trehalose is a potent enhancer: Lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of Taq polymerase by the disaccharide trehalose, *Clin Chem*, 2004; 50: 1256-9.

64. Gerard GF, D'Alessio JM. Chapter 6 (73-93) From: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 16, *Enzymes of Molecular Biology*, Edited by MM Burell, 1993, Humana Press, Inc., Totowa, NJ.

65. Brownie J et al., The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucl Acid Res*, 1997;25:3235-41.

66. Sellner LN et al., Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucl Acid Res*, 1992;20:1487-90.

67. Chandler DP et al., Reverse Transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR, *Appl Environ Microbiol*, 1998;64:669-77.

68. Suslov O et al., PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency, Nucl Acid Res, 2005;33:e181.

69. Lin Y and Jayasena SD, Inhibition of multiple thermostable DNA polymerases by a heterodimeric aptamer, J Mol Biol, 1997;271:100-111.

70. Noma T and Ikebukuro K, Aptamer selection based on inhibitory activity using an evolution-mimicking algorithm, Biochem Biophys Res Comm, 2006, 347, 226-31.

71. Chen H and Gold L, Selection of high-affinity RNA ligands to reverse transcriptase: Inhibition of cDNA synthesis and RNase h activity, Biochemistry, 1994, 33, 8746-56.

72. Dang C and Jayasena SD, Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR, J Mol Biol, 1996;264:268-78.

A lo largo de toda la memoria descriptiva se citan diversas patentes, publicaciones de patentes y documentos que no son patentes a efectos de describir el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> University of Utah Research Foundation Wittwer, Carl T Quackenbush, John F Housekeeper, Jessica A

<120> RT-PCR extrema

<130> 1267.13WO

<150> 62/251,400

<151> 05-11-2015

<160> 42

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

cccatccaac gtctacatcg agtc 24

<210> 2

<211> 19

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

tccttctctt gccagggcat 19

<210> 3

<211> 45

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mutación

<222> (23)..(23)

<223> residuo G o A

<400> 3

cccatccaac gtctacatcg agtccgatgc ctggcaagag aagga 45

<210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 5 <400> 4  
 ctacagtggg agtcacctgc 20  
 10 <210> 5  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 15 <400> 5  
 ggtactgagc tgtgaaagtc aggtt 25  
 20 <210> 6  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 25 <220>  
 <221> mutación  
 <222> (28)..(28)  
 <223> residuo A o G  
 30 <400> 6  
 ctacagtggg agtcacctgc tttgccaaa gggaacctga cttcacagc tcagtacc 58  
 35 <210> 7  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7  
 40 gggagtcacc tgctttgcc 20  
 45 <210> 8  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
 tactgagctg tgaaagtcag gttcc 25  
 50 <210> 9  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 55 <400> 9  
 gggagtcacc tgctttgcc aaagggaacc tgacttcac agctcagta 49  
 60 <210> 10  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

	<400> 10		
	ctctgtgctt tctgtatcct cagagtggca ttct	34	
5	<210> 11 <211> 28 <212> ADN <213> Homo sapiens		
10	<400> 11		
	cgtctgctgg agtgtgccca atgctata	28	
15	<210> 12 <211> 60 <212> ADN <213> Homo sapiens		
20	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(41) <223> región sintética estándar 5'		
25	<400> 12		
	acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaaa attcagtggc attaaatagc	60	
30	<210> 13 <211> 67 <212> ADN <213> Homo sapiens		
35	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(50) <223> región sintética estándar 5'		
	<400> 13		
	<b>gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagaaaaa ccagagctaa</b>	<b>60</b>	
40	<b>agggaag</b>	<b>67</b>	
45	<210> 14 <211> 66 <212> ADN <213> Homo sapiens		
50	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(41) <223> región sintética estándar 5'		
	<400> 14		
	<b>acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaaa agctggtgtc tgctatagaa</b>	<b>60</b>	
55	<b>ctgatt</b>	<b>66</b>	
60	<210> 15 <211> 72 <212> ADN <213> Homo sapiens		

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(50)  
 <223> región sintética estándar 5'

5

<400> 15

gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagaaaaa gttgccagag 60  
 ctaaaggga gg 72

10

<210> 16  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Cebador común sintético

<400> 16

20

acacacacac acacacacac acacacacac acacacaaaa a 41

<210> 17  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Cebador común sintético

30

<400> 17

gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagagaga gagagaaaaa 50

35

<210> 18  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40

<220>  
 <223> Cebador común sintético

<400> 18

actcgacga actcaccgca ctcc 24

45

<210> 19  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Cebador común sintético

<400> 19

55

actcgacga actcaccgca ctcc 24

60

<210> 20  
 <211> 100  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Plantilla sintética		
	<400> 20		
5		actcgcacga actcaccgca ctccggatgg attgtgaaga ggccaagat actggtcata	60
		ttatcctttg atctagctct cactcgcact ctcacgcaca	100
	<210> 21		
	<211> 200		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Plantilla sintética		
15	<400> 21		
		actcgcacga actcaccgca ctccctcaatg ctgacaaatc gaaagaatag gaatagcgta	60
		attactagag gactccaata tagtatatta ccctgggtgac cgcctgtact gtaggaacac	120
		taccgcggtt atattgacag cttagcaatc taccctgttg ggatctgttt aagtggctct	180
		cactcgcact ctcacgcaca	200
20	<210> 22		
	<211> 300		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Plantilla sintética		
	<400> 22		
		actcgcacga actcaccgca ctccccttcg aatataaagt acgacattac tagcaatgac	60
		agttccagga tttaagaaag tagtgttcca catcaatgca tatccagtga aagcataacg	120
		tcaaaaaaag cctggcaccg ttgcgatct ggacttactt agatttggtg tagtcaagcc	180
		ggctatcagc gatttatccc ggaaacacat actagtgagt tatttgtatg ttacctagaa	240
30		tagctgtcac gaatcactaa tacattcacc caccagctct cactcgcact ctcacgcaca	300
	<210> 23		
	<211> 400		
	<212> ADN		
35	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Plantilla sintética		
40	<400> 23		

	actcgcacga actcaccgca ctctgaata caagacgaca gtcctgatta tatttttcatt	60
	taattacgcc aatttaatta tgatgaatat taacggaatt aaatatgtat tgataagtac	120
	taagtaatgg ttaccacg gcgatctata tgcaaggga acattaacaa atttaaacat	180
	ctgatgtgga caaaacttgt aatgtggtat agttaaaaat ataggtttca gggacacgta	240
	agtatctatc ttgaatgttt aagtaggtcc tgtctaccat tctgaaattt agaaaatcgc	300
	gttcatcggg ctgtcggcta cacctcagaa aaccatttcg tgttgcacag gaggaacttt	360
	cgagggttcg tatgagctct cactcgcaact ctcacgcaca	400
5	<210> 24 <211> 500 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Plantilla sintética  <400> 24	
	actcgcacga actcaccgca ctccaccgct tgacgacgta gggatatttg tatctgaatc	60
	tactcattta cctacatact gaagattttg cgatcgtcta atatattgga ctaatgccg	120
	atttctgatc aattactcta ggcgatactt catcgtcggc cttatttgga ttttgctcaa	180
	gtgctaaact ctctgcgcgt caatactagt ctgacatcag tcaagacctg ctatctgaaa	240
	actactagag agatatacct aacaacttta gtggataaat caggctctgga gattgtcata	300
	taatgccact agggtcagaa ggctgtgtca aagttagtgg ttagtaggtc tccgctctgc	360
	ggtagtattc ttatattctc ttactatgca tcaaacaaaa tagaatgcat agacaaaccg	420
	cctgccaaagt ttacaagata acttgcgtat aggtttataa gggttcttct gtatcgtctc	480
15	cactcgcaact ctcacgcaca	500
20	<210> 25 <211> 31 <212> ADN <213> Homo sapiens  <400> 25	
	gcttgaaga ttgctaaaat gatagtcagt g	31
25	<210> 26 <211> 26 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 26	
	ttgatcatc tgagcctgct gcataa	26
35	<210> 27 <211> 60	

<212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 5 <221> mutación  
 <222> (34)..(34)  
 <223> residuo A o G  
  
 <400> 27  
 10 gcttggaaga ttgctaaaaat gatagtcagt gacattatgc agcagggtca gtatgatcaa 60  
  
 <210> 28  
 <211> 17  
 15 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 28  
 20 ttctgggca tggagtc 17  
  
 <210> 29  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 25 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 29  
 30 caggtcttg cgatgc 17  
  
 <210> 30  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> virus respiratorio sincitial  
  
 <400> 30  
 tggggcaaat atgtcacgaa g 21  
 40  
 <210> 31  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> virus respiratorio sincitial  
 45  
 <400> 31  
 ccatttaagc aatgacctcg aatttca 27  
  
 <210> 32  
 50 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Virus Zika  
  
 <400> 32  
 55 caggttggag tgggagtc 20  
  
 <210> 33  
 <211> 20  
 60 <212> ADN  
 <213> Virus Zika  
  
 <400> 33  
 65 ttgtaacgt gccacatggt 20



	<210> 34		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> secuencia sintética		
5	<400> 34		
	caagacgggc ggggtggta ggcgccgtg	30	
10	<210> 35		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> secuencia sintética		
15	<400> 35		
	actgatggc ggggtggta ggcgccatct	30	
20	<210> 36		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> secuencia sintética		
	<400> 36		
25	aagaccagac aatgtacagt attgcctga	30	
30	<210> 37		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> secuencia sintética		
	<400> 37		
35	gccggccaat gtacagtatt ggccggc	27	
40	<210> 38		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> secuencia sintética		
	<400> 38		
45	ccggacaatg tacagtattg gcccg	26	
50	<210> 39		
	<211> 33		
	<212> ARN		
	<213> secuencia sintética		
	<400> 39		
	uuaccacgcg cucuaacug cuagcgccau ggc	33	
55	<210> 40		
	<211> 41		
	<212> ARN		
	<213> secuencia sintética		
60	<400> 40		
	cuuaccacgc gcucuaacu gcuagcgcca uggccaaaac u	41	
65	<210> 41		
	<211> 21		
	<212> ADN		

## ES 2 916 153 T3

<213> Homo sapiens

<400> 41

5 aggtagggtga ggagacttaa g 21

<210> 42

<211> 17

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 42

15 taaccagctg gtggtga 17

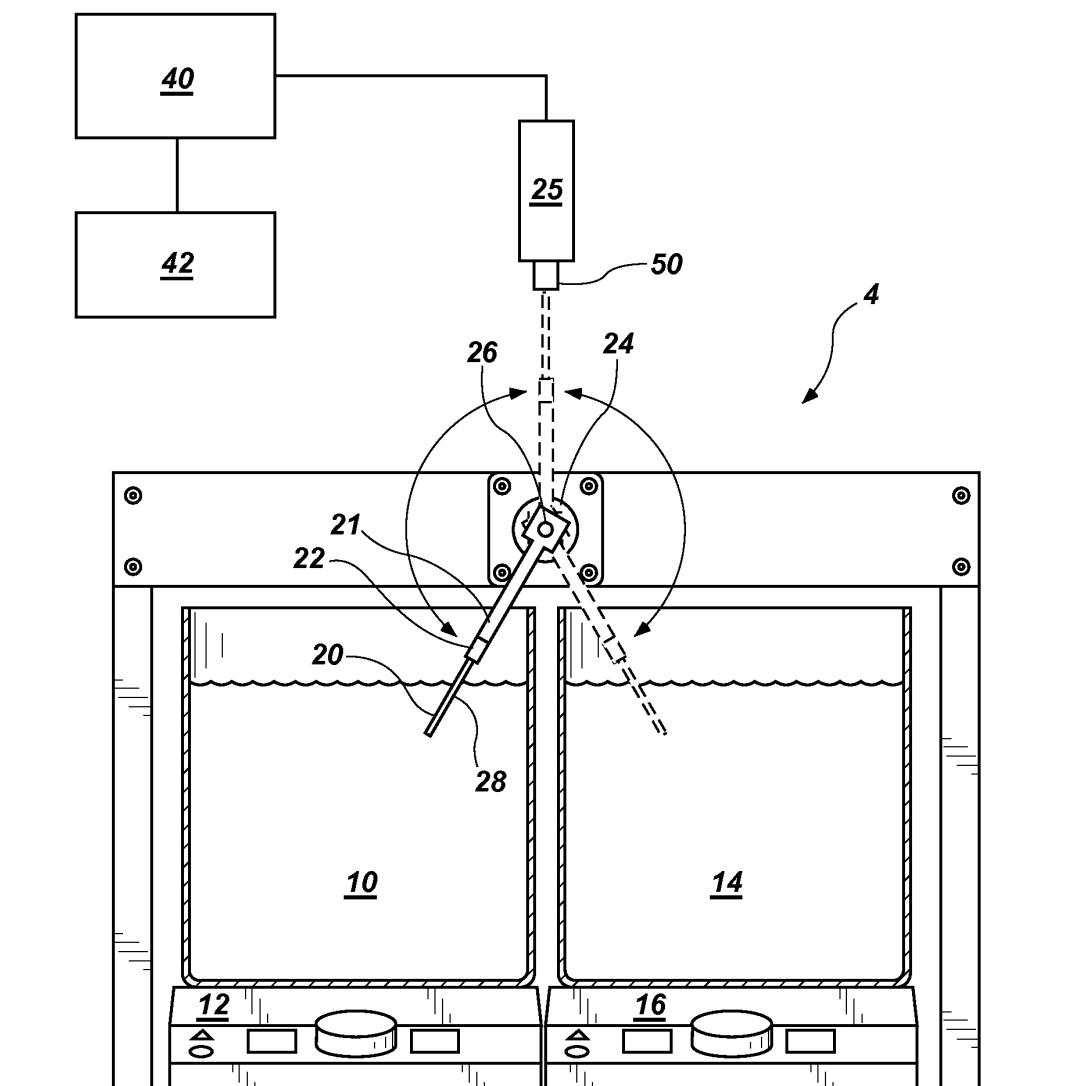
## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para amplificar un ARN diana en una muestra biológica durante la amplificación que comprende las etapas de:
  - 5 proporcionar una mezcla de reacción que comprende la muestra biológica, una enzima de transcripción inversa, una polimerasa termoestable y cebadores configurados para la amplificación del ARN diana en la muestra biológica, la polimerasa se proporciona a una concentración, como mínimo, de 0,5  $\mu\text{M}$  y los cebadores se proporcionan, cada uno, a una concentración, como mínimo, de 2  $\mu\text{M}$ ;
  - 10 calentar la mezcla de reacción desde una temperatura de mezcla hasta una temperatura de transcripción inversa en menos de un segundo,
  - transcribir de forma inversa el ARN a ADN mediante incubación durante un tiempo de transcripción inversa no superior a 5 minutos, y
  - amplificar el ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa mediante ciclado térmico de la muestra biológica entre, como mínimo, una temperatura de desnaturalización y una temperatura de alargamiento a través de una pluralidad de ciclos de amplificación utilizando un perfil de ciclado de temperatura extrema, en el que cada ciclo se completa en un tiempo de ciclo inferior a 20 segundos por ciclo.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la enzima de transcripción inversa se proporciona a una concentración reducida por debajo de la concentración recomendada por el fabricante para una reacción de RT para la enzima de transcripción inversa.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el tiempo de la transcripción inversa no es superior a un minuto,
  - de manera preferente, en el que el tiempo de la transcripción inversa no es superior a 16 segundos,
  - 25 de manera más preferente, en el que el tiempo de la transcripción inversa no es superior a 8 segundos,
  - de manera más preferente, en el que el tiempo de la transcripción inversa no es superior a 4 segundos,
  - de manera más preferente, en el que el tiempo de la transcripción inversa no es superior a 2 segundos.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que los cebadores se proporcionan cada uno a una concentración, como mínimo, de 4  $\mu\text{M}$ .
5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa de amplificación tiene lugar en la misma mezcla de reacción que la etapa de transcripción inversa.
6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción tiene una concentración de KCl no superior a 10 mM, de manera preferente, en el que la mezcla de reacción está sustancialmente libre de potasio.
7. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción comprende, además, un agente reductor.
8. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que la enzima de transcripción inversa es MMLV proporcionada a una concentración no superior a 4,0 unidades/ $\mu\text{l}$ ,
  - o en el que la enzima de transcripción inversa es AMV proporcionada a una concentración no superior a 0,8 unidades/ $\mu\text{l}$ .
9. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que
  - la etapa de amplificación tiene un tiempo de amplificación igual al tiempo del ciclo multiplicado por el número de ciclos,
  - el procedimiento tiene un tiempo total igual a la suma del tiempo de la transcripción inversa y el tiempo de amplificación, y
  - 50 el tiempo de la transcripción inversa no es superior al 50 % del tiempo total,
  - de manera preferente, en el que el tiempo de la transcripción inversa no es superior al 20 % del tiempo total,
  - de manera más preferente, en la que el tiempo de la transcripción inversa no es superior al 10 % del tiempo total.
10. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que una primera parte de la mezcla de reacción se proporciona congelada y una segunda a mezcla de reacción se proporciona enfriada, y que comprende, además, mezclar la primera parte y la segunda parte antes de la etapa de transcripción inversa,
  - de manera preferente, en el que los dNTP y  $\text{MgCl}_2$  se proporcionan en la segunda parte.
11. Procedimiento, según la reivindicación 1,
  - en el que una primera parte de la mezcla de reacción se proporciona con un primer cebador y una segunda parte de la mezcla de reacción se proporciona con un segundo cebador, y que comprende, además, mezclar la primera parte y la segunda parte antes de la etapa de transcripción inversa.
12. Procedimiento, según la reivindicación 11,

en el que la etapa de transcripción inversa comienza dentro de un segundo de la finalización de la etapa de mezcla.

13. Procedimiento, según la reivindicación 10,  
5 en el que una de la primera parte y la segunda parte comprende la enzima de transcripción inversa y la otra de la primera parte y la segunda parte comprende la polimerasa termoestable.

14. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la mezcla de reacción comprende, además, un aptámero,  
10 de manera preferente, en el que el aptámero se proporciona a una concentración, como mínimo, de 1  $\mu$ M,  
de manera más preferente, en el que el aptámero se modifica con un bloqueador en 3'.



**FIG. 1a**

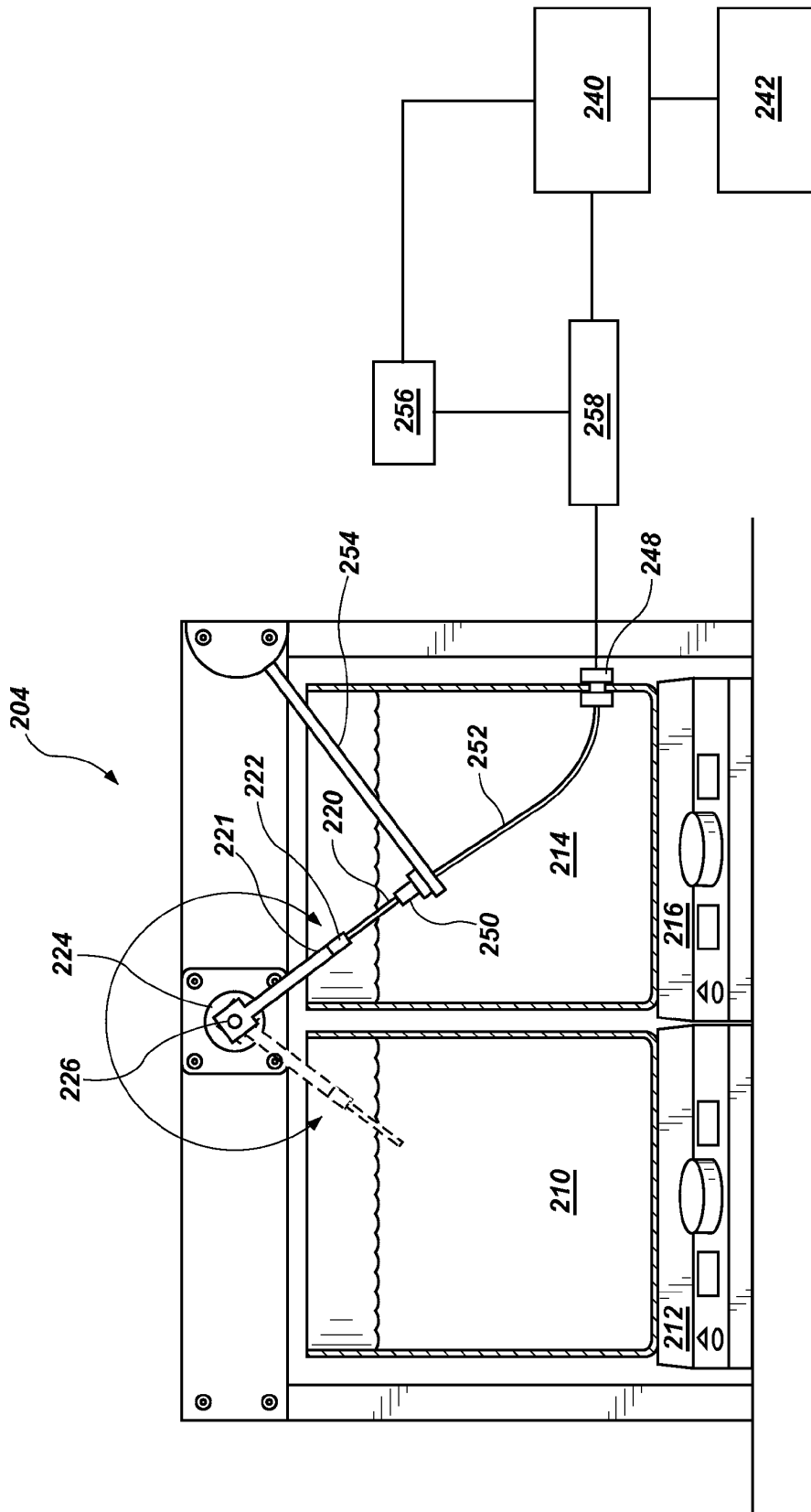
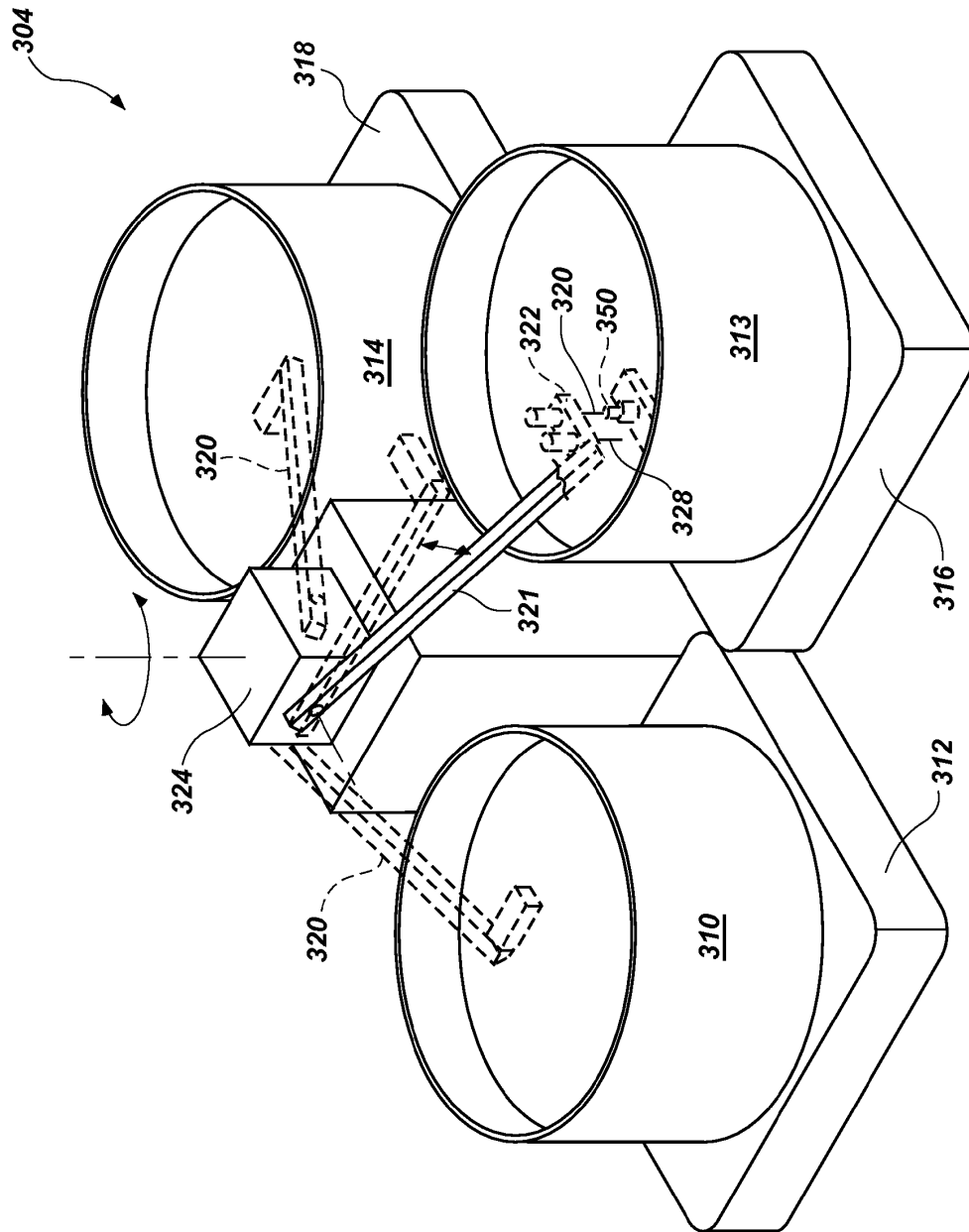
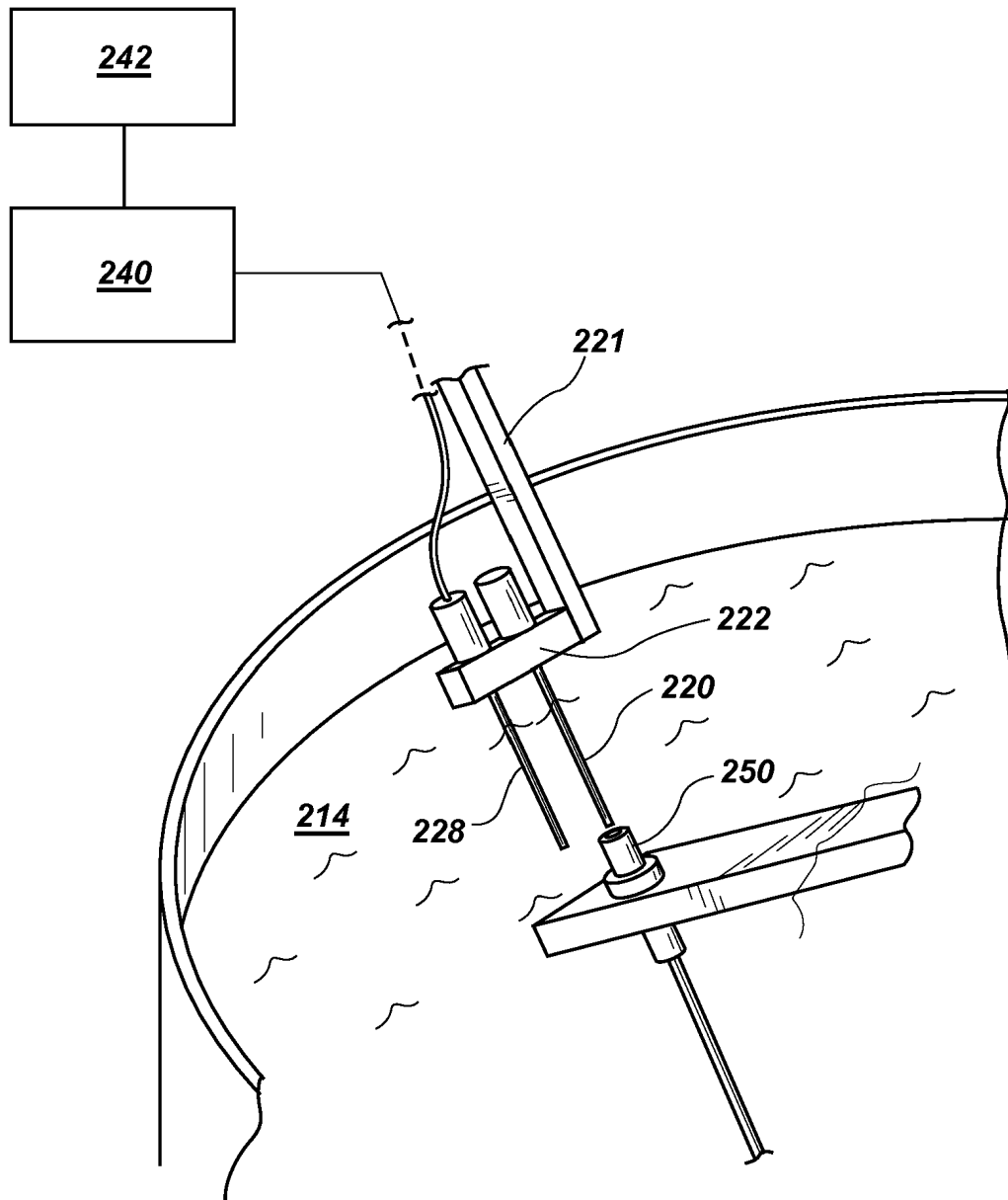


FIG. 1b



**FIG. 1c**



**FIG. 1d**



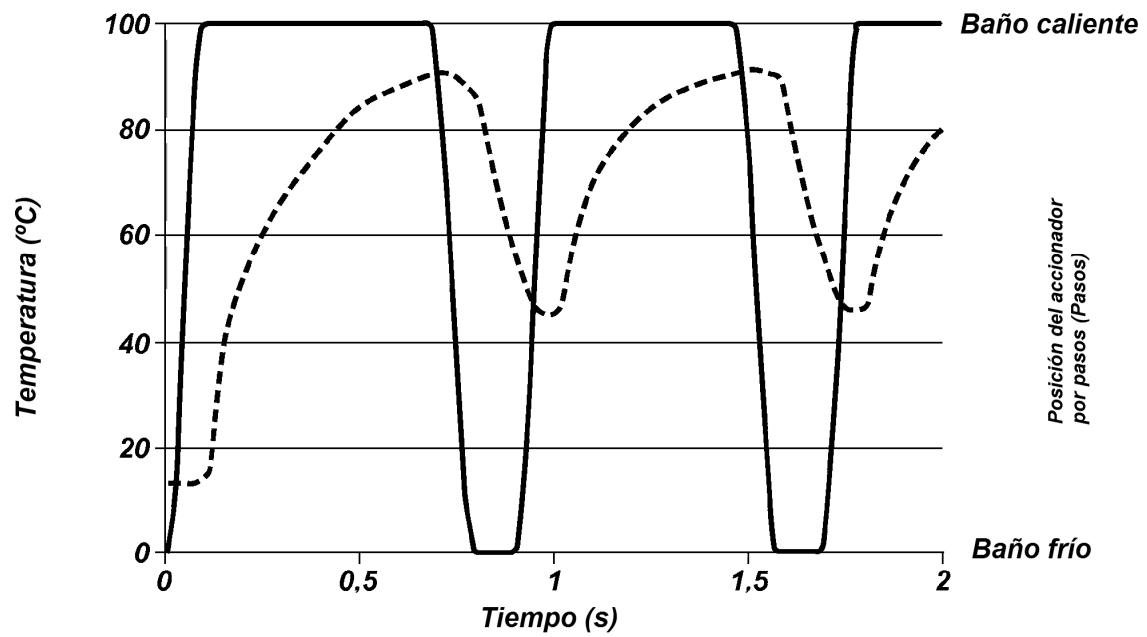


FIG. 2a

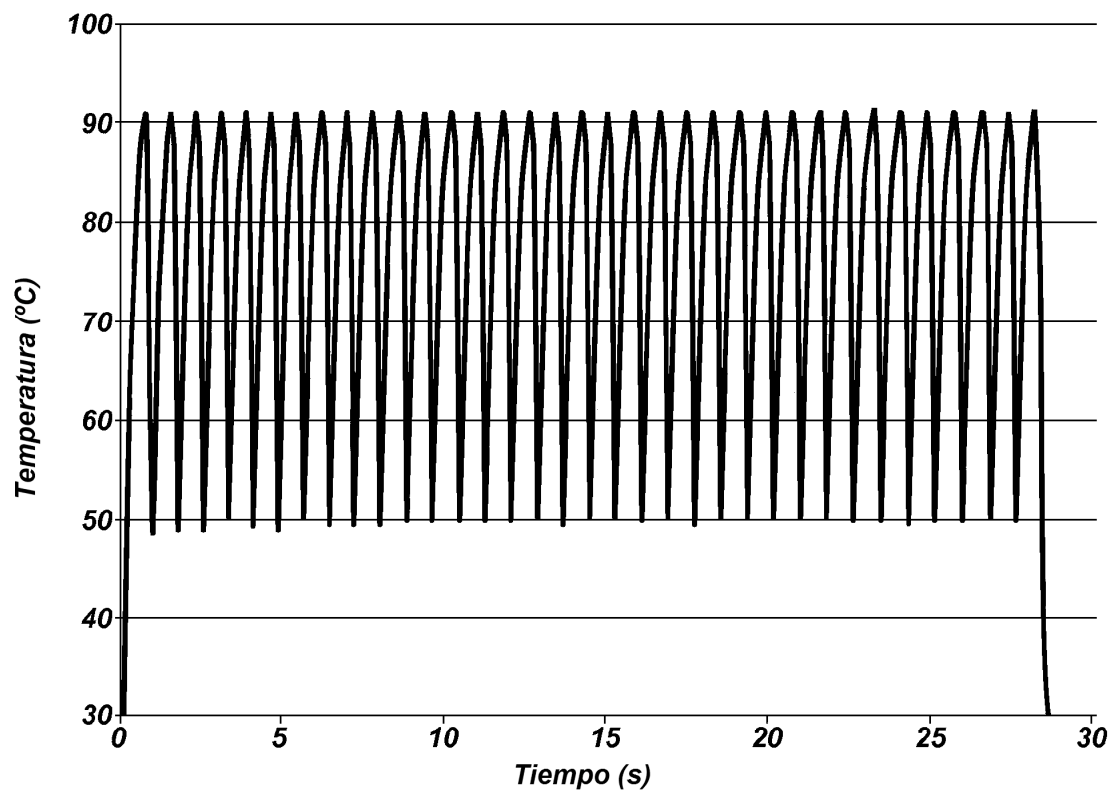
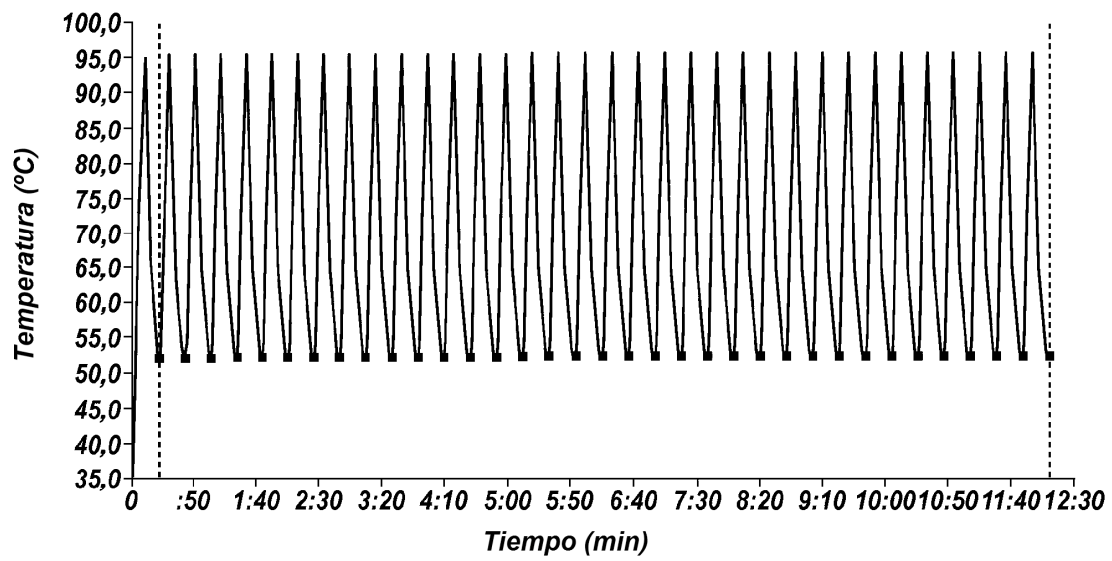
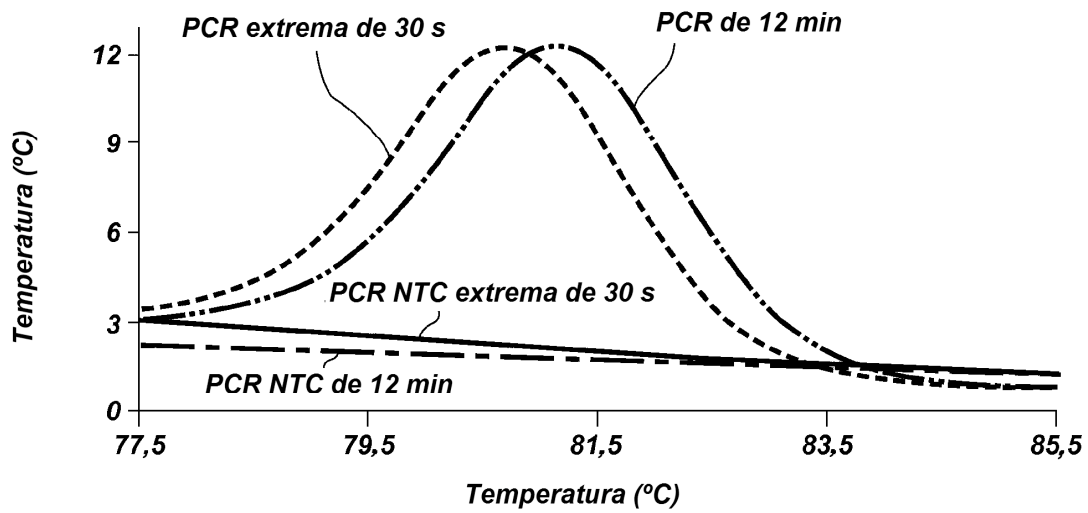


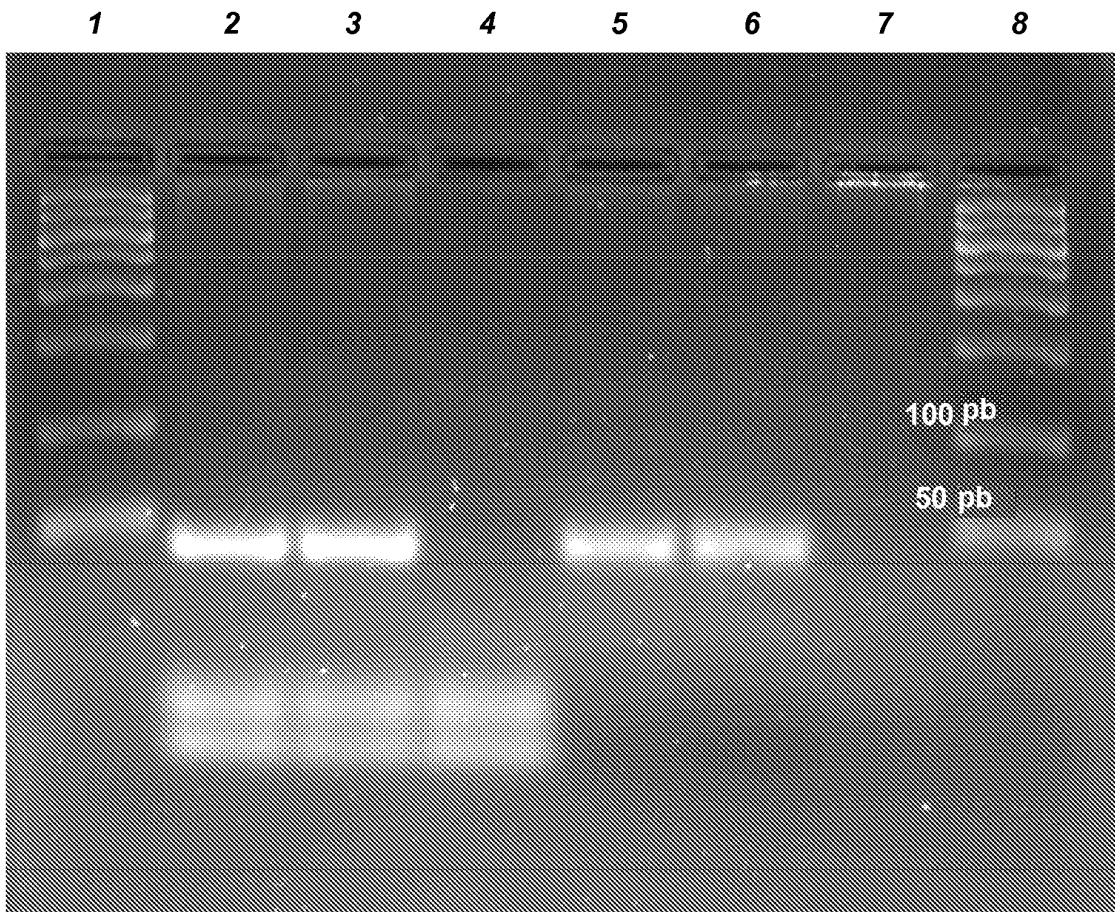
FIG. 2b



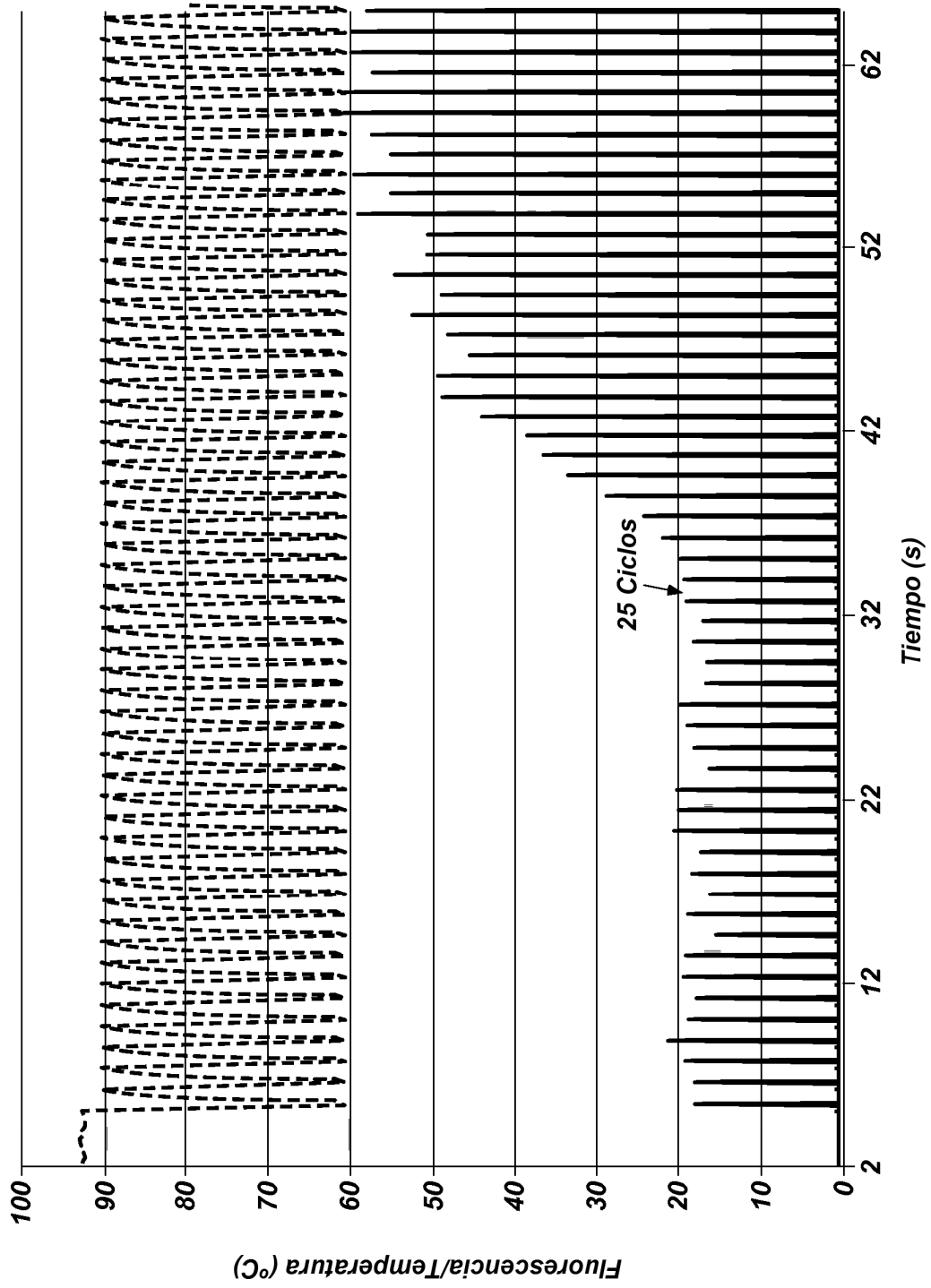
**FIG. 2c**



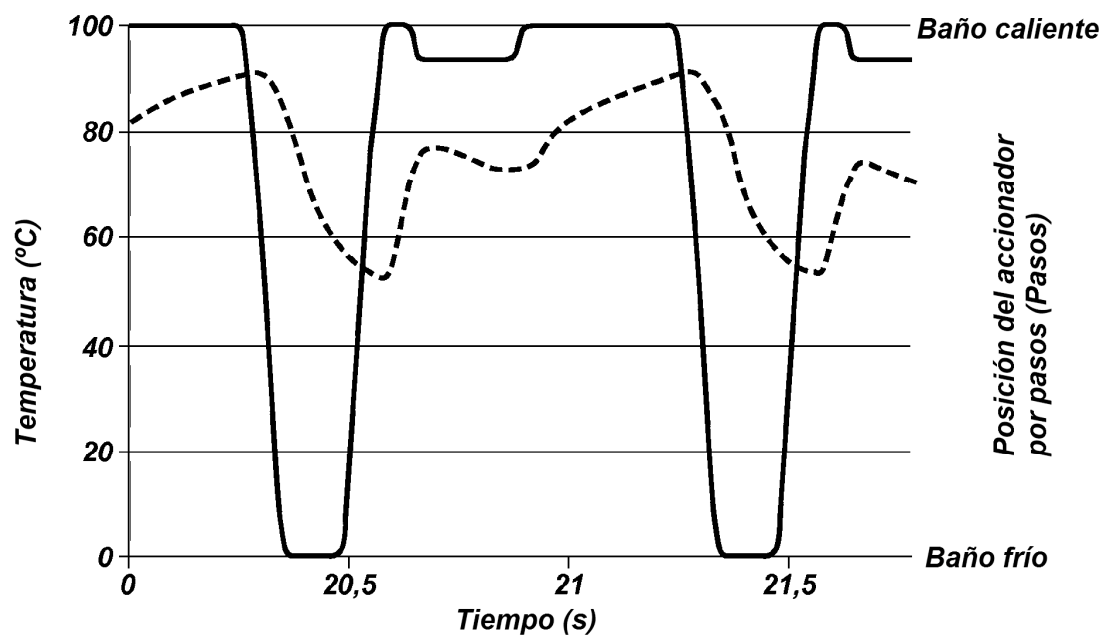
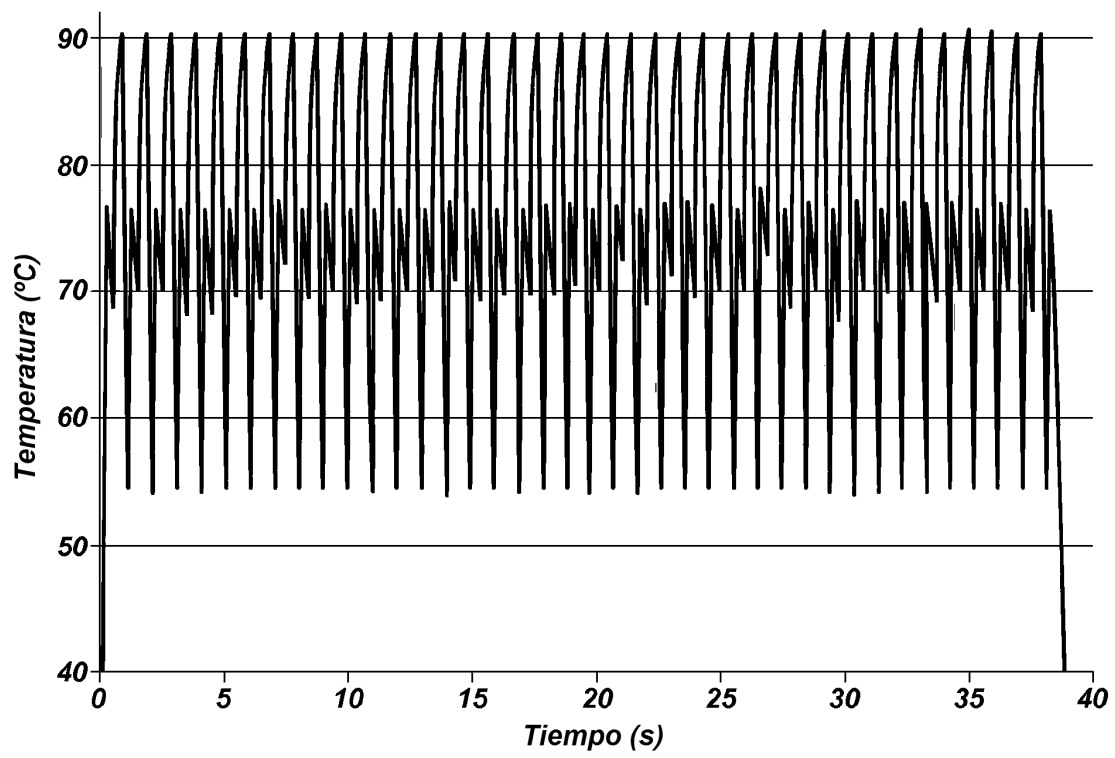
**FIG. 3a**

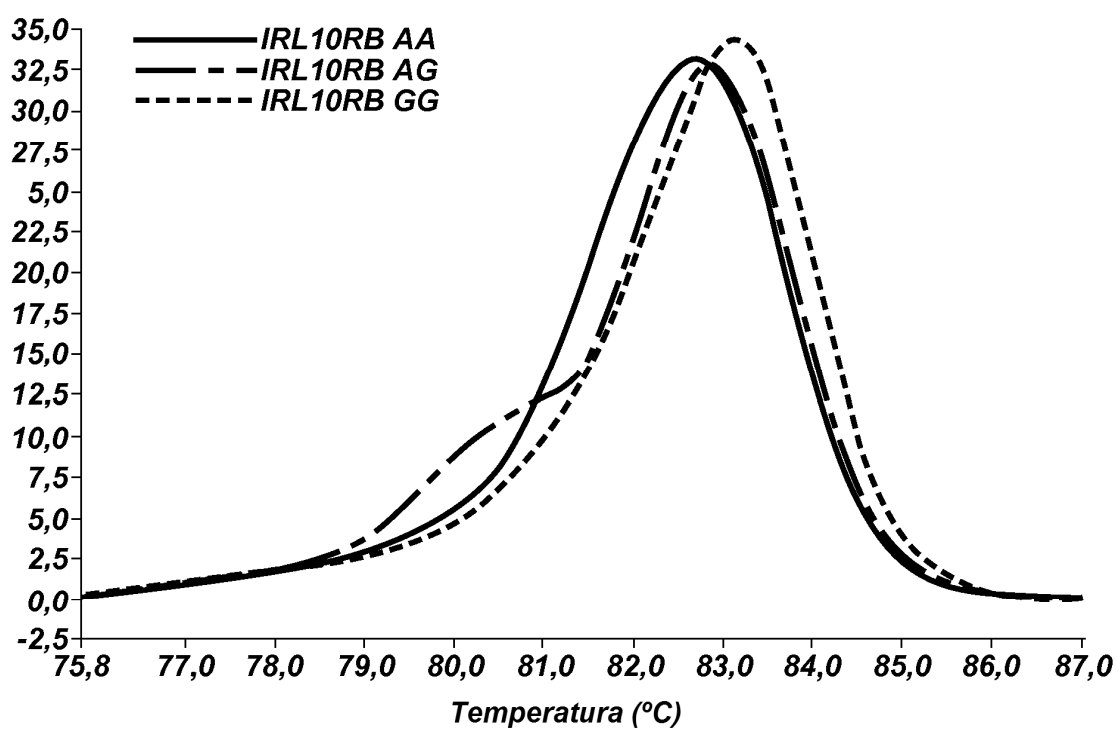


**FIG. 3b**



**FIG. 3c**





**FIG. 4c**

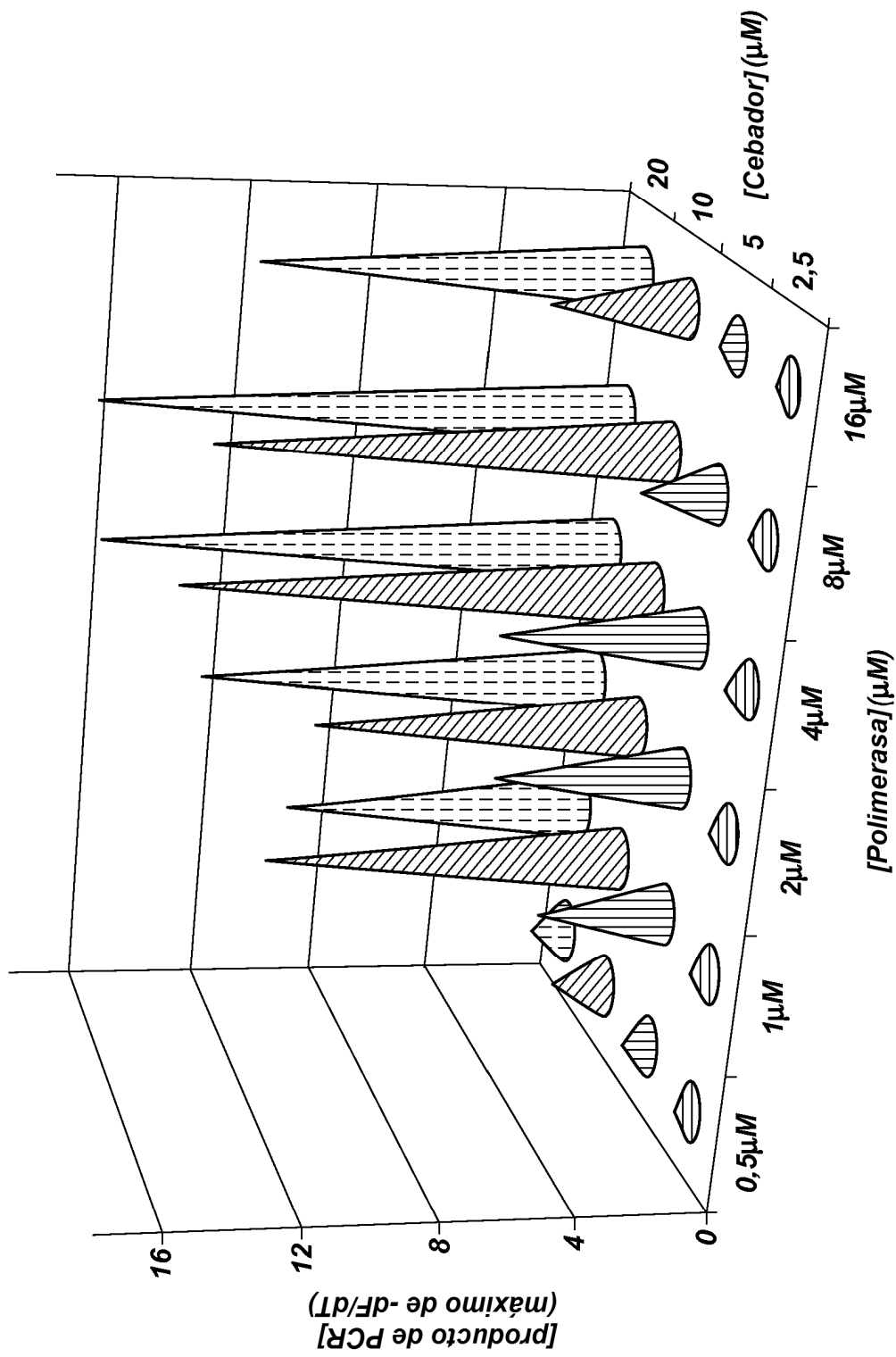
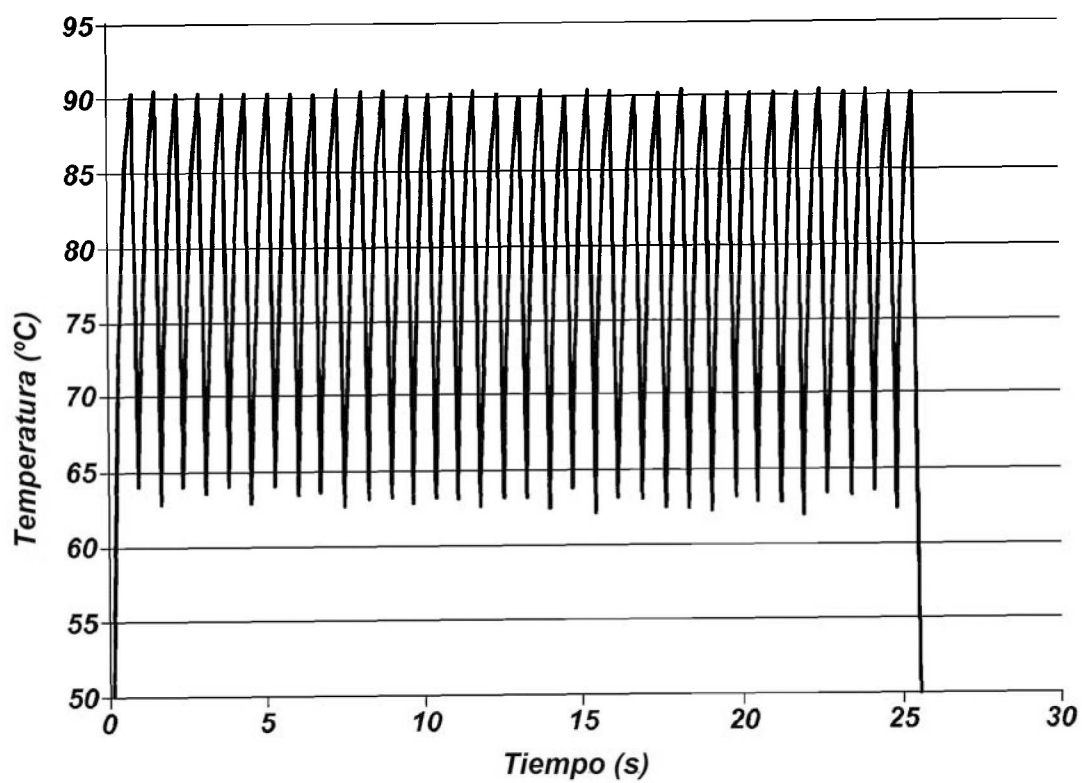
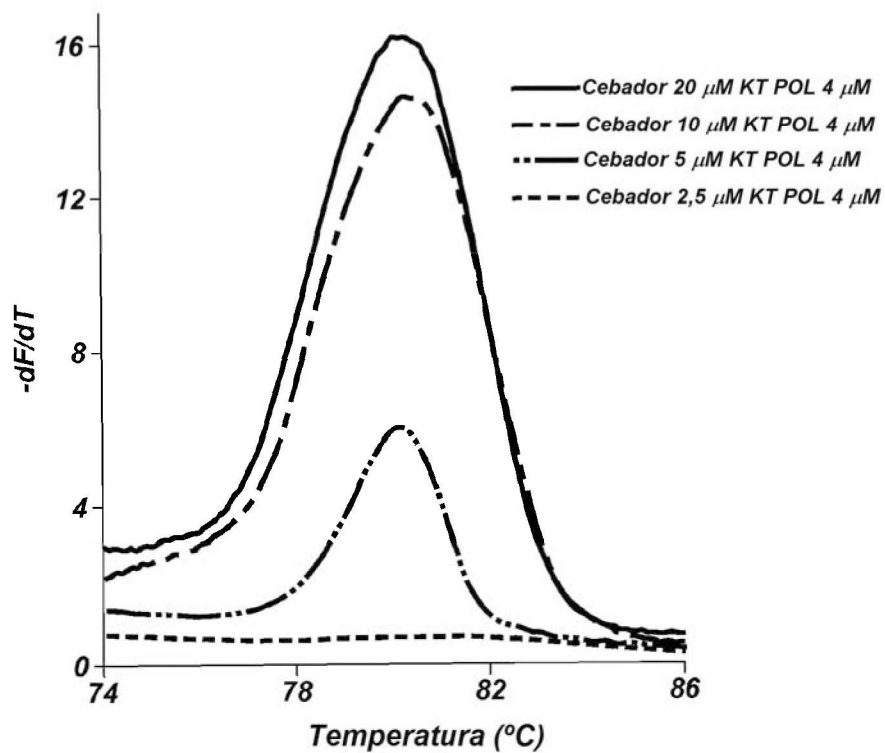


FIG. 5a

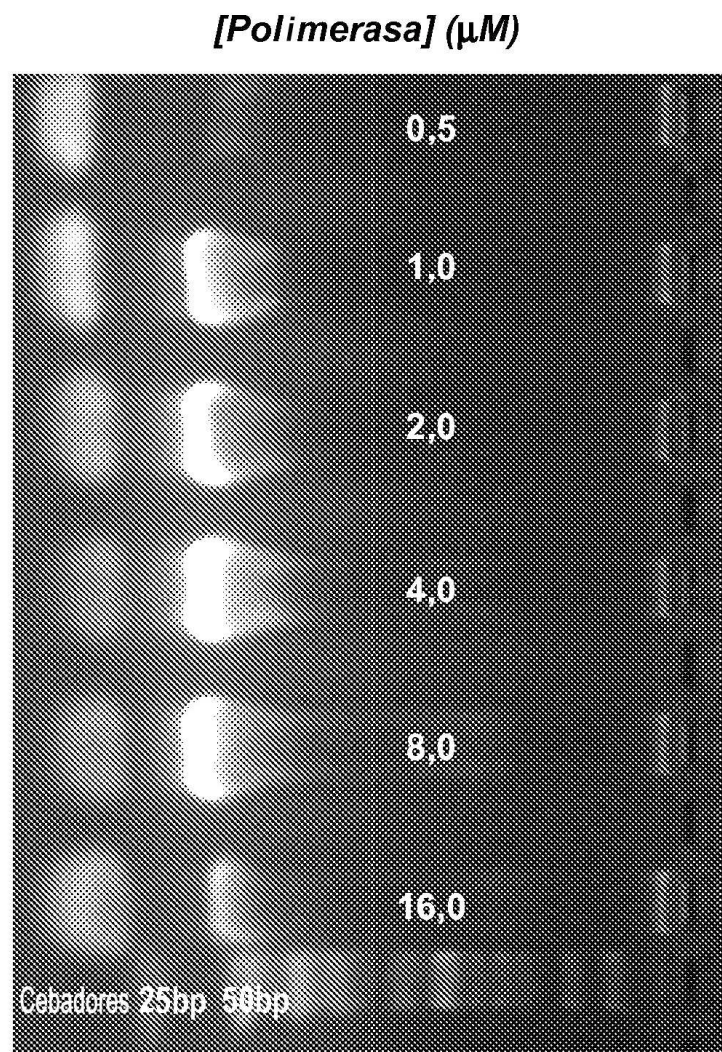


**FIG. 5b**

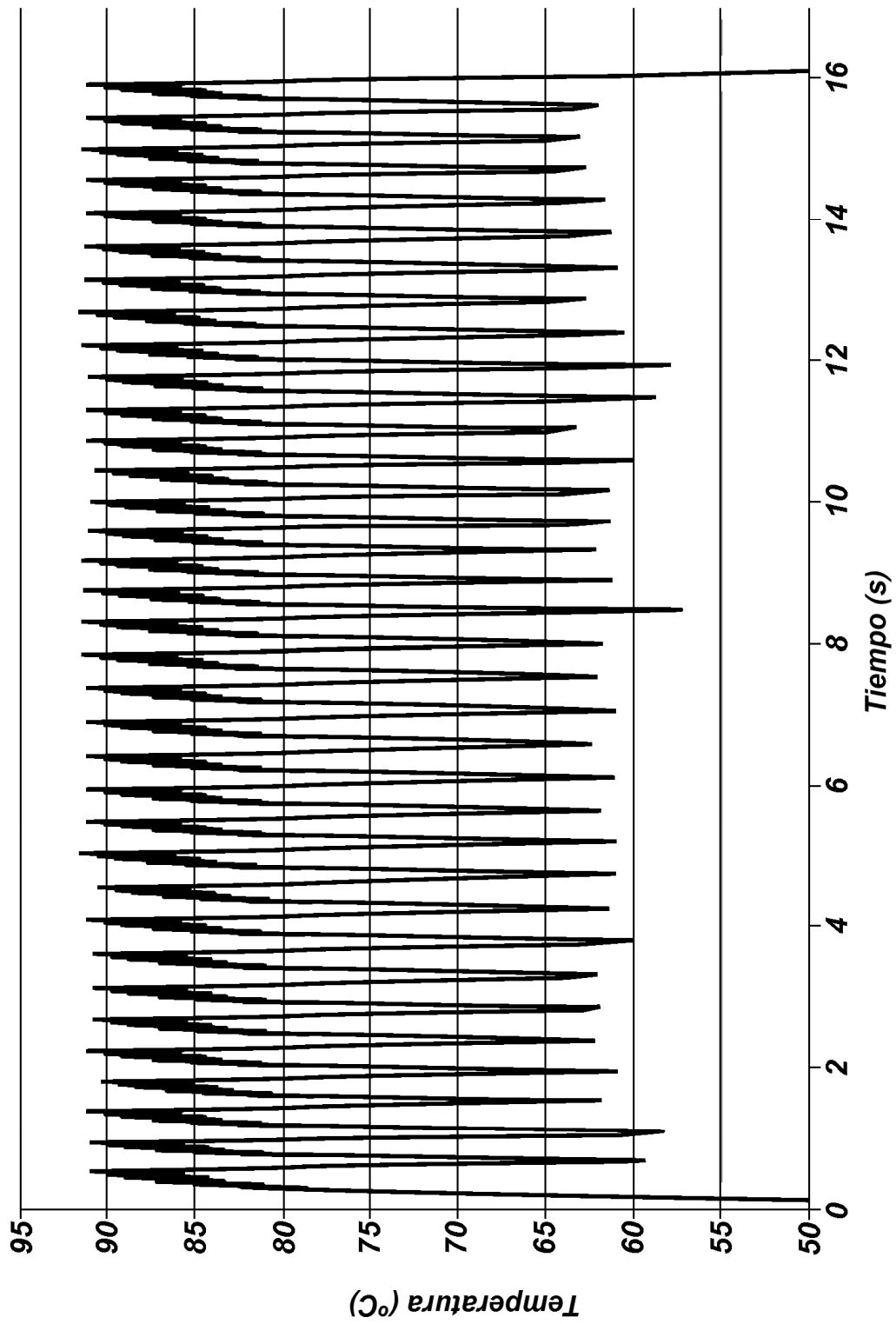


**FIG. 5c**

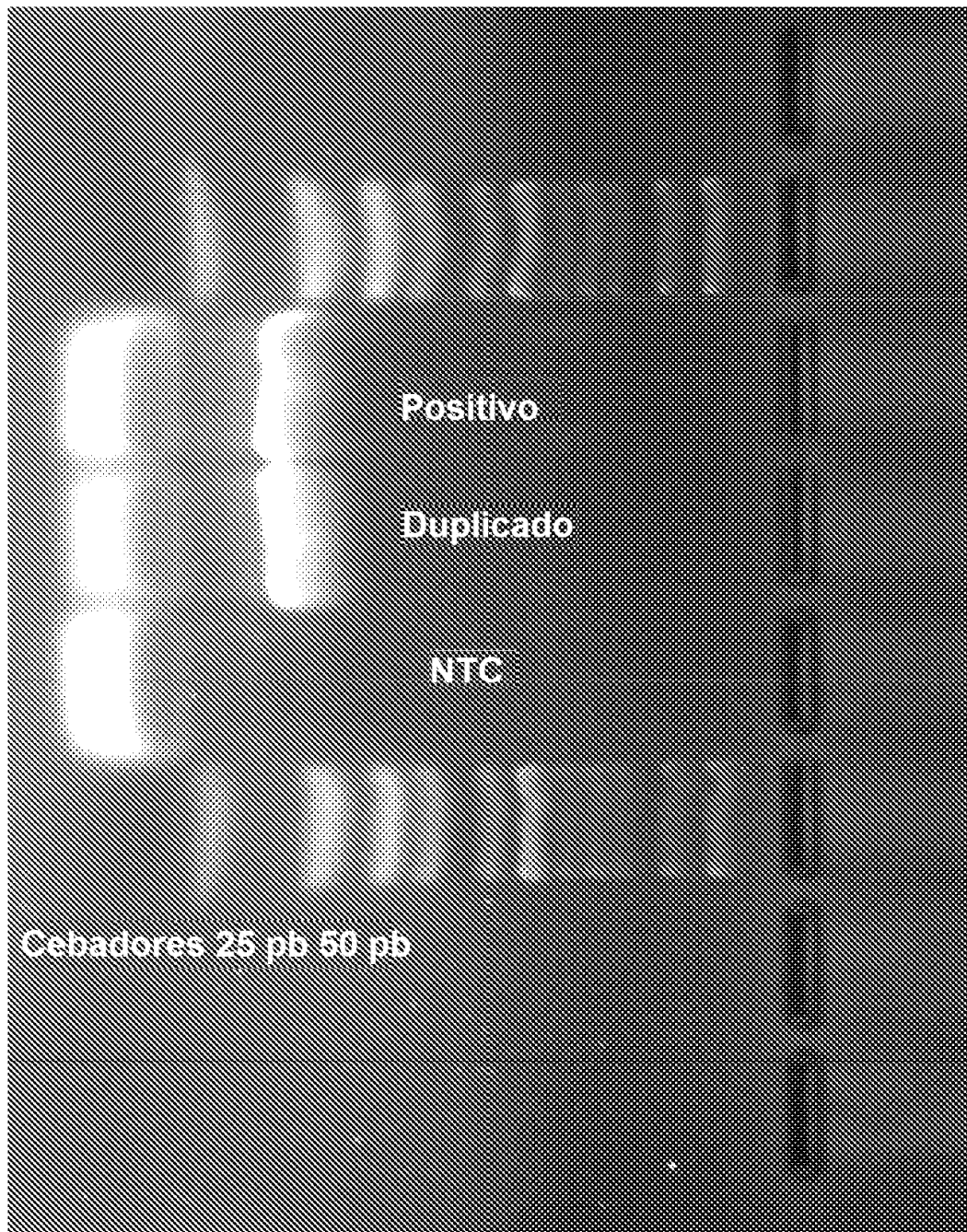




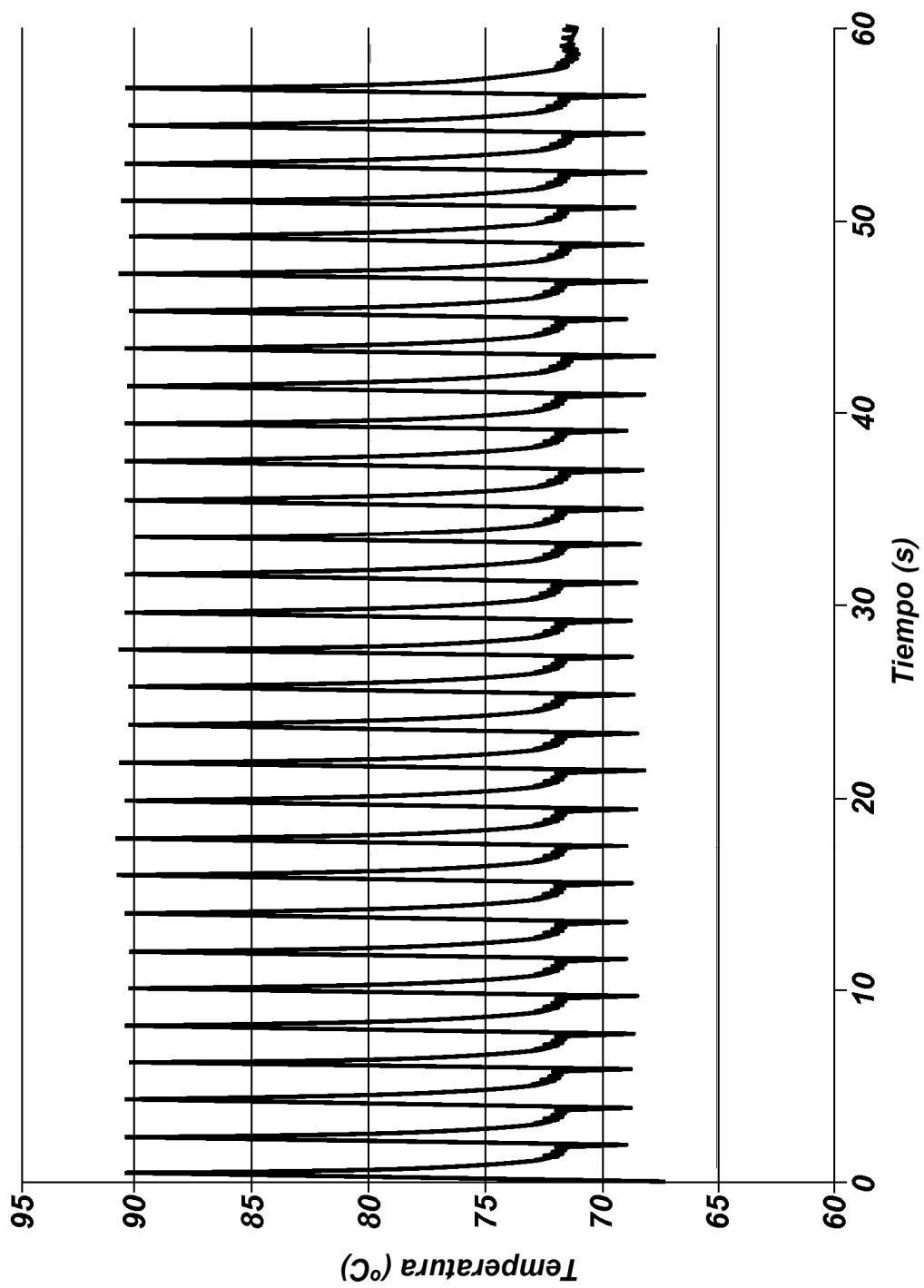
**FIG. 5d**



**FIG. 6a**



**FIG. 6b**



**FIG. 7a**



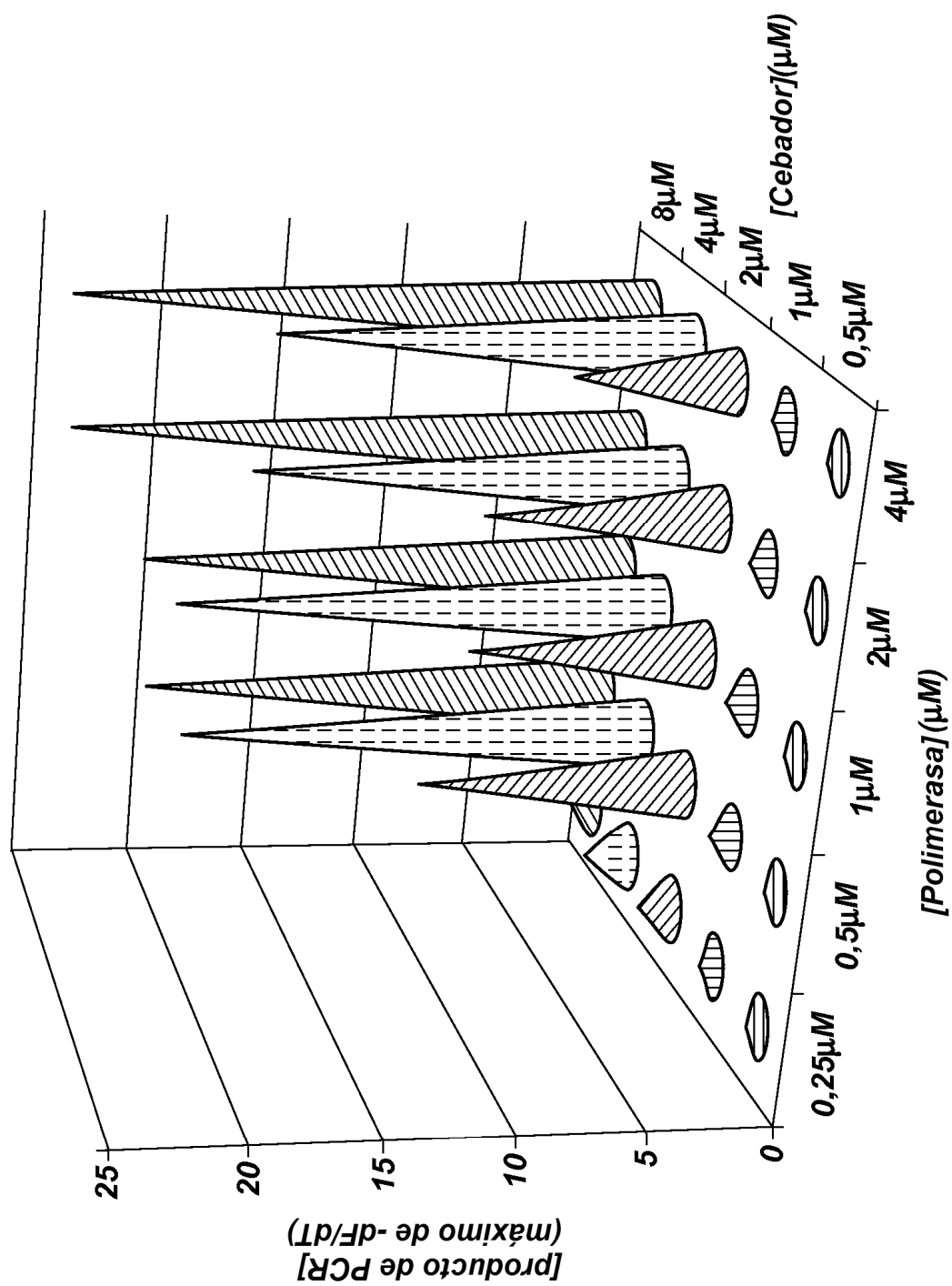
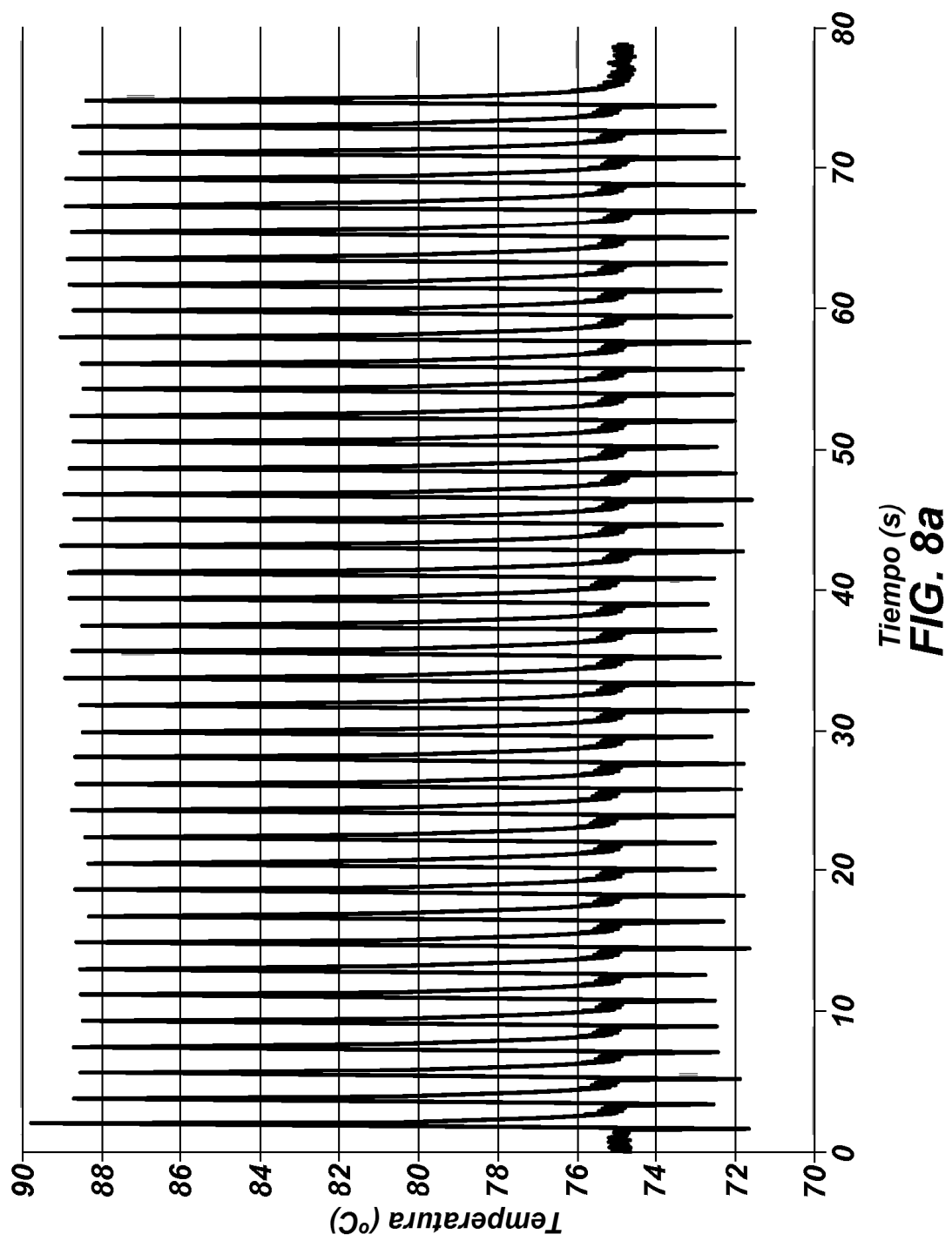
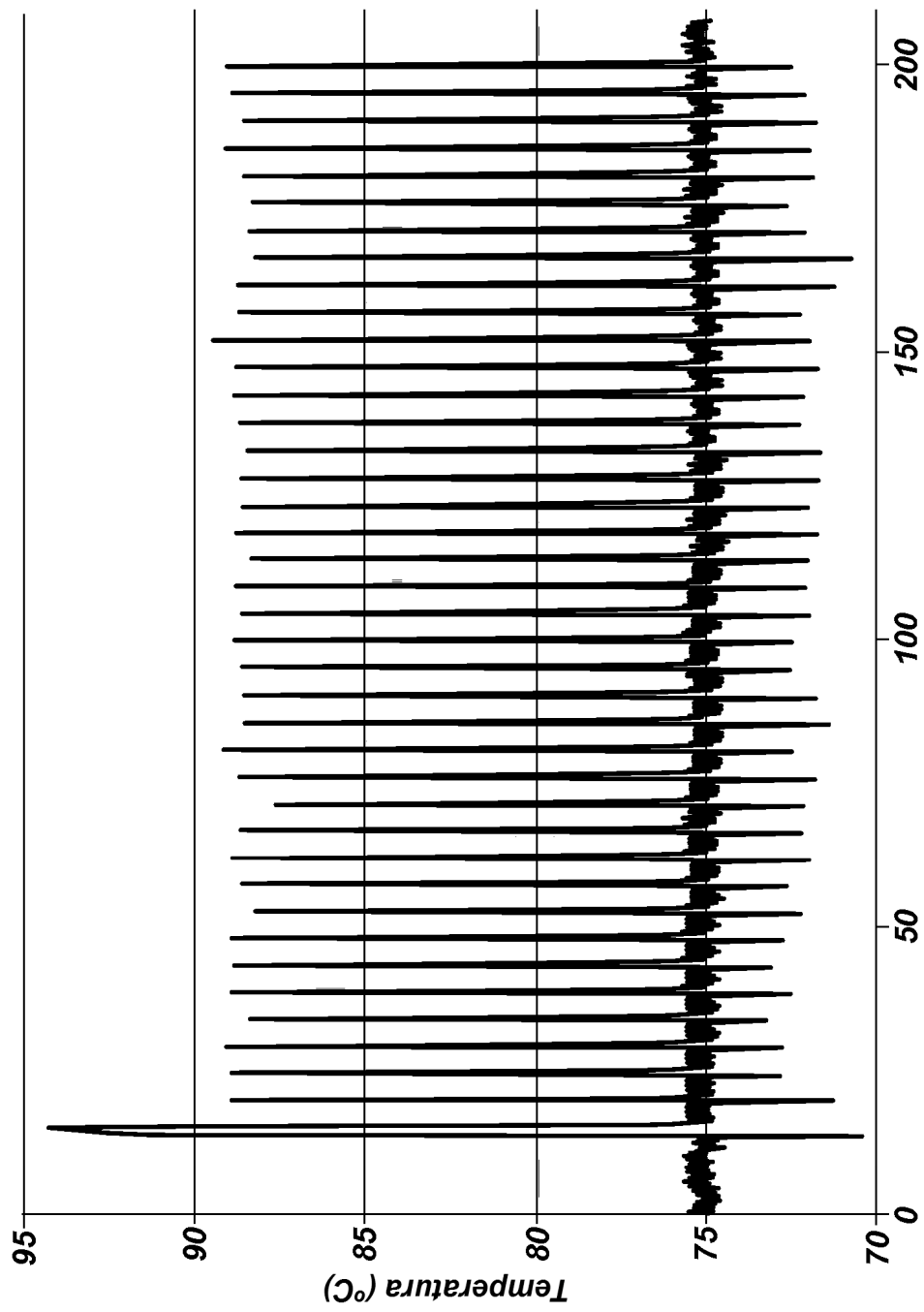


FIG. 7b





*Tiempo (s)*

**FIG. 8b**

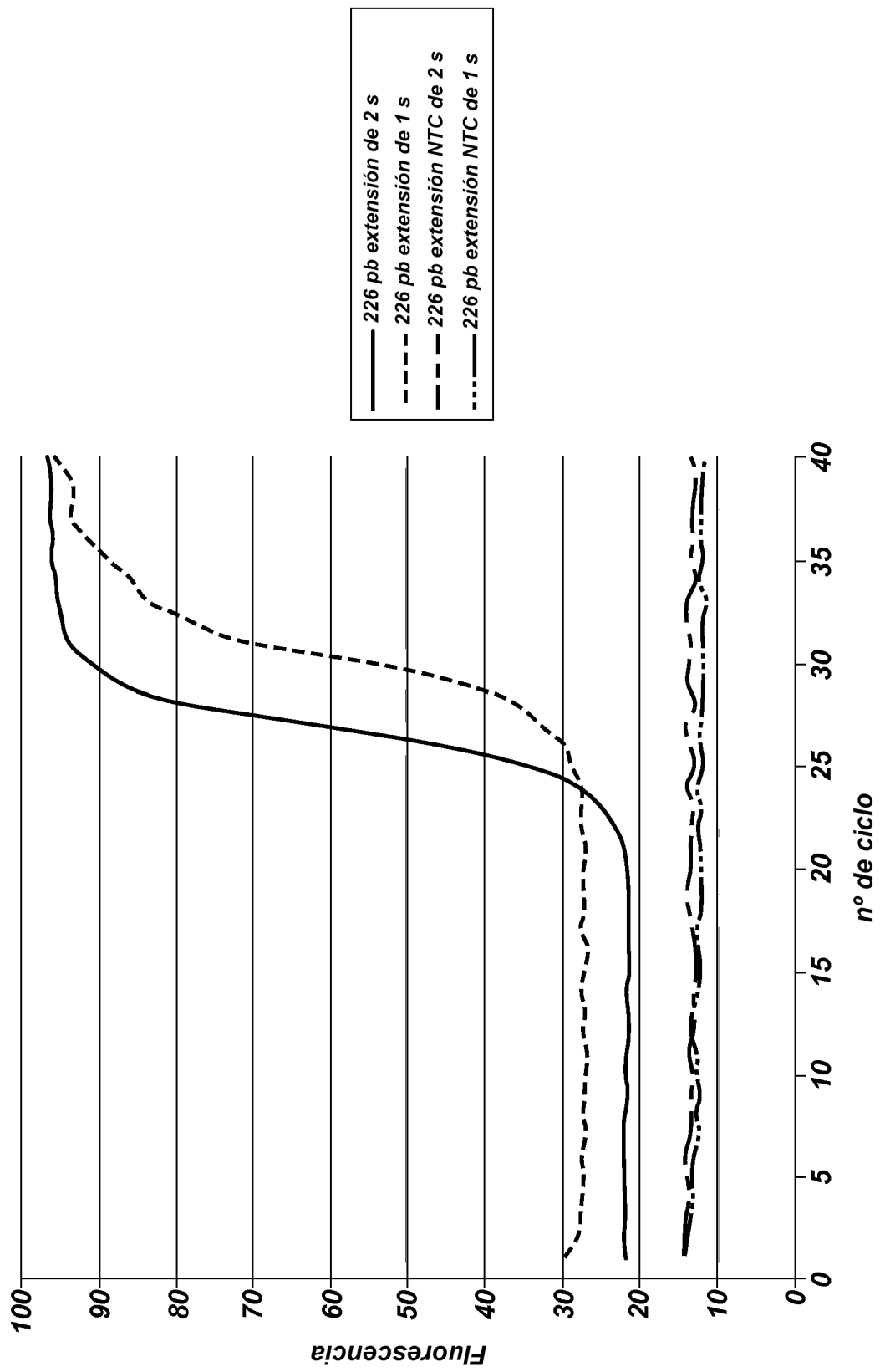
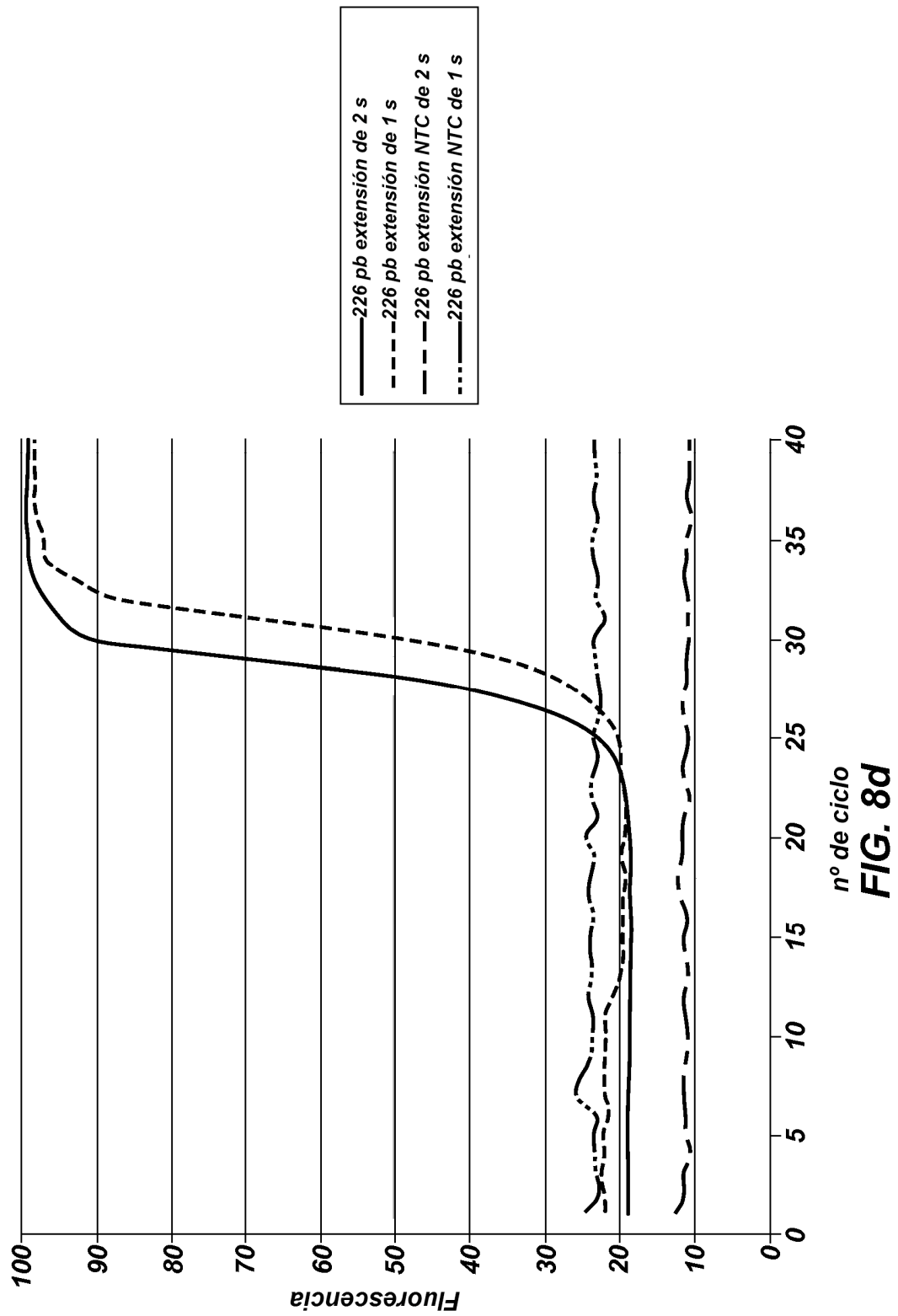
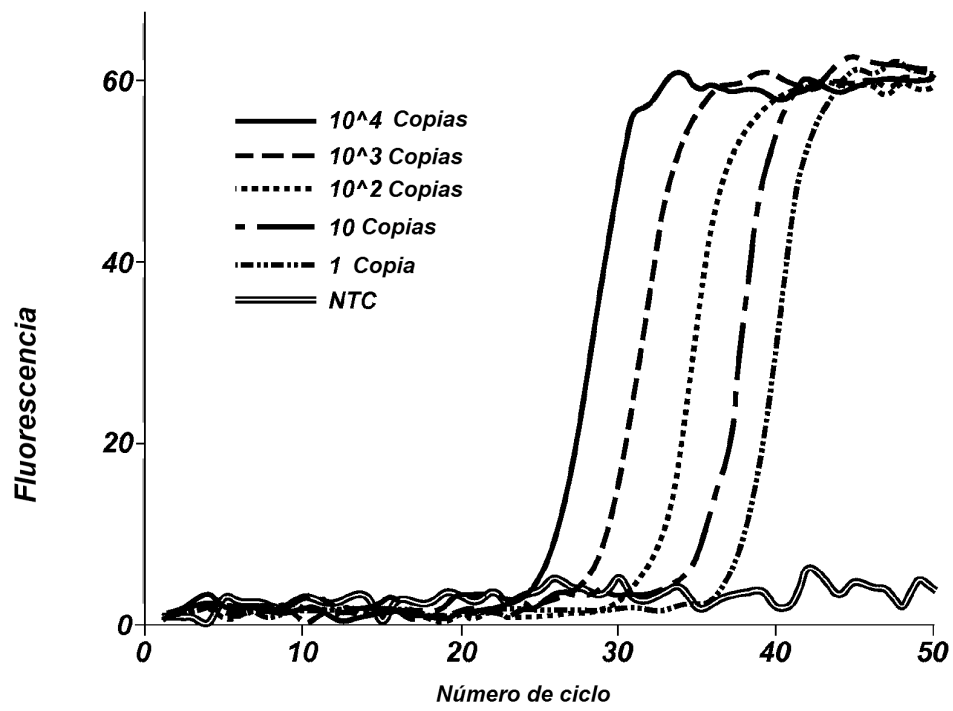


FIG. 8c

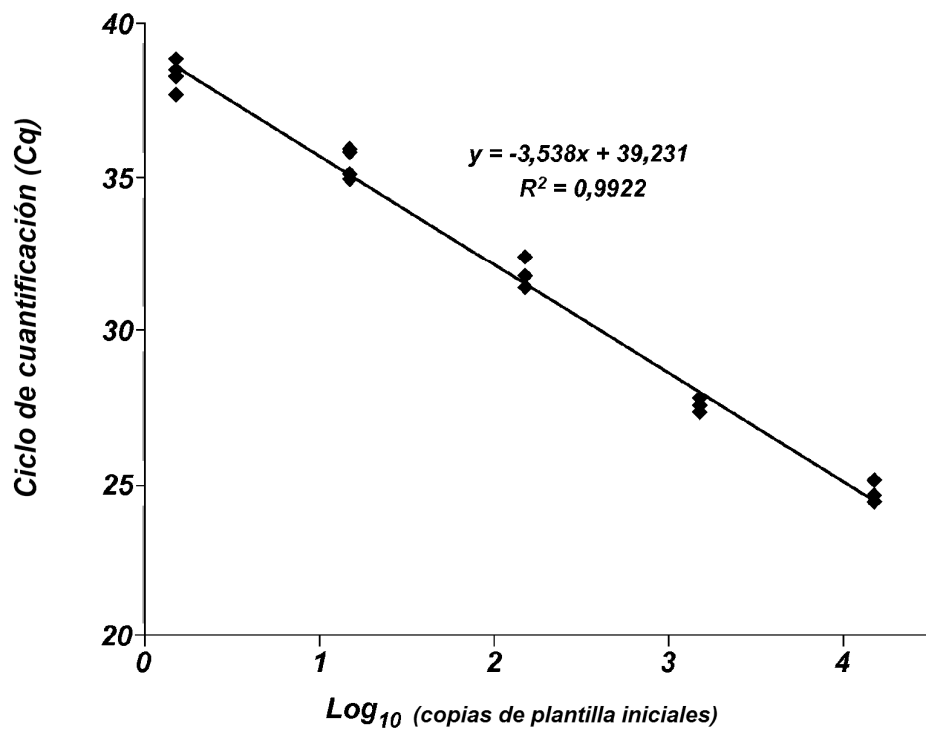




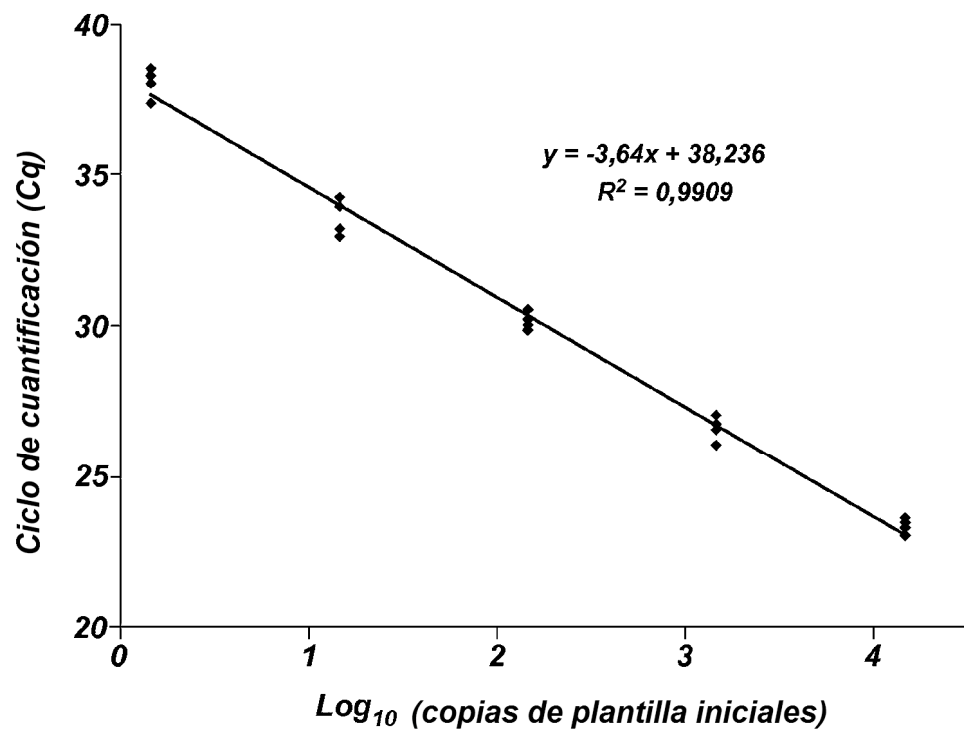
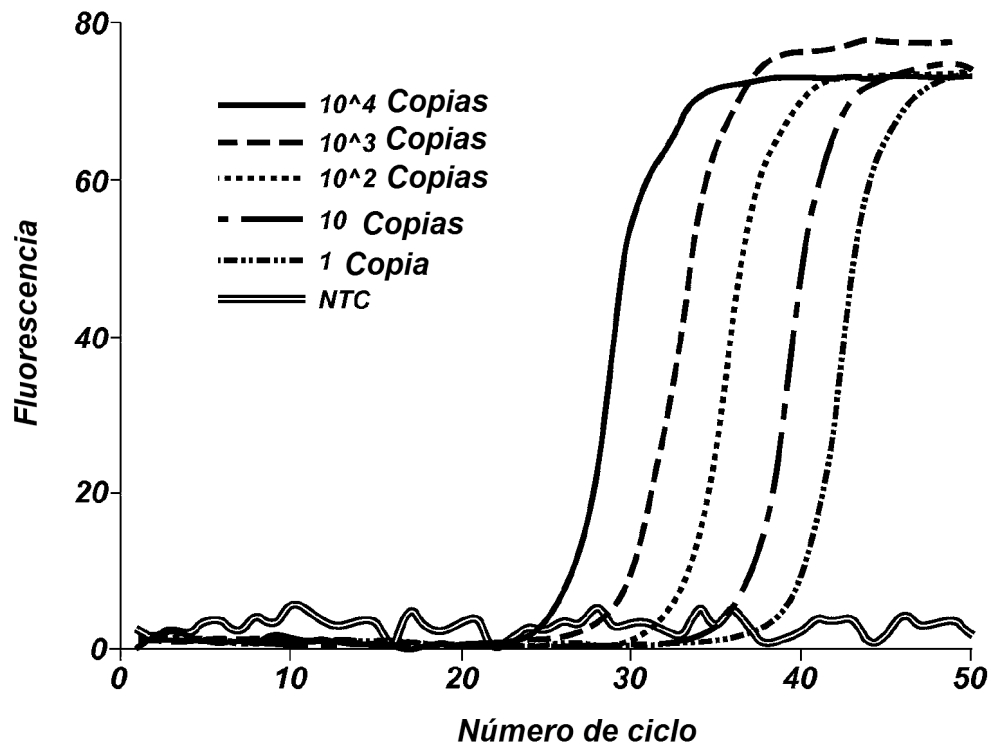
n° de ciclo  
**FIG. 8d**

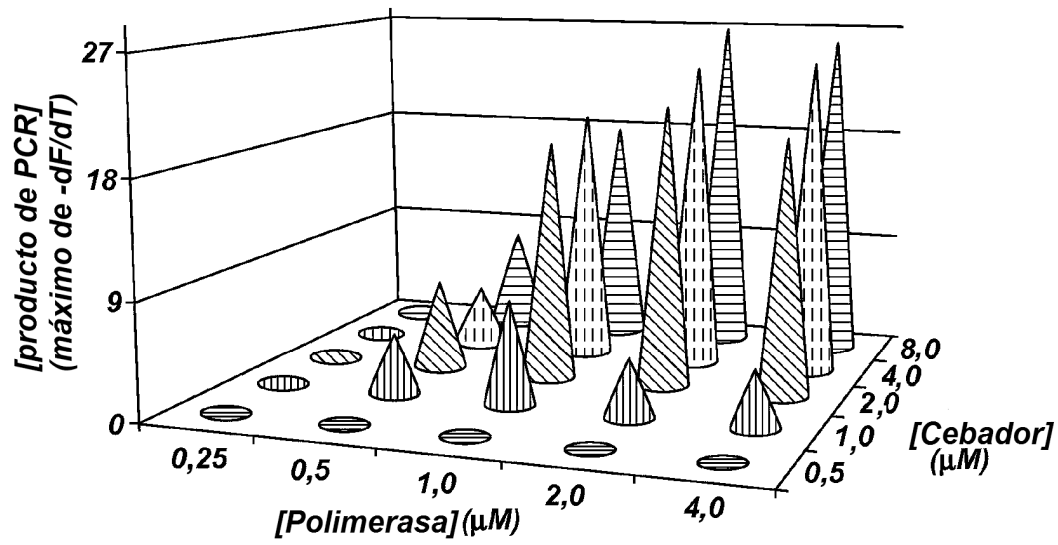


**FIG. 9a**

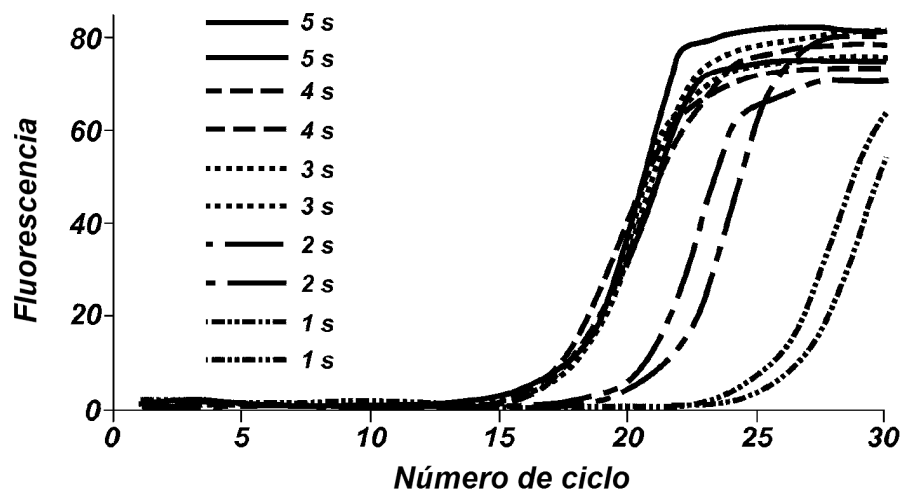


**FIG. 9b**

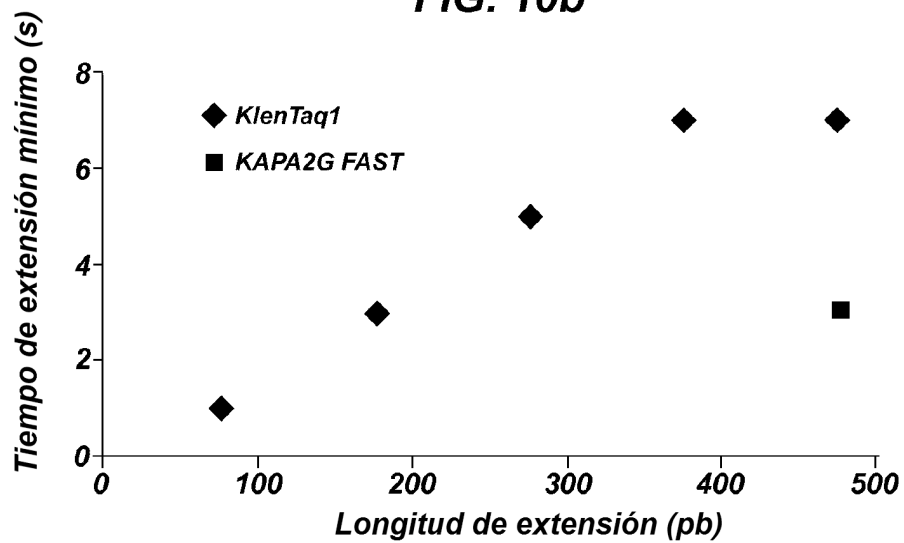




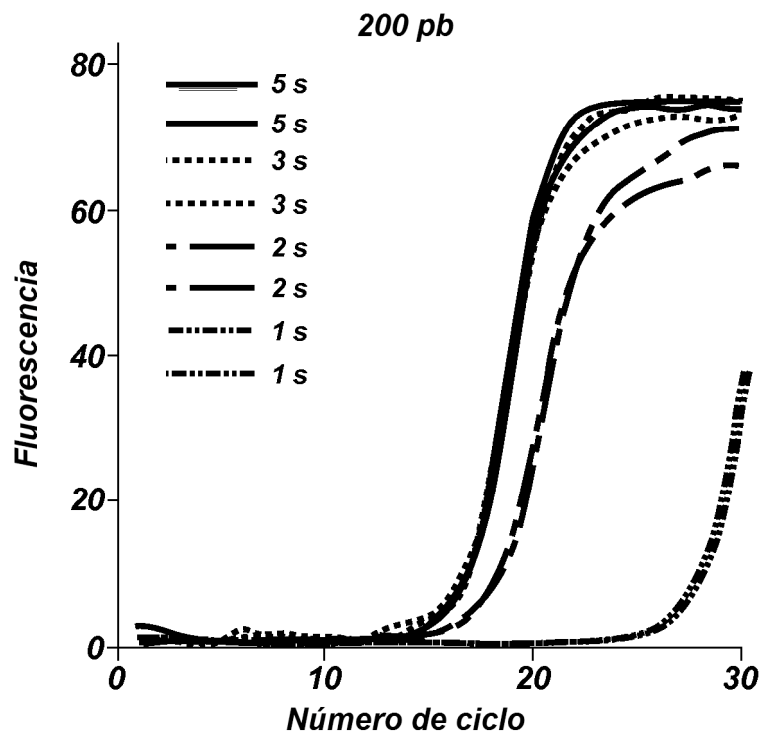
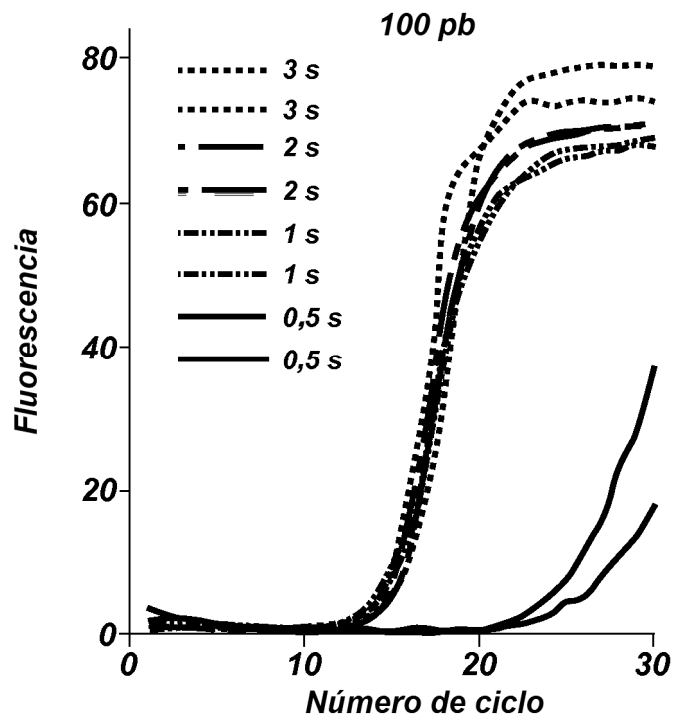
**FIG. 10a**

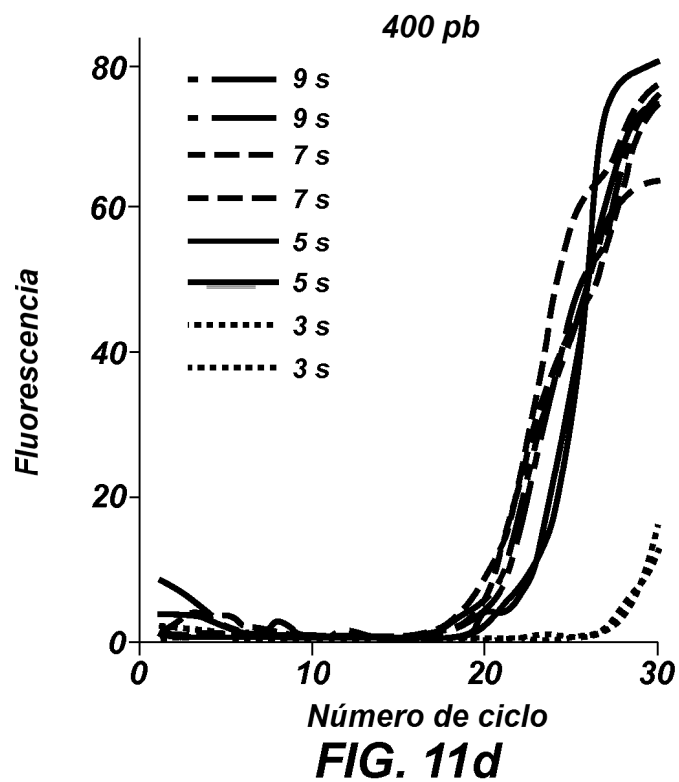
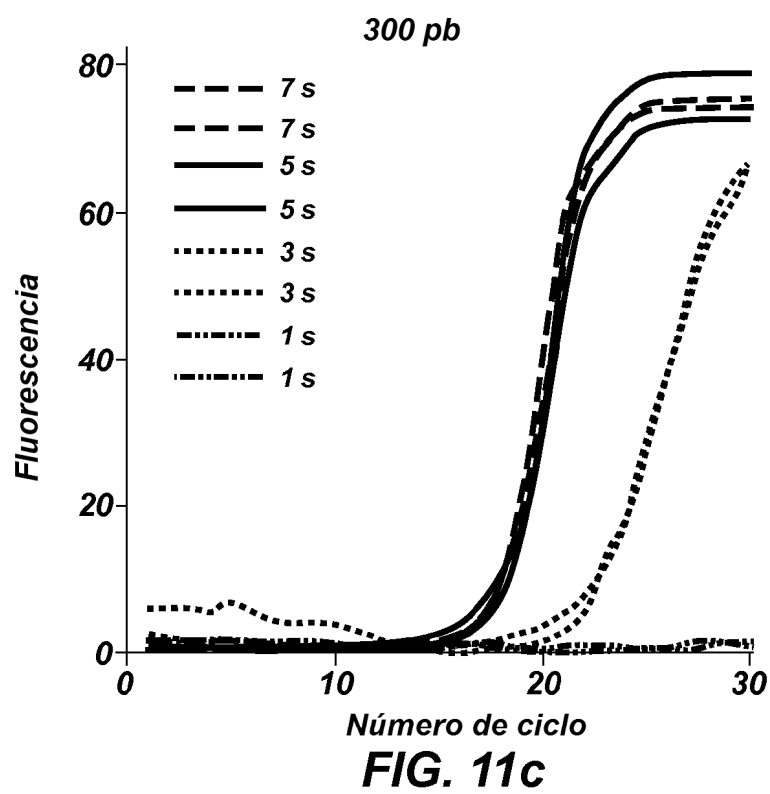


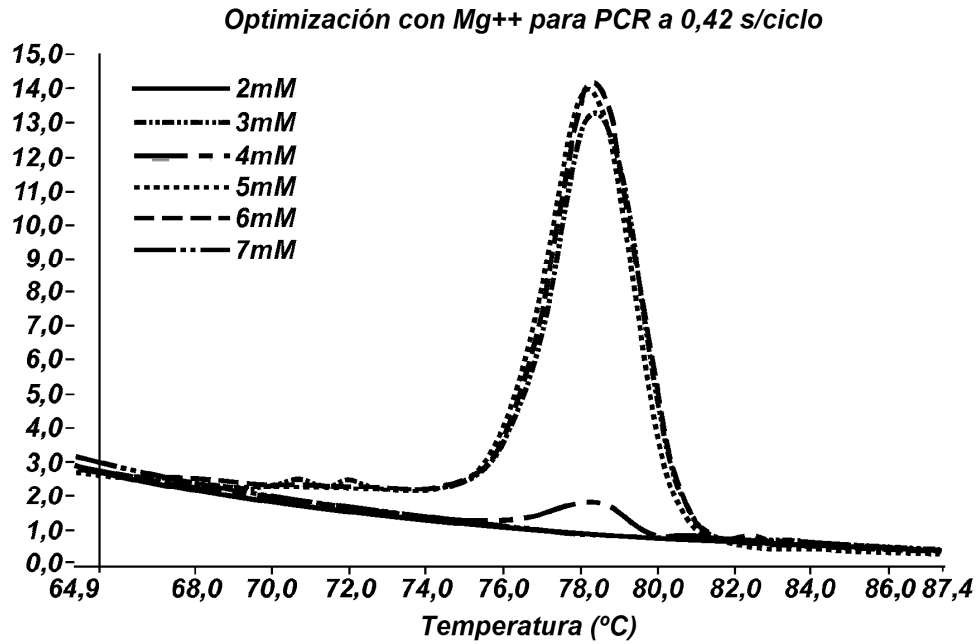
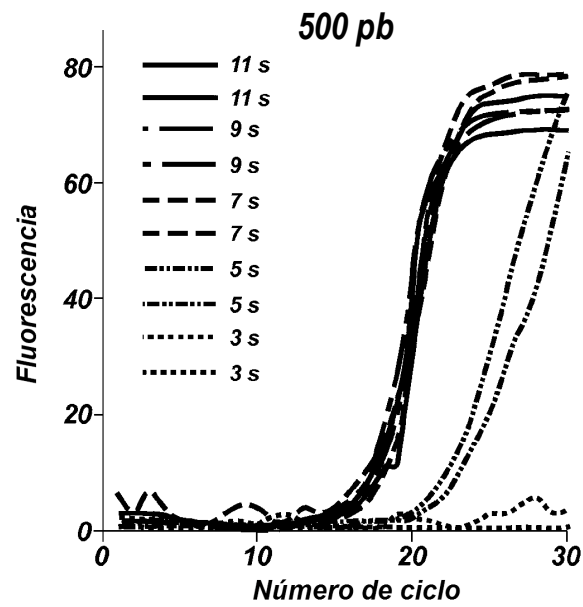
**FIG. 10b**



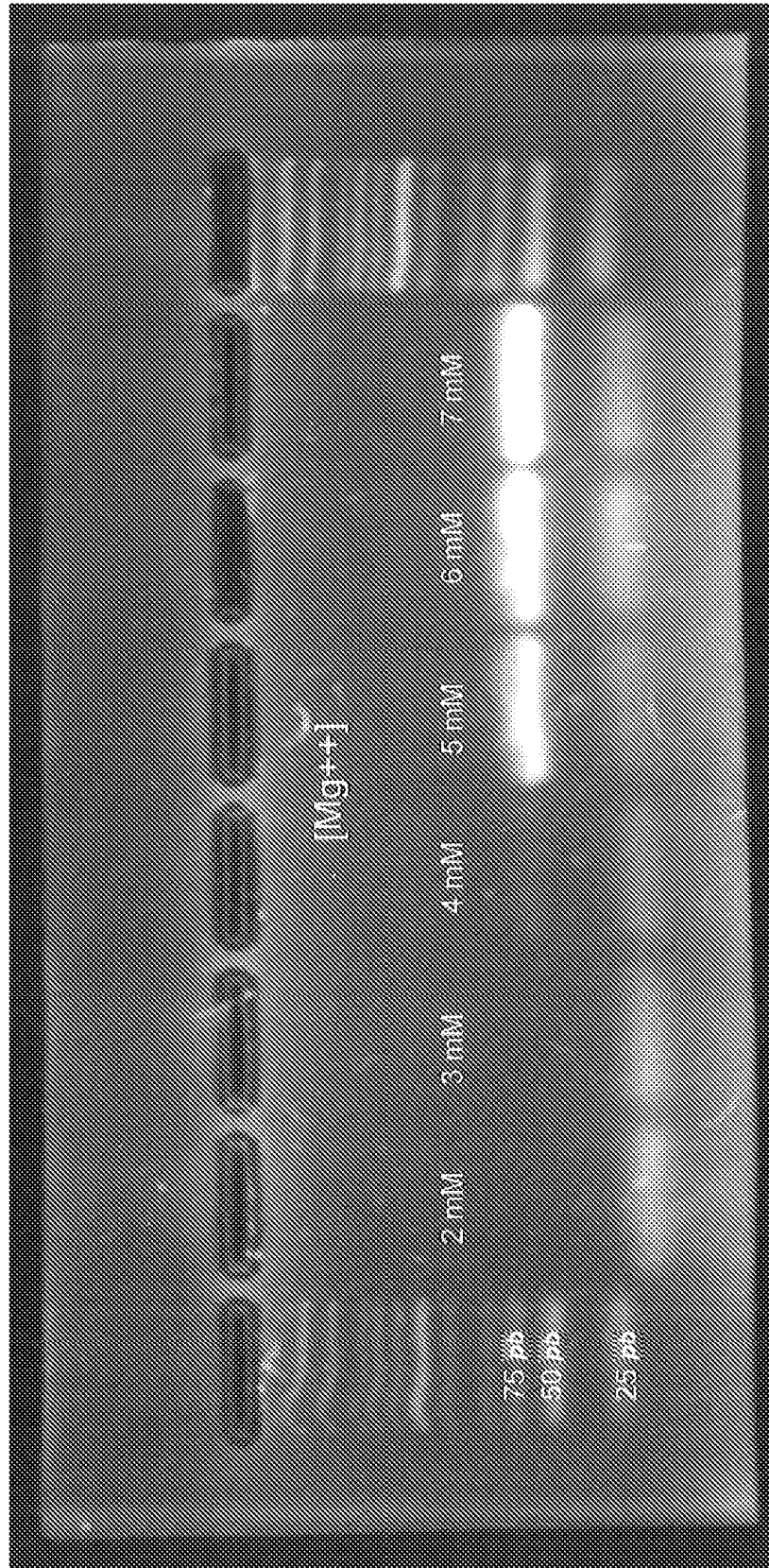
**FIG. 10c**







Optimización con  $Mg^{++}$  para gel de PCR a 0,42 s/ciclo



**FIG. 12b**



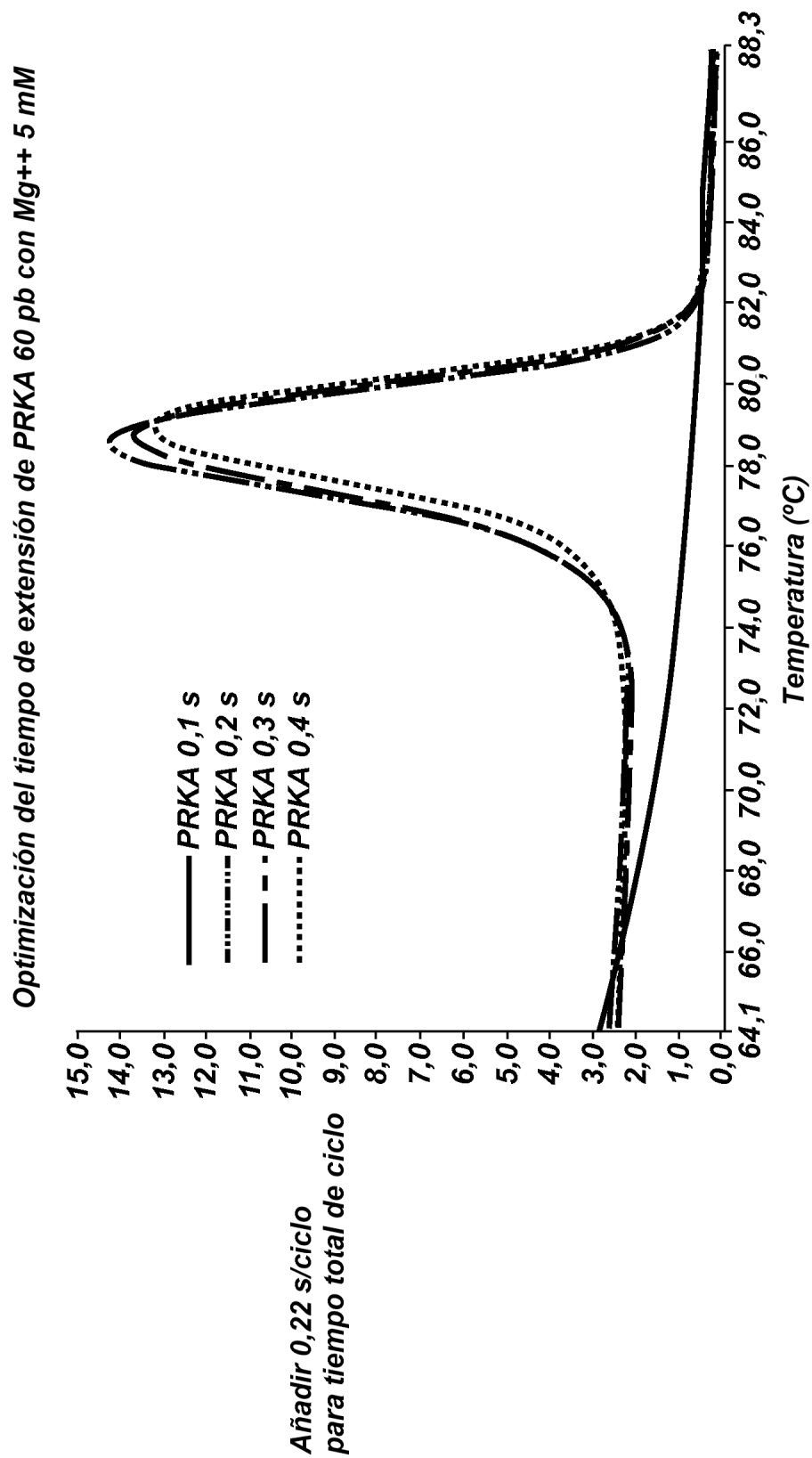
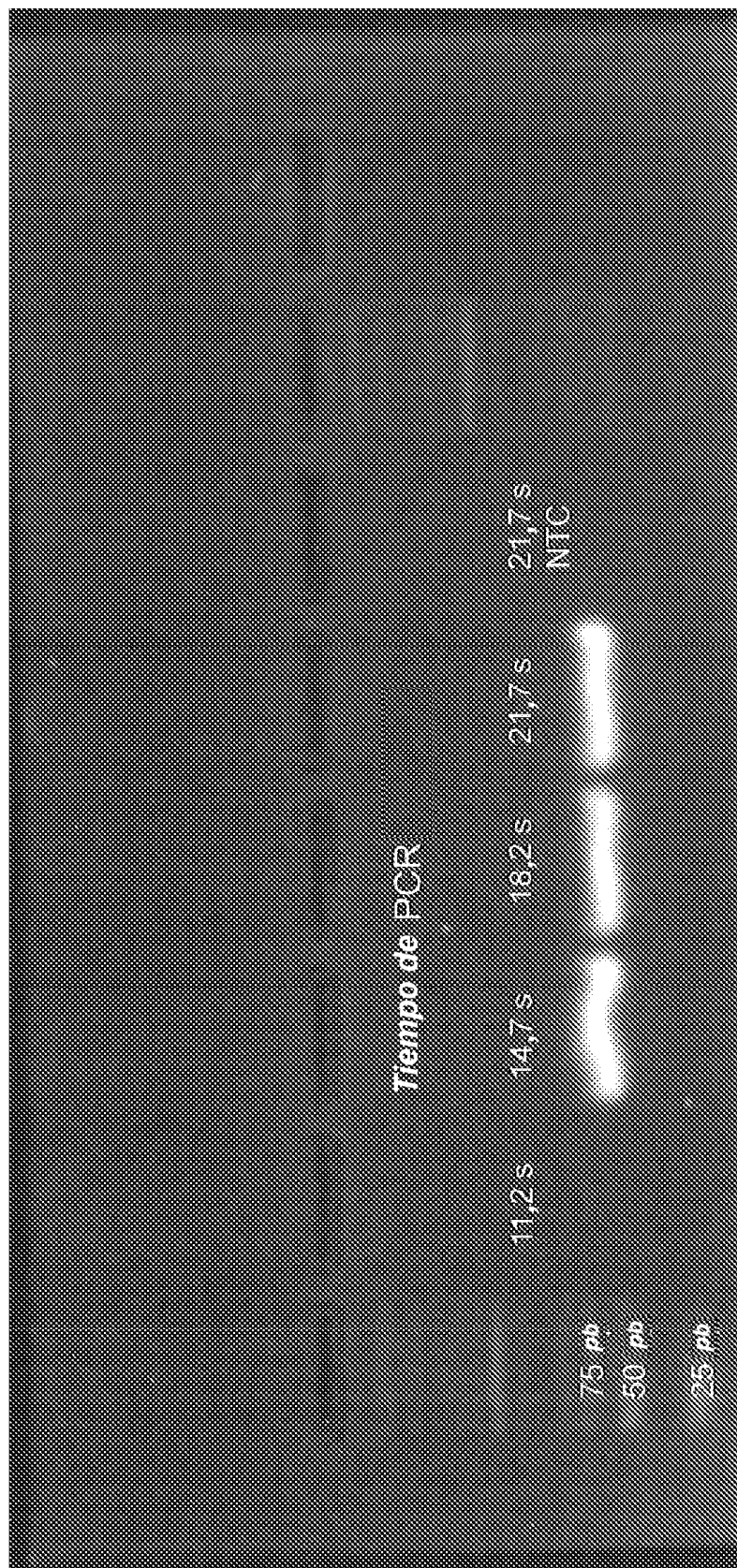
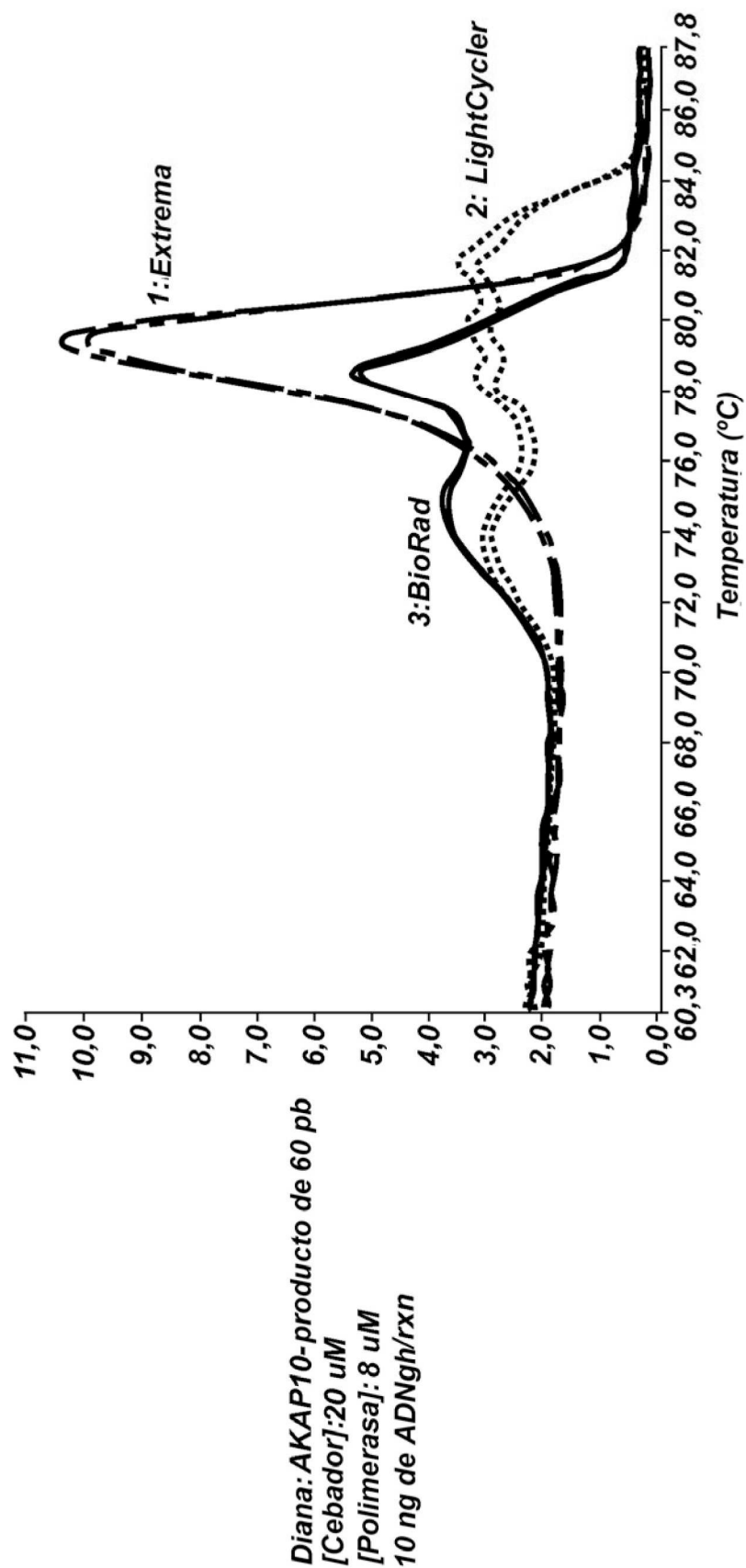


FIG. 13a

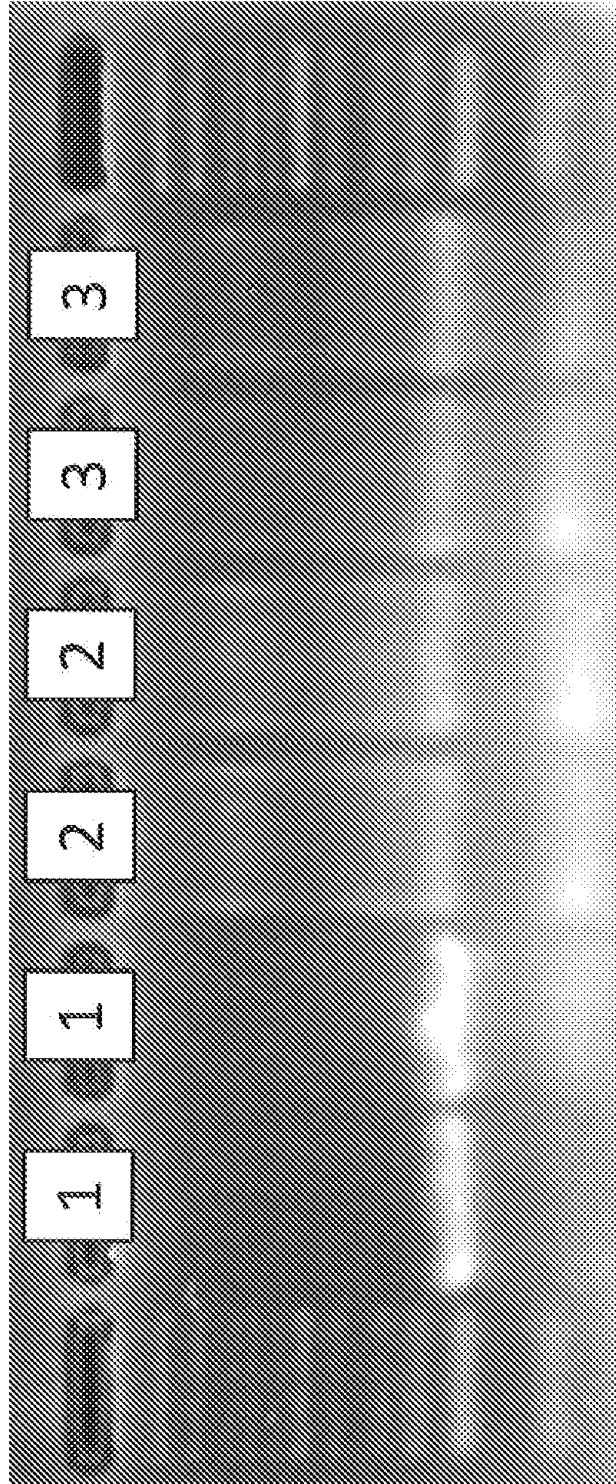
*Optimización del tiempo de extensión con gel de Mg++ 5 mM*



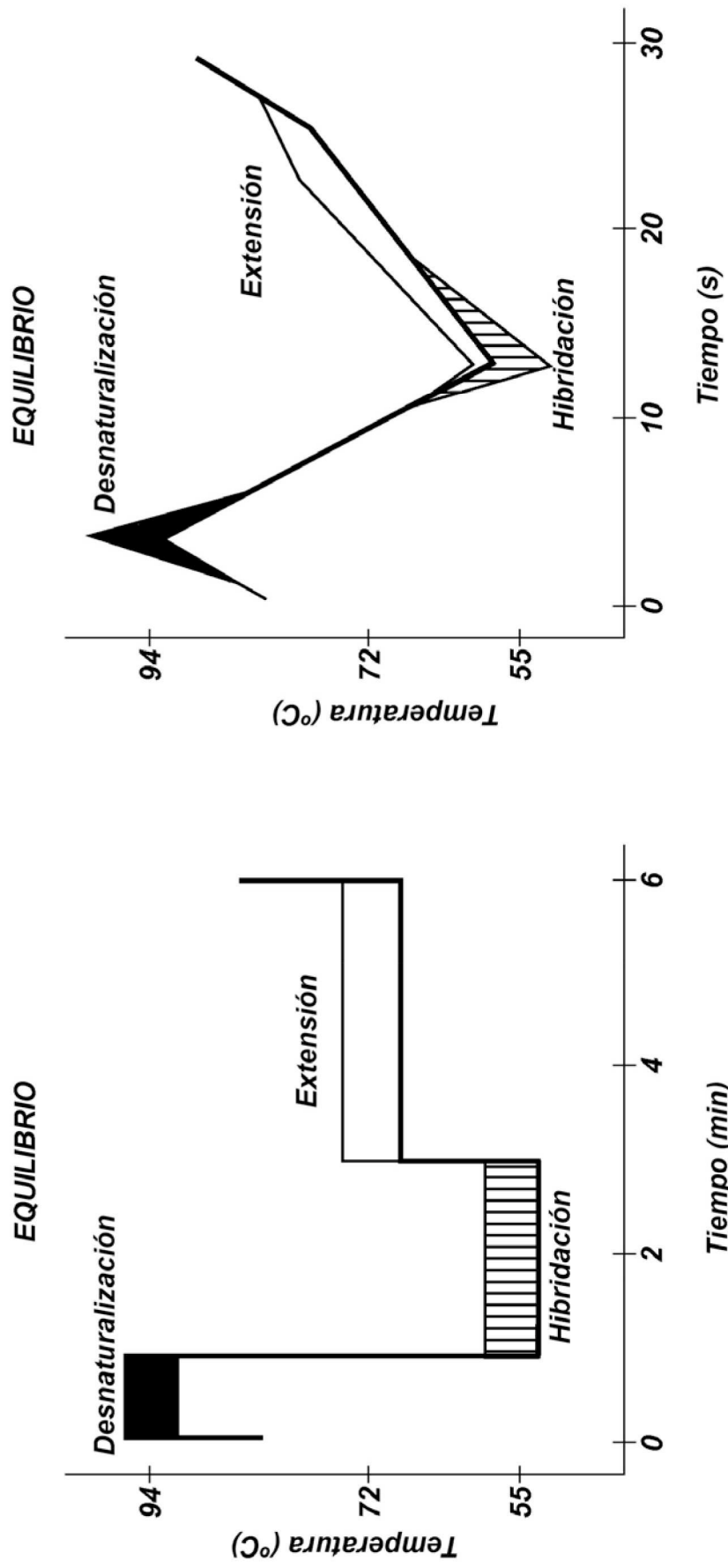
**FIG. 13b**



**FIG. 14a**



**FIG. 14b**



**FIG. 15a**

**FIG. 15b**

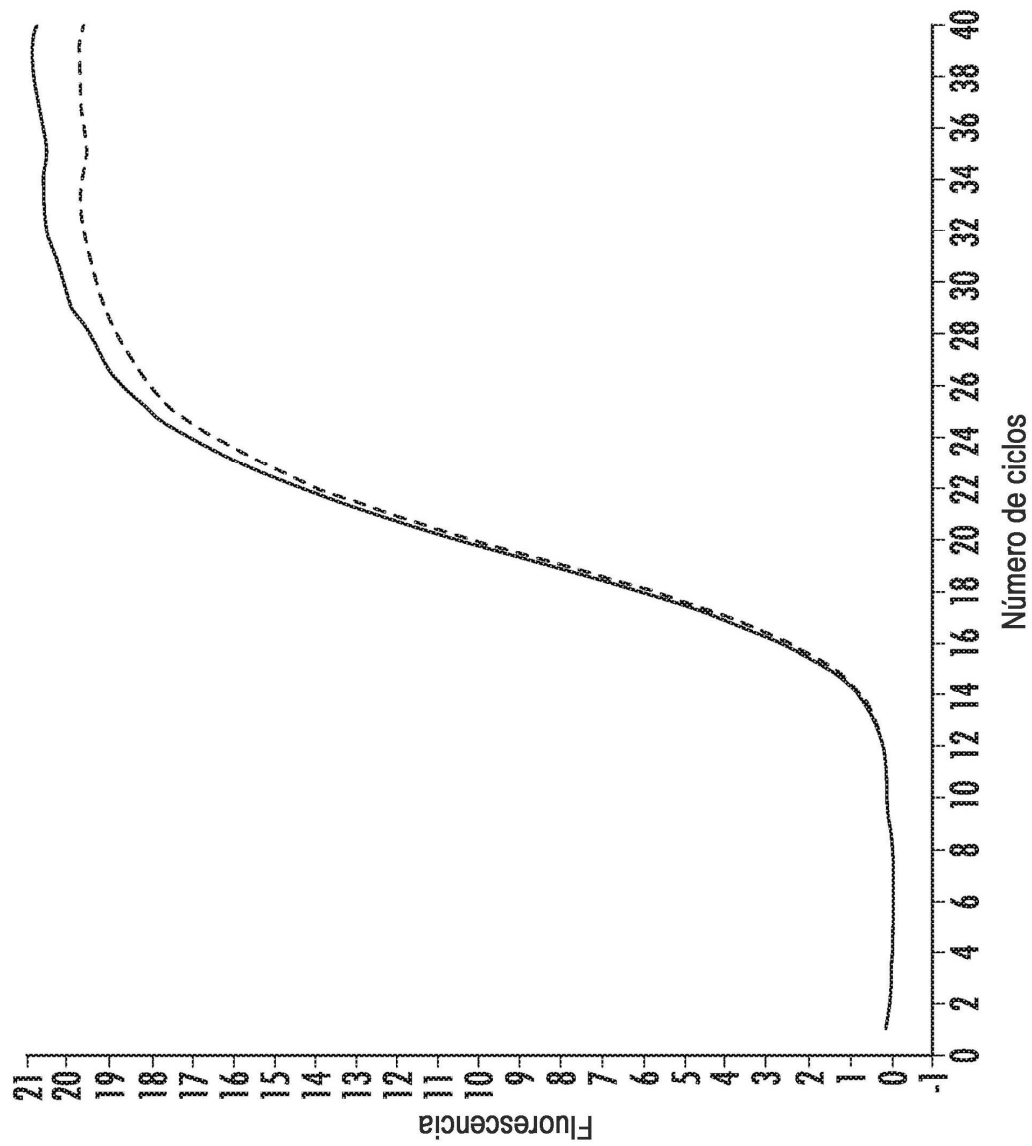
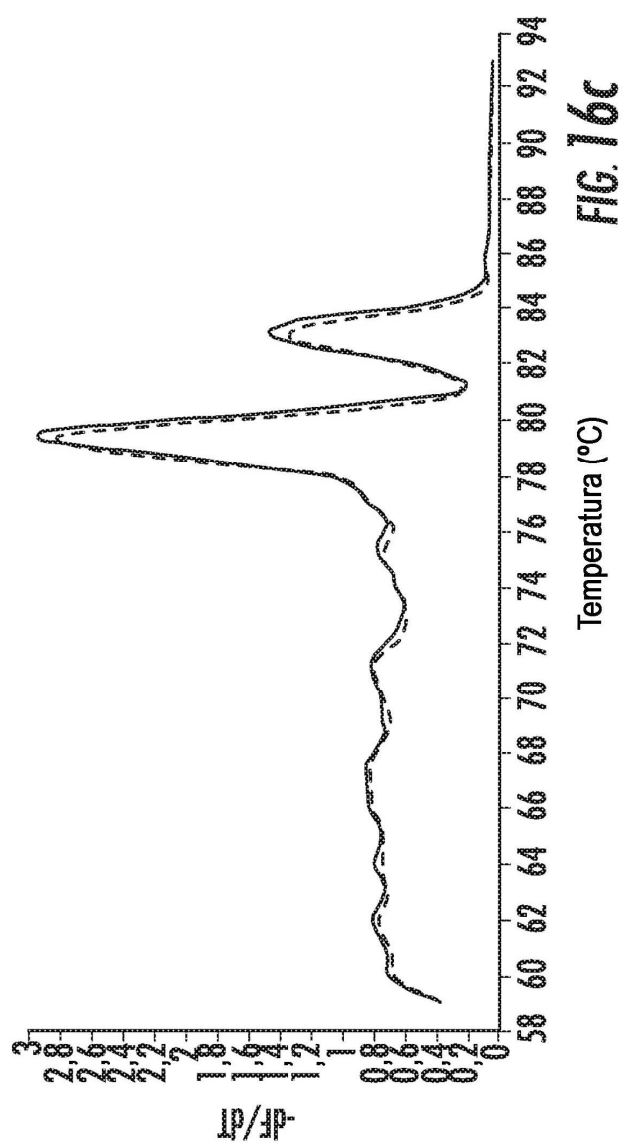
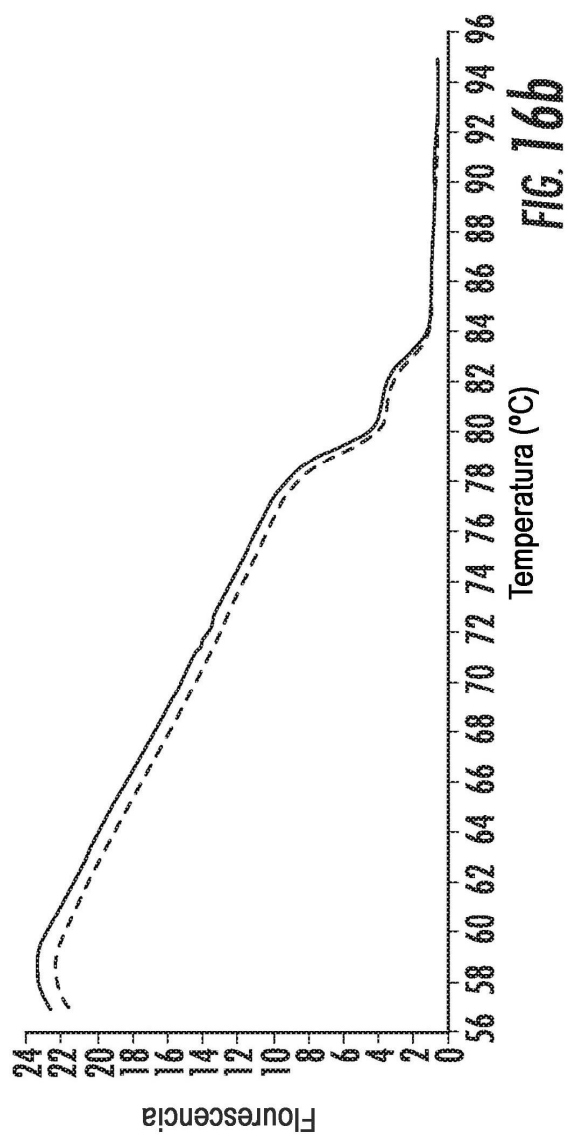


FIG. 16a



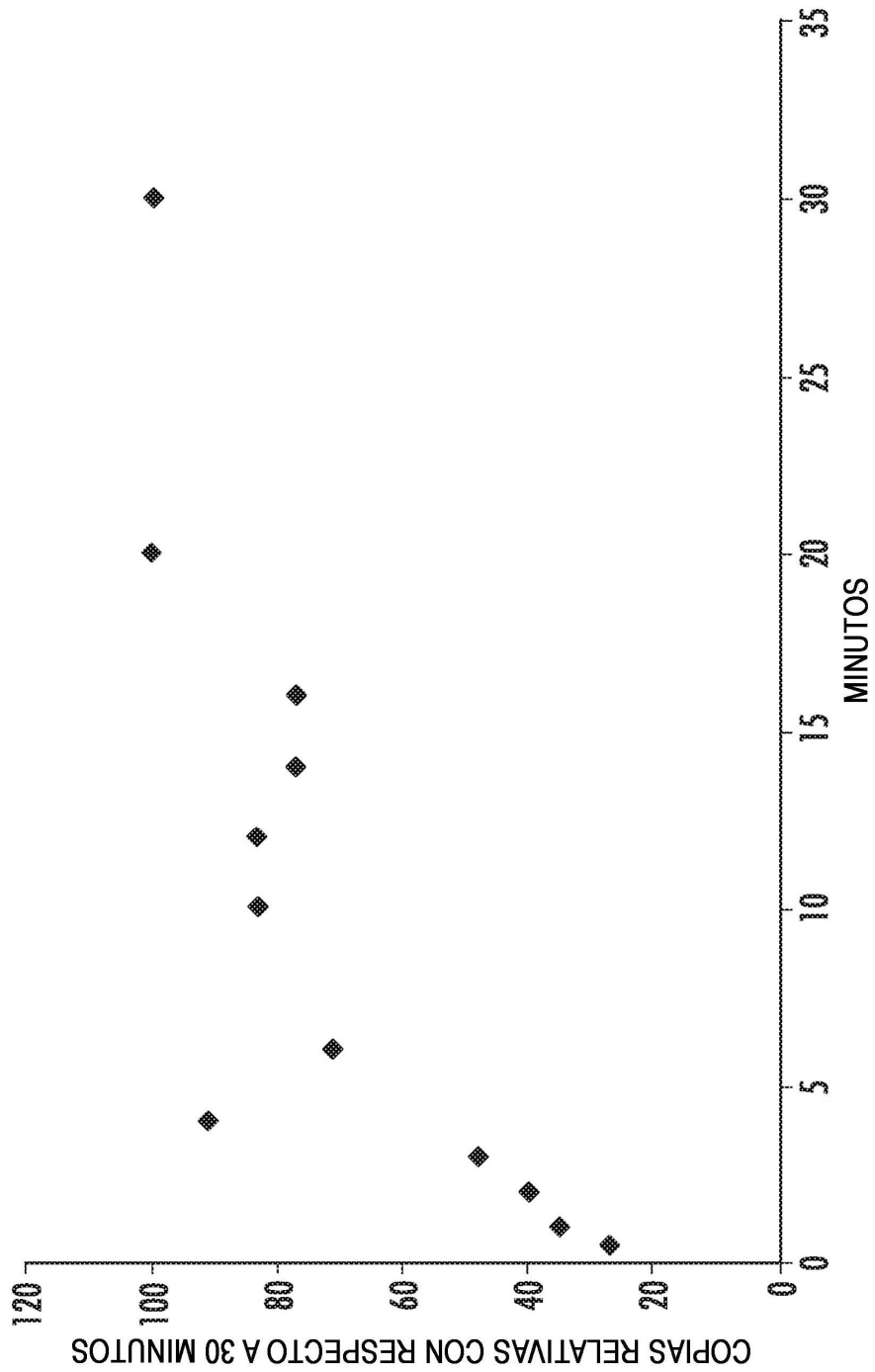


FIG. 17



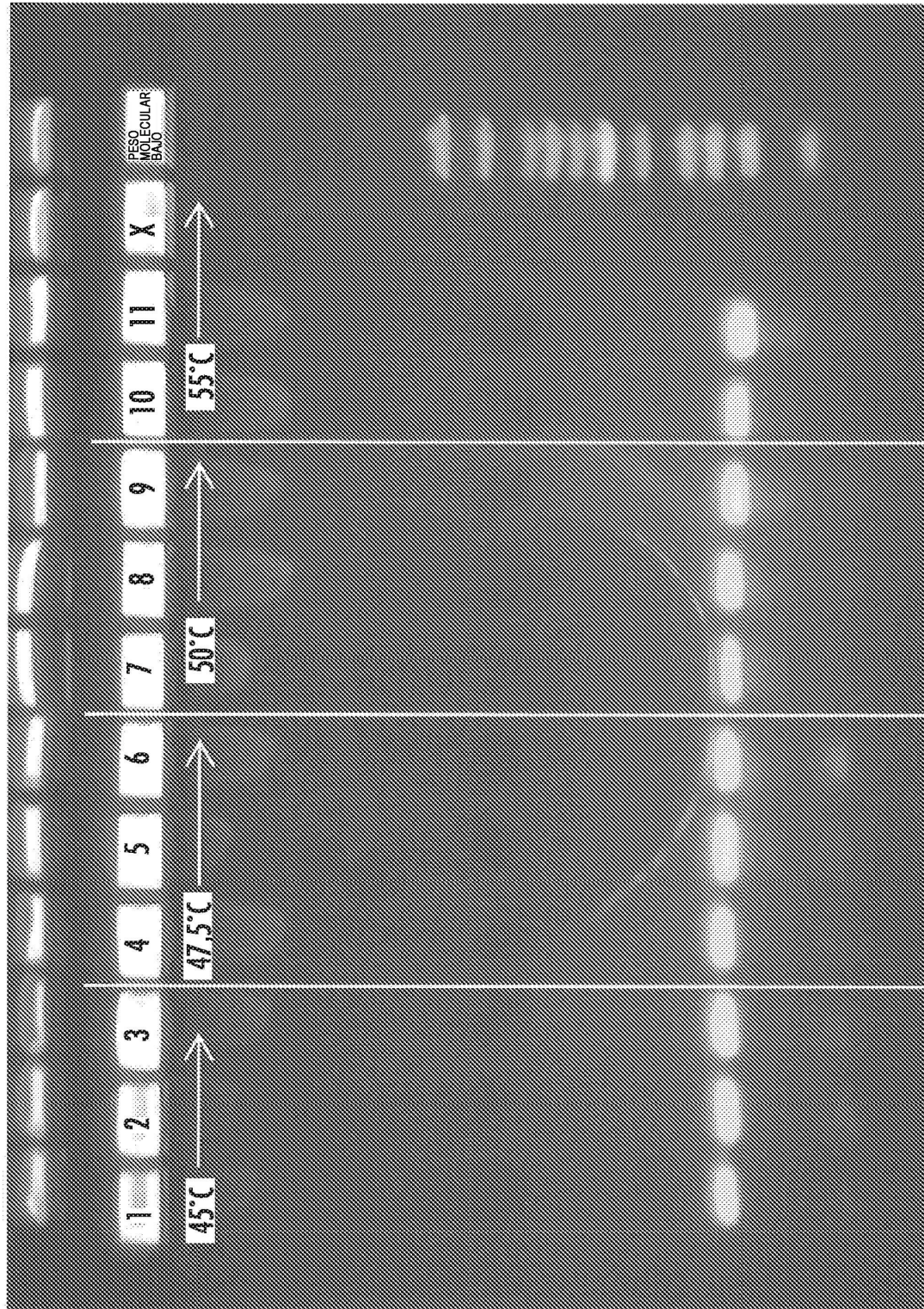
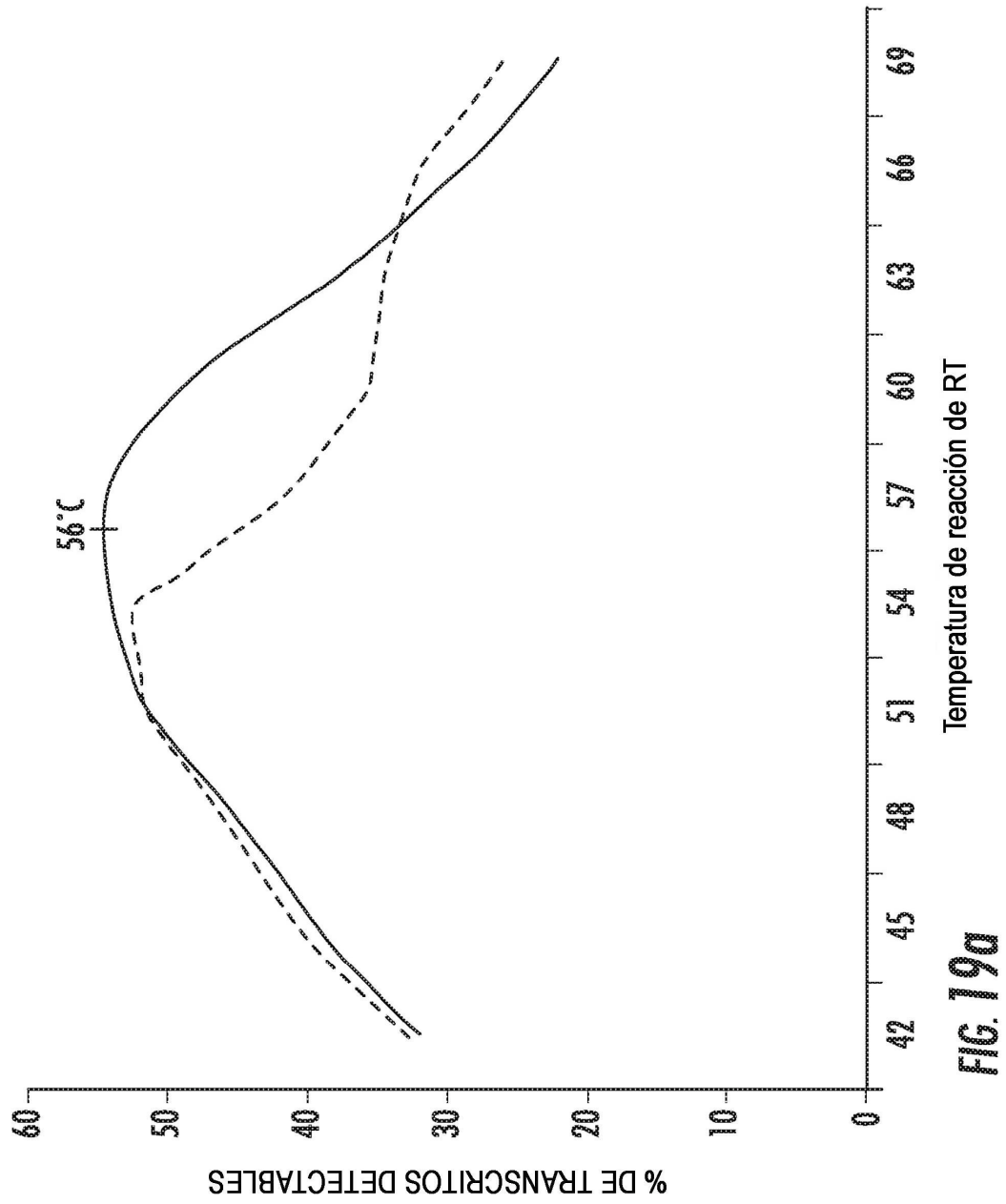


FIG. 18





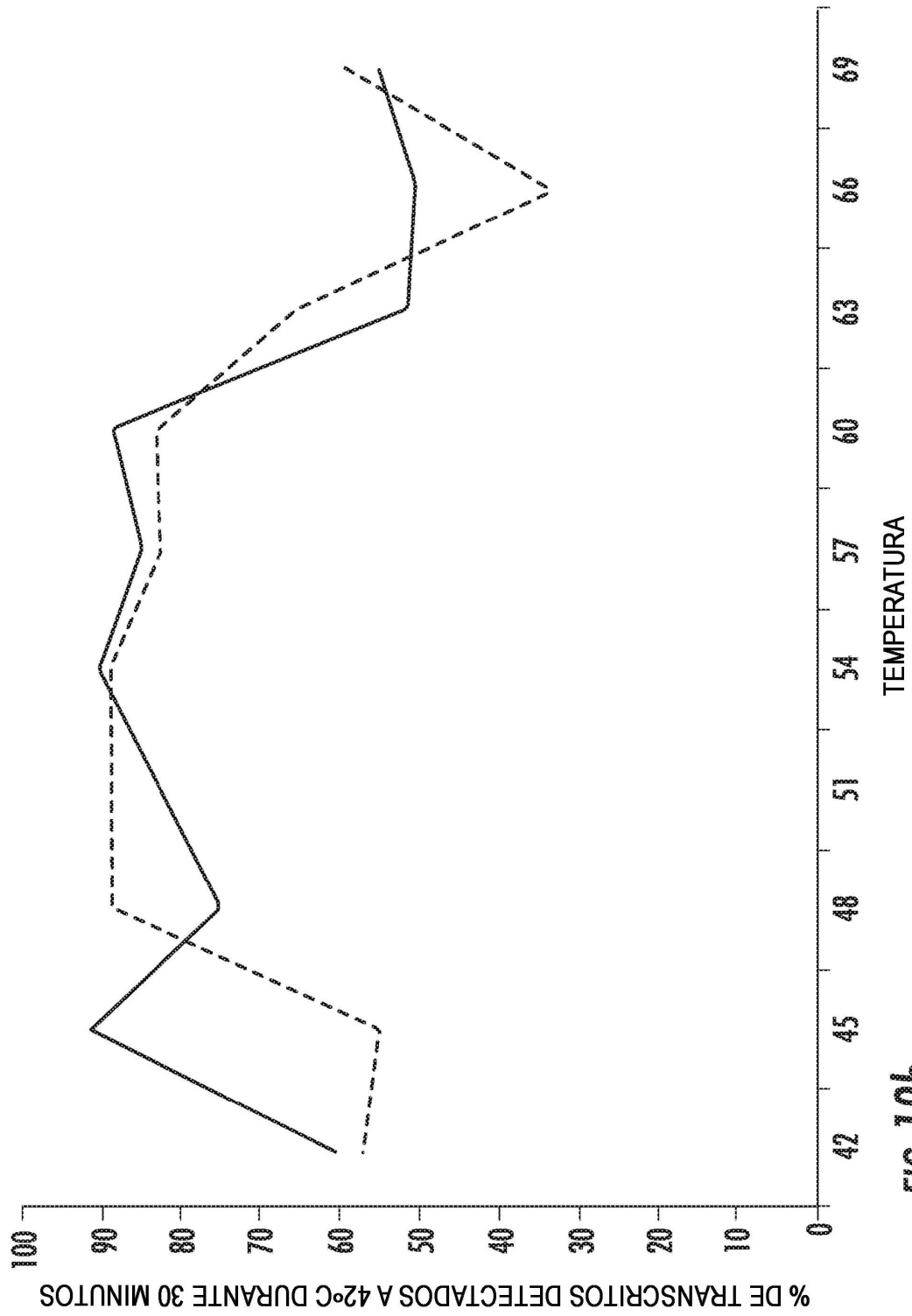
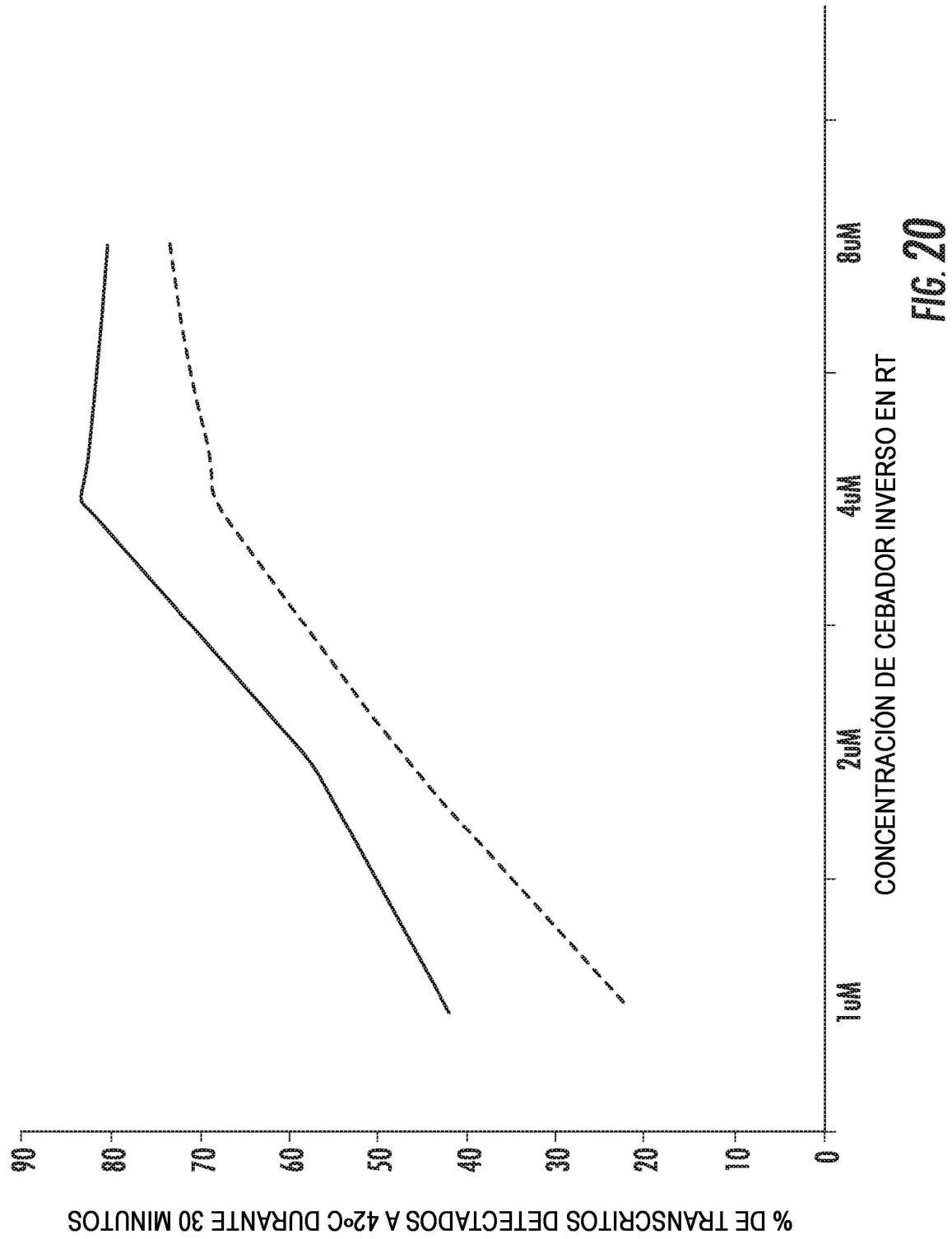
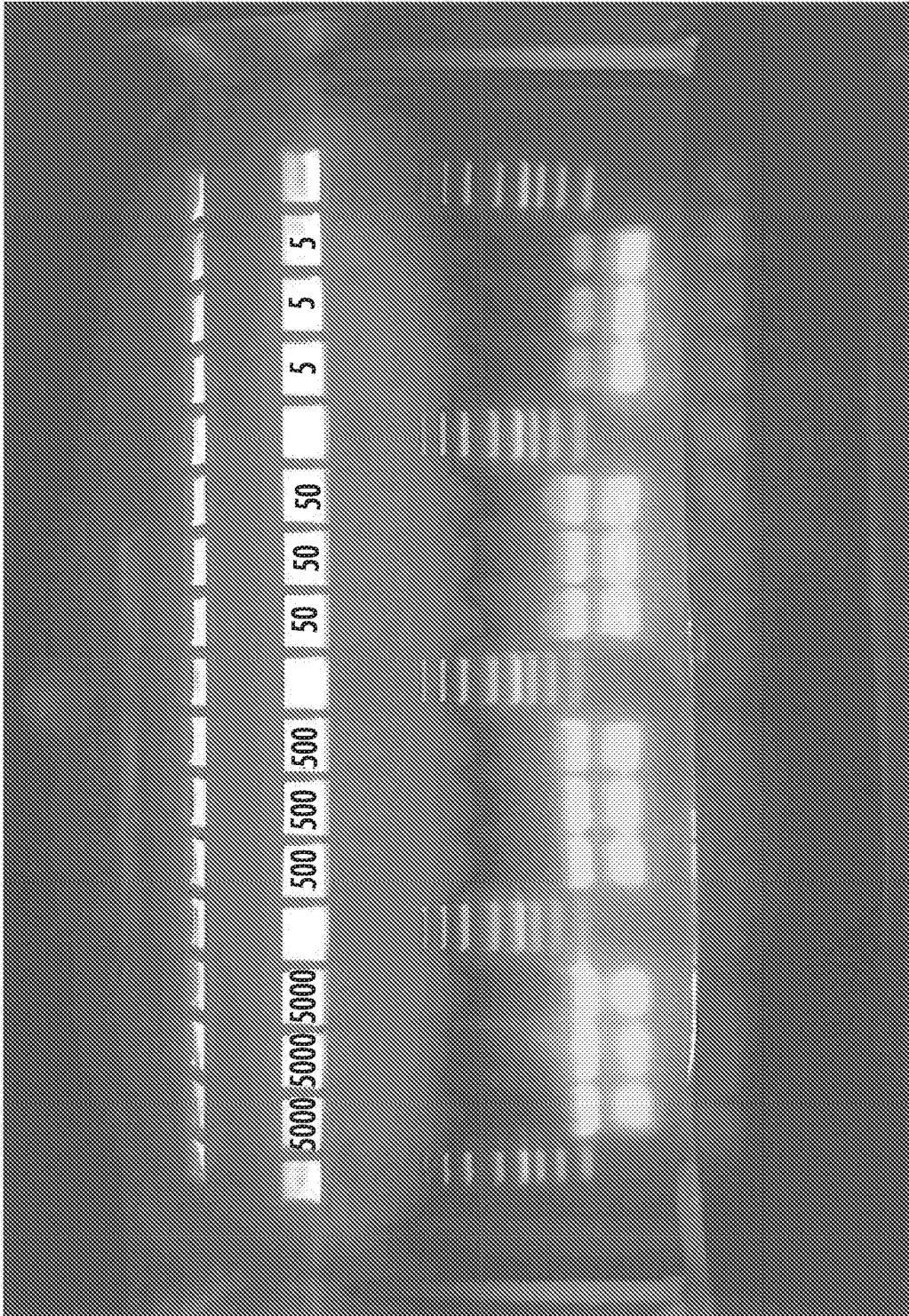


FIG. 19b

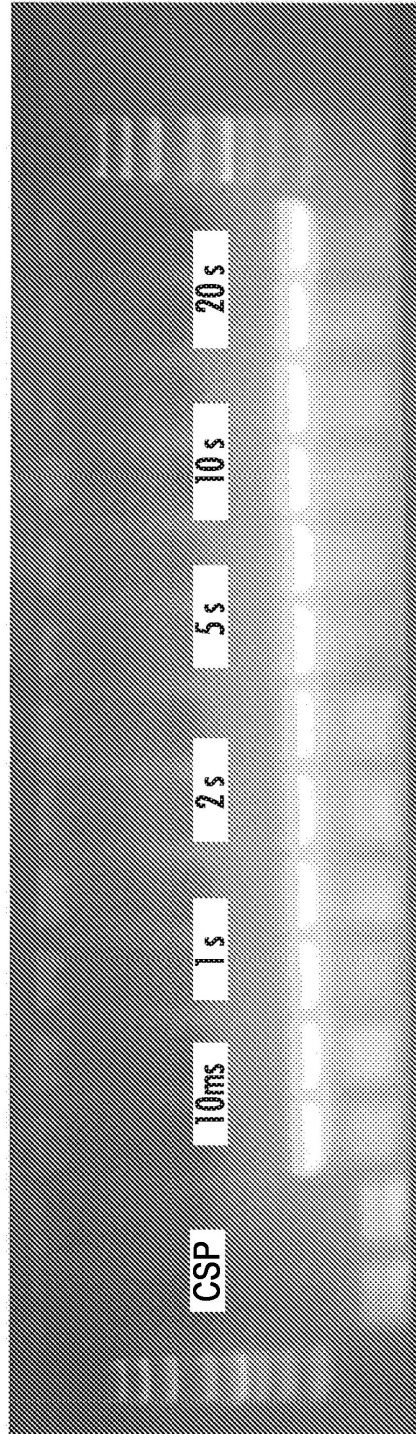






**FIG. 21**





**FIG. 22**

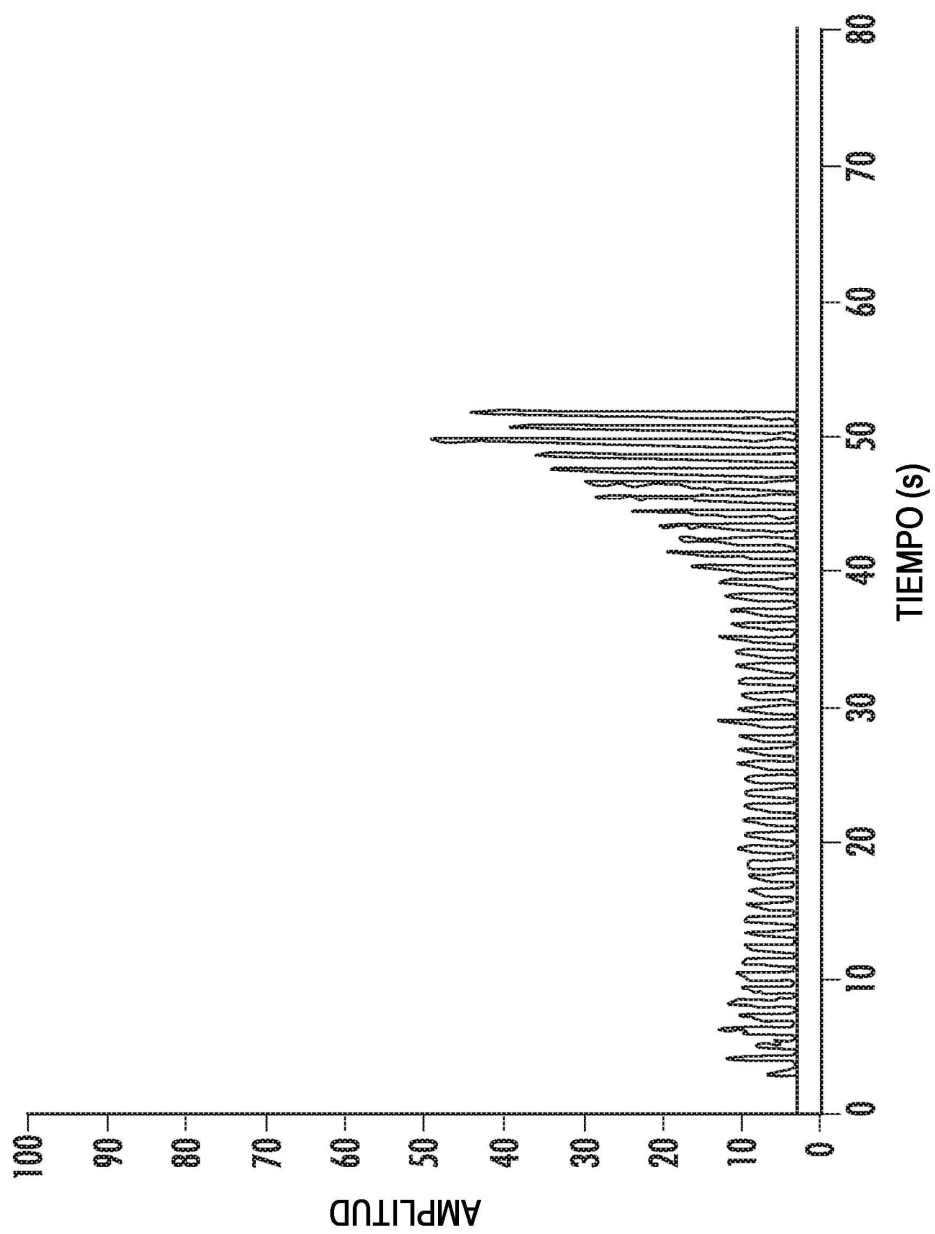


FIG. 23

CN	CN	PREPARADO EN FRÍO			TEMPERATURA AMBIENTE		
		0s	1s	5s	0s	1s	5s

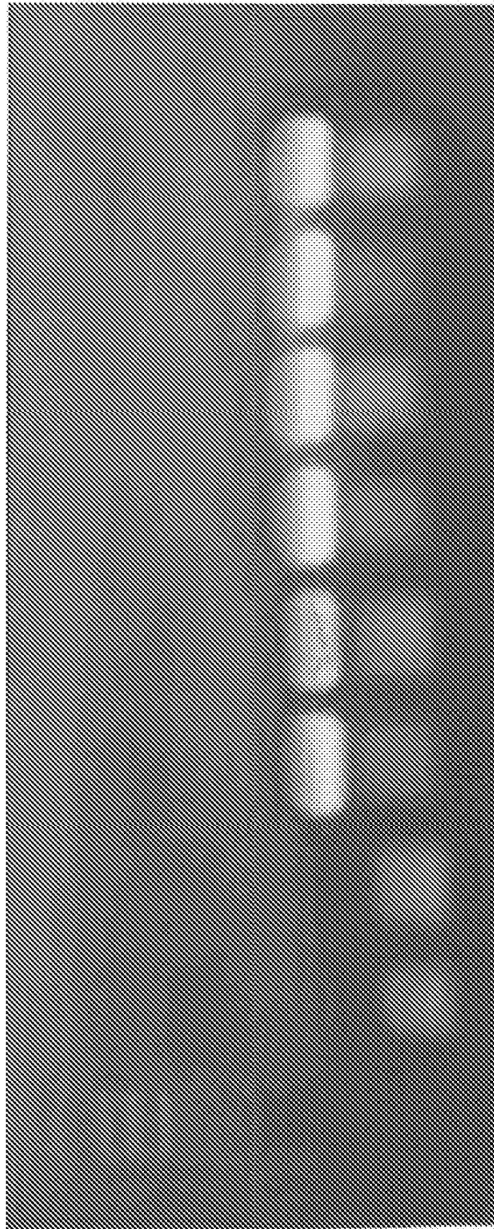


FIG. 24



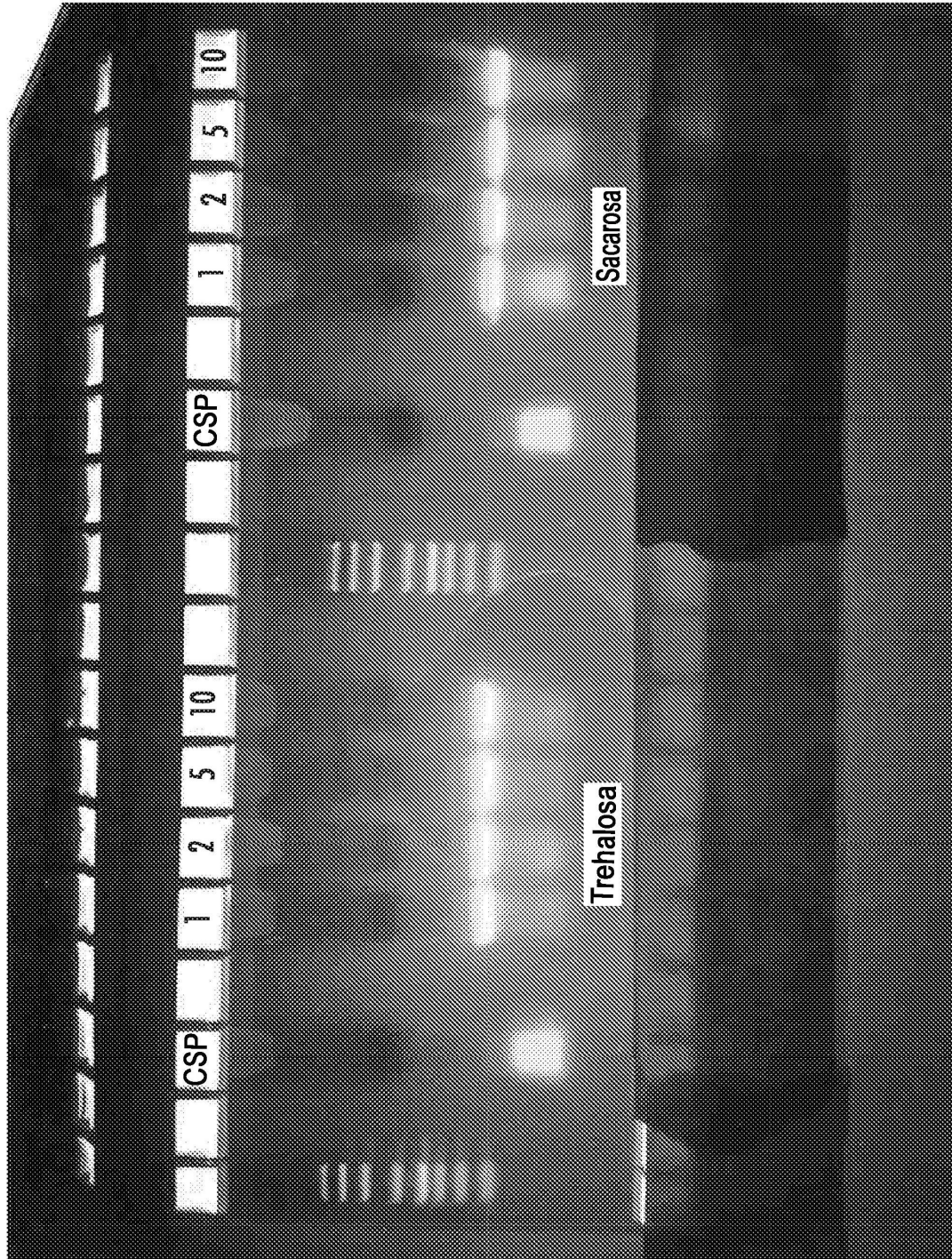


FIG. 25



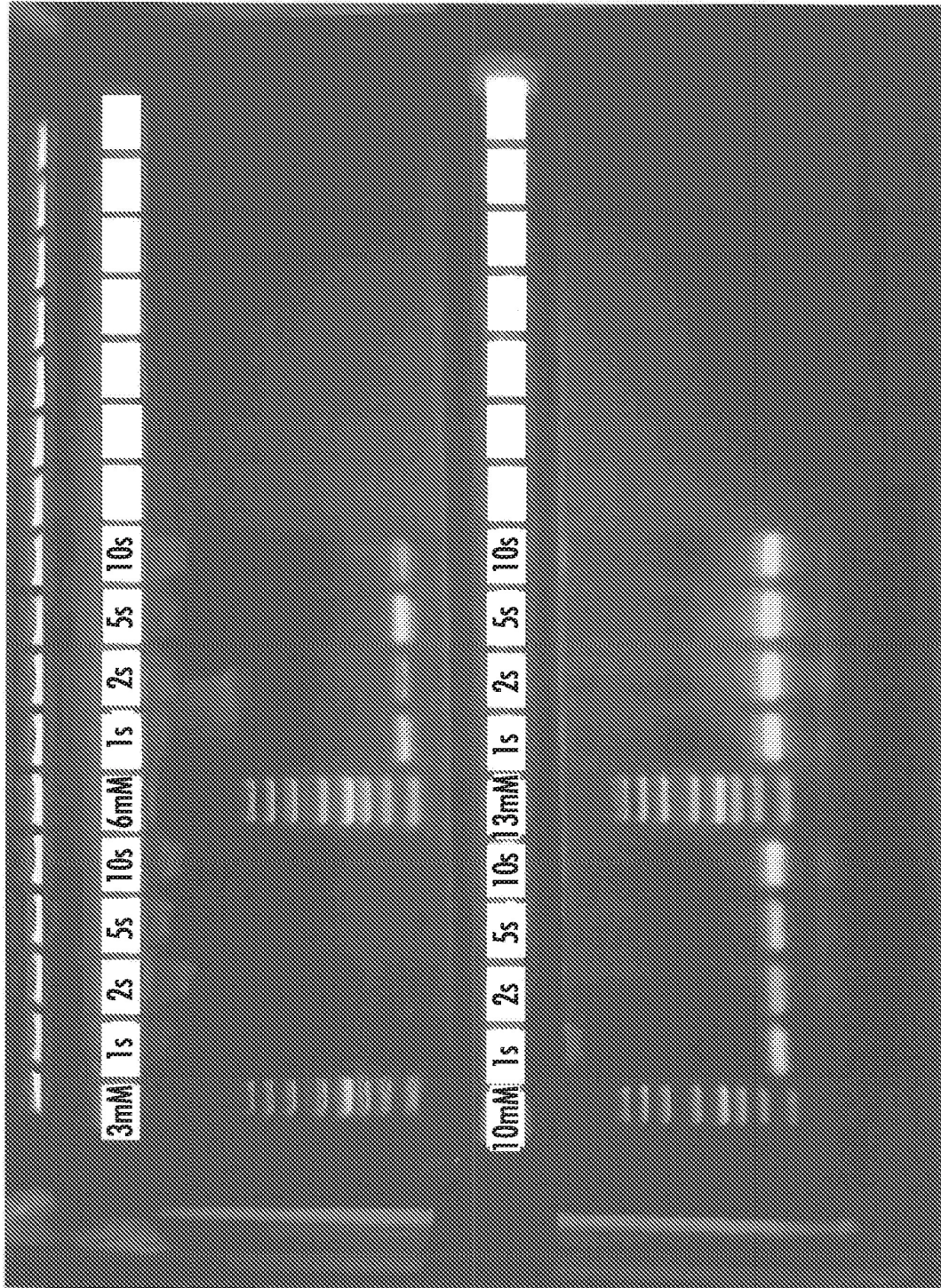


FIG. 26



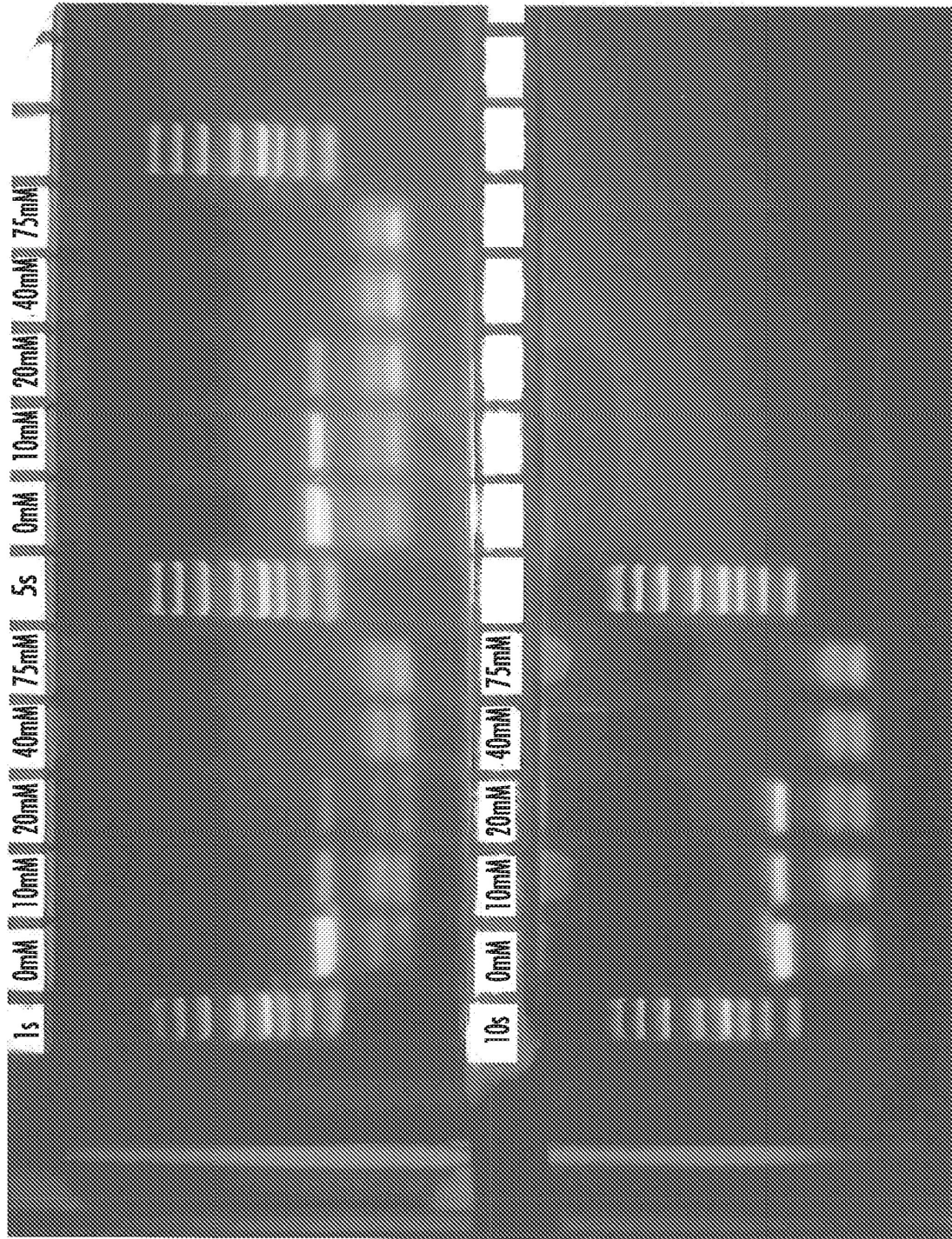


FIG. 27



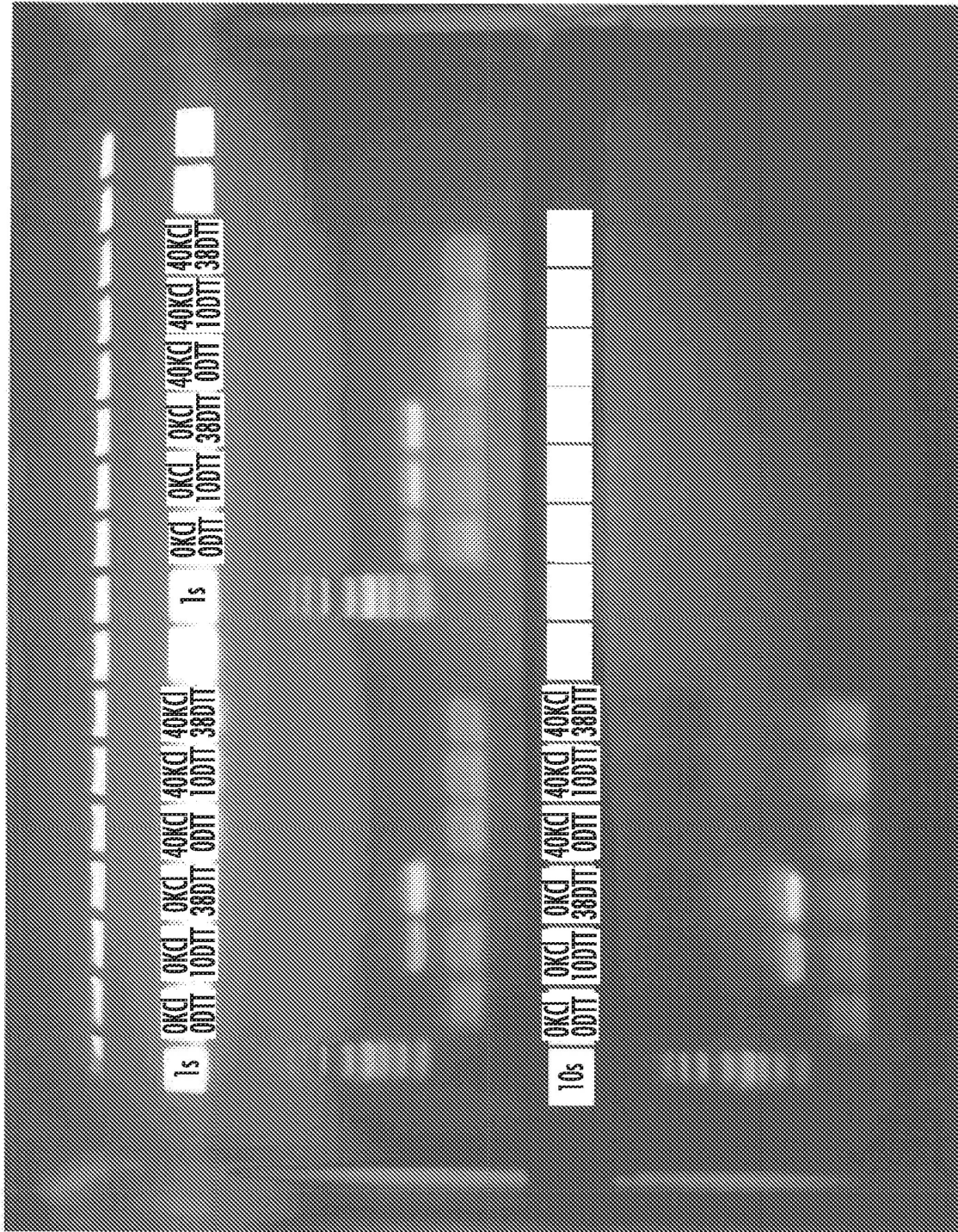


FIG. 28



# Efecto de [MMLV] y tiempo sobre Cq

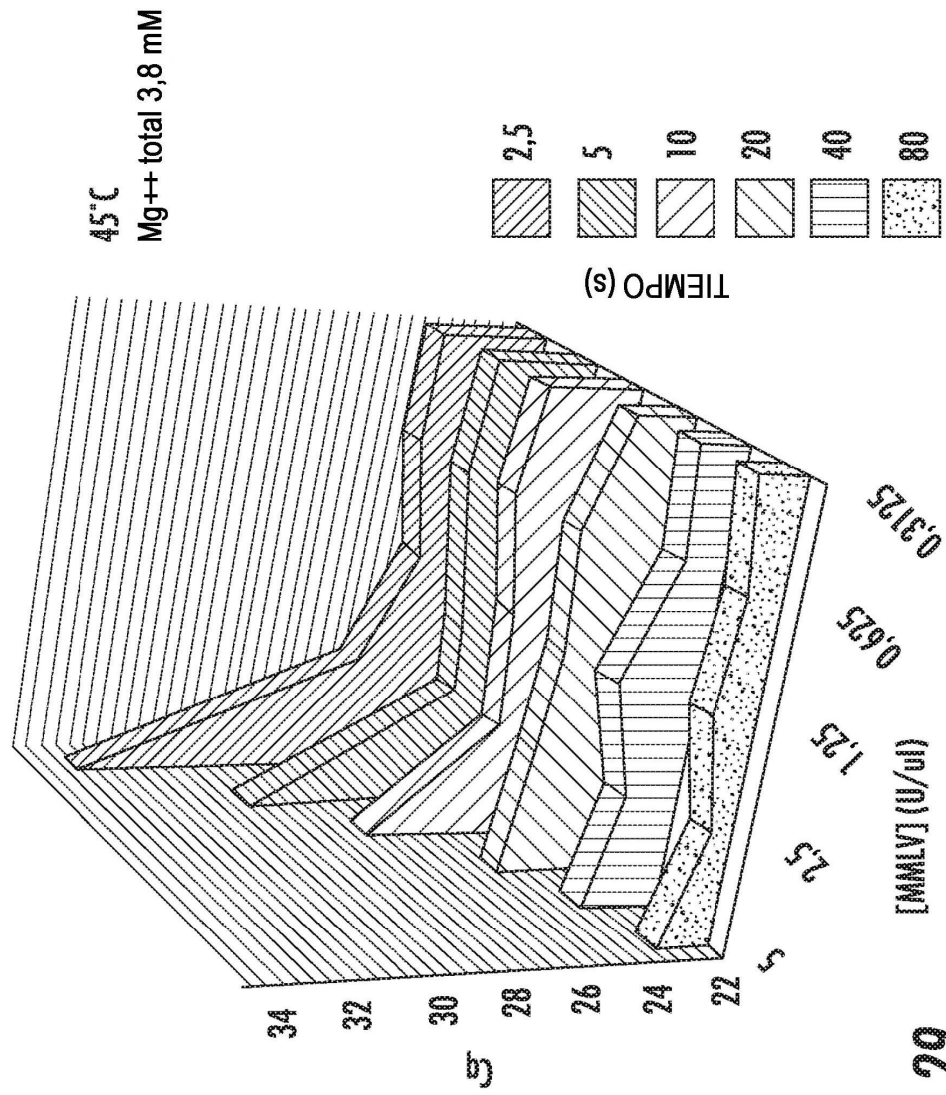


FIG. 29

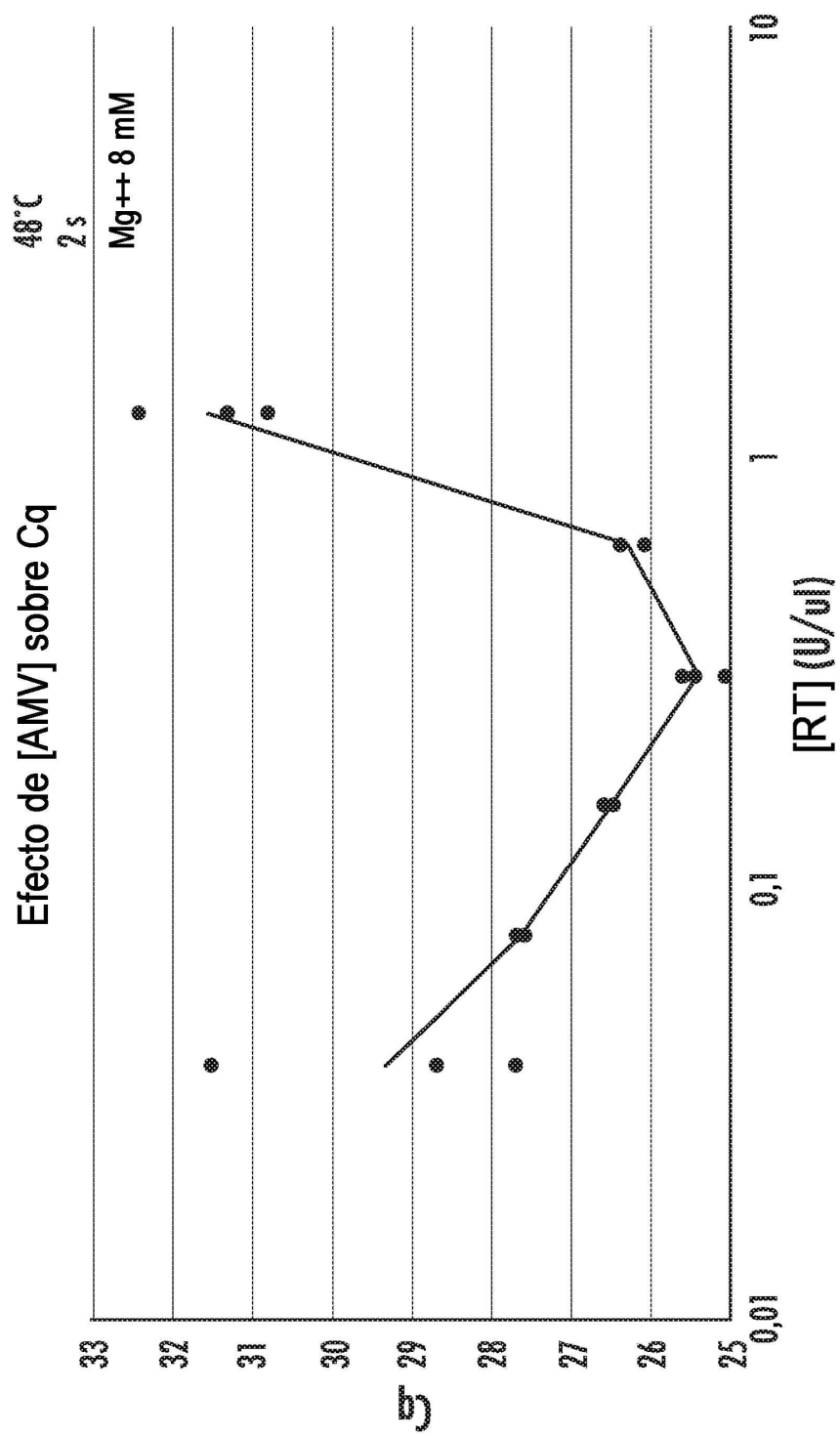
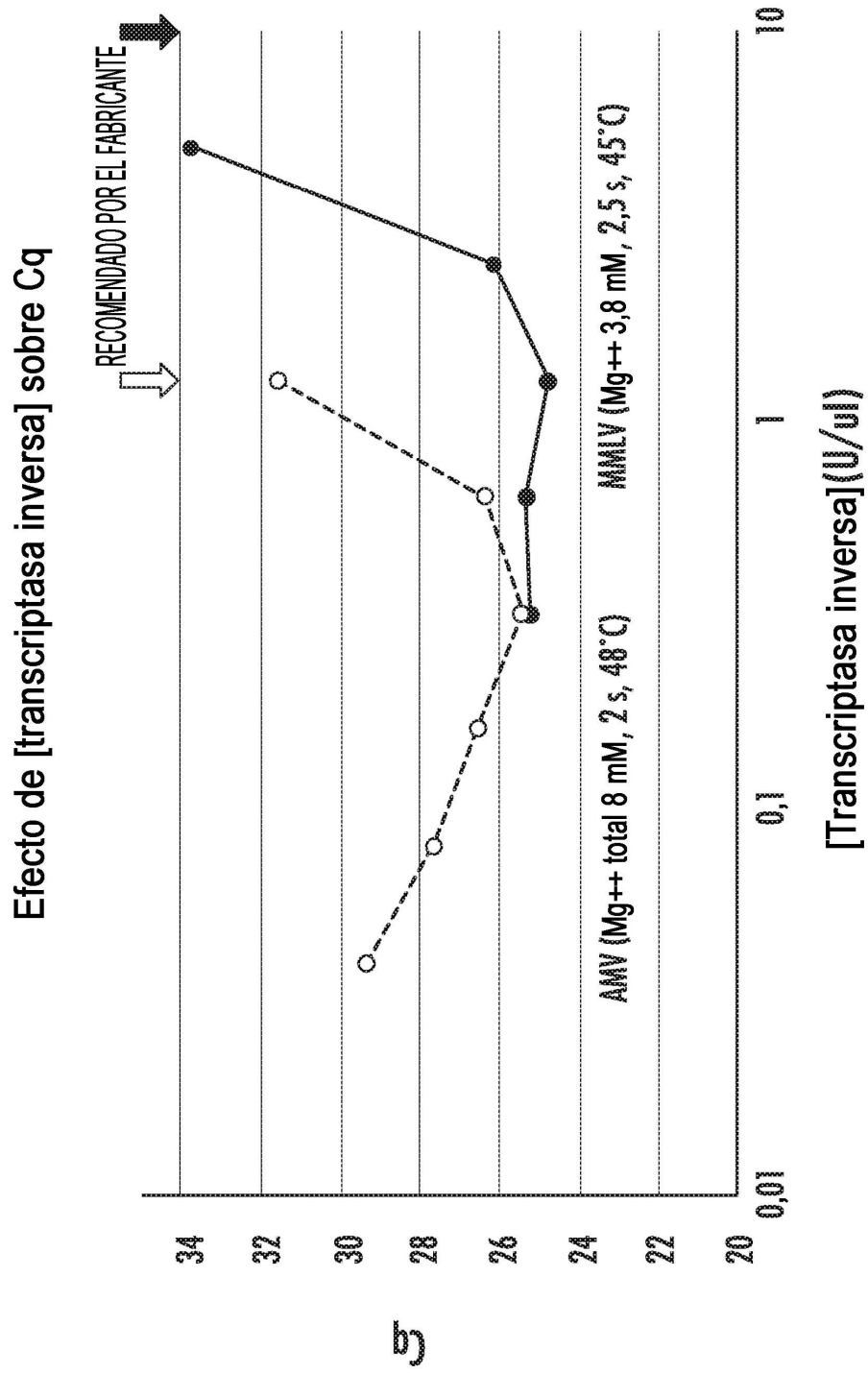
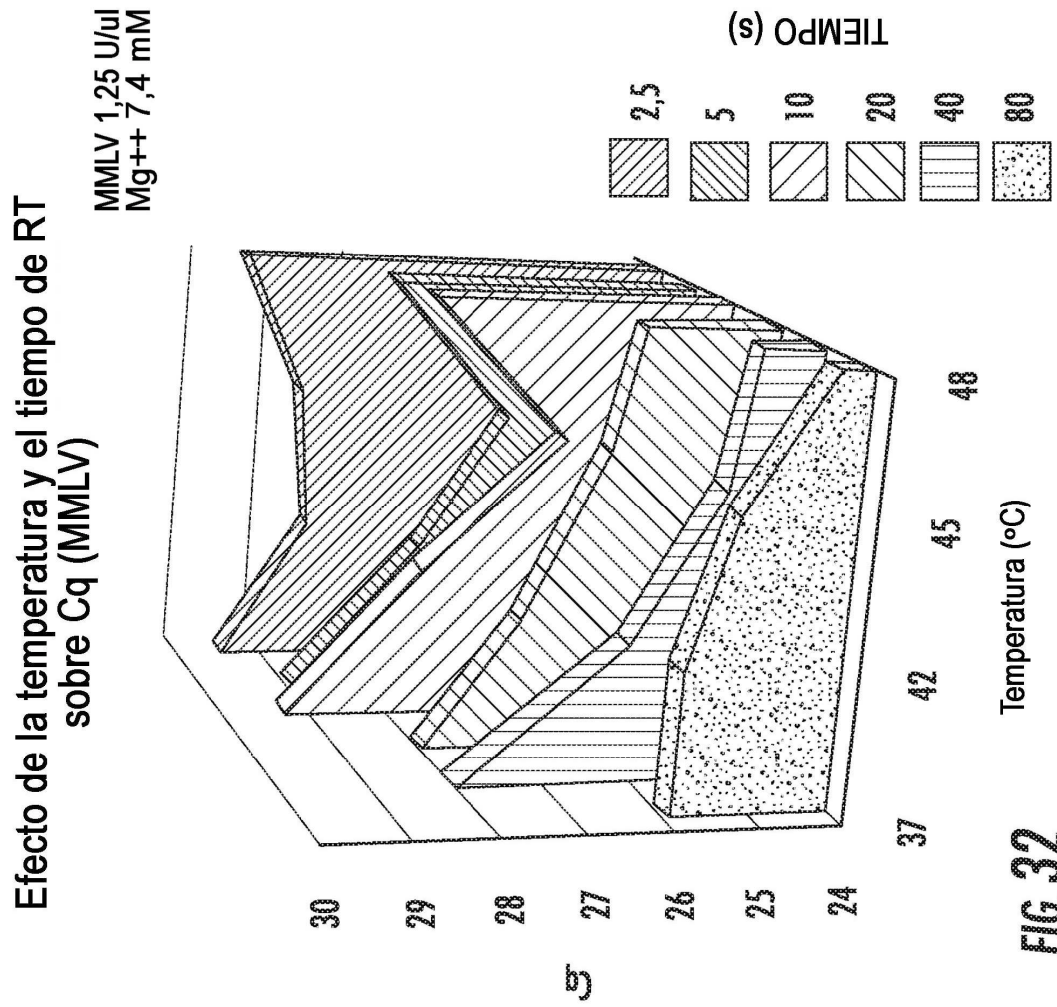


FIG. 30



**FIG. 31**



**FIG. 32**



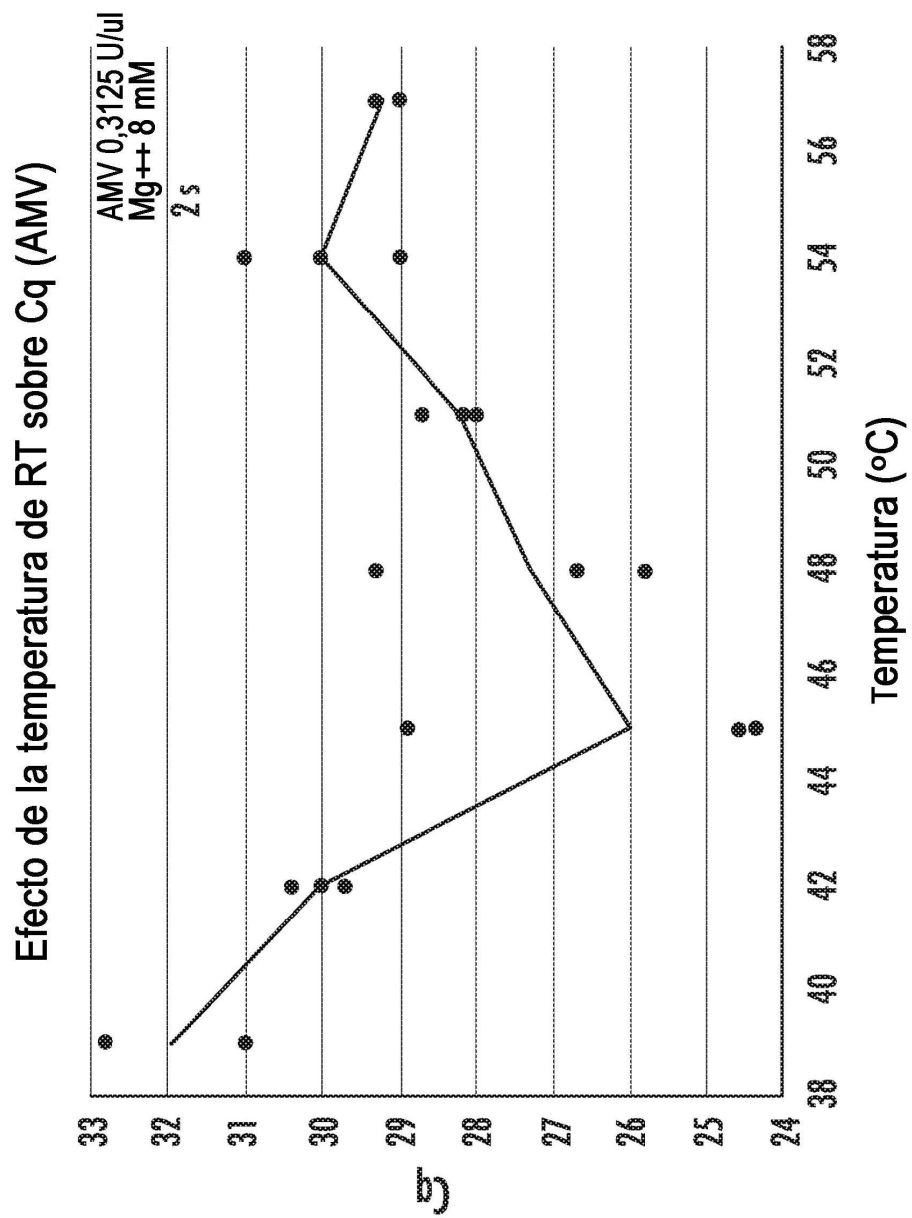


FIG. 33

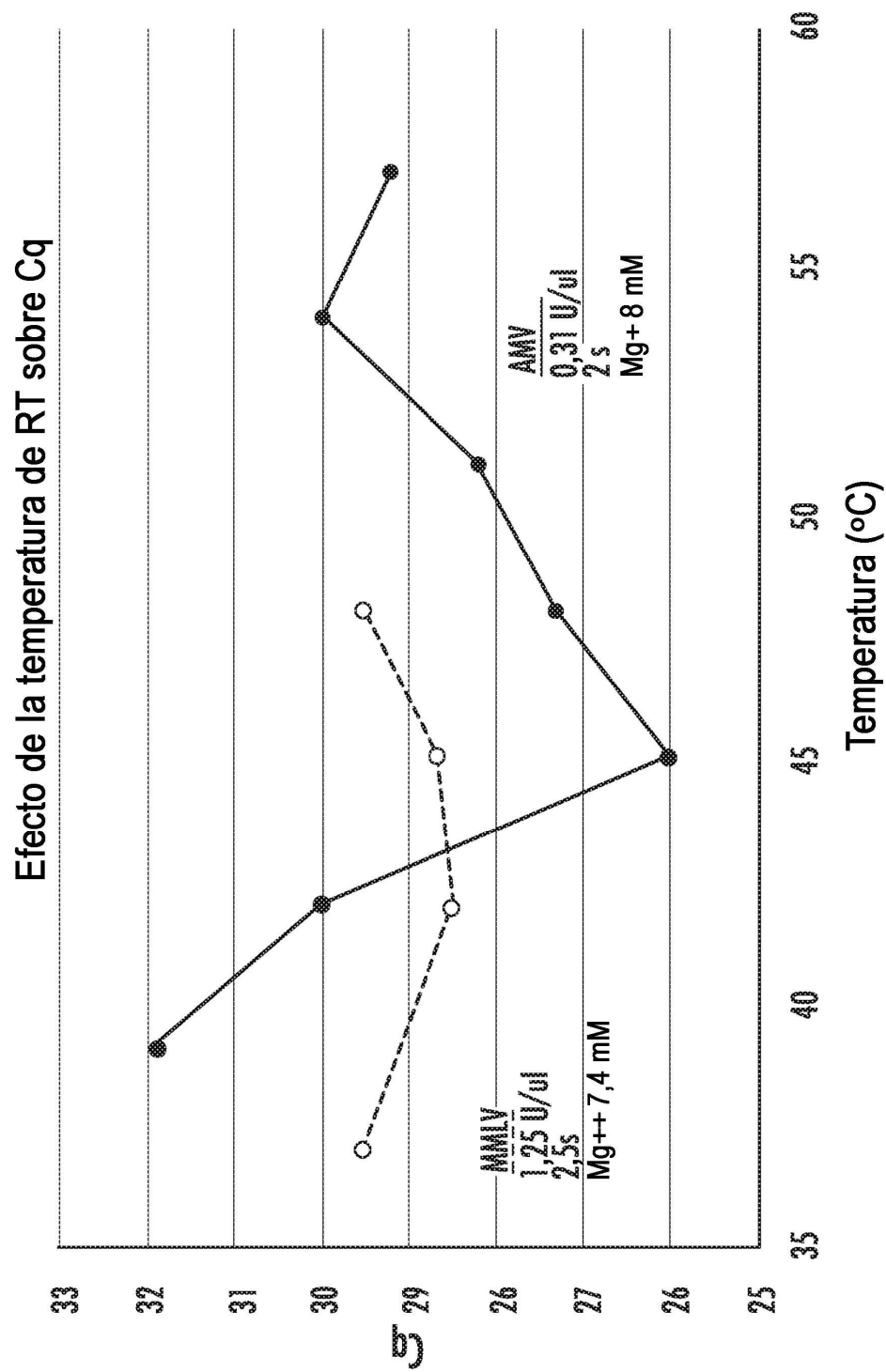


FIG. 34

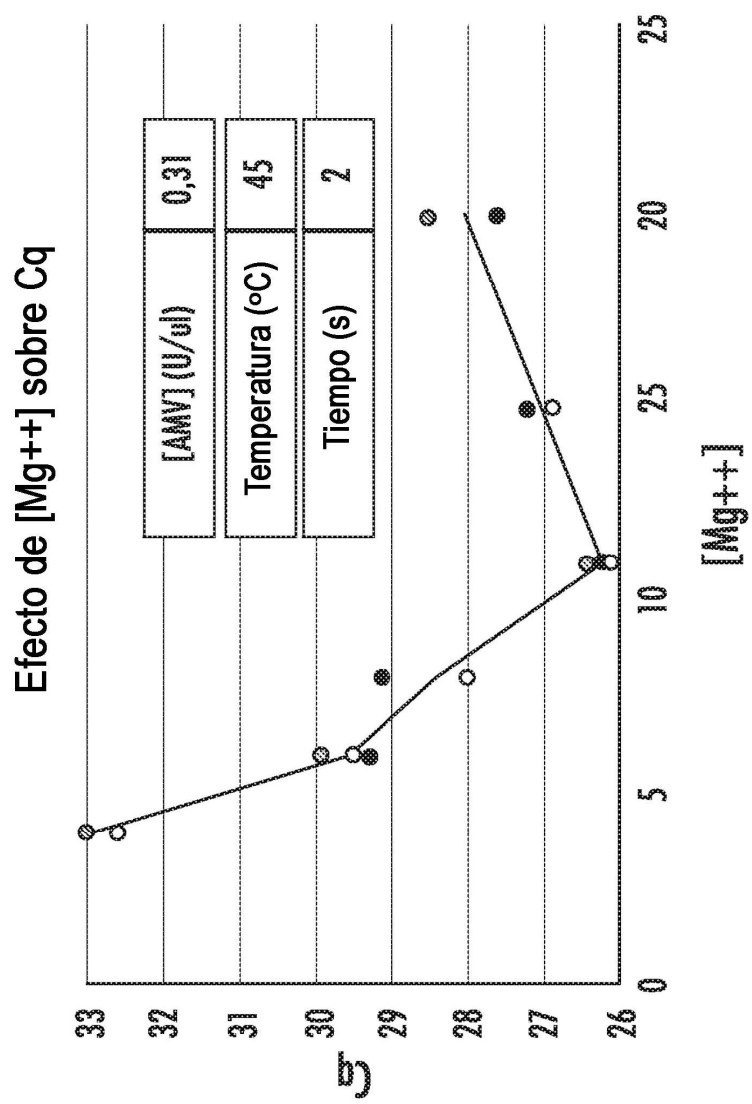


FIG. 35

# Efecto de $[Mg^{++}]$ total] sobre Cq

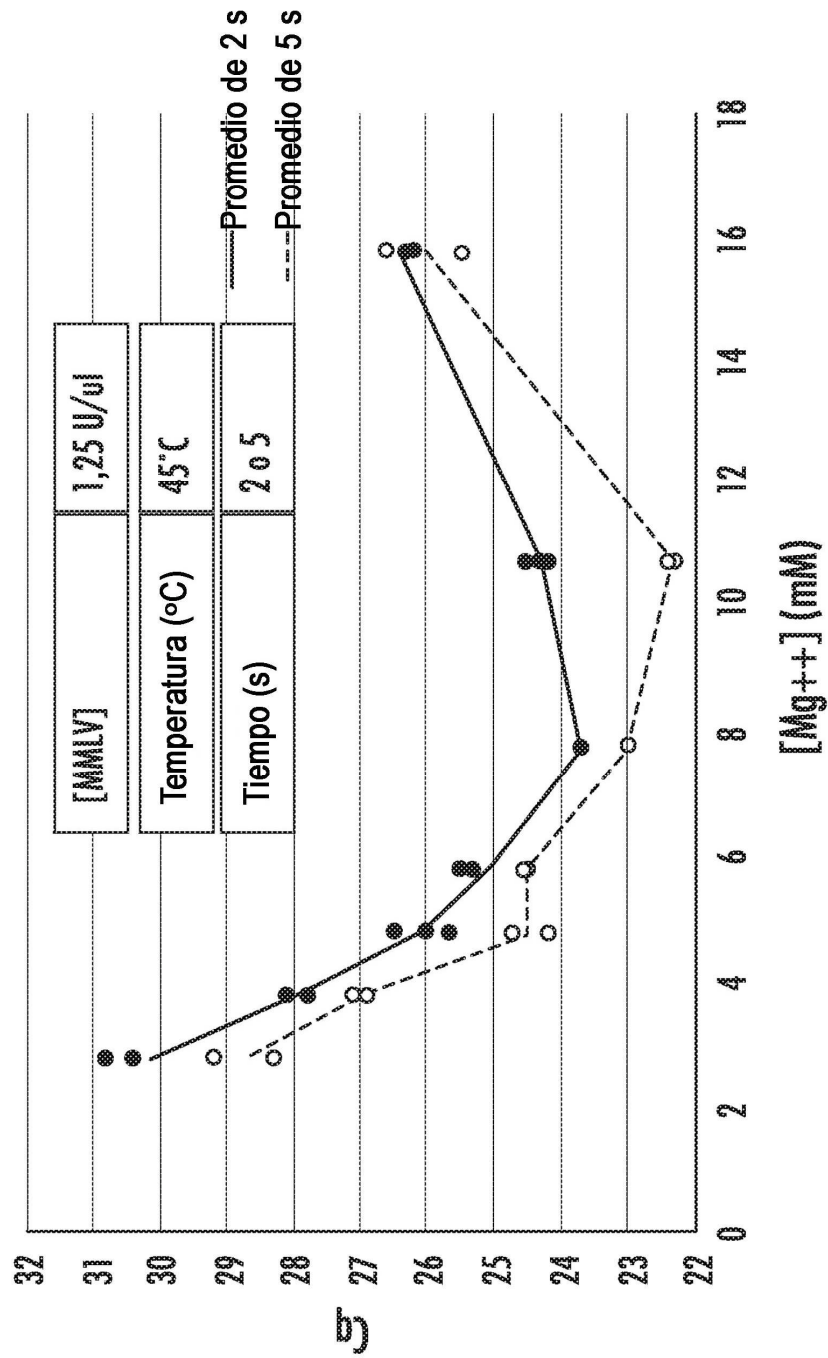


FIG. 36

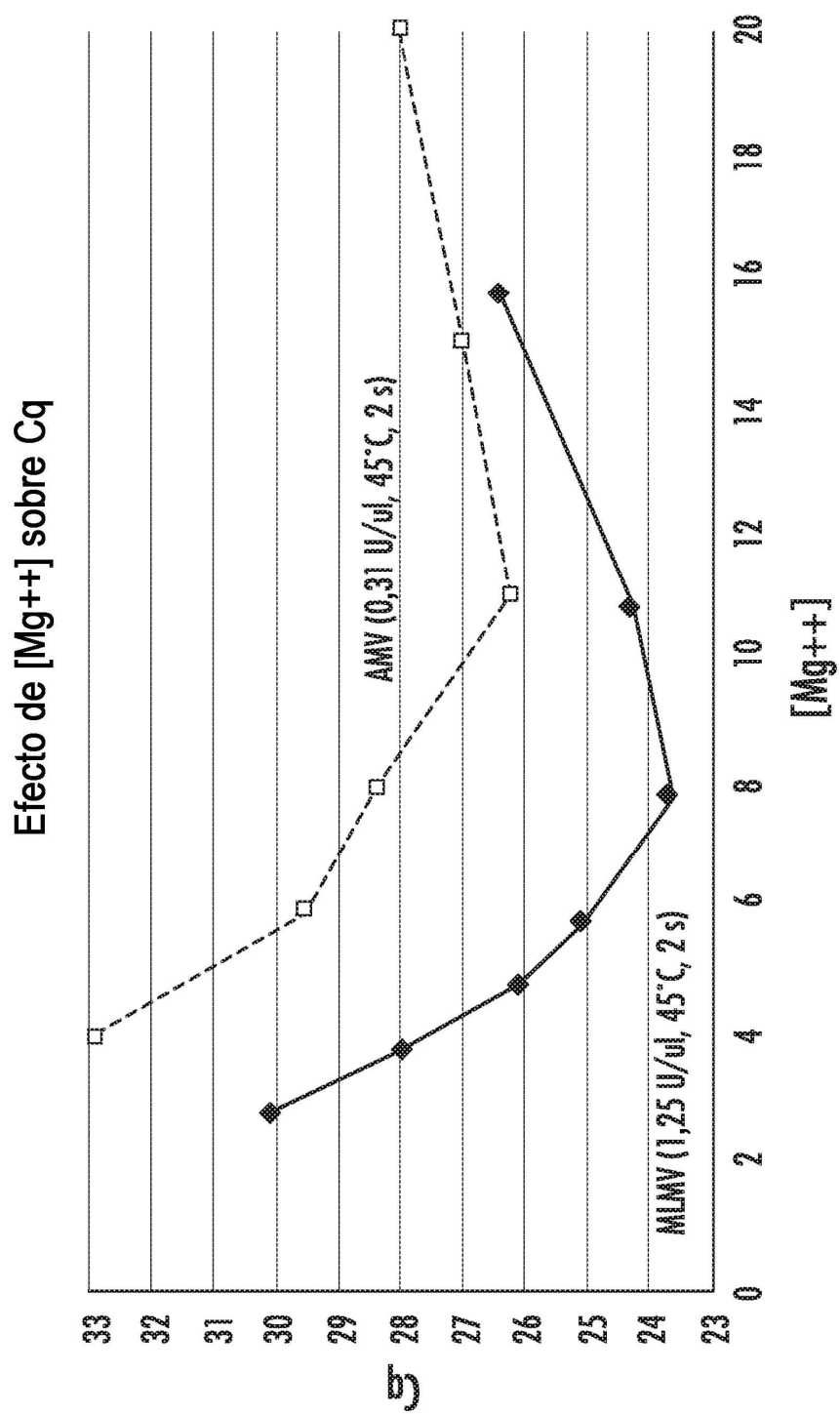
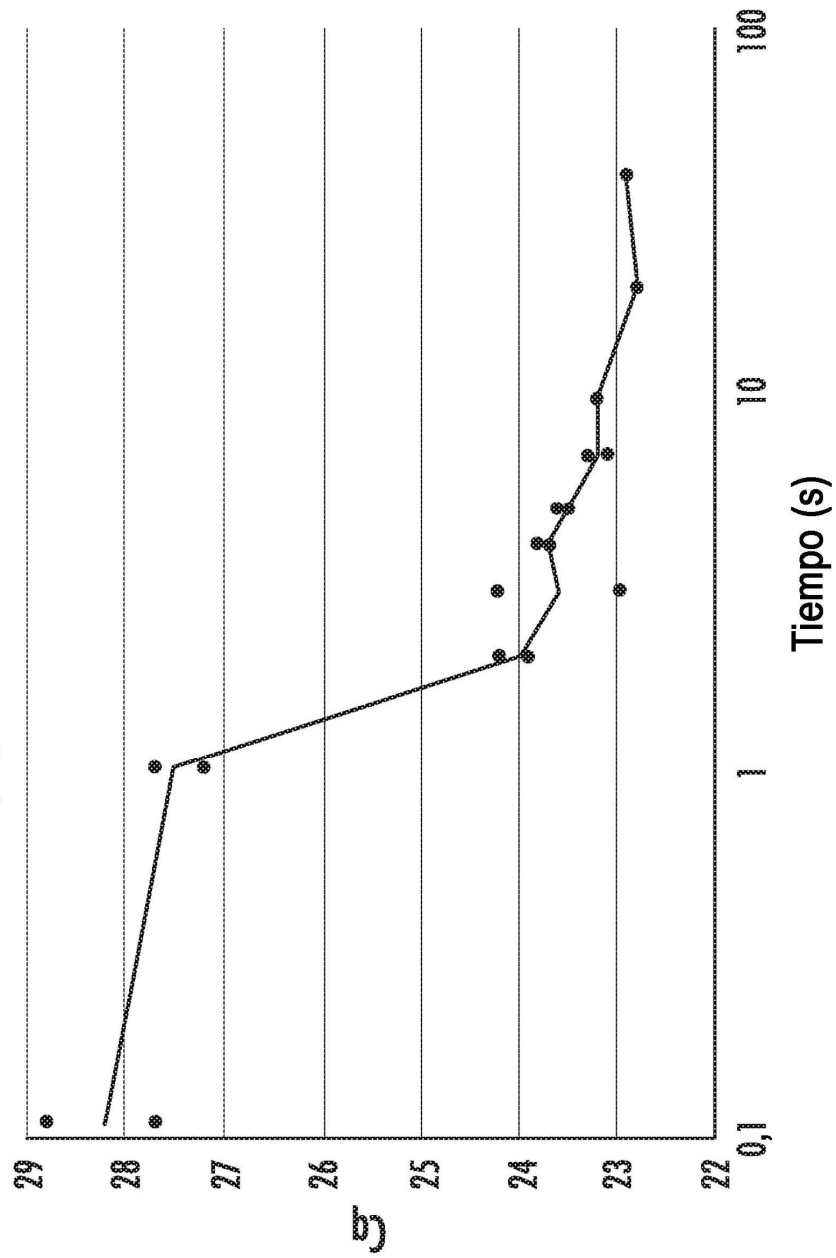
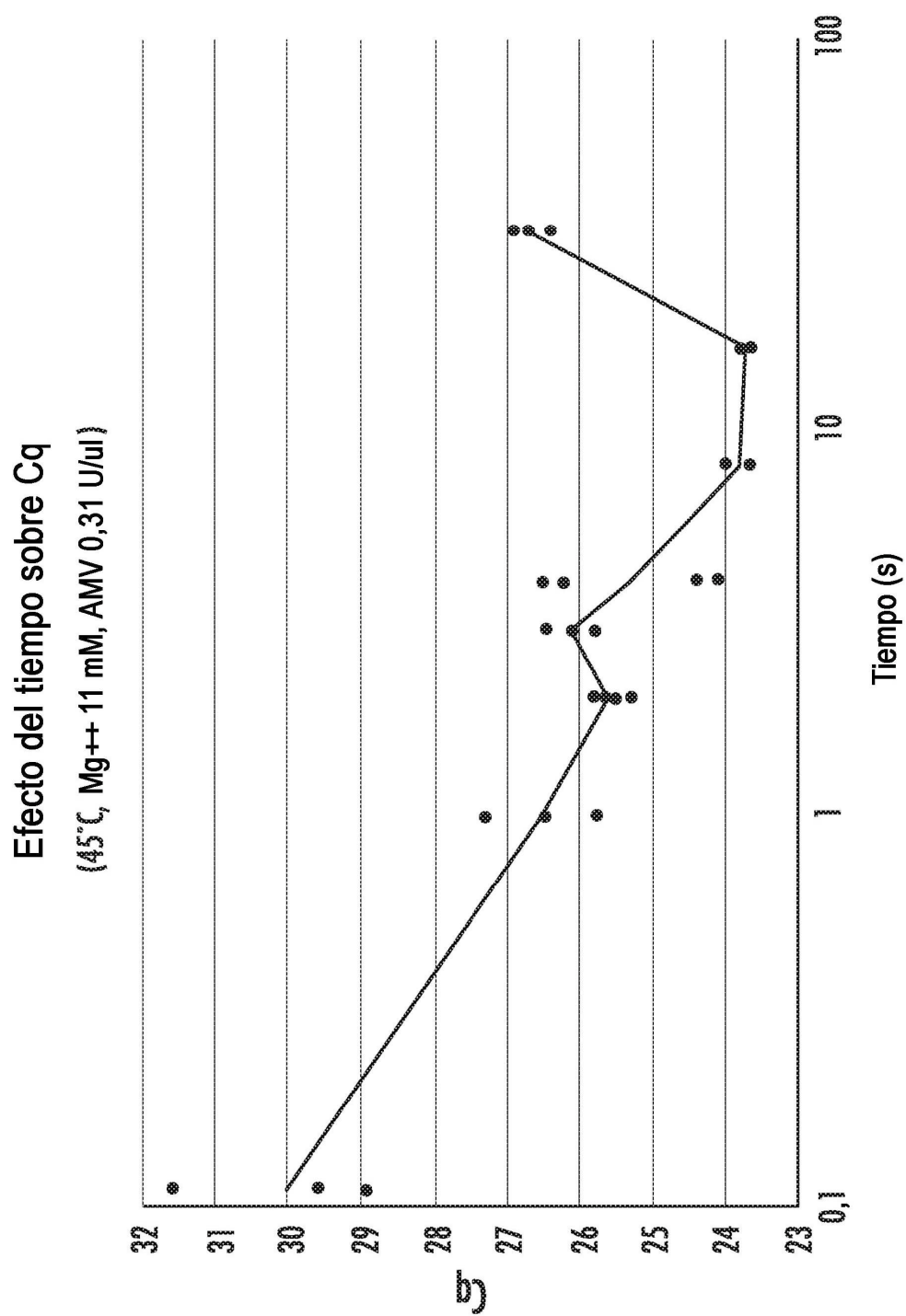


FIG. 37

**MMLV: Efecto del tiempo sobre Cq**  
(45°C, Mg++ total 7,4, MMLV 1,25 U/ul)



**FIG. 38**



**FIG. 39**

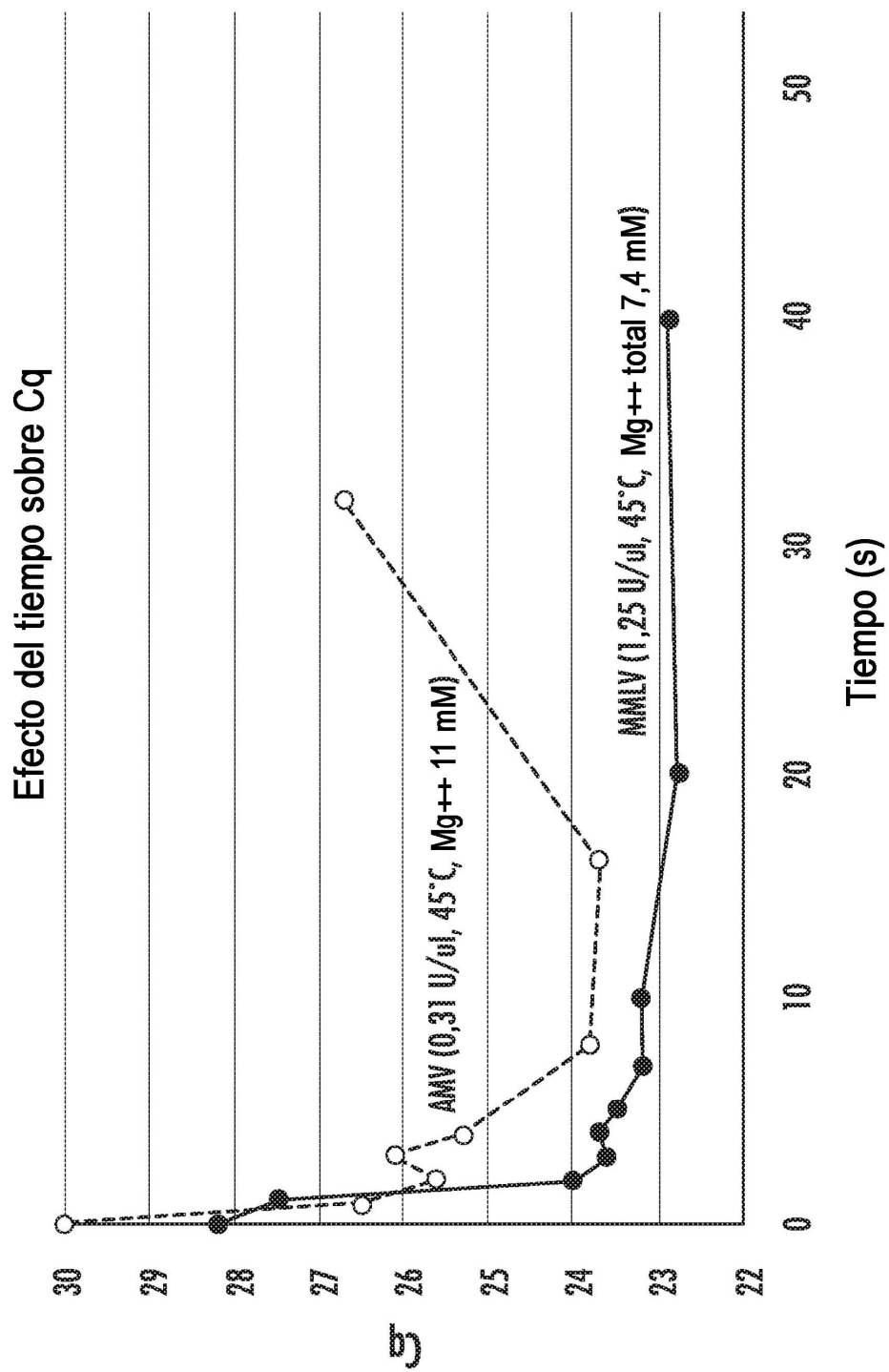


FIG. 40



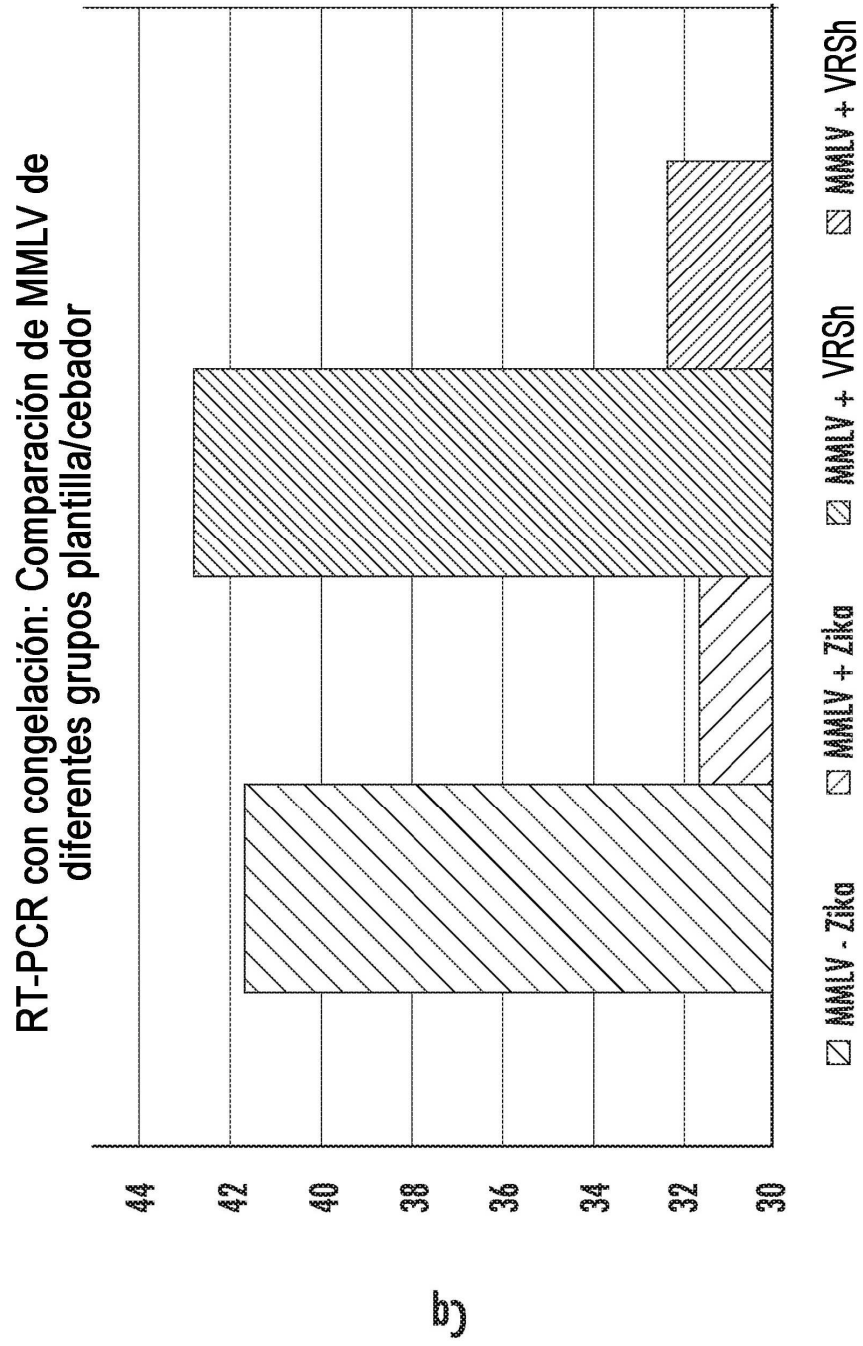


FIG. 41

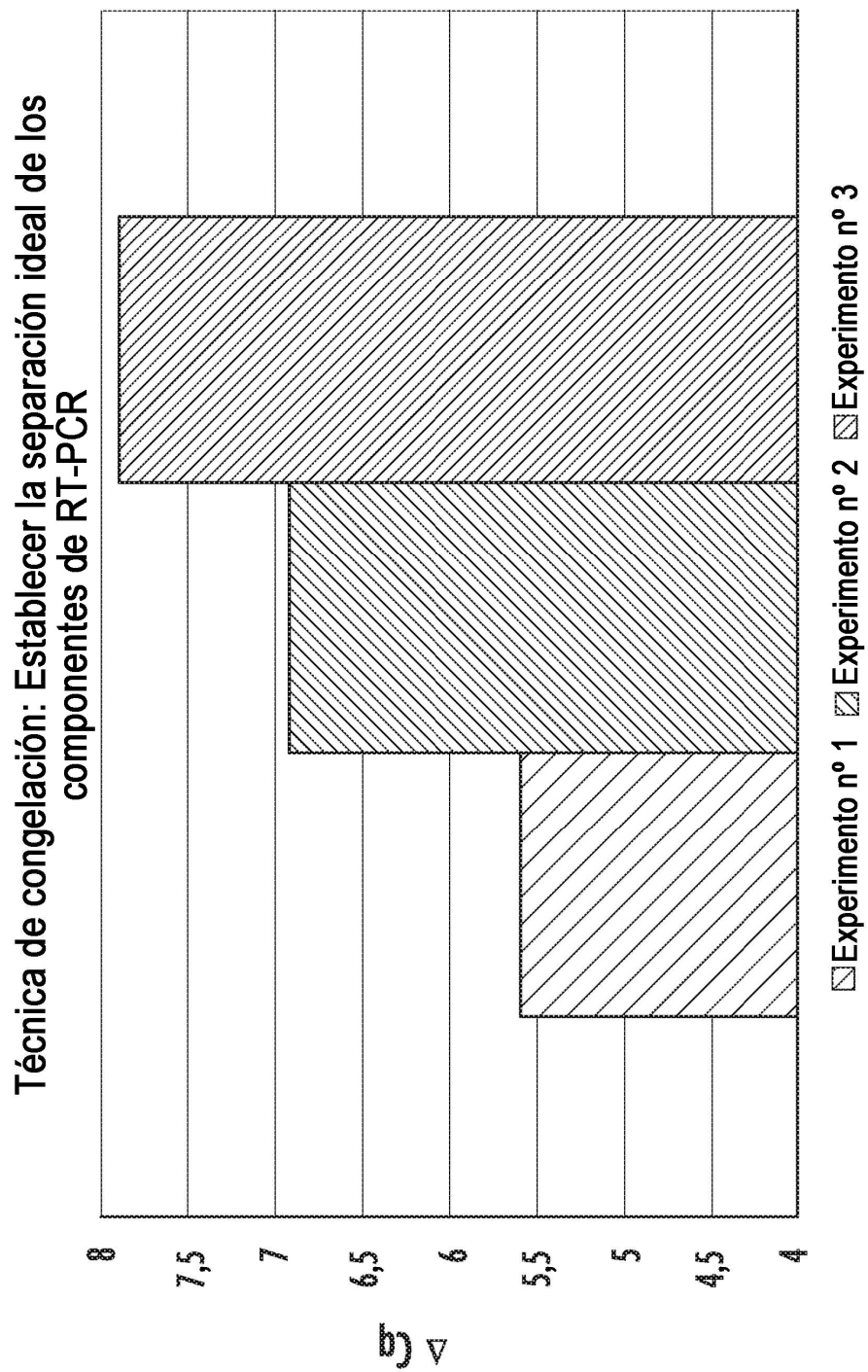


FIG. 42

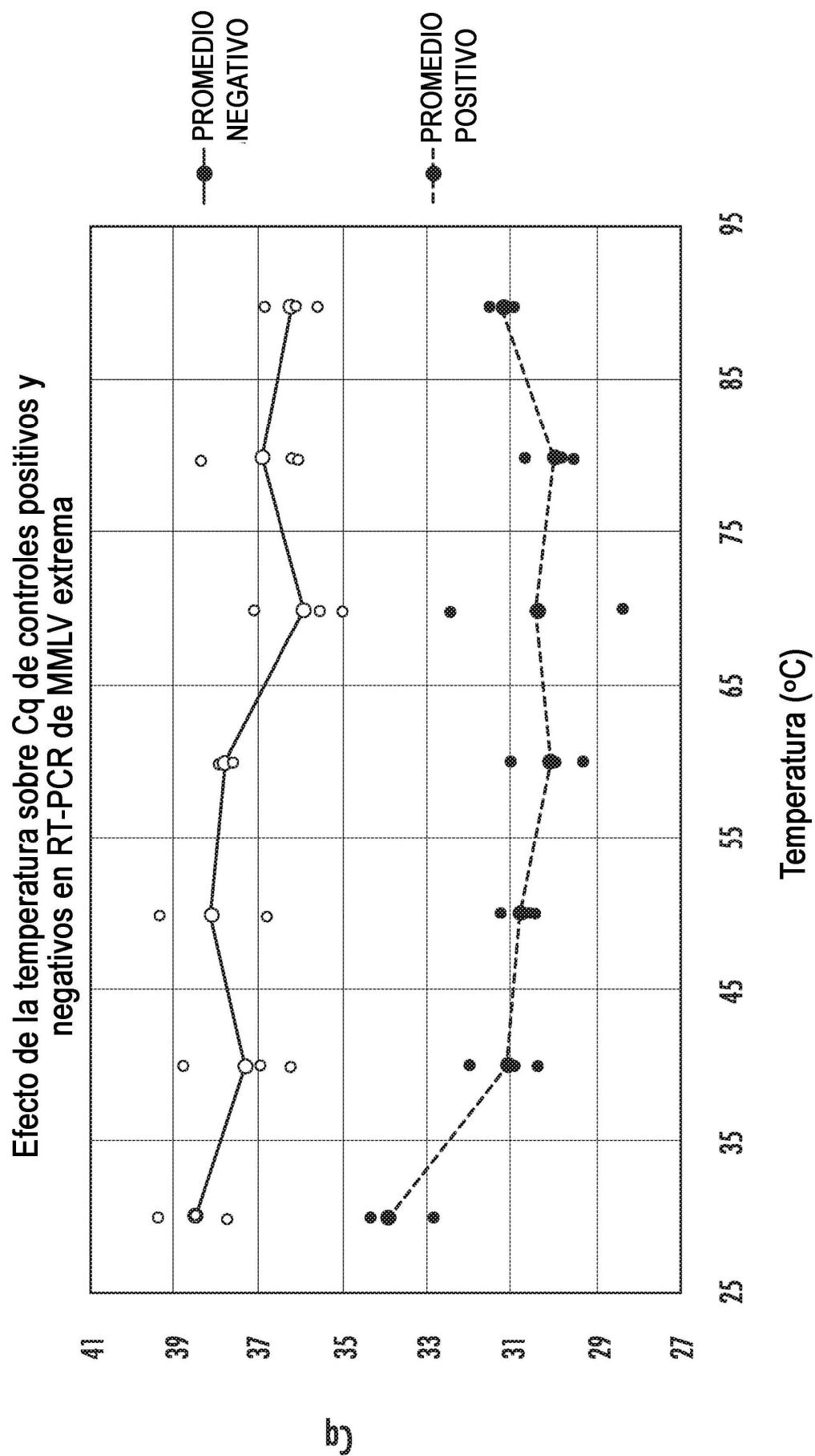
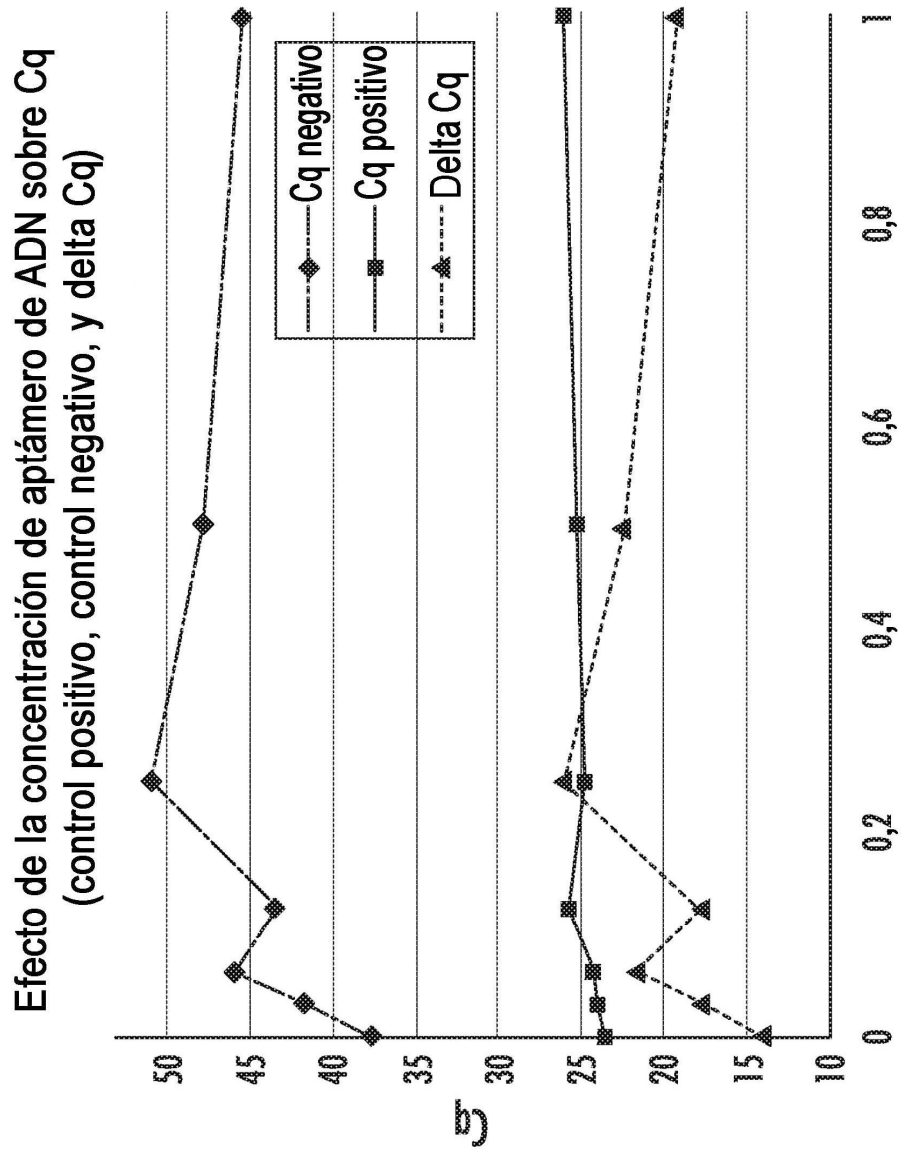
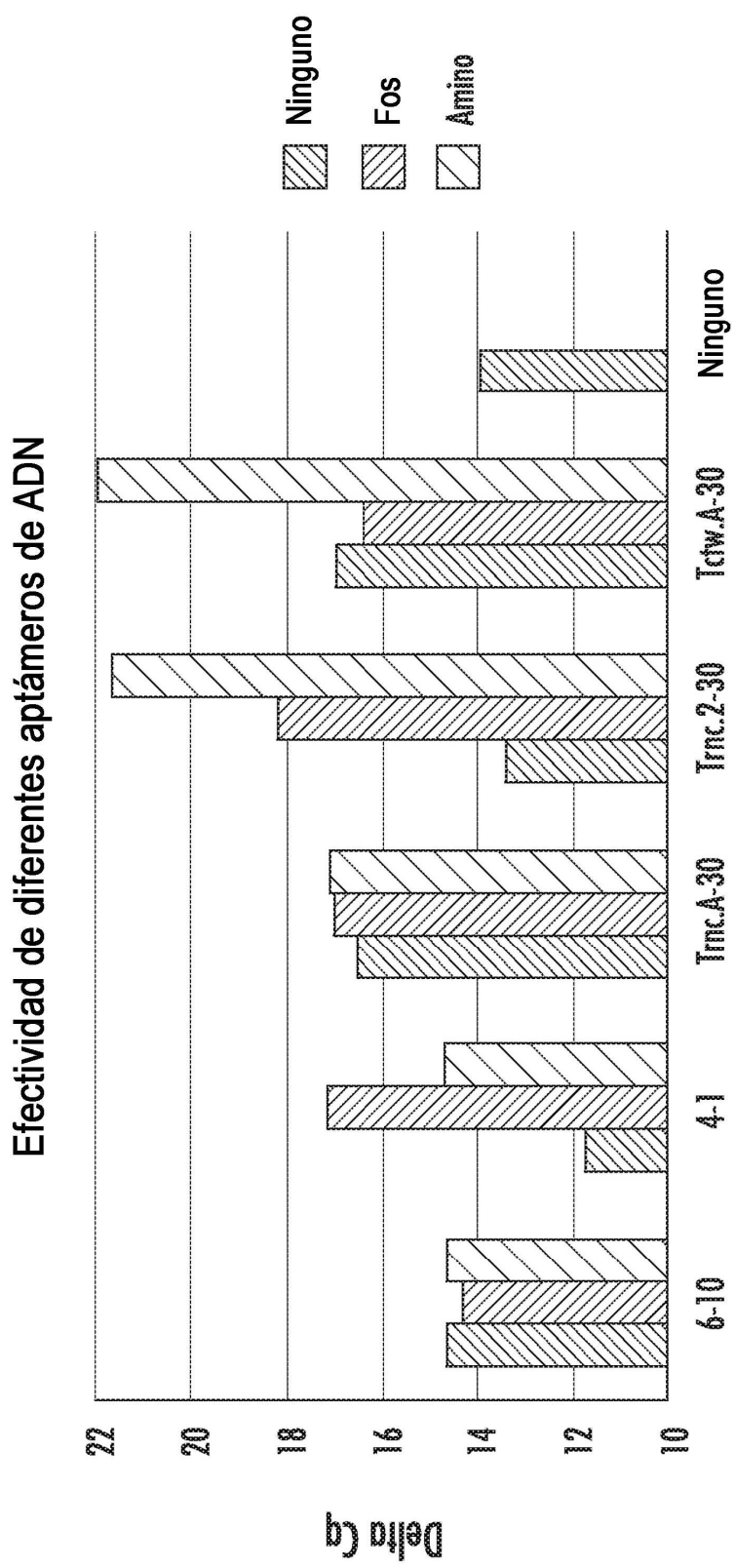


FIG. 43



[Aptámero de ADN]

FIG. 44



Aptámero  
FIG. 45

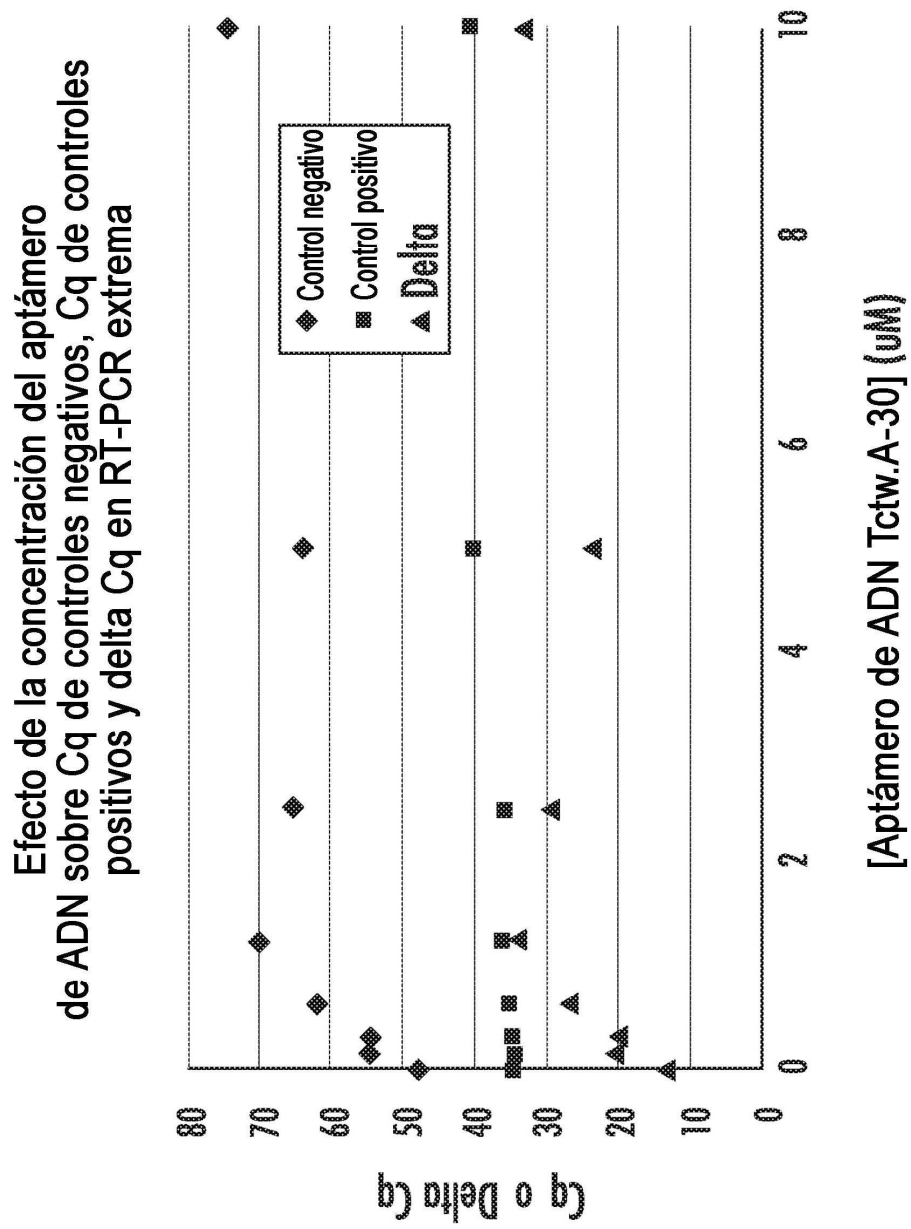


FIG. 46

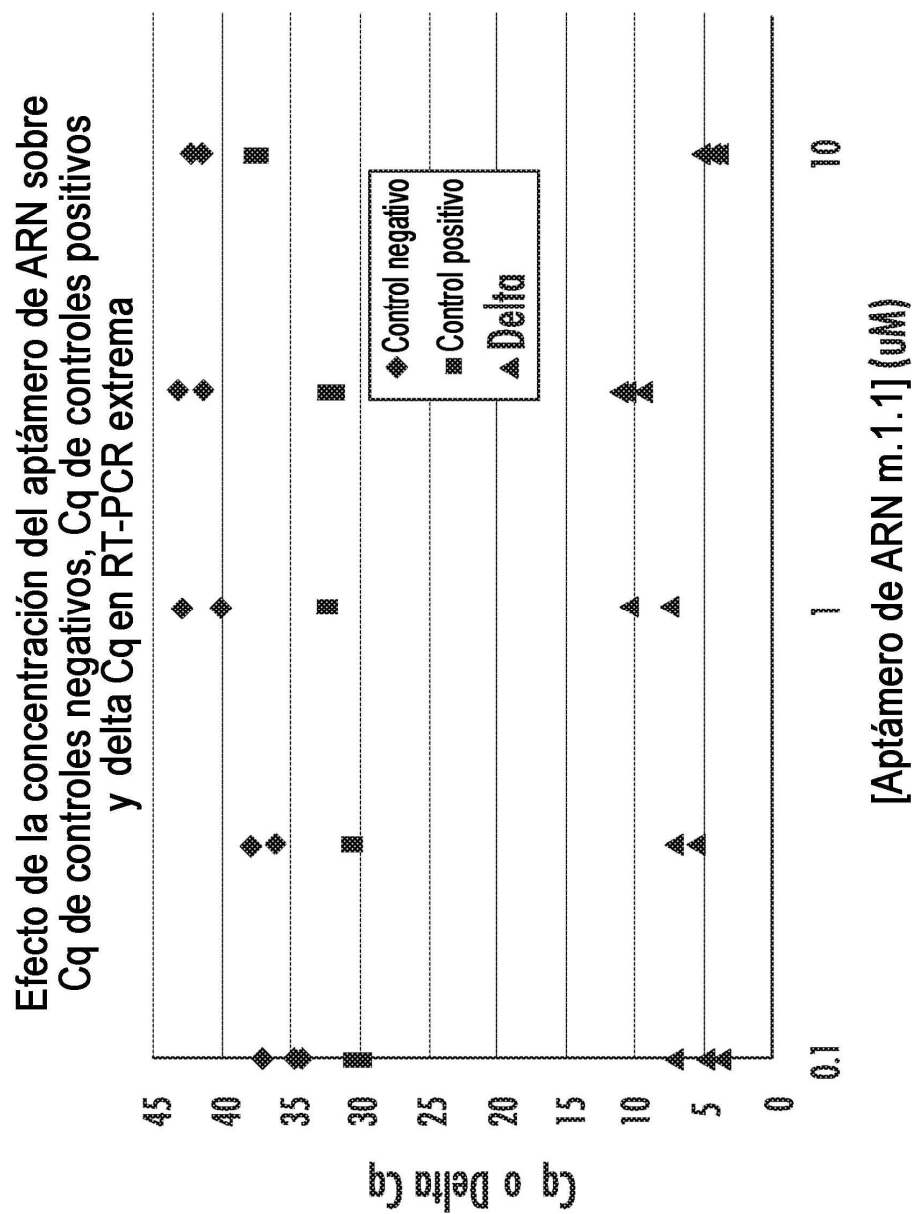


FIG. 47



## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

*Esta lista de referencias citada por el solicitante es únicamente para mayor comodidad del lector. No forman parte del documento de la Patente Europea. Incluso teniendo en cuenta que la compilación de las referencias se ha efectuado con gran cuidado, los errores u omisiones no pueden descartarse; la EPO se exime de toda responsabilidad al respecto.*

### Documentos de patentes citados en la descripción

- US 6706617 B
- US 6210882 B
- US 20090275014 A1
- US 6472186 B
- US 5436149 A
- WO 2015069743 A
- WO 62251400 A

### Literatura no patente citada en la descripción

- Rapid cycle DNA amplification. **WITTWER CT ; REED GB ; RIRIE KM**. The polymerase chain reaction. 1994, 174-181
- **WITTWER CT ; FILLMORE GC ; HILLYARD DR**. Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air. *Nucleic Acids Res*, 1989, vol. 17, 4353-7
- **WITTWER CT ; FILLMORE GC ; GARLING DJ**. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Anal Biochem*, 1990, vol. 186, 328-31
- **WITTWER CT ; GARLING DJ**. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. *Biotechniques*, 1991, vol. 10, 76-83
- **WITTWER CT ; MARSHALL BC ; REED GH ; CHERRY JL**. Rapid cycle allele-specific amplification: studies with the cystic fibrosis delta F508 locus. *Clin Chem*, 1993, vol. 39, 804-9
- **SCHODER D ; SCHMALWIESER A ; SCHAUBERGER G ; HOORFAR J ; KUHN M ; WAGNER M**. Novel approach for assessing performance of PCR cyclers used for diagnostic testing. *J Clin Microbiol*, 2005, vol. 43, 2724-8
- **HERRMANN MG ; DURTSCHI JD ; WITTWER CT ; VOELKERDING KV**. Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clin Chem*, 2007, vol. 53, 1544-8
- **HERRMANN MG ; DURTSCHI JD ; BROMLEY LK ; WITTWER CT ; VOELKERDING KV**. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem*, 2006, vol. 52, 494-503
- **RAJA S ; EL-HEFNAWY T ; KELLY LA ; CHESTNEY ML ; LUKETICH JD ; GODFREY TE**. Temperature-controlled primer limit for multiplexing of rapid, quantitative reverse transcription-PCR assays: application to intraoperative cancer diagnostics. *Clin Chem*, 2002, vol. 48, 1329-37
- **WITTWER CT ; RIRIE KM ; ANDREW RV ; DAVID DA ; GUNDRY RA ; BALIS UJ**. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 1997, vol. 22, 176-81
- Fluorescence monitoring of rapid cycle PCR for quantification. **WITTWER CT ; RIRIE KM ; RASMUSSEN RP**. Gene Quantification. Birkhauser, 1998, 129-44
- **ELENITOBA-JOHNSON O ; DAVID D ; CREWS N ; WITTWER CT**. Plastic vs. glass capillaries for rapid-cycle PCR. *Biotechniques*, 2008, vol. 44, 487-8, 490, , 492
- **ROPER MG ; EASLEY CJ ; LANDERS JP**. Advances in polymerase chain reaction on microfluidic chips. *Anal Chem*, 2005, vol. 77, 3887-93
- **ZHANG C ; XING D**. Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic Acids Res*, 2007, vol. 35, 4223-37
- **CHENG J ; SHOFFNER MA ; HVICHIA GE ; KRICKA LJ ; WILDING P**. Chip PCR. II. Investigation of different PCR amplification systems in microfabricated silicon-glass chips. *Nucleic Acids Res*, 1996, vol. 24, 380-5
- **WOOLLEY AT ; HADLEY D ; LANDRE P ; DEMELLO AJ ; MATHIES RA ; NORTHRUP MA**. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal Chem*, 1996, vol. 68, 4081-6
- **NEUZIL P ; ZHANG C ; PIPPER J ; OH S ; ZHUO L**. Ultra fast miniaturized real-time PCR: 40 cycles in less than six minutes. *Nucleic Acids Res*, 2006, vol. 34, e77
- **ODA RP ; STRAUSBAUCH MA ; HUHMER AF ; BORSON N ; JURRENS SR ; CRAIGHEAD J et al**. Infrared-mediated thermocycling for ultrafast polymerase chain reaction amplification of DNA. *Anal Chem*, 1998, vol. 70, 4361-8



- **ROPER MG ; EASLEY CJ ; LEGENDRE LA ; HUMPHREY JA ; LANDERS JP.** Infrared temperature control system for a completely noncontact polymerase chain reaction in microfluidic chips. *Anal Chem*, 2007, vol. 79, 1294-300
- **FRIEDMAN NA ; MELDRUM DR.** Capillary tube resistive thermal cycling. *Anal Chem*, 1998, vol. 70, 2997-3002
- **HEAP DM ; HERRMANN MG ; WITTEW CT.** PCR amplification using electrolytic resistance for heating and temperature monitoring. *Biotechniques*, 2000, vol. 29, 1006-12
- **KOPP MU ; MELLO AJ ; MANZ A.** Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip. *Science*, 1998, vol. 280, 1046-8
- **HASHIMOTO M ; CHEN PC ; MITCHELL MW ; NIKITOPOULOS DE ; SOPER SA ; MURPHY MC.** Rapid PCR in a continuous flow device. *Lab Chip*, 2004, vol. 4, 638-45
- **CREWS N ; WITTEW C ; GALE B.** Continuous-flow thermal gradient PCR. *Biomed Microdevices*, 2008, vol. 10, 187-95
- **CHIOU JT ; MATSUDAIRA PT ; EHRlich DJ.** Thirty-cycle temperature optimization of a closed-cycle capillary PCR machine. *Biotechniques*, 2002, vol. 33, 557-8, 60, , 62
- **FREY O ; BONNEICK S ; HIERLEMANN A ; LICHTENBERG J.** Autonomous microfluidic multi-channel chip for real-time PCR with integrated liquid handling. *Biomed Microdevices*, 2007, vol. 9, 711-8
- **CHEN J ; WABUYELE M ; CHEN H ; PATTERSON D ; HUPERT M ; SHADPOUR H et al.** Electrokinetically synchronized polymerase chain reaction microchip fabricated in polycarbonate. *Anal Chem*, 2005, vol. 77, 658-66
- **SUN Y ; KWOK YC ; NGUYEN NT.** A circular ferrofluid driven microchip for rapid polymerase chain reaction. *Lab Chip*, 2007, vol. 7, 1012-7
- **AGRAWAL N ; HASSAN YA ; UGAZ VM.** A pocket-sized convective PCR thermocycler. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, vol. 46, 4316-9
- **ZHANG C ; XU J ; MA W ; ZHENG W.** PCR microfluidic devices for DNA amplification. *Biotechnol Adv*, 2006, vol. 24, 243-84
- **WHEELER EK ; BENETT W ; STRATTON P ; RICHARDS J ; CHEN A ; CHRISTIAN A et al.** Convectively driven polymerase chain reaction thermal cycler. *Anal Chem*, 2004, vol. 76, 4011-6
- **BELGRADER P ; BENETT W ; HADLEY D ; LONG G ; MARIELLA R, JR. ; MILANOVICH F et al.** Rapid pathogen detection using a microchip PCR array instrument. *Clin Chem*, 1998, vol. 44, 2191-4
- **TERAZONA H ; TAKEI, H ; HATTORI A ; YASUDA K.** Development of a high-speed real-time polymerase chain reaction system using a circulating water-based rapid heat exchange. *Jap J Appl Phys*, 2010, vol. 49, 06GM05
- **WHEELER EK ; HARA CA ; FRANK J ; DEOTTE J ; HALL SB ; BENETT W ; SPADACCINI C ; BEER NR.** Under-three minute PCR: Probing the limits of fast amplification. *Analyst*, 2011, vol. 136 (16), 3707-12
- **FUCHIWAKI Y ; NAGAI H ; SAITO M ; TAMIYA E.** Ultra-rapid flow-through polymerase chain reaction microfluidics using vapor pressure. *Biosens Bioelect*, 2011, vol. 27, 88-94
- **MALTEZOS G ; JOHNSTON M ; TAGANOV K ; SRICHANTARATSAMEE C ; GORMAN J ; BALTIMORE D ; CHANTRATITA W ; SCHERER A.** Exploring the limits of ultrafast polymerase chain reaction using liquid for thermal heat exchange: A proof of principle. *Appl. Phys. Lett.*, 2010, vol. 97, 264101
- **WILHELM J ; HAHN M ; PINGOUD A.** Influence of DNA target melting behavior on real-time PCR quantification. *Clin Chem*, 2000, vol. 46, 1738-43
- **ZUNA J ; MUZIKOVA K ; MADZO J ; KREJCI O ; TRKA J.** Temperature non-homogeneity in rapid air-flow-based cycler significantly affects real-time PCR. *Biotechniques*, 2002, vol. 33 (508), 10, , 12
- **VON KANEL T ; ADOLF F ; SCHNEIDER M ; SANZ J ; GALLATI S.** Sample number and denaturation time are crucial for the accuracy of capillary-based LightCyclers. *Clin Chem*, 2007, vol. 53, 1392-4
- **Rapid thermal cycling and PCR kinetics. WITTEW CT ; HERRMANN MG.** PCR Methods Manual. Academic Press, 1999, 211-29
- **WITTEW CT ; REED GH ; GUNDRY CN ; VANDERSTEEN JG ; PRYOR RJ.** High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*, 2003, vol. 49, 853-60
- **VON AHSEN N ; WITTEW CT ; SCHUTZ E.** Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg(2+), deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas. *Clin Chem*, 2001, vol. 47, 1956-61
- **RIRIE KM ; RASMUSSEN RP ; WITTEW CT.** Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, 1997, vol. 245, 154-60
- **WITTEW CT ; HERRMANN MG ; MOSS AA ; RASMUSSEN RP.** Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 1997, vol. 22, 130-1, 4-8
- **WEIS JH ; TAN SS ; MARTIN BK ; WITTEW CT.** Detection of rare mRNAs via quantitative RT-PCR. *Trends Genet*, 1992, vol. 8, 263-4
- **Rapid cycle amplification for construction of competitive templates. BROWN RA ; LAY MJ ; WITTEW CT.** Genetic Engineering with PCR. Horizon Scientific Press, 1998, vol. Norfolk, 57-70
- **AUSUBEL et al.** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, 1998

- Analysis of rapid thermocycling for the polymerase chain reaction. **WHITNEY SE**. Ph.D. thesis. University of Nebraska, 2004
- **LAWYER FC ; STOFFEL S ; SAIKI RK ; CHANG SY ; LANDRE PA ; ABRAMSON RD ; GELFAND DH**. High-level expression, purification and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient of 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Meth Appl*, 1993, vol. 2, 275-287
- **INNIS MA ; MYAMO KB ; GELFAND DH ; BROW MAD**. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 1988, vol. 85, 9436-40
- **TERAZONO H ; HATTORI A ; TAKEI H ; TAKEDA K ; YASUDA K**. Development of 1480 nm photothermal high-speed real-time polymerase chain reaction system for rapid nucleotide recognition. *Jpn J Appl Phys.*, 2008, vol. 47, 5212-6
- Rapid PCR and melting curve analysis. **WITTMER CT ; RASMUSSEN RP ; RIRIE KM**. The PCR Revolution: Basic Technologies and Applications. Cambridge Univ Press, 2010, 48-69
- **FUCHIWAKI Y ; SAITO M ; WAKIDA S ; TAMIYA E ; NAGAI H**. A practical liquid plug flow-through polymerase chain-reaction system based on a heat-resistant resin chip. *Anal Sci*, 2011, vol. 27, 225-30
- **KIM H ; DIXIT S ; GREEN CJ ; FARIS GW**. Nano-droplet real-time PCR system with laser assisted heating. *Optics Express*, 2009, vol. 17, 218-27
- **OBEID PJ ; CHRISTOPOULOS TK ; CRABTREE HJ ; BACKHOUSE CJ**. Microfabricated device for DNA and RNA amplification by continuous-flow polymerase chain reaction and reverse transcription-polymerase chain reaction with cycle number selection. *Anal Chem*, 2003, vol. 75, 288-95
- **GIORDANO BC ; FERRANCE J ; SWEDBERG S ; HUHMER AFR ; LANDERS JP**. Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds. *Anal Biochem*, 2001, vol. 291, 124-132
- **PAL, D. ; VENKATARAMAN, V. ; MOHAN, K. N. ; CHANDRA, H. S. ; NATARAJAN, V.** A power-efficient thermocycler based on induction heating for DNA amplification by polymerase chain reaction. *Review of Scientific Instruments*, 2004, vol. 75 (9), 2880-2883
- **YUANZHI LAO, F. E. H. ; TAY, F. E. H. ; GUOLIN XU ; HARTONO, D. ; LEE, Y. Y.** A Non-Contact Micro Thermocycling Chip for Polymerase Chain Reactions. *International Journal of Computational Engineering Science*, 2003, vol. 4 (3), 651-654
- **SHEN F ; SUN, B ; KREUTZ JE ; DAVYDOVA EK ; DU W ; REDDY PL ; JOSEPH LJ ; ISMAGILOV RF**. Multiplexed Quantification of Nucleic Acids with Large Dynamic Range Using Multivolume Digital RT-PCR on a Rotational SlipChip Tested with HIV and Hepatitis C Viral Load. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, vol. 133, 17705-17712
- **BUSTIN, S et al**. Variability of the reverse transcription step: practical implications. *Clinical Chemistry*, 2015, vol. 61, 201-12
- **JL MONTGOMERY ; CT WITTMER**. Influence of PCR reagents on DNA polymerase extension rates measured on real-time PCR instruments. *Clin Chem*, 2014, vol. 60, 334-340
- **S MIFATOVIC-RUSTEMPASIC et al**. Sensitive and specific quantitative detection of rotavirus A by one-step real-time reverse transcription-PCR assay without antecedent double-stranded-RNA denaturation. *J Clin Microbiol*, 2013, vol. 51, 3047-54
- **P CARNINCI et al**. Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA. *PNAS*, 1998, vol. 95, 520-4
- **AN SPIESS et al**. Trehalose is a potent enhancer: Lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of Taq polymerase by the disaccharide trehalose. *Clin Chem*, 2004, vol. 50, 1256-9
- Enzymes of Molecular Biology. **GERARD GF ; D'ALESSIO JM**. Methods in Molecular Biology. Humana Press, Inc, 1993, vol. 16, 73-93
- **BROWNIE J et al**. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucl Acid Res*, 1997, vol. 25, 3235-41
- **SELLNER LN et al**. Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucl Acid Res*, 1992, vol. 20, 1487-90
- **CHANDLER DP et al**. Reverse Transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1998, vol. 64, 669-77
- **SUSLOV O et al**. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucl Acid Res*, 2005, vol. 33, e181
- **LIN Y ; JAYASENA SD**. Inhibition of multiple thermostable DNA polymerases by a heterodimeric aptamer. *J Mol Biol*, 1997, vol. 271, 100-111
- **NOMA T ; IKEBUKURO K**. Aptamer selection based on inhibitory activity using an evolution-mimicking algorithm. *Biochem Biophys Res Comm*, 2006, vol. 347, 226-31
- **CHEN H ; GOLD L**. Selection of high-affinity RNA ligands to reverse transcriptase: Inhibition of cDNA synthesis and RNase h activity. *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 8746-56
- **DANG C ; JAYASENA SD**. Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR. *J Mol Biol*, 1996, vol. 264, 268-78