

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 288**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2011 E 11748195 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 2539472**

54 Título: **Fast PCR para la genotipificación de STR**

30 Prioridad:

**26.02.2010 US 308862 P**

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

**28.08.2015**

73 Titular/es:

**LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (50.0%)**  
**5791 Van Allen Way**  
**Carlsbad, CA 92008, US y**  
**HENNESSY, LORI (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WANG, DENNIS**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 544 288 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

Fast PCR para la genotipificación de STR

## CAMPO

5 En general, las presentes ilustraciones se refieren a la amplificación de una muestra de ácido nucleico con el fin de obtener un perfil de STR en menos de 45 minutos.

## Antecedentes

10 Puesto que el proceso de PCR depende enormemente del funcionamiento de la ADN polimerasa utilizada, se han investigado diversas ADN polimerasas naturales o rediseñadas *in vitro*. Dos propiedades clave de una ADN polimerasa juegan papeles importantes en la determinación del tiempo de reacción global requerido para la amplificación por PCR. La primera propiedad es la "tasa de elongación" (o "tasa de extensión"), que se define como el número de nucleótidos polimerizados por segundo por molécula de ADN polimerasa. La segunda propiedad es la "procesividad", que se define como el número medio de nucleótidos añadidos por una ADN polimerasa en un único evento de unión. Tanto la "tasa de elongación" como la "procesividad" dependen de los componentes del medio de reacción y de la secuencia del molde de ADN.

15 Una detección rápida y exacta de los perfiles de ADN es un aspecto clave del análisis de muestras forenses y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) juega una parte integral en este proceso. Los métodos para disminuir el tiempo de PCR ahorrarán trabajo al técnico. Hay una necesidad no satisfecha para disminuir el tiempo de PCR sin comprometer la sensibilidad, la especificidad y la exactitud de los resultados.

20 Vallone et al. (Forensic Science International, vol 3, núm. 1 2008) describen un protocolo de PCR de ciclo rápido que amplifica 15 loci STR utilizando una polimerasa distinta de la ADN polimerasa AmpliTaqGold convencional. Giese et al. (Journal of Forensic Science, vol 54, núm. 6 2009) describen una PCR múltiple rápida para la amplificación de STR. El documento WO2006/074233 describe una proteína de fusión que comprende una proteína de unión a ácido nucleico y una polimerasa para mejorar la PCR. Yoshida et al. (Fisheries Science, vol 66, 2000 págs. 397-399) describen la mejora de la PCR para detectar dinucleótidos polimorfos. Esta reacción no es una reacción múltiple. Butler et al. (Forensic Science International, vol. 129, 2002 págs. 10-24) describen una reacción de PCR múltiple. La Figura 1 muestra el método utilizado en la aparición de diversos amplicones espúreos con tamaños similares al del amplicón esperado.

## Compendio de algunas realizaciones de la invención

30 La presente invención proporciona un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico en donde el método implica someter una mezcla de reacción a al menos un ciclo de amplificación, en donde la mezcla de reacción comprende un ácido nucleico de doble hebra, al menos 15 pares de cebadores en donde cada par de cebadores es susceptible de recocido con un locus de una repetición corta en tándem (STR) diferente, en donde el ciclo de amplificación es una amplificación en dos etapas en donde la extensión se produce a una temperatura de recocido en donde la temperatura de recocido oscila de aproximadamente 55°C a aproximadamente 75°C, y por medio de lo cual se detecta un perfil de STR completo.

35 Preferiblemente, el tiempo para completar un ciclo de amplificación es de 25 segundos.

40 En algunas realizaciones la temperatura de recocido en el ciclo de amplificación es al menos aproximadamente 5°C mayor, 10°C mayor, o 15°C mayor que la T<sub>m</sub> pronosticada de al menos dos de los cebadores mientras la temperatura de recocido oscila de aproximadamente 55°C a aproximadamente 75°C y el recocido y la extensión se producen a la misma temperatura. En algunas realizaciones la mezcla de reacción se mantiene a la temperatura de recocido durante 1 segundo, 2 segundos, 3 segundos o hasta 20 segundos o más. En algunas realizaciones la temperatura de desnaturalización es de 4 a 8 segundos y la temperatura de recocido junto con la temperatura de extensión es de 5 segundos a 25 segundos.

45 En algunas realizaciones, la ADN polimerasa utilizada en el protocolo Fast PCR en la presente memoria es una ADN polimerasa de la Familia A (Pol A) de cualquier fuente natural o recombinante incluyendo fragmentos y variantes de los mismos.

50 En algunas realizaciones, el método del protocolo Fast PCR ilustrado en la presente memoria se puede utilizar para la amplificación de una muestra de ácido nucleico para obtener un perfil de STR en 45 minutos o menos. En otras realizaciones se amplifican un múltiplex de al menos 15 loci STR, al menos 20 loci STR o al menos 40 loci STR más los loci de amelogenina mediante el método del protocolo Fast. En algunas realizaciones, el método del protocolo Fast PCR se utiliza para una reacción de PCR en tiempo real.

Se describen kits con configuraciones variables para su uso en la identificación de seres humanos que comprenden al menos un par de cebadores para la amplificación de loci de STR en un ciclo de amplificación de 25 segundos o menos.

### Breve descripción de los dibujos

Las FIGURAS 1A-1E son esquemas que representan los resultados en la réplica de un experimento de titulación de enzima utilizando Platinum® Taq y el protocolo Fast PCR.

### Descripción de las realizaciones ilustrativas

- 5 *Con el propósito de interpretar esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y cuando sea apropiado, los términos utilizados en singular también incluirán el plural y viceversa. En caso de que cualquier definición siguiente entre en conflicto con el uso de esa palabra en cualquier otro documento, la definición mostrada más abajo siempre prevalecerá con el fin de interpretar esta memoria descriptiva y sus reivindicaciones asociadas a menos que se pretenda claramente un significado contrario (por ejemplo en el documento en el que se utiliza originalmente el término). Se observa que, según se utiliza en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el" y "la", incluyan los referentes en plural a menos que expresamente e inequívocamente se limiten a un referente. El uso de "o" representa "y/o" a menos que se establezca de otro modo. Con fines ilustrativos, pero no como limitación, "X y/o Y" pueden significar "X" o "Y" o "X e Y". El uso de "comprenden", "comprende", "que comprende", "incluyen", "incluye", y "que incluye" son indistintos y no se pretende que sea limitante. Además, cuando la descripción de una o más realizaciones utiliza el término "que comprende", los expertos en la técnica comprenderán que, en algunos casos específicos, la realización o las realizaciones se pueden describir alternativamente utilizando la expresión "que consiste esencialmente en" y/o "que consiste en". El término "y/o" representa uno o todos los elementos enumerados o una combinación de dos o más de los elementos enumerados.*
- 10
- 15
- 20 Los encabezamientos de sección utilizados en la presente memoria tienen fines meramente organizativos y no se deben considerar limitantes de la materia sujeto descrita en modo alguno. La práctica de la presente invención puede emplear técnicas convencionales y descripciones de la química orgánica, tecnología de polímeros, biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica, e inmunología, que están dentro del conocimiento práctico de la técnica. Tales técnicas convencionales incluyen síntesis de oligonucleótidos, hibridación, reacción de extensión, y detección de hibridación utilizando una marca. Las ilustraciones específicas de las técnicas adecuadas se pueden obtener mediante la referencia al ejemplo descrito en la presente memoria más abajo. No obstante, también se pueden utilizar, por supuesto, otros procedimientos convencionales equivalentes. Tales técnicas convencionales y descripciones se pueden encontrar en manuales de laboratorio convencionales tales como Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vol. I-IV), PCR Primer: A Laboratory Manual, and Molecular Cloning: A Laboratory Manual (todos de Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984, IRL Press, Londres, Nelson y Cox (2000), Lehninger, Principles of Biochemistry 3ª Ed., W. H. Freeman Pub., Nueva York, N.Y. y Berg et al. (2002) Biochemistry, 5ª Ed., W. H. Freeman Pub., Nueva York, N.Y.
- 25
- 30 Según se utiliza en la presente memoria, "amplificar" hace referencia al proceso de incrementar enzimáticamente la cantidad de una secuencia de nucleótidos específica. Esta amplificación no está limitada a, pero generalmente se logra mediante PCR. Según se utiliza en la presente memoria, "desnaturalización" hace referencia a la separación de dos hebras de nucleótidos complementarias a partir de un estado recocado. La desnaturalización puede ser inducida por numerosos factores, tales como, por ejemplo, fuerza iónica del tampón, temperatura, o productos químicos que desorganizan las interacciones de emparejamiento de bases.
- 35
- 40 Según se utiliza en la presente memoria, el término "amplificar" hace referencia a un proceso por medio del cual una porción de un ácido nucleico replica utilizando, por ejemplo, cualquiera de una amplia gama de reacciones de extensión de cebadores. Las reacciones de extensión de cebadores ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, PCR. A menos que se establezca de otro modo, "amplificar" hace referencia a una única replicación o a una amplificación aritmética, logarítmica, o exponencial.
- 45
- 50 Según se utiliza en la presente memoria, "recocado" hace referencia a la interacción específica entre hebras de nucleótidos en donde las hebras se unen a otra basándose sustancialmente en la complementariedad las hebras como se determina mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick. No es necesario que la complementariedad sea de 100% para que se produzca el recocado.
- Los términos "ciclo de amplificación" y "ciclo de PCR" se utilizan indistintamente en la presente memoria y según se utiliza en la presente memoria hace referencia a la desnaturalización de una secuencia de polinucleótidos de doble hebra seguida de recocado de una secuencia de cebador a su secuencia complementaria y de la extensión de la secuencia de cebador.
- 55 Los términos "amplicón", "producto de amplificación" y "secuencia amplificada" se utilizan indistintamente en la presente memoria y hacen referencia a una amplia gama de técnicas para incrementar las secuencias de nucleótidos, linealmente o exponencialmente y pueden ser el producto de una reacción de amplificación. Un amplicón puede ser de doble hebra o de hebra sencilla, y puede incluir las hebras componentes separadas obtenidas desnaturalizando un producto de amplificación de doble hebra. En ciertas realizaciones, el amplicón de un ciclo de amplificación puede servir como molde en el siguiente ciclo de amplificación. Las técnicas de amplificación

- ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, PCR o cualquier otro método que emplee una etapa de extensión de cebadores. Otros ejemplos no limitantes de amplificación incluyen, pero no se limitan a, reacción de detección con ligasa (LDR) y reacción en cadena con ligasa (LCR). Los métodos de amplificación pueden comprender ciclación térmica o se pueden realizar de manera isoterma. En diversas realizaciones, el término "producto de amplificación" y "secuencia amplificada" incluye productos de cualquier número de ciclos de reacciones de amplificación.
- Según se utilizan en la presente memoria, los términos "cebador de amplificación" y "cebador oligonucleotídico" se utilizan indistintamente y hacen referencia a un oligonucleótido, susceptible de recocido a una región de ARN o ADN. La región recocida puede ser adyacente a una secuencia diana, incluyendo pero no limitada a un SNP, un STR o una región de mutación, y servir como un cebador de inicio para la síntesis de ADN en condiciones adecuadas bien conocidas en la técnica. Típicamente, una reacción de PCR emplea un "par de cebadores de amplificación" también referido como "par de cebadores oligonucleotídicos" incluyendo un cebador "aguas arriba" o "directo" y un cebador "aguas abajo" o "inverso", que delimitan una región de ARN o ADN que se va a amplificar. Un primer cebador y un segundo cebador pueden ser un cebador directo o inverso respectivamente, y se utilizan indistintamente en la presente memoria y no se deben considerar limitantes.
- Según se utiliza en la presente memoria, "extensión" hace referencia al ciclo de amplificación después de que el oligonucleótido cebador y el ácido nucleico diana se hayan recocido entre sí, en donde la enzima polimerasa cataliza la extensión del cebador, permitiendo de ese modo la amplificación, utilizando el ácido nucleico diana como molde de replicación.
- Según se utilizan en la presente memoria, los términos "polinucleótido", "oligonucleótido", y "ácido nucleico" se utilizan indistintamente en la presente memoria y hacen referencia a polímeros de monómeros de nucleótidos de hebra sencilla y de doble hebra, incluyendo sin limitación 2'-desoxirribonucleótidos (ADN) y ribonucleótidos (ARN) unidos por conexiones de enlaces fosfodiéster internucleótido, o análogos internucleótido, y contraiones asociados, p. ej., H<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, trialkilamonio, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, y similares. Un polinucleótido puede estar formado totalmente por desoxirribonucleótidos, totalmente por ribonucleótidos, o por mezclas quiméricas de los mismos y puede incluir análogos de nucleótidos. Las unidades monoméricas de nucleótidos pueden comprender cualquier nucleótido o análogo de nucleótido. Los polinucleótidos oscilan típicamente desde un tamaño de unas pocas unidades monoméricas, p. ej., 5-40 cuando son referidos a veces en la técnica como oligonucleótidos, a varios miles de unidades monoméricas de nucleótidos. A menos que se indique de otro modo, siempre que se represente una secuencia de polinucleótido, se entenderá que los nucleótidos están en un orden 5' a 3' de izquierda a derecha y que "A" indica desoxiadenosina, "C" indica desoxicitosina, "G" indica desoxiguanosina, "T" indica timidina, y "U" indica desoxiuridina, a menos que se indique de otro modo. Las letras A, C, G, y T se pueden utilizar para hacer referencia a las propias bases, a los nucleósidos, o a los nucleótidos que comprenden las bases, como es convencional en la técnica. En los polinucleótidos de origen natural, la unión inter-nucleósido es típicamente un enlace fosfodiéster, y las subunidades son referidas como "nucleótidos".
- Cuando dos oligonucleótidos no solapantes, diferentes se recuecen con diferentes regiones de la misma secuencia de ácido nucleico complementario lineal, el extremo 3' de un oligonucleótido apunta hacia el extremo 5' del otro; el primero puede ser denominado oligonucleótido "aguas arriba" y el último oligonucleótido "aguas abajo".
- Los términos "polimerasa" y "polimerasa de ácido nucleico" se utilizan indistintamente y según se utiliza en la presente memoria hacen referencia a cualquier polipéptido que cataliza la síntesis o secuenciación de un polinucleótido utilizando un polinucleótido existente como molde.
- Según se utiliza en la presente memoria, "ADN polimerasa" hace referencia a una polimerasa de ácido nucleico que cataliza la síntesis o secuenciación de ADN utilizando un polinucleótido existente como molde.
- Según se utiliza en la presente memoria, "ADN polimerasa termoestable" hace referencia a una ADN polimerasa que, a una temperatura superior a 37°C, conserva su capacidad para añadir al menos un nucleótido sobre el extremo 3' de un cebador o un producto de extensión del cebador que es recocido con una secuencia de ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, una ADN polimerasa termoestable permanece activa después de la exposición a una temperatura mayor de aproximadamente 37°C. En ciertas realizaciones, una ADN polimerasa termoestable permanece activa a una temperatura de más de aproximadamente 42°C. En ciertas realizaciones, una ADN polimerasa termoestable permanece activa a una temperatura de más de aproximadamente 50°C. En ciertas realizaciones, una ADN polimerasa termoestable permanece activa a una temperatura de más de aproximadamente 60°C. En ciertas realizaciones, una ADN polimerasa termoestable permanece activa a una temperatura de más de aproximadamente 70°C. En ciertas realizaciones, una ADN polimerasa termoestable permanece activa a una temperatura de más de aproximadamente 80°C. En ciertas realizaciones, una polimerasa termoestable permanece activa a una temperatura de más de aproximadamente 90°C.
- Según se utiliza en la presente memoria, "nucleósido" incluye los nucleósidos naturales, incluyendo las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, p. ej., como describen Komberg y Baker, DNA Replication, 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992). "Análogos" en referencia a nucleósidos incluye nucleósidos sintéticos que tienen radicales de bases modificadas y/o radicales azúcar modificados, p. ej. descritos por Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley, Nueva York, 1980); Uhlman y Peyman, Chemical Reviews, 90: 543-584 (1990); o similar. Tales análogos incluyen

nucleósidos sintéticos diseñados para potenciar las propiedades de unión, reducir la degeneración, aumentar la especificidad, y similares.

5 Los términos "tasa de elongación" y "tasa de extensión" se utilizan indistintamente en la presente memoria y según se utiliza en la presente memoria hacen referencia al número de nucleótidos polimerizados por segundo por molécula de ADN polimerasa.

El término "procesividad" según se utiliza en la presente memoria hace referencia al número medio de nucleótidos añadidos por una ADN polimerasa en un único evento de unión.

El término "actividad transferasa terminal" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a la adición sin molde de un único nucleótido, principalmente adenosina, al extremo 3' de la hebra de ADN amplificada.

10 Como se define en la presente memoria, "la actividad nucleasa 5' → 3'" o "la actividad nucleasa 5' a 3'" hace referencia a aquella actividad de una polimerasa de ácido nucleico específica del molde que incluye una actividad exonucleasa 5' → 3' tradicionalmente asociada con algunas ADN polimerasas por medio de las cuales los nucleótidos son eliminados del extremo 5' de un oligonucleótido de una manera secuencial, (esto es, la ADN polimerasa I de *E. coli* tiene esta actividad mientras el fragmento de Klenow no), o una actividad endonucleasa 5' → 3' en donde la escisión se produce a más de un nucleótido del extremo 5', o ambas.

Según se utilizan en la presente memoria, las expresiones "termoestable" y "térmicamente estable" son intercambiables.

20 Según se utiliza en la presente memoria, el término "polimerasa de ácido nucleico termoestable" hace referencia a una enzima que es relativamente estable al calor cuando se compara, por ejemplo, con polimerasas de nucleótidos de *E. coli* y que cataliza la polimerización de nucleósidos. Generalmente, la enzima inicia la síntesis en el extremo 3' del cebador recocido con la secuencia diana, continua en dirección 5' a lo largo del molde y si posee actividad nucleasa 5' a 3', hidroliza la sonda recocida intermedia para liberar los fragmentos de la sonda tanto marcados como no marcados, hasta que termina la síntesis. Una enzima termoestable representativa aislada de *Thermus aquaticus* (Taq) se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.889.818 y un método para utilizarla en una PCR convencional se describe en Saiki et al., (1988), Science 239:487.

Las bacterias ilustrativas a partir de las cuales se puede aislar la ADN polimerasa Pol A incluyen, pero no se limitan a *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus*, *Thermatoga maritime*, *Bacillus caldotenax*, *Carboxydotherrmus hydrogenformans*, *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*, *Thermus brokianus*, *Thermus caldophilus* GK24, *Thermus flavus*, *Thermus rubens*, o un mutante de cualquiera de las mencionadas anteriormente.

30 Según se utiliza en la presente memoria "inicio caliente" hace referencia a la exposición térmica de una solución de reacción, a menudo una mezcla de reacción de PCR, a una temperatura suficiente para restaurar la actividad enzimática, esto es, la reactivación térmica de una ADN polimerasa que había sido inactivada, por ejemplo, por medios químicos o con anticuerpos.

35 Según se utiliza en la presente memoria, la "reacción en cadena de la polimerasa" o PCR es una amplificación de ácido nucleico que consiste en una etapa de desnaturalización inicial que separa las hebras de una muestra de ácido nucleico de doble hebra, seguido de la repetición de (i) una etapa de recocido, que permite que los cebadores de amplificación se recuezan específicamente con posiciones que flanquean una secuencia diana; (ii) una etapa de extensión que extiende los cebadores en una dirección 5' a 3' formando de ese modo un amplicón polinucleotídico complementario a la secuencia diana, y (iii) una etapa de desnaturalización que ocasiona la separación del amplicón de la secuencia diana (Mullis et al., eds, The polymerase Chain Reaction, BirkHauser, Boston, Mass. (1994)). Cada una de las etapas anteriores se puede llevar a cabo a una temperatura diferente, preferiblemente utilizando un termociclador automático (Applied Biosystems LLC, una división de Life Technologies Corporation, Foster City, CA.). Si se desea, las muestras de ARN se pueden convertir en heterodúplex de ADN/ARN o en dúplex de ADNc mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. El método de PCR también incluye la PCR con transcriptasa inversa y otras reacciones que siguen los principios de la PCR.

50 El término "cebador" hace referencia a un polinucleótido (oligonucleótido) y a análogos de los mismos que son capaces de hibridar selectivamente con un ácido nucleico diana o "molde", una secuencia que flanquea la región diana o un sitio de unión al cebador correspondiente de un producto de amplificación; y permite la síntesis de una secuencia complementaria al correspondiente molde polinucleotídico, secuencia flanqueante o producto de amplificación desde el extremo 3' del cebador. Típicamente un cebador puede tener de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de longitud y puede proporcionar un punto de inicio para la síntesis dirigida por el molde de un polinucleótido complementario al molde, que puede tener lugar en presencia de enzimas, cofactores, sustratos tales como nucleótidos (dNTP) apropiados y similares.

55 El término "extensión del cebador" según se utiliza en la presente memoria hace referencia tanto a la síntesis de ADN resultante de la polimerización de nucleósidos trifosfato individuales utilizando un cebador como punto de inicio, como a la unión de oligonucleótidos adicionales al cebador para extender el cebador. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "extensión del cebador" incluya la ligación de dos oligonucleótidos

para formar un producto más largo que puede servir a continuación como diana en futuros ciclos de amplificación. Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "cebador" incluya los oligonucleótidos utilizados en los procesos de amplificación mediados por ligación que son extendidos por medio de ligación de un segundo oligonucleótido que hibrida en una posición adyacente.

5 Según se utiliza aquí, el término "reacción de extensión del cebador" hace referencia a una reacción en la que una polimerasa cataliza la síntesis dirigida por un molde de un ácido nucleico desde el extremo 3' de un cebador. El término "producto de extensión de un cebador" hace referencia al ácido nucleico resultante. Una reacción de extensión del cebador ilustrativa no limitante es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los términos "extender" y "extensión" hacen referencia a la síntesis dirigida por el molde de un ácido nucleico desde el extremo 3' de un cebador, que está catalizada por una polimerasa.

10 El término "secuencia de ácido nucleico" según se utiliza en la presente memoria puede hacer referencia al propio material de ácido nucleico y no está restringido a la información de la secuencia (esto es, la sucesión de letras seleccionadas entre las cinco letras de bases A, C, G, T, o U) que bioquímicamente caracteriza a un ácido nucleico específico, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN. Los ácidos nucleicos mostrados en la presente memoria se representan en orientación 5' → 3' a menos que se indique de otro modo.

El término "Tm" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a la temperatura de fusión a la cual la mitad de las hebras de ADN están en estado de doble hebra y la mitad están en estado de hebra sencilla.

15 El término "desnaturalizar" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a la separación de un ácido nucleico de doble hebra en hebras complementarias sencillas. Muy a menudo, los enlaces de hidrógeno se rompen para completar la desnaturalización utilizando calor o métodos químicos tales como urea.

Los términos "recocido" e "hibridación" se utilizan indistintamente y representan la interacción de emparejamiento de bases de un ácido nucleico con otro ácido nucleico que da como resultado la formación de un dúplex u otra estructura ordenada superior. La interacción primaria es específica de la base, esto es A/T y G/C, por Watson/Crick y enlaces de hidrógeno de tipo Hoogsteen.

25 Los términos "complemento" y "complementario" según se utilizan en la presente memoria hacen referencia a la capacidad de dos polinucleótidos de hebra sencilla (por ejemplo, un cebador y un polinucleótido diana) para emparejar bases entre sí, donde una adenina de una hebra de un polinucleótido se emparejará con una base de timina o uracilo de una hebra de un segundo polinucleótido y una citosina de una hebra de un polinucleótido se emparejará con una base de guanina de una hebra de un segundo polinucleótido. Dos polinucleótidos son complementarios entre sí cuando una secuencia de nucleótidos de un polinucleótido puede emparejar las bases con una secuencia de nucleótidos de un segundo polinucleótido. Por ejemplo, 5'-ATGC y 5'-GCAT son complementarios.

El término "extender" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a aumentar la longitud de la secuencia del cebador en una dirección 5' a 3' formando de ese modo un amplicón polinucleotídico complementario a la secuencia diana

35 Los términos "detectar" y "detección" se utilizan en sentido amplio en la presente memoria e incluyen cualquier técnica por medio de la cual se pueda determinar la presencia o identificar una secuencia de ácido nucleico. En algunas realizaciones, detectar comprende cuantificar una señal detectable del ácido nucleico, incluyendo sin limitación, un método de detección en tiempo real, tal como la PCR cuantitativa ("Q-PCR"). En algunas realizaciones, detectar comprende determinar la secuencia de un producto de secuenciación o una familia de productos de secuenciación generados utilizando un producto de amplificación como molde; en algunas realizaciones, semejante detección comprende obtener la secuencia de una familia de productos de secuenciación. En otras realizaciones la detección se puede lograr a través de la medición del tamaño de un producto de amplificación de ácido nucleico.

40 Según se utiliza en la presente memoria, "ADN" hace referencia a ácido desoxirribonucleico en sus diversas formas conocidas en la técnica, tales como ADN genómico, ADNc, moléculas de ácido nucleico aisladas, ADN vector, y ADN cromosómico. "Ácido nucleico" hace referencia a ADN o ARN en cualquier forma. Los ejemplos de las moléculas de ácido nucleico aisladas incluyen, pero no se limitan a, ARNm, ARNip, miRNA, ARNhc, moléculas de ARN recombinante contenidas en un vector, moléculas de ADN recombinante mantenidas en una célula anfitriona heteróloga, moléculas de ácido nucleico parcial o sustancialmente purificadas, y moléculas de ADN sintético. Típicamente, un ácido nucleico "aislado" está libre de secuencias que flanquean de manera natural el ácido nucleico (esto es, secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual deriva el ácido nucleico. Por otra parte, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, está por lo general sustancialmente libre de otro material celular o medio de cultivo cuando es producido mediante técnicas recombinantes, o libre de precursores químicos u otros agentes químicos cuando es sintetizada químicamente.

55 Según se utiliza en la presente memoria, el término "loci de repeticiones cortas en tándem (STR)" hace referencia a regiones de un genoma que contienen elementos de secuencia repetitivos, cortos de 2 a 7 pares de bases de longitud. Cada elemento de secuencia se repite al menos una vez en una STR y es referido en la presente memoria como "unidad de repetición". El término STR también incluye una región de un ADN genómico en donde más de una

- única unidad de repetición se repite en tándem o con bases intermedias, siempre que al menos una de las secuencias se repita al menos dos veces en tándem. Los ejemplos de las STR, incluyen pero no se limitan a, un repetición de triplete, p. ej., ATC en tándem; una repetición de 4 nucleótidos (tetra-repetición), p. ej., GATA en tándem; y una repetición de 5 nucleótidos (penta-repetición), p. ej., ATTGC en tándem y así sucesivamente. Se puede encontrar información sobre STR específicas que se pueden utilizar como marcadores genéticos, entre otros sitios, en STRbase en [www.cstl.nist.gov/strbase](http://www.cstl.nist.gov/strbase).
- 5 El término "señal detectable" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una señal que es susceptible de ser detectada en ciertas condiciones. En ciertas realizaciones, una señal detectable se detecta cuando ésta está presente en una cantidad suficiente.
- 10 El término "radical señalizador" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un radical que es capaz de producir una señal detectable.
- El término "molécula indicadora" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una molécula que comprende una marca que puede ser detectada.
- 15 El término "sonda" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un polinucleótido que comprende una porción específica diseñada para hibridar de una manera específica de la secuencia con una región complementaria de una secuencia de ácido nucleico específica, p. ej., una secuencia de ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la porción específica de la sonda puede ser específica para una secuencia concreta, o alternativamente, puede ser degenerada, p. ej., específica para un conjunto de secuencias. En ciertas realizaciones, la sonda está marcada. La sonda puede ser un oligonucleótido que es complementario a al menos una porción de un producto de amplificación formado utilizando dos cebadores.
- 20 El término "sonda indicadora" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una sonda que comprende una marca que puede ser detectada.
- El término "sonda nucleasa 5'" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a una sonda que comprende un radical señalizador conectado a un radical extintor o un radical donador a través de un elemento de conexión al oligonucleótido corto. Cuando la sonda nucleasa 5' está intacta, el radical extintor o el radical donador influyen en la señal detectable del radical señalizador. De acuerdo con ciertas realizaciones, la sonda nucleasa 5' hibrida selectivamente con una secuencia de ácido nucleico diana y es escindida por un polipéptido que tiene actividad exonucleasa 5' a 3', p. ej., cuando la sonda es remplazada por una hebra recién polimerizada durante una reacción de extensión del cebador, tal como una PCR.
- 25 Según se utiliza en la presente memoria "radical extintor" hace referencia a un radical que hace que la señal detectable de un radical señalizador disminuya cuando el radical extintor está suficientemente cerca del radical señalizador.
- Asimismo en la presente memoria, las recitaciones de intervalos numéricos mediante los extremos incluyen todos los números incluidos en ese intervalo (p. ej., 1 a 5 incluye 1, 1,5, 2, 2,75, 3, 3,80, 4, 5, etc.).
- 35 A continuación se hará referencia a diversas realizaciones, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos.
- Las ADN polimerasas son conocidas por los expertos en la técnica. Las ADN polimerasas incluyen polimerasas ADN-dependientes, que utilizan ADN como molde, o polimerasas ARN-dependientes, tales como la transcriptasa inversa, que utilizan ARN como molde.
- 40 Basándose en la homología de secuencia, las ADN polimerasas bacterianas se pueden subdividir en siete familias diferentes: A, B, C, D, X, Y, y RT. Las ADN polimerasas ADN-dependientes entran en una de las seis familias (A, B, C, D, X, e Y), entrando la mayor parte en una de las tres familias (A, B, y C). Véanse, p. ej., Ito et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:4045-4057; Braithwaite et al. (1993) *Nucleic Acids Res.* 21:787-802; Filee et al. (2002) *J. Mol. Evol.* 54:763-773; y Alba (2001) *Genome Biol.* 2:3002.1-3002.4. Ciertas ADN polimerasas pueden ser polipéptidos de cadena sencilla (p. ej., ciertas polimerasas de las familias A y B) o enzimas de múltiples subunidades (p. ej., ciertas polimerasas de la familia C) teniendo una de las subunidades actividad polimerasa. *Id.* Una proteína de fusión puede comprender una ADN polimerasa seleccionada entre una polimerasa de la familia A, B, C, D, X, o Y.
- 45 Existen cinco ADN polimerasas conocidas en bacterias. Todas tienen actividad polimerasa 5'-3' e incluyen Pol I, Pol II, Pol III, Pol IV y Pol V. La Pol IV y la Pol V son ADN polimerasas de la familia Y, conocidas por tener una débil fidelidad sobre moldes normales y pueden replicar por medio de ADN dañado. Las Pol I, Pol II y Pol III tienen todas actividad exonucleasa 3'-5' mientras Pol I también está implicada en la reparación del ADN, que tiene actividad tanto polimerasa 5'-3' como exonucleasa correctora 3'-5'.
- 50 Las polimerasas de la familia A ("Pol A") incluyen polimerasas tanto replicativas como reparadoras. Los miembros replicativos de esta familia incluyen a ADN polimerasa de T7 y la ADN polimerasa mitocondrial eucariótica. Entre las polimerasas reparadoras se encuentran la ADN Pol I de *E. coli*, la Pol I de *Thermus aquaticus* (ADN polimerasa Taq), y la Pol I de *Bacillus stearothermophilus*. La reparación por escisión y el procesamiento de los fragmentos de
- 55

Okazaki generados durante la síntesis de la hebra rezagada son realizados por las polimerasas reparadoras. Debido a que las enzimas Pol A más termoestables no poseen la actividad exonucleasa 3' a 5', son incapaces de corregir la hebra de ácido nucleico recién sintetizada y por consiguiente tienen mayores tasas de error.

5 Las polimerasas de la familia B ("Pol B") son sustancialmente polimerasas replicativas incluyendo las principales ADN polimerasas eucarióticas  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y también la ADN polimerasa  $\zeta$ . Las polimerasas Pol B también incluyen ADN polimerasas codificadas por algunas bacterias y bacteriófagos, de las cuales las mejor caracterizadas son las de los bacteriófagos T4, Phi29 y RB69. Las enzimas Pol B están implicadas en la síntesis de la hebra tanto conductora como rezagada y son reseñables por su notable exactitud durante la replicación ya que muchas tienen una fuerte actividad exonucleasa 3'-5', siendo las excepciones las ADN polimerasas  $\alpha$  y  $\zeta$  que carecen de actividad correctora.

10 En ciertas realizaciones, los métodos de amplificación comprenden al menos un ciclo de amplificación, por ejemplo, pero no limitados a, los procedimientos secuenciales de: hibridación de cebadores a porciones específicas del cebador de la secuencia diana o de los productos de amplificación de cualquier número de ciclos de una reacción de amplificación; síntesis de una hebra de nucleótidos de una manera dependiente del molde utilizando una polimerasa; y desnaturalización de dúplex de ácido nucleico recién formado para separar las hebras. El ciclo se puede repetir o  
15 no.

El tiempo de amplificación por PCR se puede disminuir significativamente cambiando la enzima utilizada. Tres propiedades clave intrínsecas de una ADN polimerasa juegan papeles importantes en la determinación del tiempo de reacción global requerido para la amplificación por PCR. La primera propiedad es la "tasa de elongación" (o "tasa de extensión"), que se define como el número de nucleótidos polimerizados por segundo por molécula de ADN polimerasa. La segunda propiedad es la "procesividad", que se define como el número medio de nucleótidos  
20 añadidos por una ADN polimerasa en un único evento de unión. Tanto la "tasa de elongación" como la "procesividad" dependen de los componentes del medio de reacción y de la secuencia del molde de ADN. La tercera propiedad es la presencia o ausencia de actividad transferasa terminal, que es la adición sin molde de un único nucleótido, principalmente adenosina, al extremo 3' de la hebra de ADN amplificada.

25 Las consideraciones para reducir el tiempo de PCR pueden comenzar con la evaluación de la enzima polimerasa utilizada. Por ejemplo, el mecanismo para la activación de la enzima puede disminuir el tiempo de PCR en aproximadamente 10 minutos. Las enzimas de inicio caliente con modificaciones químicas tales como la ADN polimerasa AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems, Foster City, CA), pueden requerir una etapa de activación térmica de ocho a once minutos mientras las enzimas de inicio caliente que tienen anticuerpos (ADN polimerasa Platinum®  
30 Taq, Invitrogen, Carlsbad, CA, ADN polimerasa SpeedSTAR™ HS, Takara, Madison, WI), oligonucleótidos, o el uso de proteínas de unión a cebadores de hebra sencilla pueden reducir el mecanismo de inicio caliente a uno a dos minutos.

35 Las mejoras que disminuyen los tiempos de desnaturalización, recocido y extensión pueden reducir adicionalmente el tiempo de la PCR mediante el uso de una ADN polimerasa más procesiva así como la utilización de un ciclador térmico con tasas de incremento más rápidas o cambiando de un protocolo de ciclación de 3 etapas a un protocolo de 2 etapas que elimina un tiempo de incremento por ciclo de PCR. Adicionalmente, el uso de una ADN polimerasa Pol B puede eliminar la necesidad de una etapa de extensión final, ahorrando hasta 60 minutos. No obstante, se ha demostrado que el uso de una variedad de ADN polimerasas de la familia Pol B produce alturas de los picos sombra "stutter" más altas dificultando la interpretación del perfil de STR (datos no mostrados).

40 En algunas realizaciones, se conciben ADN polimerasas Pol A y Pol B para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana por debajo de al menos 50 minutos, por debajo de al menos 45 minutos, por debajo de al menos 40 minutos, por debajo de al menos 35 minutos, por debajo de al menos 30 minutos, por debajo de al menos 25 minutos y por debajo de al menos 20 minutos. El producto de amplificación resultante puede ser detectado. En algunas realizaciones la detección se selecciona entre microfluidos, electroforesis, espectrometría de masas y  
45 similares conocidos por un experto normal en la técnica para detectar productos de amplificación.

En algunas realizaciones, los productos de amplificación de la PCR se pueden detectar por medio de colorantes fluorescentes conjugados con los cebadores de amplificación de la PCR, por ejemplo como se describe en la solicitud de patente PCT WO 2009/059049. Los productos de amplificación por PCR también se pueden detectar mediante otras técnicas, incluyendo, pero no limitadas a, la tinción de productos de amplificación, p. ej., tinción con plata y similares.  
50

En algunas realizaciones, la detección comprende un aparato, esto es, la utilización de un método de detección automático o semi-automático que puede comprender, pero no es necesario que comprenda, un algoritmo informático. En algunas realizaciones, el aparato es portátil, transportable o comprende un componente portátil que puede ser insertado en un componente menos móvil o transportable, p. ej., que reside en un laboratorio, hospital u otro entorno en el que se lleva a cabo la detección de los productos de amplificación. En ciertas realizaciones, la etapa de detección se combina con o es una continuación de al menos una etapa de amplificación, una etapa de secuenciación, una etapa de aislamiento, una etapa de separación, por ejemplo, pero no limitadas a, un aparato de electroforesis capilar que comprende al menos un escáner fluorescente y al menos un componente para realizar gráficos, registros, o lecturas; una columna de cromatografía acoplada a un monitor de absorbancia o un escáner de  
55

fluorescencia y un registrador gráfico; una columna de cromatografía acoplada a un espectrómetro de masas que comprende un componente de registro y/o detección; un aparato espectrofotométrico que comprende al menos un escáner de luz UV/visible y al menos un componente para realizar gráficos, registros, o lecturas; o una micromatriz con un dispositivo de registro de datos tal como un escáner o una cámara CCD. En ciertas realizaciones, la etapa de  
5 detección se combina con una etapa de amplificación, por ejemplo, pero no limitada a, análisis en tiempo real tal como Q-PCR. Los métodos ilustrativos para llevar a cabo una etapa de detección incluyen la serie de aparatos ABI PRISM® Genetic Analyzer, la serie de aparatos ABI PRISM® DNA Analyzer, la serie de aparatos ABI PRISM® Sequence Detection Systems, y la serie de aparatos Applied Biosystems Real-Time PCR (todos de Applied Biosystems); y micromatrices y soporte lógico relacionado tal como la micromatriz Applied Biosystems y Applied  
10 Biosystems 1700 Chemiluminescent Microarray Analyzer y otras micromatrices y sistemas de análisis disponibles en el mercado de Affymetrix, Agilent, y Amersham Biosciences, entre otros (véase también Gerry et al., J. Mol. Biol. 292:251-62, 1999; De Bellis et al., Minerva Biotec 14:247-52, 2002; y Stears et al., Nat. Med. 9:140-45, incluyendo los suplementos, 2003) o plataformas Bed Array (Illumina, San Diego, CA). El soporte lógico ilustrativo incluye GeneMapper™ Software, GeneScan® Analysis Software, y el soporte lógico Genotyper® (todos de Applied  
15 Biosystems).

En algunas realizaciones, se puede detectar y cuantificar un producto de amplificación basándose en la razón de masa con respecto a carga de al menos una parte del amplión ( $m/z$ ). Por ejemplo, en algunas realizaciones, un  
20 cebador comprende un grupo informador compatible con la espectrometría de masas, incluyendo sin limitación, etiquetas de masa, etiquetas de carga, porciones escindibles, o isótopos que se incorporan a un producto de amplificación y pueden ser utilizados para la detección en espectrómetros de masas (véase, *p. ej.*, Haff y Smirnov, Nucl. Acids Res. 25:3749-50, 1997; y Sauer et al., Nucl. Acids Res. 31 :e63, 2003). Un producto de amplificación puede ser detectado mediante espectrometría de masas. En algunas realizaciones, un cebador comprende un sitio para una enzima de restricción, una porción escindible, o similar, para facilitar la liberación de una parte de un  
25 producto de amplificación para la detección. En ciertas realizaciones, se separa una multiplicidad de productos de amplificación mediante cromatografía líquida o electroforesis capilar, se somete a ESI o a MALDI, y se detecta mediante espectrometría de masas. Las descripciones de la espectrometría de masas se pueden encontrar, entre otros sitios, en The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology, Gary Siuzdak, MCC Press, 2003.

En algunas realizaciones, la detección comprende una lectura o evaluación manual o visual, o combinaciones de las  
30 mismas. En algunas realizaciones, la detección comprende una lectura digital o analógica automática o semi-automática. En algunas realizaciones, la detección comprende análisis en tiempo real o de variables principales de valoración. En algunas realizaciones, la detección comprende un dispositivo microfluidoico, incluyendo sin limitación, TaqMan® Low Density Array (Applied Biosystems). En algunas realizaciones, la detección comprende un aparato de detección en tiempo real. Los aparatos de tiempo real ilustrativos incluyen, ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System, ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System, Applied  
35 Biosystems 7500 Real-Time PCR System, Applied Biosystems 7900 HT Fast Real-Time PCR System (todos de Applied Biosystems); LightCycler™ System (Roche Molecular); Mx3000P™ Real-Time PCR System, Mx3005P™ Real-Time PCR System, y Mx4000® Multiplex Quantitative PCR System (Stratagene, La Jolla, CA); y Smart Cycler System (Cepheid, distribuido por Fisher Scientific). Las descripciones de los aparatos de tiempo real se pueden encontrar, entre otros sitios, en los respectivos manuales de usuario de sus fabricantes; McPherson; DNA  
40 Amplification: Current Technologies and Applications, Demidov y Broude, eds., Horizon Bioscience, 2004; y Patente de los Estados Unidos Núm. 6.814.934.

Los expertos en la técnica comprenden que los mecanismos de detección empleados son generalmente no  
45 limitantes. En lugar de eso, se encuentran dentro del alcance de los métodos y kits descritos una amplia variedad de métodos de detección, siempre que permitan la presencia o ausencia de un microorganismo en la muestra que se vaya a determinar.

En diversas realizaciones de las presentes ilustraciones se ha descubierto que el uso de un ciclo de amplificación de  
50 dos etapas en un protocolo de ciclación de PCR puede reducir el tiempo de la PCR a menos de 45 min. a la vez que se obtiene un perfil de STR interpretable, completo utilizando 1 ng de ADN de control 9947A. Los ejemplos de los protocolos Fast PCR con enzimas de la familia Pol A se ilustran en la Tabla 1.

Tabla 1: Protocolos Fast PCR con ADN polimerasa Pol A

Kit STR:	Identifier® Plus		Identifier® Plus	
Enzima:	ADN polimerasa AmpliTaq Gold®		ADN polimerasa Platinum® Taq	
Protocolo PCR		Núm. de ciclos de amplificación		Núm. de ciclos de amplificación
Desnaturalización Molde	95°C/11 min.		95°C /1 min.	
Ciclo de amplificación	94°C/5 seg. 59°C/20 seg.	29 X	94°C/5 seg. 59°C/20 seg.	29X
Adenilación sin molde	72°C/1 min.		72°C/1 min.	
Tiempo PCR Total:	45 min.		36,5 min.	

5 En algunas realizaciones el ciclo de amplificación de dos etapas es de 30 segundos o menos, 25 segundos o menos, 20 segundos o menos, 15 segundos o menos o 10 segundos o menos. En algunas realizaciones el ciclo de amplificación se lleva a cabo al menos 25 veces, al menos 26 veces, al menos 27 veces, al menos 28 veces o al menos 30 veces.

10 En algunas realizaciones, la T<sub>m</sub> pronosticada de los cebadores es de 5°C menos que la temperatura de recocido, 10°C menos que la temperatura de recocido, o 15°C menos que la temperatura de recocido. Del mismo modo, la temperatura de recocido en el ciclo de amplificación puede ser 5°C mayor que la temperatura de recocido, 10°C mayor que la temperatura de recocido, o 15°C mayor que la temperatura de recocido. La T<sub>m</sub> es un reflejo de la temperatura a la que el ADN de doble hebra se vuelve de hebra sencilla.

15 En diversas realizaciones de las presentes ilustraciones, la temperatura de recocido y la temperatura de elongación son idénticas y la extensión del cebador recocido con el molde se produce a la temperatura de recocido, por ejemplo, pero no limitado a, el protocolo de ciclo de amplificación de dos etapas. En algunas realizaciones la temperatura de recocido es de aproximadamente 55°C a aproximadamente 75°C, y de aproximadamente 57°C a aproximadamente 72°C, de aproximadamente 58°C a aproximadamente 72°C, de aproximadamente 59°C a aproximadamente 72°C y de aproximadamente 60°C a aproximadamente 72°C. En algunas realizaciones la mezcla de reacción que experimenta la amplificación por PCR se mantiene a la temperatura de recocido durante 5 segundos o menos, 4 segundos o menos, 3 segundos o menos, 2 segundos o menos o 1 segundo o menos.

20 En varias realizaciones de la presente ilustración la temperatura de desnaturalización, la temperatura a la cual el desoxiribonucleótido de doble hebra se separa en hebras sencillas, se produce a una temperatura de desnaturalización suficiente para desnaturalizar el ácido nucleico de doble hebra tal como de aproximadamente 85°C a aproximadamente 100°C y la mezcla de reacción se mantiene a la temperatura de desnaturalización durante 9 segundos o menos, 8 segundos o menos, 7 segundos o menos, 6 segundos o menos, 5 segundos o menos, 4 segundos o menos, 3 segundos o menos, 2 segundos o menos o 1 segundo y la temperatura de recocido/elongación es de 30 segundos o menos, 25 segundos o menos, 20 segundos o menos, 15 segundos o menos, 10 segundos o menos o 5 segundos o menos.

30 En diversas realizaciones la temperatura de desnaturalización, recocido/elongación y extensión reflejan la temperatura del elemento de calentamiento o bloque térmico dentro del ciclador térmico o un dispositivo microfluídico. En otras realizaciones las temperaturas de desnaturalización, recocido/elongación y extensión reflejan la temperatura de la mezcla de reacción. No es necesario que la mezcla de reacción, una vez que alcanza la temperatura de desnaturalización y/o recocido/elongación se mantenga a la temperatura de desnaturalización y/o recocido/elongación una vez que la mezcla de reacción alcanza la temperatura de desnaturalización y/o recocido/elongación.

35 En diversas realizaciones de las presentes ilustraciones la enzima Pol A puede ser una enzima derivada de *Thermus aquaticus*, *Thermus thermophilus* HB-8 o HB-27, *Thermus flavus*, *Thermus maritimus*; fragmento grande, *Thermotoga naepolitana*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus aggregans*, y *Thermomicrobium roseum*. La polimerasa de la familia Pol A puede ser un fragmento, variante o forma recombinante de la ADN

polimerasa termostable. Tales fragmentos, variantes o formas recombinantes que conservan su actividad ADN polimerasa son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En diversas realizaciones de las presentes ilustraciones se ha descubierto que elevadas concentraciones de enzima Pol A junto con elevadas concentraciones de cebadores reducen inesperadamente y sustancialmente los tiempos de amplificación por PCR para obtener perfiles de STR interpretables, completos. La titulación de la enzima Pol A seleccionada para incrementar lentamente la enzima en la mezcla de reacción se llevó a cabo para identificar la concentración óptima (Ejemplo A). Al contrario que en los estudios de Butler et al. (Forensic Sci. Intl.: Gen. 3:42-45 2008) y Tan et al. (J. Forensic Sci. 54(6):1287-1296, 2009), la amplificación satisfactoria para la determinación de un perfil de STR de una muestra de ácido nucleico es dependiente no sólo del nivel de enzima Pol A, sino del nivel de concentración de cebador y no requiere la adición de enzimas o suplementos.

Utilizando AmpF/STR® Identifiler Plus® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), para los cebadores y sustituyendo Platinum® Taq en la Mezcla Maestra, se incrementó la concentración de la enzima Pol A, Platinum® Taq, gradualmente como se muestra en las Figuras 1A-1E. La amplificación se realizó en un aparato Applied Biosystems GeneAmp® 9700 PCR (Tabla 1). Inesperadamente, una enzima insuficiente dio como resultado perfiles de STR incompletos (Figura 1A), p. ej., D5 y enzima en exceso dieron como resultado morfologías de picos divididos (Figuras 1D y 1E, ~140-160 pb), concretamente en los loci D5 y D8. Sorprendentemente, se obtuvo un perfil de STR interpretable, completo utilizando el protocolo Fast PCR y enzima Platinum Taq (Figuras 1B a 1C).

Los estudios para comparar las sensibilidades de las enzimas AmpliTaq Gold®, Platinum® Taq y SpeedSTAR™ con el protocolo Fast PCR frente al kit Identifiler Plus y el protocolo de PCR convencional mostraron que el protocolo convencional era capaz de detectar un perfil STR completo con tan solo 125 pg de ADN introducido mientras el protocolo Fast PCR lograba un perfil de STR completo hasta 500 ng de ADN con AmpliTaq Gold y 250 pg de ADN para Platinum y SpeedSTAR. Como cabría esperar, la altura media de los picos fue mayor con el protocolo convencional frente al protocolo Fast PCR (datos no mostrados).

Los estudios de especificidad indicaron mayor reactividad cruzada entre especies con las enzimas Platinum y SpeedSTAR con el protocolo Fast PCR frente a la enzima AmpliTaq Gold. Adicionalmente, cuando se comparó con el protocolo convencional, la inhibición de la PCR cuando se seguía el protocolo Fast PCR estuvo presente con tan poco como Hematina 100 µM y 25 ng/µl de Ácido húmico para la enzima AmpliTaq Gold, Hematina 200 µM y 50 ng/µl de Ácido húmico para la enzima Platinum y Hematina 200 µM y 75 ng/µl de Ácido húmico para la enzima SpeedSTAR. Estos resultados se pueden revertir incrementando el número de ciclos u optimizando la formulación de la mezcla maestra.

En diversas realizaciones de las presentes ilustraciones la familia A de polimerasas puede ser una polimerasa bacteriana o un fragmento o variante de una polimerasa de la familia A que tenga actividad polimerasa. La polimerasa termoestable también puede ser una polimerasa recombinante, un fragmento o una variante de una ADN polimerasa recombinante que tiene actividad polimerasa. En algunas realizaciones la polimerasa es una variante de una ADN polimerasa Taq con una mayor procesividad con respecto a la ADN polimerasa Taq de origen natural.

En diversas realizaciones la polimerasa utilizada en la mezcla de reacción de PCR del protocolo Fast PCR puede tener adicionalmente una molécula indicadora para indicar la cantidad de ácido nucleico en la mezcla de reacción. En algunas realizaciones la molécula indicadora puede ser una sonda indicadora capaz de hibridar con un ácido nucleico de doble hebra tal como en la reacción de la nucleasa 5' como conocerán los expertos en la técnica. La sonda puede ser una sonda de nucleasa 5', una baliza molecular, una sonda de PNA u otra sonda conocida por los expertos en la técnica.

Las presentes ilustraciones también están dirigidas a kits para determinar un perfil de STR que utilizan los métodos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, un kit básico puede comprender un recipiente que tiene al menos un par de cebadores oligonucleotídicos capaz de amplificar un locus STR. Un kit también puede comprender opcionalmente instrucciones para su uso. Un kit también puede comprender otros componentes de kit opcionales, tales como, por ejemplo, uno o más de marcadores alélicos de peso molecular dirigidos a cada uno de los loci amplificados, una cantidad suficiente de enzima para la amplificación, tampón de amplificación para facilitar la amplificación, disolución de catión divalente para facilitar la actividad de la enzima, dNTP para la extensión de la hebra durante la amplificación, disolución de carga para la preparación del material amplificado para la electroforesis, ADN genómico como control de molde, un marcador de tamaño para asegurar que los materiales migran como estaba previsto en el medio de separación, y un protocolo y un manual para educar al usuario y limitar los errores en la utilización. Las cantidades de varios reactivos de los kits también se pueden variar dependiendo de numerosos factores, tales como la sensibilidad óptima del proceso. Está dentro del alcance de estas ilustraciones proporcionar kits de ensayo para su uso en aplicaciones manuales o kits de ensayo para su uso en la preparación de muestras, ajustes de reacciones, detectores o analizadores.

Los expertos en la técnica entienden que los mecanismos de detección empleados son generalmente no limitantes. En vez de eso, una amplia variedad de métodos de detección está dentro del alcance de los métodos y kits descritos, siempre que permitan determinar la presencia o ausencia de un amplicón.

## Ejemplos

### A. Titulación de enzima

5 Se preparó una disolución tampón para PCR alcalina sin enzima que tenía Tris-HCl 10-50 mM, pH 8,0, KCl 1-70 mM, y MgCl<sub>2</sub>, dNTP 0,15 - 0,4 mM cada uno, Tween-20 al 0,4-0,8%, opcionalmente Triton-x100 al 0,05%-1%, 700-3000 ng de BSA, Glicerol al 1-8%, Azida de sodio al 0,008 - 0,05%, opcionalmente DMSO al 0,5%-2%, y 1 ng de ADN de control 9947A para una reacción de 25 µl. Se prepararon alícuotas del tampón de PCR con cantidades variables de ADN polimerasa Platinum de 1 a 15 unidades/25 µl de reacción de PCR, por duplicado, (Figuras 1A-1E). Se siguió el protocolo Fast PCR de la Tabla 1 junto con los cebadores utilizados en Identifier Plus Kit que se añadieron a la mezcla de reacción. Los productos de amplificación se cargaron sobre un aparato Applied Biosystems 10 3130x/electroforesis capilar y se analizaron utilizando el soporte lógico GeneMapper® ID-X. La concentración óptima se determinó basándose en la capacidad para obtener un perfil de STR completo con alturas de los picos interpretables en general.

Una enzima insuficiente dio como resultado perfiles de STR incompletos (Figura 1A), p. ej., D5 y enzima en exceso dieron como resultado morfologías de picos divididos (Figuras 1D y 1E, ~140-160 pb), concretamente en los loci D5 y D8. Sorprendentemente, se obtuvo un perfil de STR interpretable, completo utilizando el protocolo Fast PCR y la 15 enzima Platinum Taq (Figuras 1B a 1C).

### B. Titulación del Cebador

La concentración del cebador también parecía tener impacto en el éxito del protocolo Fast PCR para los kits Identifier® Direct y NGM™ (Applied Biosystems) (datos no mostrados). De este modo, todas las concentraciones de 20 cebador se ajustaron a ≥0,100 µM en una mezcla de reacción de 25 µl. La PCR se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo Fast PCR de la Tabla 1 y se evaluó como se describe en Titulación de Enzima.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método que comprende: someter una mezcla de reacción a al menos un ciclo de amplificación, en donde la mezcla de reacción comprende un ácido nucleico de doble hebra, al menos 15 pares de cebadores en donde cada par de cebadores es susceptible de recocido con un locus de repetición corta en tándem (STR), en donde el ciclo de amplificación es una amplificación de dos etapas en donde la extensión se produce a una temperatura de recocido en donde la temperatura de recocido oscila de aproximadamente 55°C a aproximadamente 75°C, y detectar de ese modo un perfil de STR completo
2. El método de la reivindicación 1, en donde el tiempo hasta completar un ciclo de amplificación es de 25 segundos.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la temperatura de recocido es al menos aproximadamente 5°C, o al menos aproximadamente 10°C, o al menos aproximadamente 15°C mayor que la T<sub>m</sub> pronosticada de al menos uno de los cebadores.
4. El método de la reivindicación 3, en donde la temperatura de recocido es de aproximadamente 57°C a aproximadamente 72°C.
5. El método de la reivindicación 1, en donde la mezcla de amplificación comprende una ADN polimerasa Taq o un fragmento o variante de ADN polimerasa Taq que tiene actividad polimerasa.
6. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente al menos un par de cebadores susceptible de recocido con hebras complementarias del ácido nucleico de doble hebra y amplificación de una región del locus de amelogenina, preferiblemente en donde dicho locus de amelogenina amplificado se encuentra en el cromosoma X y en el cromosoma Y.
7. El método de la reivindicación 1, en donde la mezcla de reacción se somete hasta a 25, hasta a 30 o hasta a 40 ciclos de amplificación.
8. El método de la reivindicación 1, en donde el número de moléculas amplificadas producidas en al menos uno de los uno o más ciclos de amplificación es de 1,6 veces a 2 veces el número de moléculas presente al inicio del al menos un ciclo de amplificación.
9. El método de la reivindicación 1, en donde la eficacia de la amplificación de la polimerasa del al menos un ciclo de amplificación es de 0,8 a 1,0.

Figura 1A:

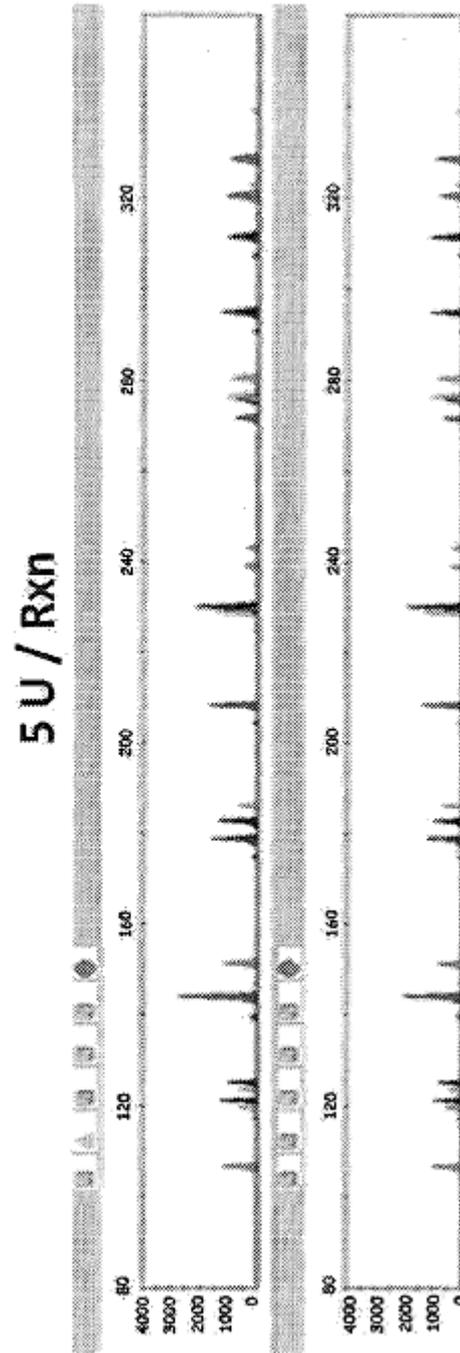


Figura 1B:

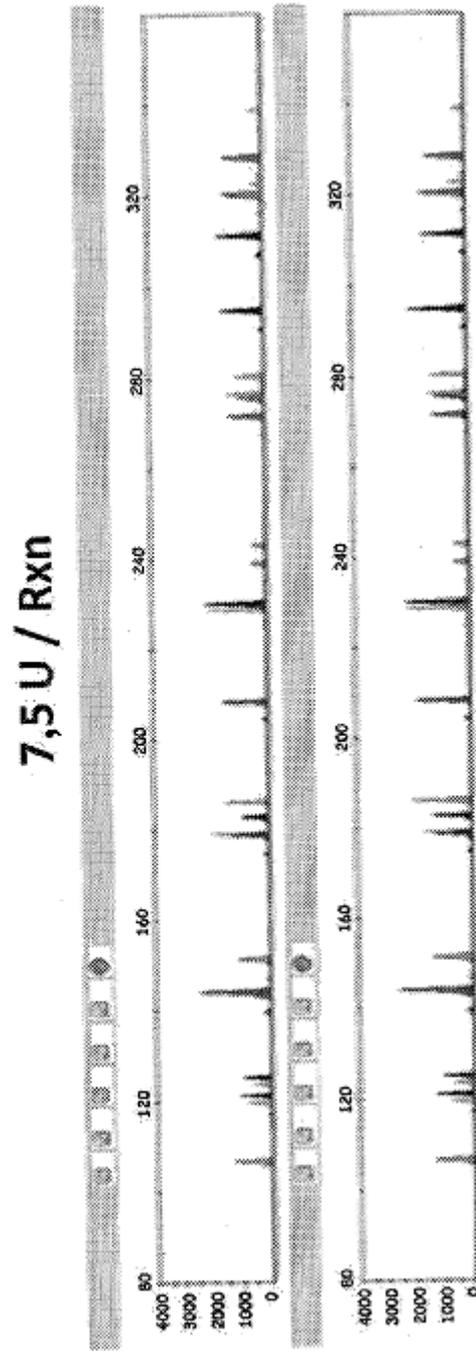


Figura 1C:

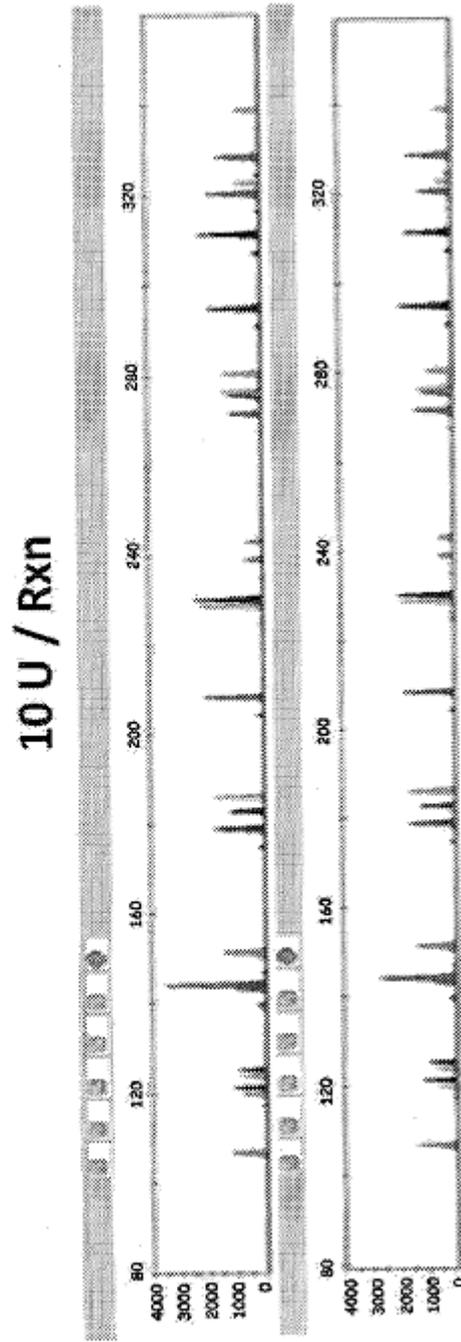


Figura 1D:

# 12,5 U / Rxn

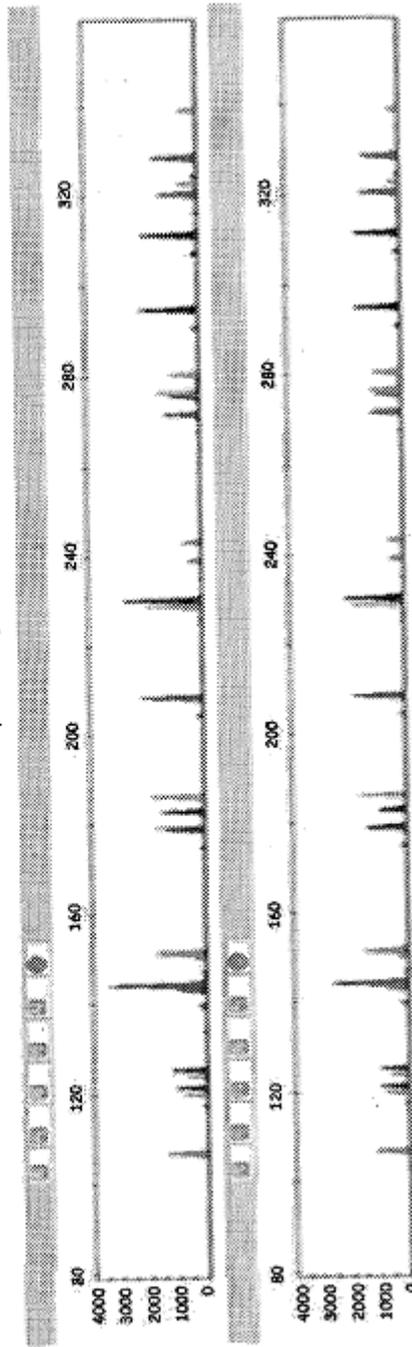


Figura 1E:

### 15 U / Rxn

