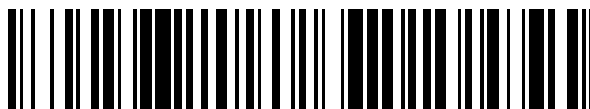


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 769**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/84 (2006.01)

G01N 35/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2010** **E 10003757 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017** **EP 2239338**

54 Título: **Control de transferencia de fluido**

30 Prioridad:

09.04.2009 EP 09005255

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

24.10.2017

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH

72 Inventor/es:

SAGNER, GREGOR y
HORAT, MARTIN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones :

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

ES 2 638 769 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).

Control de transferencia de fluido**DESCRIPCIÓN****5 Antecedentes de la invención**

Para la preparación de los ensayos, en la mayoría de los casos, es necesario mezclar varios reactivos fluidos y para obtener resultados reproducibles de dichos ensayos es importante que se transfiera un volumen controlado de cada reactivo y de la muestra. Todos los procedimientos de transferencia de fluido tienen una cierta varianza, por lo que no es posible evitar los errores de transferencia, pero al menos debe ser posible detectar aquellos procedimientos de transferencia que presentan errores inaceptables para poder rechazar el resultado de dichos ensayos.

En especial, los sistemas de PCR en tiempo real requieren una mezcla exacta de todos los componentes de reacción para que la cuantificación sea fiable y comparable, ya que la cantidad de material de muestra, de cebadores/sondas, así como de mezclas maestras requeridas para la PCR en tiempo real influyen particularmente en el resultado de cuantificación. Pero, por supuesto, otros ensayos también requieren una configuración con mezcla de varios componentes y el control de dicha configuración en términos de volumen de transferencia también es importante.

Para abordar estas incertidumbres se pueden utilizar técnicas de normalización y principalmente se establecen dos procedimientos de normalización diferentes para PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR):

(1) Para normalizar frente a las diferencias en el material de muestra (ADN o ARN), se mide un gen de referencia no regulado en combinación con el gen diana y se calcula la proporción de diana/referencia (procedimiento de cuantificación relativa; véase, por ejemplo, el manual del operario de LightCycler 480, página 179 y siguientes).

(2) Para normalizar frente a las diferencias en la intensidad de fluorescencia, se añade un colorante de referencia (que no participa en la reacción de qPCR) y todos los valores de fluorescencia medidos se normalizan frente a la fluorescencia del colorante de referencia (Applied Biosystems, colorante de referencia ROX, documento US 5.736.333).

Sin embargo, ambos procedimientos de normalización presentan problemas. El procedimiento de normalización (1) puede controlar solamente la cantidad/calidad del material de muestra cuando se aplica la cuantificación relativa, pero no cuando se utiliza la cuantificación absoluta. Además, este procedimiento no controla la cantidad de ningún otro componente de PCR aparte del material de muestra. El procedimiento de normalización (2) normaliza solamente frente a las diferencias en la intensidad de fluorescencia generadas por las variaciones del sistema de qPCR. No controla ni avisa al usuario cuando la cantidad de un componente determinado está por debajo de un cierto límite.

El uso de un colorante de referencia interno pasivo para determinar si se han producido errores de llenado de la muestra buscando una señal ausente o anormalmente alta o baja se conoce gracias al documento US2005/0232818 A1.

El documento US2007/0141709 A1 muestra un procedimiento para mezclar una mezcla de muestras de ensayo que contiene un primer colorante que absorbe a una primera longitud de onda y un segundo colorante que absorbe a una segunda longitud de onda con un diluyente que contiene el segundo colorante solamente.

Actualmente, no hay sistemas de control de transferencia de fluido conocidos en el estado de la técnica que proporcionen un sistema de control para los volúmenes de los componentes a mezclar para una configuración de ensayo.

La presente invención proporciona un sistema cerrado para la configuración de ensayo que abarca estrategias de control para identificar errores de volumen de los componentes mezclados para dichos ensayos. El procedimiento de acuerdo con la presente invención es especialmente adecuado para la configuración de amplificaciones por PCR en tiempo real.

Sumario de la invención

Un aspecto de la presente invención es un procedimiento de control de transferencia de fluido, como se muestra en la reivindicación independiente 1 o la reivindicación independiente 2.

"Solución" se utiliza en toda la presente invención como un término genérico para todo tipo de componentes líquidos que se tienen que transferir a un recipiente para una reacción posterior en dicho recipiente, en el que dicha reacción puede requerir la adición de componentes adicionales a dicho recipiente. En consecuencia, el procedimiento de acuerdo con la presente invención se puede aplicar a cada una de las etapas de transferencia que se deban realizar antes de dicha reacción. Si se transfiere más de una solución a un recipiente de reacción, cada una de dichas soluciones se puede mezclar con un colorante distinto y característico. De forma alternativa, cada solución puede

tener el mismo colorante y se puede usar el cambio de intensidad después de cada etapa para el control de transferencia.

A lo largo de la presente invención, los colorantes de control se utilizan como controles de transferencia. La presencia de los colorantes de control se puede medir usando una maquinaria adecuada dependiendo de los colorantes usados, por ejemplo, tubos fotomultiplicadores (PMT) o chips CCD (dispositivo de acoplamiento de carga) para colorantes ópticos o contadores de centelleo en el caso de colorantes radiactivos.

Las intensidades medidas se procesan por un módulo de programa informático y dicho módulo de programa informático compara los valores calculados con determinados umbrales (por ejemplo, fluorescencia mínima, intervalo de desviación respecto a un valor medio). El módulo de programa informático genera una señal de salida que (a) advierte al usuario que cierto recipiente no ha logrado la verificación del control de transferencia ("cierre suave") o (b) inhibe el cálculo del resultado de los recipientes que no logran el control de transferencia ("cierre brusco"). Además, el módulo de programa informático se puede usar para evitar el procesamiento adicional de los recipientes en los que se ha detectado un error de transferencia.

Una ventaja de la presente invención es la verificación independiente de la precisión del volumen de transferencia para todos los componentes que se requieren para una aplicación determinada de una manera automatizada. En particular, cuando se utilizan sistemas automáticos de manipulación de líquidos (robots de pipeteo) para la configuración de la reacción, el control manual a simple vista no es aplicable al procedimiento. Además, el control del procedimiento de transferencia en aplicaciones de bajo volumen (volumen de reacción total $<3 \mu\text{l}$) es de especial relevancia, ya que la manipulación de líquidos en volúmenes de (sub)microlitros es muy crítica en cuanto a precisión y reproducibilidad.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento de control de transferencia de fluido en un flujo de trabajo de amplificación por PCR en tiempo real, comprendiendo el procedimiento:

- i) proporcionar una solución para su transferencia con un colorante de control,
- ii) transferir volúmenes predefinidos de dicha solución que comprende una concentración de dicho colorante de control a una pluralidad de recipientes,
- iii) medir la intensidad de los colorantes de control en cada recipiente,
- iv) comparar la intensidad medida en la etapa iii) para cada recipiente con un valor umbral predefinido, en el que se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado si la intensidad medida en la etapa iii) está por debajo de dicho valor umbral, y
- v) realizar una amplificación por PCR en tiempo real en dicha pluralidad de recipientes, en el que los resultados de las amplificaciones por PCR en tiempo real llevadas a cabo en dichos recipientes con un error de transferencia de fluido detectado en la etapa iv) se marcan en consecuencia.

De forma alternativa, el procedimiento de control de transferencia de fluido en un flujo de trabajo de amplificación por PCR en tiempo real de acuerdo con la presente invención también se puede realizar con la etapa

- v') realizar una amplificación por PCR en tiempo real en aquellos recipientes sin un error de transferencia de fluido detectado en la etapa iv) en lugar de la etapa iv).

Dado que la amplificación por PCR en tiempo real requiere varios componentes, cada componente puede contener los mismos o diferentes colorantes como controles de transferencia. Antes de iniciar la reacción de PCR en tiempo real, se mide la intensidad de cada colorante utilizando un instrumento de PCR en tiempo real. Por ejemplo, un colorante de control está contenido en la mezcla maestra de qPCR, el segundo colorante de control está contenido en el material de muestra y un tercer colorante de control está contenido en la mezcla de cebadores/sondas.

Descripción detallada de la invención

Las primeras etapas del procedimiento de control de transferencia de fluido de la presente invención son las siguientes:

- a) proporcionar una solución para su transferencia con un colorante de control,
- b) transferir volúmenes predefinidos de dicha solución que comprende una concentración de dicho colorante de control a una pluralidad de recipientes,
- c) medir la intensidad de los colorantes de control en cada recipiente,
- d) comparar la intensidad medida en la etapa c) para cada recipiente con un valor umbral predefinido, en el que se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado si la intensidad medida en la etapa c) está por debajo de dicho valor umbral, y
- e) compilar un valor de intensidad media de todos los recipientes que tienen una intensidad medida en la etapa c) que está por encima de dicho valor umbral predefinido,
- f) verificar, para todos los recipientes que tienen una intensidad medida en la etapa c) que está por encima de dicho valor umbral predefinido, si dicha intensidad está dentro de un intervalo predefinido que rodea a dicho valor de intensidad media compilado en la etapa e), en el que un error de transferencia de fluido se detecta para un recipiente determinado si la intensidad medida en la etapa c) no está dentro de dicho intervalo, y
- g) declarar como correcta una transferencia de fluido para todos los recipientes que tienen una intensidad medida en

la etapa c) que está dentro de dicho intervalo predefinido de la etapa f).

En el procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con la presente invención, dicha pluralidad de recipientes está dispuesta como una placa multipocillo, dicha placa multipocillo tiene al menos 8 pocillos, preferentemente al menos 96 pocillos, más preferentemente al menos 384 pocillos, lo más preferentemente al menos 1536 pocillos.

De forma alternativa, el experto en la técnica apreciará que una disposición de recipientes separados en una gradilla es igualmente adecuada para la presente invención. Por supuesto, es posible a lo largo de la presente invención que algunos de los pocillos de una placa multipocillo queden vacíos y que no todos de la pluralidad de recipientes reciban una transferencia de fluido.

En aún otro procedimiento de control de transferencia de fluido preferente de acuerdo con la presente invención, dicho valor umbral de la etapa d) está predefinido basándose en valores de intensidad medidos utilizando una solución de referencia, teniendo dicha solución de referencia el volumen y la concentración de colorante de control de la etapa b) .

El valor umbral se utiliza como un primer control de transferencia para detectar recipientes sin ninguna solución y, consecuentemente, sin ninguna intensidad, así como recipientes que obtuvieron solamente una parte menor del volumen predefinido. Para calcular un valor umbral adecuado, es preferente realizar una medición de referencia con una solución que tiene el volumen y la concentración de colorante del procedimiento de transferencia de fluido predefinido, mientras que la intensidad medida se puede usar como el valor umbral.

De forma alternativa, se puede usar la intensidad de fondo de recipientes vacíos para definir el valor umbral predefinido, por ejemplo, el valor umbral se puede definir como tres veces la intensidad de fondo.

Puesto que se pueden aceptar variaciones de transferencia menores, es más preferente permitir una cierta desviación en la intensidad medida, por ejemplo, de aproximadamente un 10 %. En este ejemplo, todavía es aceptable un error de transferencia de un 10 %. Dependiendo de la intensidad medida, el recipiente se marcará como "control de transferencia aprobado" o "control de transferencia fallido".

Además de este primer control de transferencia, se realiza un segundo control de transferencia para evaluar la desviación entre los recipientes, ya que dichas desviaciones plantean problemas con respecto a comparaciones significativas de dichos recipientes. Dicho segundo control de pipeteo se basa en un intervalo predefinido que rodea al valor de intensidad media de todos los recipientes que pasaron el primer control de pipeteo. Dependiendo de la intensidad medida, el recipiente se marcará como "control de intervalo aprobado" o "control de intervalo fallido".

Este segundo control de pipeteo es de particular importancia en situaciones con una alta varianza de la solución que se va a transferir entre cada uso del procedimiento. Esta varianza de la solución que se va a transferir se puede originar por un desplazamiento de volumen entre aplicaciones posteriores del procedimiento o por un cambio en la concentración de colorante de control. En dicha situación, no es posible establecer un umbral significativo para el valor medio que se aplicará para cada uso del procedimiento.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una posibilidad de realizar un control automatizado de pipeteo basado únicamente en la ejecución de transferencia real sin necesidad de otro valor umbral predefinido, ya que el valor de intensidad media se determina para cada ejecución para identificar recipientes comparables.

En combinación con el primer control de transferencia, se garantiza que no se utilicen recipientes con volúmenes de transferencia muy alejados de la cantidad definida para determinar el valor de intensidad media, ya que estos recipientes distorsionarían correspondientemente el valor del segundo control.

Principalmente, hay dos modos de realización diferentes adecuados para usar dicho intervalo que rodea al valor de intensidad media.

Un procedimiento de control de transferencia de fluido preferente de acuerdo con la presente invención es un procedimiento en el que dicho intervalo predefinido de la etapa f) rodea simétricamente a dicho valor de intensidad media compilado en la etapa e).

Otro procedimiento de control de transferencia de fluido preferente de acuerdo con la presente invención es un procedimiento en el que dicho intervalo predefinido de la etapa f) rodea asimétricamente a dicho valor de intensidad media compilado en la etapa e).

Estos dos modos de realización reflejan diferentes situaciones de varianzas aceptables. En situaciones en las que las precesiones hacia volúmenes de transferencia más bajos y más altos son de igual importancia, se debería utilizar un intervalo simétrico, mientras que la amplitud de dicho intervalo está predefinida basándose en variaciones de transferencia aceptables. En situaciones en las que las varianzas, por ejemplo, hacia volúmenes más altos, no son

críticas, es preferente utilizar un intervalo asimétrico que tiene un subintervalo pequeño para volúmenes más pequeños y un subintervalo mayor para volúmenes más altos.

Si se necesita transferir más de una solución a cada recipiente, para las otras soluciones también se puede utilizar un control dentro del alcance de la presente invención. En un modo de realización, las otras soluciones se mezclarán también con un colorante de control. A lo largo de la presente invención es posible utilizar el mismo colorante de control para cada una de las soluciones, si las soluciones se añaden una tras otra a los recipientes y si después de la adición de cada solución se mide la intensidad. Por lo tanto, el control de transferencia en este modo de realización se basa en el aumento de la intensidad del colorante de control después de añadir una determinada solución. De forma alternativa, cada solución se puede mezclar con un colorante de control diferente, de manera que dichos colorantes sean distinguibles espectralmente. Por consiguiente, en este modo de realización, las soluciones se pueden añadir todas a la vez o una tras otra a los recipientes, ya que las intensidades de todos los colorantes se pueden medir independientemente.

Si se necesita añadir dos soluciones a los recipientes, el procedimiento de acuerdo con la presente invención utiliza un colorante de control para la primera solución y una molécula de extinción para la segunda solución. Esta configuración tiene la ventaja de que se pueden establecer dos controles de transferencia con un solo colorante, de modo que la maquinaria para medir la intensidad es menos compleja en comparación con una configuración que requiere dos colorantes.

Un procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con la presente invención es un procedimiento en el que se añaden a los recipientes volúmenes predefinidos de una segunda solución que comprende una concentración de una molécula de extinción y en el que dicha molécula de extinción extingue la intensidad de dicho colorante de control utilizado en la etapa a), en el que dicho procedimiento comprende las etapas adicionales de

h) medir la intensidad extinguida de los colorantes de control en cada recipiente,

i) calcular un valor de parámetro de extinción basado en la intensidad extinguida medida en la etapa h) para cada recipiente, en el que se detecta un error de transferencia de fluido para un determinado recipiente si no se cumple un criterio de umbral de extinción predefinido de dicho valor de parámetro de extinción,

j) compilar un valor de parámetro de extinción medio de todos los recipientes que tienen un valor de parámetro de extinción calculado en la etapa i) que cumple dicho criterio de umbral de extinción predefinido,

k) verificar, para todos los recipientes que tienen un valor de parámetro de extinción calculado en la etapa i), que cumplen dicho criterio de umbral de extinción predefinido, si dicho valor de parámetro de extinción está dentro de un segundo intervalo predefinido que rodea a dicho valor de parámetro de extinción medio compilado en la etapa j), mientras que se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado si dicho valor de parámetro de extinción medido en la etapa i) no está dentro de dicho segundo intervalo predefinido, y

l) declarar como correcta una segunda transferencia de fluido para todos los recipientes que tienen un valor de parámetro de extinción medido en la etapa i) que está dentro de dicho segundo intervalo predefinido de la etapa k).

En este modo de realización, el segundo control de transferencia de fluido se basa de nuevo en dos etapas de control, concretamente el "control de transferencia" y el "control de intervalo" como se ha descrito anteriormente. Puesto que las etapas h) a l) son posteriores a las etapas a) a g), hay dos modos de realización diferentes que son posibles dentro del alcance de la presente invención.

En un procedimiento de control de transferencia de fluido preferente de acuerdo con la presente invención, las etapas h) a l) se realizan solamente en recipientes en los que no se ha detectado un error de transferencia de fluido en la etapa d).

En otro procedimiento de control de transferencia de fluido preferente de acuerdo con la presente invención, las etapas h) a l) se realizan solamente en recipientes en los que se ha declarado como correcta una transferencia de fluido en la etapa g).

Dependiendo de la aplicación del procedimiento de acuerdo con la presente invención, puede ser preferente realizar la segunda transferencia de fluido solamente si se pasan uno o ambos controles de transferencia de la primera transferencia de fluido. Por otro lado, si resulta más razonable ejecutar todo el flujo de trabajo incluso con recipientes fallidos que detener el flujo de trabajo para una determinada cantidad de recipientes solamente, los recipientes al menos se marcan con los errores respectivos.

Para el primer control de transferencia de la segunda transferencia de fluido, se calcula un valor de parámetro de extinción para compararlo con el criterio de umbral de extinción predefinido. El parámetro de extinción se basa en la intensidad extinguida medida en la etapa h) y hay principalmente dos modos de realización principales de dicho parámetro de extinción, concretamente dicho parámetro es la intensidad extinguida medida como tal o dicho parámetro es una proporción compilada usando la intensidad del colorante de control y la intensidad extinguida.

En un procedimiento de control de transferencia de fluido preferente de acuerdo con la presente invención, dicho valor de parámetro de extinción para cada recipiente es la intensidad extinguida de los colorantes de control medida en la etapa h).

En un procedimiento de control de transferencia de fluido más preferente de acuerdo con la presente invención, se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado en la etapa i) si la intensidad extinguida de los colorantes de control medida en la etapa h) está por encima de un valor umbral de extinción predefinido.

5 En otro procedimiento de control de transferencia de fluido preferente de acuerdo con la presente invención, dicho valor de parámetro de extinción calculado de la etapa i) es una proporción de la intensidad de los colorantes de control medida en la etapa c) y la intensidad extinguida de los colorantes de control medida en la etapa h).

10 En otro procedimiento de control de transferencia de fluido más preferente de acuerdo con la presente invención, se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado en la etapa i) si dicha proporción está por debajo o por encima de una proporción de umbral de extinción predefinido.

15 Un error de transferencia de la segunda solución es igual a una pequeña cantidad de moléculas de extinción en el recipiente y, en consecuencia, la intensidad extinguida medida será mayor de lo esperado. Por lo tanto, en el caso de un error de pipeteo, la proporción de la intensidad de los colorantes de control medida en la etapa c) dividida por la intensidad extinguida de los colorantes de control medida en la etapa h) será menor que la proporción de umbral de extinción predefinido. Por otra parte, la proporción de la intensidad extinguida de los colorantes de control medida en la etapa h) dividida por la intensidad de los colorantes de control medida en la etapa c) debe ser mayor que la proporción de umbral de extinción predefinido para detectar un error de pipeteo.

20 Como se ha discutido con respecto al umbral y al intervalo de la primera transferencia de fluido, el criterio de umbral de extinción predefinido también se basa en mediciones realizadas usando soluciones de referencia y, por supuesto, se requieren dos soluciones de referencia para este modo de realización.

25 De nuevo, dicho criterio de umbral de extinción predefinido también se puede definir empíricamente usando intensidades de recipientes vacíos e intensidades de recipientes que no tienen moléculas de extinción.

30 En un procedimiento de control de transferencia de fluido preferente de acuerdo con la presente invención, dicho criterio de umbral de extinción predefinido se basa en mediciones realizadas usando dos soluciones de referencia, una primera solución de referencia que tiene el volumen y la concentración de colorante de control de la etapa b) y la segunda solución de referencia que tiene el volumen y la concentración de colorante de extinción a utilizar en la transferencia de fluido de dicha segunda solución.

35 También con respecto a dicho segundo intervalo, hay dos modos de realización diferentes para su configuración y la discusión anterior relativa al primer intervalo se aplica también en esta ocasión.

40 En otro procedimiento de control de transferencia de fluido preferente de acuerdo con la presente invención, dicho segundo intervalo predefinido de la etapa k) está rodeando simétricamente a dicho valor de parámetro de extinción medio de la etapa j) y la amplitud de dicho segundo intervalo está predefinida basándose en unas varianzas de transferencia aceptables.

45 En aún otro procedimiento de control de transferencia de fluido preferente de acuerdo con la presente invención, dicho segundo intervalo predefinido de la etapa k) está rodeando asimétricamente a dicho valor de parámetro de extinción medio de la etapa j) y dicho segundo intervalo asimétrico está predefinido basándose en diferentes varianzas de transferencia aceptables hacia volúmenes de transferencia más bajos o más altos.

50 Con respecto a la sucesión de las diferentes etapas del procedimiento de acuerdo con la presente invención, existen dos alternativas diferentes para añadir la segunda solución.

En un primer procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con la presente invención, dicho volumen predefinido de una segunda solución que comprende una molécula de extinción se añade a los recipientes después de la etapa g) y antes de la etapa h).

55 En un segundo procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con la presente invención, dicho volumen predefinido de una segunda solución que comprende una molécula de extinción se añade a los recipientes antes de la etapa c).

60 Por lo tanto, para la primera alternativa, concretamente la adición de la segunda solución después de que se finalizan los controles de la primera transferencia de fluido, la medición de la intensidad del colorante de control se realiza antes de la presencia de la molécula de extinción.

65 Para la segunda alternativa, ambas soluciones se mezclan antes de realizar ambos controles de transferencia de fluido y, en consecuencia, el colorante de control y la molécula de extinción están presentes en los recipientes para ambas mediciones de control. Esta configuración del procedimiento de acuerdo con la presente invención es posible si la extinción del colorante de control se puede activar y desactivar en dichos recipientes.

En el procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con la presente invención, dicha intensidad de los colorantes de control en la etapa c) y dicha intensidad extinguida de los colorantes de control en la etapa h) se miden sucesivamente en dichos recipientes basándose en el ajuste de un parámetro de solución para cambiar entre un estado extinguido y un estado no extinguido de los colorantes de control.

Dado que una molécula de extinción es capaz de extinguir la intensidad de los colorantes de control, la molécula de extinción debe estar muy próxima al colorante de control y, en consecuencia, la molécula de extinción debe tener afinidad para unirse al colorante de control. Por lo tanto, para evitar la unión de la molécula de extinción al colorante de control, debe ser posible superar dicha afinidad en la solución de los recipientes. Dependiendo del tipo de interacción entre la molécula de extinción y el colorante de control, el experto en la técnica conocerá procedimientos para evitar dicha interacción.

En otro procedimiento de control de transferencia de fluido más preferente de acuerdo con la presente invención, dicho parámetro de solución es la temperatura de la solución.

En aún otro procedimiento de control de transferencia de fluido más preferente de acuerdo con la presente invención, dicho parámetro de solución es la molaridad de la solución o el pH de la solución.

Además de la afinidad de la molécula de extinción y del colorante de control mencionados anteriormente, es importante que la emisión del colorante de control y la absorbancia de la molécula de extinción se ajusten espectralmente entre sí. Si la superposición entre los espectros de emisión y los espectros de absorbancia no es lo suficientemente completa, la extinción será insuficiente.

En el procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con la presente invención, dicha molécula de extinción y dicho colorante de control se ajustan espectralmente de manera que dicha molécula de extinción extinga eficazmente la intensidad del colorante de control.

Por otra parte, es posible utilizar una molécula de extinción que tiene espectros de absorbancia que extinguen solamente una parte de los espectros de emisión del colorante de control y, en consecuencia, la medición de la intensidad del colorante de control, así como de la intensidad extinguida, se realiza únicamente en los espectros de frecuencia correspondientes a los espectros de absorbancia de la molécula de extinción.

En el procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con la presente invención, dicho colorante de control es un colorante fluorescente.

Sin limitar el alcance de la presente invención, el procedimiento de la presente invención es especialmente adecuado para los procedimientos de transferencia de fluido para preparar amplificaciones por PCR en tiempo real. Para dicha PCR en tiempo real se deben mezclar varios componentes, concretamente la muestra a amplificar, una mezcla maestra que comprende una polimerasa y nucleótidos, así como la mezcla de detección que comprende cebadores y sondas. Como ejemplo de un protocolo de transferencia de fluido adecuado de acuerdo con la presente invención, la mezcla maestra que comprende el colorante de control se mezcla con la mezcla de detección y dicha mezcla se transfiere a los recipientes en los que se realiza el primer control de transferencia de fluido. Después de ello, la muestra que comprende la molécula de extinción se añade a dichos recipientes en los que se realiza el segundo control de transferencia de fluido. De forma alternativa, evidentemente es posible utilizar muestras que comprenden el colorante de control y una mezcla maestra que comprende la molécula de extinción. Además, es posible también controlar el mezclado de la mezcla maestra y de la mezcla de detección usando un segundo colorante de control añadido a la mezcla de detección.

En un ejemplo, dicha solución se transfiere de acuerdo con las etapas a) a g) para una amplificación posterior por PCR en tiempo real que contiene un colorante de detección.

En otro procedimiento de control de transferencia de fluido preferente de acuerdo con la presente invención, dichas soluciones se transfieren de acuerdo con las etapas a) a l) para una amplificación posterior por PCR en tiempo real que contiene un colorante de detección.

Si el procedimiento de acuerdo con la presente invención se aplica para un control de transferencia de fluido durante la preparación de una PCR en tiempo real, es importante tener en cuenta que los espectros de emisión del colorante de detección requerido para la supervisión en línea de la amplificación por PCR no resulten afectados por el colorante de control.

En un procedimiento de control de transferencia de fluido más preferente de acuerdo con la presente invención, dicho colorante de control está separado espectralmente de dicho colorante de detección.

En aún otro procedimiento de control de transferencia de fluido más preferente de acuerdo con la presente invención, dicho colorante de control y dicho colorante de detección son colorantes fluorescentes.

Sin limitar el alcance de la presente invención, un modo de realización del procedimiento de acuerdo con la presente invención se basa en oligonucleótidos como marcadores de afinidad tanto en el colorante de control como en la molécula de extinción.

En el procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con la presente invención, dicho colorante de control está unido a un oligonucleótido.

En el procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con la presente invención, dicha molécula de extinción está unida a un segundo oligonucleótido.

Si los oligonucleótidos unidos al colorante de control y a la molécula de extinción deben tener afinidad entre sí, sus secuencias deben ser al menos parcialmente complementarias.

En el procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con la presente invención, dicho oligonucleótido y dicho segundo oligonucleótido tienen secuencias complementarias.

El uso de oligonucleótidos como marcadores de afinidad tiene la ventaja adicional de que la extinción del colorante de control se puede desactivar y activar fácilmente aumentando o disminuyendo la temperatura de la solución por encima o por debajo de la temperatura de fusión de la hibridación del oligonucleótido y del segundo oligonucleótido, respectivamente.

Otro aspecto de la presente invención es un procedimiento de control de transferencia de fluido en un flujo de trabajo de amplificación por PCR en tiempo real, comprendiendo el procedimiento:

- i) proporcionar una solución para su transferencia con un colorante de control,
- ii) transferir volúmenes predefinidos de dicha solución que comprende una concentración de dicho colorante de control a una pluralidad de recipientes,
- iii) medir la intensidad de los colorantes de control en cada recipiente,
- iv) comparar la intensidad medida en la etapa iii) para cada recipiente con un valor umbral predefinido, en el que se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado si la intensidad medida en la etapa iii) está por debajo de dicho valor umbral, y
- v) realizar una amplificación por PCR en tiempo real en dicha pluralidad de recipientes, en el que los resultados de las amplificaciones por PCR en tiempo real llevadas a cabo en dichos recipientes con un error de transferencia de fluido detectado en la etapa iv) se marcan en consecuencia.

En otro modo de realización del procedimiento de control de transferencia de fluido en un flujo de trabajo de amplificación por PCR en tiempo real de acuerdo con la presente invención, la etapa v) se sustituye por v') realizar una amplificación por PCR en tiempo real en aquellos recipientes sin un error de transferencia de fluido detectado en la etapa iv).

Un procedimiento de control de transferencia de fluido preferente en un flujo de trabajo de amplificación por PCR en tiempo real de acuerdo con la presente invención es un procedimiento en el que se añaden a los recipientes volúmenes predefinidos de una segunda solución que comprende una concentración de una molécula de extinción antes de la etapa v) y en el que dicha molécula de extinción extingue la intensidad de dicho colorante de control utilizado en la etapa i), en el que dicho procedimiento comprende las etapas adicionales realizadas antes de la etapa v) de

- A) medir la intensidad extinguida de los colorantes de control en cada recipiente,
- B) calcular un valor de parámetro de extinción basado en la intensidad extinguida medida en la etapa A) para cada recipiente, en el que se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado si no se cumple un criterio de umbral de extinción predefinido de dicho valor de parámetro de extinción,
- C) compilar un valor de parámetro de extinción medio de todos los recipientes que tienen un valor de parámetro de extinción calculado en la etapa B) que cumple dicho criterio de umbral de extinción predefinido,
- D) verificar, para todos los recipientes que tienen un valor de parámetro de extinción calculado en la etapa B), que cumplen dicho criterio de umbral de extinción predefinido, si dicho valor de parámetro de extinción está dentro de un segundo intervalo predefinido que rodea a dicho valor de parámetro de extinción medio compilado en la etapa C), en el que se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado si dicho valor de parámetro de extinción medido en la etapa B) no está dentro de dicho segundo intervalo predefinido, y
- E) declarar como correcta una segunda transferencia de fluido para todos los recipientes que tienen un valor de parámetro de extinción medido en la etapa B) que está dentro de dicho segundo intervalo predefinido de la etapa D).

Descripción de las figuras

Figura 1 Captura de pantalla del programa informático que ejecuta el procedimiento de acuerdo con la presente invención, que ilustra el resultado de control de transferencia de una pluralidad de recipientes.

Figura 2 Captura de pantalla del programa informático que ejecuta el modo de realización de PCR del procedimiento

de acuerdo con la presente invención, que ilustra la información de salida de las curvas de amplificación por PCR de una pluralidad de recipientes.

Ejemplo 1

Preparación de mezcla maestra y mezcla de ADN diana que contiene componentes de control de pipeteo

A) Se preparó una doble mezcla maestra para PCR en tiempo real del gen GAPDH a partir de ADNc humano, que contenía los siguientes componentes:

- cebadores de GAPDH humana 1 μ M de acuerdo con las SEQ ID NO: 1 y 2
- una sonda UPL de GAPDH humana 800 nM (Universal Probe Library, sonda n.º 60, Roche Applied Science, Ref. 04 688 589 001).
- se utilizaron componentes de PCR de IRealTime ready DNA Master Probes (Roche Applied Science). La mezcla maestra contiene oligonucleótido 4 μ M de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 marcada en el extremo 5' con un colorante fluorescente de longitud de onda larga (JA286, Roche Applied Science; máximo de excitación a 686 nm, máximo de emisión a 703 nm).

B) Se preparó una doble mezcla de ADN diana para amplificación en tiempo real, que contenía los siguientes componentes:

- 1 ng de ADNc humano (qPCR Human Reference cDNA, Clontech, Ref. 639654)
- oligonucleótido 4 μ M de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 marcado en el extremo 3' con un extintor no fluorescente (Dabsyl, Roche Applied Science, documento WO 2007/059816).

Los dos oligonucleótidos de acuerdo con las SEQ ID NO: 3 y 4 son complementarios.

Ejemplo 2

Preparación de una placa multipocillo de PCR en tiempo real que contiene diferentes cantidades de mezcla maestra y mezcla de ADN diana

Se utilizaron ocho combinaciones diferentes de mezcla maestra y mezcla de ADN diana para rellenar una placa de PCR en tiempo real de 1536 pocillos (Roche Applied Science) usando un robot de manipulación de líquidos Nanodrop Express (Innovadyne, Refs. 12043 (Fluidics Module) y 11245 (Stage Module)).

Combinación	2 x mezcla maestra (μ l)	2 x mezcla de ADN diana (μ l)
1	1	1
2	0,5	0,5
3	0,5	1
4	0	1
5	1	0,5
6	1	0
7	0,5	0
8	0	0

Cada combinación se utilizó para rellenar 96 posiciones de la placa de 1536 pocillos que representaban repeticiones técnicas.

Ejemplo 3

PCR en tiempo real incluyendo una etapa de medición de control de pipeteo

Se realizaron mediciones de control de amplificación en tiempo real y de pipeteo en un instrumento LightCycler 1536 con programa informático de análisis (Roche Applied Science). El programa informático estaba escrito en lenguaje de programación Microsoft.Net C#.

La medición de control de pipeteo se realizó antes de que se realizara la amplificación de acuerdo con el siguiente protocolo.

A) Medición del control de pipeteo:

Se realizaron dos adquisiciones individuales utilizando la combinación de filtros 618 (excitación) / 660 (emisión).

	Temp. ($^{\circ}$ C)	Tiempo de retención (s)	Tasa de aumento ($^{\circ}$ C/s)	Adquisición	Ciclos	Modo de detección	Factor de cuant.
1.adquisición	55	30	4,8	individual	1	dinámico	1,2

2.adquisición	37	30	2,5	individual	1	dinámico	1,2
---------------	----	----	-----	------------	---	----------	-----

B) PCR en tiempo real:

La amplificación en tiempo real se realizó utilizando la combinación de filtros 465 (excitación) / 510 (emisión).

5

	Temp. (°C)	Tiempo de retención (s)	Tasa de aumento (°C/s)	Adquisición	Ciclos	Modo de detección	Factor de cuant.
desnaturalización	95	60	4,8	ninguna	n.d.	n.d.	n.d.
amplificación	95	1	4,8	ninguna	45	n.d.	n.d.
	60	60	2,5	individual		dinámico	2,0
enfriamiento	40	30	2,5	ninguna	n.d.	n.d.	n.d.

Ejemplo 4

Cálculo del estado de transferencia de fluido para pocillos individuales de reacción de PCR en tiempo real

10

La intensidad de fluorescencia de cada pocillo a 55 °C se comparó con un valor umbral de fluorescencia mínimo predefinido guardado en el archivo de configuración del programa informático. El valor umbral predefinido se determinó empíricamente analizando la autofluorescencia de pocillos vacíos de placas de PCR en tiempo real de 1536 pocillos. El valor umbral se estableció significativamente por encima del valor medido más alto de un pocillo vacío. El valor umbral se estableció en 5 unidades de fluorescencia según lo definido por el programa informático estándar.

15

A todas las posiciones de la placa con un valor de fluorescencia por debajo de ese umbral se les asignó el estado de error de transferencia de fluido "M-Fail" (transferencia de fluido de la mezcla maestra fallida). El resultado se muestra en la figura 1 para muestras de las combinaciones 4 y 8 (véase la tabla del ejemplo 2).

20

Para todas las posiciones de la placa por encima de ese umbral de fluorescencia, se calculó la proporción de fluorescencia a 55 °C dividida por la fluorescencia a 37 °C. La proporción calculada se comparó con un valor umbral de proporción mínimo predefinido guardado en el archivo de configuración del programa informático. El valor umbral de proporción predefinido se determinó empíricamente analizando las proporciones de pocillos vacíos y pocillos que no contenían un oligonucleótido de extinción (SEQ ID NO: 4) de placas de PCR en tiempo real de 1536 pocillos. El valor umbral de proporción se estableció significativamente por encima del valor de proporción medido más alto de pocillos que no contenían oligonucleótidos de extinción. El valor umbral de proporción se fijó en 1,5.

25

A todas las posiciones de la placa con una proporción por debajo de ese umbral de proporción mínimo se les asignó el estado de error de transferencia de fluido "S-Fail" (fallo de configuración, es decir, transferencia de fluido de ADN diana fallida). El resultado se muestra en la figura 1 para muestras de las combinaciones 6 y 7 (véase la tabla del ejemplo 2).

30

Para todas las posiciones de la placa por encima de ese umbral de proporción mínimo, se calcula un valor de proporción medio y se compara con un intervalo de proporciones predefinido guardado en el archivo de configuración del programa informático. El intervalo de proporciones predefinido se determinó empíricamente comparando el rendimiento de la PCR de las varianzas de transferencia de fluido y se estableció asimétricamente alrededor del valor de proporción medio. El intervalo de aceptación se fijó en un 100 % por encima del valor de proporción medio y en un 50 % por debajo del valor de proporción medio.

35

40

A todas las posiciones de la placa con una proporción fuera de ese intervalo se les asignó el estado de error de transferencia de fluido "S-Fail" (fallo de configuración, es decir, transferencia de fluido de ADN diana fallida).

A todas las posiciones de la placa con un valor de fluorescencia por encima del umbral de fluorescencia mínimo predefinido, por encima del umbral de proporción mínimo predefinido y dentro del intervalo de proporción predefinido se les asignó al estado de transferencia de fluido "Pass" (aprobado). El resultado se muestra en la figura 1 para muestras de las combinaciones 1, 2, 3 y 5.

45

Ejemplo 5

Visualización de los resultados del control de transferencia de fluido combinados con los resultados de PCR en tiempo real

50

El estado del control de transferencia de fluido se visualiza en la tabla de resultados de PCR en tiempo real (figura 1). La clasificación y el filtrado permiten al usuario seleccionar un determinado estado de control de transferencia de fluido y discriminar entre reacciones de PCR en tiempo real válidas y no válidas. Como se puede ver en la figura 1, las muestras que presentan el estado de control de transferencia de fluido "Pass" también presentan un aviso

positivo y un valor de C_p válido. Las muestras que presentan el estado de control de transferencia de fluido "Fail" (M-Fail o S-Fail) presentan un aviso negativo y ningún valor de C_p debido a la configuración prevista de las combinaciones de mezcla maestra y mezcla de ADN diana.

- 5 La tabla de resultados se combina con curvas de amplificación en tiempo real (figura 2). Como se puede observar en la figura 2, las muestras que presentan el estado de control de transferencia de fluido "Pass" también presentan curvas de amplificación positivas. Las muestras que presentan el estado de control de transferencia de fluido "Fail" (M-Fail o S-Fail) presentan curvas de amplificación negativas debido a la configuración prevista de las combinaciones de mezcla maestra y mezcla de ADN diana.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG	
	<120> Control de transferencia de fluido	
	<130> 25910 FT	
10	<150> EP09005255 <151> 09-04-2009	
	<160> 4	
15	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 19	
20	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador directo de GAPDH	
25	<400> 1	
	agccacatcg ctcagacac	19
30	<210> 2 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador inverso de GAPDH	
	<400> 2	
40	gccaataacg accaaatcc	19
	<210> 3 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de control	
50	<400> 3	
	cccaaatacga	10
55	<210> 4 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido de control	
	<400> 4	
	tcgatttggg	10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de control de transferencia de fluido, comprendiendo el procedimiento
 - 5 a) proporcionar una solución para su transferencia con un colorante de control, siendo dicho colorante de control un colorante fluorescente unido a un oligonucleótido,
 - b) transferir volúmenes predefinidos de dicha solución que comprende una concentración de dicho colorante de control a una pluralidad de recipientes,
 - c) medir la intensidad de fluorescencia del colorante de control en cada recipiente,
 - 10 d) comparar la intensidad medida en la etapa c) para cada recipiente con un valor umbral predefinido, mientras que se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado si la intensidad medida en la etapa c) está por debajo de dicho valor umbral,
 - e) compilar un valor de intensidad media de todos los recipientes que tienen una intensidad medida en la etapa c) que está por encima de dicho valor umbral predefinido,
 - 15 f) verificar, para todos los recipientes que tienen una intensidad medida en la etapa c) que está por encima de dicho valor umbral predefinido, si dicha intensidad está dentro de un intervalo predefinido que rodea a dicho valor de intensidad media compilado en la etapa e), en el que un error de transferencia de fluido se detecta para un recipiente determinado si la intensidad medida en la etapa c) no está dentro de dicho intervalo, y
 - g) declarar como correcta una transferencia de fluido para todos los recipientes que tienen una intensidad medida en la etapa c) que está dentro de dicho intervalo predefinido de la etapa f) y en el que se añaden a los recipientes volúmenes predefinidos de una segunda solución que comprende una concentración de una molécula de extinción, estando dicha molécula de extinción unida a un segundo oligonucleótido, en el que el oligonucleótido y el segundo oligonucleótido tienen secuencias complementarias, y dicha molécula de extinción extingue la intensidad de dicho colorante de control utilizado en la etapa a),
 - 20 comprendiendo dicho procedimiento las etapas adicionales de
 - h) medir la intensidad de fluorescencia extinguida de los colorantes de control en cada recipiente,
 - i) calcular un valor de parámetro de extinción basado en la intensidad extinguida medida en la etapa h) para cada recipiente, en el que se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado si no se cumple un criterio de umbral de extinción predefinido de dicho valor de parámetro de extinción,
 - 30 j) compilar un valor de parámetro de extinción medio de todos los recipientes que tienen un valor de parámetro de extinción calculado en la etapa i) que cumple dicho criterio de umbral de extinción predefinido,
 - k) verificar, para todos los recipientes que tienen un valor de parámetro de extinción calculado en la etapa i), que cumplen dicho criterio de umbral de extinción predefinido, si dicho valor de parámetro de extinción está dentro de un segundo intervalo predefinido que rodea a dicho valor de parámetro de extinción medio compilado en la etapa j), mientras que se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado si dicho valor de parámetro de extinción medido en la etapa i) no está dentro de dicho segundo intervalo predefinido, y
 - 35 l) declarar como correcta una segunda transferencia de fluido para todos los recipientes que tienen un valor de parámetro de extinción medido en la etapa i) que está dentro de dicho segundo intervalo predefinido de la etapa k), en el que dicha pluralidad de recipientes está dispuesta como una placa multipocillo.
- 40 2. Un procedimiento de control de transferencia de fluido, comprendiendo el procedimiento
 - a) proporcionar una solución para su transferencia con un colorante de control, siendo dicho colorante de control un colorante fluorescente unido a un oligonucleótido,
 - b) transferir volúmenes predefinidos de dicha solución que comprende una concentración de dicho colorante de control a una pluralidad de recipientes, y en el que se añaden posteriormente a los recipientes volúmenes predefinidos de una segunda solución que comprende una concentración de una molécula de extinción, estando dicha molécula de extinción unida a un segundo oligonucleótido, en el que el oligonucleótido y el segundo oligonucleótido tienen secuencias complementarias y en el que un parámetro de la solución mezclada resultante se ajusta de tal manera que dicho colorante de control usado en la etapa a) está en un estado no extinguido,
 - 50 c) medir la intensidad de fluorescencia del colorante de control en cada recipiente,
 - d) comparar la intensidad medida en la etapa c) para cada recipiente con un valor umbral predefinido, mientras que se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado si la intensidad medida en la etapa c) está por debajo de dicho valor umbral,
 - e) compilar un valor de intensidad media de todos los recipientes que tienen una intensidad medida en la etapa c) que está por encima de dicho valor umbral predefinido,
 - 55 f) verificar, para todos los recipientes que tienen una intensidad medida en la etapa c) que está por encima de dicho valor umbral predefinido, si dicha intensidad está dentro de un intervalo predefinido que rodea a dicho valor de intensidad media compilado en la etapa e), en el que un error de transferencia de fluido se detecta para un recipiente determinado si la intensidad medida en la etapa c) no está dentro de dicho intervalo, y
 - 60 g) declarar como correcta una transferencia de fluido para todos los recipientes que tienen una intensidad medida en la etapa c) que está dentro de dicho intervalo predefinido de la etapa f) y en el que un parámetro de la solución mezclada resultante se ajusta de tal manera que dicha molécula de extinción extingue la intensidad de dicho colorante de control usado en la etapa a),
 - comprendiendo dicho procedimiento las etapas adicionales de
 - h) medir la intensidad extinguida del colorante de control en cada recipiente,
 - 65 i) calcular un valor de parámetro de extinción basado en la intensidad extinguida medida en la etapa h) para

cada recipiente, en el que se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado si no se cumple un criterio de umbral de extinción predefinido de dicho valor de parámetro de extinción,

j) compilar un valor de parámetro de extinción medio de todos los recipientes que tienen un valor de parámetro de extinción calculado en la etapa i) que cumple dicho criterio de umbral de extinción predefinido,

5 k) verificar, para todos los recipientes que tienen un valor de parámetro de extinción calculado en la etapa i), que cumplen dicho criterio de umbral de extinción predefinido, si dicho valor de parámetro de extinción está dentro de un segundo intervalo predefinido que rodea a dicho valor de parámetro de extinción medio compilado en la etapa j), mientras que se detecta un error de transferencia de fluido para un recipiente determinado si dicho valor de parámetro de extinción medido en la etapa i) no está dentro de dicho segundo intervalo predefinido, y

10 l) declarar como correcta una segunda transferencia de fluido para todos los recipientes que tienen un valor de parámetro de extinción medido en la etapa i) que está dentro de dicho segundo intervalo predefinido de la etapa k), y en el que dicha pluralidad de recipientes está dispuesta como una placa multipocillo.

15 3. El procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho valor de parámetro de extinción calculado de la etapa i) es una proporción de la intensidad del colorante de control medida en la etapa c) y la intensidad extinguida del colorante de control medida en la etapa h).

20 4. El procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho criterio de umbral de extinción predefinido se basa en mediciones realizadas usando dos soluciones de referencia, una primera solución de referencia que tiene el volumen y la concentración de colorante de control de la etapa b) y la segunda solución de referencia que tiene el volumen y la concentración de colorante de extinción de la reivindicación 1 o 2.

25 5. El procedimiento de control de transferencia de fluido de acuerdo con la reivindicación 1 para preparar una amplificación por PCR en tiempo real posterior que contiene un colorante de detección.

15

Fig. 2

