

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 849**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6876 (2008.01)

C12Q 1/6853 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013 PCT/US2013/031032**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13148212**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13769167 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2831260**

54 Título: **Ácidos nucleicos para la amplificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

29.03.2012 US 201261617562 P

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

26.03.2019

73 Titular/es:

**BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417 , US**

72 Inventor/es:

**MADEPOGU, PAUL;
KOFFENBERGER, DANIELLE y
THORNTON, KEITH**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 705 849 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

Ácidos nucleicos para la amplificación de ácidos nucleicos

5 **Campo**

Las realizaciones del presente documento se refieren de forma general a los ácidos nucleicos de control interno que son útiles en la monitorización de la amplificación y/o de la extracción de ácidos nucleicos a partir de muestras en pruebas con ácidos nucleicos (NAT).

10

Antecedentes

Los ensayos de pruebas con ácidos nucleicos (NAT) proporcionan unas potentes herramientas para la rápida detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos objetivo. Como tales, los ensayos de NAT se usan habitualmente para la detección de la presencia de organismos en una muestra, por ejemplo, en muestras de un paciente en un entorno clínico, en muestras de alimentos, en muestras medioambientales y similares. Los ensayos de NAT también se usan habitualmente en entornos de diagnóstico, por ejemplo, para la detección de polimorfismos genéticos, de repeticiones, inserciones o deleciones genéticas, o similares, o de una expresión génica alterada, como indicativo de una afección tal como una enfermedad o un trastorno.

20

En muchas situaciones es deseable obtener información cuantitativa relativa a la cantidad de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo en una muestra dada. Por ejemplo, pueden usarse ensayos cuantitativos de ácidos nucleicos, por ejemplo, ensayos de amplificación, para detectar la presencia y/o la cantidad de una secuencia objetivo específica de un patógeno presente en una muestra biológica, para determinar si la muestra está infectada por el patógeno, y/o para monitorizar la progresión o la gravedad de la infección. Los ensayos cuantitativos de ácidos nucleicos también pueden ser útiles para monitorizar el estado de una célula o de un tejido mediante la monitorización de la cantidad de una secuencia de ácidos nucleicos marcadora presente en la célula o en el tejido, o para cuantificar la cantidad de un elemento de ADN específico, por ejemplo, una repetición o un elemento transponible, presente en una muestra. El documento WO2004/104229, el documento WO2005/047462 y Rosenstraus et al (J. Clin. Microbiol., vol. 36, nº 1, págs. 191-197, 1998), divulgan ácidos nucleicos de control interno y los correspondientes cebadores y sondas para la cuantificación de ácidos nucleicos en sistemas de amplificación.

25

30

Las reacciones cuantitativas de amplificación de ácidos nucleicos pueden usarse para cuantificar la cantidad relativa y/o absoluta de una secuencia de ácidos nucleicos objetivo presente en una muestra. Dichos métodos se han convertido en muy avanzados y sensibles, de forma que pueden detectarse únicamente unas pocas copias del ácido nucleico objetivo en una muestra. Debido a la naturaleza altamente sensible de las reacciones cuantitativas de amplificación de ácidos nucleicos, con objeto de evitar falsos positivos, falsos negativos, una sobreestimación de la cantidad del objetivo o del producto, debe tenerse un cuidado extremo cuando se eligen los controles internos apropiados. Además de las consideraciones relativas a la especificidad de los controles internos (por ejemplo, controles internos de moldes, de cebadores y/o de sondas), existen unas consideraciones relativas a las características intrínsecas de las secuencias de ácidos nucleicos de control, incluyendo, por ejemplo, horquillas, unos análisis de A/T con unas temperaturas de apareamiento muy bajas, unos análisis de G/C con unas temperaturas de apareamiento muy altas que no hacen posible la amplificación de los ácidos nucleicos ni/o la hibridación de la sonda. Adicionalmente, puede ser deseable usar la misma secuencia de molde de control interno, conjunto de cebadores y sonda, en una diversidad de múltiples reacciones, para una diversidad de secuencias objetivo. Sin embargo, muchas secuencias de ácidos nucleicos son susceptibles de una amplificación y/o de una hibridación de la sonda en un estrecho conjunto de condiciones de reacción, y no son lo suficientemente robustas como para ser usadas como controles internos en una gran diversidad de condiciones de reacción.

35

40

45

50

Por lo tanto, el experto en la materia apreciará la complicada naturaleza de la identificación de una combinación robusta de una secuencia de control interno, cebadores y sondas para la realización de un control interno para monitorizar la amplificación de ácidos nucleicos. Además, el experto en la materia apreciará que a menudo se lleva a cabo una amplia validación empírica para verificar que una de secuencia del polinucleótido de molde, un par de cebadores, una sonda o una combinación de los mismos, funcionará como un control interno viable/adecuado para la amplificación cuantitativa de ácidos nucleicos.

55

Sumario

Las realizaciones divulgadas en el presente documento se refieren a composiciones mejoradas útiles como controles internos para los ensayos de pruebas con ácidos nucleicos (NAT). Consecuentemente, en el presente documento se proporcionan reactivos de control interno, kits que contienen los reactivos de control interno, así como los métodos para la elaboración y el uso de los mismos en los ensayos de pruebas con ácidos nucleicos. Como se describe con más detalle a continuación, los reactivos de control interno divulgados en el presente documento muestran unas propiedades extremadamente ventajosas, que incluyen una tremenda sensibilidad y reproducibilidad. Adicionalmente, los reactivos de control interno divulgados en el presente documento son muy versátiles y útiles como controles en ensayos de NAT para la detección y/o la cuantificación de un amplio conjunto de diferentes

60

65

secuencias objetivo.

Consecuentemente, en algunas realizaciones se proporcionan polinucleótidos que pueden usarse como los moldes en las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo, pero no se limitan a, reacciones de amplificación de ácidos nucleicos cuantitativas y/o cualitativas. En algunas realizaciones, los polinucleótidos pueden usarse como moldes de control interno para ensayos cuantitativos de pruebas con ácidos nucleicos, tales como una PCR cuantitativa. Algunos ejemplos de polinucleótidos de molde de control interno comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, la secuencia de las SEQ ID NOs: 1, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15, o las variantes de las mismas, incluyendo las subsecuencias de las mismas.

En algunas realizaciones, se proporcionan oligonucleótidos que pueden usarse como los cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, para amplificar las secuencias de control de molde usadas como patrones y/o como controles internos. Los oligonucleótidos pueden incluir cebadores individuales y/o pares de cebadores para la amplificación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, los cebadores pueden usarse para amplificar una secuencia de molde de control (por ejemplo, las SEQ ID NOs: 1, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y las variantes de las mismas, incluyendo las subsecuencias de las mismas). Algunos ejemplos de cebadores comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, la secuencia de las SEQ ID NOs: 3, 4, 5 o 6, o las variantes de las mismas.

En algunas realizaciones, se proporcionan oligonucleótidos que pueden usarse como las sondas. En algunas realizaciones, las sondas comprenden oligonucleótidos pueden hibridar con amplicones de las secuencias de control divulgadas en el presente documento, por ejemplo, SEQ ID NOs: 1, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, y las variantes de las mismas). Algunos ejemplos de sondas comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, la secuencia de la SEQ ID NO: 2, o las variantes de las mismas.

En algunas realizaciones, se proporcionan kits. Los kits pueden incluir polinucleótidos y/u oligonucleótidos según se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir polinucleótidos y/u oligonucleótidos para una cuantitativa para el control interno de una amplificación de ácidos nucleicos. Los kits pueden incluir al menos uno de un polinucleótido de molde, un cebador que amplifica específicamente las secuencias de molde. En algunas realizaciones, el kit puede incluir un par de cebadores de amplificación que amplifica específicamente las secuencias de molde. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir opcionalmente una sonda que hibrida específicamente con el polinucleótido de molde. Los kits divulgados en el presente documento pueden incluir opcionalmente una polimerasa, un tampón de reacción, uno o más dNTP, o cualquier combinación de los mismos, así como otros reactivos usados en las reacciones de amplificación.

Algunas realizaciones proporcionan métodos para la realización de un ensayo de NAT. En algunas realizaciones, el método incluye proporcionar un molde de la secuencia del polinucleótido que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en, la SEQ ID NO: 1, y poner en contacto la secuencia de molde con al menos un cebador, por ejemplo, un cebador de la SEQ ID NO: 3, 4, 5 o 6, que hibrida específicamente con la secuencia de molde. En algunas realizaciones, el polinucleótido incluye una variante de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el método incluye la extensión del cebador, produciendo así un amplicón de la secuencia de molde. En algunas realizaciones, el método incluye la detección de la presencia y/o de la cantidad del amplicón. En algunas realizaciones, la etapa de detección comprende poner en contacto el amplicón con una sonda, en la que la sonda comprende una fracción detectable y en la que la sonda se une al amplicón. En algunas realizaciones, el método incluye la etapa de determinación de la cantidad de sonda que está unida específicamente a un amplicón. En algunas realizaciones, la etapa de determinación se lleva a cabo en tiempo real según se generan los amplicones. En algunas realizaciones, la sonda comprende una fracción detectable, y se mide la cantidad de señal procedente de la fracción detectable. En algunas realizaciones, se mide la acumulación de la sonda que está hibridada específicamente con, o unida a, los amplicones, en función del tiempo o del ciclo, y se genera una curva de amplificación. En algunas realizaciones se lleva a cabo una serie de reacciones en la que en cada reacción se proporciona una cantidad conocida diferente de la secuencia de molde. En algunas realizaciones, el método incluye la etapa de generación de una curva patrón a partir de una serie de curvas de amplificación. En algunas realizaciones, la curva patrón se usa para la determinación de la concentración inicial de una secuencia del polinucleótido en una reacción de amplificación. En algunas realizaciones, las reacciones de amplificación comprenden múltiples reacciones de amplificación.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** ilustra un mapa vectorial de un vector PUC 119 modificado que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 8.

Las **Figuras 2A y 2B** muestran la secuencia de un vector PUC 119 modificado (la Figura 2A muestra las posiciones 1-1800 de la secuencia, y la Figura 2B muestra las posiciones 1801-3350 de la secuencia) que contiene un inserto que incluye un ejemplo de secuencia de molde de control interno ("DrosScaff2"; la SEQ ID NO: 8), y las posiciones relativas de los cebadores que comprenden la SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 4, y una sonda que comprende la SEQ ID NO: 2. Como se indica por el símbolo del rombo, el residuo de "t" en la posición

1668 de esta secuencia difiere de los residuos de "C" que se encuentran en la correspondiente posición en la SEQ ID NO: 15 ("DrosScaff1").

5 La **Figura 3A** ilustra una curva patrón derivada a partir de las reacciones de amplificación en tiempo real de 5 copias del molde, de 50 copias del molde y de 500 copias del molde de control interno que comprende la SEQ ID NO: 8 mediante el uso del Par de Cebadores 5 de amplificación. Para la cantidad inicial de las 5 copias del molde, de las 50 copias del molde y de las 500 copias del molde, se realizaron cuatro réplicas, y se determinó el Cq. La curva patrón representa el Cq frente al log de la cantidad inicial de molde.

10 La **Figura 3B** muestra las curvas de amplificación (fluorescencia frente al ciclo) para la serie de reacciones de amplificación usadas para la generación de la curva patrón mostrada en la Figura 3A.

15 La **Figura 4A** muestra las curvas de amplificación (fluorescencia frente al ciclo) de una serie de reacciones de amplificación en la que la concentración inicial de molde era de 200, de 50, de 25 o de 5 copias del plásmido linealizado que comprende la SEQ ID NO: 8, y en la que se usaron los cebadores del Par de Cebadores 5 como los cebadores de amplificación. Se usó una sonda fluorescente que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 en las reacciones.

20 La **Figura 4B** muestra las curvas de amplificación (fluorescencia frente al ciclo) de una serie de reacciones de amplificación en tiempo real en la que la concentración inicial de molde era de 200, de 50, de 25 o de 5 copias del plásmido linealizado que comprende la SEQ ID NO: 8, y en la que se usaron los cebadores del Par de Cebadores 1 como los cebadores de amplificación. Se usó una sonda fluorescente que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 en las reacciones.

25 La **Figura 4C** muestra las curvas de amplificación (fluorescencia frente al ciclo) de una serie de reacciones de amplificación en tiempo real en la que la concentración inicial de molde era de 200, de 50, de 25 o de 5 copias del plásmido linealizado que comprende la SEQ ID NO: 8, y en la que se usaron los cebadores del Par de Cebadores 5 como los cebadores de amplificación. Se usó una sonda fluorescente que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 en las reacciones.

30 La **Figura 4D** muestra las curvas de amplificación (fluorescencia frente al ciclo) de una serie de reacciones de amplificación en tiempo real en la que la concentración inicial de molde era de 200, de 50, de 25 y de 5 copias del plásmido linealizado que comprende la SEQ ID NO: 8, y en la que se usaron los cebadores del Par de Cebadores 5 como los cebadores de amplificación. Se usó una sonda fluorescente que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 en las reacciones.

35 La **Figura 5** ilustra el rendimiento de la PCR (eficacia de la PCR, R^2 y pendiente) y la sensibilidad, detectando tan pocas como 5 copias/reacción del plásmido linealizado (plásmido "DrosScaff1") que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 15.

40 Descripción detallada

45 Debe apreciarse que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada son únicamente ejemplares y explicativas, y no pretenden limitar el ámbito de las actuales enseñanzas. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural salvo que específicamente se indique de otro modo. También, el uso de "comprende", de "contiene" y de "incluye", o de modificaciones de esas palabras de raíz, por ejemplo, pero no se limitan a, "que comprende", "contenido" y "que incluye", no pretende ser limitante. El uso de "o" significa "y/o" salvo que se indique de otro modo. El término "y/o" significa que los términos anteriores y posteriores pueden tomarse conjuntamente o por separado. Con fines ilustrativos, pero no como limitación, "X y/o Y" puede significar "X" o "Y" o "X e Y".

50 Siempre que se proporcione un intervalo de valores en el presente documento, se entiende que el intervalo incluye el valor de partida y el valor final, y cualquier valor o intervalo de valores entre los mismos salvo que específicamente se indique de otro modo. Por ejemplo, "desde 0,2 hasta 0,5" significa 0,2, 0,3, 0,4, 0,5; intervalos entre los mismos tales como 0,2-0,3, 0,3-0,4, 0,2-0,4; incrementos entre los mismos tales como 0,25, 0,35, 0,225, 0,335, 0,49; intervalos de incrementos entre los mismos tales como 0,26-0,39; y similares.

Los encabezamientos de sección usados en el presente documento tienen únicamente fines organizativos y no deben ser interpretados en modo alguno como limitantes del asunto en cuestión descrito.

60 En el caso de que uno o más materiales de la bibliografía y similares de definan o usen un término de tal forma que contradiga la definición del término de esta solicitud, predomina la solicitud. Aunque las presentes enseñanzas se describen junto con varias realizaciones, no se pretende que las presentes enseñanzas estén limitadas a dichas realizaciones. Por el contrario, las presentes enseñanzas engloban varias alternativas, modificaciones y equivalentes, como apreciarán los expertos en la materia.

65 Varias realizaciones de esta divulgación describen composiciones y kits y métodos de uso de los mismos, para su uso en los ensayos de pruebas con ácidos nucleicos (NAT). Consecuentemente, algunas realizaciones proporcionan

secuencias de ácidos nucleicos para su uso en ensayos de NAT, por ejemplo, en ensayos de amplificación. Una persona experta en la materia apreciará que, para cualquier secuencia de ácidos nucleicos, puede obtenerse fácilmente el complemento inverso, y que una divulgación de una secuencia de ácidos nucleicos también proporciona una divulgación del complemento inverso de esa secuencia. Una persona experta en la materia apreciará que las subsecuencias de las secuencias nucleicas divulgadas en el presente documento pueden obtenerse con facilidad.

Los ácidos nucleicos proporcionados en el presente documento pueden estar en diversas formas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se disuelven (bien solos o bien junto con otros diversos ácidos nucleicos) en una solución, por ejemplo, un tampón. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se proporcionan, bien solos o bien junto con otros ácidos nucleicos aislados, en forma de una sal. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se proporcionan en una forma liofilizada que puede ser reconstituida. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados divulgados en el presente documento pueden proporcionarse solos en una pella liofilizada, o en una pella liofilizada junto con otros ácidos nucleicos aislados. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se proporcionan fijados sobre una sustancia sólida, tal como una microesfera, una membrana, o similares. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se proporcionan en una célula hospedadora, por ejemplo, en una línea celular portadora de un plásmido, o en una línea celular portadora de una secuencia integrada de forma estable.

Secuencias de control

Algunas realizaciones divulgadas en el presente documento proporcionan secuencias de ácidos nucleicos de control para ensayos de NAT. En algunas realizaciones, la secuencia de control puede usarse como un control externo, o patrón, que es un procesamiento paralelo al de las muestras de prueba. En algunas realizaciones, la secuencia de control puede usarse como un control interno y se combina con la muestra de prueba antes del procesamiento.

El artesano experto apreciará que el término "ácido nucleico" engloba polidesoxirribonucleótidos (que contienen 2-desoxi-D-ribosa), polirribonucleótidos (que contienen D- ribosa), así como cualquier otro tipo de polinucleótido que sea un N- o C-glicósido de una base púrica o pirimidínica, y otros polímeros que contienen esqueletos no nucleotídicos, por ejemplo, de poliamida (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA)) y de polimorfolino (disponible en el mercado en Anti-Virals, Inc., Corvallis, Oreg., en forma de los polímeros NEUGENE™), y otros polímeros de ácidos nucleicos específicos con secuencias sintéticas, siempre que los polímeros contengan nucleobases en una configuración que permita el apareamiento de bases y el apilamiento de bases, tal y como se encuentran en el ADN y en el ARN.

Los términos nucleótido y polinucleótido incluyen, por ejemplo, 3'-desoxi-2',5'-ADN, fosforamidatos de oligodesoxirribonucleótido N3'→P5', ARN sustituido en 2'-O-alquilo, ADN bi- y monocatenario, así como ARN bi- y monocatenario, híbridos de ADN:ARN, e híbridos entre PNA y ADN o ARN. Los términos también incluyen tipos conocidos de modificaciones, por ejemplo, marcadores que son conocidos en la materia, metilación, "protectores", la sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales por un análogo, modificaciones internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.), con enlaces cargados negativamente (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), y con enlaces cargados positivamente (por ejemplo, aminoalquilfosforamidatos, aminoalquilfosfotriésteres), aquellos que contienen fracciones laterales, tales como, por ejemplo, proteínas (incluyendo nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señalización, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como las formas no modificadas del polinucleótido o del oligonucleótido.

Se apreciará que, según se usa en el presente documento, los términos "nucleósido" y "nucleótido" incluirán aquellas fracciones que contienen no solo las bases conocidas de purina y pirimidina, sino también otras bases heterocíclicas que han sido modificadas. Dichas modificaciones incluyen purinas o pirimidinas metiladas, purinas o pirimidinas aciladas, u otros heterociclos. Los nucleósidos o los nucleótidos modificados también incluirán modificaciones en la fracción de azúcar, por ejemplo, en las que uno más de los grupos hidroxilo son sustituidos por un halógeno, un grupo alifático, o están funcionalizados en forma de éteres, de aminas, o similares. Otras modificaciones de los nucleótidos o de los polinucleótidos implican la redistribución, el anexo o la sustitución, o grupos funcionales que alteran de otro modo la base de purina o de pirimidina formando fuentes de hidrógeno con una respectiva pirimidina o purina complementaria, por ejemplo, isoguanina, isocisteína, y similares. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos y/o las sondas incluyen al menos uno, dos, tres o cuatro nucleótidos modificados.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento incluyen una o más bases universales. Según se usa en el presente documento, el término "base universal" se refiere a un análogo de nucleótido que puede hibridar con más de un nucleótido seleccionado entre A, T, C y G. En algunas realizaciones, la base universal puede seleccionarse entre el grupo que consiste en desoxiinosina, 3-ntiropirrol, 4-nitroindol, 6-nitroindol, 5-nitroindol.

En algunas realizaciones, las secuencias de ácidos nucleicos de control divulgadas en el presente documento son secuencias de control objetivo ("SCO"), que son los moldes para las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos. Los expertos en la materia apreciarán que las subsecuencias de las SCO divulgadas en el presente documento pueden ser amplificadas mediante una PCR u otros métodos de amplificación, según se analiza con más detalle en el presente documento, al igual que la totalidad de las SCO divulgadas en el presente documento. En algunas realizaciones, se proporciona una SCO como un control para un ensayo múltiple, en el que se amplifica una cantidad conocida de la SCO y del al menos un ácido nucleico objetivo que va a ser cuantificado en la misma mezcla de reacción. En algunas realizaciones, se amplifica una cantidad conocida de la SCO en una primera mezcla de reacción, mientras que se amplifica un ácido nucleico objetivo que va a ser cuantificado en una segunda mezcla de reacción.

En algunas realizaciones, la SCO consiste en, consiste esencialmente en, o comprende, la secuencia de la SEQ ID NO: 1, o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la SCO se proporciona en un vector, por ejemplo, en un plásmido. Consecuentemente, algunas realizaciones proporcionan una secuencia del polinucleótido que consiste en, consiste esencialmente en, o comprende, la SEQ ID NO: 1 en un plásmido, por ejemplo, las secuencias que consisten en, que consisten esencialmente en, o que comprenden, la SEQ ID NO: 8. En las realizaciones en las que la SCO se proporciona en un plásmido, el plásmido puede estar linealizado, o alternativamente, el plásmido puede no estar linealizado (por ejemplo, en una forma superhelicoidal o circular desenrollada). En algunas realizaciones, la secuencia de molde comprende un polinucleótido que comprende al menos una de las secuencias de las SEQ ID NOs: 9, 10, 11, 12 o 13 o una variante de las mismas. Las "variantes" de las secuencias divulgadas en el presente documento se analizan a continuación.

En algunas realizaciones, la SCO comprende polinucleótidos aislados a partir del ADN genómico, o de un fragmento genómico, o de una modificación del mismo, de un organismo del género *Drosophila*, por ejemplo, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulons*, *Drosophila sechellia*, *Drosophila yakuba*, *Drosophila erecta*, *Drosophila ficusphila*, *Drosophila eugracilis*, *Drosophila biarmipes*, *Drosophila takahashii*, *Drosophila elegans*, *Drosophila rhopaloa*, *Drosophila kikkawai*, *Drosophila ananassae*, *Drosophila bipectinata*, *Drosophila pseudoobscura*, *Drosophila persimilis* o *Drosophila willistoni*. Preferiblemente, las secuencias SCO comprenden, consisten en, o consisten esencialmente en, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 14. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 14 se corresponde de forma general con la secuencia que se encuentra en el genoma de *Drosophila melanogaster* (GenBank: AC246436; nucleótidos 35779 hasta 35978), y la SEQ ID NO: 1 incluye una modificación de la SEQ ID NO: 14: el residuo de "C" en la posición 93 de la SEQ ID NO: 14 se cambió por una "T" en la misma posición de la SEQ ID NO: 1. Esta modificación, que también se encuentra en el plásmido de la SEQ ID NO: 8, está indicada por un símbolo de rombo en la **Figura 2**.

Oligonucleótidos

En algunas realizaciones, se proporcionan oligonucleótidos, por ejemplo, cebadores y/o sondas. Según se usa en el presente documento, los términos "cebador" y "sonda" incluyen, pero no se limitan a oligonucleótidos. Preferiblemente, los cebadores y/o las sondas oligonucleotídicos divulgados en el presente documento pueden tener entre 8 y 45 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, los cebadores y o las sondas pueden tener al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 o más nucleótidos de longitud. Los cebadores y/o las sondas pueden ser proporcionados en cualquier forma adecuada, incluyendo unidos sobre un soporte sólido, líquida y liofilizada, por ejemplo. Las secuencias del cebador y de la sonda divulgadas en el presente documento pueden ser modificadas para que contengan nucleótidos adicionales en el 5' o el 3' terminal, o en ambos. Sin embargo, el artesano experto apreciará que las bases adicionales en el 3' terminal de los cebadores de amplificación (no necesariamente de las sondas) generalmente son complementarias de la secuencia de molde. Las secuencias del cebador y de la sonda divulgadas en el presente documento también pueden ser modificadas para eliminar los nucleótidos en el 5' o en el 3' terminal. El artesano experto apreciará que, con objeto de que funcionen en la amplificación, los cebadores o las sondas tendrán una longitud mínima y una temperatura de apareamiento según se divulga en el presente documento.

Los cebadores y las sondas oligonucleotídicos pueden unirse a sus objetivos a una temperatura de apareamiento, que es una temperatura menor que la temperatura de fusión (T_m). Según se usa en el presente documento, " T_m " y "temperatura de fusión" son términos intercambiables que se refieren a la temperatura a la cual el 50 % de una población de moléculas de polinucleótidos bicatenarios queda disociada en hebras individuales. Las fórmulas para el cálculo de la T_m de los polinucleótidos son bien conocidas en la materia. Por ejemplo, la T_m puede calcularse mediante la siguiente ecuación: $T_m = 69,3 + 0,41 \times (G + C) \% - 6 - 50/L$, en la que L es la longitud de la sonda en nucleótidos. La T_m de un polinucleótido híbrido puede estimarse también mediante el uso de una fórmula adoptada a partir de los ensayos de hibridación en una sal 1 M, y habitualmente se usan para el cálculo de la T_m de los cebadores de la PCR: $[(\text{número de A} + \text{T}) \times 2 \text{ }^\circ\text{C} + (\text{número de G} + \text{C}) \times 4 \text{ }^\circ\text{C}]$. Véase, por ejemplo, C. R. Newton et al. PCR, 2ª Ed., Springer-Verlag (Nueva York: 1997), pág. 24. En la materia existen otros cálculos más sofisticados que tienen en cuenta características tanto estructurales como de la secuencia para el cálculo de la T_m . La temperatura de fusión de un oligonucleótido puede depender de la complementariedad entre el cebador o la sonda oligonucleotídica y la secuencia de unión, y de las condiciones salinas. En algunas realizaciones, un cebador oligonucleotídico o una sonda proporcionados en el presente documento tiene una T_m de menos de

aproximadamente 90 °C en KCl 50 mM, tampón de Tris-HCl 10 mM, por ejemplo, de aproximadamente 89 °C, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80 79, 78, 77, 76, 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 61, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39 °C o menos, incluyendo los intervalos entre dos cualesquiera de los valores indicados. Como se analiza con más detalle a continuación, en algunas realizaciones, los cebadores divulgados en el presente documento se proporcionan en forma de un par de cebadores de amplificación, por ejemplo, que comprenden un cebador directo y un cebador inverso. Preferiblemente, los cebadores directo e inverso tienen unas T_m que no difieren en más de 10 °C, por ejemplo, que difieren en menos de 10 °C, en menos de 9 °C, en menos de 8 °C, en menos de 7 °C, en menos de 6 °C, en menos de 5 °C, en menos de 4 °C, en menos de 3 °C, en menos de 2 °C o en menos de 1 °C.

Las secuencias del cebador y de la sonda pueden estar modificadas por tener sustituciones de nucleótidos (con respecto a la secuencia objetivo) en la secuencia del oligonucleótido, con la condición de que el oligonucleótido contenga una complementariedad suficiente para hibridar específicamente con la secuencia de ácidos nucleicos objetivo. De esta forma, pueden sustituirse al menos 1, 2, 3, 4 o hasta aproximadamente 5 nucleótidos. Según se usa en el presente documento, el término "complementariedad" se refiere a una secuencia complementaria entre las regiones de dos hebras de un polinucleótido o entre dos regiones de la misma hebra del polinucleótido. Una primera región de un polinucleótido es complementaria de una segunda región del mismo polinucleótido o de uno diferente si cuando las dos regiones están dispuestas en un modo antiparalelo, al menos un nucleótido de la primera región es capaz de un apareamiento de bases con una base de la segunda región. Por lo tanto, no es necesario que dos polinucleótidos complementarios aparezcan sus bases en cada posición de nucleótido. "Totalmente complementario" se refiere a un primer polinucleótido que es 100 % o "totalmente" complementario de un segundo polinucleótido, y por lo tanto forma un par de bases en cada posición de nucleótido. "Parcialmente complementario" también se refiere a un primer polinucleótido que no es complementario al 100 % (por ejemplo, es complementario al 90 %, o al 80 % o al 70 %) y contiene nucleótidos malapareados en una o más posiciones de nucleótidos. En algunas realizaciones, un oligonucleótido incluye una base universal.

Según se usa en el presente documento, el término "hibridación" se usa en referencia al apareamiento de hebras de polinucleótidos complementarias (incluyendo parcialmente complementarias). La hibridación y la fuerza de la hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre las hebras de polinucleótido) se ve afectada por muchos factores bien conocidos en la materia que incluyen el grado de complementariedad entre los polinucleótidos, la rigurosidad de las condiciones implicadas afectadas por condiciones tales como la concentración de sales, la temperatura de fusión del híbrido formado, la presencia de otros componentes (por ejemplo, la presencia o la ausencia de polietilenglicol), la molaridad de las hebras que hibridan y el contenido de G:C de las hebras de polinucleótidos. En algunas realizaciones, los cebadores están diseñados de tal forma que la T_m de un cebador del conjunto está a alrededor de 2 °C de la T_m del otro cebador del conjunto. Una amplia guía sobre la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, Nueva York); y en Ausubel et al, eds. (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2 (Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York). Véase Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York). Como se analiza adicionalmente en el presente documento, el término "hibridación específica" o "que hibrida específicamente" se refiere a la hibridación de un polinucleótido, por ejemplo, de un cebador o de una sonda oligonucleotídico o similares, con una secuencia objetivo, tal como una secuencia que va a ser cuantificada en una muestra, a una secuencia positiva de control de ácidos nucleicos objetivo, o similares, y secuencias no relacionadas, en las condiciones usadas normalmente para la amplificación de ácidos nucleicos.

En algunas realizaciones, los cebadores y/o las sondas incluyen oligonucleótidos que hibridan con una secuencia de ácidos nucleicos objetivo a lo largo de la totalidad de la secuencia del oligonucleótido. Dichas secuencias pueden denominarse como "totalmente complementarias" entre sí. Cuando se indica que un oligonucleótido es "sustancialmente complementario" con respecto a una secuencia de ácidos nucleicos del presente documento, las dos secuencias pueden ser totalmente complementarias o pueden formar malapareamientos después de la hibridación, pero conservar la capacidad de hibridar en unas condiciones rigurosas o en unas condiciones convencionales de PCR, como se analiza a continuación. Según se usa en el presente documento, el término "sustancialmente complementarios" se refiere a la complementariedad entre dos ácidos nucleicos, por ejemplo, la región complementaria del oligonucleótido y de la secuencia objetivo. No es necesario que la complementariedad sea perfecta; puede haber cualquier número de malapareamientos de pares de bases que entre los dos ácidos nucleicos. Sin embargo, si el número de malapareamientos es tan grande que no se produce una hibridación incluso con las condiciones de hibridación más rigurosas, la secuencia no es una secuencia sustancialmente complementaria. Cuando se indica que dos secuencias son "sustancialmente complementarias" en el presente documento, significa que las secuencias son lo suficientemente complementarias entre sí como para hibridar en las condiciones de reacción seleccionadas. La relación entre la complementariedad de un ácido nucleico y la rigurosidad de la hibridación suficiente para conseguir especificidad es bien conocida en la materia y se describe adicionalmente a continuación con respecto a la identidad de la secuencia, la temperatura de fusión y las condiciones de hibridación. Por lo tanto, pueden usarse secuencias sustancialmente complementarias en cualquiera de los métodos de detección divulgados en el presente documento. Dichas sondas pueden ser, por ejemplo, perfectamente complementarias, o pueden contener entre 1 y muchos malapareamientos siempre que las condiciones de hibridación sean suficientes para permitir, por ejemplo, una discriminación entre una secuencia objetivo y una

secuencia no objetivo. Consecuentemente, unas secuencias sustancialmente complementarias pueden referirse a unas secuencias que varían en un porcentaje de identidad del 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 75, 70 o menor, o cualquier número entre los mismos, en comparación con la secuencia de referencia. Por ejemplo, los oligonucleótidos divulgados en el presente documento pueden contener 1, 2, 3, 4, 5 o más malapareamientos y/o bases degeneradas, en comparación con la secuencia objetivo con la que hibrida el oligonucleótido, con la condición de que los oligonucleótidos sean capaces de hibridar específicamente con la secuencia objetivo, por ejemplo, en unas condiciones convencionales de amplificación de ácidos nucleicos.

Los cebadores descritos en el presente documento pueden ser preparados mediante el uso de técnicas conocidas en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, una clonación y una digestión de las secuencias apropiadas y una síntesis química directa. Algunos métodos de síntesis química que pueden usarse para la elaboración de los cebadores del descrito en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, el método del fosfotriéster descrito por Narang et al. (1979) *Methods in Enzymology* 68: 90, el método del fosfodiéster divulgado por Brown et al. (1979) *Methods in Enzymology* 68: 109, el método del dietilfosforamidato divulgado por Beaucage et al. (1981) *Tetrahedron Letters* 22: 1859, y el método del soporte sólido descrito en la Patente de EE.UU. n° 4.458.066. En el presente documento también se contempla el uso de un sintetizador automatizado de oligonucleótidos para la preparación de los cebadores oligonucleotídicos sintéticos descritos en el presente documento. Adicionalmente, si se desea, los cebadores pueden marcarse mediante el uso de técnicas conocidas en la materia y descritas a continuación.

Preferiblemente, los oligonucleótidos divulgados en el presente documento son totalmente o sustancialmente complementarios de una secuencia objetivo o de un polinucleótido objetivo, por ejemplo, de una SCO. Según se usa en el presente documento, los términos "polinucleótido objetivo" y "ácido nucleico objetivo" se refieren a un polinucleótido cuya presencia va a ser determinada en una reacción, por ejemplo, una secuencia de control interna, y/o una secuencia de muestra que se va a medir.

Consecuentemente, en el presente documento se proporcionan cebadores que comprenden, que consisten esencialmente en, o que consisten en, una secuencia de una de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6, o una variante de las mismas.

Conjuntos de cebadores

En algunas realizaciones, se proporciona un conjunto de cebadores de amplificación. El conjunto de cebadores de amplificación puede incluir uno o más, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más pares de cebadores. Según se usa en el presente documento, el término "par de cebadores" puede referirse a dos cebadores que hibridan individualmente con las hebras opuestas de un ácido nucleico objetivo, por ejemplo, una secuencia de control interna de una PCR cuantitativa, en la que cada cebador puede ser extendido en su extremo 3' para formar un producto de amplificación objetivo, por ejemplo, en una PCR. Los pares de cebadores pueden incluir cebadores directos e inversos.

En algunas realizaciones, las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento incluyen un par de cebadores que comprende al menos un conjunto de cebadores de amplificación que hibrida con, y amplifica, una secuencia de control objetivo. Un primer oligonucleótido que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en, la secuencia de la SEQ ID NO: 3, y un segundo oligonucleótido que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en, la secuencia de la SEQ ID NO: 4, es un ejemplo de un par de cebadores (en lo sucesivo en el presente documento el "Par de Cebadores 5") útil en relación con las realizaciones divulgadas en el presente documento. Un primer oligonucleótido que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en, la secuencia de la SEQ ID NO: 5, y un segundo oligonucleótido que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en, la secuencia de la SEQ ID NO: 6, es otro ejemplo de un par de cebadores (en lo sucesivo en el presente documento el "Par de Cebadores 1") útil en relación con las realizaciones divulgadas en el presente documento. Las características del Par de Cebadores 1 y del Par de Cebadores 2 se describen en la Tabla 1.

Tabla 1

Par de Cebadores 1:					
Ejemplo de región de molde: Armazón genómico de <i>D. melanogaster</i> CP000223.3, pb 1395700-1395900					
Nombre del cebador	Secuencia	SEQ ID NO:	Tm (°C)	% de GC	Longitud del producto (pb)
Dros.MAX. FP1	ATCTAGCCGTGTGCCCGCTT	5	58,5	60,00	139
Dros.MAX. RP1	GGTTGTCCCATTGTGGAGGACAGC	6	59,95	56,00	

Par de Cebadores 5:

Ejemplo de región de molde:

Armazón genómico de *D. melanogaster* CP000223.3, pb 1395700-1395900

Dros.MAX. FP5	GGATCTAGCCGTGTGCCCGCT	3	60,97	66,67	149
Dros.MAX. RP5	GGCATGGAGGTTGTCCCATTTGTG	4	58,47	54,17	

En algunas realizaciones, un par de cebadores incluye un primer cebador que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 5, o una variante de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 5, y un segundo cebador que comprende una secuencia de la SEQ ID NO: 4 o de la SEQ ID NO: 6, o una variante de la SEQ ID NO: 4 o de la SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones, puede usarse un par de cebadores para amplificar un amplicón de una secuencia de control objetivo (SCO), por ejemplo, un molde que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1, la secuencia de la SEQ ID NO: 8, o una variante de las mismas. En algunas realizaciones, el Par de Cebadores 1 o el Par de Cebadores 5 se usa para amplificar las secuencias de la SEQ ID NO: 1 o de la SEQ ID NO: 8 (por ejemplo, las secuencias de molde de control). En algunas realizaciones, el Par de Cebadores 5 produce por lo tanto un amplicón según se muestra en la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, el Par de Cebadores 1 o el Par de Cebadores 5 amplifica un molde que comprende una variante de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, la secuencia de la SEQ ID NO: 10, 11, 12 o 13. En algunas realizaciones, el Par de Cebadores 1 o el Par de Cebadores 5 amplifica un molde que comprende el ADN genómico de *Drosophila*, o un fragmento genómico.

Sondas

En algunas realizaciones, se proporcionan sondas específicas de secuencia. Algunas sondas incluyen, pero no se limitan a, los oligonucleótidos según se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, las sondas específicas de secuencia divulgadas en el presente documento hibridan específicamente con una secuencia objetivo, tal como una SCO. En algunas realizaciones, la sonda específica de secuencia híbrida específicamente con, y es total o sustancialmente complementaria de, una secuencia de nucleótido flanqueada por los sitios de unión de un cebador directo y de un cebador inverso divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, las sondas específicas de secuencia comprenden al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de la SEQ ID NO: 3, 4, 5 o 6, de forma que la sonda específica de secuencia se solapa con el sitio de unión de un cebador de amplificación divulgado en el presente documento.

Se han descrito diferentes tipos de fracciones detectables para la detección de los productos de amplificación. Una clase de fracciones detectables es los agentes intercalantes, que se unen no específicamente a un ácido nucleico bicatenario. Los agentes intercalantes tienen una fluorescencia relativamente baja cuando no están unidos, y una fluorescencia relativamente alta tras la unión a los ácidos nucleicos bicatenarios. Como tales, los agentes intercalantes pueden usarse para monitorizar la acumulación de ácidos nucleicos de doble hebra durante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos. Algunos ejemplos de dichos colorantes no específicos incluyen agentes intercalantes tales como SYBR Green I (Molecular Probes), yoduro de propidio, bromuro de etidio, y similares. Otros tipos de fracciones detectables emplean derivados de sondas de ácidos nucleicos específicas de secuencia. Por ejemplo, sondas oligonucleotídicas marcadas con uno o más colorantes, de forma que después de la hibridación con un ácido nucleico de molde, se genera un cambio detectable en la fluorescencia. Aunque para algunas aplicaciones pueden ser deseables colorantes no específicos, las sondas específicas de secuencia pueden proporcionar unas mediciones de la amplificación más precisas. Una configuración de la sonda específica de secuencia puede incluir un extremo de la sonda unido a un fluoróforo, y el otro extremo de la sonda unido a un inactivador. Cuando la sonda está sin hibridar, puede mantener una configuración de tallo-bucle, en la que el fluoróforo está inactivado por el inactivador, impidiendo así que el fluoróforo emita fluorescencia. Cuando la sonda está hibridada con una secuencia nucleica de molde, está linealizada, separando el fluoróforo del inactivador, y permitiendo así que el fluoróforo emita fluorescencia. Otra configuración de la sonda específica de secuencia puede incluir una primera sonda unida a un primer fluoróforo de un par FRET, y una segunda sonda unida a un segundo fluoróforo de un par FRET. La primera sonda y la segunda sonda pueden estar configuradas para hibridar con las secuencias de un amplicón que están en una proximidad suficiente para permitir la transferencia de energía mediante una FRET cuando la primera sonda y la segunda sonda están hibridadas con el mismo amplicón.

En algunas realizaciones, la sonda específica de secuencia comprende un oligonucleótido según se divulga en el presente documento conjugado con un fluoróforo. En algunas realizaciones, la sonda está conjugada con dos o más fluoróforos. Algunos ejemplos de fluoróforos incluyen: colorantes de xanteno, por ejemplo, colorantes de fluoresceína y de rodamina, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), etil éster del ácido 2-[etilamino]-3-(etilimino)-2-7-dimetil-3H-xanten-9-il]benzoico monohidrato (R6G) (emite una radiación de respuesta en una longitud de onda que varía entre aproximadamente 500 y 560 nm), yoduro de 1,1,3,3,3',3'-hexametilindodicarbocianina (HIDC) (emite una radiación de respuesta en una longitud de onda que varía entre aproximadamente 600 y 660 nm), 6-carboxifluoresceína (conocida habitualmente por las abreviaturas FAM y F), 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE o J),

N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA o T), 6-carboxi-X-rodamina (ROX o R), 5-carboxirrodamina-6G (R6G5 o G5), 6-carboxirrodamina-6G (R6G6 o G6) y rodamina 110; colorantes de cianina, por ejemplo, los colorantes Cy3, Cy5 y Cy7; cumarinas, por ejemplo, umbeliferona; colorantes de benzoimida, por ejemplo, Hoechst 33258; colorantes de fenantridina, por ejemplo, Texas Red; colorantes de etidio; colorantes de acridina; colorantes de carbazol; colorantes de fenoxazina; colorantes de porfirina; colorantes de polimetina, por ejemplo, colorantes de cianina tales como Cy3 (emite una radiación de respuesta en una longitud de onda que varía entre aproximadamente 540 y 580 nm), Cy5 (emite una radiación de respuesta en una longitud de onda que varía entre aproximadamente 640 y 680 nm), etc.; colorantes BODIPY y colorantes de quinolina. Algunos fluoróforos específicos de interés incluyen: Pireno, Cumarina, Dietilaminocumarina, FAM, Fluoresceína Clorotriazinilo, Fluoresceína, R110, Eosina, JOE, R6G, HIDC, Tetrametilrodamina, TAMRA, Lissamina, ROX, Naftofluoresceína, Texas Red, Naflluoresceína, Cy3, y Cy5, y similares.

En algunas realizaciones, la sonda está conjugada con un inactivador. Un inactivador puede absorber la radiación electromagnética y disiparla en forma de calor, permaneciendo por lo tanto oscuro. Algunos ejemplos de inactivadores incluyen Dabcilo, NFQ, tales como BHQ-1 o BHQ-2 (Biosearch), IOWA BLACK FQ (IDT) y IOWA BLACK RQ (IDT). En algunas realizaciones, el inactivador es seleccionado para que se empareje con un fluoróforo de forma que absorba la radiación electromagnética emitida por el fluoróforo. Algunos pares de fluoróforo/inactivador útiles en las composiciones y los métodos divulgados en el presente documento son bien conocidos en la materia, y pueden encontrarse, por ejemplo, descritos en S. Marras, "Selection of Fluorophore and Quencher Pairs for Fluorescent Nucleic Acid Hybridization Probes" disponible en el sitio de internet molecular-beacons.org/download/marras,mmb06 %28335%293.pdf.

En algunas realizaciones, se une un fluoróforo a un primer extremo de la sonda, y se une un inactivador al segundo extremo de la sonda. La unión puede incluir una unión covalente, y opcionalmente puede incluir al menos una molécula conectora posicionada entre la sonda y el fluoróforo o el inactivador. En algunas realizaciones, se une un fluoróforo a un extremo 5' de una sonda, y se une un inactivador a un extremo 3' de una sonda. En algunas realizaciones, se une un fluoróforo a un extremo 3' de una sonda, y se une un inactivador a un extremo 5' de una sonda. Algunos ejemplos de sondas que pueden usarse en una amplificación cuantitativa de ácidos nucleicos incluyen balizas moleculares, sondas SCORPIONS™ (Sigma) y sondas TAQMAN™ (Life Technologies).

Algunas realizaciones divulgadas en el presente documento proporcionan sondas que hibridan específicamente con una secuencia de molde de control o un amplicón de una secuencia de molde de control de la SEQ ID NO: 1 o de la SEQ ID NO: 8, o una subsecuencia de las mismas. Consecuentemente, algunas realizaciones divulgadas en el presente documento proporcionan una sonda que hibrida con un amplicón procedente de la amplificación de un molde que comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 8 por parte de uno del Par de Cebadores 1 o del Par de Cebadores 5. En algunas realizaciones, la sonda mide la amplificación de una variante de la SEQ ID NO: 1 o de una subsecuencia de la misma mediante la hibridación con un amplicón de al menos una de la SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11, 12 o 13. Consecuentemente, en algunas realizaciones, se proporciona una sonda oligonucleotídica que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en, la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o 16, o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la sonda comprende un fluoróforo y/o un inactivador según se describe en el presente documento. En las realizaciones preferidas, las sondas pueden comprender la SEQ ID NO: 2, con el fluoróforo 6-carboxi-X-rodamina ("ROX" o "R") unido al extremo 5' de la sonda, y el inactivador IOWA BLACK Black-hole Quencher® 2 (IDT) ("BHQ") unido al extremo 3' de la sonda (por ejemplo, 5'-(ROX)-TGA TGC CTC TTC ACA TTG CTC CAC CTT TCC T- BHQ-2- 3').

En algunas realizaciones, se proporcionan dos o más sondas. En algunas realizaciones, se proporciona una primera sonda y se proporciona una segunda sonda. La primera sonda puede estar unida a un primer fluoróforo de FRET. La segunda sonda puede estar unida a un segundo fluoróforo de FRET. Cada una de la primera sonda y la segunda sonda puede estar configurada para que hibride con la secuencia de un amplicón que se va a cuantificar. En algunas realizaciones, la primera sonda está configurada para hibride con una primera subsecuencia del amplicón, y la segunda sonda está configurada para que hibride con una segunda subsecuencia del amplicón. En algunas realizaciones, la primera subsecuencia está posicionada en 5' de la segunda subsecuencia, y el número de bases entre el extremo 3' de la primera subsecuencia y el extremo 5' de la segunda subsecuencia no es mayor de aproximadamente 10 bases, por ejemplo, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 bases. En algunas realizaciones, la primera sonda y la segunda sonda hibridan, cada una, con una secuencia que es una subsecuencia de la SEQ ID NO: 1 o una variante de la misma. En algunas realizaciones, la primera sonda comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2, o una variante o una subsecuencia de la SEQ ID NO: 2, y la segunda sonda es según se describe en el presente documento.

Vectores

En algunas realizaciones, las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas en el presente documento (por ejemplo, una SCO) están presentes en un vector, por ejemplo, un plásmido o un virus. Los vectores son bien conocidos en la materia, y una persona experta en la materia apreciará que pueden usarse muchos vectores para proporcionar una secuencia de ácidos nucleicos. Además, existen muchas variantes de los vectores, y la persona experta en la materia puede producir vectores adicionales. Los vectores pueden ser modificados mediante una

mutagénesis dirigida, mediante una mutagénesis aleatoria o mediante una o más etapas de clonación para añadir, eliminar y/o sustituir al menos una secuencia de ácidos nucleicos del vector, por ejemplo, un sitio de clonación múltiple, un gen de resistencia a un antibiótico, un origen de replicación o un gen que codifica un marcador que facilita la visualización de las células portadoras del vector, tal como la beta galactosidasa, la luciferasa o la proteína fluorescente verde.

En algunas realizaciones, el vector contiene una secuencia de molde para la amplificación de ácidos nucleicos. La secuencia de molde para la amplificación de ácidos nucleicos puede moverse a un vector diferente, por ejemplo, mediante una digestión de restricción, para eliminar la secuencia de molde para la amplificación de los ácidos nucleicos de un primer vector, y una ligación para insertar la secuencia de molde para la amplificación de los ácidos nucleicos en un segundo vector, o mediante una amplificación de los ácidos nucleicos, por ejemplo, una amplificación mediante una PCR de la secuencia de molde para la amplificación de los ácidos nucleicos, y una ligación de la secuencia de molde para la amplificación de los ácidos nucleicos en un segundo vector.

A modo de ejemplo, en la SEQ ID NO: 7 se muestra un plásmido derivado del pUC 119. En algunas realizaciones, puede usarse un plásmido que no contiene una secuencia de molde de control interno (por ejemplo, una SCO), por ejemplo, el plásmido de la SEQ ID NO: 7 como control negativo en los ensayos de NAT. La secuencia de un plásmido derivado del pUC119, que contiene la secuencia de molde de la PCR de la SEQ ID NO: 1, se proporciona en la SEQ ID NO: 8. La Figura 1 ilustra un mapa de un plásmido que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8.

Variantes

Una persona experta en la materia apreciará que pueden generarse variantes de la secuencia de ácidos nucleicos indicada mediante el uso de técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, mediante una mutagénesis aleatoria, una mutagénesis dirigida o una síntesis química de una variante deseada. En algunas realizaciones, se proporcionan las variantes de las secuencias indicadas, en las que cada variante tiene una secuencia que difiere de una secuencia de referencia en al menos un nucleótido. En algunas realizaciones, un ácido nucleico variante comprende una secuencia sustancialmente complementaria que tiene una identidad de al menos aproximadamente el 70 % de nt-nt con una secuencia de referencia, por ejemplo, de al menos aproximadamente el 70 %, el 71 %, el 72 %, el 73 %, el 74 %, el 75 %, el 76 %, el 77 %, el 78 %, el 79 %, el 80 %, el 81 %, el 82 %, el 83 %, el 84 %, el 85 %, el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,3 %, el 99,5 %, el 99,7 %, el 99,8 %, el 99,9 % o el 99,99 %, incluyendo los intervalos entre dos cualesquiera de los valores indicados.

En algunas realizaciones, una variante tiene una función sustancialmente equivalente o similar a la de una secuencia de referencia. Por ejemplo, para una secuencia de referencia que tiene sitios de unión del cebador y/o de la sonda, muchas variantes de ácidos nucleicos fuera del sitio de unión del cebador y/o de la sonda no afectan a la unión del cebador ni a la subsiguiente amplificación o hibridación de la sonda.

En algunas realizaciones, una variante de un molde de referencia es amplificada mediante los mismos cebadores que el molde de referencia. En algunas realizaciones, una variante de un sitio de hibridación de la sonda de referencia hibrida con la misma sonda que la secuencia de referencia. En algunas realizaciones, una variante de una SCO es amplificada mediante los mismos cebadores, y es hibridada por los mismos cebadores que la SCO. En algunas realizaciones, se proporciona una variante de una SCO, y se proporcionan uno o más cebadores variantes correspondientes para que se apareen con la SCO variante. En algunas realizaciones, se proporciona un sitio de unión de la sonda variante, y se proporcionan una o más sondas variantes correspondientes para que hibriden con el sitio de unión de la sonda variante. En algunas realizaciones, se proporciona una variante de una secuencia de control interna de una amplificación cuantitativa de ácidos nucleicos, y se proporcionan los correspondientes cebadores/o sondas variantes para que se apareen con la secuencia de control interna variante.

En algunas realizaciones, una variante da como resultado un malapareamiento parcial en un sitio de hibridación de un cebador y/o de una sonda, pero todavía permite la unión del cebador o de la sonda. La variante puede estar en la sonda y/o en el cebador. Alternativamente, la variante puede estar en la secuencia a la que se une la sonda y/o el cebador. En algunas realizaciones, un cebador o una sonda variante da como resultado un malapareamiento de no más de 5 ácidos nucleicos, por ejemplo, de 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido. En algunas realizaciones, incluso cuando hay malapareamientos, un cebador puede aparearse con un sitio de unión y funcionar en una amplificación mediante una PCR, siempre que los malapareamientos no estén en los dos primeros nucleótidos del extremo 3' del cebador. En algunas realizaciones, incluso cuando hay malapareamientos, una sonda puede hibridar con una secuencia objetivo, independientemente de las posiciones de los malapareamientos.

En algunas realizaciones, un cebador o una sonda de PCR variante se une a la secuencia objetivo con una temperatura de apareamiento según se describe en el presente documento, y por lo tanto es funcional para la amplificación y/o la detección de una secuencia de ácidos nucleicos.

En algunas realizaciones, se proporciona una variante que tiene una identidad en la secuencia de al menos aproximadamente el 85 %, por ejemplo, de al menos aproximadamente el 86 %, el 87 %, el 88 %, el 89 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, el 99,3 %, el 99,5 %, el 99,7 %, el 99,8 %, el 99,9 % o el 99,99 %, incluyendo los intervalos entre dos cualesquiera de los valores indicados.

el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 %, el 99 %, o más, con la SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 representa una secuencia aislada de *Drosophila melanogaster*. Cuando se usan los cebadores de la SEQ ID NO: 3 y de la SEQ ID NO: 4 para amplificar la SEQ ID NO: 1, se produce la secuencia de la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, se usa un par de cebadores que incluye un cebador directo que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 5, y un cebador inverso que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o de la SEQ ID NO: 6 para la amplificación del ADN genómico de *Drosophila melanogaster*. Debido a la presencia de repeticiones en este ADN genómico, las secuencias que comprenden la SEQ ID NO: 8, 9, 10, o 11, o las subsecuencias de las mismas, pueden ser producidas mediante los pares de cebadores descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, aunque una secuencia comprenda 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más nucleótidos variantes de la secuencia de la SEQ ID NO: 1, esta secuencia puede ser amplificada mediante un par de cebadores que incluye uno de un cebador que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3 o de la SEQ ID NO: 5, y uno de un cebador que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o de la SEQ ID NO: 6, y/o puede ser hibridada por la sonda de la SEQ ID NO: 2.

15 Métodos

En el presente documento se proporcionan métodos de uso de las composiciones divulgadas en el presente documento, por ejemplo, para monitorizar la eficacia del rendimiento del ensayo de NAT. En algunas realizaciones, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden usarse para monitorizar la eficacia de la preparación de la muestra de prueba, así como del procesamiento. Como ejemplos, en algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento pueden combinarse con muestras de prueba y usarse para monitorizar la extracción y/o el procesamiento de un ácido nucleico (por ejemplo, la amplificación y/o la detección). En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas en el presente documento no se combinan con muestras de prueba, sino que son procesadas en paralelo para monitorizar la extracción y/o el procesamiento de un ácido nucleico (por ejemplo, la amplificación y/o la detección). En algunas realizaciones, los cebadores y los ácidos nucleicos de molde divulgados en el presente documento proporcionan un método robusto y reproducible para determinar la eficacia de la extracción, u otras métricas del rendimiento de diversos procesos automatizados o manuales de los sistemas de procesamiento de muestras, mientras que adicionalmente sirven como control para la amplificación de varios analitos. Por ejemplo, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden usarse ventajosamente en relación con dispositivos que realizan automáticamente ensayos de NAT, incluyendo, pero no se limitan a, dispositivos que preparan y procesan automáticamente las muestras de los ensayos de NAT (por ejemplo, realizan automáticamente la extracción y la preparación del ácido nucleico, así como la amplificación y la detección).

En algunas realizaciones, se proporcionan controles del rendimiento de la extracción. Los ácidos nucleicos pueden extraerse a partir de diversos tipos de especímenes, incluyendo especímenes biológicos o clínicos, por ejemplo, muestras de tejido, fluidos corporales o muestras de cultivos celulares, así como muestras de comida, muestras de suelo o similares, mediante el uso de una diversidad de técnicas conocidas en la materia. La extracción de los ácidos nucleicos puede incluir la separación de los ácidos nucleicos de otras sustancias de una muestra biológica, por ejemplo, proteínas, lípidos, membranas, orgánulos, carbohidratos y moléculas inorgánicas. La extracción de los ácidos nucleicos puede llevarse a cabo manualmente o mediante uno de una diversidad de sistemas automatizados. Los métodos proporcionados en el presente documento pueden ser útiles para monitorizar la eficacia de la extracción de un ácido nucleico, por ejemplo, para validar un método, un dispositivo y/o un reactivo de extracción, para proporcionar un control positivo cuando se lleva a cabo un proceso de extracción, y/o para llevar a cabo una comprobación de mantenimiento de uno o más componentes de un dispositivo de procesamiento automatizado.

En algunas realizaciones, se añade una cantidad conocida de un ácido nucleico de molde, por ejemplo, de una secuencia de control objetivo (SCO) a una muestra biológica, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 1, 8, 9, 10, 11, 12, 13, una variante de las mismas o el complemento inverso de las mismas. En algunas realizaciones, la cantidad conocida del ácido nucleico de molde es añadida a una muestra de prueba antes de la realización de cualquier etapa del protocolo de extracción de un ácido nucleico. En algunas realizaciones, la cantidad conocida del ácido nucleico de molde es añadida después de que se haya realizado al menos una etapa de un protocolo de extracción de un ácido nucleico.

En algunas realizaciones, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden usarse en los métodos de amplificación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, la amplificación de ácidos nucleicos puede incluir la amplificación cuantitativa de los ácidos nucleicos, por ejemplo, para medir la cantidad relativa o absoluta de un ácido nucleico presente en una muestra. En algunas realizaciones, el ácido nucleico puede incluir la amplificación cualitativa de los ácidos nucleicos, por ejemplo, para determinar si una secuencia de ácidos nucleicos está presente o ausente en una muestra. En algunas realizaciones, la amplificación de los ácidos nucleicos puede incluir la amplificación cuantitativa y cualitativa de los ácidos nucleicos, por ejemplo, para determinar si una secuencia de ácidos nucleicos está presente en una muestra, y si está presente, para medir la cantidad relativa o absoluta de la secuencia de ácidos nucleicos presente en la muestra. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos pueden incluir, pero no se limitan a: una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), por ejemplo, una amplificación por desplazamiento múltiple (MDA), una amplificación isotérmica mediada por un bucle (LAMP), una reacción en cadena de la ligasa (LCR), una inmunoamplificación, y una

diversidad de procedimientos de amplificación basados en la transcripción, incluyendo una amplificación mediada por la transcripción (TMA), una amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), una replicación de la secuencia autosostenida (3SR) y una amplificación en círculos rodantes. Véase, por ejemplo, Mullis, "Process for Amplifying, Detecting, and/or Cloning Nucleic Acid Sequences," la Patente de EE.UU. n° 4.683.195; Walker, "Strand Displacement Amplification," la Patente de EE.UU. n° 5.455.166; Dean et al., "Multiple displacement amplification," la Patente de EE.UU. n° 6.977.148; Notomi et al., "Process for Synthesizing Nucleic Acid," la Patente de EE.UU. n° 6.410.278; Landegren et al. la Patente de EE.UU. n° 4.988.617 "Method of detecting a nucleotide change in nucleic acids"; Birkenmeyer, "Amplification of Target Nucleic Acids Using Gap Filling Ligase Chain Reaction," la Patente de EE.UU. n° 5.427.930; Cashman, "Blocked-Polymerase Polynucleotide Immunoassay Method and Kit," la Patente de EE.UU. n° 5.849.478; Kacian et al., "Nucleic Acid Sequence Amplification Methods," la Patente de EE.UU. n° 5.399.491; Malek et al., "Enhanced Nucleic Acid Amplification Process," la Patente de EE.UU. n° 5.130.238; Lizardi et al., BioTechnology, 6: 1197 (1988); Lizardi et al., la Patente de EE.UU. n° 5.854.033 "Rolling circle replication reporter systems." En algunas realizaciones, se llevan a cabo dos o más de los métodos indicados de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, secuencialmente.

En algunas realizaciones, se lleva a cabo una serie de reacciones de amplificación individuales con unas cantidades conocidas de moldeos de un ácido nucleico, tales como secuencias de control de molde (SCO) según se divulga en el presente documento, para generar una curva patrón. Tomando como base la curva patrón, puede determinarse la cantidad del molde objetivo en las reacciones de amplificación individuales. En algunas realizaciones, se combina una cantidad conocida del molde de control interno (por ejemplo, una secuencia de control de molde tal como la SEQ ID NO: 1, 8, 9, 10, 11, 12 o 13, o una variante de las mismas) con una muestra que puede contener o no un ácido nucleico objetivo que va a ser amplificado, y tanto la secuencia de control de molde como el ácido nucleico objetivo (si estuviera presente) son amplificados en una reacción múltiple. En algunas realizaciones, una serie de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, teniendo cada reacción una cantidad conocida de la secuencia de control de molde (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 1, 8, 9, 10, 11, 12 o 13), y se determina un umbral de detección para cada cantidad de molde de control interno, generando así una curva patrón. En algunas realizaciones, se llevan a cabo múltiples réplicas de cada cantidad del molde de control, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 réplicas. La curva patrón de la secuencia de control interna puede usarse a continuación para determinar la cantidad de la reacción objetivo en una muestra. Un método múltiple y de curva patrón de cuantificación de un ácido nucleico se describe con detalle en McMillan et al (Patente de Estados Unidos n° 6.783.934). En algunas realizaciones, se calcula el número de ciclos de amplificación realizado hasta que un amplicón objetivo alcanza un umbral de detección ("Cq"). En algunas realizaciones, el método incluye proporcionar una sonda en la reacción de amplificación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se proporciona una sonda no específica de secuencia. En algunas realizaciones, los métodos divulgados en el presente documento incluyen proporcionar una sonda específica de secuencia en la reacción de amplificación, por ejemplo, una sonda que comprende, que consiste en, o consiste esencialmente en, la SEQ ID NO: 2, o una variante de la misma.

En algunas realizaciones, el método incluye la detección de la cantidad del amplicón producido. La detección puede llevarse a cabo de forma continua o periódica. Por ejemplo, la detección puede llevarse a cabo al final de cada N ciclo o fracción del mismo, en el que N es uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o similares. En algunas realizaciones, la detección puede incluir la medición de la fluorescencia, por ejemplo, la intensidad de la radiación electromagnética a la longitud de onda de emisión del fluoróforo unido a la sonda, o a un intervalo de longitud de onda que incluye la longitud de onda de emisión del fluoróforo unido a la sonda. En algunas realizaciones, la detección puede incluir una FRET de detección.

En algunas realizaciones, se mide la eficacia de la amplificación nucleica cuantitativa. Puede ser útil medir la eficacia de la reacción de amplificación nucleica cuantitativa, por ejemplo, para determinar la sensibilidad de la reacción a un bajo número de copias de los ácidos nucleicos, o para optimizar o validar un protocolo, un reactivo y/o un dispositivo para la amplificación cuantitativa de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, se añade una cantidad conocida del ácido nucleico de molde a una reacción cuantitativa de un ácido nucleico. En algunas realizaciones, el molde es un molde de control interno. En algunas realizaciones se añade a la reacción un par de cebadores configurado para amplificar un amplicón del ácido nucleico de molde. El cebador directo y el cebador inverso del par de cebadores pueden hibridar con el molde y ser extendidos, produciendo así un amplicón. La cantidad de amplicón producido puede ser monitorizada en uno o más puntos temporales durante la reacción de amplificación, o puede ser monitorizada de forma continua mediante el uso de los métodos divulgados en el presente documento. En algunas realizaciones, puede definirse un Cq de ciclo umbral como un nivel de unidades de fluorescencia relativas (UFR), por ejemplo, de aproximadamente 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.700, 2.000, 2.500 o 3.000 UFR. En el Ejemplo 2 del presente documento, el Cq se define como 500 UFR. En algunas realizaciones, la curva patrón es representada en forma del Cq frente a la cantidad inicial de molde, o una transformación logarítmica de la misma. En algunas realizaciones, la curva patrón es representada en forma de unidades fluorescentes relativas frente a la cantidad inicial de molde, o una transformación logarítmica de la misma.

En algunas realizaciones, la cantidad conocida del ácido nucleico de molde es cuantificada mediante una reacción de amplificación cuantitativa de ácidos nucleicos según se describe en el presente documento, por ejemplo, una PCR cuantitativa. En algunas realizaciones, por ejemplo, en una realización en la que se está extrayendo un ARN, el ARN es retrotranscrito en ADN antes de la etapa de cuantificación. En algunas realizaciones, la cantidad conocida

del ácido nucleico de molde es cuantificada después de que se haya completado el procedimiento de extracción. En algunas realizaciones, la cantidad conocida de ácido nucleico de molde es cuantificada después de una etapa intermedia del proceso de extracción, por ejemplo, para determinar la eficacia de una etapa subsiguiente del proceso de extracción.

5 El experto apreciará que las composiciones divulgadas en el presente documento pueden usarse en diversos tipos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, según se divulga en el presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden usarse en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para una revisión de la tecnología de PCR, incluyendo las condiciones convencionales de PCR, aplicada a la microbiología clínica, véase DNA Methods in Clinical Microbiology, Singleton P., Publicado por Dordrecht; Boston: Kluwer Academic, (2000) Molecular Cloning to Genetic Engineering White, B. A. Ed. en Methods in Molecular Biology 67: Humana Press, Totowa (1997) y "PCR Methods and Applications", desde 1991 hasta 1995 (Cold Spring Harbor Laboratory Press). Algunos ejemplos no limitantes de "condiciones de PCR" incluyen las condiciones divulgadas en las referencias mencionadas en el presente documento, tales como, por ejemplo, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (a un pH de 9,0), Triton X-100 al 0,1 %, MgCl₂ 2,5 mM, con una temperatura de apareamiento de 72 °C; o MgCl₂ 4 mM, Tris 100 mM, a un pH de 8,3, KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 5 mM, 0,15 mg de BSA, Trehalosa al 4 %, con una temperatura de apareamiento de 59 °C, o KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM (a un pH de 9,0), Triton X-100 al 0,1 %, MgCl₂ 2,5 mM, con una temperatura de apareamiento de 55 °C, o similares.

20 En algunas realizaciones, se proporciona al menos una polimerasa. La polimerasa puede usarse para una PCR cuantitativa. Hay disponibles diferentes polimerasas de ácidos nucleicos para su uso, incluyendo, pero no se limitan a, la polimerasa de ADN FASTSTART™ Taq (Roche), la KlenTaq 1 (AB peptides Inc.), la polimerasa de ADN HOTGOLDSTAR™ (Eurogentec), la polimerasa de ADN KAPATAQ™ HotStart o la polimerasa de ADN KAPA2G™ Fast HotStart (Kapa Biosystemss) y la PHUSION™ Hot Start (Finnzymes).

25 En algunas realizaciones, se usa un único cebador, por ejemplo, la SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, o variantes del mismo, para la amplificación

Termociclado

30 Las condiciones de termociclado pueden variar en función del tiempo, así como de la temperatura, para cada una de las diferentes etapas, dependiendo del termociclador usado, así como de otras variables que podrían modificar el rendimiento de la amplificación. En algunas realizaciones, se lleva a cabo un protocolo en 2 etapas en el que el protocolo combina las etapas de apareamiento y de elongación a una temperatura común, óptima para el apareamiento tanto de los cebadores como de las sondas, así como una etapa de extensión. En algunas realizaciones, se lleva a cabo un protocolo en 3 etapas en el que se realizan una etapa de desnaturalización, una etapa de apareamiento y una etapa de elongación.

40 En algunas realizaciones, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden usarse en relación con dispositivos de reacciones de amplificación en tiempo real, por ejemplo, el BD MAX® (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ), el VIPER® (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ), el VIPER LT® (Becton Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ), el SMARTCYLCER® (Cepheid, Sunnyvale, CA), el ABI PRISM 7700® (Applied Biosystems, Foster City, CA), el ROTOR-GENE™ (Corbett Research, Sídney, Australia), el LIGHTCYCLER® (Roche Diagnostics Corp, Indianapolis, IN), el ICYCLER® (BioRad Laboratories, Hercules, CA), el IMX4000® (Stratagene La Jolla, CA), el sistema de PCR en tiempo real CFX96™ (Bio-Rad Laboratories Inc), y similares.

Amplificación isotérmica

50 En algunas realizaciones, las composiciones divulgadas en el presente documento pueden usarse en métodos que comprenden la amplificación isotérmica de los ácidos nucleicos. Las condiciones de amplificación isotérmica pueden variar en función del tiempo, así como de la temperatura, dependiendo de variables tales como el método, la enzima, el molde, y el cebador o cebadores usados. Algunos ejemplos de métodos de amplificación que pueden llevarse a cabo en condiciones isotérmicas incluyen, pero no se limitan a, algunas versiones de LAMP, SDA, y similares.

55 La amplificación isotérmica puede incluir una etapa opcional de desnaturalización, seguida por una incubación isotérmica en la que se amplifica un ácido nucleico. En algunas realizaciones, se realiza una incubación isotérmica sin una etapa de desnaturalización inicial. En algunas realizaciones, la incubación isotérmica se realiza al menos aproximadamente a 25 °C, por ejemplo, aproximadamente a 25 °C, a 26, a 27, a 28, a 29, a 30, a 31, a 32, a 33, a 34, a 35, a 36, a 37, a 38, a 39, a 40, a 41, a 42, a 43, a 44, a 45, a 46, a 47, a 48, a 49, a 50, a 51, a 52, a 53, a 54, a 55, a 56, a 57, a 58, a 59, a 60, a 61, a 62, a 63, a 64, a 65, a 66, a 67, a 68, a 69, a 70, a 71, a 72, a 73, a 74 o a 75 °C, incluyendo los intervalos entre cualesquiera de los valores indicados. En algunas realizaciones, la incubación isotérmica se realiza aproximadamente a 37 °C. En algunas realizaciones, la incubación isotérmica se realiza aproximadamente a 64 °C. En algunas realizaciones, la incubación isotérmica se realiza durante 180 minutos o menos, por ejemplo, durante aproximadamente 180, 165, 150, 135, 120, 105, 90, 75, 60, 45, 30 o 15 minutos, incluyendo los intervalos entre dos cualesquiera de los valores indicados.

Hibridación *in situ*

En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de hibridación *in situ*. La hibridación *in situ* puede llevarse a cabo con muestras según se describe en el presente documento, o con secciones de las mismas. En algunas realizaciones, puede usarse la hibridación *in situ* para identificar la localización de una secuencia objetivo de un ácido nucleico, por ejemplo, intracelularmente, entre una población de células, en un tejido u órgano, y/o en un organismo completo. En algunas realizaciones, la hibridación *in situ* se usa para cuantificar el número de copias de un ácido nucleico objetivo en una muestra. En algunas realizaciones, puede usarse una sonda según se describe en el presente documento en una hibridación *in situ*. En algunas realizaciones, la sonda puede incluir un oligonucleótido que consiste sustancialmente en la SEQ ID NO: 2, o una variante y/o una subsecuencia de la misma. En algunas realizaciones, la sonda puede incluir un oligonucleótido que comprende, o que consiste sustancialmente en, una de la SEQ ID NO: 3-6, o una variante y/o una subsecuencia de la misma.

Mezcla maestra

En algunas realizaciones, se proporciona una mezcla maestra. Una mezcla maestra puede incluir al menos dos reactivos para un ensayo que son proporcionados a unas concentraciones relativas que son proporcionales a las concentraciones relativas de los reactivos de un ensayo de NAT. Por lo tanto, puede añadirse una única una única cantidad de mezcla maestra a una reacción para proporcionar las apropiadas concentraciones relativas de dos o más reactivos. En algunas realizaciones, una mezcla maestra puede incluir al menos dos de: polimerasa, tampón, sales, por ejemplo, magnesio, nucleótidos trifosfato, un par de cebadores y agua. En algunas realizaciones, una mezcla maestra puede ser proporcionada a una concentración mayor que la que se usará en una reacción. En algunas realizaciones, una mezcla maestra se proporciona en una forma liofilizada, y es reconstituida a una concentración mayor que la que se usará en la reacción. En algunas realizaciones una mezcla maestra incluye reactivos a una concentración de al menos aproximadamente 2x la concentración de la reacción, por ejemplo, 2x, 2,5x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x, 15x, 20x, 25x, 40x, 50x, 100x, 200x, 250x o 500x.

Kits

En algunas realizaciones se proporcionan kits. En algunas realizaciones, un kit incluye uno o más de: un par de cebadores, una sonda, un polinucleótido de molde, por ejemplo, una secuencia de molde de control interno de un NAT cuantitativo, una polimerasa, un tampón, uno o más nucleótidos (por ejemplo, una mezcla de dNTP), instrucciones o envasado. En algunas realizaciones, al menos un reactivo del kit se proporciona en una mezcla maestra.

En algunas realizaciones, se proporcionan un molde de control interno, al menos un par de cebadores para la amplificación del molde de control interno, y al menos una sonda que hibrida con un amplicón del par de cebadores, junto con al menos un par de cebadores y al menos una sonda para un polinucleótido objetivo.

En algunas realizaciones, la secuencia de control interno del kit incluye un polinucleótido de molde que comprende al menos una de la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 13.

En algunas realizaciones, el kit incluye al menos un cebador según se describe en el presente documento, por ejemplo, un oligonucleótido que comprende una de la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el kit incluye al menos un par de cebadores según se describe en el presente documento, por ejemplo, el Par de Cebadores 1 y/o el Par de Cebadores 5.

En algunas realizaciones, el kit incluye al menos una sonda según se describe en el presente documento, por ejemplo, una sonda oligonucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 2 o 16.

En algunas realizaciones, el kit incluye al menos una de: transcriptasa; RNAsa inversa, por ejemplo, RNAsa H; o una polimerasa de ARN, por ejemplo, la polimerasa de ARN T7, o similares.

EJEMPLO 1: PCR CUANTITATIVA CON SENSIBILIDAD, ROBUSTEZ Y REPRODUCIBILIDAD [¿POR QUÉ PONER EL EJEMPLO PROFÉTICO EN PRIMER LUGAR?]

Con objeto de evaluar la sensibilidad, la robustez y la reproducibilidad de las composiciones divulgadas en el presente documento como secuencias de control/patrón, se llevó a cabo una serie de reacciones de amplificación de reacciones en cadena de la polimerasa.

Cada reacción incluía un número conocido de copias de un plásmido de molde, una sonda TAQMAN™ (Life Technologies) que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2 (o de la SEQ ID NO: 16 en el caso de los ensayos mostrados en la Figura 4D), y uno del Par de Cebadores 1 o el Par de Cebadores 5. En los ensayos representados en las Figuras 3A, 3B, 4A, 4B, 4C y 4D, el molde era un plásmido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 8. En los ensayos representados en la Figura 5, el molde era un plásmido linealizado que tiene la secuencia de la SEQ ID

NO: 15. Las reacciones se llevaron a cabo con 5 copias del molde, 50 copias del molde y 500 copias del molde, y se realizaron cuatro réplicas. La PCR en tiempo real se llevó a cabo en placas de reacción ópticas de 96 pocillos mediante el uso del sistema de PCR en tiempo real CFX96™ (Bio-Rad Laboratories Inc.). El perfil de termociclado era: a 95 °C, 15 min (1 ciclo); a 95 °C, 15 s, a 60 °C, 1 min (50 ciclos). Las condiciones de las reacciones de PCR eran: Tris a un pH de 8,0 (70 mM), NaOH 5,0 mM, cebador inverso 0,60 uM, cebador directo 0,60 uM, sondas Dros,MAX (0,40 uM) (Nota: había 4 lotes diferentes de sondas usados, según se describe en el presente documento), MgCl₂ (3,5 mM), dATP (0,05 mM), dCTP (0,05 mM), dGTP (0,05 mM), dTTP (0,05 mM), polimerasa HGS (2,7 unidades). Para cada cantidad de molde, se midió la cantidad de producto al final de cada ciclo en Unidades de Fluorescencia Relativa, y se determinó el número de ciclos (Cq) necesario para detectar un nivel umbral de producto (medido por la hibridación de la sonda fluorescente). El nivel umbral de Cq fue establecido a 500 UFR.

Las **Figuras 3A, 3B, 4A, 4B, 4C y 4D** ilustran los resultados de estos ensayos. Se obtuvieron unos resultados muy reproducibles, incluso para las reacciones que tienen únicamente 5 copias de plásmido. Como se muestra en la **Figura 3A**, una curva patrón que representa el número de copias de molde frente al Cq para cada una de las réplicas tenía un valor de R² de 0,993.

Las curvas de amplificación mostradas en las **Figuras 4A, 4C y 4D** muestran una elevada sensibilidad y reproducibilidad para el Par de Cebadores 5, y la **Figura 4B** muestra una elevada sensibilidad y reproducibilidad para el Par de Cebadores 1 para las reacciones de PCR cuantitativas a 200, 50, 25 y 5 copias de plásmido por reacción de PCR. Las **Figuras 4A, 4B y 4C** representan los resultados en los que cada ensayo usaba una sonda de un lote de sonda diferente (**Figura 4A** = lote 1; **Figura 4B** = lote 2, **Figura 4C** = lote 3) y que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2 (es decir, una única "T" en el extremo 5' de la sonda), mientras que la **Figura 4D** representa los resultados del ensayo que usa sondas que tienen la secuencia de la SEQ ID NO: 16 (es decir, un doblete de "TT" en el extremo 5' de la sonda). Los resultados de la Figura 4D muestran que el sistema tiene una elevada sensibilidad y reproducibilidad, incluso cuando se usan sondas variantes (nótese que la sonda de la SEQ ID NO: 16 no se complementa completamente con la secuencia de unión de la sonda del molde de la SEQ ID NO: 8, ya que la T del extremo 5' de la sonda se corresponde con una "C" en la hebra equivalente de la SEQ ID NO: 16). Como se muestra en la **Figura 4B**, el umbral de detección y el índice de amplificación era reproducible y sensible para las reacciones que tienen 5 copias del molde (número de referencia 1), 50 copias del molde (número de referencia 2) y 500 copias del molde (número de referencia 3).

EJEMPLO 2: REACCIÓN DE AMPLIFICACIÓN CUANTITATIVA

Se recogen muestras de células. Se aísla el ARN a partir de las muestras de células. Los ARN de las muestras aislados son retrotranscritos, produciendo así el ADNc de la muestra. Se reconstituye una mezcla maestra liofilizada que incluye polimerasa, tampón, magnesio y nucleótidos trifosfato hasta una concentración de 2x mediante la adición de diluyente. Se combinan partes iguales de la mezcla maestra y de un líquido que incluye: una concentración de 2x de los ADNc de la muestra (o un control negativo o un control positivo); cebadores para la amplificación de un marcador de ARN vírico, la sonda SCORPION™ para la medición de la cantidad de marcador vírico amplificado, y ácidos nucleicos de control interno, en tubos de ensayo de plástico de paredes finas.

En cada tubo de prueba del ensayo hay presente un control interno para monitorizar la integridad del reactivo de la PCR y detectar la presencia de inhibidores de la PCR. También se llevan a cabo dos controles externos: un control negativo que contiene todos los reactivos, pero sin ADN de molde; y un control positivo que es una muestra que se sabe que contiene el gen objetivo, se procesan como muestras, pero se analizan para que sirvan como controles. Todos los controles se llevan a cabo al mismo tiempo, mediante el uso de los mismos reactivos, en la misma reacción de amplificación. El control interno se lleva a cabo mediante el uso de un molde que incluye un plásmido que tiene la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO: 8. El control interno control incluye un par de cebadores que incluye un primer cebador oligonucleotídico que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 3, y un segundo cebador oligonucleotídico que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 4. El par de cebadores amplificará una subsecuencia de la SEQ ID NO: 6, produciendo un producto de polinucleótido que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 7. El control interno incluye una sonda SCORPION™ con la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

La mezcla de reacción es una combinación clásica de ácidos nucleicos de molde, cebadores oligonucleotídicos a una concentración de aproximadamente 0,4 uM cada uno, la sonda a aproximadamente 0,35 uM, un tampón apropiado para la enzima, sales (MgCl₂ en este caso), y por supuesto, la enzima polimerasa a una concentración mínima de aproximadamente 0,06 U/rx. Se usa la enzima polimerasa de ADN FastStart Taq como la polimerasa. También se añaden a la mezcla de reacción los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) a una concentración de aproximadamente 0,15 mM cada uno (dTTP, dATP, dGTP y dCTP), así como albúmina sérica bovina (BSA) a aproximadamente 0,15 mg/ml. La BSA es opcional, y puede ayudar a llevar a cabo la reacción incluso en presencia de inhibidores de la PCR.

Las condiciones de ciclado que permitirán la extensión y la amplificación del cebador del ADN objetivo incluyen una etapa de desnaturalización, una etapa de apareamiento y una etapa de polimerización. La primera etapa es una etapa de desnaturalización inicial de 15 minutos a 95 °C. Está seguida por una corta etapa de desnaturalización a

ES 2 705 849 T3

95 °C durante 1 segundo, la etapa de apareamiento a 60 °C durante 9 segundos y una etapa de elongación a 72 °C durante 10 segundos. Este ciclo se repite 45 veces. También hay una etapa de elongación final de 10 minutos a 72 °C al final, para asegurar que la enzima termina la extensión de cada ADN monocatenario.

- 5 Después de cada ciclo de amplificación se mide la cantidad de producto de polinucleótido de control interno mediante la intensidad de la fluorescencia (en Unidades de Fluorescencia Relativa) emitida por el fluoróforo de la sonda de control interno SCORPION™.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Becton, Dickinson, and Company

15

<120> ÁCIDOS NUCLEICOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> GENOM.115W0

20

<150> 61/617562

<151> 29-03-2012

<160> 16

25

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 200

<212> ADN

<213> ADN sintético

30

<400> 1

```
gatgctccct tcggcatcca ttaacctggc actcaccttg cgtatagcag gatctagccg 60
tgtgcccgct tcgcaggcaa ttgaagcaga gctgatgect cttcacattg ctccaccttt 120
cctgtggcga agctccaata aattttctgc agttcaatat ttcattgctgt cctccacaaa 180
tgggacaacc tccatgccga                                     200
```

35

<210> 2

<211> 31

<212> ADN

<213> ADN sintético

40

<400> 2

```
tgatgcctct tcacattgct ccacctttcc t 31
```

45

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> ADN sintético

50

<400> 3

```
ggatctagcc gtgtgcccgc t 21
```

55

<210> 4

<211> 24

<212> ADN

<213> ADN sintético

60

<400> 4

```
ggcatggagg ttgtcccatt tgtg 24
```

<210> 5

<211> 20

<212> ADN

ES 2 705 849 T3

	<213> ADN sintético	
	<400> 5	
5	atctagccgt gtgcccgctt	20
	<210> 6	
	<211> 25	
	<212> ADN	
10	<213> ADN sintético	
	<400> 6	
	ggttgtccca tttgtggagg acagc	25
	<210> 7	
15	<211> 3150	
	<212> ADN	
	<213> ADN sintético	
20	<400> 7	

ES 2 705 849 T3

tcggttgggaa	coggagctga	atgaagccat	accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	60
tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	120
ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	180
ggcccttcog	gctggctggg	ttattgctga	taaactctgga	gccggtgagc	gtggttctcg	240
cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	300
gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	360
actgattaag	cattggtaac	tgtcagaacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	420
aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	480
caaaatcoct	taacgtgagt	tttcgttoca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	540
aggatcttct	tgagatcctt	ttttctcgcg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaac	600
aocgctaoca	gcggtggttt	gtttgocgga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	660
aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgttctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	720
ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	gctctgctaa	tcctgttacc	780
agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	ttggactcaa	gcagatagtt	840
accggataag	gcgcagcggg	cgggctgaac	gggggggttcg	tgcacacagc	ccagcttggg	900
gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	ctatgagaaa	gcgccacgct	960
tcccgaaggg	agaaagggcg	acaggtatcc	ggtaagcggc	agggtcggaa	caggagagcg	1020
cacgagggag	cttcacaggg	gaaacgcctg	gtatctttat	agtcctgtcg	ggtttcgcca	1080
cctctgactt	gagcgtogat	ttttgtgatg	ctogtcaggg	ggcggagacc	tatggaaaaa	1140
cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttcct	ggccttttgc	tgcccttttg	ctcacatggt	1200
ctttcctgcg	ttatccctcg	attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	agtgagctga	1260
tacogctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcaggtca	gtgagcagag	aagcgyaaga	1320
gogoccaata	cgaaaaccgc	ctctccccgc	gcgttggccg	attcattaat	gcagctggca	1380
cgacaggttt	ccgcactgga	aagcgggcag	tgagcgcac	gcaattaatg	tgagttagct	1440
cactcattag	gcaccccagg	ctttacactt	tatgcttccg	gctcgtatgt	tgtgtggaat	1500
tgtgagcggg	taacaatttc	acacaggaaa	cagctatgac	catgattacg	ccaagcttgg	1560
atcctatctc	ctttcgaaaag	ttgagaccat	ggaattcact	ggccgtcgtt	ttacaacgct	1620
gtgactggga	aaaccctggc	gttaccacaac	ttaatcgctt	tgacgacat	cccccttctg	1680
ccagctggcg	taatagcgaa	gaggcccgcg	ccgatcgcgc	ttcccaacag	ttgcgcagcc	1740
tgaatggcga	atggcgctcg	atgcgggtatt	ttctccttac	gcactctgtc	ggtattttcac	1800
accgcatacg	tcaaagcaac	catagtaocg	gcctctgtag	ggcgcattaa	gcgcgggggg	1860
tgtggtgggt	acgcgcagcg	tgaccgctac	acttgccagc	gccctagcgc	ccgctccttt	1920
cgctttcttc	ccttctcttc	tgcgccaggt	cgccggcttt	cccctgcaag	ctctaaatcg	1980
ggggctcoct	ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	ctcgacccca	aaaaacttga	2040
tttgggtgat	ggttcaogta	gtgggcatc	gcctgatag	acggtttttc	gccctttgac	2100
ggtggagtcc	acgttcttta	atagtggact	cttgttccaa	actggaacaa	cactcaacc	2160
tatctcgggc	tattcttttg	atttataagg	gattttgccg	atttcggcct	attggttaa	2220
aatgagctg	atttaacaaa	aatttaacgc	gaattttaac	aaaatattaa	cgtttacaat	2280
tttatggtgc	actctcagta	caatctgctc	tgatgccgca	tagttaagcc	agccccgaca	2340
ccgcaccaaca	cccgtgacg	cgcctgacg	ggcttgtctg	ctcccggcat	ccgcttacag	2400
acaagctgtg	accgtcaacg	ggagctgcat	gtgtcagagg	ttttcaccgt	catcaccgaa	2460
acgcgcgacc	cgaaagggcc	tcgtgatacg	cctattttta	taggttaatg	tcattgataat	2520
aatggtttct	tagacgtcag	gtggcacttt	tcggggaaat	gtgcgcggaa	ccctattttg	2580
tttatttttc	taaatacatt	caaataatgta	tccgctcatg	agacaataac	cctgataaat	2640
gottcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	catttccgtg	tcgcocttat	2700
tocctttttt	gcggcatttt	gccttctctg	ttttgctcac	ccagaaaacgc	tggtgaaagt	2760
aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	atcgaaactgg	atctcaacag	2820
cggttaagtc	cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtttt	ccaatgatga	gcacttttaa	2880
agttctgcta	tgtggcggcg	tattatcccg	tattgacgcc	gggcaagagc	aactcggctc	2940
ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggt	tgagtactca	ccagtcacag	aaaagcatct	3000
tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	cagtgctgcc	ataaccatga	gtgataaac	3060
tgcggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	aggaccgaag	gagctaaccg	cttttttgca	3120
caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccttga				3150

<210> 8
 <211> 3350
 <212> ADN
 <213> ADN sintético

<400> 8

5

10

tcggtgggaa	cgggagctga	atgaagccat	accaaaccgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	60
tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	120
ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	180
ggcocttccg	gctggctggt	ttattgctga	taaatctgga	gocggtgagc	gtggttctcg	240
cggtatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgtatcgtag	ttatctacac	300
gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcoctc	360
actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	420
aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	480
caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	540
aggatcttct	tgagatcctt	ttttctcgg	cgtaatctgc	tgcttgcaaa	caaaaaacc	600
accgctacca	gcggtgggtt	gtttgcggga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	660
aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgttctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	720
ccaccacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	gctctgctaa	tcctgttacc	780
agtggctgct	gccagtggcg	ataagtcgtg	tcttaccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	840
accggataag	gcgcagcggg	cgggctgaac	ggggggttcg	tgcacacagc	ccagcttggg	900
gogaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	ctatgagaaa	gcgccacgct	960
tocogaaggg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggtaaagcgg	agggtcggaa	caggagagcg	1020
cacgagggag	cttccagggg	gaaacgcctg	gtatctttat	agtccctgctg	ggtttcgcca	1080
cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	gggoggagcc	tatggaaaaa	1140
cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttctt	ggccttttgc	tggccttttg	ctcacatggt	1200
ctttcctgcg	ttatccctg	attctgtgga	taaccgtatt	accgccttg	agtgagctga	1260
taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcagagca	gtgagcgagg	aagcgaaga	1320
gcccacaata	cgcaaaccgc	ctctccccgc	gcgttggccg	attcattaat	gcagctggca	1380
cgacaggttt	cccgactgga	aagcgggcag	tgagcgcaac	gcaattaatg	tgagttagct	1440
cactcattag	gcaccccagg	ctttacactt	tatgcttccg	gctcgtatgt	tgtgtggaat	1500
tgtgagcggg	taacaatttc	acacaggaaa	cagctatgac	catgattacg	ccaagcttgg	1560
atcctatctc	ctttcgatgc	tccttcggc	atccattaac	ctggcactca	ccttgcgat	1620
agcaggatct	agccgtgtgc	cgccttcgca	ggcaattgaa	gcagagctga	tgccctctca	1680
cattgctoca	cctttcctgt	ggcgaagctc	caataaattt	tctgcagttc	aatatttcat	1740
gctgtcctcc	acaaatggga	caacctccat	gocgagaaa	ttgagaccat	ggaattcact	1800
ggcogtctgt	ttacaacgtc	gtgactggga	aaacctggc	gttacccaac	ttaatcgctt	1860
tgcagcacat	ccccctttcg	ccagctggcg	taatagcga	gaggcccgca	ccgatcgccc	1920
ttcccaacag	ttgcgagcc	tgaatggcga	atggcgctg	atgoggtatt	ttctccttac	1980
ggatctgtgc	ggtatttcac	accgcatacg	tcaaagcaac	catagtacgc	gccctgtagc	2040
gcgcgattaa	gcgcggcggg	tgtggtgggt	accgcagcgc	tgaccgctac	acttgccagc	2100
gcctagcgc	cgcctccttt	cgctttcttc	ccttcctttc	tcgccacggt	cgccggcttt	2160
ccccgtcaag	ctctaaatcg	ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	2220
ctcgacccca	aaaaacttga	tttgggtgat	ggttcacgta	gtgggccatc	gccctgatag	2280
acggtttttc	gccctttgac	gttggagtcc	acgttcttta	atagtggact	cttgttccaa	2340
actggaacaa	cactcaacc	tatctcgggc	tattcttttg	atttataagg	gattttgccc	2400
atctcgccct	attgggttaa	aaatgagctg	atttaacaaa	aatttaacgc	gaattttaac	2460
aaaatattaa	cgtttacaat	tttatggtgc	actctcagta	caatctgctc	tgatgcgcga	2520
tagttaagcc	agccccgaca	cccgccaaaca	cccgtgacg	cgccctgacg	ggcttgtctg	2580
ctccggcct	ccgcttacag	acaagctgtg	accgtcaacg	ggagctgcat	gtgtcagagg	2640
ttttcacogt	catcacogaa	acggcgagcc	cgaaagggcc	togtgatacg	cctattttta	2700
taggttaatg	tcatgataat	aatggtttct	tagacgtcag	gtggcacttt	tcggggaaat	2760
gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	caaataatgta	tcgctcatg	2820
agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	2880
catttcogtg	tcgcccttat	tcctttttt	gcggcatttt	gccttcctgt	ttttgctcac	2940
ccagaaacgc	tggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	3000
atogaactgg	atctcaacag	cggtaaagatc	cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtttt	3060
ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcgcgg	tattatcccg	tattgacgcc	3120
gggcaagagc	aactcggctg	cgcatacac	tattctcaga	atgacttggg	tgagtactca	3180
ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	cagtgtctgc	3240
ataaccatga	gtgataaac	tgcggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	aggaccgaag	3300
gagctaaccg	cttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccttga		3350

- 5 <210> 9
- <211> 149
- <212> ADN
- <213> *Drosophila melanogaster*

ES 2 705 849 T3

<400> 9

```

ggatctagcc gtgtgcccgc ttcgcaggca attgaagcag agcctgatgcc tcttcacatt 60
gctccacctt tctgtggcg aagctccaat aaatctctg cagttcaata tttcatgctg 120
tcctccacaa atgggacaac ctccatgcc 149

```

5 <210> 10
 <211> 149
 <212> ADN
 <213> *Drosophila melanogaster*

10 <400> 10

```

ggatctagcc gtgtgcccgc ttcgcaggca attgaagcag agcctgatgcc tcttcacatt 60
gctccacctt tctgtggcg aagctccaat aaatctctg cagttcaata tttcatgctg 120
tcctccacaa atgggacaac ctccatgcc 149

```

15 <210> 11
 <211> 149
 <212> ADN
 <213> *Drosophila melanogaster*

20 <400> 11

```

ggatctagcc gtgtgcccgc ttcgcaggca attgaagcag agcctgatgcc tcttcacatt 60
gctccacctt tctgtggcg aagctccaat aaatctctg cagttcaata tttcatgctg 120
tcctccacag atgggacaac ctccatgcc 149

```

25 <210> 12
 <211> 149
 <212> ADN
 <213> *Drosophila melanogaster*

30 <400> 12

```

ggatctagcc gtgtgcccgc ttcgcaggca attgaagcag agcctgatgcc tcttcacatt 60
gctccacctt tctgtggcg aagctccaat aaatctctg cagttcaata tttcatgctg 120
tcctccacag atgggacaac ctccatgcc 149

```

35 <210> 13
 <211> 149
 <212> ADN
 <213> *Drosophila melanogaster*

40 <400> 13

```

ggatctagcc gtgtgcccgc ttcgcaggca attgaagcag agcctgatgcc tcttcacatt 60
gctccacctt tctgtggcg aagctccaat aaatctctg cagttcaata tttcatgctg 120
tcctccacag atgggacaac ctccatgcc 149

```

45 <210> 14
 <211> 200
 <212> ADN
 <213> *Drosophila melanogaster*

50 <400> 14

```

gatgctccct tcggcatcca ttaacctggc actcaccttg cgtatagcag gatctagccg 60
tgtgcccget tcgcaggcaa ttgaagcaga gccgatgctt cttcacattg ctccaccttt 120
cctgtggcga agctccaata aatctctg agttcaatat tttcatgctg cctccacaaa 180
tgggacaacc tccatgccga 200

```

50 <210> 15
 <211> 3350

ES 2 705 849 T3

<212> ADN
<213> ADN sintético

<400> 15

5

togttgggaa	coggagctga	atgaagccat	accaaacgac	gagcgtgaca	ccacgatgcc	60
tgtagcaatg	gcaacaacgt	tgcgcaaact	attaactggc	gaactactta	ctctagcttc	120
ccggcaacaa	ttaatagact	ggatggaggc	ggataaagtt	gcaggaccac	ttctgcgctc	180
ggcccttccg	gctggctggt	ttattgctga	taaactctga	gccggtgagc	gtggttctcg	240
cggatcatt	gcagcactgg	ggccagatgg	taagccctcc	cgatcgtag	ttatctacac	300
gacggggagt	caggcaacta	tggatgaacg	aaatagacag	atcgctgaga	taggtgcctc	360
actgattaag	cattggtaac	tgtcagacca	agtttactca	tatatacttt	agattgattt	420
aaaacttcat	ttttaattta	aaaggatcta	ggtgaagatc	ctttttgata	atctcatgac	480
caaaatccct	taacgtgagt	tttcgttcca	ctgagcgtca	gaccccgtag	aaaagatcaa	540
aggatcttct	tgagatcctt	ttttctgcg	cgtaactctgc	tgcttgcaaa	caaaaaaacc	600
accgctacca	gcggtggttt	gtttgccgga	tcaagagcta	ccaactcttt	ttccgaaggt	660
aactggcttc	agcagagcgc	agataccaaa	tactgttctt	ctagtgtagc	cgtagttagg	720
ccaccaacttc	aagaactctg	tagcaccgcc	tacatacctc	gctctgctaa	tccgttacc	780
agtggctgct	gccagtggcg	ataagtctgt	tcttaccggg	ttggactcaa	gacgatagtt	840
accggataag	gcgcagcggg	cgggctgaac	ggggggttcg	tgcacacagc	ccagcttga	900
gcgaacgacc	tacaccgaac	tgagatacct	acagcgtgag	ctatgagaaa	gcgccacgct	960
tcccgaaggg	agaaaggcgg	acaggtatcc	ggtaaagcgg	agggtcgga	caggagagcg	1020
cacgagggag	cttccagggg	gaaacgcctg	gatatcttat	agtccctgctg	ggttctgcca	1080
cctctgactt	gagcgtcgat	ttttgtgatg	ctcgtcaggg	ggcgggagcc	tatggaaaaa	1140
cgccagcaac	gcggcctttt	tacggttctt	ggccttttgc	tggccttttg	ctcacatggt	1200
ctttcctgcg	ttatccctg	attctgtgga	taaccgtatt	accgcctttg	agtgagctga	1260
taccgctcgc	cgcagccgaa	cgaccgagcg	cagcagtgca	gtgagcggg	aagcgggaaga	1320
gcgccaata	cgcaaacccg	ctctccccgc	gcgttggcgg	atcattaat	gcagctggca	1380
cgacaggttt	cccgactgga	aagcgggcaag	tgagcgcgaac	gcaattaatg	tgagttagct	1440
cactcattag	gcaccccagg	ctttacactt	tatgcttccg	gctcgtatgt	tgtgtggaat	1500
tgtgagcggg	taacaatttc	acacaggaaa	cagctatgac	catgattacg	ccaagcttgg	1560
atcctatctc	ctttcgatgc	tcccttcggc	atccattaac	ctggcactca	ccttgcgcat	1620
agcagatct	agccgtgtgc	ccgcttcgca	ggcaattgaa	gcagagccga	gcctcttca	1680
cattgtcca	cctttcctgt	ggcgaagctc	caataaattt	tctgcagttc	aattttcat	1740
gctgtcctcc	acaaatggga	caacctccat	gccgagaaaag	ttgagaccat	ggaattcact	1800
ggccgtcgtt	ttacaacgtc	gtgactggga	aaacctggc	gttaccacaac	ttaatcgctt	1860
tgcagcacat	ccccctttcg	ccagctggcg	taatagcga	gaggccccga	ccgatcgccc	1920
ttcccaacag	ttgcgcagcc	tgaatggcga	atggcgcctg	atgcggtatt	ttctccttac	1980
gcactctgtc	ggtatttcac	accgcatacg	tcaaagcaac	catagtacgc	gccctgtagc	2040
ggcgcattaa	gcgcggcggg	tgtggtggtt	acgcgcagcg	tgaccgctac	acttgccagc	2100
gccctagcgc	ccgctccttt	cgctttcttc	ccttcctttc	tgcaccgctt	cgccggcttt	2160
ccccgtcaag	ctctaaatcg	ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	2220
ctcgacccca	aaaaacttga	tttgggtgat	ggttcacgta	gtgggccatc	gcctgatag	2280
acggtttttc	gccctttgac	gttggagtcc	acgttcttta	atagtggact	cttgttccaa	2340
actggaacaa	cactcaacc	tatctcgggc	tattcttttg	atttataagc	gattttgccg	2400
atctcggcct	attgggttaa	aaatgagctg	atttaacaaa	aatttaacgc	gaattttaac	2460
aaaatattaa	cgtttacaat	tttatggtgc	actctcagta	caatctgctc	tgatgccgca	2520
tagttaagcc	agccccgaca	cccgccaaaca	cccgtgacg	cgccctgacg	ggcttgtctg	2580
ctccccgcat	ccgcttacag	acaagctgtg	accgtcaacg	ggagctgcat	gtgtcagagg	2640
ttttcaccgt	catcaccgaa	acgcgcgacc	cgaaagggcc	tcgtgatacg	cctattttta	2700
taggttaatg	tcatgataat	aatggtttct	tagacgtcag	gtggcacttt	tcggggaaat	2760
gtgcgcggaa	cccctatttg	tttatttttc	taaatacatt	caaatatgta	tccgctcatg	2820
agacaataac	cctgataaat	gcttcaataa	tattgaaaaa	ggaagagtat	gagtattcaa	2880
catttccggtg	tgcgccctat	tccctttttt	gcggcatttt	gccttctctg	ttttgctcac	2940
ccagaaacgc	tgggtgaaagt	aaaagatgct	gaagatcagt	tgggtgcacg	agtgggttac	3000
atcgaactgg	atctcaacag	cggtaagatc	cttgagagtt	ttcgccccga	agaacgtttt	3060
ccaatgatga	gcacttttaa	agttctgcta	tgtggcggcg	tattatcccg	tattgacgcc	3120
gggcaagagc	aactcggctg	ccgcatacac	tattctcaga	atgacttggg	tgagtactca	3180
ccagtcacag	aaaagcatct	tacggatggc	atgacagtaa	gagaattatg	cagtgtctgc	3240
ataaccatga	gtgataaac	tgcggccaac	ttacttctga	caacgatcgg	aggaccgaag	3300
gagctaaccg	cttttttgca	caacatgggg	gatcatgtaa	ctcgccttga		3350

<210> 16
<211> 32
<212> ADN
<213> ADN sintético

5

<400> 16
ttgatgctc ttcacattgc tccaccttc ct

32

REIVINDICACIONES

1. Un kit que comprende:
- 5 un ácido nucleico de molde aislado para la amplificación de ácidos nucleicos que comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 99 % con la SEQ ID NO: 1 o el complemento inverso de la misma; un primer cebador que comprende la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 5; y un segundo cebador que comprende la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 6.
- 10 2. El kit de la reivindicación 1, en el que:
- (a) el ácido nucleico de molde aislado comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o el complemento inverso de la misma; o
- 15 (b) el ácido nucleico de molde aislado comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8 o el complemento inverso de la misma.
3. El kit de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una sonda oligonucleotídica que comprende una secuencia que tiene una identidad de al menos el 95 % con la SEQ ID NO: 2 o el complemento inverso de la misma.
- 20 4. El kit de la reivindicación 1, en el que el primer cebador comprende la SEQ ID NO: 3, y el segundo cebador comprende la SEQ ID NO: 4, o en el que el primer cebador comprende la SEQ ID NO: 5, y el segundo cebador comprende la SEQ ID NO: 6.
- 25 5. El kit de la reivindicación 3, en el que la sonda oligonucleotídica comprende la SEQ ID NO: 2 o el complemento inverso de la misma.
6. Un método para la cuantificación de la cantidad de un ácido nucleico en una muestra, método que comprende:
- 30 proporcionar una cantidad de un polinucleótido que comprende una secuencia idéntica en al menos el 99 % a la secuencia de la SEQ ID NO: 1; poner en contacto el polinucleótido con un cebador directo y un cebador inverso, en el que el cebador directo comprende al menos una de las SEQ ID NOs: 3 y 5, y en el que el cebador inverso comprende al menos una de las SEQ ID NOs: 4 y 6, y en el que el contacto se produce en unas condiciones convencionales de PCR; la extensión del cebador directo y del cebador inverso, produciendo así al menos un amplicón objetivo; y
- 35 detectar una señal proporcional a la cantidad del al menos un amplicón objetivo.
7. El método de la reivindicación 6, en el que la detección de una señal proporcional a la cantidad de amplicón proporcionado comprende poner en contacto el amplicón con una sonda oligonucleotídica monocatenaria que comprende una fracción detectable, en el que la sonda se aparea con el amplicón a una temperatura de al menos
- 40 50 °C en unas condiciones convencionales de PCR, y la detección de una señal emitida por la sonda después de que se haya apareado con el amplicón.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la sonda oligonucleotídica monocatenaria comprende una secuencia idéntica en al menos el 95 % a la SEQ ID NO: 2, o el complemento inverso de la misma.
- 45 9. El método de la reivindicación 7 u 8, en el que la sonda oligonucleotídica monocatenaria comprende adicionalmente al menos un fluoróforo, y al menos un inactivador.
10. El método de la reivindicación 6, en el que la cantidad del polinucleótido se pone en contacto con los cebadores
- 50 directo e inverso en una muestra antes de la extracción del ácido nucleico de la muestra.
11. El método de la reivindicación 6, en el que la extensión del cebador directo y del cebador inverso comprende al menos una de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), una amplificación isotérmica mediada por un bucle (LAMP), una reacción en cadena de la ligasa (LCR), una
- 55 inmunoamplificación, una amplificación mediada por la transcripción (TMA), una amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), una replicación de la secuencia autosostenida (3SR) y una amplificación en círculos rodantes.
12. Uso de un par de cebadores para la amplificación de un amplicón de una secuencia que tiene una identidad de
- 60 al menos el 99 % con la SEQ ID NO: 1, que comprende:
- un primer cebador oligonucleotídico que tiene una longitud de entre 21 y 45 nucleótidos y que comprende la SEQ ID NO: 3; y un segundo cebador oligonucleotídico que tiene una longitud de entre 24 y 45 nucleótidos y que
- 65 comprende la SEQ ID NO: 4; o un primer cebador oligonucleotídico que tiene una longitud de entre 20 y 45 nucleótidos y que comprende la SEQ ID NO: 5; y un segundo cebador oligonucleotídico que tiene una longitud de entre 25 y 45 nucleótidos y que

comprende la SEQ ID NO: 6.

13. El uso según la reivindicación 12, en el que el primer cebador oligonucleotídico comprende la SEQ ID NO: 3 y el segundo cebador oligonucleotídico comprende la SEQ ID NO: 4.

5 14. El uso según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, uso que comprende adicionalmente una sonda oligonucleotídica que tiene una longitud de entre 31 y 45 nucleótidos y que comprende una secuencia idéntica en al menos el 95 % a la SEQ ID NO: 2, y que comprende adicionalmente un par fluoróforo-inactivador.

10 15. El uso según de la reivindicación 14, en el que la sonda oligonucleotídica comprende la SEQ ID NO: 2.

Figura 1

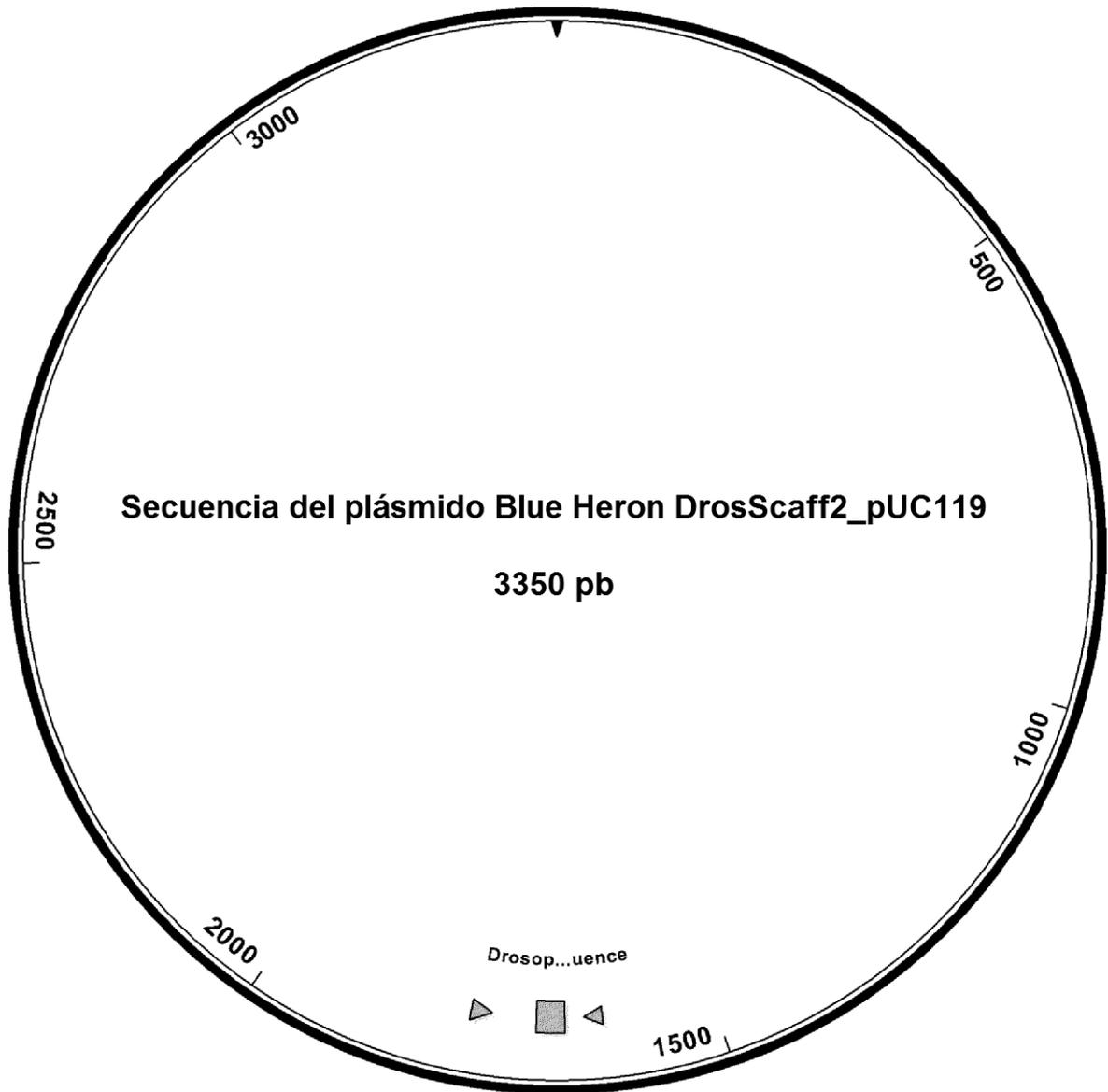


Figura 2A

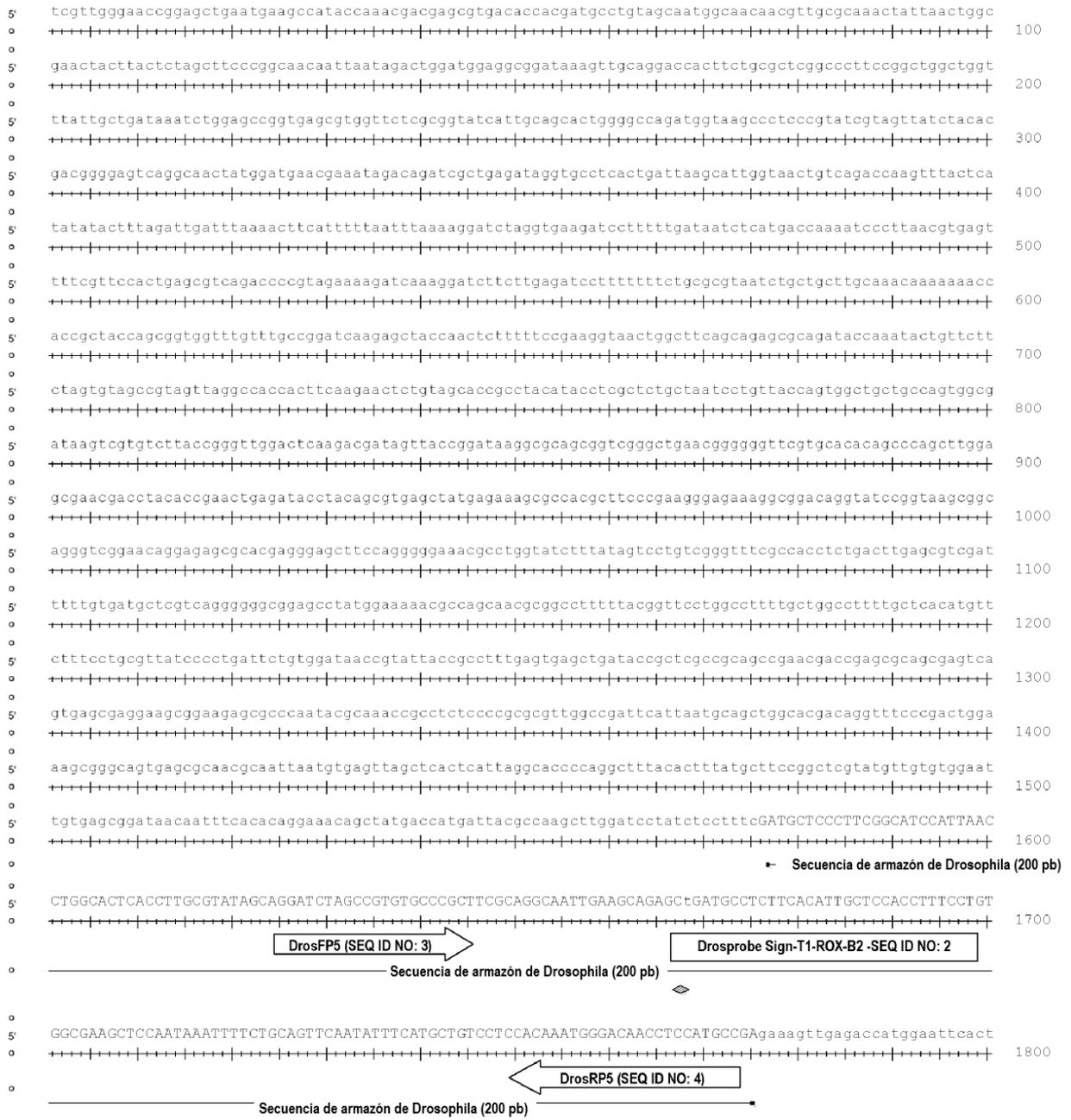


Figura 2B

```

o
5:  ggccgtcgttttacaacgtcgtgactgggaaaaccctggcgttaccacaacttaatgcocctgcagcacatccccctttcgcagctggcgtaatagcgaa 1900
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  gaggccgcgaccgatcgcccttcccaacagttgocgagcctgaatggcgaatggcgcctgatgoggtatttctccttacgcacatcgtgoggtatttcac 2000
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  accgcatacgtcaaagcaaccatagtagcgcocctgtagcggcgcaatgaagcggcggggtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttgccagc 2100
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  gcocctagcgcocctcctttcgtcttcttcccttcccttctcogcaagttcgcogcctttccocctcaagctcctaaatcggggctccctttagggttcc 2200
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  gatttagtgctttacggcacctcogacccccaaaaaacttgatttgggtgatggttcacgtagtgggccatcgcocctgatagacgggttttcgccccttgac 2300
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  gttggagtcacgcttctttaatagtggaactctgttccaaaactggaacacactcaaccctatctcgggctattcttttgatttataagggttttgccg 2400
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  attcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaattaacgcgaatttcaacaaaataaacgtttacaattttatggtgcaactctcagta 2500
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  caatctgctctgatgcccgcataagtaagccagccccgacaccccgcaacacccgctgacgcgcocctgacgggcttctctgctcccgccatccgcttacg 2600
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  acaagctgtgacogtcaacgggagctgcatgtgtcagaggtttcacogtcatcacgaaaacgcgcgacccgaaaaggcctcgtgatacgcctattttta 2700
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  taggttaatgcatgataataaatggtttcttagacgtcaggtggcaactttcggggaatgtgogggaaaccocctatttggttattttctaaatacatt 2800
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  caaataatgatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaaggaagatgagatattcaacatttcogtctcgcoccttat 2900
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  tccctttttgcggcattttgccttctgtttttgctcaccocgaaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtggttac 3000
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  atcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcgcocccaagaacgtttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcgg 3100
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  tattatoccgatattgacgcgggcaagagcaactcggtcgcgcatacactattctcagaatgacttggttgagtactcaccagtcacagaaaagcatct 3200
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  tacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgccataaccatgagtgataaactcgcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaa 3300
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o
5:  gagctaaccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttga  SEQ ID NO: 8
o  +-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
o

```

Figura 3A

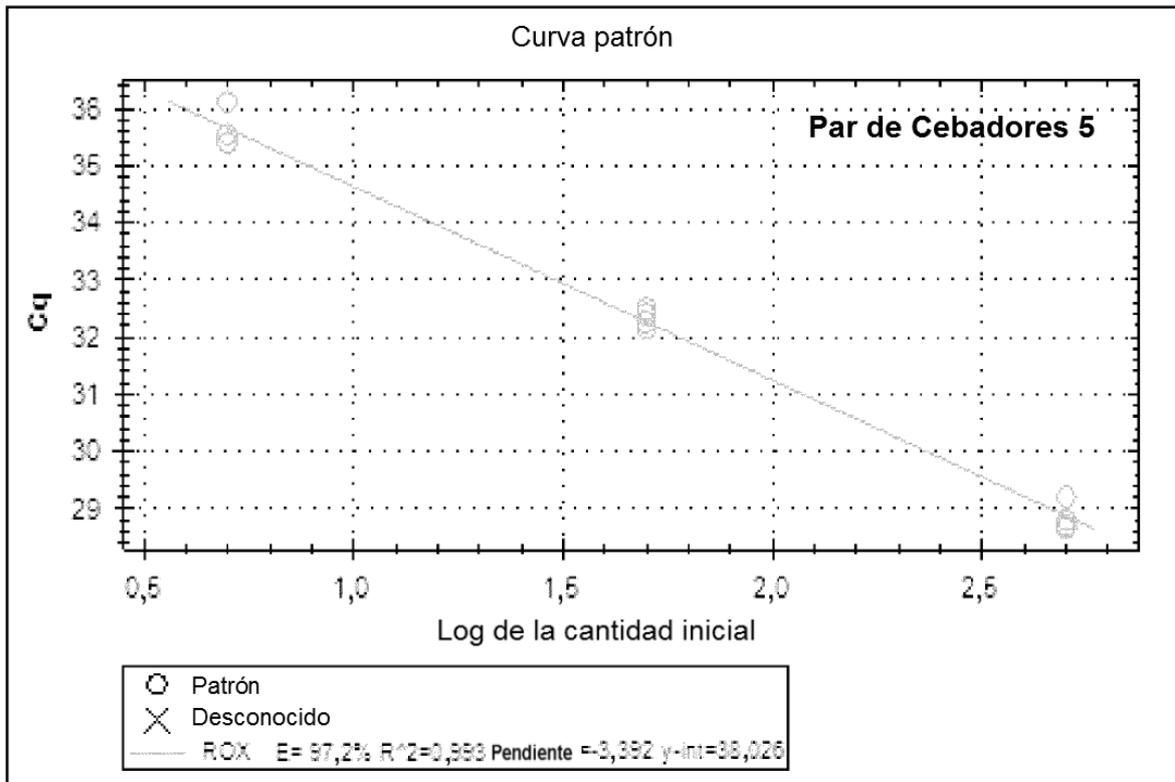
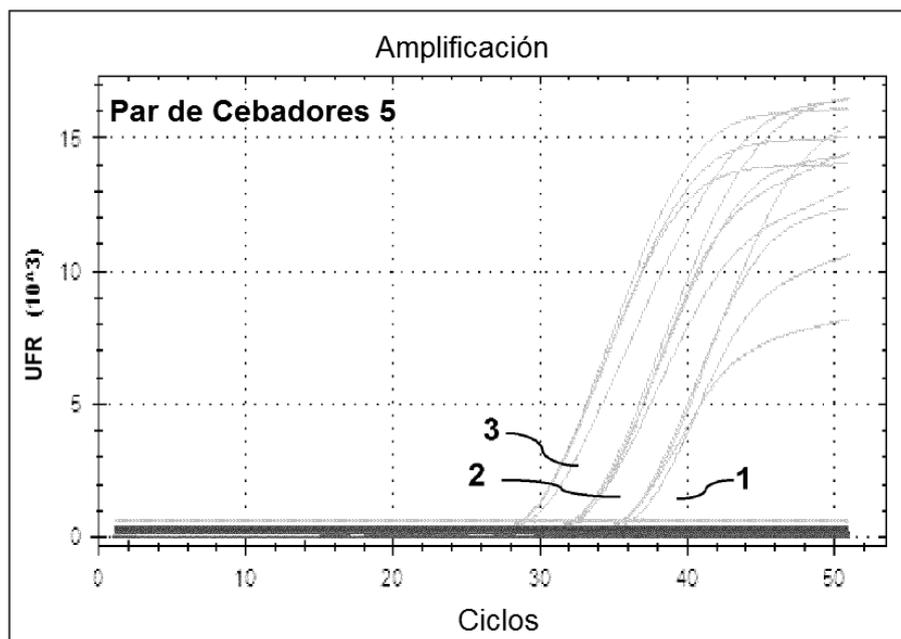


Figura 3B



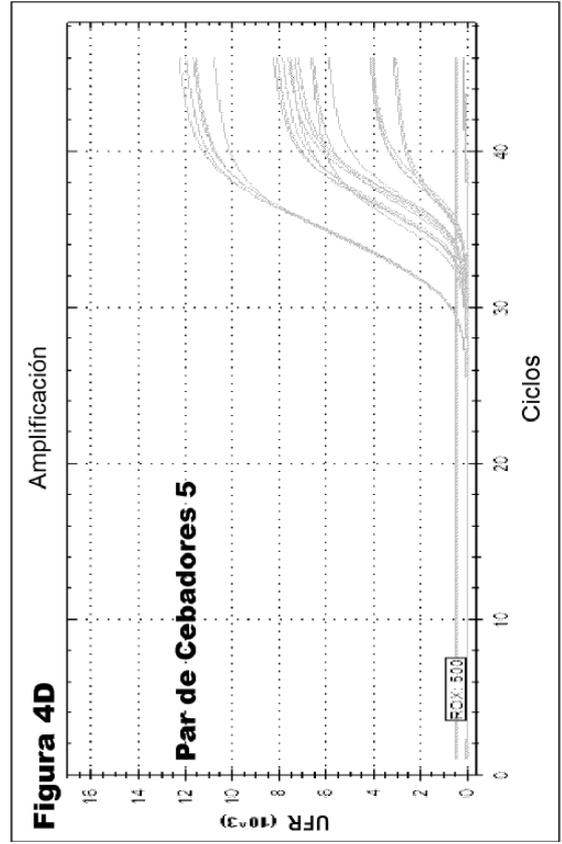
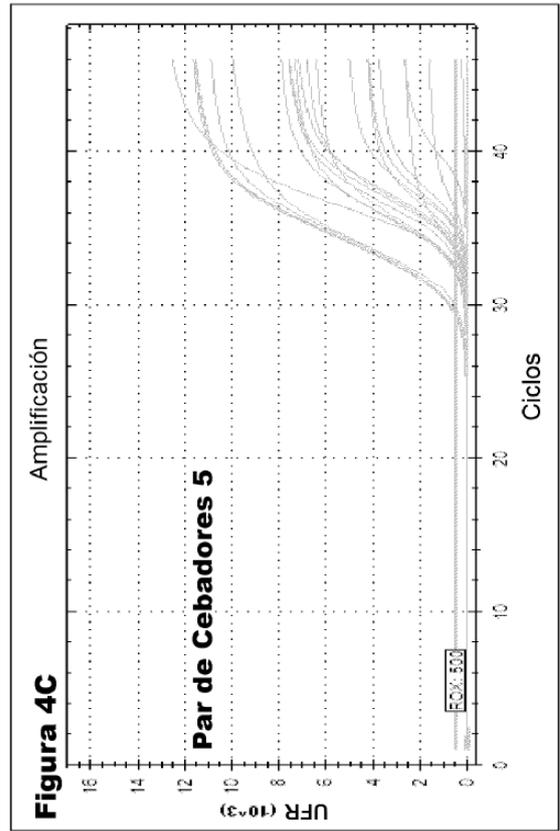
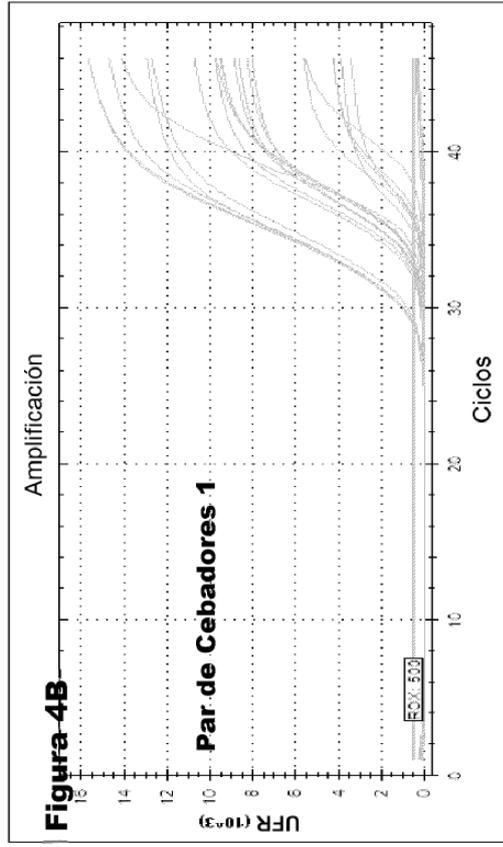
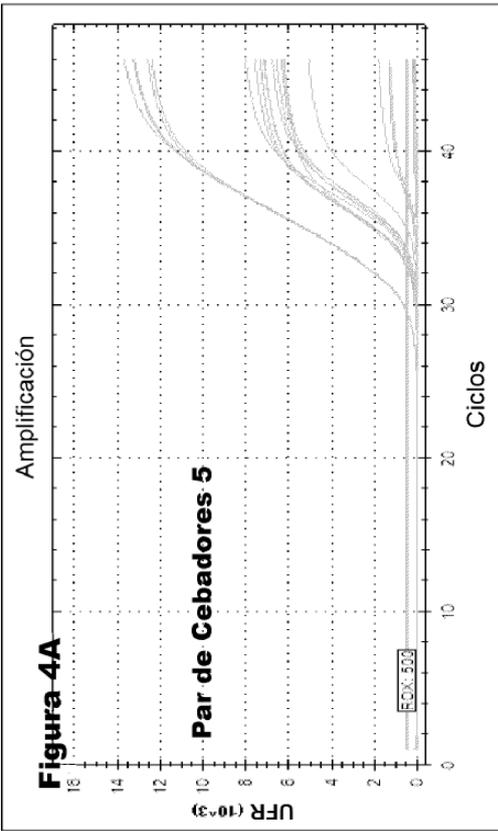


Figura 5

% de eficacia = 90,6 % Pendiente: -3,56 R²: 0,994
 Umbral 500 - Instrumento Strataqene

		Plásmido DrosScaff1 - Conjunto 1.1 (Par de Cebadores 1)						
Copias/rxn		5,0E+05	5,0E+04	5,0E+03	5,0E+02	5,0E+01	5,0E+00	NTC
		21,39	25,27	27,65	31,52	34,95	U	U
		21,39	24,17	27,81	32,18	35,26	39,47	U
	Inst 4	21,46	23,6	27,44	31,98	35,38	38,43	U
		21,05	23,97	28,2	31,23	35,45	U	U
	Valor medio del Ct	21,32	24,25	27,78	31,73	35,26	38,95	
	Desviación típica	0,18	0,72	0,32	0,43	0,22	0,74	
	CV	0,87%	2,96%	1,16%	1,36%	0,63%	1,89%	

% de eficacia = 90,6 % Pendiente: -3,56 R²: 0,993
 Umbral 500 - Instrumento Strataqene

		Plásmido DrosScaff1 - Conjunto 5 (Par de Cebadores 5)						
Copias/rxn		5,0E+05	5,0E+04	5,0E+03	5,0E+02	5,0E+01	5,0E+00	NTC
		19,75	22,65	27,19	30,12	34,13	U	U
		19,6	22,62	26,11	29,72	34,54	U	37,00
	Inst 4	19,53	22,95	26,52	30,46	34,35	U	U
		19,72	22,69	26,69	29,86	33,99	36,07	U
	Valor medio del Ct	19,65	22,73	26,63	30,04	34,25	36,07	
	Desviación típica	0,10	0,15	0,45	0,33	0,24		
	CV	0,52%	0,66%	1,68%	1,08%	0,71%		