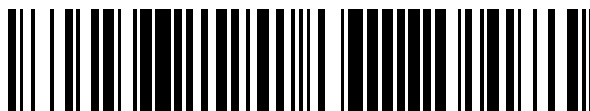


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 637**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6844 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2014 PCT/US2014/030036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145298**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2014 E 14762742 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2970960**

54 Título: **Amplificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361802241 P

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

05.11.2019

73 Titular/es:

**THERANOS IP COMPANY, LLC (100.0%)
7333 Gateway Boulevard
Newark, CA 94560, US**

72 Inventor/es:

**BELHOCINE, KAMILA;
LEE, JOSEPHINE;
PATEL, PRANAV;
RICHARDSON, AARON y
TABAKMAN, SCOTT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 729 637 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

Amplificación de ácidos nucleicos

Antecedentes

5 Hay una necesidad creciente de métodos y reactantes para la amplificación de ácidos nucleicos. La generación de muchas copias de un ácido nucleico concreto es a menudo necesaria o útil para la utilización del ácido nucleico en una aplicación dada. Por ejemplo, para analizar la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de interés, con frecuencia, el ácido nucleico se replica para incrementar su número de copias antes de analizar la secuencia. En otro ejemplo, para determinar la presencia o la ausencia de un ácido nucleico concreto en una muestra, se puede tratar una muestra en las condiciones que hacen que, si el ácido nucleico concreto está presente en la muestra, se pueda amplificar. En otro ejemplo, un ácido nucleico para ser usado como sonda se puede copiar repetidamente para que se genere un gran número de ácidos nucleicos que contienen la misma secuencia que la plantilla de ácido nucleico original, con lo que se generan muchas copias del ácido nucleico que se pueden utilizar como sonda.

15 Se conocen muchos métodos para la amplificación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 4 683 202) es un método popular para la amplificación de ácidos nucleicos. Para realizar con éxito una PCR, la reacción se debe realizar a varias temperaturas diferentes, que se repiten durante varios ciclos. Esto requiere que los equipos u otros mecanismos cambien repetidamente la temperatura de la PCR. Otro método para la amplificación de ácidos nucleicos hace referencia a la amplificación isotérmica mediada por bucles (LAMP, por su nombre en inglés) (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 6 410 278). Las reacciones de LAMP se pueden realizar de manera isotérmica, pero típicamente implican el uso de cuatro cebadores diferentes que reconocen un total de seis secuencias diferentes sobre el ácido nucleico deseado. En la solicitud de patente internacional WO 2004/070053 se describe un método de amplificación de ADNc, en donde el ADNc se liga para formar concatémeros que a continuación se amplifican mediante la amplificación por desplazamiento de hebra.

25 Para facilitar la generación de ácidos nucleicos amplificados para el gran, y cada vez mayor, número de aplicaciones que utilizan ácidos nucleicos amplificados, se desean nuevos métodos y reactantes para la amplificación de ácidos nucleicos.

Compendio

La invención está definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

30 Se dan a conocer en la presente memoria métodos y composiciones que se refieren a la amplificación de ácidos nucleicos y a la generación de concatémeros.

35 En algunas realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario, que comprende (A) preparar una mezcla de reacción que comprende: (i) un ácido nucleico bicatenario que comprende al menos una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, en donde el ácido nucleico bicatenario comprende una primera hebra y una segunda hebra, (ii) una polimerasa de ácido nucleico aislada, (iii) una ligasa de ácido nucleico aislada, (iv) un primer cebador, en donde el primer cebador es complementario a la primera hebra de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, (v) un segundo cebador, en donde el segundo cebador es complementario a la segunda hebra de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, y (B) incubar la mezcla de reacción a una temperatura de no más de 70 °C durante al menos 5 min, en donde se genera una gran cantidad de concatémeros que comprenden al menos dos copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, y la plantilla de ácido nucleico bicatenario se amplifica al menos 100 veces en menos de 60 minutos desde inicio del método.

45 En algunas realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario, en donde se prepara una mezcla de reacción de tal manera que un ácido nucleico bicatenario que comprende dos o más copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario se puede someter a un procedimiento de replicación basada en cebadores, un procedimiento de replicación basada en hebras entrecruzadas, o un procedimiento de ligación de extremo con extremo. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción se prepara y se incuba de tal manera que los tres procedimientos se producen simultáneamente en la mezcla de reacción.

50 En algunas realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario, en donde una mezcla de reacción se prepara de tal manera que un ácido nucleico bicatenario que comprende una única copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario se puede someter de manera optativa a cualquiera o ambos de un procedimiento de replicación basada en cebadores o un procedimiento de ligación de extremo con extremo. En algunas realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario, en donde se prepara una mezcla de reacción de tal manera que un ácido nucleico bicatenario que comprende dos o más copias de la plantilla

de ácido nucleico bicatenario puede de manera optativa someterse a cualquiera de uno, dos o tres entre un procedimiento de replicación basada en cebadores, un procedimiento de replicación basada en hebras entrecruzadas, o un procedimiento de ligación de extremo con extremo. En algunas realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario, en donde se prepara una mezcla de reacción de tal manera que un ácido nucleico bicatenario que comprende una única copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario puede someterse de manera optativa a cualquiera de uno o ambos entre un procedimiento de replicación basada en cebadores o un procedimiento de ligación de extremo con extremo, y de tal manera que un ácido nucleico bicatenario que comprende dos o más copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario puede de manera optativa someterse a cualquiera de uno, dos o tres entre un procedimiento de replicación basada en cebadores, un procedimiento de replicación basada en hebras entrecruzadas o un procedimiento de ligación de extremo con extremo.

En las realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un método para replicar una plantilla de ácido nucleico bicatenario, en donde el método comprende incubar en una mezcla de reacción un primer cebador, una ADN polimerasa, una ligasa de ácido nucleico, una primera copia, segunda copia y tercera copia de un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla, y una primera copia y una segunda copia de un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla durante al menos 5 min a una temperatura de no más de 80 °C, en donde: la ADN polimerasa tiene actividad de desplazamiento de hebra, la ligasa de ácido nucleico tiene actividad sobre los extremos romos de ácidos nucleicos bicatenarios, cada copia de los ácidos nucleicos bicatenarios lineales monoplantilla contiene una única copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, cada copia del ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla y del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla comprende: i) una primera hebra y una segunda hebra, en donde cada hebra comprende un extremo 5' y un extremo 3', y ii) un primer extremo y un segundo extremo, en donde el primer extremo comprende el extremo 5' de la primera hebra y el extremo 3' de la segunda hebra, y el segundo extremo comprende el extremo 5' de la segunda hebra y el extremo 3' de la primera hebra, y durante la incubación de la mezcla de reacción, i) el primer cebador se hibrida con la primera hebra de la primera copia del ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla y sirve de cebador para la generación de un producto de extensión del primer cebador, en donde el producto de extensión del primer cebador es complementario a la primera hebra del ácido nucleico bicatenario; ii) el segundo extremo de la segunda copia del ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla se liga con el primer extremo de la tercera copia del ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla; y iii) se forma una estructura entrecruzada que comprende la segunda hebra de la primera copia del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla hibridado con la primera hebra de la segunda copia del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla, en donde el extremo 3' de la segunda hebra de la primera copia del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla sirve de cebador para la generación de un segunda hebra nueva de concatémeros, y en donde el extremo 3' de la primera hebra de la segunda copia del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla sirve de cebador para la generación de una primera hebra nueva de concatémeros.

En unas realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario, en donde el método comprende la incubación de un ácido nucleico bicatenario que comprende la plantilla de ácido nucleico bicatenario en una mezcla de reacción, en donde la mezcla de reacción comprende una polimerasa de ácido nucleico aislada que tiene actividad de desplazamiento de hebra, una ligasa de ácido nucleico aislada, un primer cebador y un segundo cebador, en donde: la plantilla de ácido nucleico bicatenario comprende una primera hebra y una segunda hebra; el primer cebador es complementario a la primera hebra de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, en donde el segundo cebador es complementario a la segunda hebra de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, la mezcla de reacción se mantiene a una temperatura no mayor de 70 °C durante la incubación, y tras la incubación del ácido nucleico bicatenario que comprende la plantilla de ácido nucleico bicatenario en una mezcla de reacción, se generan muchos concatémeros que comprenden al menos dos copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, y la plantilla de ácido nucleico bicatenario se amplifica al menos 100 veces en menos de 60 min desde que se inició el método.

En las realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un recipiente que comprende en comunicación fluidica dentro de él: un primer cebador, un segundo cebador, una ADN polimerasa, una ligasa de ácido nucleico y una serie de concatémeros, en donde: la ADN polimerasa tiene actividad de desplazamiento de hebra, la ligasa de ácido nucleico tiene actividad sobre los extremos romos de los ácidos nucleicos bicatenarios, el primer cebador es complementario a una primera porción de una plantilla polinucleotídica, el segundo cebador es complementario a una secuencia de nucleótidos compañera, en donde la secuencia de nucleótidos compañera es complementaria a una segunda porción de la plantilla polinucleotídica, los concatémeros son moléculas bicatenarias, en donde cada uno comprende al menos dos copias de una plantilla de ácido nucleico bicatenario, y los muchos concatémeros comprenden un primer concatémero, segundo concatémero y tercer concatémero, y cada uno de los primer concatémero, segundo concatémero y tercer concatémero comprende al menos 5 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario.

En las realizaciones, en un método, la mezcla de reacción, el recipiente o el kit dado a conocer en la presente memoria que implica una serie de concatémeros, la serie de los cuales comprenden un primer concatémero, segundo concatémero y tercer concatémero. En las realizaciones, cada uno de los primer concatémero,

segundo concatémero y tercer concatémero comprenden cada uno al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 50 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario.

5 En las realizaciones, en un concatémero que comprende al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 50 copias de una plantilla de ácido nucleico bicatenario, cada una de las al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 50 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario está conectada directamente en el concatémero en serie.

10 En algunas realizaciones, en los métodos dados a conocer en la presente memoria que implican la amplificación de plantillas de ácido nucleico o la generación de concatémeros, se generan multitud de concatémeros que comprenden al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 50, 100, 500 o 1000 copias de una plantilla de ácido nucleico. En algunas realizaciones, en las composiciones o en los métodos dados a conocer en la presente memoria que implican una serie de concatémeros, la serie de concatémeros puede comprender un primer concatémero, segundo concatémero y tercer concatémero. En las realizaciones, cada uno de los primer concatémero, segundo concatémero y tercer concatémero puede contener al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 50, 100, 500 o 1000 copias de una plantilla de ácido nucleico.

15 En las realizaciones, una mezcla de reacción, recipiente o kit dado a conocer en la presente memoria comprende una transcriptasa inversa.

En las realizaciones, en un método, la mezcla de reacción, el recipiente o el kit dado a conocer en la presente memoria que implica una plantilla de ácido nucleico bicatenario, el ácido nucleico bicatenario se genera a partir de una molécula de ARN monocatenario.

20 En algunas realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un recipiente, que comprende en comunicación fluida en este: (A) una polimerasa de ácido nucleico aislada, (B) una ligasa de ácido nucleico aislada, (C) una plantilla de ácido nucleico que comprende al menos una primera hebra, (D) un primer cebador, en donde el primer cebador es complementario a una primera hebra de una plantilla de ácido nucleico bicatenario, y (E) un segundo cebador, en donde el segundo cebador es complementario a una segunda hebra de la plantilla de ácido nucleico bicatenario.

25 En algunas realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un kit para la detección de un ácido nucleico deseado y de interés que comprende al menos una primera hebra, en donde el kit comprende dos o más contenedores aislados desde el punto de vista fluido, en donde los contenedores conjuntamente comprenden: (A) una polimerasa de ácido nucleico aislada, (B) una ligasa de ácido nucleico aislada, (C) un primer cebador, en donde el primer cebador es complementario a la primera hebra del ácido nucleico deseado y de interés, (E) un segundo cebador, en donde el segundo cebador es complementario a una secuencia complementaria a la primera hebra del ácido nucleico deseado y de interés. En algunas realizaciones, el kit comprende el ácido nucleico deseado y de interés.

30

En algunas realizaciones, un ácido nucleico deseado dado a conocer en la presente memoria es una plantilla de ácido nucleico bicatenario.

35 En algunas realizaciones, en un método, el kit o el recipiente dado a conocer en la presente memoria que comprende un primer y un segundo cebador, los cebadores comprenden cada uno al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, en un método, el kit o el recipiente dado a conocer en la presente memoria que comprende un primer y un segundo cebador, los cebadores comprenden cada uno no más de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40 o 50 nucleótidos.

40 En algunas realizaciones, todos los procedimientos de un método dado a conocer en la presente memoria se realizan a una temperatura que no supera los 85, 80, 75, 70, 65, 60, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, o 10 °C. En algunas realizaciones, algunos de los procedimientos de un método dado a conocer en la presente memoria se realizan a una temperatura que no supera los 85, 80, 75, 70, 65, 60, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 o 10 °C.

45 En algunas realizaciones, dos o más procedimientos de un método dado a conocer en la presente memoria se realizan simultáneamente en la misma reacción. En algunas realizaciones, todos los procedimientos de un método dado a conocer en la presente memoria se realizan simultáneamente en la misma reacción.

50 En algunas realizaciones, en un método dado a conocer en la presente memoria, una plantilla de ácido nucleico se amplifica al menos 10, 100, 1000, 10000, 100000 o 1000000 veces en menos de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120 o 180 min desde el inicio del método.

En algunas realizaciones, un kit dado a conocer en la presente memoria comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico deseado y de interés.

En algunas realizaciones, una mezcla de reacción, recipiente o kit dado a conocer en la presente memoria comprende un colorante de ácido nucleico.

5 En algunas realizaciones, en un recipiente o kit dado a conocer en la presente memoria que comprende una polimerasa de ácido nucleico aislada, la polimerasa de ácido nucleico aislada es una ADN polimerasa. En algunas realizaciones, en un recipiente o kit dado a conocer en la presente memoria que comprende una polimerasa de ácido nucleico aislada, la polimerasa de ácido nucleico aislada es una transcriptasa inversa.

10 En algunas realizaciones, en un método, el recipiente o el kit dado a conocer en la presente memoria que comprende una polimerasa de ácido nucleico, la polimerasa de ácido nucleico tiene actividad de desplazamiento de hebra.

15 En las realizaciones, una mezcla de reacción, recipiente o kit dado a conocer en la presente memoria comprende una polimerasa de ácido nucleico. En las realizaciones, una polimerasa de ácido nucleico es una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de hebra. En las realizaciones, una polimerasa de ácido nucleico es una ARN polimerasa. En las realizaciones, una polimerasa de ácido nucleico es una transcriptasa inversa. En las realizaciones, una mezcla de reacción, recipiente o kit comprende más de una clase de polimerasa de ácido nucleico, tal como tanto una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de hebra como una transcriptasa inversa. En las realizaciones, una mezcla de reacción, recipiente o kit dado a conocer en la presente memoria comprende nucleótidos y tampón.

20 En las realizaciones, en un método, la mezcla de reacción, el recipiente o el kit dado a conocer en la presente memoria que implica una plantilla polinucleotídica, la plantilla polinucleotídica es una molécula monocatenaria. En unas realizaciones, en un método, la mezcla de reacción, el recipiente o el kit dado a conocer en la presente memoria que implica una plantilla polinucleotídica, la plantilla polinucleotídica comprende una hebra de una plantilla de ácido nucleico bicatenario. En las realizaciones, en un método, la mezcla de reacción, el recipiente o el kit dado a conocer en la presente memoria que implica una plantilla polinucleotídica, la plantilla polinucleotídica es una molécula de ADN o de ARN.

25 En las realizaciones, en un método, la mezcla de reacción, el recipiente o el kit dado a conocer en la presente memoria que implica una plantilla de ácido nucleico, la plantilla de ácido nucleico es una molécula de ARN o ADN. En las realizaciones, una plantilla de ácido nucleico puede ser una molécula monocatenaria o bicatenaria.

30 En las realizaciones, en un método dado a conocer en la presente memoria que implica la incubación de una mezcla de reacción, durante la incubación de la mezcla de reacción, la temperatura de la mezcla de reacción no supera los 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 37, 35, 30, 25 o 20 °C. En las realizaciones, en un método dado a conocer en la presente memoria, todas las etapas del método se realizan a una temperatura que no supera los 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 37, 35, 30, 25 o 20 °C. En las realizaciones, una mezcla de reacción, recipiente o kit dado a conocer en la presente memoria se mantiene a una temperatura que no supera los 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 37, 35, 30, 25 o 20 °C. En las realizaciones, un método dado a conocer en la presente memoria se realiza sin termociclación.

35 En las realizaciones, una mezcla de reacción, recipiente o kit dado a conocer en la presente memoria no contiene una enzima recombinasa.

40 En las realizaciones, en un método, la mezcla de reacción, el recipiente o el kit dado a conocer en la presente memoria puede contener o implicar numerosas copias de un cebador. Las numerosas copias pueden ser, por ejemplo, al menos 5, 10, 15, 20, 50, 100, 500, 1000, 10000, 100000 o 1000000 de copias del cebador.

45 En las realizaciones, una mezcla de reacción o recipiente dado a conocer en la presente memoria puede comprender al menos una porción de una muestra biológica de un sujeto. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, saliva, sangre, orina, una torunda de mejilla o una torunda nasal. El sujeto puede ser un humano.

50 En algunas realizaciones, dos o más etapas de un método dado a conocer en la presente memoria se realizan simultáneamente en la misma mezcla de reacción. En algunas realizaciones, todas las etapas de un método dado a conocer en la presente memoria se realizan simultáneamente en la misma mezcla de reacción.

55 En algunas realizaciones, en un método dado a conocer en la presente memoria, una plantilla de ácido nucleico se amplifica al menos 10, 100, 1000, 10000, 100000 o 1000000 de veces en menos de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120 o 180 min desde el inicio del método. En algunas realizaciones, en un método dado a conocer en la presente memoria, el número de copias de una plantilla de ácido nucleico en una mezcla de reacción se incrementa al menos 10, 100, 1000, 10000, 100000 o 1000000 de veces en menos de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120 o 180 min desde el inicio del método.

60 En las realizaciones, una plantilla de ácido nucleico dada a conocer en la presente memoria puede ser una plantilla de ácido nucleico monocatenario o bicatenario.

65 En las realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un método para ensayar un microorganismo

5 patógeno en una muestra, en donde el método comprende la realización de un método que se da a conocer en la presente memoria para amplificar el ácido nucleico a partir del patógeno. En las realizaciones, el ácido nucleico deseado utilizado en una composición o método dado a conocer en la presente memoria puede ser el ácido nucleico de un microorganismo patógeno. En las realizaciones, el primer y el segundo cebador utilizados en un método dado a conocer en la presente memoria pueden cada uno contener regiones que son complementarias a una secuencia en el ácido nucleico del patógeno, o que son complementarias a una secuencia que es complementaria a una secuencia del ácido nucleico del patógeno. En las realizaciones, el ácido nucleico del patógeno puede ser ADN o ARN. Los patógenos pueden incluir, sin limitación, virus, bacterias, hongos y protistas. Una muestra puede ser de un sujeto y puede tener cualquiera de las características de la muestra descritas en otra parte en la presente memoria.

10 En las realizaciones, un método dado a conocer en la presente memoria para la amplificación de un ácido nucleico se puede utilizar para un método diagnóstico externo a un organismo de humano o de animal. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de un humano o animal, y la muestra se puede ensayar para detectarle un ácido nucleico deseado y de interés con un método dado a conocer en la presente memoria para la amplificación de ácidos nucleicos.

15 En las realizaciones, un método dado a conocer en la presente memoria puede incluir: a) dar a conocer uno o varios reactantes para llevar a cabo un método tal y como se da a conocer en la presente memoria (p. ej., uno o varios de los primer cebador, segundo cebador, plantilla de ácido nucleico, polimerasa de ácido nucleico, nucleótidos, tampón, agua, etc.) en una mezcla de reacción, y b) incubar la mezcla de reacción a una temperatura sustancialmente isotérmica, en donde la temperatura de la mezcla de reacción no se aparta de una temperatura central en no más ni menos de 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 °C durante la incubación. En las realizaciones, una temperatura central puede ser, por ejemplo, de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 °C.

20 En las realizaciones, un método dado a conocer en la presente memoria se puede realizar a una temperatura sustancialmente isotérmica. En las realizaciones, una temperatura sustancialmente isotérmica puede ser cualquiera de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 °C, más o menos 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 °C.

En las realizaciones, un método dado a conocer en la presente memoria se puede realizar a una o varias temperaturas, ninguna de las cuales supera los 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30 o 25 °C.

25 En las composiciones y los métodos dados a conocer en la presente memoria donde interviene una polimerasa de ácido nucleico, en las realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico tiene actividad exonucleasa de 3' a 5'.

30 Las referencias en la presente memoria para generar una copia o amplificar una plantilla polinucleotídica o plantilla de ácido nucleico incluyen la generación de una copia que contiene la secuencia de la plantilla polinucleotídica / plantilla de ácido nucleico, así como generar una copia que contiene una secuencia análoga de la plantilla polinucleotídica / plantilla de ácido nucleico, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Por ejemplo, si una plantilla polinucleotídica es ARN, generar una copia de la plantilla puede incluir la generación de una copia que es una molécula de ADN que contiene la versión de ADN de la secuencia del ARN de la plantilla polinucleotídica (a saber, en la secuencia de ADN, contiene T en lugar de U).

En algunas realizaciones, un método dado a conocer en la presente memoria comprende el tratamiento de uno o varios de los componentes de la reacción o etapas del método con un colorante de ácido nucleico.

35 En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden incluir la generación de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal para ser usado en un procedimiento dado a conocer en la presente memoria a partir de una molécula deseada monocatenaria. Una molécula deseada monocatenaria puede ser de ADN o de ARN (p. ej., ARNm).

40 En algunas realizaciones, un método dado a conocer en la presente memoria comprende la medición de una señal fluorescente de un ensayo que comprende el método.

45 En algunas realizaciones, una ligasa de ácido nucleico puede estar incluida con un método o composición dado a conocer en la presente memoria. En algunas realizaciones, una plantilla de ácido nucleico se puede amplificar más rápidamente con un método dado a conocer en la presente memoria cuando se incluye una ligasa en una mezcla de reacción para un método dado a conocer en la presente memoria, en comparación con la no inclusión de una ligasa de ácido nucleico en la reacción.

En algunas realizaciones, los métodos de amplificación dados a conocer en la presente memoria se pueden realizar sin termociclación.

50 En algunas realizaciones, los métodos de amplificación dados a conocer en la presente memoria se pueden realizar a una temperatura constante. En algunas realizaciones, los métodos de amplificación dados a conocer en la presente memoria se pueden realizar dentro de un margen de temperatura que se extiende no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o 30 °C por encima o por debajo de una temperatura establecida de 10, 15,

20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 °C.

5 En algunas realizaciones, los métodos de amplificación dados a conocer en la presente memoria pueden comprender la incubación de una mezcla de reacción a dos, tres, cuatro, cinco o más temperaturas o márgenes de temperatura diferentes. En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden comprender la incubación de una mezcla de reacción a una primera temperatura, en donde la primera temperatura es una temperatura de no más de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 o 75 °C, y una segunda temperatura, en donde la segunda temperatura es una temperatura de no más de 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 °C. En algunas realizaciones, en un método dado a conocer en la presente memoria, una mezcla de reacción se puede mantener a una temperatura de no más de 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 °C durante el método.

10 En algunas realizaciones, los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria comprenden, en volumen, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de agua. En algunas realizaciones, los métodos y las composiciones dadas a conocer en la presente memoria comprenden, en volumen, de forma colectiva no más de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70 u 80% de glicerol o polietilenglicol.

15 En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden comprender el ensayo de una muestra en busca de un microorganismo patógeno. En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden comprender la detección de un microorganismo patógeno en una muestra. En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden comprender la medición de la cantidad de patógeno en una muestra. Los microorganismos patógenos pueden incluir, por ejemplo, bacterias, virus, protistas y hongos.

20 En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden realizarse sin el uso de un cebador que contenga regiones autocomplementarias. En algunas realizaciones, los métodos y composiciones dados a conocer en la presente memoria no comprenden un cebador que contenga regiones autocomplementarias.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos,

30 la figura 1 es un esquema general de un método y los procedimientos dados a conocer en la presente memoria. Los paneles 1A a 1C muestran las características y las etapas de ejemplo de los métodos dados a conocer en la presente memoria.

La figura 2 es un gráfico que describe los resultados de las reacciones realizadas de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria.

La figura 3 es un gráfico que describe los resultados de las reacciones realizadas de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria.

35 La figura 4 es un gráfico que describe los resultados de las reacciones realizadas de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria.

40 Se observa que los dibujos y los elementos que hay en ellos no están necesariamente dibujados para dar forma ni a escala. Por ejemplo, la forma o la escala de los elementos de los dibujos se pueden simplificar o modificar para facilitar o dar claridad a la presentación. Se debe saber además que los dibujos y los elementos que hay en ellos tienen solamente propósitos ilustrativos y de ejemplo, y no se debe considerar que los limitan de ninguna manera.

Descripción detallada

45 Aunque la invención incluye diferentes modificaciones y formas alternativas, las realizaciones específicas de las mismas se muestran a modo de ejemplo en los dibujos y se describirán en la presente memoria con detalle. Sin embargo, se debe saber que de ninguna manera se intenta limitar la invención a las formas concretas que se describen.

En algunas realizaciones, se dan a conocer en la presente memoria métodos y composiciones que hacen referencia a la amplificación de ácidos nucleicos y a la generación de concatémeros.

50 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un «polinucleótido» se refiere a una cadena polimérica que contiene dos o más nucleótidos. «Polinucleótidos» incluye cebadores, oligonucleótidos, hebras de ácidos nucleicos, etc. Un polinucleótido puede contener nucleótidos estándares o no estándares. Típicamente, un polinucleótido contiene un fosfato en el 5' de un extremo («extremo 5'») y un grupo hidroxilo en el 3' del otro extremo («extremo 3'») de la cadena. Al nucleótido más hacia 5' de un polinucleótido se le puede denominar

en la presente memoria como el «nucleótido del extremo 5'» del polinucleótido. Al nucleótido más hacia 3' de un polinucleótido se le puede denominar en la presente memoria como el «nucleótido del extremo 3'» del polinucleótido.

5 El término «secuencia abajo», tal y como se utiliza en la presente memoria en el contexto de un polinucleótido que contiene un nucleótido en el extremo 5' y un nucleótido en el extremo 3', se refiere a una posición en el polinucleótido que está más cercano al nucleótido del extremo 3' que una posición de referencia en el polinucleótido. Por ejemplo, en un cebador que tiene la secuencia: 5' ATAAGC 3', la «G» está secuencia abajo de la «T» y todas las «A».

10 El término «secuencia arriba» tal y como se utiliza en la presente memoria en el contexto de un polinucleótido que contiene un nucleótido en el extremo 5' y un nucleótido en el extremo 3', se refiere a una posición en el polinucleótido que está más cercano al nucleótido del extremo 5' que una posición de referencia en el polinucleótido. Por ejemplo, en un cebador que tiene la secuencia: 5' ATAAGC 3', la «T» está secuencia arriba de «G», la «C» y las dos «A» más cercanas a la «G».

15 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «ácido nucleico» incluye tanto ADN como ARN, que incluyen los ADN y los ARN que contienen nucleótidos no estándares. Un «ácido nucleico» contiene al menos un polinucleótido (una «hebra de ácido nucleico»). Un «ácido nucleico» puede ser monocatenario o bicatenario.

20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un «concatémero» hace referencia a una molécula de ácido nucleico que contiene en él dos o más copias de un ácido nucleico concreto, en donde las copias están conectadas en serie. Dentro del concatémero, las copias del ácido nucleico concreto pueden estar conectadas directamente las unas a las otras, o pueden estar conectadas indirectamente (p. ej., puede haber nucleótidos entre las copias del ácido nucleico concreto). En un ejemplo, el ácido nucleico concreto puede ser el de una plantilla de ácido nucleico bicatenario, de tal manera que un concatémero puede contener dos o más copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario. En otro ejemplo, el ácido nucleico concreto puede ser una plantilla polinucleotídica, de tal manera que un concatémero puede contener dos o más copias de la plantilla polinucleotídica. En algunas realizaciones, los concatémeros generados de acuerdo con los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria pueden contener al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100 o más copias de una plantilla de ácido nucleico directamente conectadas unas a las otras en serie.

30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un ácido nucleico o molécula «deseada» o «destinataria» se refiere a un ácido nucleico de interés. Un ácido nucleico / molécula deseada puede ser de cualquier tipo, entre ellos ADN o ARN monocatenario o bicatenario (p. ej., ARNm).

35 Tal y como se utiliza en la presente memoria, las secuencias «complementarias» hacen referencia a dos secuencias de nucleótidos que, cuando se hibridan de forma antiparalela la una a la otra, contienen muchas bases nucleotídicas individuales que pueden emparejarse con otras de acuerdo con las reglas estándares de emparejamiento de bases (p. ej., A-T, G-C o A-U), de tal manera que las moléculas que contienen las secuencias pueden hibridarse específicamente las unas a las otras. No es necesario que cada base nucleotídica de dos secuencias sea capaz de emparejarse la una a la otra para que las secuencias se consideren «complementarias». Las secuencias se pueden considerar complementarias, por ejemplo, si al menos el 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de las bases nucleotídicas de dos secuencias son capaces de emparejarse las unas con las otras cuando las secuencias están hibridadas de manera óptima para la complementación. Además, las secuencias pueden todavía considerarse «complementarias» cuando la longitud total de las dos secuencias es significativamente diferente la una de la otra. Por ejemplo, un cebador de 15 nucleótidos se puede considerar «complementario» a un polinucleótido más largo que contiene cientos de nucleótidos si muchas bases nucleotídicas individuales del cebador pueden emparejarse con las bases nucleotídicas del polinucleótido más largo cuando el cebador está hibridado de forma antiparalela con una región concreta del polinucleótido más largo. Adicionalmente, las secuencias «complementarias» pueden contener uno o varios análogos de nucleótido o análogos de nucleobase.

50 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «aislado», cuando se aplica a las proteínas, ácidos nucleicos u otras biomoléculas, hace referencia a una molécula que se ha purificado o separado de un componente de su entorno que se produce de forma natural (p. ej., una proteína purificada de una célula en la que se ha sintetizado de forma natural). Una molécula «aislada» puede estar en contacto con otras moléculas (por ejemplo, como parte de una mezcla de reacción). Tal y como se utiliza en la presente memoria, las moléculas «aisladas» también incluyen proteínas o ácidos nucleicos producidos de manera recombinante que tienen una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que se produce de forma natural. Los ácidos nucleicos «aislados» incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido contenidas en las células que habitualmente expresan el polipéptido, en donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales. En algunas realizaciones, los polipéptidos «aislados» están purificados a una homogeneidad de al menos el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 100%, tal y como se pone de manifiesto por SDS-PAGE de los polipéptidos seguido por el método de tinción

con azul de Coomassie, plata u otra forma de teñir proteínas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico que se ha descrito que contiene la «secuencia» de una plantilla u otro ácido nucleico también se puede considerar que contiene la plantilla u otro propio ácido nucleico (p. ej., una molécula que está descrito que contiene la secuencia de una plantilla también se puede describir como que contiene la plantilla), a menos que el contexto dicte con claridad otra cosa.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, cuando un primer polinucleótido se describe como «hibridado», «que se hibrida», o similar, a un segundo polinucleótido, la totalidad del primer polinucleótido o cualquier porción del mismo puede hibridarse al segundo polinucleótido y viceversa.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, una referencia a «tratar» un objeto dado para una afección, u otro objeto o similar, hace referencia a exponer directa o indirectamente el objeto dado a la afección u otro objeto citados. Así pues, mientras que una etapa de «tratamiento» puede implicar una acción relacionada diferente (p. ej., añadir una enzima a un recipiente, agitar un recipiente, etc.) no todas las etapas del «tratamiento» requieren una acción relacionada diferente. Por ejemplo, puede prepararse en un recipiente una reacción que implica uno o varios reactantes y, una vez que se ha iniciado la reacción, se pueden producir muchos acontecimientos o etapas en el recipiente sin más intervención humana ni mecánica con el contenido del recipiente. Uno o varios de estos muchos acontecimientos o etapas en el recipiente se pueden describir como «que trata» un objeto en el recipiente, incluso aunque no se produzca ninguna intervención independiente con el contenido del recipiente después del inicio de la reacción.

Las realizaciones de los métodos y composiciones dadas a conocer en la presente memoria se pueden describir con referencia a la figura 1. Se puede dar a conocer un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 110 o un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 (figura 1A). Un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 110 contiene una única copia de una plantilla de ácido nucleico bicatenario 100. Un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla puede contener dos o más copias de una plantilla de ácido nucleico bicatenario (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100 o más). El ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 de ejemplo contiene 3 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario 100 (100a, 100b y 100c). Una plantilla de ácido nucleico bicatenario comprende una primera hebra de plantilla 101 y una segunda hebra de plantilla 102.

Un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 110 contiene una primera hebra 111 y una segunda hebra 112. La secuencia de la primera hebra de plantilla 101 se encuentra dentro de la primera hebra 111 y la secuencia de la segunda hebra de plantilla 102 se encuentra dentro de la segunda hebra 112. Un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 contiene una primera hebra 151 y una segunda hebra 152. Las secuencias con muchas copias de la primera hebra de plantilla 101a, 101b, 101c están dentro de la primera hebra 151 y las secuencias de las muchas copias de la segunda hebra de plantilla 102a, 102b, 102c están dentro de la segunda hebra 152.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 110 o un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 se puede tratar en las condiciones en las que pueden tener lugar al menos 1 o 2 procedimientos con el ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 110 (figura 1B) o al menos pueden tener lugar 1, 2 o 3 procedimientos con el ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 (figura 1C).

Con referencia a la figura 1B, un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 110 se puede tratar de tal manera que se puede someter al menos a 1 o 2 procedimientos diferentes.

Como una primera alternativa, se separan la primera hebra 111 y la segunda hebra 112, se hibridan la primera hebra de plantilla 101 y la segunda hebra de plantilla 102 con un primer cebador 105 o un segundo cebador 106, respectivamente, y sirven de plantilla para la generación de ácidos nucleicos basada en la polimerasa a partir de nuevas hebras de plantilla complementarias a la correspondiente hebra de plantilla. Específicamente, desde el extremo 3' del primer cebador 105 puede sintetizarse una nueva segunda hebra de plantilla 132 que es complementaria a la primera hebra de plantilla 101, y desde el extremo 3' del segundo cebador 106 se puede sintetizar una nueva primera hebra de plantilla 121 que es complementaria a la segunda hebra de plantilla 102. Esto puede dar lugar a la formación de dos nuevos ácidos nucleicos bicatenarios lineales monoplantilla 120, 130, cada uno de los cuales contiene una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario 100a, 100b. El primer nuevo ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 120 contiene la segunda hebra de plantilla 102 y la nueva primera hebra de plantilla 121. El segundo nuevo ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 130 contiene la primera hebra de plantilla 101 y la nueva segunda hebra de plantilla 132. Al procedimiento general de más arriba se le puede denominar en la presente memoria como «replicación basada en cebadores».

En las realizaciones de la replicación basada en cebadores, cuando se separan la primera hebra 111 y la segunda hebra 112, inicialmente, solo una porción de las hebras se separa y las restantes porciones de las hebras permanecen hibridadas. En tales realizaciones, el primer cebador 105 o el segundo cebador 106 se pueden hibridar a una porción monocatenaria expuesta complementaria de una hebra, y entonces sirven de cebador para la generación de una segunda nueva hebra de plantilla 132 o una primera nueva hebra de plantilla

121, respectivamente. A medida que la polimerasa se desplaza a lo largo de la hebra de plantilla (lo que genera una nueva hebra de plantilla), puede desplazar la hebra que está hibridada a la hebra de plantilla (a saber, la polimerasa puede tener actividad de desplazamiento de hebra). La hebra de plantilla desplazada puede entonces hibridarse a un cebador complementario de la misma, a partir del cual se puede sintetizar una nueva hebra de plantilla. Así pues, en las realizaciones, el procedimiento de la replicación basada en cebadores puede ser tal y como se esboza en líneas generales en el «Procedimiento 1» de la figura 1, excepto que la primera hebra de plantilla 101 y la segunda hebra de plantilla 102 no se separan completamente a la vez ni cada una se hibrida con un cebador, sino que, en su lugar, mientras que partes de la primera hebra de plantilla y de la segunda hebra de plantilla permanecen hibridadas entre sí, una porción de una de las hebras se hibrida con un cebador, y entonces una polimerasa se encarga de la separación de las dos hebras a medida que se sintetiza una nueva hebra de plantilla.

Como segunda alternativa, un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 110 se puede tratar en las condiciones en las que se liga extremo con extremo a otro ácido nucleico bicatenario. Preferiblemente, el otro ácido nucleico bicatenario es otra copia del ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla o un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla (en vez de un ácido nucleico bicatenario que no contiene ninguna copia de la plantilla). Las condiciones pueden incluir la incubación de los ácidos nucleicos bicatenarios con una ligasa. A modo de ejemplo, en la figura 1B, el ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 110 se muestra ligado de extremo con extremo a otro ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 140, lo que da lugar a la formación de un nuevo ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 145. El nuevo ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 145 de ejemplo contiene dos copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario 110a, 110b, uno de cada de: i) ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 110 y ii) ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 140. Al procedimiento general de más arriba se le puede denominar en la presente memoria como «ligación de extremo con extremo». Los nuevos ácidos nucleicos bicatenarios lineales multiplantilla formados por el procedimiento de ligación de extremo con extremo pueden contener cualquier número de copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, basándose en el número total de copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario en las moléculas que se ligan unas a otras en un procedimiento de ligación de extremo con extremo. Por ejemplo, si un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla que contiene seis copias de la plantilla se liga a un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla, el nuevo ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla contendrá siete copias de la plantilla.

Una vez que se forma un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla (p. ej., como en el procedimiento de ligación de extremo con extremo descrito en la figura 1B), un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla puede participar en diferentes procedimientos. Con referencia a la figura 1C, un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 se puede tratar de tal forma que se puede someter al menos a 1, 2 o 3 procedimientos diferentes. Un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150, tal y como se utiliza en los procedimientos de la figura 1C, puede haberse generado anteriormente mediante cualquier mecanismo idóneo, tal como, por ejemplo, se puede haber generado en un método de ligación de extremo con extremo, tal y como se esboza en la figura 1B, o se puede haber generado en una ronda previa de generación de concatémeros, tal y como se esboza en la figura 1C y se describe con más detalle más adelante. De igual forma, mientras que el ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 de ejemplo de la figura 1C contiene 3 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla puede contener dos o más copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, tal y como se describe en otro lugar de la presente memoria.

Como primera alternativa, un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 se puede tratar para someterlo a la replicación basada en cebadores, tal y como se describe más arriba. Las condiciones de la reacción y los reactantes para la replicación basada en cebadores con un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 pueden ser los mismos que para un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla 110. Con la replicación basada en cebadores de un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla, cada nuevo ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla formado como resultado del procedimiento puede contener muchas copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario. En el caso del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150, cada ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla contiene 3 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario 100a, 100b y 100c; por consiguiente, cada nuevo ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla generado a partir de 150 puede contener hasta 3 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario. Sin embargo, ya que en algunas circunstancias un cebador puede hibridarse a cualquier copia de su secuencia complementaria en un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla, las nuevas hebras de plantilla que son complementarias a una primera o segunda hebra de un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla no serán necesariamente tan largas, o no contendrán tantas copias de una hebra de plantilla como la primera o la segunda hebra de un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla. Por ejemplo, ya que el ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 contiene 3 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario 100a, 100b y 100c, si un cebador se hibrida a una hebra de plantilla de la copia 100b, una nueva hebra de plantilla generada a partir de dicho cebador solamente contendrá 2 copias de la hebra de plantilla.

Como segunda alternativa, un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 se puede tratar para someterse a la ligación de extremo con extremo con otro ácido nucleico bicatenario, tal y como se describe más arriba. Preferiblemente, el otro ácido nucleico bicatenario es otra copia del ácido nucleico bicatenario lineal

monoplantilla o un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla (en vez de un ácido nucleico bicatenario que no contiene ninguna copia de la plantilla). Un nuevo ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla formado por ligación de extremo con extremo de un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla más otro ácido nucleico bicatenario lineal de plantilla puede contener tantas copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario como estén presentes conjuntamente en los ácidos nucleicos bicatenarios que formaban el nuevo ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla. Por ejemplo, si un primer ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla que contiene 3 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario se liga de extremo con extremo con un segundo ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla que contiene 2 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, el nuevo ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla resultante contendrá 5 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario. En otro ejemplo, si un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla que contiene 2 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario se liga de extremo con extremo con un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla, el nuevo ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla resultante contendrá 3 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario.

Como tercera alternativa, un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 puede tratarse con otro ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 160 en las condiciones que hacen que se forme una estructura entrecruzada 170 que comprende una región del extremo 3' de una hebra del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 hibridada a una región del extremo 3' de una hebra del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 160. En particular, el ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 150 contiene una primera hebra 151 y una segunda hebra 152, y tres copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario 100a, 100b, 100c, y el ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 160 contiene una primera hebra 161 y una segunda hebra 162, y tres copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario 100a, 100b, 100c. Cada copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario (en cualquiera de los ácidos nucleicos bicatenarios lineales multiplantilla 150 o 160) contiene una copia de la primera hebra de plantilla 101 y una copia de la segunda hebra de plantilla 102. Los ácidos nucleicos bicatenarios lineales multiplantilla 150, 160 se pueden tratar en condiciones que hacen que, por ejemplo, la secuencia de la primera plantilla de la hebra 101a de la primera hebra del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 161 se hibride con la secuencia de la segunda plantilla de la hebra 102c de la segunda hebra del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 152 para producir una estructura entrecruzada que comprende estas hebras. En general, ya que los ácidos nucleicos bicatenarios lineales multiplantilla contienen al menos dos copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, hay numerosas regiones dentro de cualquier ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla que pueden ser complementarias a otros ácidos nucleicos bicatenarios lineales multiplantilla, lo que facilita así la formación de estructuras entrecruzadas entre diferentes ácidos nucleicos bicatenarios lineales multiplantilla. Una estructura entrecruzada 170 se puede tratar con una polimerasa de ácido nucleico en las condiciones en las que se forman un producto de extensión de la primera hebra del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 161 y un producto de extensión de la segunda hebra del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 152. La polimerasa puede generar un producto de extensión a partir del extremo 3' de las hebras de ácido nucleico 161, 152. Al producto de extensión de la primera hebra del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 161 se le puede denominar en la presente memoria como una «nueva primera hebra de concatémeros» 181. Al producto de extensión de la segunda hebra del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla 152 se le puede denominar en la presente memoria como una «nueva segunda hebra de concatémeros» 182. Juntas, la nueva primera hebra de concatémeros 181 y la nueva segunda hebra de concatémeros 182 se pueden denominar un «nuevo concatémero» 180. El nuevo concatémero 180 puede tener una longitud de nucleótidos mayor que cualquiera de las moléculas originales utilizadas para generar el nuevo concatémero 180, y puede contener más copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario. Por ejemplo, el nuevo concatémero 180 contiene 5 copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario 100a, 100b, 100c, 100d y 100e. Un nuevo concatémero puede contener exclusivamente copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, o puede contener nucleótidos adicionales a las copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario. Al procedimiento general de más arriba se le puede denominar en la presente memoria como «replicación de hebras entrecruzadas».

En algunas realizaciones, en los métodos dados a conocer en la presente memoria, uno o varios de los procedimientos de más arriba pueden tener lugar simultáneamente en la misma mezcla de reacción. En algunas realizaciones, todos los procedimientos de más arriba pueden producirse simultáneamente en la misma mezcla de reacción. Además, una molécula generada de acuerdo con un procedimiento dado a conocer en la presente memoria puede utilizarse a continuación en el mismo, u otro, procedimiento dado a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, si se genera un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla a partir de dos ácidos nucleicos bicatenarios lineales monoplantilla, dicho ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla puede someterse a cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria para un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla. En otro ejemplo, una molécula formada por un procedimiento de ligación de extremo con extremo dado a conocer en la presente memoria puede utilizarse a continuación como una plantilla para un procedimiento de replicación basada en cebadores. En otro ejemplo, un nuevo concatémero formado por un procedimiento de replicación basada en hebras entrecruzadas puede utilizarse a continuación como parte de un procedimiento de ligación de extremo con extremo. En otro ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más ácidos nucleicos bicatenarios pueden ligarse simultáneamente para dar una única molécula en un procedimiento de ligación de extremo con extremo dado a conocer en la presente memoria.

En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden conducir a un incremento en una mezcla de reacción de uno o ambos de: 1) el número de moléculas de ácido nucleico que contienen una plantilla de ácido nucleico bicatenario de interés, y 2) el número medio de copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario de interés presente en las moléculas de ácido nucleico que contienen plantilla de ácido nucleico bicatenario de interés. Por consiguiente, en algunas realizaciones, las plantillas de ácido nucleico bicatenario se pueden amplificar con rapidez de acuerdo con los métodos y los procedimientos dados a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede amplificar (a saber, incrementar su número) una plantilla de ácido nucleico al menos 500 veces en menos de 0,1, 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 o 180 min desde el comienzo del método. En otro ejemplo, en algunas realizaciones, se puede amplificar una plantilla de ácido nucleico al menos 10000 veces en menos de 0,1, 0,5, 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 o 180 min desde el comienzo del método. En otro ejemplo, en algunas realizaciones, se puede amplificar una plantilla de ácido nucleico al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000 o 1000000 de veces por encima de la cantidad original de la plantilla de ácido nucleico presente en una mezcla de reacción al comienzo del método en menos de 0,1 min, 0,5 min, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 90 min, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h o 24 h desde el inicio del método. En algunas realizaciones, cuando se inicia un método, todos los reactantes para un procedimiento del método están en un recipiente que contiene la mezcla de reacción para el método. En algunas realizaciones, cuando se inicia un método, todos los reactantes para todos los procedimientos del método están en un recipiente que contiene la mezcla de reacción para el método.

En algunas realizaciones, en un método dado a conocer en la presente memoria, una plantilla de ácido nucleico se puede amplificar a una velocidad mayor que una velocidad lineal. En algunas realizaciones, en un método dado a conocer en la presente memoria, una plantilla de ácido nucleico se puede amplificar exponencialmente. En algunas realizaciones, en un método dado a conocer en la presente memoria, una plantilla de ácido nucleico puede al menos doblarse en número cada 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 90, 120, 180 o 240 min después de que se inicie el método. En algunas realizaciones, una plantilla de ácido nucleico se puede amplificar al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000 o 10000000 de veces por encima de la cantidad original de la plantilla de ácido nucleico presente en la reacción al comienzo del método.

La presencia de numerosas copias de una plantilla de ácido nucleico en un concatémero u otro ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla generado de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria puede contribuir a la rápida amplificación de plantillas de ácido nucleico de acuerdo con los métodos dados a conocer en la presente memoria. En concreto, ya que pueden estar presentes numerosas copias de una hebra de una plantilla de ácido nucleico en un único concatémero / hebra de ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla, la carga de una única polimerasa sobre un único concatémero / hebra de ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla puede dar lugar a la generación de numerosas copias de una hebra de la plantilla de ácido nucleico. En algunas situaciones, el tiempo necesario para que las polimerasas de ácido nucleico se topen y se carguen sobre las hebras de ácido nucleico puede afectar significativamente la velocidad global de una reacción de amplificación. Por ejemplo, si cada hebra de ácido nucleico con la que se tope una polimerasa durante una reacción de replicación solo contiene una única copia de una hebra de una plantilla de ácido nucleico, una polimerasa puede necesitar toparse y cargarse en una nueva hebra de plantilla después de que se genere cada copia de la hebra de la plantilla. En cambio, con un concatémero, después de que la polimerasa se tope y se cargue sobre una hebra de concatémero, puede sintetizar numerosas copias de una hebra de la plantilla sin necesidad de dejar la hebra de concatémero ni de toparse ni cargarse sobre otra hebra.

En los métodos dados a conocer en la presente memoria, los ácidos nucleicos bicatenarios que no contienen una plantilla bicatenaria de interés pueden algunas veces juntarse como parte de un procedimiento de ligación de extremo con extremo dado a conocer en la presente memoria. No obstante, dado que estas moléculas no se amplificarán por lo general de manera específica por una polimerasa con los procedimientos dados a conocer en la presente memoria (debido a la ausencia de cebadores que se hibriden de forma específica a la plantilla bicatenaria de interés), estas moléculas no se amplificarán específicamente con los métodos dados a conocer en la presente memoria. De igual forma, ya que estas moléculas no se amplifican específicamente con los métodos dados a conocer en la presente memoria, a medida que progresan los métodos dados a conocer en la presente memoria, en una mezcla de reacción pueden estar presentes cantidades crecientes de ácidos nucleicos bicatenarios que contienen la plantilla bicatenaria de interés (p. ej., debido a su generación mediante procedimientos basados en cebadores). Así pues, a medida que progresan las reacciones dadas a conocer en la presente memoria, un porcentaje creciente de moléculas bicatenarias en una reacción pueden contener la plantilla bicatenaria de interés, lo que incrementa así la probabilidad de que un acontecimiento de ligación de extremo con extremo se dé entre dos ácidos nucleicos bicatenarios, en donde cada uno de ellos contiene al menos una copia de la plantilla bicatenaria de interés (en vez de entre dos ácidos nucleicos bicatenarios que no contienen la plantilla de interés o entre un ácido nucleico bicatenario que contiene la plantilla y un ácido nucleico bicatenario que no contiene la plantilla de interés). Por consiguiente, los métodos dados a conocer en la presente memoria permiten la amplificación rápida y específica de las plantillas bicatenarias de interés.

En algunas realizaciones de los métodos dados a conocer en la presente memoria, es igual de probable que

se produzcan los diferentes procedimientos descritos en la presente memoria en los que intervienen una plantilla de ácido nucleico bicatenario. En otras realizaciones, es más o menos probable que se produzcan uno o varios de los procedimientos. En algunas realizaciones, en determinadas condiciones de reacción, tienen las mismas probabilidades de producirse los diferentes procedimientos descritos en la presente memoria que implican una plantilla de ácido nucleico bicatenario. En algunas realizaciones, en determinadas condiciones de reacción, tienen las mismas probabilidades de producirse uno o varios de los procedimientos. Por ejemplo, en un método dado a conocer en la presente memoria en el que interviene una polimerasa de ácido nucleico y una ligasa, la polimerasa y la ligasa pueden tener ser activas a diferentes temperaturas óptimas. Si la reacción se incuba a una temperatura más cercana a la temperatura óptima para la polimerasa, entonces los procedimientos basados en la polimerasa descritos en la presente memoria (replicación basada en cebadores y replicación basada en hebras entrecruzadas) pueden verse favorecidos frente a la ligación de extremo con extremo. En algunos ejemplos, los métodos dados a conocer en la presente memoria se pueden realizar a dos o más temperaturas, para favorecer que tengan lugar los diferentes procedimientos dados a conocer en la presente memoria en una mezcla de reacción (p. ej., basándose en las diferentes temperaturas óptimas para las diferentes enzimas).

En los procedimientos descritos en la presente memoria en los que interviene una polimerasa de ácido nucleico, la polimerasa puede tener actividad de desplazamiento de hebra. Por ejemplo, en los procedimientos de replicación basada en cebadores descritos en la presente memoria, a medida que una polimerasa genera un producto de extensión desde el cebador a lo largo de una hebra de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, puede desplazar la otra hebra de la plantilla de ácido nucleico bicatenario desde una de las hebras, ya que las dos hebras pueden todavía hibridarse parcialmente al comienzo de la generación del producto de extensión del cebador. En otro ejemplo, en un procedimiento de replicación de hebras entrecruzadas descrito en la presente memoria, a medida que una polimerasa genera un producto de extensión desde el extremo 3' de una hebra de un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla en una estructura entrecruzada, la polimerasa puede desplazar la otra hebra original del ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla. Durante la generación de un producto de extensión de una polimerasa, el producto de extensión puede quedar covalentemente conectado a la molécula original que sirvió de cebador para la generación del producto de extensión (p. ej., un cebador o hebra de ácido nucleico más grande). En algunas situaciones, la molécula que sirvió de cebador para la generación de un producto de extensión de una polimerasa se puede considerar que es parte del producto de extensión de la polimerasa. En algunas realizaciones, las condiciones que hacen que se forme un producto de extensión de un cebador u otra hebra de ácido nucleico pueden incluir cualquier condición suficiente para soportar la síntesis de ácidos nucleicos basada en la polimerasa. Las condiciones de ejemplo para la síntesis de ácidos nucleicos basada en la polimerasa se conocen en la técnica y se dan a conocer, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, M. R. Green y J. Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012). Se pueden utilizar los mismos o diferentes tipos de polimerasas para los diferentes procedimientos en los métodos dados a conocer en la presente memoria.

Las moléculas de ácido nucleico generadas de acuerdo con los métodos y las composiciones dadas a conocer en la presente memoria pueden tener cualquier longitud de nucleótidos. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico generadas en la presente memoria pueden tener al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000, 20 000 o 25000 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico generadas en la presente memoria pueden tener no más de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000, 20 000 o 25000 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico generadas en la presente memoria pueden tener una longitud seleccionada de un margen que tiene un valor mínimo de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000 o 20 000 nucleótidos de longitud, y un valor máximo de 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 15000, 20 000 o 25000 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, al menos algunas moléculas de ácido nucleico generadas de acuerdo con un método o composición dado a conocer en la presente memoria tienen las características descritas más arriba. En algunas realizaciones, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de las moléculas de ácido nucleico generadas de acuerdo con un método o composición dado a conocer en la presente memoria tienen las características descritas más arriba.

Las moléculas de ácido nucleico generadas de acuerdo con los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria pueden contener cualquier cantidad de copias de una plantilla de ácido nucleico bicatenario. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico generadas en la presente memoria pueden contener al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 copias de una plantilla de ácido nucleico bicatenario. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico generadas en la presente memoria pueden contener no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 copias de una plantilla de ácido nucleico bicatenario. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico generadas en la presente memoria pueden tener un número de copias de una plantilla de ácido nucleico bicatenario

seleccionada de un margen que tiene un valor mínimo de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 o 90 copias, y un valor máximo de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 copias. En algunas realizaciones, al menos algún ácido nucleico generado de acuerdo con un método o composición dado a conocer en la presente memoria tiene las características descritas más arriba. En algunas realizaciones, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de los ácidos nucleicos generados de acuerdo con un método o composición dado a conocer en la presente memoria tienen las características descritas más arriba.

El progreso de un método dado a conocer en la presente memoria se puede vigilar de diferentes maneras. En las realizaciones, se puede ensayar una reacción que detecte un producto de amplificación de ácido nucleico (p. ej., por la cantidad de producto o la velocidad a la que se genera). En otras realizaciones, una reacción se puede ensayar para que detecte la actividad de una polimerasa a lo largo de una plantilla de ácido nucleico (p. ej., por el movimiento de una polimerasa a lo largo de una hebra de plantilla). Así pues, en algunas realizaciones, se pueden observar acontecimientos de un método dado a conocer en la presente memoria debido a la acumulación del producto a partir de un método (que puede ser durante o después de se completan las etapas del método), o debido a acontecimientos detectables que se producen durante las etapas de un método.

La presencia de ácidos nucleicos amplificados se puede ensayar, por ejemplo, mediante la detección de los productos de reacción (ácidos nucleicos amplificados o subproductos de la reacción) o mediante la detección de las sondas asociadas al progreso de la reacción.

En algunas realizaciones, los productos de la reacción se pueden identificar mediante la tinción de los productos con un colorante. En algunas realizaciones, un colorante puede tener mayor fluorescencia cuando está unido a un ácido nucleico que cuando no está unido a un ácido nucleico. En algunas realizaciones, un colorante se puede intercalar en un ácido nucleico bicatenario o se puede fijar a una región externa de un ácido nucleico. Los colorantes de ácido nucleico que se pueden utilizar con los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria incluyen, por ejemplo, colorantes de cianina, PicoGreen®, OliGreen®, RiboGreen®, colorantes SYBR®, SYBR® Gold, SYBR® Green I, SYBR® Green II, bromuro de etidio, dihidroetidio, BlueView™, colorantes TOTO®, colorantes TO-PRO®, colorantes POPO®, colorantes YOYO®, colorantes BOBO®, colorantes JOJO®, colorantes LOLO®, colorantes SYTOX®, colorantes SYTO®, yoduro de propidio, yoduro de hexidio, azul de metileno, DAPI, naranja de acridina, quinacrina, dímeros de acridina, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina, colorantes de bisbencimida, colorantes de Hoechst, 7-aminoactinomicina D, actinomicina D, hidroxiestilbamidina, pironina Y, colorante Diamond™, GelRed™, GelGreen™ y LDS 751.

En algunas realizaciones, los productos de reacción se pueden identificar mediante el análisis de la turbidez de las reacciones de amplificación. Por ejemplo, en unas realizaciones, el incremento de la turbidez puede estar correlacionado con la formación de los productos de reacción y de los subproductos de reacción (p. ej., pirofosfato en complejo con magnesio).

En algunas realizaciones, los productos de reacción se pueden identificar cuando se separa por electroforesis en gel una reacción realizada de acuerdo con un método de la presente memoria, y a continuación se tiñe el gel con un colorante para ácidos nucleicos. El colorante puede ser cualquier colorante de ácido nucleico descrito en la presente memoria o, si no, conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, con los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria se puede utilizar cualquier método o composición conocido en la técnica para la detección de los ácidos nucleicos o los procedimientos asociados a la generación de ácidos nucleicos.

En algunas realizaciones, en una reacción dada a conocer en la presente memoria se incluyen una sonda del ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una porción de una hebra de la plantilla de ácido nucleico (o una hebra que tiene una secuencia similar o idéntica) y que contiene uno o ambos de un indicador fluorescente (fluoróforo) y un extintor.

En un ejemplo, una sonda del ácido nucleico puede contener un indicador fluorescente en su extremo 5' o 3' y un extintor en el otro extremo. La sonda puede además tener una secuencia nucleotídica que contiene, en orden, al menos una primera, segunda y tercera región, en donde la primera y la tercera regiones son complementarias la una a la otra, y en donde al menos una porción de la segunda región es complementaria a una porción de una hebra de la plantilla de ácido nucleico (la sonda «secuencia a detectar»). En algunas realizaciones, la longitud de la segunda región puede ser mayor que la longitud de la primera o de la tercera región. En algunas realizaciones, la longitud de la segunda región puede tener entre 10 y 40 nucleótidos, y la longitud de la primera y tercera regiones puede tener entre 4 y 10 nucleótidos. La sonda puede tener al menos dos conformaciones diferentes: (A) una conformación en donde la sonda no se hibrida con su secuencia a detectar, y en donde la primera y la tercera regiones se hibridan la una con la otra; esta conformación puede ser una estructura «ahorquillada», en donde la primera y la tercera regiones forman el tallo y la segunda región forma el bucle, y (B) una conformación en donde la sonda se hibrida con su secuencia a detectar; en esta conformación, la segunda región o una porción de la misma se hibrida con su secuencia a detectar, y la primera y la tercera regiones no se hibridan la una a la otra. En la conformación (A) de la sonda, el indicador fluorescente

y el extintor (que está localizados en los extremos opuestos de la sonda / en los extremos externos de la primera y la tercera regiones) pueden estar en estrecha proximidad el uno del otro (al estar ambos en el extremo de la estructura del tallo formada por la hibridación de la primera y de la tercera regiones), de tal manera que se apaga el indicador fluorescente. En la conformación (B) de la sonda, el indicador fluorescente y el extintor pueden no estar en estrecha proximidad el uno del otro, de tal forma que el indicador fluorescente no se apaga. La sonda se puede utilizar para vigilar la acumulación de un producto de reacción seleccionado, por ejemplo, en las condiciones de reacción en las que la sonda puede formar una estructura ahorquillada o bien hibridarse con su secuencia a detectar. En algunas realizaciones, si la secuencia a detectar está presente, la sonda se puede hibridar con la secuencia a detectar, y la sonda puede emitir fluorescencia en respuesta a la luz de una longitud de onda del espectro de excitación del fluoróforo. En cambio, si la secuencia a detectar no está presente, la sonda puede formar una estructura ahorquillada y no emitir fluorescencia en respuesta a la luz de una longitud de onda del espectro de excitación del fluoróforo.

En otro ejemplo, una sonda de ácido nucleico puede contener un indicador fluorescente en su extremo 5' o 3', y se puede hibridar a un cebador de ácido nucleico que contiene un extintor. El cebador de ácido nucleico que contiene un extintor puede contener el extintor en una posición en el cebador de tal forma que cuando la sonda de ácido nucleico se hibrida con el cebador, se apaga el indicador fluorescente. La sonda se puede utilizar para vigilar la acumulación de un producto de reacción seleccionado, por ejemplo, en las condiciones de reacción en las que la sonda puede hibridarse al cebador o bien hibridarse con su secuencia a detectar. En algunas realizaciones, si la secuencia a detectar está presente, la sonda puede hibridarse con la secuencia a detectar y la sonda puede emitir fluorescencia en respuesta a la luz de una longitud de onda del espectro de excitación del fluoróforo. En cambio, si no está presente la secuencia a detectar, la sonda puede permanecer emparejada con el cebador y no emitir fluorescencia en respuesta a la luz de una longitud de onda del espectro de excitación del fluoróforo.

En las sondas que contienen una pareja de indicador fluorescente y extintor, el indicador fluorescente y el extintor se pueden seleccionar de tal manera que el extintor pueda apagar al indicador con eficacia. En algunas realizaciones, un indicador fluorescente está emparejado con un extintor, en donde el máximo de emisión del indicador fluorescente es similar al máximo de absorción del extintor. Los fluoróforos que se pueden utilizar como indicador fluorescente incluyen, por ejemplo, CAL Fluor Gold, CAL Fluor Orange, Quasar 570, CAL Fluor Red 590, CAL Fluor Red 610, CAL Fluor Red 610, CAL Fluor Red 635, Quasar 670 (Biosearch Technologies), VIC, NED (Life Technologies), Cy3, Cy5, Cy5.5 (GE Healthcare Life Sciences), Oyster 556, Oyster 645 (Integrated DNA Technologies), LC Red 610, LC Red 610, LC Red 640, LC Red 670, LC Red 705 (Roche Applied Science), Texas Red, FAM, TET, HEX, JOE, TMR y ROX. Los extintores que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, DDQ-I, DDQ-II (Eurogentec), Eclipse (Epoch Biosciences), Iowa Black FQ, Iowa Black RQ (Integrated DNA Technologies), BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3 (Biosearch Technologies), QSY-7, QSY-21 (Molecular Probes) y Dabcyl.

En algunas realizaciones, un método dado a conocer en la presente memoria se puede vigilar en un aparato que contiene una fuente de luz y un sensor óptico. En algunas situaciones, la reacción puede estar colocada en el recorrido de la luz desde la fuente de luz, y se puede medir la luz absorbida por la muestra (p. ej., en el caso de una reacción con turbidez), la dispersada por la muestra (p. ej., en el caso de una reacción con turbidez), o la emitida por la muestra (p. ej., en el caso de una reacción que contiene una molécula fluorescente). En algunas realizaciones, se puede llevar a cabo un método dado a conocer en la presente memoria, o se puede vigilar en un dispositivo o módulo en este, tal y como se describe en la solicitud de publicación de patente de los EE. UU. n.º US 2014/0073043.

Con el uso de los métodos dados a conocer en la presente memoria, los productos de amplificación específicos de una plantilla de ácido nucleico de interés se pueden identificar en menos de, por ejemplo, 30 s, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min o 240 min desde el inicio de una reacción de amplificación. En otros ejemplos, con el uso de los métodos dados a conocer en la presente memoria, se pueden identificar las reacciones de amplificación que son positivas para una plantilla del ácido nucleico de interés cuando se generan tan solo 10, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000 o 1000000 copias de la plantilla. En otros ejemplos, con el uso de los métodos dados a conocer en la presente memoria se puede identificar la presencia de una plantilla del ácido nucleico de interés en una muestra que contiene tan solo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 5000 o 10000 copias de la plantilla de interés al comienzo del método.

En las realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria se pueden utilizar para ensayar una muestra en busca de un ácido nucleico deseado y de interés. En determinadas realizaciones, la presencia o la cantidad de un ácido nucleico deseado y de interés en una muestra se puede determinar por un método que implica la determinación de un tiempo de inflexión para la amplificación del ácido nucleico en una reacción. Un tiempo de inflexión / punto de inflexión es un tiempo o un punto en el que se determina que una reacción de amplificación es positiva para una plantilla de ácido nucleico. Un tiempo/punto de inflexión se puede identificar a través de uno o varios indicadores, tales como, por ejemplo, el tiempo transcurrido tras el inicio de una reacción cuando se ha generado una cantidad seleccionada de ácido nucleico en la reacción, el momento en

el que la tasa de amplificación en la reacción cambia de una fase basal a una fase exponencial, o el momento en el que la tasa de amplificación en una reacción cambia de una fase exponencial a una fase estacionaria, etc. En las realizaciones, un tiempo/punto de inflexión se puede identificar sobre la base de un cambio de fluorescencia o absorbancia de una reacción, o después de que alcance un valor seleccionado la fluorescencia o la absorbancia de una reacción. En determinadas realizaciones, la presencia o la cantidad de un ácido nucleico deseado y de interés en una muestra se puede determinar por un método que implica la comparación de un tiempo de inflexión para la amplificación del ácido nucleico de una reacción de la cual se desconoce la cantidad de ácido nucleico deseado y de interés frente a uno o ambos de: i) una reacción que se sabe que carece del ácido nucleico deseado y de interés (a saber, un control negativo) o ii) una reacción que se sabe que contiene el ácido nucleico deseado y de interés (a saber, un control positivo). En las realizaciones, tanto una reacción que contiene el ácido nucleico deseado y de interés como una reacción que no contiene el ácido nucleico deseado se pueden medir en busca de un tiempo de inflexión seleccionado. En las realizaciones, la presencia de un ácido nucleico deseado y de interés en una muestra se puede determinar basándose en un método que implica la evaluación de la diferencia en el tiempo entre la inflexión de una reacción que contiene una muestra que puede o no puede contener un ácido nucleico deseado y de interés, y un tiempo de inflexión de una o varias reacciones con el estado conocido del ácido nucleico deseado y de interés (p. ej. que se sabe que contiene o que no contiene el ácido nucleico deseado y de interés). Por ejemplo, se puede identificar que una muestra contiene un ácido nucleico deseado y de interés si el tiempo de inflexión de la reacción de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria se adelanta al menos 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 o 180 min con respecto a una correspondiente reacción que se sabe que no contiene el ácido nucleico deseado y de interés. En otro ejemplo, se puede identificar que una muestra contiene un ácido nucleico deseado y de interés si el tiempo de inflexión de la reacción de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria no se retrasa más de 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 o 180 min con respecto a una reacción correspondiente que se sabe que contiene el ácido nucleico deseado y de interés.

Los métodos dados a conocer en la presente memoria se pueden realizar durante cualquier longitud de tiempo. Típicamente, el método se realizará durante una cantidad de tiempo suficiente para vigilar, por ejemplo, la velocidad de replicación del ácido nucleico, la aparición de la actividad polimerasa, o la acumulación del producto de amplificación. En algunas realizaciones, un método dado a conocer en la presente memoria se puede llevar a cabo durante un total de menos de 10 s, 30 s, 1 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h, 16 h o 24 h, tiempo tras el cual se mide la velocidad de replicación del ácido nucleico, la aparición de la actividad polimerasa o la acumulación del producto de amplificación.

Los métodos dados a conocer en la presente memoria se pueden terminar de diferentes maneras. En una realización, las etapas de un método pueden finalizar tras la reducción de la concentración o el consumo completo de uno o varios reactantes implicados en una o varias etapas del método (p. ej., dNTP). En otra realización, las etapas de un método pueden terminar tras la inactivación de una o varias enzimas implicadas en una o varias etapas del método (p. ej., polimerasas). Las enzimas se pueden inactivar de diferentes maneras. Por ejemplo, las enzimas pueden ir perdiendo poco a poco la actividad enzimática con el tiempo debido a fenómenos aleatorios que alteran la estructura de la enzima, o las enzimas pueden quedar expuestas a una condición que acelera la inactivación de la actividad enzimática (p. ej., calor elevado, pH extremo, etc.).

Un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla comprende una única copia de una plantilla de ácido nucleico bicatenario. En algunas realizaciones, todo el ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla es una plantilla de ácido nucleico bicatenario. En algunas realizaciones, un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla contiene nucleótidos adicionales a los de la plantilla de ácido nucleico bicatenario. En algunas realizaciones, un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla solo comprende copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario. En algunas realizaciones, un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla contiene nucleótidos adicionales a los de las plantillas de ácido nucleico bicatenario. Típicamente, los ácidos nucleicos bicatenarios lineales de plantilla dados a conocer en la presente memoria tienen extremos romos. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos bicatenarios lineales de plantilla pueden tener extremos cohesivos («extremos cohesivos» hace referencia a los extremos que tienen una hebra protuberante que tiene uno o varios nucleótidos sin emparejar). Un ácido nucleico bicatenario lineal de plantilla puede contener ADN, ARN, o una mezcla de los mismos.

Un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla se puede generar mediante cualquier procedimiento en donde se puede formar un ácido nucleico bicatenario que contiene una única copia de una plantilla de ácido nucleico bicatenario. Por ejemplo, se puede generar un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla a partir de un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla previo de acuerdo con un procedimiento de replicación basada en cebadores descrito en la presente memoria. En otro ejemplo, se puede generar un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla a partir de un ácido nucleico circular que contiene la secuencia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, mediante un procedimiento de replicación basada en cebadores. En otro ejemplo, se puede generar un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla a partir de una molécula de ARN monocatenario a través de un procedimiento en el que interviene una transcriptasa inversa. En otro ejemplo, se puede generar un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla mediante la ligación de extremo con extremo del ácido nucleico bicatenario que no contiene ninguna copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario con un ácido nucleico bicatenario lineal monoplantilla previo. Un ácido nucleico bicatenario lineal

multiplantilla se puede generar mediante cualquier procedimiento en el cual se puede formar un ácido nucleico bicatenario que contiene dos o más copias de una plantilla de ácido nucleico bicatenario, tal como mediante los procedimientos descritos en la presente memoria. Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «ácido nucleico bicatenario lineal de plantilla» incluye tanto los ácidos nucleicos bicatenarios lineales monoplantilla como los ácidos nucleicos bicatenarios lineales multiplantilla.

Un ácido nucleico bicatenario lineal de plantilla puede tener cualquier longitud de nucleótidos. Por ejemplo, un ácido nucleico bicatenario lineal de plantilla puede tener al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 750, 1000 o 1500 nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, un ácido nucleico bicatenario lineal de plantilla puede tener entre 2 y 100000, entre 5 y 100000, entre 10 y 100000, entre 15 y 100000, entre 20 y 100000, entre 25 y 100000, entre 30 y 100000, entre 50 y 100000, entre 70 y 100000, entre 100 y 100000, entre 200 y 100000, entre 2 y 10000, entre 5 y 10000, entre 10 y 10000, entre 15 y 10000, entre 20 y 10000, entre 25 y 10000, entre 30 y 10000, entre 50 y 10000, entre 70 y 10000, entre 100 y 10000, entre 200 y 10000, entre 2 y 5000, entre 5 y 5000, entre 10 y 5000, entre 15 y 5000, entre 20 y 5000, entre 25 y 5000, entre 30 y 5000, entre 50 y 5000, entre 70 y 5000, entre 100 y 5000, entre 200 y 5000, entre 2 y 3000, entre 5 y 3000, entre 10 y 3000, entre 15 y 3000, entre 20 y 3000, entre 25 y 3000, entre 30 y 3000, entre 50 y 3000, entre 70 y 3000, entre 100 y 3000, entre 200 y 3000, entre 2 y 1000, entre 5 y 1000, entre 10 y 1000, entre 15 y 1000, entre 20 y 1000, entre 25 y 1000, entre 30 y 1000, entre 50 y 1000, entre 70 y 1000, entre 100 y 1000, entre 200 y 1000, entre 2 y 500, entre 5 y 500, entre 10 y 500, entre 15 y 500, entre 20 y 500, entre 25 y 500, entre 30 y 500, entre 50 y 500, entre 70 y 500, entre 100 y 500, o entre 200 y 500 bases de nucleótidos de longitud.

Una plantilla de ácido nucleico bicatenario se puede generar mediante cualquier método dado a conocer en la presente memoria para la generación de un ácido nucleico bicatenario lineal de plantilla dado a conocer en la presente memoria.

En algunas realizaciones, una plantilla de ácido nucleico bicatenario es una molécula de ADN bicatenario que se generó a partir de una molécula de ARN (p. ej., una molécula de ARN monocatenario, tal como ARNm). Una molécula de ADN bicatenario se puede generar a partir de una molécula de ARN mediante las técnicas que se conocen bien en la materia, por ejemplo, mediante la transcripción inversa. Las condiciones de ejemplo para generar una molécula de ADN bicatenario a partir de una molécula de ARN se dan a conocer, por ejemplo, en *RNA: A Laboratory Manual*, D. Rio et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (2011). Brevemente, en algunos ejemplos, un cebador que es complementario a una secuencia de ARN de interés se puede incubar con: enzima de tipo transcriptasa inversa (p. ej., transcriptasa inversa de AMV, transcriptasa inversa de M-MLV, transcriptasa inversa Superscript II™, transcriptasa inversa Superscript III™ o transcriptasa inversa ThermoScript™), dNTP y la secuencia de ARN de interés. El cebador puede hibridarse con el ARN y, a continuación, comenzando a partir del extremo en 3' del cebador, la transcriptasa inversa puede sintetizar una hebra de ADN complementaria al ARN (ADNc). En algunas realizaciones, el ARN hibridado al ADNc se puede degradar (p. ej., con una ARNasa; la ARNasa puede ser la transcriptasa inversa, que también puede tener actividad de ARNasa), y el ADNc puede incubarse entonces con: un cebador diferente que es complementario a la hebra del ADNc, dNTP, y una ADN polimerasa (p. ej., cualquier ADN polimerasa explicada en otro lugar de la presente memoria). A continuación, comenzando desde el extremo 3' del cebador diferente, la ADN polimerasa puede sintetizar una hebra de ADN complementaria al ADNc, con lo que se genera una molécula de ADN bicatenario lineal.

En algunas realizaciones, una plantilla de ácido nucleico bicatenario se puede generar a partir de una molécula de ARN monocatenario en la misma mezcla de reacción en la que se amplifica la plantilla del ácido nucleico bicatenario de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria. En algunas realizaciones, el mismo cebador se puede utilizar para A) la generación de una hebra de ADNc de una molécula de ARN, y B) como un primer o segundo cebador en el procedimiento de replicación basada en cebadores dado a conocer en la presente memoria.

En algunas realizaciones, una plantilla de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. A una única hebra de una plantilla de ácido nucleico se le puede hacer referencia en la presente memoria como una «plantilla polinucleotídica». Una «plantilla polinucleotídica», tal y como se le hace referencia en la presente memoria, no descarta que se una a una secuencia complementaria de la misma. En otros términos, una «plantilla polinucleotídica» puede ser, por ejemplo, la totalidad de una plantilla de ácido nucleico monocatenario, o puede ser una hebra de una plantilla de ácido nucleico bicatenario.

Una plantilla de ácido nucleico bicatenario puede tener cualquier longitud de nucleótidos. Por ejemplo, una plantilla de ácido nucleico bicatenario puede tener al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 750, 1000 o 1500 nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, una plantilla de ácido nucleico bicatenario puede tener entre 2 y 100000, entre 5 y 100000, entre 10 y 100000, entre 15 y 100000, entre 20 y 100000, entre 25 y 100000, entre 30 y 100000, entre 50 y 100000, entre 70 y 100000, entre 100 y 100000, entre 200 y 100000, entre 2 y 10000, entre 5 y 10000, entre 10 y 10000, entre 15 y 10000, entre 20 y 10000, entre 25 y 10000, entre 30 y 10000, entre 50 y 10000, entre

70 y 10000, entre 100 y 10000, entre 200 y 10000, entre 2 y 5000, entre 5 y 5000, entre 10 y 5000, entre 15 y 5000, entre 20 y 5000, entre 25 y 5000, entre 30 y 5000, entre 50 y 5000, entre 70 y 5000, entre 100 y 5000, entre 200 y 5000, entre 2 y 3000, entre 5 y 3000, entre 10 y 3000, entre 15 y 3000, entre 20 y 3000, entre 25 y 3000, entre 30 y 3000, entre 50 y 3000, entre 70 y 3000, entre 100 y 3000, entre 200 y 3000, entre 2 y 1000, entre 5 y 1000, entre 10 y 1000, entre 15 y 1000, entre 20 y 1000, entre 25 y 1000, entre 30 y 1000, entre 50 y 1000, entre 70 y 1000, entre 100 y 1000, entre 200 y 1000, entre 2 y 500, entre 5 y 500, entre 10 y 500, entre 15 y 500, entre 20 y 500, entre 25 y 500, entre 30 y 500, entre 50 y 500, entre 70 y 500, entre 100 y 500, o entre 200 y 500 bases de nucleótidos de longitud.

Un «cebador», tal y como se utiliza en la presente memoria, puede hacer referencia a un polinucleótido que es i) capaz de hibridarse a una hebra de ácido nucleico original y ii) actuar como un punto de inicio para la síntesis de una nueva hebra de ácido nucleico, en donde la nueva hebra de ácido nucleico es un producto de extensión del cebador y es complementaria a la hebra original. Un cebador puede tener un grupo -OH libre en su extremo 3', que puede servir de origen para la síntesis del producto de extensión.

Un cebador puede contener nucleótidos estándares [p. ej., desoxirribonucleótidos de ADN estándares (monofosfato de desoxiadenosina, monofosfato de desoxiguanosina, monofosfato de timidina, monofosfato de desoxicitidina), o ribonucleótidos de ARN estándares (monofosfato de adenosina, monofosfato de guanosina, monofosfato de uridina, monofosfato de citidina)], nucleótidos alternativos (p. ej., inosina), nucleótidos modificados, análogos de nucleótidos, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, un cebador oligonucleotídico puede incluir ácidos peptidonucleicos, morfolinos (p. ej., oligonucleótidos de fosfordiamidato de morfolino), ácidos nucleicos bloqueados [véase, por ejemplo, Kaur, H. et al., *Biochemistry* 45 (23), 7347-55 (2006)], ácidos nucleicos glicosados, o ácidos nucleicos treosados. Un cebador puede tener un esqueleto que incluye, por ejemplo, enlaces fosfodiéster, enlaces fosforotioato (un O sin puentear está remplazado por azufre), o enlaces peptídicos (como parte de un ácido peptidonucleico). A los nucleótidos alternativos, a los nucleótidos modificados y a los análogos de nucleótidos se les puede hacer referencia conjuntamente en la presente memoria como «nucleótidos no estándares».

La presencia de un nucleótido no estándar en un cebador puede afectar a diferentes propiedades del cebador. En algunas realizaciones, la inclusión de un nucleótido no estándar en un cebador puede incrementar o disminuir la estabilidad termodinámica de un cebador por una secuencia complementaria del mismo. Por ejemplo, un cebador que tiene incrementada su estabilidad termodinámica puede contener un ácido nucleico bloqueado. Un cebador que tiene disminuida la estabilidad termodinámica puede contener, por ejemplo, inosina (descrito por Auer et al., *Nucl. Acids. Res.* 24; 5021-5025 (1996)) o un grupo químico cargado negativamente, tal como un ácido carboxílico.

Un cebador dado a conocer en la presente memoria puede tener cualquier longitud. En algunas realizaciones, un cebador puede tener al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 750, 1000 o 1500 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, un cebador puede tener no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 750, 1000 o 1500 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, un cebador puede tener una longitud seleccionada de un margen que tiene un valor mínimo de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 750, o 1000 nucleótidos de longitud, y un valor máximo de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 750, 1000 o 1500 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, un cebador puede tener cualquier longitud y contener cualquier secuencia de nucleótidos que permita la hibridación suficientemente estable y específica del cebador a su complemento a la temperatura que se utiliza para un método o etapa del mismo en el que participa el cebador. La longitud exacta deseada de un cebador puede depender de muchos factores, que incluyen la temperatura de una reacción, la composición química del cebador, y la reacción en la que participa el cebador. En algunas realizaciones, la región de fijación a la plantilla de un cebador puede tener cualquier longitud y contener cualquier secuencia de nucleótidos que permita la hibridación suficientemente estable y específica de la región de fijación a la plantilla del cebador a su complemento a la temperatura que se utiliza para un método o etapa del mismo en el que participa el cebador. La longitud exacta deseada de la región de fijación a la plantilla de un cebador puede depender de muchos factores, entre ellos la temperatura de una reacción, la composición química de la región de fijación a la plantilla del cebador, y la reacción en la que participa el cebador. La inclusión de uno o varios nucleótidos no estándares en el cebador puede cambiar la longitud deseada del cebador que se usa en un método dado a conocer en la presente memoria, en comparación con la longitud de un cebador correspondiente que carece de un nucleótido no estándar. Por ejemplo, si con un método dado a conocer en la presente memoria se desea tener un cebador con una T_m determinada, en algunas realizaciones, un cebador con la T_m seleccionada puede tener una longitud más corta si el cebador contiene al menos algunos nucleótidos no estándares, en comparación con si el cebador contiene solo nucleótidos estándares.

Un cebador dado a conocer en la presente memoria se puede preparar mediante cualquier método idóneo. Por ejemplo, un cebador se puede sintetizar químicamente. En otro ejemplo, un ácido nucleico que se produce de forma natural se puede aislar, escindir (p. ej., con enzimas de restricción) y/o modificar para generar o formar parte de un cebador descrito en la presente memoria.

5 En algunas realizaciones, se puede unir un marcador a un cebador. Los marcadores incluyen, por ejemplo, ligandos de fijación (p. ej., digoxina o biotina), enzimas, moléculas fluorescentes/fluoróforos, moléculas luminiscentes, moléculas extintoras, o radioisótopos. En otras realizaciones, una base de un oligonucleótido se puede remplazar por un análogo fluorescente, tal como la 2-aminopurina (véase, por ejemplo, *Proc. Acad. Sci. USA*, 91, 6644-6648 (1994)).

10 En algunas realizaciones, las condiciones tal como: i) un cebador se hibrida a una hebra de plantilla en un procedimiento de replicación basada en cebadores dado a conocer en la presente memoria, o ii) una región del extremo 3' de una primera hebra de un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla se hibrida con una región del extremo 3' de una segunda hebra de un ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla, para producir un estructura entrecruzada que comprende estas hebras, pueden cada una incluir la incubación de los ácidos nucleicos a una temperatura de tal forma que las hebras de las moléculas de ácido nucleico bicatenario «respiren» (a saber, se sometan a periodos breves de ruptura localizada de los puentes de hidrógeno que conectan los pares de bases) a un nivel suficiente para que se facilite la entrada de un cebador o de una hebra de ácido nucleico diferente entre las hebras de una molécula bicatenaria, y la hibridación del cebador o hebra de ácido nucleico diferente a una de las hebras de la molécula de ácido nucleico bicatenario abierta. En algunas realizaciones, los métodos o los procedimientos dados a conocer en la presente memoria se pueden realizar o incubar a una temperatura de al menos 10, 15, 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, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 90 o 95 °C. En algunas realizaciones, los métodos o los procedimientos dados a conocer en la presente memoria se pueden realizar o incubar a una temperatura de no más de 10, 15, 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, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 90 o 95 °C. En algunas realizaciones, los métodos o los procedimientos dados a conocer en la presente memoria se pueden realizar o incubar a una temperatura entre 10, 15, 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, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 o 90 °C y 15, 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, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 90 o 95 °C.

35 En algunas realizaciones, para un método o procedimiento dado a conocer en la presente memoria, la etapa o procedimiento se realiza a una temperatura por debajo de la temperatura de fusión (T_m) de las hebras relevantes de nucleótidos potencialmente emparejados, o regiones de las mismas (p. ej., un cebador de una hebra de plantilla de ácido nucleico o una región del extremo 3' de una primera hebra de un primer ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla se hibrida con una región del extremo 3' de una segunda hebra de un segundo ácido nucleico bicatenario lineal multiplantilla, etc.). En algunas realizaciones, para un método o procedimiento dado a conocer en la presente memoria, el procedimiento o el método se realiza a una temperatura por encima de la T_m de las hebras relevantes de nucleótidos potencialmente emparejados, o regiones de las mismas. Por lo general, «temperatura de fusión» de una secuencia de nucleótidos hace referencia a la temperatura en la que el 50% de los ácidos nucleicos que tienen la secuencia de nucleótidos se emparejan según la base a una secuencia complementaria de la misma (a saber, están en una molécula bicatenaria) y el 50% de los ácidos nucleicos que tienen la secuencia de nucleótidos están en una forma monocatenaria.

50 En algunas realizaciones, una polimerasa de ácido nucleico se incluye con un método o composición dado a conocer en la presente memoria. Una polimerasa puede generar un producto de extensión de un cebador. El cebador y el producto de extensión del mismo pueden ser complementarios de una hebra de ácido nucleico de plantilla. Por lo general, una polimerasa de ácido nucleico iniciará la síntesis de un producto de extensión de un cebador en el extremo en 3' del cebador. En algunas realizaciones, se incluye una ADN polimerasa con un método o composición dados a conocer en la presente memoria. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «ADN polimerasa» hace referencia a una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad polimerasa de manera principal o exclusiva sobre las plantillas de ADN. En algunas realizaciones, se incluye una transcriptasa inversa con un método o una composición dados a conocer en la presente memoria. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «transcriptasa inversa» hace referencia a una polimerasa de ácido nucleico que puede sintetizar una hebra de ADN a partir de una plantilla de ARN. En algunas realizaciones, una ARN polimerasa puede estar incluida en un método o composición dado a conocer en la presente memoria. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «ARN polimerasa» se refiere a una polimerasa de ácido nucleico que puede sintetizar una hebra de ARN a partir de una plantilla de ADN o ARN.

60 En algunas realizaciones, una polimerasa dada a conocer en la presente memoria puede tener actividad de

desplazamiento de hebra. Las polimerasas que tienen actividad de desplazamiento de hebra incluyen, por ejemplo, la ADN polimerasa exo-Bca, la ADN polimerasa de $\phi 29$, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, la ADN polimerasa Vent_R, la ADN polimerasa Deep Vent_R, la ADN polimerasa 9°N_m y el gran fragmento grande de la ADN polimerasa Bst. También se pueden utilizar otras polimerasas que tienen una actividad de desplazamiento de hebra.

Las versiones modificadas de las polimerasas también se pueden utilizar con los métodos y las composiciones que se dan a conocer en la presente memoria, siempre y cuando la polimerasa modificada tenga actividad de síntesis de ácido nucleico dependiente de secuencia. Una versión modificada de una polimerasa («polimerasa modificada») puede tener, por ejemplo, 100 o menos, 70 o menos, 50 o menos, 40 o menos, 30 o menos, 20 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o menos o 1 aminoácido diferente de la secuencia de la versión original de la polimerasa. En algunas realizaciones, una polimerasa modificada puede contener no más de 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10 o 5, más o menos, aminoácidos que la polimerasa original. En algunas realizaciones, una polimerasa modificada puede comprender un fragmento de una polimerasa original. En algunas realizaciones, una polimerasa modificada puede comprender un polipéptido quimérico con una porción procedente de una polimerasa y una porción procedente de una proteína que no es polimerasa. En algunas realizaciones, una polimerasa modificada puede tener, por ejemplo, un incremento de la actividad catalítica, incremento de la estabilidad o incremento de la termoestabilidad en comparación con la polimerasa original.

En algunas realizaciones, una polimerasa dada a conocer en la presente memoria es termoestable. Una polimerasa termoestable puede tener, por ejemplo, una semivida de al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 o 180 min a una temperatura de hasta 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 °C. En algunas realizaciones, una polimerasa modificada puede ser termoestable.

En algunas realizaciones, los métodos y los procedimientos dados a conocer en la presente memoria incluyen o se realizan en las condiciones suficientes para soportar la síntesis de ácidos nucleicos basada en la polimerasa. Las condiciones de ejemplo para la síntesis de ácidos nucleicos basada en la polimerasa se conocen bien en la técnica y se dan a conocer, por ejemplo, en Green y Sambrook, véase más arriba. Los componentes no limitantes para una reacción de síntesis de ácidos nucleicos basada en la polimerasa pueden incluir uno o varios de: enzima de tipo polimerasa (a una concentración entre, por ejemplo, 0,01 y 10 unidades de enzima por 50 μ l de volumen de reacción, o cualquier margen en este que incluye, por ejemplo, entre 0,01-1, 0,1-10, 0,1-5, 0,5-10, 0,5-5, 0,5-2, 1-10 o 1-5 unidades de enzima por 50 μ l de volumen de reacción, en donde 1 unidad de enzima incorporará 15 mmol de dNTP en el producto de polimerización en 30 min a 75 °C); plantilla (a una concentración de al menos, por ejemplo, 1, 10, 100, 1000, 10000 o 100000 copias por reacción); cebador (a una concentración entre, por ejemplo, 0,01 y 10 μ mol/l o cualquier margen en estos que incluye, por ejemplo, entre 0,01-1, 0,1-10, 0,1-5, 0,5-5 o 0,5-2 μ M); dNTP (p. ej., dATP, dTTP, dGTP y dCTP, a una concentración entre, por ejemplo, 50 y 500 μ M cada uno de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, o cualquier margen en estos que incluye, por ejemplo, entre 50-350, 100-500, 100-300, 200-500 o 300-400 μ M cada uno de dATP, dTTP, dGTP y dCTP); sal (p. ej., KCl o acetato de potasio, a una concentración entre, por ejemplo, 1 y 200 mM, o cualquier margen en este, que incluye, por ejemplo, entre 1-100, 1-50, 1-20, 1-10, 10-20, 10-50 o 10-200 mM); tampón (p. ej., Tris-HCl o Tris-acetato, pH 7,8-8,5, a una concentración entre, por ejemplo, 1 y 100 mM o cualquier margen en este que incluye, por ejemplo, entre 1-50, 1-20, 1-10, 1-5, 10-100, 20-100 o 50-100 mM); e iones de magnesio (a una concentración entre, por ejemplo, 0,1 y 10 mM, o cualquier margen en este, que incluye, por ejemplo, entre 0,1-5, 0,1-1, 0,5-10, 0,5-5 o 0,5-2,5 mM). Otros componentes no limitantes para una reacción de síntesis de ácidos nucleicos basada en la polimerasa pueden incrementar la velocidad de la reacción, incrementar la fidelidad de la reacción o incrementar la estabilidad de las enzimas o del ADN en la reacción, y pueden incluir uno o varios de: gelatina (a una concentración entre, por ejemplo, el 0,0001% y el 0,1% p/v), SAB (a una concentración entre, por ejemplo, 0,01 y 1 μ g/ μ l), sacarosa (a una concentración entre, por ejemplo, 0,01 M y 0,8 M), trehalosa (a una concentración entre, por ejemplo, 0,01 M y 0,8 M), DMSO (a una concentración entre, por ejemplo, el 0,01 y el 10% v/v), betaína (a una concentración entre, por ejemplo, 0,1 y 10 M), formamida (a una concentración entre, por ejemplo, el 0,1 y el 10% v/v), glicerol (a una concentración entre, por ejemplo, el 0,1 y el 20% v/v), polietilenglicol (a una concentración entre, por ejemplo, el 0,1 y el 20% v/v), detergentes no iónicos [p. ej., NP-40 (a una concentración entre, por ejemplo, el 0,01 y el 1% v/v), Tween-20 (a una concentración entre, por ejemplo, el 0,01 y el 1% v/v) o Triton X-100 (a una concentración entre, por ejemplo, el 0,01 y el 1% v/v)], iones de amonio [p. ej., sulfato de amonio (a una concentración entre, por ejemplo, 1 y 100 mM)] y EDTA (a una concentración entre, por ejemplo, 0,001 y 0,1 mM). También pueden estar presentes otros reactantes en una reacción de síntesis de ácidos nucleicos basada en la polimerasa dada a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden utilizar los reactantes suficientes para sintetizar productos de reacción del ARN o productos de reacción que contienen nucleótidos no estándares. Las condiciones suficientes para soportar la síntesis de ácidos nucleicos basada en la polimerasa pueden incluir multitud de temperaturas y valores de pH. Por ejemplo, el pH de una reacción de síntesis de ácidos nucleicos basada en la polimerasa está entre, por ejemplo, pH 6,0 y pH 10,0 tal como 6,5, 7, 7,5, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,5, 9 o 9,5. La temperatura de una reacción de síntesis de ácidos nucleicos basada en la polimerasa puede ser constante o variar. Una temperatura constante puede estar, entre, por ejemplo, 10 °C y 95 °C, tal como 20, 25, 30, 35, 37, 40, 42, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 u 85 °C. Una temperatura

variada puede estar en dos o más temperaturas diferentes entre, por ejemplo, 10 °C y 95 °C, tal como dos o más temperaturas seleccionadas de 20, 25, 30, 35, 37, 40, 42, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 u 85 °C.

5 En algunas realizaciones, se incluye una ligasa de ácidos nucleicos con un método o composición dado a conocer en la presente memoria. Las ligasas catalizan la formación de enlaces fosfodiéster entre los nucleótidos, típicamente entre el fosfato en 5' de un nucleótido y el grupo hidroxilo en 3' de otro nucleótido.

Las ligasas de ácidos nucleicos incluyen la ADN ligasa de *E. coli*, la ADN ligasa de *Taq*, la ADN ligasa de T3, la ADN ligasa de T4, la ADN ligasa de T7, Ampligase™, la ARN ligasa 1 de T4 y la ARN ligasa 2 de T4.

10 Para catalizar la reacción de ligación, determinadas ligasas requieren ATP (p. ej., la ADN ligasa de T4) o NAD⁺ (ADN ligasa de *E. coli*). En algunas realizaciones, una ligasa puede ligar ácidos nucleicos que tienen extremos romos. En algunas realizaciones, una ligasa puede ligar ácidos nucleicos que tienen extremos cohesivos. En algunas realizaciones, una ligasa puede ligar ácidos nucleicos que tienen tanto extremos romos como cohesivos.

15 Las versiones modificadas de las ligasas también se pueden utilizar con los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria, siempre y cuando la ligasa modificada tenga la capacidad de catalizar la formación de enlaces fosfodiéster entre los nucleótidos. Una versión modificada de una ligasa («ligasa modificada») puede tener, por ejemplo, 100 o menos, 70 o menos, 50 o menos, 40 o menos, 30 o menos, 20 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o menos o 1 aminoácido diferente de la secuencia de la versión original de la ligasa que se produce en la naturaleza. En algunas realizaciones, una ligasa modificada puede contener no más de 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, o 5, más o menos, aminoácidos que la ligasa original. En algunas realizaciones, una ligasa modificada puede comprender un fragmento de una ligasa original. En algunas realizaciones, una ligasa modificada puede comprender un polipéptido quimérico con una porción procedente de una ligasa y una porción procedente de una proteína que no es ligasa. En algunas realizaciones, una ligasa modificada puede tener, por ejemplo, un incremento de la actividad catalítica, incremento de la estabilidad o incremento de la termoestabilidad en comparación con la ligasa original.

20

25

En algunas realizaciones, una ligasa dada a conocer en la presente memoria es termoestable. Una ligasa termoestable puede tener, por ejemplo, una semivida de al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 o 180 min a una temperatura de hasta 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 °C. En algunas realizaciones, una ligasa modificada puede ser termoestable.

30 En algunas realizaciones, una ligasa utilizada con los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria puede ser una ligasa modificada a la que se hace referencia en la presente memoria como «p50-Tth», que tiene esta secuencia de aminoácidos:

MGHHHHHHHHSSGHIEGRASADGPYLQILEQPKQRGFRFRYVCEGPSHGGLPGASSEK
 NKKSYPQVKICNYVGPAAKVVQLVTNGKNIHLHAHSLVGHKCEDGICTVTAGPKDMVVGAFAN
 LGILHVTKKKVFETLEARMTEACIRGYNPGLLVHPDLAYLQAEGGGDRQLGDREKELIRQAA
 LQQTKEMDLSVVRMLMFTAFLPDSTGSFTRRLEPVVSDAIYDSKAPNASNLKIVRMDRTAGCVT
 GGEEIYLLCDKVQKDDIQIRFYEEEENGGVWEGFGDFSPTDVHRQFAIVFKTPKYKDINITKP
 ASVFFVQLRRKSDLETSEPKPFLYYPEIKDKEEVQRKRQKSSGTSGGGSGGGMTLEEARKR
VNELRDLIRYHNYRYVVLADPEISDAEYDRLRELKELEERFPELKSPDSPTLQVGARPL
EATFRPVRHPTRMYSLDNAFNLDLKAFEERIERALGRKGPFAYTVEHKVDGLSVNLYY
EEGVLVYGATRGDGEVGEVVTQNLTIPTIPRRLKGVPERLEVRGEVYMPIEAFRLNEE
LEERGERIFKNPRNAAAGSLRQKDPRIKRLRATFYALGLGLEEVEREGVATQFALL
HWLKEKGFVVEHGYARAUGAEGVEAVYQDWLKKRRALPFEADGVVVKLDELALWRE
LGYTARAPRFAIAYKFAEEKETRLLDVVFQVGRVTPVGILEPVFLEGSEVSRVTLH
NESYIEELDIRIGDWVLVHKAGGVIPEVLRVLKERRTGEERPIRWPETCPECGRLLKEG
KVHRCNPPLCPAKRFEAIRHFASRKAMDIQGLGEKLIERLLEKGLVKDVADLYRLKED
LVGLERMGEKSAQNLLRQIEESKKRGLERLLYALGLPGVGEVLARNLAARFGNMDRLL
EASLEELLEVEEVGELTARAILETLKDPAFRDLVRRLLKEAGVEMEAKEKGGALKGLTF
VITGELSRPREEVKALLRRLGAKVTDSVSRKTSYLVVGENPGSKLEKARALGVPTLTEE
LYRLLLEARTGKKAEEELV

(SEQ ID n.º 1). La ligasa p50-Tth tiene actividad termoestable de ligación de extremos romos a temperaturas de como mínimo 60 °C. La ligasa p50-Tth es una proteína quimérica que comprende una secuencia líder que contiene His10, una secuencia de p50 de los aminoácidos 40-366 (indicados en cursiva) de la proteína NF-κB de humanos con el número de acceso NP_003989, una secuencia flexible rica en glicinas y una secuencia de la ADN ligasa Tth, de *Thermus thermophilus* HB8, con número de acceso YP_144363 (indicado con subrayado). En algunas realizaciones, se puede utilizar una versión modificada de la ligasa p50-Tth con los métodos y las composiciones dadas a conocer en la presente memoria (p. ej., con 100 o menos, 70 o menos, 50 o menos, 40 o menos, 30 o menos, 20 o menos, 10 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, 2 o menos o 1 aminoácido diferente de la ligasa p50-Tth). En las realizaciones, una ligasa utilizada con una composición o método dado a conocer en la presente memoria puede ser una ligasa descrita en la solicitud de patente internacional WO 2014/145269.

Los métodos dados a conocer en la presente memoria se pueden llevar a cabo a una serie de temperaturas. En algunas realizaciones, se llevan a cabo a la misma temperatura todas las etapas de un método. Así pues, el ciclado de la temperatura, tal como en la PCR, no es necesario con los métodos descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria se pueden llevar a cabo a dos o más temperaturas diferentes. En algunas realizaciones, una mezcla de reacción que contiene reactantes para un método dado a conocer en la presente memoria se incuba a dos o más temperaturas diferentes. En algunos ejemplos, se pueden seleccionar diferentes temperaturas para optimizar la velocidad, exactitud u otro rasgo de diferentes procedimientos de un método dado a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, se puede seleccionar una temperatura para que se incremente la actividad enzimática de una polimerasa. En algunos ejemplos, se pueden seleccionar diferentes temperaturas para que se incremente la especificidad de fijación de un cebador a una plantilla, o para que se incremente la accesibilidad de una plantilla a un cebador (p. ej., temperaturas más elevadas pueden favorecer la separación de los ácidos nucleicos bicatenarios de plantilla, o puede favorecer la fijación específica de secuencia que tienen los cebadores). En algunas realizaciones, todas las etapas de un método dado a conocer en la presente memoria se realizan a una temperatura de no más de 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 o 10 °C. En algunas realizaciones un método dado a conocer en la presente memoria se realiza a una temperatura entre 20-60, 30-70, 40-80, 30-40, 35-45, 40-50, 45-55, 50-60 o 55-65 °C. En determinadas realizaciones, una muestra que contiene un ácido nucleico deseado se puede calentar a una temperatura mayor de 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 95 °C antes del inicio de un método dado a conocer en la presente memoria. En determinadas realizaciones, una mezcla de reacción dada a conocer en la presente memoria se puede calentar una vez a una temperatura elevada mayor de 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 °C antes o después del comienzo de un método dado a conocer en la presente memoria. Después de calentar la mezcla de reacción a la temperatura elevada, se puede mantener a una temperatura menor tal y como se da a conocer en otro lugar en la presente memoria (p. ej., a una temperatura entre 40 y 70 °C) para el resto del funcionamiento del método. En las realizaciones, si una mezcla de la reacción o muestra

se calienta a una temperatura elevada antes del inicio de un método dado a conocer en la presente memoria, se puede añadir una polimerasa de ácido nucleico a la mezcla de reacción o muestra después de que la mezcla de reacción o la muestra se haya calentado a la temperatura elevada, y la mezcla de reacción o la muestra haya regresado a una temperatura menor, tal y como se da a conocer en la presente memoria. Los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar con o sin un termociclador.

Como una consideración, la temperatura utilizada para un método o procedimiento dado a conocer en la presente memoria se puede seleccionar para que sea adecuado para la enzima o enzimas que se utilizan en el método. En algunas realizaciones, para los métodos en los que se utiliza una polimerasa o una ligasa, la temperatura o temperaturas de la reacción se seleccionan de tal manera que no perjudica significativamente la actividad de la polimerasa ni de la ligasa (p. ej., la temperatura de la reacción se puede seleccionar de tal manera que la polimerasa y la ligasa tengan una semivida de al menos 24, 12, 6, 4, 3, 2, 1, 0,75, 0,5, 0,25 o 0,1 h). Como alternativa, los métodos se pueden realizar a una temperatura que perjudica la actividad de la enzima o enzimas que se utilizan en el método (p. ej., la temperatura de la reacción se puede seleccionar de tal forma que una enzima en la reacción tenga una semivida de no más de 24, 12, 6, 4, 3, 2, 1, 0,75, 0,5, 0,25 o 0,1 h). En algunas realizaciones, si se realiza un método a una temperatura u otra condición (p. ej., pH) que perjudica la actividad de una o varias enzimas, se puede añadir más enzima a la reacción a uno o varios intervalos después del inicio del método para complementar la actividad de la enzima o enzimas estropeadas.

En algunas realizaciones, uno o varios procedimientos de un método dado a conocer en la presente memoria se suceden en el mismo recipiente de la reacción (p. ej., tubo, punta, contenedor, etc.). En algunas realizaciones, todos los procedimientos de un método se suceden en el recipiente de la reacción.

Los reactantes para los métodos dados a conocer en la presente memoria se pueden suministrar juntos al comienzo de una reacción o se pueden añadir secuencialmente, en donde después de una, dos o más etapas, se añaden nuevos reactantes a una reacción. En algunas circunstancias, se pueden añadir nuevos reactantes (p. ej., enzimas, cebadores) a un recipiente de reacción durante el transcurso de la reacción para incrementar la cantidad de reactantes disponibles que actúan sobre los sustratos o para remplazar la función de los reactantes que se han ido inactivando (p. ej., enzimas). Se pueden añadir nuevos reactantes a una reacción en uno o varios intervalos de tiempo seleccionados después del inicio de una reacción de un método dado a conocer en la presente memoria (por ejemplo, a 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45 o 60 min después del inicio de una reacción).

En algunas realizaciones, dos o más conjuntos de un primer y segundo cebadores se dan a conocer en un método dado a conocer en la presente memoria, en donde cada conjunto contiene un primer cebador y un segundo cebador, y en donde diferentes conjuntos de cebadores son complementarios a diferentes plantillas de ácido nucleico. Tanto el primero como el segundo cebador en un conjunto son complementarios a diferentes hebras de la misma plantilla de ácido nucleico. La inclusión de dos o más conjuntos de cebadores en un método dado a conocer en la presente memoria puede conseguir la amplificación simultánea de numerosas plantillas de ácidos nucleicos diferentes en el mismo recipiente de reacción. Esto puede ser útil, por ejemplo, para amplificar numerosas plantillas de interés en una muestra, o para ensayar la presencia de muchas plantillas diferentes en una muestra. En algunas realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, 500 o más conjuntos de un primer y segundo cebadores se dan a conocer en un método dado a conocer en la presente memoria para amplificar o ensayar la presencia de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, 500 o más plantillas de ácidos nucleicos diferentes.

En algunas realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un recipiente que contiene una o varias enzimas, cebadores u otros reactantes dados a conocer en la presente memoria. Los recipientes pueden incluir cualquier estructura capaz de soportar o contener un material líquido o sólido, y puede incluir tubos, contenedores, puntas, etc. En algunas realizaciones, una pared de un recipiente puede permitir la transmisión de la luz a través de la pared. Un recipiente puede ser transparente desde el punto de vista óptico. Un recipiente puede contener, por ejemplo, cualquiera o varios de una polimerasa de ácido nucleico aislada, una ADN polimerasa aislada, una transcriptasa inversa aislada, una ligasa aislada, un primer cebador, un segundo cebador, un colorante de ácido nucleico, o una sonda de ácido nucleico, tal y como se describe en otro lugar de la presente memoria. Se puede suministrar cualquier cantidad de copias de cualquiera de los compuestos contenidos de un recipiente (p. ej., una primera copia, una segunda copia, una tercera copia, etc.). El contenido de un recipiente puede estar en comunicación fluidica. En algunas realizaciones, un recipiente puede además contener una plantilla de ácido nucleico. En algunas realizaciones, un recipiente puede además contener nucleótidos, tamponantes, sales, agua u otros reactantes dados a conocer en la presente memoria para la amplificación de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, un recipiente puede contener dos o más conjuntos de cebadores, en donde cada conjunto de cebadores comprende un primer y segundo cebador, y los diferentes conjuntos de cebadores son complementarios a las diferentes plantillas de ácido nucleico.

Dos o más reactantes útiles para un método dado a conocer en la presente memoria se pueden envasar y distribuir como un kit. Por ejemplo, un kit puede incluir cualesquiera dos o más de: una plantilla de ácido nucleico, un primer cebador, un segundo cebador, una polimerasa de ácido nucleico, una ADN polimerasa, una

5 transcriptasa inversa, una ligasa aislada, tamponantes, colorantes de ácidos nucleicos, una sonda de ácido nucleico, o dNTP, tal y como se describe en otro lugar de la presente memoria. Dentro del kit, dos o más reactantes se pueden envasar en recipientes independientes o en el mismo recipiente. En algunas realizaciones, un kit puede además contener nucleótidos, tamponantes, sales, agua u otros reactantes dados a conocer en la presente memoria para la amplificación de ácidos nucleicos.

10 Los diferentes métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria para la amplificación de una plantilla de ácido nucleico pueden cumplir muchas de las funciones que anteriormente han sido llevadas a cabo con otros métodos y composiciones para la amplificación de ácidos nucleicos dependiente del termociclador e isotérmica. A la plantilla de ácidos nucleicos para la amplificación de acuerdo con los métodos dados a conocer en la presente memoria también se la puede denominar en la presente memoria como un «ácido nucleico deseado» o similar. Los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria se pueden utilizar, por ejemplo, para aislar y clonar ácidos nucleicos de interés, análisis de expresión génica, identificación diagnóstica de ácidos nucleicos, síntesis de ácidos nucleicos nuevos, síntesis y marcación de sondas de ácido nucleico, identificación forense de un sujeto, identificación de los alelos de un sujeto, cribado genético, secuenciación de ácidos nucleicos, y aplicaciones relacionadas. Una molécula de ácido nucleico deseado puede ser de cualquier tipo, entre ellos ADN o ARN monocatenario o bicatenario (p. ej., ARNm). Un ácido nucleico deseado puede ser de cualquier tipo o función (p. ej., una secuencia codificante de proteína, una secuencia reguladora, un intrón, etc.). Un ácido nucleico deseado puede ser la totalidad de un gen o una porción del mismo. Los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden incluir que una molécula destinataria de ácido nucleico monocatenario se convierta en un ácido nucleico bicatenario lineal de plantilla mediante los métodos descritos en la presente memoria o, si no, los conocidos en la técnica.

25 En algunas realizaciones, un método o composición dado a conocer en la presente memoria se puede utilizar para detectar la cantidad de un ácido nucleico deseado en una muestra (que incluye la presencia o ausencia de la diana) para medir la cantidad de un producto de amplificación de una diana formada a partir de una muestra en un periodo de tiempo seleccionado, o para determinar la cantidad de tiempo necesario para generar un determinado número de copias de una plantilla a partir de una muestra. Las muestras que se pueden utilizar con los métodos y composiciones dados a conocer en la presente memoria se describen en otro lugar de la presente memoria y pueden incluir, por ejemplo, un líquido corporal, una secreción, o un tejido, de un sujeto. En las realizaciones, una muestra se puede procesar antes de usar la muestra en un ensayo para amplificar un ácido nucleico deseado en la muestra de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria. El procesamiento de la muestra puede incluir cualquier etapa de procesamiento, tal y como se describe en otro lugar de la presente memoria, y puede incluir, por ejemplo, etapas de tratamiento con ultrasonidos o de lisis química.

35 En algunas realizaciones, un método dado a conocer en la presente memoria se puede llevar a cabo para ensayar de forma simultánea al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100 o más ácidos nucleicos deseados diferentes en el mismo recipiente de reacción. Típicamente, para cada ácido nucleico deseado y de interés, se dan a conocer un primer cebador y un segundo cebador, en donde cada uno es complementario a una hebra del ácido nucleico deseado, o un complemento de la misma. La amplificación de los diferentes ácidos nucleicos deseados en el mismo recipiente se puede vigilar, por ejemplo, mediante el uso de sondas de ácido nucleico que tienen especificidad por las secuencias a detectar en los diferentes ácidos nucleicos deseados y por diferentes fluoróforos.

45 En algunas realizaciones, un método o composición dado a conocer en la presente memoria se puede utilizar para detectar la presencia o la ausencia de un nucleótido de interés concreto en un ácido nucleico deseado (p. ej., en el caso de una mutación o SNP). Por ejemplo, un primer o segundo cebador se puede seleccionar para que se fije selectivamente a una región en un ácido nucleico deseado que incluye, o es adyacente, al nucleótido de interés. El cebador se puede diseñar de tal manera que, selectivamente: i) se fije a la región cuando la región contiene el nucleótido de interés, o bien ii) no se fije a la región cuando la región contiene el nucleótido de interés. Un método como el descrito en la presente memoria se puede llevar a cabo con el cebador seleccionado, y el resultado de la reacción de amplificación puede proporcionar la información relacionada con la presencia o ausencia del nucleótido de interés en el ácido nucleico deseado. Por ejemplo, si un primer cebador se diseña para que tenga una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ácido nucleico deseado que incluye un nucleótido de interés concreto (p. ej., una mutación), la amplificación satisfactoria del ácido nucleico deseado con el cebador seleccionado a partir de una muestra puede indicar que la muestra contiene un ácido nucleico deseado que tiene el nucleótido de interés concreto. En algunas realizaciones, un cebador utilizado para el análisis de un nucleótido de interés en un ácido nucleico deseado puede contener un nucleótido crítico en el extremo en 3' del cebador (a saber, un nucleótido que corresponde a la misma posición de un nucleótido de interés en el ácido nucleico deseado). En tal caso, la hibridación del nucleótido del extremo 3' del cebador puede ser dependiente de la presencia del nucleótido de interés en el ácido nucleico deseado. Si el nucleótido del extremo 3' del cebador no se hibrida con un nucleótido en el ácido nucleico deseado (p. ej., debido a una discordancia entre los nucleótidos), la discordancia puede impedir de forma significativa que una polimerasa de ácido nucleico sintetice un producto de extensión del cebador. En consonancia, en algunas realizaciones, un cebador que tiene el nucleótido del extremo 3' que se corresponde

5 con un nucleótido de interés puede ser útil para determinar la presencia o ausencia de un nucleótido concreto en un ácido nucleico deseado. En tales realizaciones, en algunas situaciones, el nucleótido crítico del extremo en 3' del cebador se puede seleccionar para que sea complementario al nucleótido de interés en el ácido nucleico deseado, y en algunas otras situaciones, el nucleótido crítico del extremo 3' del cebador se puede seleccionar para que no sea complementario al nucleótido de interés en el ácido nucleico deseado. El nucleótido de interés puede representar, por ejemplo, una forma de tipo silvestre, una forma mutante o un polimorfismo de un ácido nucleico deseado.

10 Los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria se pueden utilizar para amplificar un ácido nucleico de cualquier muestra que pueda contener ácidos nucleicos. Los ejemplos de muestras pueden incluir diferentes muestras de líquidos. En algunos ejemplos, la muestra puede ser una muestra de líquido corporal de un sujeto. La muestra puede incluir uno o varios componentes líquidos. En algunos casos, se pueden dar a conocer muestras sólidas o semisólidas. La muestra puede incluir tejido recogido del sujeto. La muestra puede incluir un fluido corporal, secreción, o tejido, de un sujeto. La muestra puede ser una muestra biológica. La muestra biológica puede ser un líquido corporal, una secreción o una muestra de tejido. Los ejemplos de muestras biológicas pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, sangre, suero, saliva, orina, líquido gástrico y digestivo, lágrimas, heces, semen, secreción vaginal, líquidos intersticiales derivados de tejido tumoral, líquidos oculares, sudor, mucosidad, cera de oído, aceite, secreciones glandulares, aliento, líquido espinal, cabello, uñas, células de piel, plasma, torunda nasal o lavado nasofaríngeo, líquido espinal, líquido cefalorraquídeo, tejido, torunda de la garganta, biopsia, líquido de la placenta, líquido amniótico, sangre de la médula, líquidos enfáticos, líquidos de cavidades, esputo, pus, microbiota, meconio, leche de las mamas u otras secreciones. La muestra puede darse a conocer de un animal o de un humano. Las muestras pueden ser de una planta, de un microorganismo (p. ej., virus, bacterias), u otro material biológico.

25 En algunas realizaciones, los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria se pueden realizar o utilizarse en las localizaciones de los puntos de servicio (p. ej., la casa o el trabajo del sujeto, tienda de comestibles, parafarmacias, hospitales, colegios, etc.). Los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria pueden permitir la amplificación rápida de los ácidos nucleicos de una muestra de un sujeto para ayudar con el diagnóstico o el tratamiento de un sujeto. Por ejemplo, los métodos y las composiciones dados a conocer aquí se pueden utilizar para analizar en una muestra de un sujeto la presencia de ácidos nucleicos de un patógeno, tal como un virus (p. ej., gripe) o bacteria (p. ej., estreptococo).

30 Los ensayos y los métodos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo en un dispositivo, o en un sistema, para el procesamiento de una muestra. Los ensayos y los métodos descritos en la presente memoria pueden incorporarse con facilidad y utilizarse en un dispositivo para el procesamiento de una muestra, o un sistema para el procesamiento de una muestra, que puede ser un dispositivo de ensayo automatizado, o puede ser un sistema de ensayo automatizado. Tal dispositivo y tal sistema pueden ser útiles para la puesta en práctica de los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, un dispositivo puede ser útil para recibir una muestra. Un dispositivo puede ser útil para preparar o para procesar una muestra. Un dispositivo puede ser útil para llevar a cabo un ensayo en una muestra. Un dispositivo puede ser útil para obtener datos de una muestra. Un dispositivo puede ser útil para transmitir datos obtenidos de una muestra. Un dispositivo puede ser útil para desechar una muestra después del procesamiento o del ensayo de una muestra.

40 Un dispositivo puede ser parte de un sistema, un componente del cual puede ser un dispositivo de procesamiento de muestras. Un dispositivo puede ser un dispositivo de procesamiento de muestras. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que facilite la recogida de una muestra, prepare una muestra para un análisis clínico, o realice un método con uno o más reactantes, tal y como se describe en la presente memoria. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para obtener datos de una muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para transmitir los datos obtenidos de una muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para analizar los datos de una muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para comunicarse con otro dispositivo, o un laboratorio, o un individuo afiliado a un laboratorio, para analizar datos obtenidos de una muestra.

50 Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para colocarse dentro de un sujeto o en sus superficies. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para aceptar una muestra de un sujeto, de manera directa o bien de manera indirecta. Una muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre (p. ej., una muestra obtenida de un pinchazo en el dedo o de una punción en una vena, o de una muestra de sangre arterial), una muestra de orina, una muestra de biopsia, un corte de tejido, una muestra de heces, u otra muestra biológica; una muestra de agua, una muestra de suelo, una muestra de alimento, una muestra de aire; u otra muestra. Una muestra de sangre puede comprender, p. ej., sangre completa, plasma o suero. Un dispositivo de procesamiento de muestras puede recibir una muestra del sujeto a través de una abertura del dispositivo. La recogida de la muestra se puede producir en un sitio de recogida de muestras, o en cualquier otro lugar. La muestra se puede suministrar al dispositivo en un sitio de recogida de muestras.

60 En algunas realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que acepte

o sostenga un cartucho. En algunas realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestras puede comprender un cartucho. El cartucho se puede retirar del dispositivo de procesamiento de muestras. En algunas realizaciones, se puede suministrar una muestra al cartucho del dispositivo de procesamiento de muestras. Como alternativa, una muestra se puede suministrar a otra porción de un dispositivo de procesamiento de muestras. El cartucho y/o el dispositivo puede comprender una unidad de recogida de muestras que se puede configurar para aceptar una muestra.

Un cartucho puede incluir una muestra y puede incluir reactantes para ser utilizados en el procesamiento o análisis de una muestra, desechables para ser usados en el procesamiento o análisis de una muestra, u otros materiales. Un cartucho puede contener los reactantes descritos en la presente memoria para realizar un método descrito en la presente memoria. Después de la colocación de un cartucho o de la inserción de un cartucho en un dispositivo de procesamiento de muestras, uno o varios componentes del cartucho se pueden poner en comunicación fluidica con otros componentes del dispositivo de procesamiento de muestras. Por ejemplo, si una muestra se recoge en un cartucho, la muestra se puede transferir a otras porciones del dispositivo de procesamiento de muestras. De igual forma, si uno o varios reactantes se suministran en un cartucho, los reactantes se pueden transferir a otras porciones del dispositivo de procesamiento de muestras, u otros componentes del dispositivo de procesamiento de muestras se pueden poner en contacto con los reactantes. En algunas realizaciones, los reactantes o los componentes de un cartucho pueden permanecer integrados en el cartucho. En algunas realizaciones, no se incluye ninguna fluidica que requiera entubación ni que requiera mantenimiento (p. ej., mantenimiento manual o automático).

Se puede transferir una muestra o reactante a un dispositivo, tal como un dispositivo de procesamiento de muestras. Una muestra o reactante se puede transferir al interior de un dispositivo. Tal transferencia de la muestra o reactante se puede llevar a cabo sin suministrar ninguna vía de fluido continuo desde el cartucho al dispositivo. Tal transferencia de muestra o reactante se puede llevar a cabo sin suministrar una vía de fluido continuo al interior de un dispositivo. En las realizaciones, tal transferencia de muestra o reactante se puede llevar a cabo mediante un sistema de manipulación de muestras (p. ej., una pipeta); por ejemplo, una muestra, reactante o alícuota de la misma se puede aspirar al interior de un componente de transferencia con la punta abierta, tal como una punta de pipeta, que puede estar conectada de manera operativa a un sistema de manipulación de muestras que transfiere la punta, con la muestra, el reactante, o la alícuota del mismo contenido dentro de la punta, a una localización en el interior o sobre la superficie del dispositivo de procesamiento de muestras. La muestra, el reactante o la alícuota del mismo se puede depositar en una localización en el interior o sobre la superficie del dispositivo de procesamiento de muestras. La muestra y el reactante, o los numerosos reactantes, se pueden mezclar con el uso de un sistema de manipulación de muestras de una manera similar. Uno o varios componentes del cartucho se pueden transferir de una manera automática a otras porciones del dispositivo de procesamiento de muestras, y viceversa.

Un dispositivo, tal como un dispositivo de procesamiento de muestras, puede tener un sistema de manipulación de fluidos. Un sistema de manipulación de fluidos puede realizar, o puede ayudar a realizar, el transporte, la dilución, la extracción, la distribución en alícuotas, la mezcla y otras acciones con un fluido, tal como una muestra. En algunas realizaciones, un sistema de manipulación de fluidos puede estar contenido dentro de una abertura del dispositivo. Un sistema de manipulación de fluidos puede permitir la recogida, la administración, el procesamiento y/o el transporte de un fluido, una disolución de reactantes secos, mezclado de reactantes líquidos y/o secos con un líquido, así como la recogida, la administración, el procesamiento y/o el transporte de componentes, muestras o materiales no fluidicos. El fluido puede ser una muestra, un reactante, un diluyente, un lavado, un colorante o cualquier otro fluido que pueda ser utilizado por el dispositivo, y puede incluir, pero sin limitarse a ellos, fluidos homogéneos, diferentes líquidos, emulsiones, suspensiones y otros fluidos. Un sistema de manipulación de fluidos, que incluye sin limitación una pipeta, también se puede utilizar para transportar recipientes (con o sin que contengan fluidos en este) alrededor del dispositivo. El sistema de manipulación de fluidos puede dispensar o aspirar un fluido. La muestra puede incluir uno o varios materiales particulados o sólidos que flotan dentro de un fluido.

En las realizaciones, un sistema de manipulación de fluidos puede comprender una pipeta, una punta de pipeta, una jeringuilla, un capilar u otro componente. El sistema de manipulación de fluidos puede tener una porción con una superficie interna y una superficie externa y un extremo abierto. El sistema de manipulación de fluidos puede comprender una pipeta, que puede incluir un cuerpo de pipeta y una boquilla de pipeta, y puede comprender una punta de pipeta. Una punta de pipeta se puede o no retirar de una boquilla de pipeta. En las realizaciones, un sistema de manipulación de fluidos puede utilizar una pipeta que lleva acoplada una punta de pipeta; una punta de pipeta puede ser desechable. Una punta puede formar un sello hermético para el fluido cuando esté acoplada a una pipeta. Una punta de pipeta se puede utilizar una vez, dos veces o más veces. En las realizaciones, un sistema de manipulación de líquidos puede utilizar una pipeta o un dispositivo similar con o sin una punta de pipeta para aspirar, dispensar, mezclar, transportar o cualquier otra manipulación del fluido. El fluido se puede dispensar desde el sistema de manipulación de fluidos cuando se desee. El fluido puede estar contenido dentro de una punta de pipeta antes de dispensarse, p. ej., desde un orificio en la punta de la pipeta. En las realizaciones, o en casos durante el uso, se puede dispensar todo el fluido; en otras realizaciones o casos durante el uso, se puede dispensar una porción del fluido dentro de una punta. Una pipeta puede

5 aspirar selectivamente un fluido. La pipeta puede aspirar una cantidad seleccionada de fluido. La pipeta puede ser capaz de actuar como mecanismo de agitación para mezclar el fluido dentro de la punta o dentro de un recipiente. La pipeta puede incorporar puntas o recipientes que crean bucles de flujo continuo para la mezcla, que incluye los materiales o reactivos que no están en forma líquida. Una punta de pipeta también puede facilitar la mezcla, mediante la administración medida de numerosos fluido de manera simultánea o en secuencia, tal como en las reacciones del sustrato de 2 partes.

10 El sistema de manipulación de líquidos puede incluir una o varias unidades fluidicamente aisladas o independientes desde el punto de vista hidráulico. Por ejemplo, el sistema de manipulación de fluidos puede incluir una, dos o más puntas de pipeta. Las puntas de pipeta se pueden configurar para aceptar y confinar un fluido. Las puntas pueden estar aisladas desde el punto de vista fluidoico o ser independientes desde el punto de vista hidráulico, unas de otras. El fluido contenido dentro de cada punta puede estar aislado desde el punto de vista fluidoico o ser independiente desde el punto de vista hidráulico de los fluidos en otras puntas y de los otros fluidos dentro del dispositivo. Las unidades aisladas desde el punto de vista fluidoico e independientes desde el punto de vista hidráulico se pueden retirar con respecto a otras porciones del dispositivo y/o del uno con respecto al otro. Las unidades aisladas desde el punto de vista fluidoico e independientes desde el punto de vista hidráulico se pueden retirar de manera individual. Un sistema de manipulación de fluidos puede comprender una o varias bases o soportes. Una base o soporte puede soportar una o varias pipetas o unidades de pipeta. Una base o soporte puede conectar una o varias pipetas del sistema de manipulación de líquidos entre sí.

20 Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para realizar etapas o acciones de procesamiento con una muestra obtenida de un sujeto. El procesamiento de muestras puede incluir la preparación de la muestra, que incluye, p. ej., dilución de la muestra, división de una muestra en alícuotas, extracción, puesta en contacto con un reactante, filtración, separación, centrifugación u otra acción o etapa preparatoria o de procesamiento. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que realice una o varias acciones o etapas de preparación de muestras con la muestra. De manera optativa, se puede preparar una muestra para una reacción química y/o etapa de procesamiento físico. Una acción o etapa de preparación de muestras puede incluir una o varias de lo siguiente: centrifugación, separación, filtración, dilución, enriquecimiento, purificación, precipitación, incubación, pipeteo, transporte, cromatografía, lisis celular, citometría, pulverización, molienda, activación, tratamiento con ultrasonidos, procesamiento en microcolumna, procesamiento con perlas magnéticas, procesamiento con nanopartículas u otra acción o etapa de preparación de muestras. Por ejemplo, la preparación de la muestra puede incluir una o varias etapas para separar la sangre en fracciones séricas y/o particuladas, o para separar cualquier otra muestra en diferentes componentes. La preparación de la muestra puede incluir una o varias etapas para diluir y/o concentrar una muestra, tal como una muestra de sangre u otras muestras biológicas. La preparación de las muestras puede incluir la adición de un anticoagulante u otros ingredientes a una muestra. La preparación de muestras también puede incluir la purificación de una muestra. En las realizaciones, todo el procesamiento, la preparación o las acciones o etapas del ensayo de las muestras se realiza en un único dispositivo. En las realizaciones, todo el procesamiento, la preparación o las acciones o etapas del ensayo de las muestras se realizan dentro de un alojamiento de un único dispositivo. En las realizaciones, la mayoría del procesamiento, de la preparación o de las acciones o etapas del ensayo de las muestras se realizan en un único dispositivo y se pueden realizar dentro de un único alojamiento de un dispositivo. En las realizaciones, mucho del procesamiento, de la preparación o de las acciones o etapas del ensayo de las muestras se realiza en un único dispositivo y se puede realizar dentro de un único alojamiento de un dispositivo. En las realizaciones, el procesamiento, la preparación o las acciones o etapas del ensayo de las muestras se pueden realizar en más de un dispositivo.

45 Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que ejecute uno o varios ensayos con una muestra, y para obtener los datos de la muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestras puede realizar los métodos dados a conocer en la presente memoria, así como otros ensayos. Un ensayo puede incluir uno o varios tratamientos físicos o químicos, y puede incluir la ejecución de una o varias reacciones químicas o físicas. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que realice uno, dos o más ensayos con una muestra pequeña de líquido corporal. Una o varias reacciones químicas pueden tener lugar con una muestra que tiene un volumen, tal y como se describe en otro lugar de la presente memoria. Por ejemplo, una o varias reacciones químicas pueden tener lugar en una píldora que tiene un volumen por debajo del femtolitro. En un caso, la unidad de recogida de muestras está configurada para recibir un volumen de la muestra de fluido corporal equivalente a una única gota, o menos, de sangre o líquido intersticial. En las realizaciones, el volumen de una muestra puede ser un volumen pequeño, en donde un volumen pequeño puede ser un volumen que es de menos de aproximadamente 1000 μl , o menos de aproximadamente 500 μl , o menos de aproximadamente 250 μl , o menos de aproximadamente 150 μl , o menos de aproximadamente 100 μl , o menos de aproximadamente 75 μl , o menos de aproximadamente 50 μl , o menos de aproximadamente 40 μl , o menos de aproximadamente 20 μl , o menos de aproximadamente 10 μl , menos de aproximadamente 5 μl , menos de aproximadamente 1 μl , menos de aproximadamente 0,5 μl , menos de aproximadamente 0,1 μl , u otro volumen pequeño. En las realizaciones, todas las acciones o etapas de ensayo de la muestra se realizan con una única muestra. En las realizaciones, todas las acciones o etapas de ensayo de la muestra se realizan con un único dispositivo. En las realizaciones, todas las acciones o etapas del ensayo de la muestra se realizan

dentro de un alojamiento de un único dispositivo. En las realizaciones, la mayoría de las acciones o etapas de ensayo de la muestra se realizan en un único dispositivo y se pueden realizar dentro de un alojamiento de un único dispositivo. En las realizaciones, muchas acciones o etapas de ensayo de la muestra se realizan en un único dispositivo y se pueden llevar a cabo dentro de un alojamiento de un único dispositivo. En las realizaciones, el procesamiento, la preparación, o las acciones o etapas del ensayo de las muestras se pueden realizar en más de un dispositivo.

Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que realice numerosos ensayos con una muestra. En algunas realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que realice un método dado a conocer en la presente memoria, y uno, dos o más ensayos adicionales. En las realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que realice numerosos ensayos con una única muestra. En las realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que realice numerosos ensayos con una única muestra, en donde la muestra es una muestra pequeña. Por ejemplo, una muestra pequeña puede tener un volumen de muestra que es un volumen pequeño de menos de aproximadamente 1000 μl , o menos de aproximadamente 500 μl , o menos de aproximadamente 250 μl , o menos de aproximadamente 150 μl , o menos de aproximadamente 100 μl , o menos de aproximadamente 75 μl , o menos de aproximadamente 50 μl , o menos de aproximadamente 40 μl , o menos de aproximadamente 20 μl , o menos de aproximadamente 10 μl , menos de aproximadamente 5 μl , menos de aproximadamente 1 μl , menos de aproximadamente 0,5 μl , menos de aproximadamente 0,1 μl u otro volumen pequeño. Un dispositivo de procesamiento de muestras puede ser capaz de realizar ensayos multiplexados con una única muestra. Numerosos ensayos se pueden ejecutar simultáneamente; se pueden ejecutar secuencialmente; o algunos ensayos se pueden ejecutar simultáneamente mientras que otros se ejecutan secuencialmente. Uno o varios ensayos de control y/o calibradores (p. ej., entre ellos una configuración con un control de un calibrador para el ensayo/análisis) también se puede incorporar en el dispositivo; los ensayos de control y el ensayo con los calibradores se pueden realizar de manera simultánea con los ensayos realizados con una muestra, o se pueden realizar antes o después de que los ensayos se realicen con una muestra, o cualquier combinación de los mismos. En las realizaciones, todas las acciones o etapas de ensayo de la muestra se realizan en un único dispositivo. En las realizaciones, toda una serie de acciones o etapas del ensayo se realizan dentro de un alojamiento de un único dispositivo. En las realizaciones, la mayoría de acciones o etapas de ensayo de la muestra, de los numerosos ensayos, se realizan en un único dispositivo, y se pueden realizar dentro de un alojamiento de un único dispositivo. En las realizaciones, muchas acciones o etapas del ensayo de las muestras, de los numerosos ensayos, se realizan en un único dispositivo y se pueden realizar dentro de un alojamiento de un único dispositivo. En las realizaciones, el procesamiento, la preparación o las acciones o etapas del ensayo de las muestras se pueden realizar en más de un dispositivo.

En las realizaciones, se pueden realizar toda una serie de ensayos en un breve periodo de tiempo. En las realizaciones, tal breve periodo de tiempo comprende menos de aproximadamente tres horas, o menos de aproximadamente dos horas, o menos de aproximadamente una hora, o menos de aproximadamente 40 min, o menos de aproximadamente 30 min, o menos de aproximadamente 25 min, o menos de aproximadamente 20 min, o menos de aproximadamente 15 min, o menos de aproximadamente 10 min, o menos de aproximadamente 5 min, o menos de aproximadamente 4 min, o menos de aproximadamente 3 min, o menos de aproximadamente 2 min, o menos de aproximadamente 1 min, u otro breve periodo de tiempo.

Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que detecte una o varias señales referentes a la muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que identifique una o varias propiedades de la muestra. Por ejemplo, el dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que detecte la presencia o la concentración de un analito (p. ej., un ácido nucleico deseado) o de numerosos analitos o una situación patológica en la muestra (p. ej., en o por un fluido corporal, secreción, tejido u otra muestra). Como alternativa, el dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para detectar una señal o señales que se pueden analizar para detectar la presencia o la concentración de uno o varios analitos (que pueden ser indicativos de una situación patológica) o una situación patológica en la muestra. Las señales se pueden analizar en el dispositivo integrado o en otra localización. La ejecución de una prueba clínica puede o no incluir algún análisis o comparación de los datos recogidos.

Una reacción química u otra etapa de procesamiento se puede realizar con o sin la muestra. Los ejemplos de etapas, pruebas o ensayos que puede preparar o ejecutar el dispositivo pueden incluir, pero sin limitarse a ellos, inmunoensayo, ensayo de ácidos nucleicos (p. ej., los métodos dados a conocer en la presente memoria), ensayo basado en receptores, ensayo citométrico, ensayo colorimétrico, ensayo enzimático, ensayo electroforético, ensayo electroquímico, ensayo espectroscópico, ensayo cromatográfico, ensayo al microscopio, ensayo topográfico, ensayo calorimétrico, ensayo turbidimétrico, ensayo de aglutinación, ensayo de radioisótopos, ensayo viscométrico, ensayo de coagulación, ensayo del tiempo de coagulación, ensayo de síntesis de proteínas, ensayo histológico, ensayo en cultivos, ensayo de osmolaridad y/u otros tipos de ensayos, centrifugación, separación, filtración, dilución, enriquecimiento, purificación, precipitación, pulverización, incubación, pipeteo, transporte, lisis celular y otras acciones o etapas de preparación de la muestra, o combinaciones de los mismos. Las etapas, pruebas o ensayos que se pueden preparar o ejecutar en el dispositivo pueden incluir la toma de imágenes, que incluye microscopía, citometría y otras técnicas que

preparan o utilizan imágenes. Las etapas, pruebas o ensayos que se pueden preparar o ejecutar en el dispositivo pueden incluir además una valoración de la histología, morfología, cinemática, dinámica y/o estado de una muestra, que puede incluir tal valoración de las células.

5 Un dispositivo puede ser capaz de realizar todas las etapas integradas (p. ej., etapas o acciones realizadas por un solo dispositivo) en un breve periodo de tiempo. Un dispositivo puede ser capaz de realizar todas las etapas integradas en una única muestra en un periodo de tiempo breve. Por ejemplo, a partir de la recogida de la muestra de un sujeto hasta la transmisión de los datos y/o al análisis se puede tardar aproximadamente 3 h o menos, 2 h o menos, 1 h o menos, 50 min o menos, 45 min o menos, 40 minutos o menos, 30 min o menos, 20 min o menos, 15 min o menos, 10 min o menos, 5 min o menos, 4 min o menos, 3 min o menos, 2 min o menos, o 1 min o menos. La cantidad de tiempo desde que se acepta una muestra dentro del dispositivo hasta la transmisión de los datos y/o el análisis desde el dispositivo con respecto a tal muestra puede depender del tipo o número de etapas, pruebas o ensayos realizados con la muestra. La cantidad de tiempo desde que se acepta una muestra dentro del dispositivo hasta la transmisión de los datos y/o el análisis desde el dispositivo con respecto a tal muestra puede tardar aproximadamente 3 h o menos, 2 h o menos, 1 h o menos, 50 min o menos, 45 min o menos, 40 min o menos, 30 min o menos, 20 min o menos, 15 min o menos, 10 min o menos, 5 min o menos, 4 min o menos, 3 min o menos, 2 min o menos, o 1 min o menos.

Un dispositivo se puede configurar para que prepare una muestra para su eliminación, o para que elimine una muestra, tal como una muestra biológica, después del procesamiento o del ensayo de una muestra.

20 En las realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestras puede estar configurado para que transmita los datos obtenidos de una muestra. En las realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestras puede estar configurado para que se comunique por una red. Un dispositivo de procesamiento de muestras puede incluir un módulo de comunicación que puede actuar de interfase con la red. Un dispositivo de procesamiento de muestras puede estar conectado a la red a través de una conexión por cable o inalámbrica. La red puede ser una red local (LAN, por su nombre en inglés) o una red de gran alcance (WAN, por su nombre en inglés) tal como Internet. En algunas realizaciones, la red puede ser una red local personal. La red puede incluir la nube. El dispositivo de procesamiento de muestras puede estar conectado a la red sin que se necesite ningún dispositivo intermedio, o se puede necesitar un dispositivo intermedio para conectar un dispositivo de procesamiento de muestras a una red. Un dispositivo de procesamiento de muestras puede comunicarse por una red con otro dispositivo, que puede ser cualquier tipo de dispositivo en red, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, un ordenador personal, un servidor o un portátil; asistentes digitales personales (PDA, por su nombre en inglés), tales como un dispositivo con Windows CE; teléfonos tales como teléfonos móviles, móviles inteligentes (p. ej., iPhone, Android, Blackberry, etc.), o teléfonos portátiles que detectan la localización (tales como los GPS); un dispositivo con itinerancia, tal como un dispositivo con itinerancia conectado a la red; un dispositivo inalámbrico, tal como un dispositivo de correo electrónico inalámbrico, u otro dispositivo capaz de comunicarse por medios inalámbricos con una red de ordenadores; o cualquier otro tipo de dispositivo en red que pueda comunicarse posiblemente por una red y manejar transacciones electrónicas. Tal comunicación puede incluir el suministro de datos a una infraestructura informática en la nube o a cualquier otro tipo de infraestructura de almacenamiento de datos a la que pueden acceder otros dispositivos.

40 Un dispositivo de procesamiento de muestras puede suministrar los datos concernientes a una muestra a, p. ej., un profesional de asistencia sanitaria, una localización de profesionales de asistencia sanitaria, tal como un laboratorio, o a un afiliado al mismo. Uno o varios de un laboratorio, profesional de la asistencia sanitaria, o sujeto, puede tener un dispositivo en red capaz de recibir o acceder a los datos proporcionados por el dispositivo de procesamiento de muestras. Un dispositivo de procesamiento de muestras puede estar configurado para que suministre a una base de datos los datos concernientes a una muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestras puede estar configurado para que suministre los datos concernientes a una muestra a un sistema electrónico de historiales médicos, a un sistema de información de un laboratorio, a un sistema automático de laboratorio, o a otro sistema o programa informático. Un dispositivo de procesamiento de muestras puede suministrar los datos en forma de un informe.

50 Un laboratorio, dispositivo u otra entidad o programa informático puede llevar a cabo los análisis de datos que conciernen a una muestra sobre la marcha. Un sistema informático puede llevar a cabo un análisis químico y/o un análisis patológico, o estos se podían distribuir entre combinaciones de personal de laboratorio, clínico y especialistas o expertos. El análisis puede incluir la evaluación cualitativa y/o cuantitativa de una muestra. El análisis de los datos puede incluir una evaluación posterior cualitativa y/o cuantitativa de una muestra. De manera optativa, se puede generar un informe basándose en los datos brutos, en los datos preprocesados o en los datos analizados. Tal informe se puede preparar para mantenga la confidencialidad de los datos obtenidos a partir de la muestra, la identidad y otra información que concierne al sujeto de quien se obtuvo una muestra, el análisis de los datos y otra información confidencial. El informe y/o los datos se pueden transmitir a un profesional de la asistencia sanitaria. Los datos obtenidos por un dispositivo de procesamiento de muestras, o el análisis de tales datos, o los informes, se pueden suministrar a una base de datos, a un sistema electrónico de historias clínicas, a un sistema de información de un laboratorio, a un sistema automatizado de un laboratorio, o a otro sistema o programa informático.

La descripción y detalles de ejemplos de reactantes, ensayos, métodos, kits, dispositivos y sistemas que se pueden utilizar, o que se utilizarán, con métodos, composiciones y otros reactantes descritos en la presente memoria se pueden encontrar, por ejemplo, en la patente de los EE .UU. 8 088 593; en la patente de los EE. UU. n.º 8 380 541; en la publicación de solicitud de patente de los EE .UU. n.º US 2014/0057255; en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º US2014/0073043, y en la solicitud de patente internacional WO 2013/052318.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten la presente descripción de ninguna manera.

10 Ejemplo 1

Un método tal y como se da a conocer en la presente memoria se utilizó para amplificar un ácido nucleico deseado. Se prepararon las reacciones para la detección de un ácido nucleico deseado de T102A1, que es una molécula de ADN de *Staphylococcus aureus*, subespecie SSCmec. El T102A1 tiene la secuencia 5'

```
CAACTAATGAAACAGAAAGTCGTAACCTATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTAT
TAGGTTATGTTGGTCCCATTAACTCTGAAGAATTAACAAAAAGAAATATAAAGGCT
ATAAAGATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAACTTTACGATAAAAAG
CTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTCACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATC
GCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAGATATTCAACTAACTAT
TGATGCTAAAGTTCAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTCAG
GTAAGTCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAGCACACCTTCAT
ATGACGTCTATCCATTTATGTATGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGA
AGATAAAAAAGAACCTCTGCTCAACAAGTTCCAGATTACAACCTCACCAGGTTCAAC
TCAAAAAATATTAACAGCA 3' (SEQ ID NO: 2).
```

15 Se utilizaron el primer cebador «RLX0513» (secuencia de nucleótidos: 5' GGCTCAGGTTACTGCTATCCACCC 3' (SEQ ID n.º 3)) y el segundo cebador «RLX0514» (secuencia de nucleótidos: 5' TTTTGAGTTGAACCTGGTGAAGTTG 3' (SEQ ID n.º 4)) para amplificar una secuencia deseada de T102A1.

20 Se prepararon mezclas de reacción de 25 µl, en donde cada una contenía: acetato de potasio a 50 mM, Tris-acetato a 20 mM, pH 7,9, acetato de magnesio a 10 mM, DTT a 1 mM, seroalbúmina bovina (SAB) a 0,2 µg/µl, betaína a 0,8 M, dATP, dTTP, dGTP y dCTP a 1,4 mM cada uno, rATP a 1 mM, SYTO® 59 (Life Technologies) a 1×, 1,2 unidades/µl de ADN polimerasa Bst (New England BioLabs), 20 unidades/µl de ADN ligasa de T4 (New England BioLabs), 0,8 µM del primer cebador RLX0513, 0,8 µM del segundo cebador RLX0514, y 0, 100, 1000, 10000, 100000 o 1000000 de copias de la plantilla de T102A1 por microlitro. La plantilla se calentó previamente a 85 °C durante 5 min y se enfrió en hielo durante 5 min antes de añadirlo a la mezcla de reacción.

25 Tras la adición de la plantilla, las mezclas de reacción se incubaron a 42 °C durante 15 min, seguido de 56 °C durante 90 min en un instrumento CFX96 Touch (Bio-Rad). En estas condiciones de reacción, a 42 °C, las reacciones de ligación están relativamente favorecidas; a 56 °C, las reacciones de la polimerasa están relativamente favorecidas. Los puntos de inflexión para los ensayos se determinaron con el uso de un método con un solo umbral con el programa informático CFX Manager (Bio-Rad), y se muestran en la figura 2. En el eje X da a conocer la concentración de las moléculas de la plantilla por microlitro, y en el eje Y se da a conocer el tiempo de inflexión (en minutos) del ensayo. De izquierda a derecha a lo largo del eje X, las barras son para: 1000 000, 100000, 10000, 1000, 100 o 0 (control sin plantilla, o «CsP») copias de la plantilla de T102A1 por microlitro. Tal y como se muestra en la figura 2, cada una de las reacciones, incluso las que contienen tan solo 100 copias de plantilla por microlitro, tiene tiempos de inflexión significativamente más rápidos que la reacción de control sin plantilla (CsP). Las reacciones de control sin la plantilla a veces muestran un tiempo de inflexión; esto se debe a que, con el tiempo, se forman productos inespecíficos de fondo. Los tiempos de inflexión específicos para las reacciones se dan a conocer a continuación en la tabla 1. «Cq» se refiere al valor (tiempo) del ciclo de cuantificación del punto de inflexión.

30

35

Tabla 1
RLX513/514

T102A1	Cq con	Desv. est.
10 ⁶	44,29	3,53
10 ⁵	50,27	4,83
10 ⁴	59,11	1,07
10 ³	62,19	6,74
10 ²	73,36	1,41
CsP	92,75	8,14

Ejemplo 2

- 5 Un método tal y como se da a conocer en la presente memoria se utilizó para amplificar un ácido nucleico deseado. Se prepararon las reacciones para la detección de un ácido nucleico deseado a partir de TH1S3, que es una molécula de ARNm del gen de la hemaglutinina del virus de la gripe A, H1N1. El ARNm de TH1S3 tiene la secuencia: 5'

CGCCGGAUAGGCUCUUGGGAAACCGAAGACAGCCACAACGGGAAACUAUGUAAA
 UAAAAGGAAUAGCCCCACUACAAUUGGGGAAAUGUAACAUCGCCGGAUAGGCUCU
 UGGGAAACCCAGAAUGCGACUCACUGCUUCCAGCGAAAUCAUGGUCCUACAUGU
 AGAAACACCAAACUCUGAGAAUGGAGCAUGUUAUCCAGGAGAUUUCAUCGACUA
 UGAGGAACUGAAGGAGCAAUUGAGCUCAGUAUCAUCAUAGAAAGAUUCGAAAU
 AUUCCCAAGGAAAGUUCAUGGCCCAACCACAACACACUCAAGGAGUAAACAGCA
 GCAUGCUCUCCAUAGGGGAAAAGCAGUUUUACAGAAAUUUGCUAUGGCUGACG
 AAAACGGGGGACUCAUACCCAAAGCUGAACAAUCCUAUGUGAACAAUAAAAGG
 AAAGAAGUC 3' (SEQ ID NO: 5).

- 10 El primer cebador «RLX0585» (secuencia de nucleótidos: 5' CGCCGGATGGCTCTTGGGAAACC 3' (SEQ ID n.º 6)) y el segundo cebador «RLX0586» (secuencia de nucleótidos: 5' TCGCTGGAAGCAGTGAGTCGCATTC 3' (SEQ ID n.º 7)) se utilizaron para amplificar una secuencia deseada a partir de TH1S3.

- 15 Se prepararon mezclas de reacción de 25 µl, en donde cada una contenía: acetato de potasio a 50 mM, Tris-acetato a 20 mM, pH 7,9, acetato de magnesio a 10 mM, DTT a 1 mM, seroalbúmina bovina (SAB) a 0,2 µg/µl, betaína a 0,8 M, dATP, dTTP, dGTP y dCTP a 1,4 mM cada uno, rATP a 1 mM, SYTO® 59 (Life Technologies) a 1×, 1,2 unidades/µl de la ADN polimerasa Bst (New England BioLabs), ADN ligasa de T4 (New England BioLabs) a 20 unidades/µl, enzima de tipo transcriptasa inversa de AMV (New England BioLabs) a 0,016 unidades/µl, inhibidor murino de ARNasas (New England BioLabs) a 1 unidad/µl, 0,8 µM del primer cebador RLX0585, 0,8 µM del segundo cebador RLX0586, y 0, 100, 1000 o 10000 copias por microlitro de la plantilla de TH1S3. La plantilla se calentó previamente a 85 °C durante 5 min y se enfrió en hielo durante 5 min antes de la adición de la mezcla de reacción. Tras la adición de la plantilla, las mezclas de reacción se incubaron a 42 °C durante 15 min, seguido de 65 °C durante 90 min en un instrumento CFX 96 Touch (Bio-Rad). En estas condiciones de reacción, a 42 °C, las reacciones de ligación se ven relativamente favorecidas; a 65 °C, las reacciones de la polimerasa se ven relativamente favorecidas. Los puntos de inflexión para los ensayos se
- 25 determinaron con un método de un solo umbral con el programa informático CFX Manager (Bio-Rad) y se

muestran en la figura 3. En el eje X se da a conocer la concentración de las moléculas de la plantilla por microlitro, y en el eje Y se da a conocer el tiempo de inflexión (en minutos) del ensayo. Tal y como se muestra en la figura 3, cada una de las reacciones que contienen la plantilla tiene un tiempo de inflexión por debajo de los 40 min.

5 Ejemplo 3

Un método tal y como se da a conocer en la presente memoria se utilizó para amplificar un ácido nucleico deseado. Se prepararon las reacciones para la detección de un ácido nucleico deseado a partir de T129A1, que es una molécula del ARNm del gen de la hemaglutinina, el dominio HA1 (segmento 4), del virus de la gripe B. El ARNm de T129A1 tiene la secuencia: 5'

10 CUUCUUGAAUUUGAUGUCUAAGAGUAAUUUGCCAACGUGAGGCCAUCAGAAAGU
 AUGGUGCGCAAGUGGCAGGAGCAAGGUAAUAAAAGGGUCCUUGCCUUUAAUUGG
 UGAAGCAGAUUGCCUCCACGAAAAUACGGUGGAUAAAACAAAAGCAAGCCUUA
 CUACACAGGAGAACAUGCAAAAGCCAUAGGAAAUUGCCCAAUAUGGGUGAAAAC
 ACCCUUGAAGCUGGCCAAUGGAACCAAUAUAGACCGCCUGCAAAACUAUUAAAAG
 GAAAGAGGUUUCUUCGGAAGCGACAGACAGUAACACUCAACUCUCGACCAUCUGG
 UGUAACAACCUCG 3' (SEQ ID NO: 8).

15 El primer cebador «RLX0479» (secuencia de nucleótidos: 5' CGGTGGATTAAACAAAAGCAAGCC 3' (SEQ ID n.º 9)) y el segundo cebador «RLX0480» (secuencia de nucleótidos: 5' ATTGGCCAGCTTCAAGGGTG 3' (SEQ ID n.º 10)) se utilizaron para amplificar una secuencia deseada a partir de T129A1.

20 Se prepararon mezclas de reacción de 25 µl, en donde cada una contenía: acetato de potasio a 50 mM, Tris-acetato a 20 mM, pH 7,9, acetato de magnesio a 10 mM, DTT a 1 mM, seroalbúmina bovina (SAB) a 0,2 µg/µl, betaína a 0,8 M, dATP, dTTP, dGTP y dCTP a 1,4 mM cada uno, rATP a 1 mM, SYTO® 59 (Life Technologies) a 1×, ADN polimerasa Bst (New England BioLabs) a 1,2 unidades/µl, ADN ligasa de T4 (New England BioLabs) a 20 unidades/µl, enzima de tipo transcriptasa inversa de AMV (New England BioLabs) a 0,016 unidades/µl, inhibidor murino de ARNasas (New England BioLabs) a 1 unidad/µl, 0,8 µM del primer cebador RLX0479, 0,8 µM del segundo cebador RLX0480, y 0, 100, 1000, 10000, 100000 o 1000000 de copias por microlitro de la plantilla de T129A1. Se prepararon seis réplicas de la mezcla de reacción para cada una de las diferentes cantidades de plantilla de T129A1. La plantilla se calentó previamente a 85 °C durante 5 min y se enfrió en hielo durante 5 min antes de añadirla a la mezcla de reacción. Tras la adición de la plantilla, las mezclas de reacción se incubaron a 42 °C durante 15 min, seguido de 65 °C durante 90 min en un instrumento CFX 96 Touch (Bio-Rad). En estas condiciones de reacción, a 42 °C, las reacciones de ligación están relativamente favorecidas; a 65 °C, las reacciones de la polimerasa están relativamente favorecidas. Los puntos de inflexión para los ensayos se determinaron con un método de un único umbral con el programa informático CFX Manager (Bio-Rad), y se muestran en la figura 4. En el eje X se da a conocer la concentración de las moléculas de la plantilla por microlitro y en el eje Y se da a conocer el tiempo de inflexión (en minutos) del ensayo. De izquierda a derecha a lo largo del eje X, las barras son para: 1000 000, 100000, 10000, 1000, 100 o 0 (control sin plantilla/«CsP») copias por microlitro de la plantilla de T129A1. Tal y como se muestra en la figura 4, cada una de las reacciones que contienen la plantilla tiene un tiempo de inflexión por debajo de 40 min y es significativamente más rápido que la reacción de control sin plantilla (CsP).

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos dadas a conocer en la presente memoria son secuencias artificiales, a menos que se diga otra cosa.

40 Aunque en la presente memoria se han demostrado y descrito las realizaciones preferidas de la presente invención, será obvio para los expertos en la técnica que tales realizaciones se dan a conocer solo a modo de ejemplo. Tendrán lugar ahora numerosas variaciones, cambios y sustituciones por los expertos en la técnica sin alejarse de la invención. En la puesta en práctica de la invención se debe saber que se pueden emplear diferentes alternativas a las realizaciones de la invención descritas en la presente memoria.

45 Tal y como se utiliza en la descripción en la presente memoria y a lo largo de las reivindicaciones que siguen, un primer objeto que se describe que contiene «al menos una porción» de un segundo objeto puede contener todo, o por completo, el segundo objeto. Tal y como se utiliza en la descripción de la presente memoria y a lo largo de las reivindicaciones que siguen, los términos «comprender», «incluir» y «contener» y los tiempos verbales relacionados son inclusivos y abiertos, y no excluyen otros elementos o etapas de los métodos que no se hayan enumerado. De igual forma, la presencia de palabras y frases de extensión, tales como «uno o varios», «al menos», «pero sin limitarse a» u otras frases parecidas, en algunos casos no se deberá leer como

que significan que se pretende estrechar o restringir al caso más limitado en los casos donde tales frases de extensión puedan estar ausentes.

Este documento contiene material sujeto a la protección de los derechos de autor. El propietario de los derechos de autor (el solicitante de la presente memoria) no se opone a la reproducción facsímil mediante cualquiera de los documentos de la patente o la descripción de la patente, tal y como aparecen en el archivo o registro de patentes de la Oficina de Patentes y Marcas de los EE. UU., y en el resto de los casos se reserva todos los derechos de autor, cualquiera que fuese. Se debe aplicar la siguiente advertencia: Copyright 14-2013, Theranos, Inc.

Listado de secuencias

SEC ID Nº 1:

MGHHHHHHHHSSGHIEGRASADGPYLQILEQPKQRGFRFRYVCEGPSHGGLPGASSE
 KNKKSYPQVKICNYVGPAAKVVIVQLVTNGKNIHLHAHSLVGKHCEGDICTVTAGPKDMV
 VGFANLILHVTKKKVFETLEARMTEACIRGYNPGLLVHPDLAYLQAEGGGDRQLGDR
 EKELIRQAALQQTKEMDLSVVRLMFTAFLPDSTGSFTRRLEPVVSDAIYDSKAPNASNL
 KIVRMDRTAGCVTGGEEIYLLCDKVQKDDIQIRFYEEEENGGVWEGFGDFSPTDVHRQF
 AIVFKTPKYKDINITKPASVVFVQLRRKSDLETSEPKPFLYPEIKDKEEVQRKRQKGSSGT
 SGGSGGGMTLEEARKRVNELRDLIRYHNYRYVVLADPEISDAEYDRLLRELKELEERF
 PELKSPDSPTLQVGARPLEATFRPVRHPTRMYSLDNAFNLDDELKAFEERIERALGRKGPF
 AYTVEHKVDGLSVNLYEEGVLVYGATRGDGEVGEVETQNLLTIPTIPRRLKGVPERLE
 VRGEVYMPIEAFLRLNEELEERGERIFKNPRNAAAGSLRQKDPRITAKRGLRATFYALGL
 GLEEVEREGVATQFALLHWLKEKGFVVEHGYARAVGAEGVEAVYQDWLKKRRALPFE
 ADGVVVKLDELALWRELGYTARAPRFAIAYKFPAAEEKETRLLDVVFQVGRTRVTPVG
 ILEPVFLEGSEVSRVTLHNESYIEELDIRIGDWVLVHKAGGVIPVLRVLKERRTGEERPIR
 WPETCPECGRLLKEGKVHRCNPPLCPAKRFEAIRHFASRKAMDIQGLGEKLIERLLEK
 GLVKDVADLYRLRKEDLVGLERMGEKSAQNLLRQIEESKKRGLERLLYALGLPGVGEV
 LARNLAARFGNMDRLLEASLEELLEVEEVGELTARILETLKDPAFRDLVRRRLKEAGVE
 MEAKEKGGEALKGLTFVITGELSRPREEVKALLRRLGAKVTDSVSRKTSYLVVGENPGS
 KLEKARALGVPTLTEEELYRLLLEARTGKKAEELV

SEC ID NO: 2:

CAACTAATGAAACAGAAAGTCGTA ACTATCCTCTAGAAAAAGCGACTTCACATCTAT
 TAGGTTATGTTGGTCCCATTAACTCTGAAGAATTA AAAACAAAAAGAATATAAAGGCT
 ATAAAGATGATGCAGTTATTGGTAAAAAGGGACTCGAAAACTTTACGATAAAAAG
 CTCCAACATGAAGATGGCTATCGTGTCACAATCGTTGACGATAATAGCAATACAATC
 GCACATACATTAATAGAGAAAAAGAAAAAGATGGCAAAGATATTCAACTAACTAT
 TGATGCTAAAGTTCAAAGAGTATTTATAACAACATGAAAAATGATTATGGCTCAG
 G TACTGCTATCCACCCTCAAACAGGTGAATTATTAGCACTTGTAAGCACACCTTCAT
 ATGACGTCTATCCATTTATGTATGCATGAGTAACGAAGAATATAATAAATTAACCGA

ES 2 729 637 T3

AGATAAAAAAGAACCTCTGCTCAACAAGTTCCAGATTACAACCTTCACCAGGTTCAAC
TCAAAAAATATTAACAGCA

SEC ID NO: 3:

5 GGCTCAGGTACTGCTATCCACCC

SEC ID NO: 4:

10 TTTTGAGTTGAACCTGGTGAAGTTG

SEC ID NO: 5:

CGCCGGAUGGCUCUUGGGAAACCGAAGACAGCCACAACGGGAAACUAUGUAAA
UAAAAGGAAUAGCCCCACUACAAUUGGGGAAAUGUAACAUCGCCGGAUGGCUCU
UGGGAAACCCAGAAUGCGACUCACUGCUUCCAGCGAAAUCAUGGUCCUACA
UUGUAGAAACACCAAACUCUGAGAAUGGAGCAUGUUAUCCAGGAGAUU
UCAUCGACUAUGAGGAACUGAAGGAGCAAUUGAGCUCAGUAUCAU
CAUUAGAAAGAUUCGAAAUAUUUCCCAAGGAAAGUUCAUGG
CCCAACCACAACACUCUCAAAGGAGUAACAGCAGCAUGC
UCCCAUAGGGGAAAAAGCAGUUUUACAGAAAUUUGC
UAUGGCUGACGAAAACGGGGACUCAUACCCAAAGCUGA
ACAAUUCCUAUGUGAACAAUAAAGGAAAGAAGUC

15 SEC ID NO: 6:

CGCCGGATGGCTCTTGGGAAACC

20 SEC ID NO: 7:

TCGCTGGAAGCAGTGAGTCGCATTC

25 SEC ID NO: 8:

CUUCUUGAAUUUGAUGUCUAAGAGUAAUUUGCCAACGUGAGG
CCAUCAGAAAGUAUGGUGCGCAAGUGGCAGGAGCAAGGUA
AUAAAAGGGUCCUUGCCUUAAUUGGUGAAGCAGAUUGCC
UCCACGAAAAUACGGUGGAUUAAACAAAAGCAAGCCUUA
CUACACAGGAGAACAUGCAAAAGCCAUAGGAAAUUGCC
CAAUAUGGGUGAAAACACCCUUGAAGCUGGCCAAUGG
AACCAAUAUAGACCGCCUGCAAAACUAUUAAGGAAAG
AGGUUCUUCGGAAGCGACAGACAGUAACACUCAACUC
UCGACCAUCUGGUGUAACAACCUCG

SEC ID NO: 9:

30 CGGTGGATTAACAAAAGCAAGCC

SEC ID NO: 10:

35 ATTGGCCAGCTTCAAGGGTG

REIVINDICACIONES

1. Un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario, que comprende,
- (A) preparar una mezcla de reacción que comprende:
- 5 (i) un ácido nucleico bicatenario que comprende al menos una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, en donde el ácido nucleico bicatenario comprende una primera hebra y una segunda hebra,
- (ii) una ligasa de ácido nucleico aislada,
- (iii) un primer cebador, en donde el primer cebador es complementario a la primera hebra de la plantilla de ácido nucleico bicatenario,
- 10 (iv) un segundo cebador, en donde el segundo cebador es complementario a la segunda hebra de la plantilla de ácido nucleico bicatenario,
- en donde la plantilla de ácido nucleico de la mezcla de reacción se calienta a una temperatura elevada por encima de 70 °C;
- (B) incubar la mezcla de reacción con una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad de desplazamiento de hebra a una temperatura isotérmica de menos de 70 °C durante al menos 5 min,
- 15 en donde
- se generan numerosos concatémoros que comprenden al menos dos copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario, y la plantilla de ácido nucleico bicatenario se amplifica al menos 100 veces en menos de 60 min desde el inicio del método,
- en donde la polimerasa de ácido nucleico comprende una ADN polimerasa.
- 20 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la mezcla de reacción se incuba a una temperatura de no más de 65 °C.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la mezcla de reacción se incuba a una temperatura de no más de 60 °C.
- 25 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el método comprende tanto la ADN polimerasa como una transcriptasa inversa.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende el tratamiento de uno o varios de los componentes de la reacción con un colorante de ácido nucleico.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el primer y el segundo cebadores comprenden cada uno al menos 6 nucleótidos.
- 30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el primer y el segundo cebadores comprenden cada uno al menos 8 nucleótidos.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el primer y el segundo cebadores comprenden cada uno no más de 30 nucleótidos.

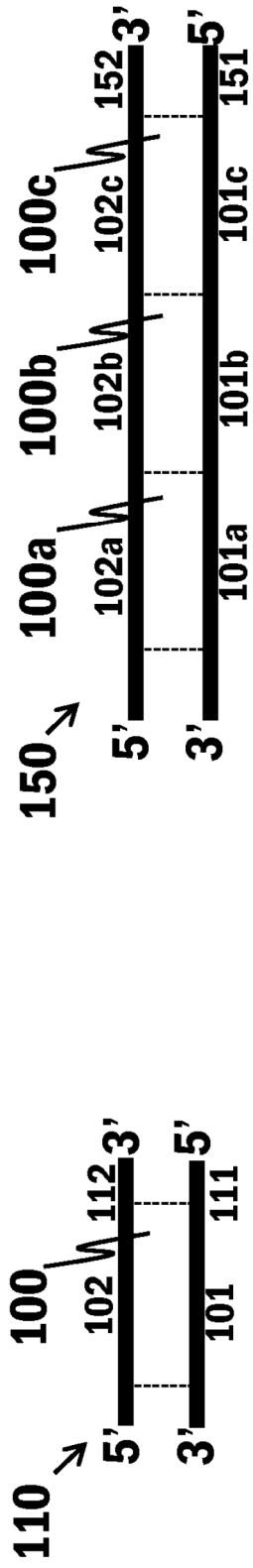


Fig. 1

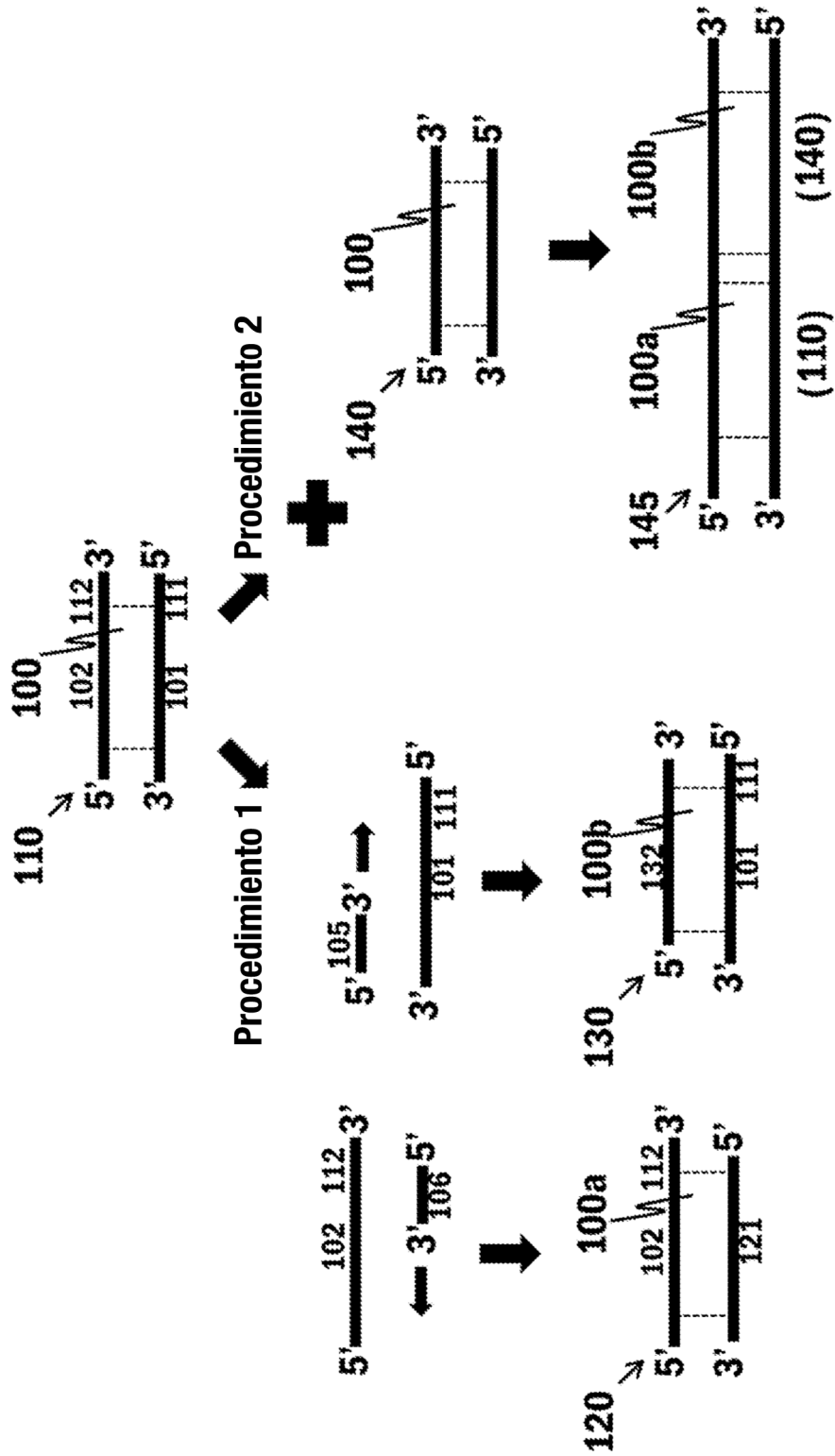


Fig. 1. Continuación

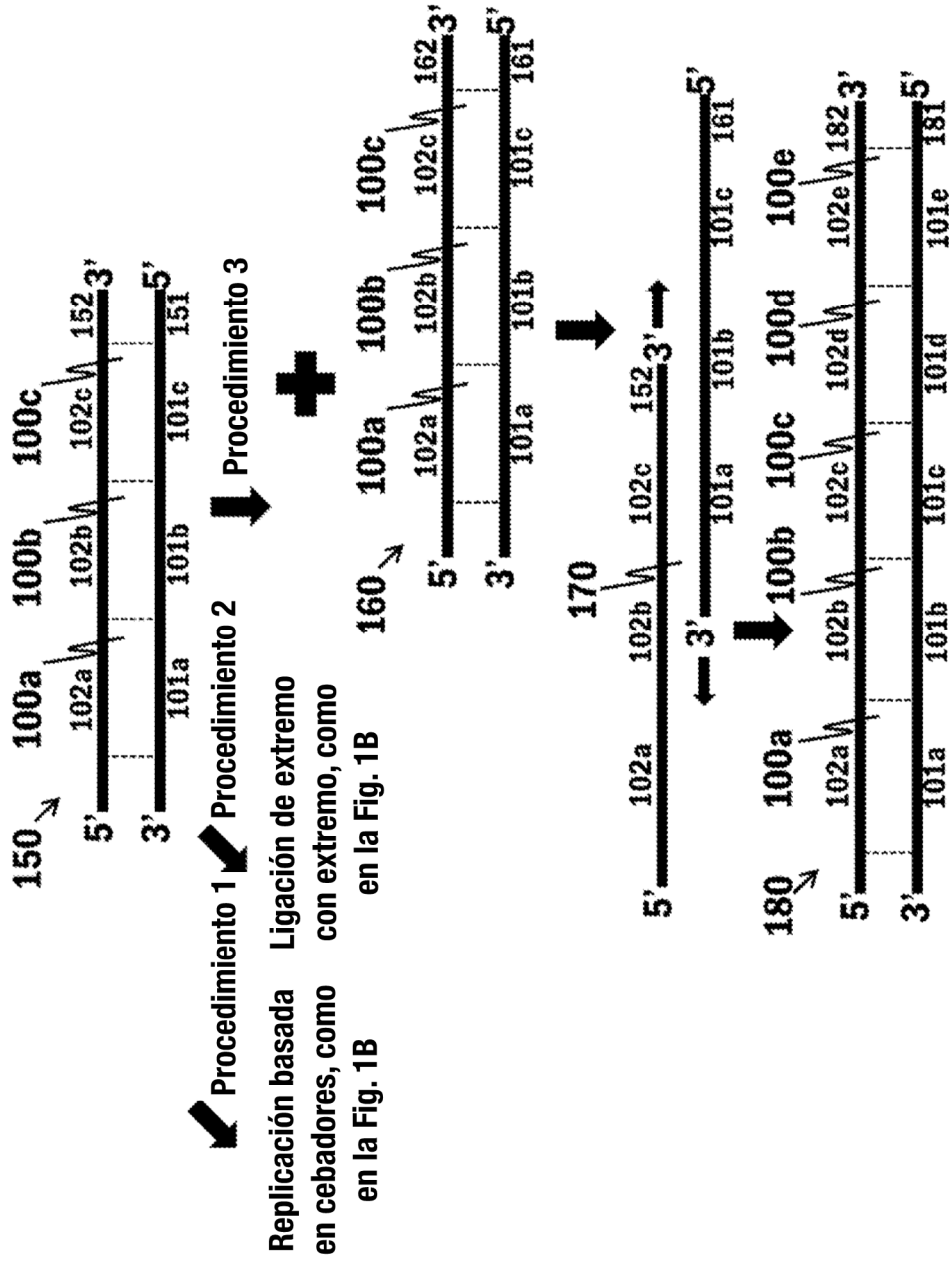


Fig. 1. Continuación

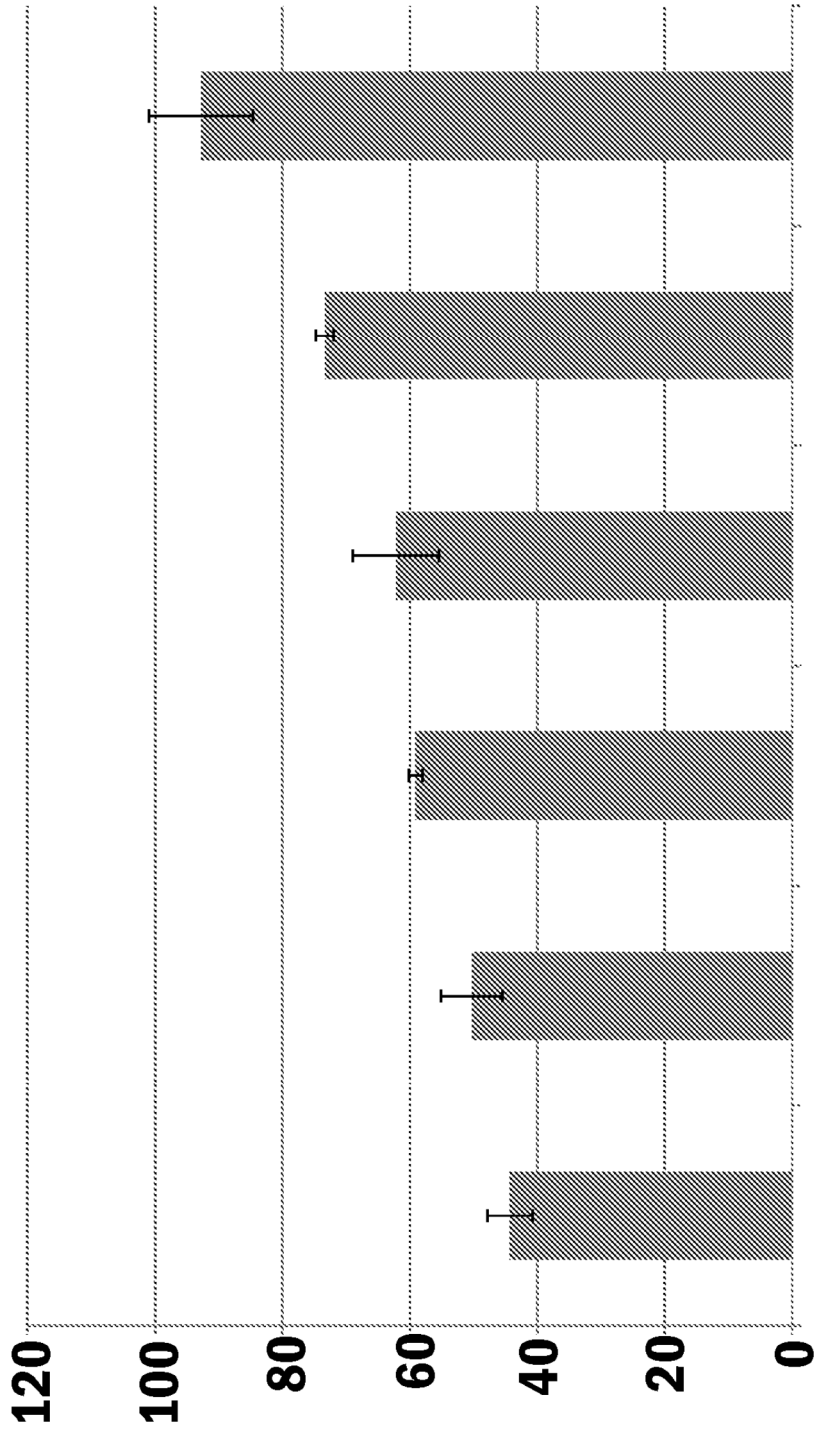


Fig. 2

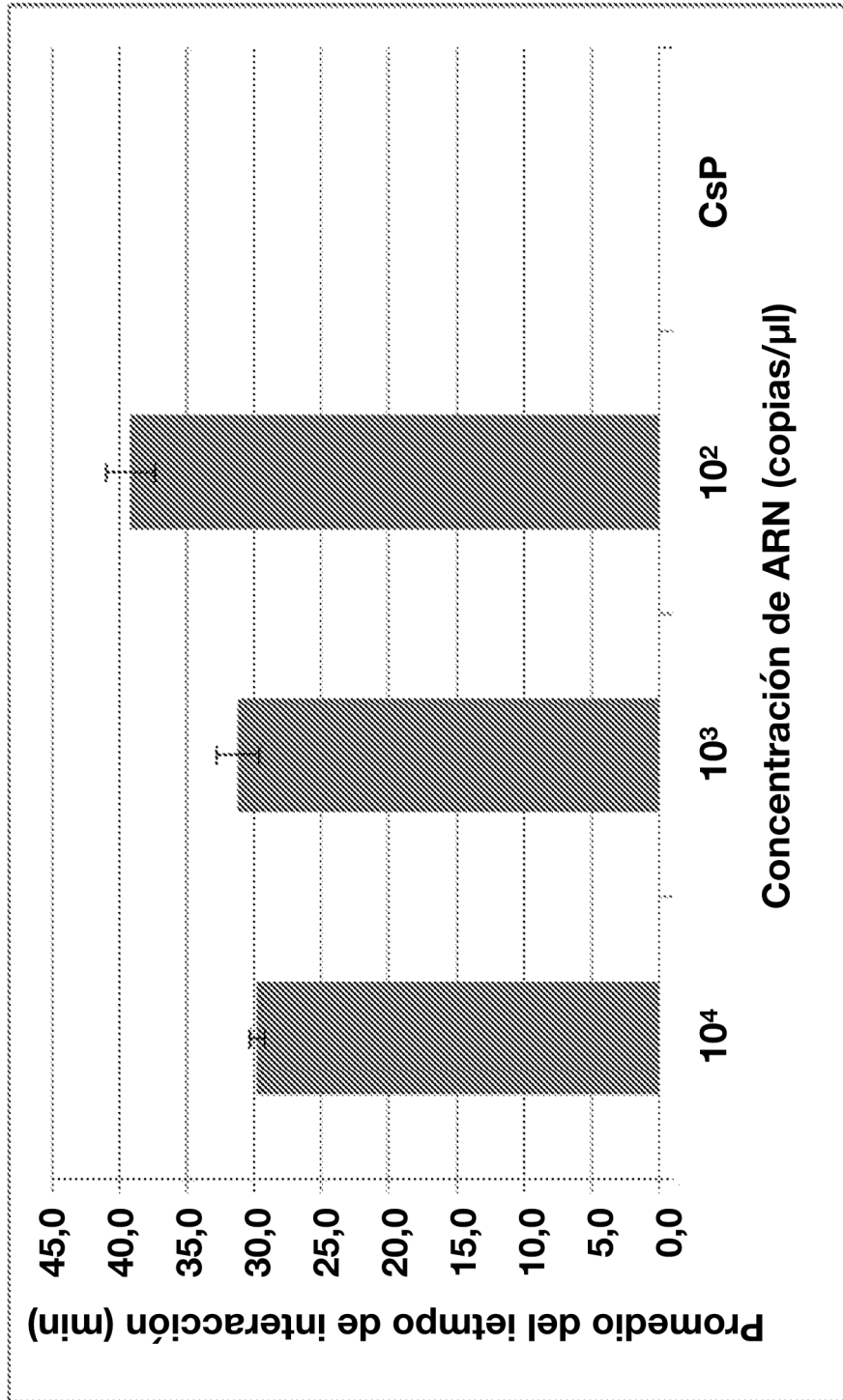


Fig. 3

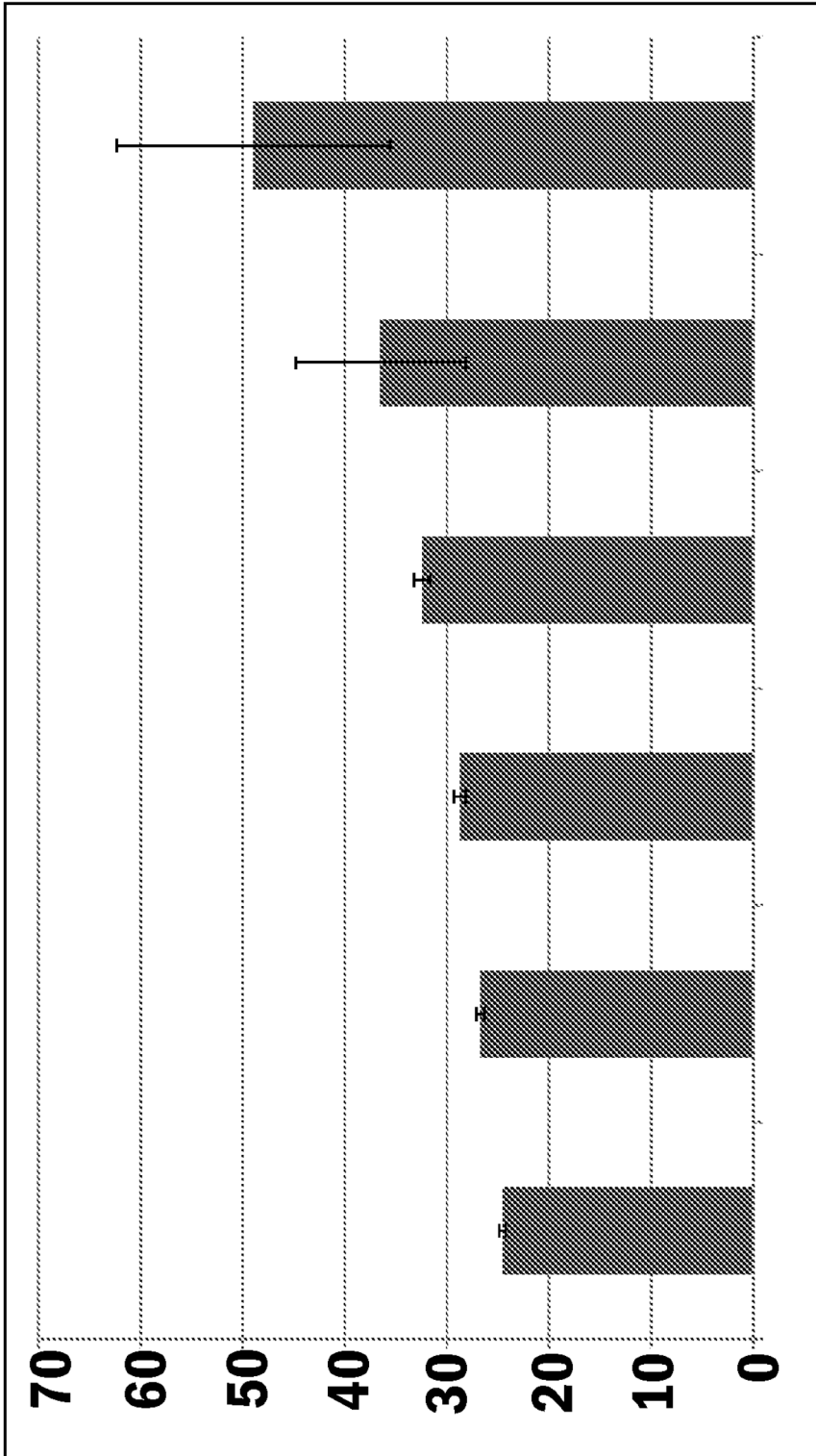


Fig. 4