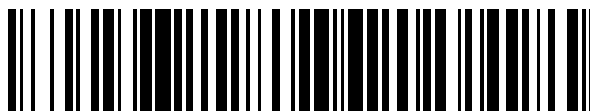


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 602**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2014 PCT/US2014/030028**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14145291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2014 E 14762846 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019 EP 2970961**

54 Título: **Amplificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361800340 P

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

24.01.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

PATEL, PRANAV

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 738 602 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 creciente necesidad de métodos y reactivos para la amplificación de ácidos nucleicos. La generación de numerosas copias de un ácido nucleico concreto es a menudo necesario o útil para utilizar el ácido nucleico para una determinada aplicación. Por ejemplo, para analizar la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de interés se replica con frecuencia el ácido nucleico para incrementar su número de copias antes de analizar la secuencia. En otro ejemplo, para determinar la presencia o ausencia de un ácido nucleico concreto en una muestra, se puede tratar una muestra en las condiciones en las que si el ácido nucleico concreto está presente en la muestra, se puede amplificar. 10 En otro ejemplo, un ácido nucleico para ser usado como una sonda se puede copiar repetidamente para generar 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 una serie de 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 diferentes temperaturas, que se repiten para varios ciclos. Esto requiere equipos u otros mecanismos para cambiar repetidamente la temperatura de la PCR. A otro método para la amplificación de ácidos nucleicos se le denomina 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). 20 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 diana.

25 La patente de los EE. UU. US 2001/03039 se refiere al aislamiento de ADN que contiene discordancias de bases nucleotídicas mediante un procedimiento de amplificación en círculo rodante modificado. Los fragmentos de ADN se pueden convertir en una forma que se puede utilizar como plantillas para amplificación en círculo rodante mediante la ligación de adaptadores formadores de horquillas a los extremos de los fragmentos. La patente europea EP 2048248 describe un método y un kit para amplificar un ácido nucleico con el uso de la amplificación en círculo rodante (RCA, por su nombre en inglés), con la formación de una plantilla de ADN circular monocatenario al hacer reaccionar una solución, que incluye dos oligómeros de horquilla, el ácido nucleico diana y otros componentes.

30 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

Se dan a conocer en la presente memoria métodos que se refieren a la amplificación de ácidos nucleicos.

35 De acuerdo con esta invención, se da a conocer un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico tal y como se define en la reivindicación 1 en la presente memoria. Las características preferidas y optativas de la invención se encuentran entre las subreivindicaciones en la presente memoria.

40 La descripción da a conocer un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario que comprende dos hebras complementarias independientes, que comprende: (A) generar una hebra circular a partir de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, en donde la hebra circular comprende el componente monocatenario de al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción y las secuencias de cada una de las dos hebras complementarias independientes; (B) tratar la hebra circular con un primer cebador oligonucleotídico y una polimerasa, en las condiciones en las que se sintetiza un producto de extensión del primer cebador; (C) tratar el producto de extensión del primer cebador de la etapa (B) con un segundo cebador oligonucleotídico y una polimerasa, en las condiciones en las que se sintetiza un producto de extensión del segundo cebador que es complementario al producto de extensión del primer cebador de la etapa (B), para producir un nuevo ácido nucleico bicatenario que comprende al menos una porción del producto de extensión del primer cebador y al menos una porción del producto de extensión del segundo cebador; y (D) tratar el nuevo ácido nucleico bicatenario de la etapa (C) con una enzima de restricción que reconoce una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción que corresponde a al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción de la etapa (A), en las condiciones en las que el nuevo ácido nucleico bicatenario de la etapa (C) se escinde para formar dos o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños, al menos dos de los cuales comprenden al menos una porción de una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal de la etapa (A), con lo que se amplifica la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal. 45 50

55 La descripción da a conocer un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal que comprende dos hebras complementarias independientes, que comprende: (A) tratar la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal con dos adaptadores polinucleotídicos en las condiciones en las que se forma una hebra circular que comprende los dos adaptadores y las dos hebras complementarias, en donde cada adaptador comprende una hebra de ácido nucleico única que contiene el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción y que está configurado para, en determinadas condiciones, adoptar una estructura ahorquillada; (B) tratar la hebra circular

de la etapa (A) con un primer cebador oligonucleotídico y una polimerasa, en las condiciones en las que se sintetiza un producto de extensión del primer cebador; (C) tratar el producto de extensión del primer cebador de la etapa (B) con un segundo cebador oligonucleotídico y una polimerasa, en las condiciones en las que se sintetiza un producto de extensión del segundo cebador que es complementario al producto de extensión del primer cebador de la etapa (B), para producir un nuevo ácido nucleico bicatenario que comprende al menos una porción del producto de extensión del primer cebador y al menos una porción del producto de extensión del segundo cebador; y (D) tratar el nuevo ácido nucleico bicatenario de la etapa (C) con una enzima de restricción que reconoce una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción que corresponde a un componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción de la etapa (A), en las condiciones en las que el nuevo ácido nucleico bicatenario de la etapa (C) se escinde para formar dos o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños, al menos dos de los cuales comprenden al menos una porción de una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal de la etapa (A), con lo que se amplifica la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal.

En algunas realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, que comprende: (A) tratar una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal que comprende dos hebras complementarias y un primer y segundo extremo con un primer y un segundo adaptador polinucleotídico, en las condiciones en las que: i) el primer adaptador está ligado a los extremos de ambas hebras complementarias presentes en el primer extremo de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, ii) el segundo adaptador está ligado a los extremos de ambas hebras complementarias presentes en el segundo extremo del ácido nucleico bicatenario lineal, y iii) se forma una hebra circular que comprende los dos adaptadores y las dos hebras complementarias, en donde cada adaptador: i) comprende un ácido nucleico monocatenario que contiene el complemento monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción y ii) se configura para que, en determinadas condiciones, adopte una estructura ahorquillada; (B) tratar la hebra circular de la etapa (A) con un primer cebador oligonucleotídico y una polimerasa, en las condiciones en las que se sintetiza un producto de extensión del primer cebador; (C) tratar el producto de extensión del primer cebador de la etapa (B) con un segundo cebador oligonucleotídico y una polimerasa, en las condiciones en las que se sintetiza un producto de extensión del segundo cebador que es complementario al producto de extensión del primer cebador de la etapa (B), para producir un nuevo ácido nucleico bicatenario que comprende al menos una porción del producto de extensión del primer cebador y al menos una porción del producto de extensión del segundo cebador; y (D) tratar el nuevo ácido nucleico bicatenario de la etapa (C) con una enzima de restricción que reconoce una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción que corresponde al componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción de al menos uno de los adaptadores, en las condiciones en las que el nuevo ácido nucleico bicatenario de la etapa (C) se escinde para formar dos o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños, al menos dos de los cuales comprenden al menos una porción de una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal de la etapa (A), con lo que se amplifica la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal.

Se describe un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal que comprende dos hebras complementarias separadas que comprenden: (A) ligar un adaptador que comprende una sola hebra de ácido nucleico en cada extremo de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal para producir una hebra circular que contiene la fórmula general en la dirección de 5' a 3': -A1-S1-A2-S2-, en donde cada adaptador contiene al menos cuatro bases nucleotídicas y un componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción, A1 y A2 designan adaptadores independientes, S1 designa una primera hebra complementaria de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, S2 designa una segunda hebra complementaria de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, el extremo 3' de A1 se liga al extremo 5' de S1, el extremo 3' de S1 se liga al extremo 5' de A2, el extremo 3' de A2 se liga al extremo 5' de S2 y el extremo 3' de S2 se liga al extremo 5' de A1; (B) hibridar un primer cebador oligonucleotídico a la hebra circular; (C) extender el primer cebador oligonucleotídico a lo largo de la hebra circular con el uso de una polimerasa para formar un producto de extensión del primer cebador; (D) hibridar un segundo cebador oligonucleotídico al producto de extensión del primer cebador; (E) extender el segundo cebador oligonucleotídico a lo largo de al menos una porción del producto de extensión del primer cebador mediante el uso de una polimerasa para producir un nuevo ácido nucleico bicatenario que comprende al menos una porción del producto de extensión del primer cebador y al menos una porción del producto de extensión del segundo cebador; y (F) escindir el nuevo ácido nucleico bicatenario de la etapa con una enzima de restricción que reconoce una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción que corresponde al componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción de al menos uno de los adaptadores para formar dos o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños, al menos dos de los cuales comprenden al menos una porción de una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal de la etapa (A), con lo que se amplifica la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal.

Se describe un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, que comprende: (A) preparar una mezcla de reacción que comprende: (i) la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal que comprende una primera hebra complementaria y una segunda hebra complementaria, (ii) una ligasa de ácido nucleico aislada, (iii) una polimerasa de ácido nucleico aislada, y (iv) una enzima de restricción aislada; y (B) incubar la mezcla de reacción durante al menos 3 minutos.

Se describe un recipiente, que comprende en comunicación fluidica en la que: (A) una ligasa de ácido nucleico aislada, (B) una polimerasa de ácido nucleico aislada, (C) una enzima de restricción aislada y (D) un adaptador polinucleotídico, en donde el adaptador comprende una sola hebra de ácido nucleico que contiene el componente monocatenario de

una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción y que está configurado para, en determinadas condiciones, adoptar una estructura ahorquillada.

5 La descripción da a conocer un kit para detectar un ácido nucleico diana de interés, en donde el kit puede comprender dos o más recipientes aislados desde el punto de vista fluidoico, en donde los contenedores conjuntamente comprenden: (A) una ligasa de ácido nucleico aislada, (B) una polimerasa de ácido nucleico aislada, (C) una enzima de restricción aislada y (D) un adaptador polinucleotídico, en donde el adaptador comprende una sola hebra de ácido nucleico que contiene el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción y que está configurado para, en determinadas condiciones, adoptar una estructura ahorquillada.

10 Se describe un método que comprende la amplificación de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal mediante un procedimiento que implica la generación de ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños, en donde el método se puede repetir durante 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 o más ciclos, en donde un ácido nucleico bicatenario más corto de un ciclo del método se utiliza como una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en otro ciclo del método.

15 En algunas realizaciones, una composición útil en el presente método puede comprender una ligasa de ácido nucleico aislada, una polimerasa de ácido nucleico aislada y una enzima de restricción aislada, y puede además comprender una enzima de tipo transcriptasa inversa aislada.

La descripción da a conocer una composición o un método que implica la amplificación de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, en donde el método puede comprender la generación de concatémicos que comprenden dos o más copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal.

20 Se describe una composición o un método en donde interviene la amplificación de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal y la generación de un concatémico que comprende dos o más copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, en donde el método puede comprender la escisión del concatémico con una enzima de restricción para generar dos o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños que contienen al menos una porción de una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal.

25 La descripción da a conocer una composición o un método en donde interviene el adaptador que comprende una única hebra de ácido nucleico que contiene el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción y que está configurado para, en determinadas condiciones, adoptar una estructura ahorquillada, en donde el tallo de la estructura ahorquillada comprende los nucleótidos de los extremos 5' y 3' del adaptador y 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 o más nucleótidos cadena abajo o cadena arriba de los nucleótidos de los extremos 5' o 3', respectivamente.

30 La descripción da a conocer una composición o un método en donde interviene el adaptador que comprende una única hebra de ácido nucleico que contiene el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción y que está configurada para, en determinadas condiciones, adoptar una estructura ahorquillada, la hebra única de ácido nucleico comprende una región en 5', una región central y una región en 3', la región en 5' y la región en 3' son complementarias entre sí y la región en 5' y la región en 3', cuando se hibridan la una con la otra, forman el tallo de la estructura ahorquillada.

35 La descripción da a conocer una composición o un método en donde interviene un adaptador que tiene una estructura ahorquillada, el tallo de la estructura ahorquillada comprende los nucleótidos de los extremos 5' y 3' del adaptador, y comprende una región más externa y una región interna, en donde la región más externa del tallo comprende los nucleótidos de los extremos 5' y 3' del adaptador.

40 Se describe un método en el que se amplifica una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, en donde el método comprende la preparación de una mezcla de reacción que contiene los reactantes para realizar el método. En algunas realizaciones, se puede preparar una mezcla de reacción en un recipiente o colocarse en él.

45 La descripción da a conocer un método en el que se prepara una mezcla de reacción que contiene los reactantes para la realización del método, en donde la mezcla de reacción se puede incubar a una temperatura constante. La mezcla de reacción se puede incubar a una temperatura constante durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90, 120 o 180 min. La mezcla de reacción se puede incubar a una temperatura constante de no más de 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 o 10 °C.

50 La descripción da a conocer un método que implica la generación de un ácido nucleico bicatenario más corto a partir de la escisión de un nuevo ácido nucleico bicatenario, en donde el ácido nucleico bicatenario más corto generado en un primer ciclo del método se puede utilizar como la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en un segundo ciclo del método.

55 La descripción da a conocer un método que implica la generación de dos o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños a partir de la escisión de un nuevo ácido nucleico bicatenario, en donde al menos dos de los dos o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños contienen una copia completa de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal utilizada en el método como material de partida para generar los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños.

En algunas realizaciones, en un método dado a conocer más arriba o en otra parte de la presente memoria que implica la escisión de un nuevo ácido nucleico bicatenario para generar uno o varios ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños, el nuevo ácido nucleico bicatenario se escinde mediante una enzima de restricción que reconoce una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción en el nuevo ácido nucleico bicatenario.

5 Se describe un método en el que se amplifica una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, en donde el número de copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal se dobla al menos cada 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150, 180 o 240 min del método.

10 Se describe un método en el que se amplifica una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, en donde el método además comprende la generación de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal para la amplificación a partir de una molécula diana de ácido nucleico monocatenario. En algunas realizaciones, la molécula diana de ácido nucleico monocatenario puede ser una molécula monocatenaria de ADN o ARN. En algunas realizaciones, una enzima de tipo transcriptasa inversa genera una molécula de ADN a partir de una molécula de ARN diana.

La descripción da a conocer un método o una composición en donde interviene un primer cebador oligonucleotídico, en donde el primer cebador es complementario a una hebra de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal.

15 La descripción da a conocer un método o una composición en donde interviene un segundo cebador oligonucleotídico, en donde el segundo cebador es complementario a una hebra de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal.

20 La descripción da a conocer un método o una composición en donde interviene un primer cebador oligonucleotídico y un segundo cebador oligonucleotídico, en donde tanto el primer cebador oligonucleotídico como el segundo cebador oligonucleotídico son complementarios a una hebra complementaria de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, en donde el primer cebador oligonucleotídico y el segundo cebador oligonucleotídico son complementarios a diferentes hebras de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal.

La descripción da a conocer un método o una composición en donde interviene un primer cebador oligonucleotídico y un segundo cebador oligonucleotídico y al menos un adaptador, en donde al menos uno del primer cebador oligonucleotídico y del segundo cebador oligonucleotídico es complementario al adaptador.

25 La descripción da a conocer un método o una composición en donde interviene un cebador, en donde el cebador es un oligodesoxirribonucleótido.

30 La descripción da a conocer un método o una composición en donde interviene al menos un primer adaptador y un segundo adaptador, en donde el primer y el segundo adaptador contienen la misma secuencia nucleotídica. En un método o una composición en donde interviene al menos un primer adaptador y un segundo adaptador, el primer y el segundo adaptadores pueden contener diferentes secuencias nucleotídicas.

35 La descripción da a conocer un método o una composición en donde interviene al menos un primer adaptador y un segundo adaptador, en donde el primer y el segundo adaptadores contienen un componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción para diferentes enzimas de restricción. En un método o una composición en donde interviene al menos un primer adaptador y un segundo adaptador, el primer y segundo adaptadores contienen un componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción para la misma enzima de restricción.

La descripción da a conocer un método o una composición en donde interviene un adaptador, en donde el adaptador contiene una secuencia de nucleótidos de tal forma que, en determinadas condiciones, forma una estructura ahorquillada que contiene un extremo romo por la combinación de los extremos 5' y 3' del adaptador.

40 Se describe un método o una composición en donde interviene un adaptador, en donde el adaptador contiene una secuencia de nucleótidos de tal forma que, en determinadas condiciones, forma una estructura ahorquillada que contiene un extremo cohesivo por la combinación de los extremos 5' y 3' del adaptador. En algunos de tales métodos o composiciones, el adaptador que forma una estructura ahorquillada que contiene un extremo cohesivo por la combinación de los extremos 5' y 3' del adaptador tiene una protuberancia 3' en la región del tallo. En algunos de tales métodos o composiciones, el adaptador que forma una estructura ahorquillada que contiene un extremo cohesivo por la combinación de los extremos 5' y 3' del adaptador tiene una protuberancia 5' en la región del tallo.

45 La descripción da a conocer un método o una composición en donde interviene un adaptador, en donde el adaptador contiene una secuencia de nucleótidos que, en determinadas condiciones, forma una estructura ahorquillada que contiene una mitad de una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción por la combinación de los extremos 5' y 3' del adaptador.

50 La descripción da a conocer un método o una composición en donde interviene un adaptador, en donde el adaptador contiene una secuencia de nucleótidos que comprende una región 5', una región central y una región 3', en donde la región 5' y la región 3' de la secuencia son complementarias la una a la otra de tal forma que, en determinadas condiciones, se hibridan la una con la otra y forman el tallo de una estructura ahorquillada, y el tallo comprende una parte más externa que comprende los nucleótidos de los extremos 5' y 3' y una parte interna.

La descripción da a conocer un método o una composición en donde interviene un adaptador que contiene un tallo que comprende una parte más externa y una parte interna, en donde la parte más externa del adaptador contiene un extremo romo. En tales métodos o composiciones en donde interviene un adaptador que contiene un tallo que comprende una parte más externa y una parte interna, la parte más externa del adaptador contiene un extremo cohesivo. En algunos métodos o composiciones en donde interviene un adaptador que contiene un tallo que comprende una parte más externa y una parte interna, la parte más externa del adaptador contiene la mitad de una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción. En algunos métodos o composiciones en donde interviene un adaptador que contiene un tallo que comprende una parte más externa y una parte interna, en donde la parte más externa del adaptador contiene la mitad de una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción, si dos de los adaptadores se ligan extremo con extremo (a saber, en la parte más externa del adaptador), la versión completa de la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción se forma a partir de la combinación de las dos mitades de la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción suministrada por los dos adaptadores. En algunos métodos o composiciones en donde interviene un adaptador que comprende un tallo que comprende una parte más externa y una parte interna, la parte interna comprende una secuencia bicatenaria completa de enzima de restricción.

La descripción da a conocer un método o una composición en donde interviene una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal que comprende una primera hebra complementaria y una segunda hebra complementaria, en donde la primera hebra complementaria y la segunda hebra complementaria contienen el mismo número de nucleótidos. En algunos métodos o composiciones en donde interviene una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal que comprende una primera hebra complementaria y una segunda hebra complementaria, la primera hebra complementaria y la segunda hebra complementaria contienen una cantidad diferente de nucleótidos. En algunos métodos o composiciones en donde interviene una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, la plantilla tiene extremos romos en ambos extremos. En algunos métodos o composiciones en donde interviene una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, la plantilla tiene extremos cohesivos en ambos extremos.

En algunos métodos o composiciones en donde interviene una polimerasa, la polimerasa tiene actividad de desplazamiento de hebra. En algunos métodos o composiciones en donde interviene una polimerasa que genera el producto de extensión de un primer cebador, la polimerasa tiene actividad de desplazamiento de hebra. En algunos métodos o composiciones en donde interviene una polimerasa que genera el producto de extensión de un segundo cebador, la polimerasa tiene actividad de desplazamiento de hebra. En algunos métodos o composiciones en donde interviene una polimerasa, la polimerasa es una ADN polimerasa.

La descripción da a conocer una mezcla de reacción, recipiente o kit que comprende una polimerasa de ácido nucleico. La descripción da a conocer una polimerasa de ácido nucleico que es una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de hebra. La descripción da a conocer una polimerasa de ácido nucleico que es una ARN polimerasa. La descripción da a conocer una polimerasa de ácido nucleico que es una transcriptasa inversa. La descripción da a conocer una mezcla de reacción, recipiente o kit que 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. Se describe una mezcla de reacción, recipiente o kit que comprende nucleótidos y tampón.

La descripción da a conocer un método, mezcla de reacción, recipiente o kit en donde interviene una plantilla polinucleotídica, en donde la plantilla polinucleotídica es una molécula monocatenaria. La descripción da a conocer un método, mezcla de reacción, recipiente o kit en donde interviene una plantilla polinucleotídica, en donde la plantilla polinucleotídica comprende una hebra de una plantilla de ácido nucleico bicatenario. En un método, mezcla de reacción, recipiente o kit descritos en donde interviene una plantilla polinucleotídica, la plantilla polinucleotídica es una molécula de ADN o de ARN.

La descripción da a conocer un método, mezcla de reacción, recipiente o kit en donde interviene una plantilla de ácido nucleico, en donde la plantilla de ácido nucleico es una molécula de ARN o ADN. Una plantilla de ácido nucleico puede ser una molécula monocatenaria o bicatenaria.

La descripción da a conocer un método que implica la incubación de una mezcla de reacción, en donde 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. Todas las etapas del método se pueden realizar a una temperatura de no más de 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 37, 35, 30, 25 o 20 °C. La descripción da a conocer una mezcla de reacción, recipiente o kit mantenido a una temperatura de no más de 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 37, 35, 30, 25 o 20 °C. Un método descrito en la presente memoria se realiza sin termociclado.

Una mezcla de reacción, recipiente o kit descrito en la presente memoria no contiene una enzima de tipo recombinasa.

Un método, mezcla de reacción, recipiente o kit descrito 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, 1 000, 10 000, 100 000 o 1 000 000 de copias del cebador.

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.

Dos o más etapas de un método dado a conocer en la descripción de la presente memoria se realizan simultáneamente en la misma mezcla de reacción. En algunos de tales métodos, todas las etapas de un método se realizan simultáneamente en la misma mezcla de reacción.

5 En algunos métodos dados a conocer en la presente memoria, una plantilla de ácido nucleico se amplifica al menos 10, 100, 1 000, 10 000, 100 000 o 1 000 000 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 algunos métodos dados 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, 1 000, 10 000, 100 000 o 1 000 000 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.

10 Se describe una plantilla de ácido nucleico que puede ser una plantilla de ácido nucleico bicatenario o monocatenario.

Se describe un kit que comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico diana de interés.

15 Se describe un método o una composición en los que se ligan dos o más ácidos nucleicos, en donde la ligación se realiza enzimáticamente. En algunos métodos o composiciones en los que se ligan dos o más ácidos nucleicos, la ligación se realiza químicamente.

20 En los métodos o las composiciones descritos en la presente memoria en los que interviene el tratamiento de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal que comprende dos hebras complementarias con dos moléculas de adaptador en las condiciones en las que se forma una hebra circular que comprende las dos moléculas de adaptador y las dos hebras complementarias, las condiciones comprenden poner en contacto con una ligasa las moléculas de adaptador y la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal.

25 En algunos métodos descritos en la presente memoria en donde interviene una hebra circular que comprende dos hebras complementarias de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, el método puede comprender una etapa para promover o mantener la separación de las dos hebras complementarias dentro de la hebra circular (por ejemplo, para disminuir al mínimo la autohibridación de las secuencias de las dos hebras complementarias que forman parte de la hebra circular). En algunos métodos, la etapa puede incluir el calentamiento de la hebra circular. En algunos métodos, la etapa puede incluir la incubación de la hebra circular con una molécula que interfiere con la hibridación de la secuencia de las hebras complementarias. En algunos métodos, una molécula que interfiere con la hibridación de las secuencias de las hebras complementarias puede ser un cebador que es complementario a una de las hebras complementarias. En algunos métodos, el cebador puede contener uno o varios nucleótidos alternativos (p. ej., un nucleótido de ácido nucleico bloqueado).

30 En algunos métodos descritos, todas las etapas de tal método dado a conocer en la presente memoria se pueden realizar a una temperatura que no supere los 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15 o 10 °C.

Dos o más etapas de un método descrito en la presente memoria se realizan simultáneamente.

35 En algunos métodos dados a conocer en la presente memoria en los que se amplifica una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal se amplifica al menos 2, 5, 10, 20, 50, 100, 1 000, 10 000, o 100 000 veces en menos de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90 o 120 min desde el inicio del método.

En algunos métodos descritos en la presente memoria, el punto de inicio implica la amplificación de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal es el punto en el que todos los reactantes para la realización del método se han combinado en un único recipiente.

40 Algunos métodos descritos en la presente memoria comprenden el tratamiento con uno o varios componentes de la reacción con un colorante de ácido nucleico. Algunos métodos descritos en la presente memoria comprenden la medición de una señal fluorescente desde un ensayo que comprende el método.

Algunas mezclas de reacción, recipientes o kits dados a conocer en la presente memoria comprenden un colorante de ácido nucleico.

45 La descripción da a conocer un método en el que interviene un nuevo ácido nucleico bicatenario que comprende al menos una porción del producto de extensión del primer cebador y al menos una porción del producto de extensión del segundo cebador, en donde el nuevo ácido nucleico bicatenario comprende todo el producto de extensión del primer cebador. En los métodos descritos en los que interviene un nuevo ácido nucleico bicatenario que comprende al menos una porción del producto de extensión del primer cebador y al menos una porción del producto de extensión del segundo cebador, el nuevo ácido nucleico bicatenario comprende tanto todo el producto de extensión del primer cebador como todo el producto de extensión del segundo cebador.

50 Los métodos que se describen en la presente memoria implican la escisión de un nuevo ácido nucleico bicatenario para formar dos o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños, en los que al menos dos de los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños comprenden al menos una porción de una copia de una plantilla de ácido nucleico

bicatenario lineal, en donde los al menos dos ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños pueden cada uno comprender una copia completa de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal.

5 Se describe un método de ensayo para un microorganismo patógeno en una muestra, en donde el método comprende la realización de un método tal y como está descrito en la presente memoria para amplificar un ácido nucleico de un microorganismo patógeno. Se describe que el ácido nucleico diana utilizado en una composición o un método dado a conocer en la presente memoria puede ser un ácido nucleico de un microorganismo patógeno. El primer y segundo cebadores utilizados en un método dado a conocer en la presente memoria pueden cada uno contener regiones que son complementarias a una secuencia del ácido nucleico del microorganismo patógeno, o que son complementarias a una secuencia que es complementaria a una secuencia del ácido nucleico del patógeno. El ácido nucleico del patógeno puede ser ADN o ARN. Los microorganismos patógenos pueden incluir, pero 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 de la presente memoria.

15 En la presente memoria se describe un método para la amplificación de un ácido nucleico que se puede usar para un método diagnóstico en el exterior del cuerpo de un humano o de un animal. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de un humano o animal, y a la muestra se le puede analizar la presencia de un ácido nucleico diana de interés con un método descrito en la presente memoria para la amplificación de ácidos nucleicos.

20 Un método descrito en la presente memoria puede incluir: a) dar a conocer uno o más reactivos para realizar un método tal y como se describe en la presente memoria (p. ej., uno o varios de 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 difiere de una temperatura central en más o menos 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 °C durante la incubación. Tal temperatura central puede ser, por ejemplo, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 °C.

25 Un método descrito en la presente memoria se puede realizar a una temperatura sustancialmente isotérmica. Tal 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.

Un método descrito en la presente memoria se puede llevar a cabo 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.

En algunas composiciones y métodos descritos en la presente memoria en donde interviene una polimerasa de ácido nucleico, la polimerasa de ácido nucleico tiene actividad exonucleasa de 3' a 5'.

30 Las referencias en la presente memoria para la generación de una copia, o la amplificación, de una plantilla polinucleotídica o plantilla de ácido nucleico incluye la generación de una copia que contiene la secuencia de la plantilla polinucleotídica / plantilla de ácido nucleico, así como la generación de una copia que contiene una secuencia análoga de la plantilla polinucleotídica / plantilla de ácido nucleico, a menos que el contexto claramente dictamine otra cosa. Por ejemplo, si una plantilla polinucleotídica es ARN, la generación de 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 de ARN de la plantilla polinucleotídica (a saber, en la secuencia de ADN contiene T en vez de U).

Breve descripción de las figuras

En las figuras,

40 La figura 1 es un esquema general de un método descrito en la presente memoria. En las figuras 1A a 1G se muestran diferentes características o etapas de los métodos descritos en la presente memoria,

La figura 2 es un gráfico que representa los resultados de reacciones realizadas de acuerdo con un método descrito en la presente memoria,

La figura 3 es un gráfico que representa los resultados de reacciones realizadas de acuerdo con un método descrito en la presente memoria, y

45 La figura 4 es una imagen de un gel de agarosa que contiene muestras de reacciones realizadas de acuerdo con un método descrito en la presente memoria.

50 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 hacer fácil 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 deben considerar tímidos de ninguna manera.

Descripción detallada

Se describen en la presente memoria métodos y composiciones relacionados con la amplificación de ácidos nucleicos.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, "ácido nucleico" incluye tanto el ADN como el 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.

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un "polinucleótido" se refiere a una hebra polimérica que contiene dos o más nucleótidos. "Polinucleótidos" incluye cebadores, oligonucleótidos, hebras de ácido nucleico, 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 hebra. 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.

10 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un "ácido nucleico bicatenario lineal" se refiere a un ácido nucleico bicatenario que tiene dos extremos accesibles (p. ej., un "primer extremo" y un "segundo extremo"). Así pues, "ácidos nucleicos bicatenarios lineales" difiere de los ácidos nucleicos bicatenarios circulares, que no tienen ningún extremo accesible. Un "ácido nucleico bicatenario lineal" comprende dos hebras complementarias de ácidos nucleicos. Un "ácido nucleico bicatenario lineal" puede tener cualquier conformación (p. ej., curvado, retorcido, lineal, etc.) siempre y cuando tenga dos extremos accesibles. En cada extremo de un ácido nucleico bicatenario lineal, están presentes el extremo 5' de una hebra y el extremo 3' de la otra hebra del ácido nucleico bicatenario lineal. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una "plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal" se refiere a un ácido nucleico bicatenario lineal que se puede amplificar de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria.

15 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un ácido nucleico o molécula "diana" o "destinatario" se refiere a un ácido nucleico de interés. Una molécula/ácido nucleico diana puede ser de cualquier tipo, entre ellos un ADN o ARN monocatenario o bicatenario (p. ej., ARNm). En algunos casos, un ácido nucleico diana puede ser un ácido nucleico que puede directamente funcionar como una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en un método dado a conocer en la presente memoria (p. ej., una molécula de ADN bicatenario lineal), o puede ser un ácido nucleico que necesita más procesamiento o conversión para funcionar como una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en un método dado a conocer en la presente memoria (p. ej., ARNm).

20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, las secuencias "complementarias" se refieren a dos secuencias de nucleótidos que, cuando se hibridan de forma antiparalela la una con la otra, contienen muchas bases nucleotídicas individuales que pueden aparearse unas 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 para cada base nucleotídica de dos secuencias sean capaces 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 se pueden aún 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. Además, las secuencias "complementarias" pueden contener uno o varios análogos de nucleótido o análogos de nucleobase.

25 Tal y como se utiliza en la presente memoria, "tipo de adaptador" se refiere a una molécula adaptadora que tiene una secuencia de nucleótidos concreta. Si dos adaptadores tienen alguna diferencia en la secuencia de nucleótidos o alguna modificación química, se consideran que son de dos "tipos" diferentes.

30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un "componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción" se refiere a una secuencia de nucleótidos que es la misma que la secuencia de una hebra de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción, leída en el sentido de 5' a 3'. Por ejemplo, un "componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción" para la enzima de restricción EcoRI es "GAATTC", para la enzima de restricción Stul es "AGGCCT" y para la enzima de restricción BsmI es "GAATGCN" o "NGCATT".

35 Tal y como se utiliza en la presente memoria, una "secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción" se refiere a la estructura bicatenaria formada cuando ambas hebras de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción (p. ej., un "componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción" y su complemento) se hibridan la una a la otra.

40 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un "concatémero" se refiere 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 lineal,

de tal manera que un concatémero puede contener dos o más copias de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal.

5 Tal y como se utiliza en la presente memoria, el término "aislado", cuando se aplica a las proteínas, ácidos nucleicos u otras biomoléculas, se refiere a una molécula que se ha purificado o separado de un componente de su medio cuando 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 forma recombinante que tienen una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que se produce de forma natural. Los ácidos nucleicos "aislados" incluyen las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido contenidas en las células que habitualmente expresan el polipéptido, en donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra 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.

10 Tal y como se utiliza en la presente memoria, en el contexto de dos o más moléculas poliméricas (p. ej., ácidos nucleicos, proteínas), "corresponde a", "que corresponde a" y similares se refiere a moléculas poliméricas o porciones de las mismas que tienen la misma secuencia o una secuencia similar de elementos del componente (p. ej., nucleótidos, aminoácidos). Por ejemplo, si se describe que un primer ácido nucleico contiene una región que "corresponde a" la secuencia de un segundo ácido nucleico, la región pertinente del primer ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos que es la misma o similar a la secuencia del segundo ácido nucleico.

15 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.

20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, una referencia a "tratar" un determinado objeto a una condición u otro objeto o similar, se refiere a la exposición directa o indirecta del objeto dado a la condición o al 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 en la que intervienen 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 tratan" un objeto en el recipiente, incluso aunque no se produzca ninguna intervención independiente con el contenido del recipiente después del inicio de la reacción.

25 La descripción da a conocer métodos para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal.

30 La descripción da a conocer un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal que puede incluir una o varias de las siguientes etapas generales:

(1) Generar una hebra circular a partir de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, en donde la hebra circular contiene el componente monocatenario de al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción;

35 (2) Tratar la hebra circular de la etapa (1) con un primer oligonucleotídico y una polimerasa, en las condiciones en las que se sintetiza un producto de extensión del primer cebador;

40 (3) Tratar el producto de extensión del primer cebador de la etapa (2) con un segundo cebador oligonucleotídico y una polimerasa, en las condiciones en las que se sintetiza un producto de extensión del segundo cebador que es complementario al producto de extensión del primer cebador de la etapa (2) para producir un nuevo ácido nucleico bicatenario que comprende al menos una porción del producto de extensión del primer cebador y al menos una porción del producto de extensión del segundo cebador;

45 (4) Tratar el nuevo ácido nucleico bicatenario de la etapa (3) con una enzima de restricción que reconoce una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción que corresponde al componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción de la etapa (1), en las condiciones en las que se escinde el nuevo ácido nucleico bicatenario de la etapa (3) para formar dos o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños que comprenden al menos una porción de una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal de la etapa (1).

50 Se describen métodos que pueden además incluir la repetición de las etapas (1) a (4) para uno, dos, tres o más ciclos adicionales, con el uso de un ácido nucleico bicatenario más corto de la etapa (4) como la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en la etapa (1).

55 Se describen métodos que pueden incluir, antes de la etapa (1), la generación de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal para ser usada en la etapa (1) a partir de una molécula diana monocatenaria. Una molécula diana

monocatenaria puede ser ADN o ARN (p. ej., ARNm).

Se describen métodos que pueden incluir cualquiera de las características, etapas o componentes explicados en otro lugar de la presente memoria. Además, aunque algunos métodos de amplificación de ácido nucleico descritos está descrito que contienen cuatro etapas, se debe saber que los métodos de amplificación descritos pueden estar descrito que contienen cualquier número de etapas (p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). Se pueden realizar simultáneamente dos, tres o más aspectos de algunos métodos de amplificación descritos. También se debe saber que, aunque los métodos dados a conocer en la presente memoria se han descrito en la presente memoria con el uso de un número escaso de términos, frases y etapas con el propósito de brevedad, los métodos dados a conocer en la presente memoria también se podrían describir con otros términos, frases y etapas que no se dan a conocer en la presente memoria, pero que también describen con exactitud los métodos dados a conocer en la presente memoria.

A continuación, se da a conocer más información sobre diferentes etapas generales de determinados métodos dados a conocer en la presente memoria.

En algunos métodos dados a conocer en la presente memoria, una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal ("plantilla") que comprende dos hebras complementarias se puede convertir en una sola hebra de ácido nucleico circular ("hebra circular"). Una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal tiene un primer extremo y un segundo extremo, y las dos hebras complementarias se pueden denominar una "primera hebra" / "primera hebra complementaria" y una "segunda hebra" / "segunda hebra complementaria". Típicamente, cada extremo de una plantilla comprende el extremo 5' de una hebra (p. ej., de la primera hebra) y el extremo 3' de la otra hebra (p. ej., de la segunda hebra).

Se puede utilizar como una plantilla cualquier ácido nucleico bicatenario lineal de interés. La plantilla puede tener extremos romos tanto en el primer extremo como en el segundo extremo, puede tener extremos cohesivos tanto en el primer extremo como en el segundo extremo, o puede tener un extremo romo en un extremo y un extremo cohesivo en el otro extremo. La plantilla de ácido nucleico bicatenario se puede obtener o generar mediante cualquier método con el que se obtenga o genere un ácido nucleico bicatenario lineal, tal como mediante escisión de una molécula más grande o mediante la síntesis de una molécula monocatenaria precursora.

Para convertir una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en una hebra circular, se trata la plantilla de tal manera que la primera y segunda hebras complementarias de la plantilla se unen directa o indirectamente extremo con extremo como parte de la misma hebra de ácido nucleico monocatenaria circular. Por ejemplo, para generar una hebra circular a partir de la plantilla, el extremo 3' de la primera hebra se puede unir directa o indirectamente al extremo 5' de la segunda hebra, y el extremo 3' de la segunda hebra se puede unir directa o indirectamente al extremo 5' de la primera hebra. Así pues, en las disposiciones, tanto la primera como la segunda hebras complementarias de la plantilla acaban formando parte de la misma hebra circular.

Durante la generación de una hebra circular a partir de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, los extremos de la primera y segunda hebras complementarias de la plantilla pueden estar unidos directa o indirectamente para formar la hebra circular. Los extremos pueden estar unidos indirectamente, por ejemplo, a través de una molécula adaptadora que hace de puente entre el extremo 3' de una primera hebra y el extremo 5' de una segunda hebra. Las hebras pueden estar unidas directamente, por ejemplo, a través del enlace directo del extremo 3' de una primera hebra con el extremo 5' de una segunda hebra. Los extremos de las hebras pueden estar unidos directamente, por ejemplo, cuando numerosos nucleótidos en el extremo de una o ambas hebras no están emparejados entre sí, de tal forma que el extremo 5' de una hebra o el extremo 3' de la otra hebra tiene libertad para moverse a una posición adyacente al extremo de la otra hebra, donde se puede producir el enlace de los extremos.

La descripción da a conocer, en una hebra circular, el extremo 3' de la primera hebra que está unido indirectamente al extremo 5' de la segunda hebra, y el extremo 3' de la segunda hebra que está unido indirectamente al extremo 5' de la primera hebra. En otras disposiciones, en una hebra circular, el extremo 3' de la primera hebra está unido directamente al extremo 5' de la segunda hebra, y el extremo 3' de la segunda hebra está unido directamente al extremo 5' de la primera hebra. En otras disposiciones, en una hebra circular, el extremo 3' de la primera hebra está indirectamente unido al extremo 5' de la segunda hebra y el extremo 3' de la segunda hebra está unido directamente al extremo 5' de la primera hebra. En otras disposiciones, en una hebra circular, el extremo 3' de la primera hebra está unido directamente al extremo 5' de la segunda hebra y el extremo 3' de la segunda hebra está unido indirectamente al extremo 5' de la primera hebra.

En algunas disposiciones, para generar una hebra circular de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, en cada uno del primer extremo y del segundo extremo de la plantilla, los extremos de la primera hebra y de la segunda hebra pueden estar conectados el uno con el otro mediante una o varias moléculas adaptadoras ("adaptadores"). Así pues, en algunas disposiciones, dentro de una hebra circular, la secuencia de una hebra complementaria de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal puede estar separado secuencialmente de la secuencia de la otra hebra complementaria en cada extremo por la secuencia de al menos una molécula adaptadora.

Cualquier adaptador descrito en cualquier lugar de la presente memoria puede conectar la primera y la segunda hebras de la plantilla. Por ejemplo, un adaptador puede contener una única hebra de ácido nucleico que tiene un extremo 5'

y un extremo 3'. Los adaptadores del mismo tipo o de diferentes tipos pueden conectar la primera y la segunda hebras de la plantilla. Por ejemplo, un adaptador de tipo "A" puede conectar los extremos de la primera y de la segunda hebras en el primer extremo de la plantilla, y un adaptador de tipo "A" también puede conectar los extremos de la primera y segunda hebras en el segundo extremo de la plantilla. En otro ejemplo, un adaptador de tipo "A" puede conectar los extremos de la primera y segunda hebras en el primer extremo de la plantilla, y un adaptador de tipo "B" puede conectar los extremos de la primera y segunda hebras en el segundo extremo de la plantilla. En algunas disposiciones, dos, tres, cuatro, cinco o más tipos de adaptadores se incorporan en una hebra circular durante la generación de una hebra circular a partir de una plantilla. En algunas disposiciones, dos, tres, cuatro, cinco o más tipos de adaptadores están presentes en una mezcla de reacción para la generación de una hebra circular a partir de una plantilla, pero no están incorporados necesariamente en una hebra circular.

Cualquier número de adaptadores puede conectar los extremos de la primera y segunda hebras complementarias en cada extremo de la plantilla (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5 o más adaptadores). Por ejemplo, un adaptador puede conectar los extremos de la primera y segunda hebras en el primer extremo de la plantilla y un adaptador puede conectar los extremos de la primera y segunda hebras en el segundo extremo de la plantilla. En otro ejemplo, dos adaptadores pueden conectar los extremos de la primera y segunda hebras en el primer extremo de la plantilla (a saber, hay dos adaptadores entre los extremos de la primera y segunda hebras) y dos adaptadores pueden conectar los extremos de la primera y segunda hebras en el segundo extremo de la plantilla. En otro ejemplo, un adaptador puede conectar los extremos de la primera y segunda hebras en el primer extremo de la plantilla y dos adaptadores pueden conectar los extremos de la primera y segunda hebras en el segundo extremo de la plantilla. En algunas disposiciones, el mismo número de adaptadores puede conectar los extremos de la primera y segunda hebras en el primer extremo y el segundo extremo de la plantilla. En algunas disposiciones, un número diferente de adaptadores puede conectar los extremos de la primera y segunda hebras en cada uno de primer extremo y segundo extremo de la plantilla.

Los diferentes componentes de la hebra circular (p. ej., la primera y segunda hebras de la plantilla, adaptadores) pueden estar conectados secuencialmente de forma covalente o no covalente en la hebra. Los componentes de la hebra circular pueden estar unidos covalentemente, por ejemplo, a través de sus esqueletos de fosfato. Los componentes de la hebra circular pueden estar unidos no covalentemente, por ejemplo, a través de enlaces iónicos entre ligando y receptor.

En algunas disposiciones, los componentes de la hebra circular están unidos entre sí por ligación. La ligación puede implicar la formación de un enlace fosfodiéster entre el fosfato en 5' de un nucleótido y el hidroxilo en 3' de otro nucleótido. En la ligación puede intervenir una enzima que tiene actividad de ligasa de nucleótidos, tal como una ADN ligasa. Se puede utilizar cualquier ligasa idónea para ligar entre sí los componentes de la hebra circular. Como alternativa, en la ligación puede que no intervenga una enzima y, en su lugar, puede intervenir una reacción química con grupos reactivos, p. ej., fosforotioato. Los métodos para la ligación química se describen, por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. n.ºs 5 859 232 y 5 151 510.

En una hebra circular que contiene las dos hebras de la plantilla y una, dos, tres, cuatro o más adaptadores, los extremos de las hebras de la plantilla pueden estar unidos directamente a los adaptadores. En una alternativa, uno o varios nucleótidos adicionales (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más) pueden estar presentes en la hebra circular entre al menos uno de los adaptadores y al menos una de las hebras de la plantilla (p. ej., si durante la formación de la hebra circular, un número pequeño de nucleótidos se añaden adyacentes al extremo de una hebra de la plantilla o un adaptador cuando se unen la hebra de la plantilla y el adaptador). En una alternativa, en la hebra circular, uno o más nucleótidos (p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más) pueden estar ausentes del extremo de un adaptador o de una hebra de la plantilla en la localización del enlace entre el adaptador y la hebra de la plantilla (p. ej., si durante la formación de la hebra circular, se pierde un pequeño número de nucleótidos del extremo de una hebra de la plantilla o de un adaptador cuando se unen la hebra de la plantilla y el adaptador).

En algunas disposiciones, en una reacción para generar una hebra circular que contiene adaptadores y una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, se pueden dar a conocer uno o varios cebadores (un "cebador de puente") que son capaces de hibridarse a una porción (típicamente, una región que incluye el extremo) tanto de un adaptador como de una primera o segunda hebra complementaria de la plantilla. En algunas circunstancias, un cebador de puente puede hibridarse a una porción de un adaptador y a continuación a una porción de una hebra complementaria (o viceversa), con lo que se acercan en estrecha proximidad el adaptador y la plantilla, con lo que se asegura la posterior ligación del adaptador a los extremos de la primera y segunda hebras en un extremo de la plantilla, y la formación de la hebra circular. En algunas circunstancias, se pueden dar a conocer al menos dos cebadores de puente diferentes, en donde cada cebador de puente es capaz de hibridarse a una porción de una hebra en un extremo diferente de la plantilla, con lo que se asegura el acercamiento en estrecha proximidad de los adaptadores con ambos extremos de la plantilla. En algunas circunstancias, un cebador de puente puede funcionar como un primer cebador oligonucleotídico (descrito a continuación con más detalle) de un método de amplificación dado a conocer en la presente memoria. En algunas circunstancias, un cebador de puente no asegura la generación de un producto de extensión (p. ej., si el cebador carece de un grupo hidroxilo en 3').

Una hebra circular puede contener el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción. El componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción puede estar localizado en cualquier lugar dentro de la hebra circular. En algunas disposiciones, el componente monocatenario de una secuencia

de enzima de restricción está localizado en la hebra circular en una región que corresponde a la primera o segunda hebra de la plantilla. En algunas disposiciones, el componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción está localizado en la hebra circular en una región que no corresponde a la primera o la segunda hebras de la plantilla. En algunas disposiciones, el componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción está localizado en la hebra circular en una región que corresponde a un adaptador.

En algunas disposiciones, en una hebra circular que contiene un componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción, tampoco hay una secuencia complementaria al componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción en otro lugar en la hebra. En tales circunstancias, el componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción no puede emparejarse con otra secuencia de la hebra circular para formar una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa y localizada de enzima de restricción. En algunas disposiciones, en una hebra circular que contiene un componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción, hay una secuencia complementaria al componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción en otro lugar en la hebra. En tales circunstancias, el componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción puede emparejarse con otra secuencia de la hebra circular para formar una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa y localizada de enzima de restricción.

Uno o varios componentes monocatenarios de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción pueden estar presentes en una hebra circular. En algunas disposiciones, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más componentes monocatenarios de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción pueden estar presentes en una hebra circular. En algunas disposiciones, dentro de una hebra circular, un componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción está presente secuencialmente tanto antes como después de una región de la hebra que corresponde a la primera hebra complementaria de la plantilla, de tal forma que la primera y la segunda hebras complementarias están separadas en ambos extremos por un componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción. En algunas disposiciones, dentro de la hebra circular, está presente un componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción de manera secuencial después de la región de la hebra que corresponde a la primera hebra complementaria y después de la región de la hebra que corresponde a la segunda hebra complementaria, de tal forma que la primera y la segunda secuencias complementarias están separadas en ambos extremos por un componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción.

En una hebra circular que contiene dos o más componentes monocatenarios de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción, los componentes monocatenarios de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción pueden ser para la misma enzima de restricción o para diferentes enzimas de restricción. La hebra circular puede contener el componente monocatenario de cualquier secuencia de reconocimiento de enzima de restricción. Las secuencias de reconocimiento de enzima de restricción se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, M. R. Green y J. Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2012), que se incorpora en la presente memoria mediante referencia en su totalidad.

La hebra circular se puede tratar con un cebador oligonucleotídico y una polimerasa en las condiciones en las que se sintetiza un producto de extensión del cebador. El cebador oligonucleotídico se puede denominar el "primer cebador oligonucleotídico" o "primer cebador". El producto de extensión del primer cebador se puede denominar el "producto de extensión del primer cebador".

El primer cebador puede ser de cualquier tipo de cebador descrito en otro lugar de la presente memoria. Por ejemplo, el cebador puede contener desoxirribonucleótidos estándares, ribonucleótidos estándares, nucleótidos no estándares, o una combinación de los mismos.

El primer cebador puede ser complementario, y ser capaz de hibridarse, a cualquier posición de la hebra circular. En algunas disposiciones, el primer cebador puede ser complementario a una secuencia de la hebra circular que corresponde a la primera o la segunda hebra complementaria de la plantilla. En algunas disposiciones, el primer cebador puede ser complementario a una secuencia de la hebra circular que corresponde a un adaptador. En algunas realizaciones, el primer cebador puede ser complementario a una secuencia de la hebra circular que corresponde a una porción de la primera o de la segunda hebra complementaria y una porción de un adaptador.

En algunas circunstancias, en un método descrito en la presente memoria, puede ser ventajoso la utilización de un primer cebador que es complementario a una secuencia de una hebra circular que corresponde a la primera o a la segunda hebra complementaria de la plantilla, en vez de utilizar un primer cebador que es complementario a una secuencia de la hebra circular que corresponde a un adaptador. Un primer cebador con especificidad de fijación por la primera o la segunda hebra complementaria asegurará la amplificación selectiva de las hebras circulares que contienen regiones que corresponden a la primera o a la segunda hebra complementaria de la plantilla. En cambio, si el primer cebador es complementario a una secuencia en la hebra circular que exclusivamente corresponde a, por ejemplo, una secuencia adaptadora, el primer cebador puede asegurar la amplificación de productos inespecíficos que contienen la secuencia del adaptador, pero no la secuencia de la primera o de la segunda hebra complementaria de la plantilla. Así pues, en algunas realizaciones, se puede producir la amplificación de fondo más baja o una cantidad más grande de amplificación específica de la plantilla en un método dado a conocer en la presente memoria cuando un primer cebador que es complementario a una secuencia de la primera o de la segunda hebra complementaria se

utiliza para generar un producto de extensión del primer cebador (en comparación con el uso de un primer cebador que es complementario a un adaptador).

Sin embargo, en las disposiciones, se pueden diseñar cebadores y adaptadores que reducen o eliminan los posibles problemas debidos a la amplificación de elementos inespecíficos. Por ejemplo, los adaptadores se pueden diseñar de las maneras descritas en otro lugar de la presente memoria para disminuir al mínimo la formación de productos de ligación inespecíficos entre los adaptadores.

En algunas circunstancias, en un método descrito en la presente memoria, puede ser ventajoso la utilización de un primer cebador que es complementario a una secuencia en una hebra circular que corresponde a un adaptador, en vez de utilizar un primer cebador que es complementario a una secuencia en la hebra circular que corresponde a la primera o a la segunda hebra complementaria de la plantilla. Un primer cebador con especificidad de fijación por el adaptador puede ser ventajoso en las circunstancias en las que, por ejemplo, no se conoce la secuencia de la plantilla, o cuando se realizan con el mismo adaptador muchas reacciones de amplificación diferentes. En tales circunstancias, el uso de un primer cebador con especificidad de fijación por el adaptador puede facilitar el funcionamiento de la reacción o reacciones, por la eliminación o reducción de la necesidad de cebadores específicos de la plantilla.

Se puede generar un primer producto de extensión con una polimerasa. La polimerasa puede ser de cualquier tipo descrito en otra parte de la presente memoria. En algunas realizaciones, la polimerasa puede tener actividad de desplazamiento de hebra. Las polimerasas que tienen actividad de desplazamiento de hebra incluyen la ADN polimerasa de $\phi 29$, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I, la ADN polimerasa Vent_R, la ADN polimerasa Deep Vent_R, la ADN polimerasa 9°N_m y el fragmento grande de la ADN polimerasa Bst.

La polimerasa puede catalizar la formación de un producto de extensión del primer cebador. Típicamente, el producto de extensión se genera a partir del extremo 3' del primer cebador. Durante la generación del producto de extensión del primer cebador, el primer cebador puede estar unido covalentemente al producto de extensión sintetizado, de tal manera que el primer cebador acaba formando parte de la molécula descrita en la presente memoria como el "producto de extensión del primer cebador". El producto de extensión del primer cebador que se ha generado es complementario a la secuencia de la hebra circular.

La síntesis de un producto de extensión del primer cebador con una polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de hebra puede dar lugar a la generación de un producto de extensión que tiene más nucleótidos (esto es, una mayor longitud) que la hebra circular. Si la polimerasa sintetiza un producto de extensión que comienza en el extremo 3' del primer cebador y continúa para sintetizar un producto de extensión de aproximadamente la longitud de la hebra circular, puede finalmente toparse con el extremo 5' del primer cebador. En este punto, la polimerasa puede continuar desplazándose y sintetizar el producto de extensión a lo largo de la hebra circular, con lo que se desplaza de manera secuencial el primer cebador y las porciones el producto de extensión del primer cebador que se generó al principio. La polimerasa puede continuar durante muchas rondas de circularización y síntesis de un producto de extensión a lo largo de la longitud de la hebra circular, con lo que se genera un producto de extensión que puede contener numerosas copias de una secuencia que es complementaria a la secuencia de la hebra circular. Así pues, por ejemplo, el producto de extensión del primer cebador puede contener al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 copias de una secuencia que es complementaria a la secuencia de la hebra circular.

Un producto de extensión del primer cebador que contiene numerosas copias de una secuencia que es complementaria a la hebra circular puede ser un concatémero. El proceso de generación de un producto de extensión del primer cebador a partir de la hebra circular que puede contener numerosas copias de una secuencia que es complementaria a la secuencia de la hebra circular se puede denominar en la presente memoria "amplificación en círculo rodante".

Las condiciones adecuadas para la generación de un producto de extensión del primer cebador pueden incluir cualquier condición suficiente para asegurar la síntesis de ácidos nucleicos por la acción de una polimerasa. Los ejemplos de condiciones para la síntesis de ácidos nucleicos por la acción de una polimerasa se conocen 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 polimerasas puede 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 comprendido en él, que incluye, por ejemplo, entre 0,01 y 1, 0,1 y 10, 0,1 y 5, 0,5 y 10, 0,5 y 2, 1 y 10 o 1 y 5 unidades de enzima por 50 μ l de volumen de reacción, en donde 1 unidad de enzima incorporará 15 nmol 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, 1 000, 10 000 o 100 000 copias por reacción); cebador (a una concentración entre, por ejemplo, 0,01 y 10 μ M, o cualquier margen entre ellos, que incluye, por ejemplo, entre 0,01 y 1, 0,1 y 10, 0,1 y 5, 0,5 y 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 ellos que incluye, por ejemplo, entre 50 y 350, 100 y 500, 100 y 300, 200 y 500 o 300 y 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 ellos, que incluye, por ejemplo, entre 1 y 100, 1 y 50, 1 y 20, 1 y 10, 10 y 20, 10 y 50 o 10 y 200 mM); tampón (p. ej., Tris-HCl o Tris-acetato, pH 7,8 a 8,5, a una concentración entre, por ejemplo, 1 y 100 mM, o cualquier margen en ellos que incluye, por ejemplo, entre 1 y 50, 1 y 20, 1 y 10, 1 y 5, 10 y 100, 20 y 100 o 50 y 100 mM); e iones de magnesio (a una concentración entre, por ejemplo,

0,1 y 10 mM, o cualquier margen en ellos, que incluye, por ejemplo, entre 0,1 y 5, 0,1 y 1, 0,5 y 10, 0,5 y 5 o 0,5 y 2,5 mM). Otros componentes no limitantes para una reacción de síntesis de ácidos nucleicos por la acción de una 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), SBA (a una concentración entre, por ejemplo, 0,01 y 1 µg/µl), 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 por la acción de una 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 asegurar la síntesis de ácidos nucleicos por la acción de una polimerasa pueden incluir multitud de temperaturas y valores de pH. Por ejemplo, el pH de una reacción de síntesis de ácidos nucleicos por la acción de una 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 por la acción de una 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.

El producto de extensión del primer cebador se puede tratar con un cebador oligonucleotídico y una polimerasa en las condiciones en las que se sintetiza un producto de extensión del cebador. El cebador oligonucleotídico se puede denominar el "segundo cebador oligonucleotídico" o "segundo cebador". El producto de extensión del segundo cebador se puede denominar el "producto de extensión del segundo cebador".

El segundo cebador puede ser de cualquier tipo descrito en otro lugar en la presente memoria. Por ejemplo, el cebador puede contener desoxirribonucleótidos estándares, ribonucleótidos estándares, nucleótidos no estándares o una combinación de los mismos.

El segundo cebador puede ser complementario, e hibridarse en cualquier localización, del producto de extensión del primer cebador. En algunas realizaciones, el segundo cebador puede hibridarse a una secuencia en el producto de extensión del primer cebador que corresponde a la primera o a la segunda hebra complementaria de la plantilla. En algunas realizaciones, el segundo cebador puede hibridarse a una secuencia en el producto de extensión del primer cebador que corresponde a una secuencia complementaria a un adaptador (a saber, la secuencia del segundo cebador puede corresponder a una secuencia en un adaptador). En algunas realizaciones, el segundo cebador puede ser complementario a una secuencia en el producto de extensión del primer cebador que corresponde a una porción de la primera o de la segunda hebra complementaria y una porción de una secuencia complementaria a un adaptador.

En algunas circunstancias, en un método descrito en la presente memoria puede ser ventajoso utilizar un segundo cebador que es complementario a una secuencia en el producto de extensión del primer cebador que corresponde a la primera o a la segunda hebra complementaria de la plantilla, en vez de utilizar un segundo cebador que es complementario a una secuencia en el producto de extensión del primer cebador que corresponde a una secuencia complementaria a un adaptador. Un segundo cebador con especificidad de fijación por la primera o la segunda hebra complementaria asegurará la amplificación selectiva de un producto de extensión del primer cebador que contiene regiones que corresponden a la primera o a la segunda hebra complementaria. En cambio, si el segundo cebador es complementario a una secuencia del producto de extensión del primer cebador que corresponde exclusivamente a, por ejemplo, una secuencia complementaria a una secuencia de adaptador, el segundo cebador puede asegurar la amplificación de productos inespecíficos que contienen la secuencia del adaptador, pero no la secuencia de la primera o de la segunda hebra complementaria. Así pues, en algunas realizaciones, la menor amplificación de fondo o una cantidad mayor de amplificación específica de la plantilla se puede producir en un método dado a conocer en la presente memoria cuando un segundo cebador que es complementario a una secuencia de la primera o de la segunda hebra complementaria se utiliza para generar un producto de extensión del segundo cebador (en comparación con la utilización de un segundo cebador que es complementario a una secuencia complementaria de un adaptador).

En algunas circunstancias, en un método descrito en la presente memoria, puede ser ventajoso utilizar un segundo cebador que es complementario a una secuencia en un producto de extensión del primer cebador que corresponde a una secuencia complementaria al adaptador, en vez de utilizar un segundo cebador que es complementario a una secuencia del producto de extensión del primer cebador que corresponde a la primera o a la segunda hebra de la plantilla. Un segundo cebador con especificidad de fijación por una secuencia complementaria al adaptador puede ser ventajoso en las circunstancias en las que, por ejemplo, no se conoce la secuencia de la plantilla o cuando numerosas reacciones de amplificación diferentes se llevan a cabo con el mismo adaptador. En tales circunstancias, el uso de un segundo cebador con especificidad de fijación por una secuencia complementaria al adaptador puede facilitar el funcionamiento de la reacción o reacciones al eliminar o reducir una necesidad de cebadores específicos de la plantilla.

En algunas disposiciones, en un método descrito en la presente memoria, el primer cebador puede ser complementario a una secuencia en la primera o en la segunda hebra complementaria de la plantilla, y el segundo cebador puede ser complementario a una secuencia en la primera o en la segunda hebra complementaria de la plantilla. En otras disposiciones, el primer cebador puede ser complementario a una secuencia en una molécula adaptadora y el segundo cebador puede ser complementario a una secuencia complementaria a una secuencia en una molécula adaptadora. En otras disposiciones, el primer cebador puede ser complementario a una secuencia complementaria a una secuencia en una molécula adaptadora y el segundo cebador puede ser complementario a una secuencia en la primera o en la segunda hebra complementaria de la plantilla. En otras disposiciones, el primer cebador puede ser complementario a una secuencia en la primera o en la segunda hebra complementaria de la plantilla y el segundo cebador puede ser complementario a una secuencia complementaria a una secuencia en una molécula adaptadora.

Se puede generar un producto de extensión del segundo cebador con una polimerasa. La polimerasa puede ser de cualquier tipo descrito en otro lugar de la presente memoria. En algunas disposiciones, la polimerasa puede tener actividad de desplazamiento de hebra. En algunas disposiciones, la polimerasa puede ser del mismo tipo que se utiliza para la generación del producto de extensión del primer cebador. En algunas disposiciones, la polimerasa puede ser de un tipo diferente al que se utiliza para la generación del producto de extensión del primer cebador.

La polimerasa puede catalizar la formación de un producto de extensión del segundo cebador. Típicamente, el producto de extensión se genera desde el extremo 3' del segundo cebador. Durante la generación del producto de extensión del segundo cebador, el segundo cebador puede estar unido covalentemente al producto de extensión sintetizado, de tal forma que el segundo cebador forma parte de la molécula descrita en la presente memoria como el "producto de extensión del segundo cebador". El producto de extensión del segundo cebador es complementario a al menos una porción de la secuencia del producto de extensión del primer cebador. El producto de extensión del segundo cebador puede contener una o varias copias de la secuencia de la hebra circular.

Las condiciones apropiadas para la generación de un producto de extensión del segundo cebador pueden incluir cualquier condición suficiente para asegurar la síntesis de ácidos nucleicos por la acción de una polimerasa y puede incluir cualquier condición explicada en otro lugar en la presente memoria para la síntesis de ácidos nucleicos por la acción de una polimerasa. En algunas disposiciones, las condiciones para la generación de un producto de extensión del segundo cebador son las mismas que las condiciones para la generación de un producto de extensión del primer cebador. En algunas disposiciones, las condiciones para la generación de un producto de extensión del segundo cebador son diferentes de las condiciones para la generación de un producto de extensión del primer cebador.

La síntesis de un producto de extensión del segundo cebador puede dar lugar a la generación de un nuevo ácido nucleico bicatenario que contiene al menos una porción del producto de extensión del primer cebador y al menos una porción del producto de extensión del segundo cebador ("nuevo ácido nucleico bicatenario"). El nuevo ácido nucleico bicatenario puede contener al menos una porción del producto de extensión del primer cebador y el producto de extensión del segundo cebador completo. El nuevo ácido nucleico bicatenario puede contener, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o más copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal. En algunas disposiciones, el nuevo ácido nucleico bicatenario puede contener regiones entre algunas o cada una de las copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal. En algunas disposiciones, las regiones entre las copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal pueden contener secuencias de reconocimiento bicatenarias completas de enzima de restricción que corresponde al componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción presente en la hebra circular.

En algunas disposiciones, dentro del nuevo ácido nucleico bicatenario, algunas o cada una de las copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario puede estar separada por regiones que contienen la secuencia de nucleótidos de adaptadores utilizados durante la generación de la hebra circular para conectar los extremos de la primera y de la segunda hebras complementarias de la plantilla, y mediante secuencias nucleotídicas complementarias a los adaptadores. En algunas disposiciones, estas regiones que contienen la secuencia de nucleótidos de adaptadores pueden contener una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción que corresponde al componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción presente en la correspondiente molécula adaptadora.

El nuevo ácido nucleico bicatenario puede contener una o varias copias de la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción que corresponde al componente monocatenario de la secuencia de reconocimiento de enzima de restricción presente en la hebra circular. En algunas disposiciones, las regiones del nuevo ácido nucleico bicatenario que contiene copias de la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción son parte de regiones del nuevo ácido nucleico bicatenario que corresponden a un adaptador. Esta configuración se puede producir, por ejemplo, cuando el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción en la hebra circular estaba originalmente en un adaptador que llegó a formar parte de la hebra circular.

El nuevo ácido nucleico bicatenario se puede tratar con una enzima de restricción que reconoce y escinde la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción en el nuevo ácido nucleico bicatenario. Típicamente, la enzima de restricción no será capaz de reconocer ni escindir un ácido nucleico que contiene solo un componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción. En su lugar, la enzima de restricción sólo reconocerá y escindiré, por lo general, un ácido nucleico que contiene la correspondiente secuencia de

reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción. Por consiguiente, en algunas disposiciones, una enzima de restricción no reconocerá ni escindirá el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción presente en una hebra circular o adaptador, pero reconocerá y escindirá la correspondiente secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción presente en un nuevo ácido nucleico bicatenario.

El tratamiento del nuevo ácido nucleico bicatenario con una enzima de restricción que reconoce la secuencia de reconocimiento de enzima de restricción presente en la hebra circular puede dar lugar a la escisión del nuevo ácido nucleico bicatenario mediante la enzima de restricción en dos o más ácidos nucleicos bicatenarios nuevos ("ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños"). Uno o varios de los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños pueden contener una o varias copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal. Además, uno o varios de los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños pueden contener una versión bicatenaria de una secuencia adaptadora (a saber, una secuencia adaptadora hibridada a un ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria a la secuencia adaptadora) o porción de la misma. En algunas disposiciones, uno o varios ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños pueden contener una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal flanqueada en uno o ambos extremos por una porción de una versión bicatenaria de una secuencia adaptadora. En tales circunstancias, uno o ambos extremos del ácido nucleico bicatenario más corto pueden contener una porción de la secuencia de reconocimiento bicatenaria de enzima de restricción reconocida por la enzima de restricción que escindió el nuevo ácido nucleico bicatenario.

Se pueden generar numerosos ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños a partir de la escisión de un nuevo ácido nucleico bicatenario. En algunas disposiciones, se pueden generar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o más nuevos ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños a partir de un único nuevo ácido nucleico bicatenario. Uno o varios de los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños puede contener una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal. En determinadas disposiciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o más nuevos ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños que contienen una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal se pueden generar a partir de un único nuevo ácido nucleico bicatenario.

Para tratar un nuevo ácido nucleico bicatenario con una enzima de restricción que reconoce y escinde la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción en el nuevo ácido nucleico bicatenario, la reacción puede contener una enzima de restricción que reconoce la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción. La enzima de restricción puede tener una concentración, por ejemplo, entre 0,01 y 10 unidades de la enzima de restricción por 50 µl de volumen de reacción, o cualquier margen en ellos que incluye, por ejemplo, entre 0,01 y 5, 0,01 y 1, 0,1 y 10, 0,1 y 5, 0,1 y 1, 0,5 y 10, 0,5 y 5, 0,5 y 2,5, 1 y 10, y 1 a 5 unidades por 50 µl de volumen de reacción, en donde 1 unidad de enzima es la cantidad necesaria para digerir 1 µg del ADN del fago λ en 1 h a 25 °C. Las condiciones para tratar un nuevo ácido nucleico bicatenario con una enzima de restricción que reconoce y escinde la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción en el nuevo ácido nucleico bicatenario pueden ser las mismas o diferentes que las condiciones para la generación de un producto de extensión del segundo cebador. En algunas disposiciones, las condiciones para tratar un nuevo ácido nucleico bicatenario con una enzima de restricción que reconoce y escinde la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción en el nuevo ácido nucleico bicatenario puede incluir cualquiera de las condiciones suficientes para asegurar la síntesis de ácidos nucleicos por la acción de una polimerasa descrita en otro lugar de la presente memoria. En algunas disposiciones, la enzima de restricción está también presente en las reacciones para generar una hebra circular a partir de una plantilla, para generar un producto de extensión del primer cebador o para generar un producto de extensión del segundo cebador.

En algunas disposiciones, uno o varios ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños generados a partir de la escisión con la enzima de restricción de un nuevo ácido nucleico bicatenario se puede utilizar como la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en uno o varios ciclos adicionales de un método dado a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden generar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños a partir de la escisión por la enzima de restricción de un nuevo ácido nucleico bicatenario, y se pueden utilizar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o más de estos ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños como la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en otro ciclo de un método dado a conocer en la presente memoria. En algunas disposiciones, solo los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños que contienen una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal original (o una porción del mismo) se pueden utilizar como la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en otro ciclo de un método dado a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, si uno o ambos del primer cebador o del segundo cebador son complementarios a una secuencia en la primera o en la segunda hebra de la plantilla, solo los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños que contienen una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal original (o una porción relevante del mismo) se amplificarán en una ronda posterior de un método dado a conocer en la presente memoria. En algunas disposiciones, solo los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños que contienen una copia del adaptador (o una porción de la misma) se pueden utilizar como la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en otro ciclo de un método dado a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, si uno o ambos del primer cebador o del segundo cebador son complementarios a una secuencia en el adaptador, solo los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños que contienen una copia del adaptador original (o porción relevante del mismo) se amplificarán en una ronda posterior de un método dado a conocer en la presente memoria.

En algunas disposiciones, una o varias etapas de un método dado a conocer en la presente memoria se pueden realizar para muchos ciclos. Por ejemplo, de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria, se puede generar un ácido nucleico bicatenario más corto a partir de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal original. El ácido nucleico bicatenario más corto se puede utilizar a continuación como la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en una ronda posterior de un ciclo dado a conocer en la presente memoria. Este procedimiento puede repetirse él mismo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500 o más veces, en donde cada tiempo conduce a un incremento del número de copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal original. En algunas disposiciones, en un método dado a conocer, una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal original se puede amplificar exponencialmente, de tal manera que, con cada ciclo, el número de copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal original aumenta al menos al doble.

En la figura 1 se da a conocer un esquema de un ejemplo de un método de amplificación dado a conocer en la presente memoria. Los diferentes elementos representados en esta y otras figuras dadas a conocer en la presente memoria son solo a modo de ejemplo; se puede utilizar cualquiera de las variaciones referentes a los diferentes elementos y etapas de métodos descritos en la presente memoria. Además, los elementos de estas y otras figuras no están necesariamente a escala y no son limitantes con respecto a las formas de las moléculas.

Se puede dar a conocer una plantilla 110 de ácido nucleico bicatenario lineal (figura 1A). La plantilla 110 puede contener una primera hebra 111 complementaria y una segunda hebra 112 complementaria. La plantilla 110 de ácido nucleico bicatenario lineal tiene un primer extremo 110a y un segundo extremo 110b. El primer extremo 110a puede contener el extremo 5' de la primera hebra 111 y el extremo 3' de la segunda hebra 112. El segundo extremo 110b puede contener el extremo 3' de la primera hebra 111 y el extremo 5' de la segunda hebra 112.

Se pueden dar a conocer dos adaptadores 121, 131 ("adaptador A" y "adaptador B", respectivamente) con la plantilla 110 de ácido nucleico bicatenario lineal. Cada adaptador puede comprender una única hebra de ácido nucleico y puede contener un extremo 5' y un extremo 3'. El adaptador A 121 y el adaptador B 131 pueden cada uno contener el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción. El adaptador A 121 y el adaptador B 131 pueden tener la misma o diferente secuencia de ácido nucleico.

Se puede dar a conocer una ligasa con dos o más adaptadores 121, 131 y la plantilla 110 de ácido nucleico bicatenario lineal. La ligasa puede catalizar el enlace covalente del extremo 3' del primer adaptador 121 al extremo 5' de la primera hebra 111 y del extremo 5' del primer adaptador 121 al extremo 3' de la segunda hebra 112. La ligasa también puede catalizar la unión covalente del extremo 5' del segundo adaptador 131 al extremo 3' de la primera hebra 111 y el extremo 3' del segundo adaptador 131 al extremo 5' de la segunda hebra 112. El enlace covalente de la primera hebra 111 y la segunda hebra 112 entre sí a través de una molécula adaptadora 121, 131 en cada uno de primer extremo 110a y segundo extremo 110b de la plantilla 110 de ácido nucleico bicatenario lineal puede dar lugar a la generación de una hebra circular 140 (figura 1B). La hebra circular puede contener los nucleótidos de la primera hebra 111 y de la segunda hebra 112, cuyas secuencias están separadas dentro de la hebra circular por los nucleótidos del primer adaptador 121 y los nucleótidos del segundo adaptador 131.

Un primer cebador 151 se puede incubar, e hibridarse, con la hebra circular 140 (figura 1C). El primer cebador 151 puede ser complementario a cualquier región de la hebra circular 140. Una polimerasa 154 de ácido nucleico se puede incubar con el primer cebador 151 y la hebra circular 140. La polimerasa 154 puede sintetizar un producto de extensión 150 del primer cebador (figura 1D), que puede incluir el primer cebador. La polimerasa 154 puede tener actividad de desplazamiento de hebra. El producto de extensión 150 del primer cebador puede ser complementario a la hebra circular 140. Como parte del producto de extensión 150 del primer cebador, se generan las secuencias que son complementarias a diferentes componentes de la hebra circular [p. ej., se genera una secuencia 112 que es complementaria a la primera hebra 111 (tiene la misma secuencia que la segunda hebra 112); se genera una secuencia 111 que es complementaria a la segunda hebra 112 (tiene la misma secuencia que la primera hebra 111); se genera una secuencia 122 que es complementaria al primer adaptador 121; y se genera una secuencia 132 que es complementaria al segundo adaptador 131]. La polimerasa 154 puede tener actividad de desplazamiento de hebra, de tal forma que cuando la polimerasa se topa con el extremo 5' del producto de extensión 150 del primer cebador hibridado a la hebra circular 140, desplaza el extremo 5' del producto de extensión del primer cebador y las posteriores regiones, y continúa sintetizando el producto de extensión del primer cebador (figura 1E). De resultas de la actividad de desplazamiento de hebra de la polimerasa 154, el producto de extensión 150 del primer cebador sintetizado puede finalmente contener más nucleótidos y tener una mayor longitud que la hebra circular 140.

Un segundo cebador 161 se puede incubar con el producto de extensión 150 del primer cebador y se puede hibridar con él (figura 1F). El segundo cebador 161 puede ser complementario a cualquier región del producto de extensión 150 del primer cebador. Una polimerasa 154 de ácido nucleico se puede incubar con el segundo cebador 161 y el producto de extensión 150 del primer cebador. La polimerasa puede sintetizar un producto de extensión del segundo cebador 160 que puede incluir el segundo cebador (figura 1G). El producto de extensión 160 del segundo cebador puede ser complementario al producto de extensión 150 del primer cebador. La síntesis del producto de extensión 160 del segundo cebador puede dar lugar a la generación de un nuevo ácido nucleico bicatenario 170, que contiene al menos una porción del producto de extensión 160 del segundo cebador y al menos una porción del producto de extensión 150 del primer cebador. El nuevo ácido nucleico bicatenario 170 puede contener una o varias copias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal original 110 (primera hebra 111 hibridada a la segunda hebra 112). El

nuevo ácido nucleico bicatenario 170 puede también contener una o varias copias del adaptador A 121 y del adaptador B 131, y los complementos de los mismos (adaptador A 121 hibridado al complemento del mismo 122, y el adaptador B 131 hibridado al complemento del mismo 132; ambos también anotados con barras inclinadas). Dentro de las regiones del nuevo ácido nucleico bicatenario 170 que corresponde al adaptador A 121 y al complemento del mismo 122 y el adaptador B 131 y al complemento del mismo 132, pueden estar presentes una o varias copias de la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción que corresponde al componente monocatenario de la secuencia de reconocimiento de enzima de restricción presente en cada uno de estos adaptadores. La secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción presente en la combinación del adaptador A 121 y del complemento del mismo 122 está marcado mediante una línea vertical 125. La secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción presente en la combinación del adaptador B 131 y del complemento del mismo 132 también está marcada por una línea vertical 135.

El nuevo ácido nucleico bicatenario 170 se puede incubar con una enzima de restricción que reconoce la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción que corresponde al componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción presente en uno o en los dos de adaptador A y adaptador B (figura 1G). La enzima de restricción puede escindir el nuevo ácido nucleico bicatenario 170 en, o cerca de, los sitios de la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción 125, 135. Estos sitios 125, 135 pueden estar dentro de las regiones del nuevo ácido nucleico bicatenario 170 que corresponden al adaptador A 121 y al complemento del mismo 122, y al adaptador B 131 y al complemento del mismo 132.

La escisión del nuevo ácido nucleico bicatenario 170 en una o varias secuencias de reconocimiento bicatenarias completas de enzima de restricción 125, 135 puede dar lugar a la generación de dos o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños 181, 182 (figura 1G). Los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños 181, 182 pueden contener una copia de la plantilla 110 del ácido nucleico bicatenario lineal original (111 + 112). La copia de la plantilla 110 de ácido nucleico bicatenario lineal original (111 + 112) en los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños 181, 182 puede estar flanqueada en ambos lados por secuencias que corresponden a una porción del adaptador A 121 y del complemento del mismo 122, o del adaptador B 131 y del complemento del mismo 132.

Uno o varios ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños 181, 182 pueden utilizarse a continuación como una plantilla de ácido nucleico bicatenaria lineal en un nuevo ciclo del método esbozado en la figura 1. Por ejemplo, las etapas de las figuras 1A a 1G se pueden repetir con el uso de un ácido nucleico bicatenario más corto 181 o 182 como la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en la figura 1A del siguiente ciclo. Se pueden repetir numerosos ciclos de este procedimiento, lo que conduce a la generación de muchas copias de la plantilla 110 de ácido nucleico bicatenario lineal original. En algunas realizaciones, algunas o todas las muchas copias generadas de la plantilla 110 de ácido nucleico bicatenario lineal original pueden estar flanqueadas en uno o ambos lados por más nucleótidos, tal como una o varias secuencias que corresponden a una o varias porciones del adaptador A 121 y del complemento del mismo 122, o del adaptador B 131 y del complemento del mismo 132.

Los métodos dados a conocer en la presente memoria se pueden llevar a cabo a un serie de temperaturas. En algunas realizaciones, todas las etapas de un método se realizan a la misma temperatura. 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 realizar 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, las diferentes temperaturas se pueden seleccionar para optimizar la velocidad, precisión u otro rasgo de diferentes etapas de un método dado a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, se pueden seleccionar diferentes temperaturas para incrementar la actividad enzimática de una ligasa, de una polimerasa o de una enzima de restricción. En algunos ejemplos, las diferentes temperaturas se pueden seleccionar para incrementar la especificidad de fijación de un cebador a una plantilla o para incrementar la accesibilidad de una plantilla a un cebador (p. ej., las temperaturas más altas pueden favorecer la separación de los ácidos nucleicos bicatenarios de plantilla). 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 y 60, 30 y 70, 40 y 80, 30 y 40, 35 y 45, 40 y 50, 45 y 55, 50 y 60 o 55 y 65 °C. En determinadas realizaciones, una muestra que contiene un ácido nucleico diana se puede calentar a una temperatura de más 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 de más de 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 °C antes o después del inicio de un método dado a conocer en la presente memoria. Después de calentar la mezcla de reacción a una temperatura elevada, se puede mantener a una temperatura más baja tal y como se dio a conocer en otro lugar de la presente memoria (p. ej., a una temperatura entre 40 y 70 °C) durante el resto del funcionamiento del método. En las realizaciones, si una mezcla de 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 a la muestra después de que la mezcla de reacción o la muestra se haya calentado a la temperatura elevada, y se haya devuelto la mezcla de reacción o la muestra a una temperatura más baja, tal y como se da a conocer en la presente memoria. Los métodos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo con o sin un termociclador.

Como una consideración, la temperatura utilizada para una etapa de un método dado a conocer en la presente

memoria se puede seleccionar para que sea apropiado para la enzima o enzimas utilizadas en la etapa del método. En algunas realizaciones, para los métodos en los que están presentes una ligasa, una polimerasa o una enzima de restricción en el mismo recipiente, la temperatura o temperaturas de la reacción se seleccionan de tal manera que no perjudican significativamente la actividad de ninguna de las enzimas (p. ej., la temperatura de la reacción se puede seleccionar de tal manera que cada enzima de la reacción tenga 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 llevar a cabo a una temperatura que perjudica la actividad de una o varias de las enzimas (p. ej., la temperatura de la reacción se puede seleccionar de tal manera que al menos una de las enzimas de 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 un método se lleva a cabo a una temperatura u otra condición (p. ej., pH) que perjudica la actividad de una o varias de las enzimas, se puede añadir más enzima a la reacción en uno o varios intervalos después del inicio del método para complementar la actividad de la enzima o enzimas perjudicadas.

En algunas realizaciones, para al menos algunas etapas de un método dado a conocer en la presente memoria, la etapa o método se realiza a una temperatura por debajo de la temperatura de fusión (T_m) del primer o segundo cebadores. 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.

En algunas realizaciones, una o varias etapas de un método dado a conocer en la presente memoria tienen lugar en el mismo recipiente de reacción (p. ej., tubo, punta, recipiente, etc.). En algunas realizaciones, todas las etapas de un método tienen lugar en el mismo recipiente de reacción.

Los reactantes para los métodos dados a conocer en la presente memoria se pueden suministrar todos 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, adaptadores) 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 reemplazar 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, una o varias de las etapas de los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden tener lugar simultáneamente. Por ejemplo, durante un método dado a conocer en la presente memoria, el segundo cebador se puede hibridar con el producto de extensión del primer cebador y servir de plantilla para la síntesis del producto de extensión del segundo cebador, mientras que el producto de extensión del primer cebador continúa sintetizándose a lo largo de la hebra circular (esto es, la síntesis del producto de extensión del segundo cebador puede comenzar antes de que se complete la síntesis del producto de extensión del primer cebador). En otro ejemplo, una vez que se han generado muchos ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños en un método dado a conocer en la presente memoria, dos o más de los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños se pueden utilizar simultáneamente como plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal en un nuevo ciclo del método. En otro ejemplo, una hebra circular generada durante un primer ciclo de un método dado a conocer en la presente memoria se puede utilizar como una hebra circular durante un segundo ciclo del método, de tal manera que durante el segundo ciclo del método están disponibles dos hebras circulares (las dos hebras circulares son: i) la hebra circular generada durante el primer ciclo y ii) la hebra circular generada durante el segundo ciclo). Otras etapas de la reacción dadas a conocer en la presente memoria también ocurren simultáneamente.

En algunas realizaciones, dos o más conjuntos de 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 los diferentes conjuntos de cebadores son complementarios de diferentes plantillas de ácido nucleico bicatenario lineal. La inclusión de dos o más conjuntos de cebadores en un método dado a conocer en la presente memoria puede asegurar la amplificación simultánea de numerosas plantillas de ácido nucleico bicatenario lineal en el mismo recipiente de reacción. Esto puede ser útil, por ejemplo, para amplificar muchas plantillas de interés en una muestra, o para analizar la presencia de muchas plantillas diferentes en una muestra. En algunas realizaciones, se dan a conocer en un método dado a conocer en la presente memoria 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 primer y segundo cebadores para amplificar o analizar 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 diferentes de ácido nucleico bicatenario lineal.

En algunas realizaciones, en un método dado a conocer en la presente memoria se puede amplificar con facilidad una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal se puede amplificar 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 bicatenario lineal al menos 10 000 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 bicatenario lineal al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1 000, 5 000, 10 000, 50 000, 100 000, 500 000 o 1 000 000 de veces por encima de la cantidad original de la plantilla de ácido nucleico

bicatenario lineal 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 la primera etapa 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 todas las etapas 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 bicatenario lineal 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 bicatenario lineal se puede amplificar exponencialmente. En algunas realizaciones, en un método dado a conocer en la presente memoria, una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal puede al menos doblarse en número con cada ciclo del método. En algunas realizaciones, en un método dado a conocer en la presente memoria, una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal puede al menos doblarse 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 bicatenario lineal se puede amplificar al menos 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1 000, 5 000, 10 000, 50 000, 100 000, 500 000, 1 000 000 o 10 000 000 de veces por encima de la cantidad original de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal presente en la reacción al comienzo del método.

Con los métodos dados a conocer en la presente memoria, una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal se puede amplificar por muchos métodos. Por ejemplo, se pueden generar muchas copias de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal como parte de ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños en un único ciclo de un método dado a conocer en la presente memoria. En otro ejemplo, cuando un método dado a conocer en la presente memoria se repite durante muchos ciclos, pueden quedar disponibles muchas hebras circulares que contienen una copia de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal (p. ej., puede estar disponibles todos de una hebra circular generada en un ciclo determinado, más las hebras circulares que se generaron en los ciclos anteriores). A continuación, a partir de muchas hebras circulares, se pueden generar muchos ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños.

En algunas realizaciones, en las mezclas de reacción dadas a conocer en la presente memoria para el funcionamiento de los métodos de amplificación dados a conocer en la presente memoria, numerosas etapas son de un método de amplificación dado a conocer en la presente memoria que se realizan de manera simultánea. Por ejemplo, en algunas realizaciones, en una única mezcla de reacción, dos o más de lo siguiente se producen de manera simultánea: generación de una hebra circular a partir de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, generación de un producto de extensión del primer cebador, generación de un producto de extensión del segundo cebador y generación de un nuevo ácido nucleico bicatenario, y escisión de un nuevo ácido nucleico bicatenario en dos o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños. En algunas realizaciones, cada uno de lo de más arriba se produce de manera simultánea en una mezcla de reacción dada a conocer en la presente memoria.

En algunas realizaciones, de manera separada o concurrente con cualquier etapa de un método dado a conocer en la presente memoria, se puede dar a conocer una condición o componente de la reacción para favorecer o mantener la separación de las secuencias de dos hebras complementarias de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal dentro de la hebra circular. Tales condiciones o componentes de la reacción pueden facilitar la hibridación del primer cebador a la hebra circular y con ellos acelerar un método dado a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, la hebra circular se puede someter a una temperatura que favorece la "respiración" (a saber, breves periodos de ruptura localizada de puentes de hidrógeno que conectan las pares de bases) o la separación continua de las secuencias de las dos hebras complementarias de la plantilla dentro de la hebra circular. En otro ejemplo, la hebra circular puede verse sometida a una molécula que interfiere con la hibridación de las hebras complementarias de la plantilla dentro de la hebra circular. Tal molécula puede ser, por ejemplo, un cebador que tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una hebra complementaria de la plantilla. En el caso de un cebador que se fija específicamente a una hebra complementaria de la plantilla, el cebador puede contener uno o varios nucleótidos no estándares [p. ej., ácidos nucleicos bloqueados (descritos en, por ejemplo, Vester B. y Wengel J., *Biochemistry*, 43 (42), 26 de octubre de 2004, págs. 13233-41, que se incorpora en la presente memoria mediante referencia en su totalidad)]. Un cebador que se puede fijar específicamente a una hebra complementaria en una hebra circular y que puede interferir con la hibridación de las secuencias de las hebras complementarias dentro de la hebra circular se puede denominar en la presente memoria un "cebador de invasión". En algunas circunstancias, un cebador de invasión se puede configurar de tal forma que no permita la adición de nucleótidos en su extremo 3' por la acción de una polimerasa (p. ej., puede carecer de un grupo OH en 3').

El progreso de un método dado a conocer en la presente memoria se puede monitorizar de numerosas maneras diferentes. En las realizaciones, se puede ensayar una reacción por un producto de amplificación de ácido nucleico (p. ej., por la cantidad del producto o la velocidad a la que se genera). En otras realizaciones, se puede ensayar una reacción por la actividad de una polimerasa a lo largo de la plantilla de un ácido nucleico (p. ej., por el movimiento de una polimerasa a lo largo de un adaptador, la hebra circular o el producto de extensión del primer cebador). Así pues, en algunas realizaciones, los fenómenos de un método dado a conocer en la presente memoria se pueden observar debido a la acumulación del producto de un método (que puede ser durante o después de la compleción de las etapas del método), o debido a fenómenos detectables que se producen durante las etapas de un método.

La presencia de los ácidos nucleicos amplificados se puede ensayar, por ejemplo, mediante la detección de los

productos de reacción (los ácidos nucleicos amplificados o los subproductos de la reacción) o mediante la detección de sondas asociadas al progreso de la reacción.

5 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 que se dan 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, hidroxietilbamidina, pironina Y, colorante Diamond™, GelRed™, GelGreen™ y LDS 751.

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

20 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 tinte 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.

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

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

30 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 de nucleótidos 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 la hebra circular o del producto de extensión del primer cebador (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 regiones. En algunas realizaciones, la longitud de la segunda región puede tener entre 10 y 40 nucleótidos, y la longitud de la primera y de la 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 está hibridada 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 está hibridada a su secuencia a detectar, y la primera y la tercera regiones no se hibridan la una con 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 a su secuencia a detectar. En algunas realizaciones, si la secuencia a detectar está presente, la sonda se puede hibridar a 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.

55 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 del cebador de tal forma que el indicador fluorescente se apaga cuando la sonda de ácido nucleico se hibrida con el cebador. 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 a su secuencia a detectar. En algunas realizaciones, si la secuencia a detectar

60

está presente, la sonda puede hibridarse a 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.

5 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.

15 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 luminosa, 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, un método dado a conocer en la presente memoria se puede llevar a cabo 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. con n.º de serie 13/769 779, registrada el 18 de febrero de 2013, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

20 Con el uso de los métodos dados a conocer en la presente memoria, los productos de amplificación específicos de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal 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 bicatenario lineal de interés cuando se generan tan solo 10, 50, 100, 500, 1 000, 5 000, 10 000, 50 000, 100 000, 500 000 o 1 000 000 de 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 de ácido nucleico bicatenario lineal de interés en una muestra que contiene tan solo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1 000, 5 000 o 10 000 copias de la plantilla de interés al comienzo del método.

25 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 diana de interés. En determinadas realizaciones, la presencia o la cantidad de un ácido nucleico diana 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 que hay 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 velocidad de amplificación en la reacción cambia de una fase basal a una fase exponencial, o el momento en el que la velocidad 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 la fluorescencia o la absorbancia de una reacción alcance un valor seleccionado. En determinadas realizaciones, la presencia o la cantidad de un ácido nucleico diana de interés en una muestra se puede determinar por un método en el que interviene 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 diana de interés frente a uno o ambos de: i) una reacción que se sabe que carece del ácido nucleico diana de interés (a saber, un control negativo) o ii) una reacción que se sabe que contiene el ácido nucleico diana de interés (a saber, un control positivo). En las realizaciones, tanto en una reacción que contiene el ácido nucleico diana de interés como en una reacción que no contiene el ácido nucleico diana se puede medir un tiempo de inflexión seleccionado. En las realizaciones, la presencia de un ácido nucleico diana de interés en una muestra se puede determinar basándose en un método en el que conlleva la evaluación de la diferencia de tiempo entre la inflexión de una reacción que contiene una muestra que puede o no puede contener un ácido nucleico diana de interés, y un tiempo de inflexión de una o varias reacciones con el estado conocido del ácido nucleico diana de interés (p. ej. que se sabe que contiene o que no contiene el ácido nucleico diana de interés). Por ejemplo, se puede identificar que una muestra contiene un ácido nucleico diana 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 reacción correspondiente que se sabe que no contiene el ácido nucleico diana de interés. En otro ejemplo, se puede identificar que una muestra contiene un ácido nucleico diana 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 diana de interés.

Los métodos dados a conocer en la presente memoria se pueden llevar a cabo durante cualquier cantidad 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.).

En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden incluir la preparación de una mezcla de reacción que contiene los reactantes para llevar a cabo un método de amplificación dado a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden incluir la preparación de una mezcla de reacción que contiene cualquiera o varios de: una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, un primer cebador, un segundo cebador, uno o varios adaptadores, una ligasa, una polimerasa, y una enzima de restricción. En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden incluir la preparación de una mezcla de reacción que contiene cada uno de: una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, un primer cebador, un segundo cebador, un adaptador, una ligasa, una polimerasa, y una enzima de restricción. En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden además comprender la inclusión de una transcriptasa inversa en la mezcla de reacción. La plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, el primer cebador, el segundo cebador, los adaptadores, la ligasa, la polimerasa, la enzima de restricción y la transcriptasa inversa pueden tener cualquiera de las características descritas en otro lugar en la presente memoria. Los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden además comprender la inclusión de cualquier otro reactante descrito en otro lugar de la presente memoria que sea útil para la realización de un método de amplificación dado a conocer en la presente memoria en la mezcla de reacción (p. ej., dNTP, tampón, sales, agua, BSA, etc.). En algunas realizaciones, las mezclas de reacción se pueden preparar en un recipiente. En algunas realizaciones, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden además comprender la incubación de una mezcla de reacción durante un periodo de tiempo después de que a la mezcla de reacción se le añadan todos los reactantes para un método de amplificación dado a conocer en la presente memoria. Una mezcla de reacción se puede incubar, por ejemplo, durante no más de 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120, 150, 180, 240 o 480 min después de la combinación de todos los reactantes para un método de amplificación dado a conocer en la presente memoria en un recipiente de reacción. La mezcla de reacción se puede incubar a una o varias temperaturas seleccionadas. La temperatura puede ser cualquier temperatura para la realización de un método de amplificación descrito en otro lugar de la presente memoria. En algunas realizaciones, una mezcla de reacción se puede medir por los resultados del ensayo después de no más de 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120, 150, 180, 240 o 480 min después de la combinación de todos los reactantes para un método de amplificación dado a conocer en la presente memoria en un recipiente de reacción.

Se pueden utilizar diferentes plantillas de ácido nucleico bicatenario lineal con las composiciones y los métodos dados a conocer en la presente memoria.

La plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal puede contener ADN, ARN o una mezcla de los mismos. La plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal puede contener dos hebras complementarias independientes (una "primera hebra" / "primera hebra complementaria" y una "segunda hebra" / "segunda hebra complementaria").

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.

La plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal puede tener cualquier tamaño. Por ejemplo, la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal 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, 1 000 o 1 500 pares de bases de nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la plantilla de ácido nucleico bicatenario puede tener entre 2 y 100 000, entre 5 y 100 000, entre 10 y 100 000, entre 15 y 100 000, entre 20 y 100 000, entre 25 y 100 000, entre 30 y 100 000, entre 50 y 100 000, entre 70 y 100 000, entre 100 y 100 000, entre 200 y 100 000, entre 2 y 10 000, entre 5 y 10 000, entre 10 y 10 000, entre 15 y 10 000, entre 20 y 10 000, entre 25 y 10 000, entre 30 y 10 000, entre 50 y 10 000, entre 70 y 10 000, entre 100 y 10 000, entre 200 y 10 000, entre 2 y 5 000, entre 5 y 5 000, entre 10 y 5 000, entre 15 y 5 000, entre 20 y 5 000, entre 25 y 5 000,

entre 30 y 5 000, entre 50 y 5 000, entre 70 y 5 000, entre 100 y 5 000, entre 200 y 5 000, entre 2 y 3 000, entre 5 y 3 000, entre 10 y 3 000, entre 15 y 3 000, entre 20 y 3 000, entre 25 y 3 000, entre 30 y 3 000, entre 50 y 3 000, entre 70 y 3 000, entre 100 y 3 000, entre 200 y 3 000, entre 2 y 1 000, entre 5 y 1 000, entre 10 y 1 000, entre 15 y 1 000, entre 20 y 1 000, entre 25 y 1 000, entre 30 y 1 000, entre 50 y 1 000, entre 70 y 1 000, entre 100 y 1 000, entre 200 y 1 000, 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 pares de bases de nucleótidos de longitud.

Una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal puede tener extremos romos tanto en el primer extremo como en el segundo extremo de la plantilla, puede tener extremos cohesivos tanto en el primer extremo como en el segundo extremo de la plantilla, o puede tener un extremo romo en un extremo de la plantilla y un extremo cohesivo en el otro extremo de la plantilla. Las dos hebras complementarias independientes de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal pueden tener la misma longitud la una que la otra (lo que da lugar a una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal con extremos romos) o pueden ser diferentes (lo que da lugar a una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal con al menos un extremo cohesivo).

La plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal puede proceder de una molécula original de ácido nucleico bicatenario más grande (p. ej., mediante la escisión de la molécula original de ácido nucleico bicatenario más grande) o puede no proceder de una molécula original de ácido nucleico bicatenario más grande.

En algunas realizaciones, una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal 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), que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. 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 lineal se puede generar a partir de una molécula de ARN monocatenario en la misma mezcla de reacción en la que se amplifica la plantilla de ADN bicatenario lineal de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria. En algunas realizaciones, el mismo cebador se puede utilizar tanto para A) la generación de una hebra de ADNc a partir de una molécula de ARN, así como B) de primer o segundo cebador en un método de amplificación dado a conocer en la presente memoria.

En algunas realizaciones, se dan a conocer en la presente memoria moléculas adaptadoras de ácido nucleico ("adaptadores"). Un adaptador puede contener una sola hebra de ácido nucleico. Los adaptadores se pueden utilizar para conectar una primera hebra complementaria y una segunda hebra complementaria de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal para generar una hebra circular. Los adaptadores pueden contener ADN, ARN o una mezcla de los mismos, y pueden contener nucleótidos estándares y no estándares. Un adaptador puede contener un grupo fosfato en 5' y un grupo hidroxilo en 3'.

Los adaptadores pueden tener cualquier longitud de nucleótidos. En algunas realizaciones, un adaptador puede contener al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 12, al menos 14, al menos 16, al menos 18, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 125, al menos 150, al menos 175, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 400 o al menos 500 nucleótidos. En algunas realizaciones, un adaptador puede contener 500 o menos, 400 o menos, 300 o menos, 250 o menos, 200 o menos, 175 o menos, 150 o menos, 125 o menos, 100 o menos, 90 o menos, 80 o menos, 70 o menos, 60 o menos, 50 o menos, 45 o menos, 40 o menos, 35 o menos, 30 o menos, 25 o menos, 20 o menos, 18 o menos, 16 o menos, 14 o menos, 12 o menos, 10 o menos, 9 o menos, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, o 3 o menos nucleótidos.

En algunas realizaciones, un adaptador puede contener regiones que son autocomplementarias (a saber, el adaptador puede contener secuencias nucleotídicas internas que son capaces de emparejar las bases de acuerdo con Watson-Crick con otras secuencias nucleotídicas en la misma hebra). En algunas realizaciones, las secuencias de las regiones autocomplementarias del adaptador están invertidas una con respecto a la otra dentro de la hebra del adaptador, por lo que las regiones se hibridan como hebras antiparalelas. Un adaptador que contiene regiones autocomplementarias puede, en determinadas condiciones, formar una estructura ahorquillada. La asociación y disociación de los ácidos

nucleicos complementarios cortos se produce como una reacción de equilibrio cuyas características vienen determinadas, por ejemplo, por la temperatura y las condiciones de las sales de una reacción, y por el contenido de bases y la longitud de las secuencias complementarias. La influencia de estos factores se ha descrito en J. G. Wetmur ([1991] *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26; 227-259) que se incorpora por referencia en la presente memoria en su totalidad.

En algunas realizaciones, un adaptador que contiene regiones autocomplementarias puede contener regiones autocomplementarias en, o cerca de, los extremos 5' y 3' de la única hebra de ácido nucleico del adaptador. En algunas realizaciones, un adaptador puede contener regiones autocomplementarias en, o cerca de, los extremos 3' y 5' de la única hebra de ácido nucleico, de tal forma que no más de 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, o 0 nucleótidos sin hibridar están presentes en el extremo 5' del adaptador cuando las regiones autocomplementarias del adaptador están hibridadas. En algunas realizaciones, un adaptador puede contener regiones autocomplementarias en, o cerca de, los extremos 5' o 3' de la única hebra de ácido nucleico, de tal forma que no más de 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 nucleótidos sin hibridar están presentes en el extremo 3' del adaptador cuando las regiones autocomplementarias del adaptador están hibridadas. En algunas realizaciones, un adaptador puede contener las regiones autocomplementarias en, o cerca de, los extremos 5' y 3' de la única hebra de ácido nucleico, de tal forma que no más de 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 nucleótidos sin hibridar están presentes en el extremo 5' o bien el extremo 3' del adaptador cuando las regiones autocomplementarias del adaptador están hibridadas. Un adaptador descrito en la presente memoria que está configurado para adoptar una estructura ahorquillada puede contener regiones autocomplementarias en, o cerca de, los extremos 5' y 3' de la única hebra de ácido nucleico del adaptador. También se puede describir que tales adaptadores son capaces de adoptar una estructura ahorquillada.

En algunas realizaciones, un adaptador puede contener una región bicatenaria localizada como resultado de la hibridación de regiones autocomplementarias del adaptador. Ambas hebras de la región bicatenaria localizada del adaptador son parte de la misma hebra única de ácido nucleico más grande del adaptador. La región bicatenaria localizada del adaptador puede incluir los nucleótidos de los extremos tanto 5' como 3' del adaptador. En algunas realizaciones, un adaptador contiene una región bicatenaria localizada de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 pares de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, un adaptador contiene una región bicatenaria localizada de al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 pares de nucleótidos de longitud, que comienzan con los nucleótidos de los extremos 5' y 3' del adaptador hibridados. En algunas realizaciones, un adaptador puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más regiones bicatenarias localizadas independientes. Una región bicatenaria localizada de un adaptador puede ser un "tallo" o "región de tallo" de una estructura ahorquillada.

En algunas realizaciones, un adaptador puede contener regiones autocomplementarias en, o cerca de, los extremos 5' y 3' de la única hebra de ácido nucleico, de tal manera que se forma un tallo que tiene un extremo romo por la combinación de los extremos 5' y 3' de la única hebra de ácido nucleico tras la hibridación de las regiones autocomplementarias del adaptador. En algunas realizaciones, un adaptador puede contener regiones autocomplementarias en, o cerca de, los extremos 5' y 3' de la única hebra de ácido nucleico, de tal manera que se forma un tallo que tiene extremos cohesivos por la combinación de los extremos 5' y 3' de la única hebra de ácido nucleico tras la hibridación de las regiones autocomplementarias del adaptador. En algunas realizaciones, un adaptador que tiene un extremo cohesivo debido a la combinación de los extremos 5' y 3' de la única hebra de ácido nucleico tiene un 3' protuberante. En algunas realizaciones, un adaptador que tiene un extremo cohesivo debido a la combinación de los extremos 5' y 3' de la única hebra de ácido nucleico tiene un 5' protuberante.

En algunas realizaciones, un adaptador que contiene una región bicatenaria localizada puede contener una región de bucle monocatenario. La región de bucle monocatenario puede ser el "bucle" de una estructura ahorquillada. Una región de bucle monocatenario de un adaptador puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos. En algunas realizaciones, un adaptador puede contener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más regiones de bucle monocatenario independientes. Una región de bucle monocatenario de un adaptador puede contener una secuencia de nucleótidos de interés o una composición porcentual de nucleótidos de interés. Por ejemplo, una región de bucle monocatenario puede contener el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o más de restos de adenina o timina en la región del bucle. En otros ejemplos, una región de bucle monocatenario puede contener 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más restos de adenina o timina consecutivos en la región del bucle. En otro ejemplo, una región de bucle monocatenario puede contener el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción, o una porción de la misma.

En algunas realizaciones, un adaptador puede contener una región de tallo que tiene una T_m de interés. Una T_m de interés se puede seleccionar en función de una serie de factores. En algunas circunstancias, puede ser deseable tener una T_m en la región del tallo de tal manera que las regiones autocomplementarias del adaptador se hibriden de manera estable a la temperatura de una reacción en la que interviene el adaptador, pero que también se separe con facilidad en presencia de una polimerasa una vez que el adaptador está incorporado en una hebra circular. Una T_m de interés para una región de tallo de un adaptador puede ser, por ejemplo, de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 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, o 75 °C.

En algunas realizaciones, un adaptador puede contener el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción. El componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de

enzima de restricción puede estar enteramente dentro de una región de bucle monocatenario del adaptador, puede estar parcialmente dentro de una región de bucle monocatenario y parcialmente dentro de una región bicatenaria localizada del adaptador, puede estar enteramente dentro de una región bicatenaria localizada del adaptador, o puede estar dentro de un adaptador que carece de una estructura ahorquillada. La presencia de un componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción en un adaptador no descarta la presencia en el mismo adaptador de una región que es complementaria a parte o todo el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción. En algunas realizaciones, si un adaptador contiene un componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción y una región que es complementaria a parte o toda la secuencia, las regiones pueden hibridarse la una con la otra en determinadas condiciones como parte de una región bicatenaria localizada del adaptador.

Típicamente, si el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción no tiene una región complementaria dentro del adaptador, el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción del adaptador no puede ser reconocido con facilidad ni escindido mediante la correspondiente enzima de restricción. En algunas realizaciones, si el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción está enteramente dentro de una región bicatenaria localizada del adaptador (esto es, si el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción forma parte de una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción localizada dentro del adaptador), la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción puede estar situada en el adaptador de tal manera que se puede escindir con facilidad por la correspondiente enzima de restricción. En otras realizaciones, si el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción está enteramente dentro de una región bicatenaria localizada del adaptador, la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción puede estar situada en el adaptador de tal manera que no se pueda escindir con facilidad por la correspondiente enzima de restricción. Por ejemplo, la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción que contiene el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción puede estar inmediatamente adyacente a una región de bucle monocatenario de un adaptador, y esta estructura localizada no puede asegurar la fijación de la enzima de restricción correspondiente a la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción.

El componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción puede corresponder a cualquier secuencia de reconocimiento de enzima de restricción. Por ejemplo, el adaptador puede contener un componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción para la enzima de restricción AatII, Acc65I, Accl, Acil, Acll, Acul, Afel, AfIII, AfIII, Agel, Ahdl, AleI, Alul, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeKI, Apol, Ascl, Asel, AsiSI, Aval, Avall, AvrII, BaeGI, Bael, BamHI, BanI, BanII, BbsI, BbvCI, BbvI, Bccl, BceAI, Bcgl, BciVI, BclI, BcoDI, Bfal, BfuAI, BglI, BgIII, BlnI, BmgBI, Bmrl, BmtI, Bpml, Bpu10I, BpuEI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, Bsal, BsaJI, BsaWI, BsaXI, BseRI, BseYI, BsgI, BsiEI, BsiHKAI, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, Bsml, BsoBI, Bsp1286I, BspCNI, BspDI, BspEI, BspHI, BspMI, BspQI, BsrBI, BsrDI, BsrFI, BsrGI, Bsrl, BssHII, BssKI, BssSI, BstAPI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZ17I, Bsu36I, BtgI, BtgZI, BtsCI, BtsIMutI, Cac8I, Clal, CspCI, CviAI, CviKI-1, CviQI, Ddel, Dpnl, DpnII, DraI, DrdI, EaeI, EagI, Earl, Ecil, Eco53kI, EcoNI, EcoO109I, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, Faul, Fnu4HI, FokI, FseI, FspEI, Fspl, HaeII, HaeIII, Hgal, Hhal, HincII, HindIII, HinfI, HinP1I, HpaI, HpalI, HphI, Hpy166II, Hpy188II, Hpy188III, Hpy99I, HpyAV, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V, KasI, KpnI, LpnPI, MboI, MbolI, MfeI, MluCI, MluI, MlyI, Mmel, MnlI, MscI, MseI, MslI, MspA1I, MspI, MspJI, MwoI, NaeI, NarI, Nb.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NlaIII, NlaIV, NmeAIII, NotI, Nrul, Nsil, NspI, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI, Nt.CviPII, PacI, PaeR7I, PciI, PflFI, PflMI, Phol, PleI, Pmel, PmlI, PpuMI, PshAI, Psil, PspGI, PspOMI, PspXI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SapI, Sau3AI, Sau96I, SbfI, Scal, ScrFI, SexAI, SfaNI, SfcI, SfiI, SfoI, SgrAI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, Stul, StyD4I, Styl, SwaI, TaqI, TfiI, TseI, Tsp45I, TspMI, TspRI, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, XmnI, o ZraI.

En algunas realizaciones, un adaptador puede tener tres regiones generales en la secuencia (de 5' a 3'): A) una región en 5', B) una región central y C) una región en 3'. Las regiones en 5' y 3' pueden ser complementarias la una de la otra. En determinadas condiciones, las regiones en 5' y 3' pueden hibridarse la una a con la otra, con lo que forman una región bicatenaria localizada / tallo de una estructura ahorquillada. Al tallo formado por la hibridación de la región en 5' y la región en 3' se le puede denominar en la presente memoria un "tallo" o un "tallo terminal" del adaptador. En algunas realizaciones, las regiones en 5' y 3' pueden tener cualquiera de las características de las regiones autocomplementarias descritas en otro lugar en la presente memoria. La región central puede tener una conformación monocatenaria y puede ser el bucle de una estructura ahorquillada, en la que las regiones en 5' y 3' combinadas forman el tallo de la estructura ahorquillada. En algunas realizaciones, la región central puede contener una secuencia de nucleótidos de tal forma que, en determinadas condiciones, contiene una, dos, tres, cuatro, cinco o más regiones bicatenarias localizadas e independientes, y una, dos, tres, cuatro, cinco o más regiones monocatenarias e independientes. En algunas realizaciones, la región central puede tener cualquiera de las características de una región de bucle monocatenario descrita en otro lugar en la presente memoria.

En algunas realizaciones, en un adaptador que tiene una región 5', una región central y una región 3', y en donde las regiones en 5' y 3' forman una región bicatenaria localizada / tallo de una estructura ahorquillada, el tallo puede contener al menos dos subpartes: i) una "parte más externa" y ii) una "parte interna". La parte más externa puede contener los nucleótidos de los extremos en 5' y 3' reales del adaptador, más 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos adicionales inmediatamente adyacentes al nucleótido del extremo 5', y 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos

adicionales inmediatamente adyacentes al nucleótido del extremo 3'. En la parte más externa de un tallo, todos los nucleótidos pueden estar hibridados con otro nucleótido (a saber, el tallo puede tener un extremo romo), o algunos de los nucleótidos en una de las regiones 5' o 3' puede no estar hibridado con otro nucleótido (a saber, puede haber una protuberancia en 5' o 3' / el tallo puede tener un extremo cohesivo). La parte más externa de un tallo contiene un par de bases más externo. El par de bases más externo puede incluir tanto los nucleótidos de los extremos 5' y 3' del adaptador (en el caso de un tallo con un extremo romo), o puede incluir bien el nucleótido del extremo 5' o del extremo 3' del adaptador más un nucleótido a no más de 10 nucleótidos desde el nucleótido del extremo en 5' o en 3' del adaptador (en el caso de un tallo con un extremo cohesivo). Por ejemplo, si el tallo tiene un extremo cohesivo con una protuberancia en 3' de dos nucleótidos, el par de bases más externo es el nucleótido del extremo en 5' más el tercer último nucleótido de la región en 3' del adaptador. La parte más interna de un tallo es una parte del tallo que está más cercana a la región del centro del adaptador que la parte más externa del tallo. La parte más interna de un tallo no incluye los nucleótidos reales del extremo 5' o 3' del adaptador. La parte más interna del tallo puede comenzar, por ejemplo, en una posición a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 pares de bases desde el par de bases más externo de la parte más externa del tallo.

En algunas realizaciones, en un adaptador que contiene un tallo que tiene una parte más externa y una parte más interna, la parte más externa del tallo puede contener una porción de una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción. La porción de una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción puede ser una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción dada a conocer en la presente memoria, entre ellas las secuencias de reconocimiento palindrómicas de enzima de restricción. En algunas realizaciones, la porción de una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción es la mitad de una secuencia de reconocimiento bicatenaria palindrómica de enzima de restricción. Una "mitad" de una secuencia de reconocimiento bicatenaria palindrómica de enzima de restricción puede incluir una mitad que tiene un extremo romo o una mitad que tiene un extremo cohesivo. Tal y como se utiliza en la presente memoria, cualquier configuración de una porción más externa de un tallo se puede describir como una "mitad" de una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción si dos de las mitades combinadas juntas (p. ej., mediante la ligación de extremo con extremo o la hibridación de dos de los tallos) forman la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción.

En algunas realizaciones, la inclusión de secuencias nucleotídicas en un adaptador de tal forma que la mitad de una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción se forma en la parte más externa del tallo de un adaptador puede proporcionar diferentes ventajas. En algunas circunstancias, el uso de un adaptador que contiene la mitad de una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción en la parte más externa del tallo con un método dado a conocer en la presente memoria puede incrementar la eficacia de la amplificación de la plantilla o reducir la amplificación de fondo. Por ejemplo, un método dado a conocer en la presente memoria puede incluir una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal que tiene al menos un extremo romo y un adaptador que tiene una mitad con extremo romo de una secuencia de reconocimiento bicatenaria de enzima de restricción en la parte más externa del tallo del adaptador (p. ej., la mitad de un sitio de *StuI*). Si dos de los adaptadores están ligados o si no unidos de extremo con extremo (a saber, la parte más externa con la parte más externa), se genera una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción en la molécula recién formada (p. ej., un sitio de *StuI* completo). Si una enzima que reconoce la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción está presente en la reacción con la molécula recién formada que contiene las dos moléculas de adaptador unidas de extremo con extremo, puede reconocer la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción y escindir la molécula recién formada. Este procedimiento puede reducir o impedir la acumulación de productos indeseables de autoligación de los adaptadores. En cambio, si los adaptadores se ligan al extremo de la plantilla, siempre y cuando el extremo de la plantilla no tenga una secuencia que es la mitad de la secuencia de reconocimiento bicatenaria de enzima de restricción en la parte más externa del tallo del adaptador, no se formará la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción (p. ej., no se formará una secuencia de *StuI* completa) y los productos de ligación entre adaptador y plantilla no serán escindidos por la enzima.

En algunas realizaciones, en un adaptador que contiene un tallo que tiene una parte más externa y una parte interna, la parte interna del tallo puede contener una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción. Tal y como se utiliza en la presente memoria, estos adaptadores se pueden denominar "adaptadores reciclables". En determinadas realizaciones, la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción puede comenzar a un número seleccionado de pares de bases desde el par de bases más externo de la parte más externa del tallo, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más pares de bases desde el par de bases más externo. En algunas realizaciones, la escisión del adaptador con una enzima de restricción que reconoce la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción en la parte interna del tallo da lugar a que el tallo tenga una parte más externa que es diferente a la que había antes de la escisión. Por ejemplo, un adaptador puede tener un tallo que tiene una parte más externa con extremos cohesivos y una parte más interna que contiene la secuencia bicatenaria completa de la enzima de restricción para la enzima *StuI*. Cuando se escinde por la acción de la enzima *StuI*, una secuencia de *StuI* produce extremos romos. Por consiguiente, el adaptador puede tener inicialmente un extremo cohesivo en la parte más externa del tallo, pero después de la escisión del adaptador con *StuI* (en la secuencia de *StuI* completa en la parte más interna del tallo), el adaptador puede tener un extremo romo en la nueva parte más externa del tallo (a saber, la nueva parte más externa del tallo puede contener una porción del sitio de *StuI* que se escindió). En otro ejemplo, un adaptador puede tener un tallo con una parte más externa con extremos

cohesivos con una protuberancia "TC" en el extremo 5', y el adaptador puede también tener la secuencia bicatenaria completa de enzima de restricción para la enzima EcoRI en la parte interna del tallo. Cuando se escinde por la acción de la enzima EcoRI, una secuencia de EcoRI produce una protuberancia "AATT" en el extremo 5'. Por consiguiente, el adaptador puede inicialmente tener un extremo cohesivo en la parte más externa del tallo con una protuberancia "TC" sobre la hebra en 5', pero después de la escisión del adaptador con EcoRI, el adaptador puede tener un extremo cohesivo con una protuberancia "AATT" en la hebra en 5' en la nueva parte más externa del tallo. Un adaptador reciclable puede además contener el componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción en cualquier localización en el adaptador. El componente monocatenario de una enzima de restricción puede corresponder a la misma enzima de restricción o a una diferente que la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción en la parte más interna del tallo del adaptador.

En algunas realizaciones, los adaptadores reciclables se pueden utilizar con un método dado a conocer en la presente memoria, en donde, después de la escisión del adaptador con la enzima de restricción que reconoce la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción en la parte interna del tallo, la nueva parte más externa del tallo del adaptador es complementaria a, o compatible con, los extremos de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal. En algunas realizaciones, la parte más externa de un adaptador reciclable no es complementaria a, o compatible con, los extremos de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal antes de la escisión del adaptador con una enzima de restricción que reconoce la secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción en la parte interna de la región del tallo del adaptador. Por ejemplo, si ambos extremos de una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal tienen un extremo romo y el adaptador reciclable tiene inicialmente un tallo con una parte más externa con extremos cohesivos con una protuberancia en 5' "TC", la parte más externa del adaptador no es inicialmente complementaria ni compatible con los extremos de la plantilla (y, por lo tanto, no pueden fijarse a la plantilla para formar una hebra circular). Sin embargo, si el adaptador reciclable también contiene un sitio Stul bicatenario completo en la parte interna del tallo, después de la escisión del adaptador con Stul, la nueva parte más externa del tallo tiene un extremo romo (a saber, la mitad del sitio Stul) que es compatible con los extremos de la plantilla.

En algunas realizaciones, el uso de adaptadores reciclables con los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden proporcionar una serie de ventajas. En un ejemplo, el uso de adaptadores reciclables puede regular el número de adaptadores disponibles para fijarse los unos a los otros y a la plantilla de ácido nucleico lineal, lo que ayuda así a coordinar el número de moléculas de adaptadores disponibles con el número de moléculas de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal disponibles. Esto puede servir para reducir la amplificación inespecífica de fondo con los métodos dados a conocer en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas circunstancias, al comienzo de un método dado a conocer en la presente memoria, puede haber un número más grande de moléculas adaptadoras que de moléculas de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal. Si los adaptadores se pueden juntar de extremo con extremo (p. ej., mediante ligación), podría formarse una cantidad indeseable de productos de la ligación de adaptador con adaptador en un método dado a conocer en la presente memoria. Sin embargo, si se utiliza en el método un adaptador reciclable que tiene una parte más externa con un extremo cohesivo con una protuberancia en 5' "TC" y una parte interna que tiene un sitio Stul en la región del tallo, inicialmente, los adaptadores que tienen la parte más externa que tiene un extremo cohesivo con una protuberancia en 5' "TC" no serán capaces de autohibridarse ni de formar los productos de ligación de adaptador con adaptador. Así pues, la cantidad de productos de ligación de fondo inespecíficos de adaptador con adaptador que se generan se disminuirán al mínimo al comienzo de la reacción. Si el adaptador reciclable se incuba con Stul, escindirá algunos de los adaptadores en el sitio de Stul, lo que producirá adaptadores que tienen una nueva parte más externa que tendrá un extremo romo. El extremo romo es compatible con los extremos de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal y, por lo tanto, los adaptadores reciclables escindidos asegurarán la generación de la hebra circular en los métodos dados a conocer en la presente memoria. Los extremos romos de la parte más externa del tallo de los adaptadores reciclables escindidos asegurarán también la formación de productos de la ligación de adaptador con adaptador. Sin embargo, se pueden generar muy pocos de estos productos de extremos romos de ligación de adaptador con adaptador en comparación con si todos los adaptadores de la reacción ya contenían extremos romos en la parte más externa del tallo al comienzo del método. De igual forma, en una circunstancia en la que se llevan a cabo numerosos ciclos de un método dado a conocer en la presente memoria, ya que en cada ciclo del método se están generando más ácidos nucleicos bicatenarios, a medida que van quedando disponibles más adaptadores reciclables que tienen extremos romos (debido a la escisión de los tallos de los adaptadores con Stul), también están disponibles más plantillas de ácido nucleico bicatenario lineal para que se fijen los adaptadores de extremos romos. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el número de moléculas de plantilla disponibles puede estar al menos en líneas generales coordinado con el número de adaptadores disponibles para fijarse a las moléculas de la plantilla (p. ej., en los métodos dados a conocer en la presente memoria que utilizan adaptadores reciclables, ya que a medida que se incrementa el número de plantillas de ácido nucleico bicatenario lineal en la reacción, también se incrementa el número de adaptadores que se han escindido con la enzima que reconoce la secuencia de enzima de restricción en la parte interna del tallo).

En algunas realizaciones, se puede dar a conocer un adaptador, en donde el adaptador se hibrida con una o varias hebras de ácido nucleico adicionales. El ácido nucleico adicional hibridado al adaptador puede servir para cualquier propósito. En algunas realizaciones, el ácido nucleico adicional puede ayudar a la detección de la replicación del ADN dependiente del adaptador. Por ejemplo, el ácido nucleico adicional puede contener un marcador que da a conocer una señal detectable diferente en función de si el ácido nucleico adicional está hibridado o no con el adaptador. El ácido nucleico adicional puede tener cualquiera de las características de una sonda de ácido nucleico, tal y como se

describe en otro lugar en la presente memoria (p. ej., puede contener un indicador fluorescente y optativamente, un extintor). Además, el ácido nucleico adicional puede tener la capacidad de ser desplazado por una polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de hebra. Por consiguiente, si un adaptador se conecta primero a una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal durante la generación de una hebra circular y, a continuación, una polimerasa sintetiza un producto de extensión del primer cebador a lo largo de la longitud de la hebra circular, una vez que la polimerasa se topa con el ácido nucleico adicional hibridado con el adaptador puede desplazar el ácido nucleico adicional. Este desplazamiento puede provocar un cambio de la señal detectable desde el marcador, que se puede seguir. Por ejemplo, el ácido nucleico adicional puede contener un fluoróforo en el extremo 5' y un extintor en el extremo 3'. Estos pueden estar separados el uno del otro cuando el ácido nucleico adicional se hibrida con el adaptador (de tal forma que el fluoróforo no se extingue), pero se coloca en proximidad cercana el uno del otro cuando el ácido nucleico adicional no se hibrida al adaptador (de tal forma que se extingue el fluoróforo). La detección de un cambio en una señal detectable del marcador puede correlacionarse con la actividad de la polimerasa a lo largo de los nucleótidos del adaptador, y se puede utilizar para determinar la tasa o la cantidad de amplificación de ácido nucleico en una reacción descrita en la presente memoria.

En algunas realizaciones, se puede utilizar un único tipo de adaptador para amplificar numerosas plantillas de ácido nucleico bicatenario lineal diferentes. Tal y como se describe más arriba y en otro lugar en la presente memoria, en algunas realizaciones, durante la formación de una hebra circular, el adaptador no se hibrida con ninguno de los nucleótidos de la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal (por ejemplo, si la plantilla y los adaptadores tienen extremos romos); en su lugar, el adaptador solo se liga a la plantilla. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un único tipo de adaptador dado a conocer en la presente memoria puede asegurar la generación de una hebra circular a partir de un número ilimitado de plantillas bicatenarias. Por ejemplo, un adaptador que tiene un extremo romo puede asegurar la amplificación de cualquier plantilla bicatenaria que tenga extremos romos en un método dado a conocer en la presente memoria, independientemente de la secuencia de la plantilla bicatenaria.

Los adaptadores se pueden preparar mediante una serie de métodos. Por ejemplo, los adaptadores se pueden preparar de forma sintética, con el uso de la química automática o convencional, tal como por la unión de una estructura de partida a perlas y la adición de nucleótidos a ellas. Los adaptadores se pueden preparar también mediante la síntesis de segmentos o fragmentos de los mismos y, a continuación, mediante la unión de los segmentos o fragmentos en estructuras de adaptadores más grandes que contienen secuencias de nucleótidos idóneas para ser usadas como adaptadores en las composiciones y en los métodos dados a conocer en la presente memoria. Estos segmentos o fragmentos también pueden proceder de microorganismos, tales como de microorganismos que se producen en la naturaleza o de microorganismos que contienen secuencias de nucleótidos clonados.

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 que contiene una plantilla de ácido nucleico 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, morfolidos (p. ej., oligonucleótidos de fosforodiamidato 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 que no forma puente está reemplazado 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 de manera colectiva 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 puede ser de cualquier longitud y contener cualquier secuencia nucleotídica que permite una hibridación suficientemente estable y específica del cebador a su complemento a la temperatura utilizada para un método en el que interviene el cebador. La longitud exacta deseada de un cebador puede depender de una serie de factores, que incluyen la temperatura de una reacción, la composición química del cebador y la reacción en la que interviene el cebador. En algunos ejemplos, el cebador puede tener al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 o 25 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos, el cebador puede tener no más de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos de longitud. Como alternativa, el cebador puede tener entre 4 y 200, 5 y 200, 6 y 200, 7 y 200, 8 y 200, 9 y 200, 12 y 200, 14 y 200, 16 y 200, 18 y 200, 20 y 200, 25 y 200, 4 y 100, 5 y 100, 6 y 100, 7 y 100, 8 y

- 100, 9 y 100, 12 y 100, 14 y 100, 16 y 100, 18 y 100, 20 y 100, 25 y 100, 4 y 50, 5 y 50, 6 y 50, 7 y 50, 8 y 50, 9 y 50, 12 y 50, 14 y 50, 16 y 50, 18 y 50, 20 y 50, 25 y 50, 4 y 35, 5 y 35, 6 y 35, 7 y 35, 8 y 35, 9 y 35, 12 y 35, 14 y 35, 16 y 35, 18 y 35, 20 y 35, o 25 y 35 nucleótidos de longitud. La inclusión de uno o varios nucleótidos no estándares en el cebador puede cambiar la longitud deseada del cebador para ser usado 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.
- 5
- 10 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.
- 15 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 puede estar remplazada por un análogo fluorescente, tal como la 2-aminopurina (véase, por ejemplo, *Proc. Acad. Sci. USA*, 91, 6644-6648 (1994), que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad).
- 20 En algunas realizaciones, se incluye una ligasa de ácido nucleico con un método o una composición dados a conocer en la presente memoria. Las ligasas catalizan la formación de enlaces de 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 ácido nucleico incluyen ADN ligasa de *E. coli*, ADN ligasa de Taq, ADN ligasa de T3, ADN ligasa de T4, ADN ligasa de T7, Ampligase™, ARN ligasa 1 de T4 y ARN ligasa 2 de T4.
- 25 Para catalizar la reacción de ligación, determinadas ligasas requieren ATP (p. ej., la ADN ligasa de T4) o NAD⁺ (la ADN ligasa de *E. coli*). En algunas realizaciones, una ligasa puede ligar los ácidos nucleicos que tienen extremos romos. En algunas realizaciones, una ligasa puede ligar los ácidos nucleicos que tienen extremos cohesivos. En algunas realizaciones, una ligasa puede ligar ácidos nucleicos que tienen tanto extremos romos como cohesivos.
- 30 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 1 000, 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.
- 35
- 40 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.
- 45 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
 NKKSYPQVKICNYVGPAAKVVQLVTNGKNIHLHAHSLVGKHCEDGICTVTAGPKDMVVGAFAN
 LGILHVTKKKVFETLEARMTEACIRGYNPGLLVHPDLAYLQAEGGGDRQLGDREKELIRQAA
 LQQTKEMDLSVRLMFTAFLPDSTGSFTRRLEPVVSDAIYDSKAPNASNLKIVRMDRTAGCVT
 GGEEIYLLCDKVQKDDIQIRFYEEEEENGWVWEGFGDFSPDTHRQFAIVFKTPKYKDINITKP
 ASVQVQLRRKSDLETSEPKPFLYPEIKDKEEVQRKRQKSSGTSGGGSGGGMTLEEARKR
VNELRDLIRYHNRYVVLADPEISDAEYDRLLRELKELEERFPELKSPDSPTLQVGARPL
EATFRPVRHPTRMYSLDNAFNLDLKAFEERIERALGRKGPFAYTVEHKVDGLSVNLYY
EEGVLVYGATRGDGEVGEVTONLLTIPTIPRRLKGVPERLEVRGEVYMPIEAFLRLNEE
LEERGERIFKNPRNAAAGSLRQKDPRIKRLRATFYALGLGLEEVEREGVATQFALL
HWLKEKGFVVEHGYARAVGAEGVEAVYQDWLKKRRALPFEADGVVVKLDELALWRE
LYGTARAPRFAIAYKFPAAEKETRLLDVVFQVGRVTGRVTPVGILEPVEFLEGSEVSRVTLH
NESYIEELDIRIGDWLVHKAGGVIPEVLRVVKERRTGEERPWPETCPECGRHLLKEG
KVHRCPNPLCPAKRFEAIRHFASRKAMDIQGLGEKLIERLLEKGLVKDVADLYRLKED
LVGLERMGEKSAQNLLRQIEESKKRGLERLLYALGLPGVGEVLARNLAARFGNMDRLL
EASLEELLEVEEVGELTARAILETLKDPAFRDLVRRLEAGVEMEAKEKGGALKGLTF
VITGELSRPREEVKALLRRLGAKVTDSVSRKTSYL VVGENPGSKLEKARALGVPTLTEEE
LYRLLEARTGKKAELV

(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 a 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 dados 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 un método dado a conocer en la presente memoria puede ser una ligasa descrita en la solicitud de patente provisional de los EE. UU. n.º 61/802 124, registrada el 15 de marzo de 2013, o la solicitud de patente en el marco PCT n.º PCT/US14/30003, registrada el 15 de marzo de 2014, en donde ambas se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

En algunas realizaciones, se incluye una polimerasa de ácido nucleico con un método o una composición dados 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" hace referencia a una polimerasa de ácido nucleico que puede sintetizar una hebra de ARN a partir de una plantilla de ADN o ARN.

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 φ29, 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 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 1 000, 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, incrementada su actividad catalítica, incrementada su estabilidad o incrementada su 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 una proteína que se fija a ácidos nucleicos monocatenarios (p. ej., proteína de fijación a monocadenas (SSB, por su nombre en inglés), proteína del gen 34 de T4) se da a conocer en un método descrito en la presente memoria en el que interviene una polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de hebra. En algunas realizaciones, la generación de una nueva hebra mediante una ADN polimerasa que tiene actividad de desplazamiento de hebra se puede incrementar por la adición de una proteína de fijación a monocadenas a la reacción.

En algunas realizaciones, se incluye una enzima de restricción con un método o una composición dados a conocer en la presente memoria. Las enzimas de restricción, por lo general, cortan los ácidos nucleicos bicatenarios en, o cerca de, una secuencia de nucleótidos específica (una "secuencia de reconocimiento de enzima de restricción").

En algunas realizaciones, se puede incluir un único tipo de enzima de restricción con un método o una composición dados a conocer en la presente memoria. En otras realizaciones, dos, tres, cuatro, cinco o más tipos de enzimas de restricción pueden venir incluidos en un método o en una composición dados a conocer en la presente memoria. En algunas realizaciones, en un método o en una composición dados a conocer en la presente memoria en los que interviene una molécula de adaptador que contiene secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción que corresponden a 1, 2, 3, 4, 5 o más enzimas de restricción diferentes, el mismo número de tipos de enzimas de restricción se dan a conocer como el número de diferentes tipos de secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción en la molécula adaptadora. Por ejemplo, si un adaptador contiene un componente monocatenario de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción que corresponde a una primera enzima de restricción y una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción que corresponde a una segunda enzima de restricción, deben darse a conocer dos enzimas de restricción diferentes en las composiciones o métodos en los que interviene el adaptador. En algunas realizaciones, si dos o más adaptadores se dan a conocer en un método o composición dados a conocer en la presente memoria, se da a conocer el mismo número de tipos de enzimas de restricción que el número de tipos diferentes de secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción presentes en los dos o más adaptadores.

Las enzimas de restricción que se pueden usar con los métodos o las composiciones dados a conocer en la presente memoria incluyen, por ejemplo, las enzimas AatII, Acc65I, Accl, Acil, AclI, Acul, Afel, AfIII, AfIII, Agel, AhdI, AleI, AluI, AlwI, AlwNI, ApaI, ApaLI, ApeKI, Apol, AscI, AseI, AsiSI, Aval, Avall, AvrII, BaeGI, BaeI, BamHI, BanI, BanII, BbsI, BbvCI, BbvI, Bccl, BceAI, Bcgl, BciVI, BclI, BcoDI, Bfal, BfuAI, BfuCI, BgII, BgIII, Bipl, BmgBI, Bmrl, BmtI, Bpml, Bpu10I, BpuEI, BsaAI, BsaBI, BsaHI, Bsal, BsaJI, BsaWI, BsaXI, BseRI, BseYI, BsgI, BsiEI, BsiHKAI, BsiWI, BslI, BsmAI, BsmBI, BsmFI, BsmI, BsoBI, Bsp1286I, BspCNI, BspDI, BspEI, BspHI, BspMI, BspQI, BsrBI, BsrDI, BsrFI, BsrGI, Bsrl, BssHII, BssKI, BssSI, BstAPI, BstBI, BstEII, BstNI, BstUI, BstXI, BstYI, BstZ17I, Bsu36I, BtgI, BtgZI, BtsCI, BtsIMutI, Cac8I, ClaI, CspCI, CviAII, CviKI-1, CviQI, Ddel, Dpnl, DpnII, DraI, DrdI, EaeI, EagI, EarI, EciI, Eco53kI, EcoNI, EcoO109I, EcoP15I, EcoRI, EcoRV, Faul, Fnu4HI, FokI, FseI, FspEI, FspI, HaeII, HaeIII, Hgal, Hhal, HincII, HindIII, HinfI, HinPI, HpaI, HpaII, HphI, Hpy166II, Hpy188I, Hpy188III, Hpy99I, HpyAV, HpyCH4III, HpyCH4IV, HpyCH4V, KasI, KpnI, LpnPI, MboI, MbolI, MfeI, MluCI, MluI, MlyI, Mmel, MnlI, MscI, Msel, MsiI, MspA1I, MspI, MspJI, MwoI, NaeI, NarI, Nb.BbvCI, Nb.BsmI, Nb.BsrDI, Nb.BtsI, NciI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NlaIII, NlaIV, NmeAIII, NotI, Nrul, NsiI, Nspl, Nt.AlwI, Nt.BbvCI, Nt.BsmAI, Nt.BspQI, Nt.BstNBI, Nt.CviPII, PacI, PaeR7I, PciI, PfiFI, PfiMI, PhiI, PleI, PmeI, PmlI, PpuMI, PshAI, PstI, PspGI, PspOMI, PspXI, PstI, PvuI, PvuII, RsaI, RsrII, SacI, SacII, Sall, SapI, Sau3AI, Sau96I, SbfI, Scal, ScrFI, SexAI, SfaNI, SfiI, SfiI, SgrAI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, StuI, StyD4I, StyI, SwaI, TaqI, TfiI, TseI, Tsp45I, TspMI, TspRI, Tth111I, XbaI, XcmI, XhoI, XmaI, XmnI, o ZraI.

En algunas realizaciones, una o varias enzimas de restricción que generan extremos romos a partir de la escisión de un ácido nucleico bicatenario se pueden usar con un método o composición dados a conocer en la presente memoria. Las enzimas de restricción que generan extremos romos incluyen Pvull, SmaI, HaeIII, Hgal, AluI, EcoRV, Scal, StuI, Acc113I, AccBSI, AcvI, Afal, Afel, AhaIII, AitI, Aor51HI, Aosl, AspMI, AspNI, AssI, Avill, Ball, BanAI, BavI, BavBI, BbrPI, BbvAI, BceBI, BcoAI, BecAII, BepI, Bim19II, Brme36II, BmgBI, BoxI, Bpu95I, BpuAml, BsaAI, BsaBI, BscBI, Bse8I, BseQI, BshI, BsiBI, Bsp50I, Bsp68I, Bsp123I, BsrBI, BstUI, Cac8I, CcoI, CdiI, CeqI, CfuI, Dmal, Dpnl, DraI, EclI, Eco32I, EgeI, FspI, HpaI, KspAI, MbiI, MlsI, MscI, Mssl, NaeI, NmeRI, Nrul, Pae17kI, Paml, Pde133I, PmaCI, Mpel, PmlI, PovII, PstI, SarI, SauSI, Sfal, SmlI, SmlI, Spol, Srul, Sspl, Sual, SwaI, Scal, XmnI, ZraI, y ZmI.

Las versiones modificadas de cualquier enzima de restricción dadas a conocer en la presente memoria también se

pueden usar con los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria, siempre y cuando la enzima de restricción modificada tenga la capacidad de reconocer y escindir una secuencia de ácido nucleico bicatenario específica. Una versión modificada de una enzima de restricción (“enzima de restricción 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 diferentes de la secuencia de la versión original de la enzima de restricción. En algunas realizaciones, una enzima de restricción modificada puede contener no más de 1 000, 700, 500, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10 o 5, más o menos, aminoácidos que la enzima de restricción original. En algunas realizaciones, una enzima de restricción modificada puede comprender un fragmento de una enzima de restricción original. En algunas realizaciones, una enzima de restricción modificada puede comprender una enzima de restricción quimérica con una porción procedente de una enzima de restricción y una porción procedente de una proteína que no es una enzima de restricción. En algunas realizaciones, una enzima de restricción modificada puede tener, por ejemplo, incrementada su actividad catalítica, incrementada su estabilidad, o incrementada su termoestabilidad, en comparación con la enzima de restricción original.

En algunas realizaciones, una enzima de restricción dada a conocer en la presente memoria es termoestable. Una enzima de restricción 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 enzima de restricción modificada puede ser termoestable.

En algunas realizaciones, se da a conocer en la presente memoria un recipiente que contiene una o varias enzimas, cebadores, adaptadores 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 dicha pared. Un recipiente puede ser transparente desde el punto de vista óptico. Un recipiente puede contener, por ejemplo, cualquiera o varios de una ligasa de ácido nucleico aislada, una polimerasa de ácido nucleico aislada, una ADN polimerasa aislada, una transcriptasa inversa aislada, una enzima de restricción aislada, un adaptador, un primer cebador complementario a una hebra complementaria de una plantilla de ácido nucleico bicatenario de interés, o un segundo cebador complementario a una hebra complementaria de una plantilla de ácido nucleico bicatenario de interés, un colorante de ácido nucleico, o una sonda de ácido nucleico, tal y como se describe en otro lugar de la presente memoria. El contenido de un recipiente puede estar en comunicación fluidica. En algunas realizaciones, un recipiente puede además contener una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal. 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 un segundo cebadores, y los diferentes conjuntos de cebadores son complementarios a diferentes ácidos nucleicos diana.

Dos o más reactantes útiles para un método dado a conocer en la presente memoria se pueden envasar y dar a conocer como un kit. Por ejemplo, un kit puede incluir cualesquiera dos o más de: una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal, un adaptador, un primer cebador complementario a una hebra complementaria de una plantilla de ácido nucleico bicatenario de interés, un segundo cebador complementario a una hebra complementaria de una plantilla de ácido nucleico bicatenario de interés, una ligasa, una ADN polimerasa, una enzima de restricción, tamponantes, un colorante de ácidos nucleicos, una sonda de ácido nucleico, una transcriptasa inversa, o dNTP, tal y como se describe en otro lugar de la presente memoria. Dentro del kit, los 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.

Los diferentes métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico diana 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. Los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria para amplificación se pueden utilizar, por ejemplo, para el aislamiento y la clonación de 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 diana puede ser de cualquier tipo, entre ellos ADN o ARN monocatenario o bicatenario (p. ej., ARNm). Un ácido nucleico diana puede ser de cualquier tipo o función (p. ej., una secuencia codificante de proteína, una secuencia reguladora, un intrón, etc.). Un ácido nucleico diana 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 diana de ácido nucleico monocatenario se convierta en una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal mediante los métodos descritos en la presente memoria o, si no, los conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, un método o una composición dados a conocer en la presente memoria se pueden utilizar para detectar la cantidad de un ácido nucleico diana en una muestra (que incluye la presencia o ausencia de la diana) para medir la cantidad de un producto de amplificación de una diana formado 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

datos 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 diana 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.

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 diana diferentes en el mismo recipiente de reacción. Típicamente, para cada ácido nucleico diana 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 diana, o es un complemento de la misma. La amplificación de los diferentes ácidos nucleicos diana en el mismo recipiente se puede seguir, por ejemplo, mediante el uso de sondas de ácido nucleico que tienen especificidad por las secuencias a detectar en los diferentes ácidos nucleicos diana y por diferentes fluoróforos.

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 diana (p. ej., en el caso de una mutación o SNP). Por ejemplo, se puede seleccionar un primer o segundo cebador para que se fije selectivamente a una región en un ácido nucleico diana que incluye, o sea 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 diana. Por ejemplo, si un primer cebador se diseña para que tenga una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia del ácido nucleico diana que incluye un nucleótido de interés concreto (p. ej., una mutación), la amplificación satisfactoria del ácido nucleico diana con el cebador seleccionado a partir de una muestra puede indicar que la muestra contiene un ácido nucleico diana 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 diana puede contener un nucleótido crítico en el extremo 3' del cebador (a saber, un nucleótido que corresponde a la misma posición de un nucleótido de interés del ácido nucleico diana). 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 diana. Si el nucleótido del extremo 3' del cebador no se hibrida con un nucleótido en el ácido nucleico diana (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. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un cebador que tiene el nucleótido del extremo 3' que se corresponde con un nucleótido de interés puede ser útil para determinar la presencia o ausencia de un nucleótido concreto en un ácido nucleico diana. En tales realizaciones, en algunas situaciones, el nucleótido crítico del extremo 3' del cebador se puede seleccionar para que sea complementario al nucleótido de interés en el ácido nucleico diana, 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 diana. El nucleótido de interés puede representar, por ejemplo, una forma de tipo silvestre, una forma mutante o un polimorfismo de un ácido nucleico diana.

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 fluidos. En algunos casos, la muestra puede ser una muestra de fluido corporal de un sujeto. La muestra puede incluir uno o varios componentes fluidos. 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 fluido 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 procedentes 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 linfáticos, líquidos de cavidades, esputo, pus, microbiota, meconio, leche de mama u otras excreciones. La muestra puede obtenerse de un animal o de un humano. Las muestras pueden ser de una planta, de un microorganismo (p. ej., virus, bacterias), o de otro material biológico.

En algunas realizaciones, los métodos y las composiciones dados a conocer en la presente memoria se pueden llevar a cabo o utilizarse en las localizaciones de los puntos de servicio (p. ej., casa o trabajo de un 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 una bacteria (p. ej., estreptococo).

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

ser fáciles de incorporar y utilizar 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 con una muestra. Un dispositivo puede ser útil para obtener datos de una muestra. Un dispositivo puede ser útil para transmitir los datos obtenidos de una muestra. Un dispositivo puede ser útil para desechar una muestra después del procesamiento o del ensayo de una muestra.

Un dispositivo puede ser parte de un sistema, uno de cuyos componentes 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 varios reactantes, tal y como se describe en la presente memoria. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que obtenga los datos de una muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que transmita los datos obtenidos de una muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que analice los datos de una muestra. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que se comunique con otro dispositivo, o con un laboratorio, o con un individuo afiliado a un laboratorio, para que analice los datos obtenidos de una muestra.

Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para ser colocado dentro de un sujeto o en su superficie. Un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que acepte 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.

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 que acepte una muestra.

Un cartucho puede incluir una muestra y puede incluir reactantes para ser utilizados en el procesamiento o análisis de una muestra, material desechable 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 fluidica continua desde el cartucho al dispositivo. Tal transferencia de muestra o reactante se puede llevar a cabo sin suministrar una vía fluidica continua 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 transfiera la punta, con la muestra, el reactante, o la alícuota del mismo contenida 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 pueden 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, el suministro, el procesamiento y/o el transporte de un fluido, una disolución de reactantes secos, mediante la mezcla de reactantes líquidos y/o secos con un líquido, así como la recogida, el suministro, 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 ellos) 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 los 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 que se halla de una punta. Una pipeta puede 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 reactantes que no están en forma líquida. Una punta de pipeta también puede facilitar la mezcla, mediante la administración medida de numerosos fluidos de manera simultánea o secuencial, tal como en las reacciones del sustrato de 2 partes.

El sistema de manipulación de líquidos puede incluir una o varias unidades aisladas desde el punto de vista fluido 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 fluido 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 fluido 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 fluido 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 fluido 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.

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 uno o varios 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, preparación o acciones o etapas del ensayo de las muestras se realizan en un único dispositivo. En las realizaciones, todo el procesamiento, preparación o 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 único 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 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.

5 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 fluido 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 1 000 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 en 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.

30 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 lleve a cabo numerosos ensayos con una única muestra. En las realizaciones, un dispositivo de procesamiento de muestras se puede configurar para que lleve a cabo 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 1 000 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.

55 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 relacionadas con 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 diana) 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 las mismas. 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.

Un dispositivo puede ser capaz de llevar a cabo todas las etapas integradas (p. ej., etapas o acciones realizadas en un único dispositivo) en un breve periodo de tiempo. Un dispositivo puede ser capaz de llevar a cabo todas las etapas integradas con 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 desecho, o para que deseche una muestra, tal como una muestra biológica, después del procesamiento o del ensayo de una muestra.

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.

Un dispositivo de procesamiento de muestras puede suministrar los datos concernientes a una muestra a, p. ej., a un profesional de asistencia sanitaria, a 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.

5 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 que 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.

El documento descriptivo y la descripción de los ejemplos de reactivos, ensayos, métodos, kits, dispositivos y sistemas que se pueden utilizar o se utilizan con los métodos, composiciones u otros reactivos descritos en la presente memoria se pueden encontrar, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. n.º 8 088 593; patente de los EE.UU. n.º 8 380 541; solicitud de patente de los EE. UU. con número de serie 13/769 798, registrada el 18 de febrero de 2013; solicitud de patente de los EE. UU. con número de serie 13/769 779, registrada el 18 de febrero de 2013; solicitud de patente de los EE. UU. con número de serie 13/244 947, registrada el 26 de septiembre de 2011; PCT/US2012/57155, registrada el 25 de septiembre de 2012; solicitud de patente los EE. UU. con número de serie 13/244 946, registrada el 26 de septiembre de 2011; solicitud de patente de los EE. UU. 13/244 949, registrada el 26 de septiembre de 2011; y solicitud de patente de los EE. UU. con número de serie 61/673 245, registrada el 26 de septiembre de 2011.

25 Ejemplos

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

Ejemplo 1: Amplificación de un ácido nucleico bicatenario lineal generado a partir de una molécula de ARN monocatenario diana

30 Una molécula de ARN monocatenario diana se convirtió a una plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal y se amplificó de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria. Se prepararon mezclas de reacción de 25 µl, cada una con: acetato de potasio a 50 mM, Tris-acetato a 20 mM, pH 7,9, acetato de magnesio a 10 mM, DTT a 1 mM, 5 µg de seroalbúmina bovina (BSA), molécula adaptadora "EE0162" a 0,1 µM [secuencia de nucleótidos (que incluye un fosfato en 5'): 5' GGGATCATCATCCAAGTACTTGGATGATGATCCC 3' (SEQ ID n.º 2)], 1,4 mM cada uno de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, el 0,5 % en volumen/volumen de polietilenglicol (PEG) 6 000, SYTO® 59 (Life Technologies) a 2 mM, 200 unidades de ADN ligasa de T4 (New England Biolabs), 25 unidades de la enzima de restricción Scal (New England Biolabs), 25 unidades de la ADN polimerasa de φ29 (New England Biolabs), 25 unidades de inhibidor murino de ARNasas (New England Biolabs), 0,1 unidades de la enzima de tipo transcriptasa inversa del AMV (New England Biolabs), cebador "RLX82" a 0,8 µM [secuencia de nucleótidos: 5' AATTCTCTTTAAATAAACCCA 3' (SEQ ID n.º 3), en donde los nucleótidos subrayados son nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (Exiqon)], cebador "RLX30" a 0,8 µM (secuencia de nucleótidos: 5' GACACAATCTGCATGAAATC 3' (SEQ ID n.º 4), en donde los nucleótidos subrayados son nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados), el trifosfato de ribonucleótido rATP a 1 mM y 0, 2 500, 25 000 o 250 000 copias de la molécula de ARN diana por microlitro. El ARN diana es una copia de ARN de una hebra de un gen de la proteína principal de la membrana externa (MOMP, por su nombre en inglés), TOR1, de *Chlamydophila pneumoniae*. El ARN se preparó a partir de la secuencia de ADN de TOR1 que viene a continuación (a saber, el ARN era complementario a la siguiente secuencia): 5'

AATTCTCTTTAAATAAACCCAAGGGCTATAAAGGCGTTGCTTTCCCTTTGCCAACAG
ATGCTGGCGTAGTAACAGCTGCTGGAACAAAGTCTGCGACCATCAATTATCATGAAT
GGCAGGTAGGAGCCTCTCTATCTTATAGACTCAACTCTTTAGTGCCATACATTGGAG
TCCAATGGTCTCGAGCAACTTTTGATGCTGATAACATCCGCATTGCTCAGCCAAAGC
TACCTACAGCTATTTAAACTTAACTGCATGGAACCCTTCTTTACTAGGGAGTGCCA
CAGCTGTTTCTTCATCTGATCAATTCTCAGATTTTCATGCAGATTGTGTC 3' (SEQ ID

n.º 5). La molécula adaptadora EE0162 tiene una secuencia de nucleótidos capaz de formar una estructura

ahorquillada, en la que el tallo contiene 15 pares de nucleótidos (Tm de 35 °C) y el bucle contiene 4 nucleótidos. La EE0162 contiene el componente monocatenario de una secuencia de enzima de restricción para la enzima de restricción Scal (5' AGTACT 3'); los 4 nucleótidos centrales de esta secuencia (GTAC) están localizados en la región del bucle del adaptador, y las A y T más externas de la secuencia están en la región del tallo (donde pueden emparejarse la una con la otra). Las mezclas de reacción se prepararon por triplicado para cada cantidad diferente de plantilla de ARN. Para cada reacción, el rATP y la plantilla de ARN de *Chlamydomophila* se añadieron a la mezcla al final, lo que sirvió de punto de inicio de la reacción. En la mezcla de reacción, el ARN se convirtió a una plantilla de ADN bicatenario lineal, que se amplificó de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria. Tras el inicio de las reacciones, las reacciones (ensayos) se vigilaron continuamente durante 120 min por la fluorescencia a la longitud de onda de excitación o de emisión de 620 o 650 nm en un instrumento CFX 96 Touch (Bio-Rad). Las reacciones se llevaron a cabo a 38,5 °C. En la figura 2 se muestran los resultados de las reacciones. El eje X muestra el tiempo (minutos) y el eje Y muestra las unidades de fluorescencia de referencia (UFR; 10³). Las reacciones que contienen diferentes cantidades de los nucleótidos del ARN diana están marcadas con diferentes letras: "A" = 250 000 copias, "B" = 25 000 copias, "C" = 2 500 copias, D = 0 copias de la molécula diana. Tal y como se muestra en la figura 2, las reacciones de las 250 000 copias de la diana tenían una señal por encima del fondo (6 UFR) hacia los aproximadamente 35 min, las reacciones de las 25 000 copias de la diana tenían una señal por encima del fondo hacia los aproximadamente 40 min, y las reacciones de las 2 500 copias de la diana tenían una señal por encima del fondo hacia los aproximadamente 60 min. El control de moléculas diana 0 no generó ninguna señal significativamente por encima del fondo al cabo de 120 min.

Ejemplo 2: Amplificación de una molécula de ADN bicatenario lineal diana: diferentes temperaturas

Se amplificó un ADN bicatenario lineal diana de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria. Se prepararon mezclas de reacción de 25 µl, cada una con: acetato de potasio a 50 mM, Tris-acetato a 20 mM, pH 7,9, acetato de magnesio a 10 mM, DTT a 1 mM, 5 µg de seroalbúmina bovina (BSA), molécula adaptadora "EE0162" a 0,05 µM [secuencia de nucleótidos (que incluye un fosfato en 5'):

5' GGGATCATCATCCAAGTACTTGGATGATGATCCC 3' (SEQ ID n.º 2)], 1,4 mM cada uno de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, SYBR® Green (Life Technologies) a 0,4×, 200 unidades de ADN ligasa de T4 (New England Biolabs), 18 unidades de la enzima de restricción Scal (New England Biolabs), 25 unidades de la ADN polimerasa de φ29 (New England Biolabs), cebador "RLX82" a 1 µM [secuencia de nucleótidos: 5' AATTCTCTTTAAATAAACCCA 3' (SEQ ID n.º 3), en donde los nucleótidos subrayados son nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (Exiqon)], cebador "RLX142" a 1 µM (secuencia de nucleótidos: 5' GACACAATCTGCATGAAATC 3' (SEQ ID n.º 6), en donde los nucleótidos subrayados son nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados), el trifosfato de ribonucleótido rATP a 1 mM y 1 000 000 de copias por microlitro de la molécula de ADN bicatenario lineal diana de TOR1 de *Chlamydomophila pneumoniae* (una hebra que tiene la secuencia dada a conocer más arriba en el ejemplo 1). Se prepararon 16 mezclas de reacción que tienen la composición recogida más arriba, y 2 de estas mezclas se incubaron a cada una de: 36,5, 36,8, 37,4, 38,3, 39,4, 40,3, 40,7 y 41,2 °C. Tras el inicio de las reacciones, los ensayos se vigilaron continuamente durante 100 min mediante la fluorescencia a la longitud de onda de excitación o emisión de 494 o 521 nm en un instrumento CFX Touch (Bio-Rad). En la figura 3 se muestran los resultados de las reacciones, en donde el gráfico para cada temperatura de reacción diferente es la media de las dos reacciones realizadas a cada temperatura. El eje X muestra el tiempo (minutos) y el eje Y muestra las unidades de fluorescencia de referencia. Tal y como se muestra en la figura 3, la temperatura óptima para la reacción con estos reactantes estaba entre 37,4 y 39,4 °C, con la actividad máxima a 38,3 °C.

Ejemplo 3: Amplificación de una molécula de ADN bicatenario lineal diana: diferentes cantidades de plantilla

Se amplificó un ADN bicatenario lineal diana de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria. Se prepararon mezclas de reacción de 25 µl, cada una con: acetato de potasio a 50 mM, Tris-acetato a 20 mM, pH 7,9, acetato de magnesio a 10 mM, DTT a 1 mM, 5 µg de seroalbúmina bovina (SAB), molécula adaptadora "EE0162" a 0,08 µM [secuencia de nucleótidos (que incluye un fosfato en 5'):

5' GGGATCATCATCCAAGTACTTGGATGATGATCCC 3' (SEQ ID n.º 2)], 1,4 mM cada uno de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, SYBR® Green (Life Technologies) a 0,4×, 200 unidades de ADN ligasa de T4 (New England Biolabs), 18 unidades de la enzima de restricción Scal (New England Biolabs), 25 unidades de la ADN polimerasa de φ29 (New England Biolabs), cebador "RLX82" a 1 µM [secuencia de nucleótidos: 5' AATTCTCTTTAAATAAACCCA 3' (SEQ ID n.º 3), en donde los nucleótidos subrayados son nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (Exiqon)], cebador "RLX30" a 1 µM (secuencia de nucleótidos: 5' GACACAATCTGCATGAAATC 3' (SEQ ID n.º 4), en donde los nucleótidos subrayados son nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados), el trifosfato de ribonucleótido rATP a 1 mM, polietilenglicol (PEG) 6000 al 0,5 % volumen/volumen, y 0, 1, 10, 100, 1 000 o 10 000 copias por microlitro de la molécula de ADN bicatenario lineal diana de TOR1 de *Chlamydomophila pneumoniae* (una hebra que tiene la secuencia dada a conocer más arriba en el ejemplo 1). Se prepararon 16 mezclas de reacción que tienen la composición recogida más arriba para cada una de las diferentes cantidades de la plantilla de ADN bicatenario lineal diana de *Chlamydomophila pneumoniae*. Tras el inicio de las reacciones, los análisis se vigilaron continuamente durante 120 min mediante la longitud de onda de excitación o de emisión de 494 o 521 nm en un instrumento CFX Touch (Bio-Rad). Las reacciones se incubaron a 38,5 °C. En la tabla 1 se muestran los resultados de los ensayos, y recoge el tiempo promedio para la inflexión ("Tinf prom") (a saber, la señal positiva) de los ensayos con las diferentes cantidades de ácido nucleico diana. El punto de

inflexión de los ensayos se determinó basándose en los análisis de las reacciones con el programa informático CFX Manager (Bio-Rad). Las reacciones con 10 copias o menos de la molécula de ácido nucleico diana no generaron un punto de inflexión positivo y no se recogen en la tabla. En la tabla 1 también se recoge la desviación estándar del tiempo de inflexión para los ensayos con las diferentes cantidades de ácido nucleico diana. Tal y como se muestra en la tabla 1, los métodos dados a conocer en la presente memoria pueden amplificar con eficacia un ácido nucleico diana en una reacción que contiene 100 copias por microlitro o menos de la molécula de ácido nucleico diana.

Tabla 1:

Número de copias	Tinf prom (min)	Desv. est.
10 000	39,16	2,47
1 000	51,02	4,92
100	77,16	17,15

Ejemplo 4: Amplificación de una molécula de ADN bicatenario lineal diana: diferentes adaptadores

Se amplificó un ADN bicatenario lineal diana de acuerdo con un método dado a conocer en la presente memoria. Se prepararon mezclas de reacción de 20 µl, cada una con: acetato de potasio a 50 mM, Tris-acetato a 20 mM, pH 7,9, acetato de magnesio a 10 mM, DTT a 1 mM, 4 µg de seroalbúmina bovina (BSA), 1,4 mM cada uno de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 400 unidades de ADN ligasa de T4 (New England Biolabs), 20 unidades de la enzima de restricción Scal (New England Biolabs), 28 unidades de la ADN polimerasa de φ29 (New England Biolabs), cebador "EE0146" a 0,8 µM [secuencia de nucleótidos (que incluye un fosfato en 5'): 5' AATCTCTTTAAATAAACCCA (SEQ ID n.º 3), en donde los nucleótidos subrayados son nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (Exiqon)], cebador "EE0147" a 0,8 µM [secuencia de nucleótidos: 5' GACACAATCTGCATGAAATC (SEQ ID n.º 7), en donde los nucleótidos subrayados son nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados (Exiqon)], el trifosfato de ribonucleótido rATP a 1 mM, molécula adaptadora a 0,5 µM seleccionada de: "RLX0007"/"RLX-7" (secuencia de nucleótidos: 5' GGGATCATCAGCCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTTAAAAAAAAATAGGCT GATGATCCC 3' (SEQ ID n.º 8)), "EE0159"/"159" (secuencia de nucleótidos: 5' GGGATCATCATCATAGTACTATGTGATGATGATCCC 3' (SEQ ID n.º 9)), "EE0161"/"161" (secuencia de nucleótidos: 5' GGGATCATCATCCATCAGTACTGATGGATGATGATCCC 3' (SEQ ID n.º 10)), "EE0162"/"162" (secuencia de nucleótidos: 5' GGGATCATCATCCAAGTACTTGGATGATGATCCC 3' (SEQ ID n.º 2)) y "EE0123"/"123" (secuencia de nucleótidos: 5' GGGATCATCAGCCTAGTCAGTCAGTCATTCATTTCAGTACTTCAGTCAGTTAGGCTGA TGATCCC 3' (SEQ ID n.º 11)) y, de manera optativa, 1 000 000 copias por microlitro de la molécula de ADN bicatenario lineal diana de TOR1 de *Chlamydomophila pneumoniae* (una hebra que tiene la secuencia dada a conocer más arriba en el ejemplo 1). La molécula adaptadora RLX-7 tiene una secuencia de nucleótidos capaz de formar una estructura ahorquillada, en donde el tallo contiene 15 pares de nucleótidos y el bucle contiene 34 nucleótidos. La molécula adaptadora 159 tiene una secuencia de nucleótidos capaz de formar una estructura ahorquillada, en donde el tallo contiene 17 pares de nucleótidos (Tm de 37 °C) y el bucle contiene 4 nucleótidos. La molécula adaptadora 161 tiene una secuencia de nucleótidos capaz de formar una estructura ahorquillada, en donde el tallo contiene 17 pares de nucleótidos (Tm de 42 °C) y el bucle contiene 4 nucleótidos. La molécula adaptadora 162 tiene una secuencia de nucleótidos capaz de formar una estructura ahorquillada, en donde el tallo contiene 15 pares de nucleótidos (Tm de 35 °C) y el bucle contiene 4 nucleótidos. La molécula adaptadora 123 tiene una secuencia de nucleótidos capaz de formar una estructura ahorquillada, en donde el tallo contiene 15 pares de nucleótidos y el bucle contiene 35 nucleótidos. Para cada uno de los diferentes adaptadores se preparó una reacción con y sin moléculas de la plantilla; para el adaptador RLX-7 se prepararon dos reacciones con y sin las moléculas de plantilla. Las reacciones se incubaron a 37 °C o 32 °C durante 45 min (37 °C: reacciones con los adaptadores RLX-7, 159, 161 y 162; 32 °C: reacciones con los adaptadores RLX-7 y 123) y a continuación se inactivaron con calor a 80 °C durante veinte minutos. A continuación, cada mezcla de reacción se cargó en un gel de agarosa, se separó en el gel y se tiñó con SYBR® Gold (Life Technologies). Tal y como se indica en el gel, las reacciones con los adaptadores 159, 161 y 162 amplificaban con eficacia la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal. Los estándares del marcador se muestran en los lados izquierdo y derecho del gel. Las diferentes bandas en las reacciones con los adaptadores 159, 161 y 162 muestran productos de reacción que contienen 1, 2, 3, o más copias de la plantilla de TOR1.

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

Aunque en la presente memoria se han mostrado y descrito las realizaciones preferidas de la presente invención, resultará obvio para los expertos en la técnica que tales realizaciones se dan a conocer solo a modo de ejemplo. Se

debe saber que, tal y como se utiliza en la descripción de la presente memoria y a lo largo de las reivindicaciones que siguen, el significado de “un”, “uno” y “el” incluye la referencia plural a menos que el contexto dictamine lo contrario con claridad. Por ejemplo, una referencia a “un ensayo” puede referirse a un único ensayo o a numerosos ensayos. De igual modo, tal y como se utiliza en la descripción en la presente memoria y a lo largo de las reivindicaciones que siguen, el significado de “en” incluye “en” y “sobre” a menos que el contexto claramente dictamine otra cosa. Tal y como se utiliza en la descripción de la presente memoria y a lo largo de las reivindicaciones que vienen a continuación, un primer objeto que se describe que contiene “al menos una porción” de un segundo objeto puede contener la cantidad total de / el segundo objeto completo. Tal y como se utiliza en la descripción de la presente memoria y a lo largo de las reivindicaciones que vienen a continuación, los términos “comprender”, “incluir” y “contener” y los tiempos relacionados son inclusivos y abiertos, y no excluyen otros elementos o etapas del método que no se mencionan. De igual forma, la presencia de palabras y frases de ampliación, tales como “uno o varios”, “al menos”, “pero sin limitarse a” u otras frases parecidas en algunos ejemplos no se debería leer que significa que se pretende o requiere el caso más restringido en los casos en donde tales frases de ampliación pueden estar ausentes. Finalmente, tal y como se utiliza en la descripción de la presente memoria y a lo largo de las reivindicaciones que vienen a continuación, el significado de “o” incluye tanto el conjuntivo como el disyuntivo, a menos que el contexto dicte expresamente otra cosa. Así pues, el término “o” incluye “y/o” a menos que el contexto dicte expresamente otra cosa.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

MGHHHHHHHHSSGHIEGRASADGPYLQILEQPKQRGFRFRYVCEGPSHGGLPGASSE
 KNKKSYPQVKICNYVGPAAKVVQLVTNGKNIHLHAHSLVGKHCEDGICTVTAGPKDMV
 VGFANLGHVTKKKVFETLEARMTEACIRGYNPGLLVHPDLAYLQAEGGGDRQLGDR
 EKELIRQAALQQTKEMDLSVVRMLMFTAFLPDSTGSFTRRLEPVVSDAIYDSKAPNASNL
 KIVRMDRTAGCVTGGEEIYLLCDKVQKDDIQIRFYEEEENGWVWEGFGDFSPDVRHQF
 AIVFKTPKYKDINITKPASVQVLRKSDLETSEPKPFLYPEIKDKEEVQRKRQKGSST
 SGGGSGGGMTEEARKNVNLRLDIRYHNYRYVVLADPEISDAEYDRLRELKELEERF
 PELKSPDSPTLQVGARPLEATFRPVRHPTRMYSLDNFNLDELKAFEERIERALGRKGP
 AYTVEHKVDGLSVNLYEEGVLVYGATRGDGEVGEVETQNLTIPTIPRRLKGVPERLE
 VRGEVYMPIEAFRLNLEEERGERIFKNPRNAAAGSLRQKDPRITAKRGLRATFYALGL
 GLEEVEREGVATQFALLHWLKEKGFVVEHGYARAVGAEGVEAVYQDWLKKRRALPFE
 ADGVVVKLDELALWRELGYTARAPRFAIAYKFPAAEEKETRLLDVVFQVGRTRVTPVG
 ILEPVFLEGSEVSRVTLHNESYIEELDIRIGDWVLVHKAGGVIPVLRVVKERRTGEERPIR
 WPETCPECGRHLLKEGKVHRCNPPLCPAKRFEAIRHFASRKAMDIQGLGEKLIERLLEK
 GLVKDVADLYRLRKEDLVGLERMGEKSAQNLLRQIEESKKRGLERLLYALGLPGVGEV
 LARNLAARFGNMDRLLLEASLEELLEVEEVGELTARAIETLKDPAFRDLVRRLEAGVE
 MEAKEKGGEALKGLTFVITGELSRPREEVKALLRRLGAKVTDSVSRKTSYLVVGENPGS
 KLEKARALGVPTLTEEELYRLLEARTGKKAEEELV

SEQ ID NO: 2:

GGGATCATCATCCAAGTACTTGGATGATGATCCC

SEQ ID NO: 3

AATTCTCTTTAAATAAACCCA

SEQ ID NO: 4

GACACAATCTGCATGAAATC

ES 2 738 602 T3

SEQ ID NO: 5

AATTCTCTTTAAATAAACCCAAGGGCTATAAAGGCGTTGCTTTCCCTTTGCCAACAG
ATGCTGGCGTAGTAACAGCTGCTGGAACAAAGTCTGCGACCATCAATTATCATGAAT
GGCAGGTAGGAGCCTCTCTATCTTATAGACTCAACTCTTTAGTGCCATACATTGGAG
TCCAATGGTCTCGAGCAACTTTTGATGCTGATAACATCCGCATTGCTCAGCCAAAGC
TACCTACAGCTATTTTAAACTTAACTGCATGGAACCCTTCTTTACTAGGGAGTGCCA
CAGCTGTTTCTTCATCTGATCAATTCTCAGATTTTCATGCAGATTGTGTC

5 SEQ ID NO: 6:

GACACAATCTGCATGAAATC

SEQ ID NO: 7:

10 GACACAATCTGCATGAAATC

SEQ ID NO: 8:

15 GGGATCATCAGCCTAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTTAAAAAAAAATAGGCT
GATGATCCC

SEQ ID NO: 9:

20 GGGATCATCATCACATAGTACTATGTGATGATGATCCC

SEQ ID NO: 10:

GGGATCATCATCCATCAGTACTGATGGATGATGATCCC

25 SEQ ID NO: 11:

GGGATCATCAGCCTAGTCAGTCAGTCATTCATTCAGTACTTCAGTCAGTTAGGCTGA
TGATCCC

REIVINDICACIONES

1. Un método para amplificar una plantilla de ácido nucleico que comprende:

(A) la transcripción inversa de un ARN monocatenario para producir un ácido nucleico bicatenario lineal que comprende dos hebras complementarias independientes:

5 (B) la formación de una hebra circular que comprende un primer adaptador polinucleotídico y un segundo adaptador polinucleotídico y las dos hebras complementarias, en donde cada adaptador comprende una sola hebra de ácido nucleico que contiene una secuencia de nucleótidos de una hebra de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción;

10 (C) la hibridación de la hebra circular de la etapa (B) con un primer cebador polinucleotídico y la síntesis de un producto de extensión del primer cebador;

(D) la hibridación del producto de extensión de primer cebador de la etapa (C) con un segundo cebador polinucleotídico y la síntesis de un producto de extensión del segundo cebador, en donde el producto de extensión del segundo cebador es complementario al producto de extensión del primer cebador;

15 (E) la producción de un nuevo ácido nucleico bicatenario que comprende al menos una porción del producto de extensión del primer cebador y al menos una porción del producto de extensión del segundo cebador y una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción que corresponde a la secuencia de la una hebra de la secuencia de reconocimiento de enzima de restricción de la etapa (B);

(F) la escisión del nuevo ácido nucleico bicatenario de la etapa (E) con una enzima de restricción; y

20 (G) la formación de dos o más ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños, al menos dos de los cuales comprenden al menos una porción de una copia del ácido nucleico bicatenario lineal de la etapa (A), con lo que se amplifica el ácido nucleico bicatenario lineal;

en donde las etapas (A) a (G) se realizan en una mezcla de reacción en condiciones isotérmicas, y en donde la mezcla de reacción comprende:

(i) el ARN monocatenario;

25 (ii) una transcriptasa inversa;

(iii) el primer adaptador polinucleotídico y el segundo adaptador polinucleotídico;

(iv) el primer cebador polinucleotídico y el segundo cebador polinucleotídico;

(v) una ligasa;

(vi) una polimerasa; y

30 (vii) la enzima de restricción.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende la repetición de las etapas (A) a (G) durante uno o más ciclos adicionales, con el uso de un ácido nucleico bicatenario más corto de la etapa (G) de un primer ciclo como el ácido nucleico bicatenario lineal de la etapa (A) de un segundo ciclo.

35 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde al menos dos de los ácidos nucleicos bicatenarios más pequeños contienen una copia completa del ácido nucleico bicatenario lineal de la etapa (A).

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde al menos uno del primer cebador oligonucleotídico o del segundo cebador oligonucleotídico es complementario a al menos uno de los adaptadores.

40 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los adaptadores contienen componentes monocatenarios de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción que corresponde a la misma enzima de restricción.

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los adaptadores contienen componentes monocatenarios de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción que corresponde a diferentes enzimas de restricción.

45 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde al menos uno de los adaptadores contiene una secuencia de nucleótidos que comprende una región 5', una región central y una región 3', en donde la región 5' y la región 3' de la secuencia son complementarias la una a la otra y forman el tallo de una estructura ahorquillada, y en donde la parte más externa del tallo contiene un extremo romo.

8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde al menos uno de los adaptadores contiene una secuencia de nucleótidos que comprende una región 5', una región central y una región 3', en donde la región 5' y la región 3' de la secuencia son complementarias la una a la otra y forman el tallo de una estructura ahorquillada, y en donde la parte más externa del tallo contiene un extremo cohesivo.
- 5 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde al menos uno de los adaptadores contiene una secuencia de nucleótidos que comprende una región 5', una región central y una región 3', en donde la región 5' y la región 3' de la secuencia son complementarias la una a la otra y forman el tallo de una estructura ahorquillada, y en donde la parte más externa del tallo contiene la mitad de una secuencia de reconocimiento bicatenaria completa de enzima de restricción.
- 10 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde todas las etapas del método se llevan a cabo a una temperatura de no más de 70 °C.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde todas las etapas del método se llevan a cabo a una temperatura de no más de 60 °C.
- 15 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde todas las etapas del método se llevan a cabo a una temperatura de no más de 50 °C.
13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde todas las etapas del método se llevan a cabo a una temperatura de no más de 40 °C.
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la plantilla de ácido nucleico bicatenario lineal se amplifica al menos 10 veces en menos de 60 min desde el inicio del método.

20

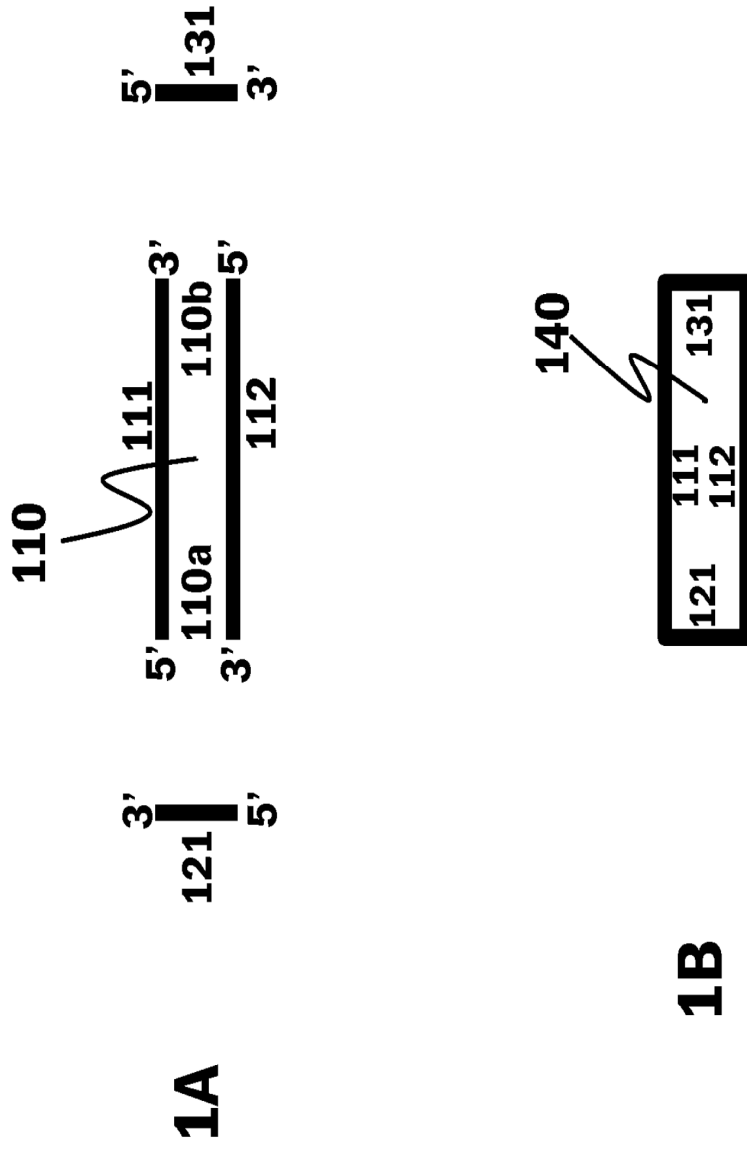
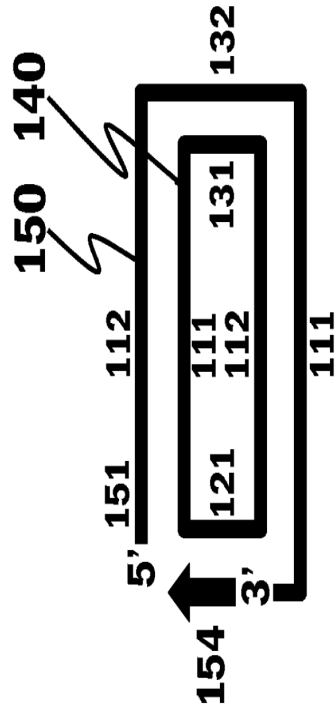


Fig. 1



1C



1D

Fig. 1 - Continuación

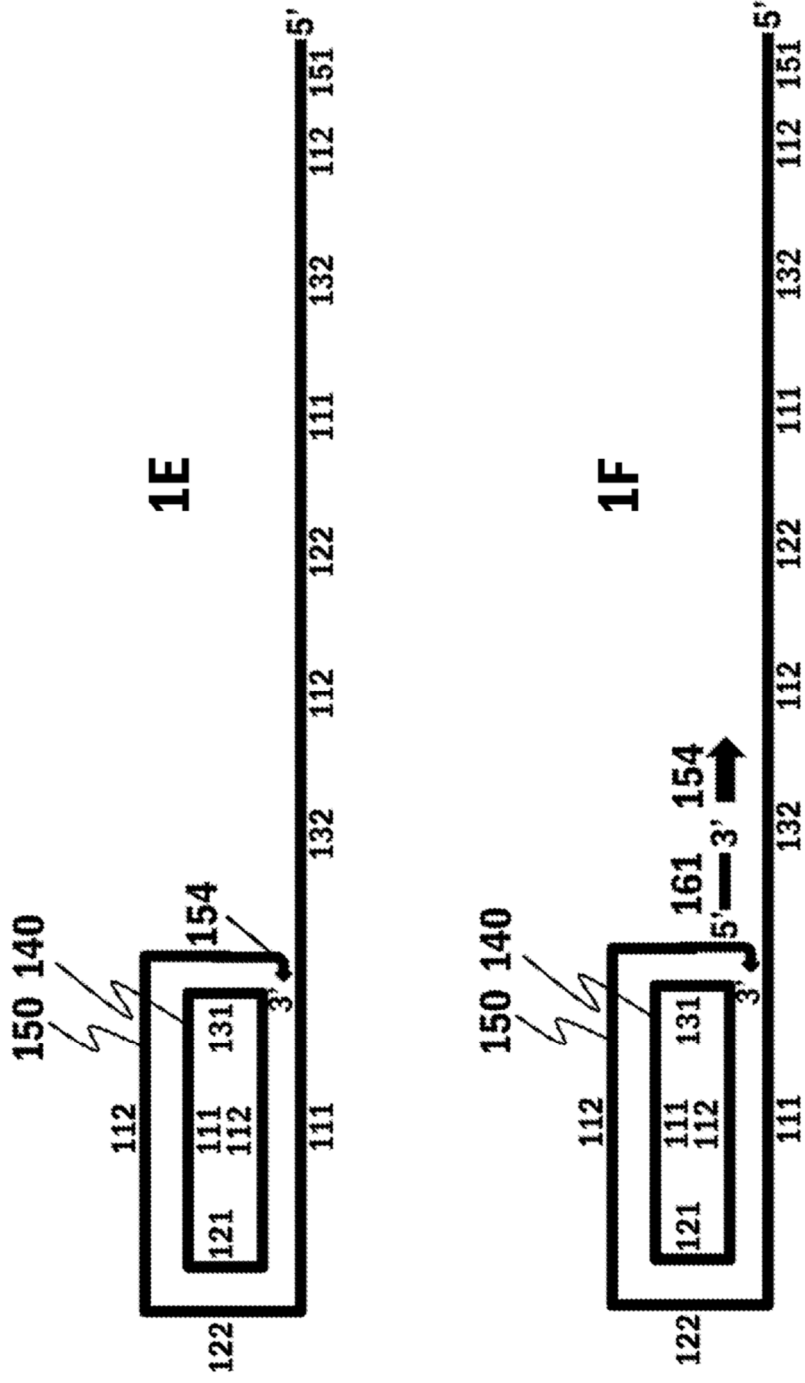


Fig. 1 - Continuación

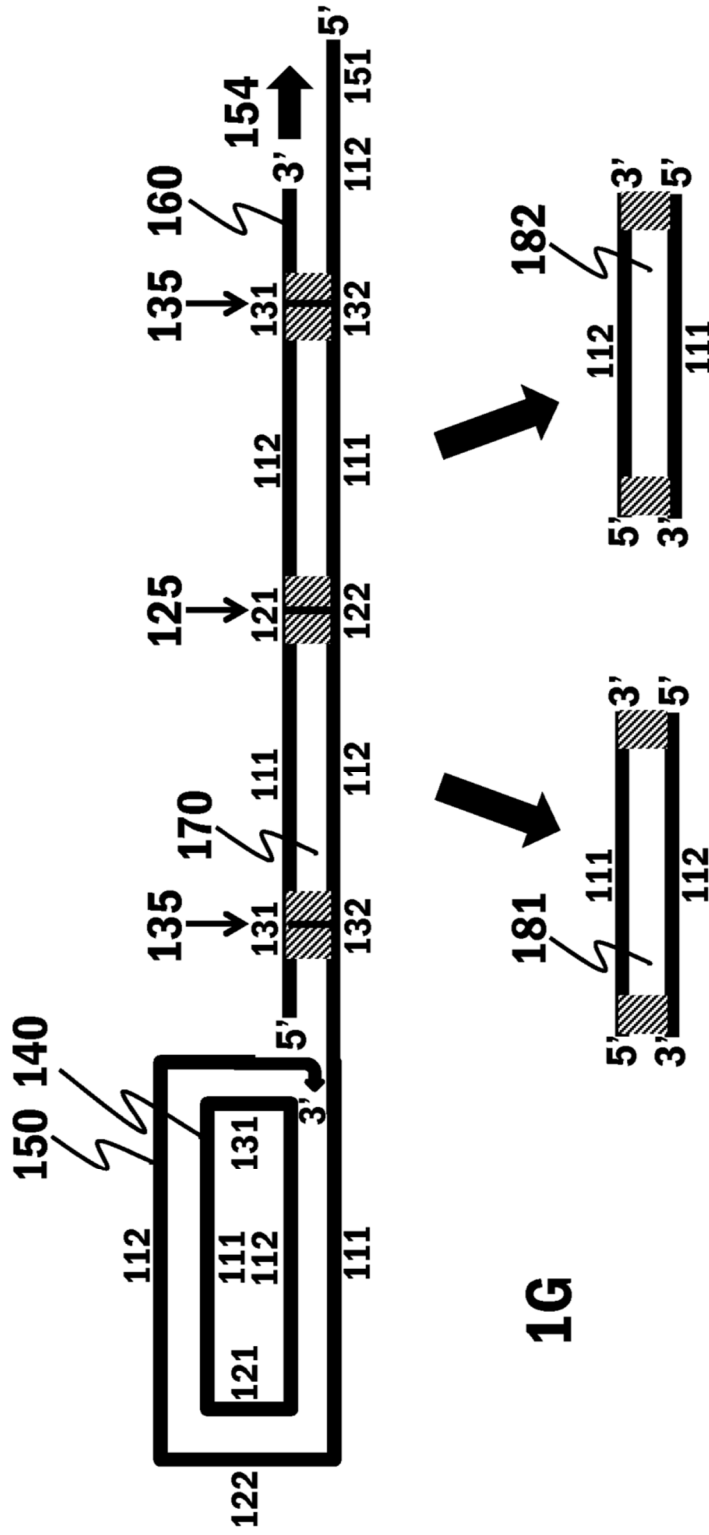


Fig. 1 - Continuación

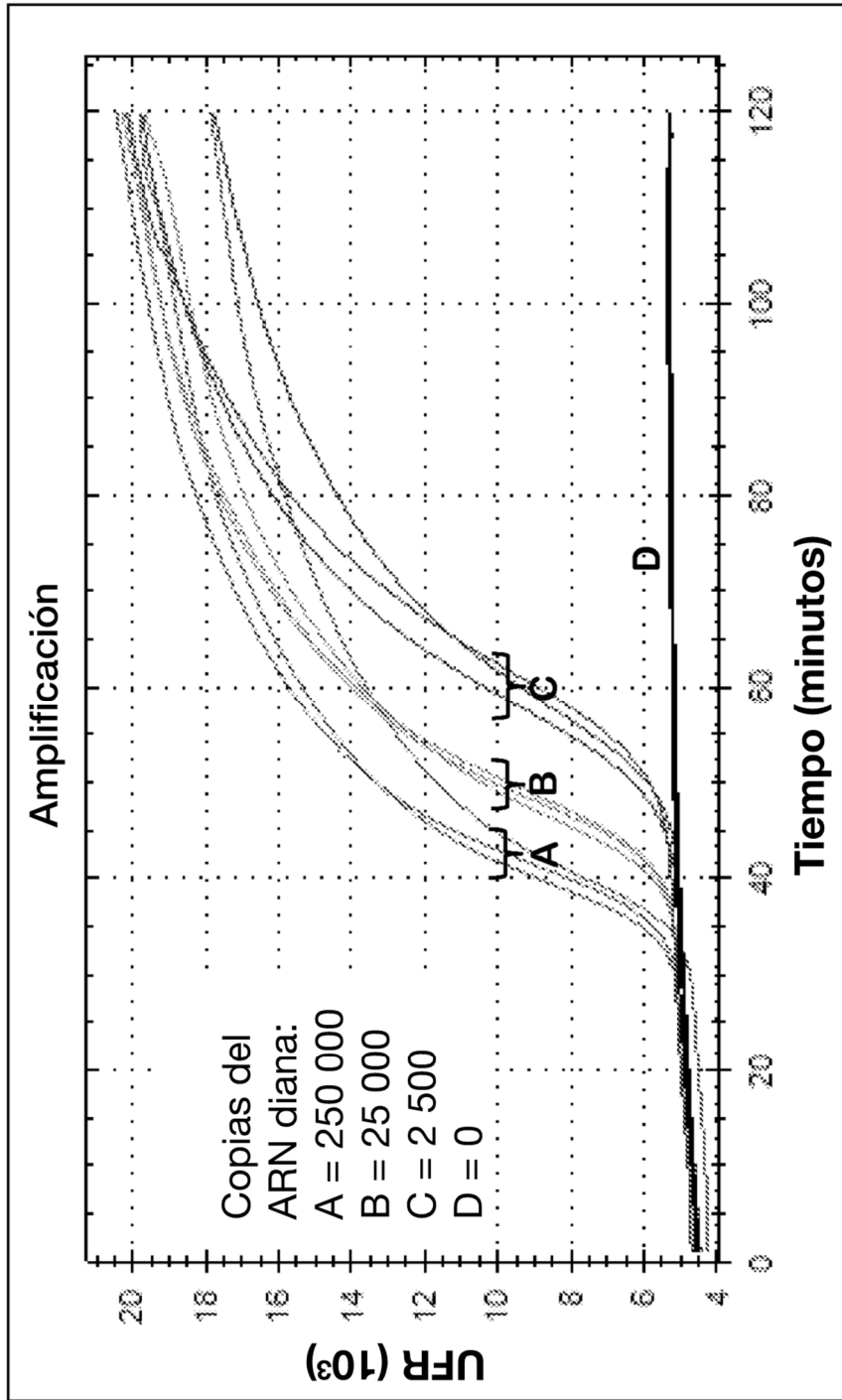


Fig. 2

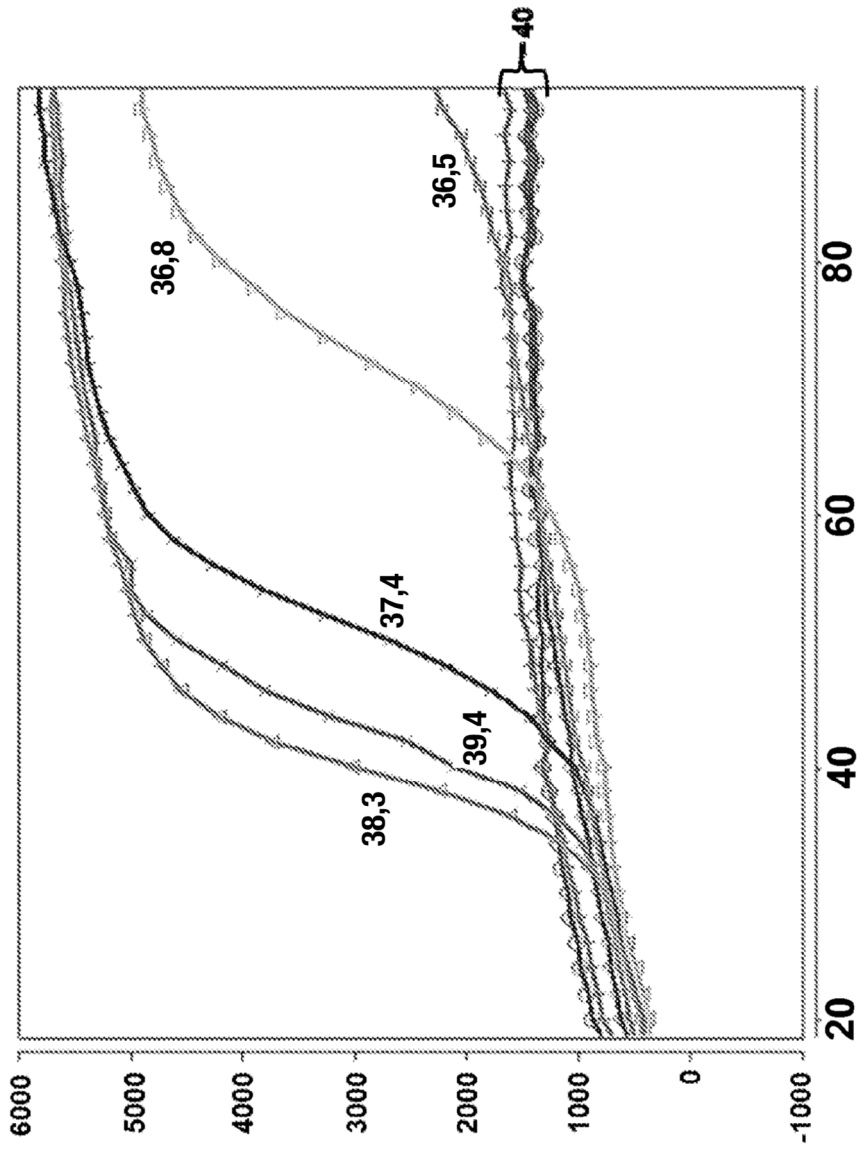


Fig. 3

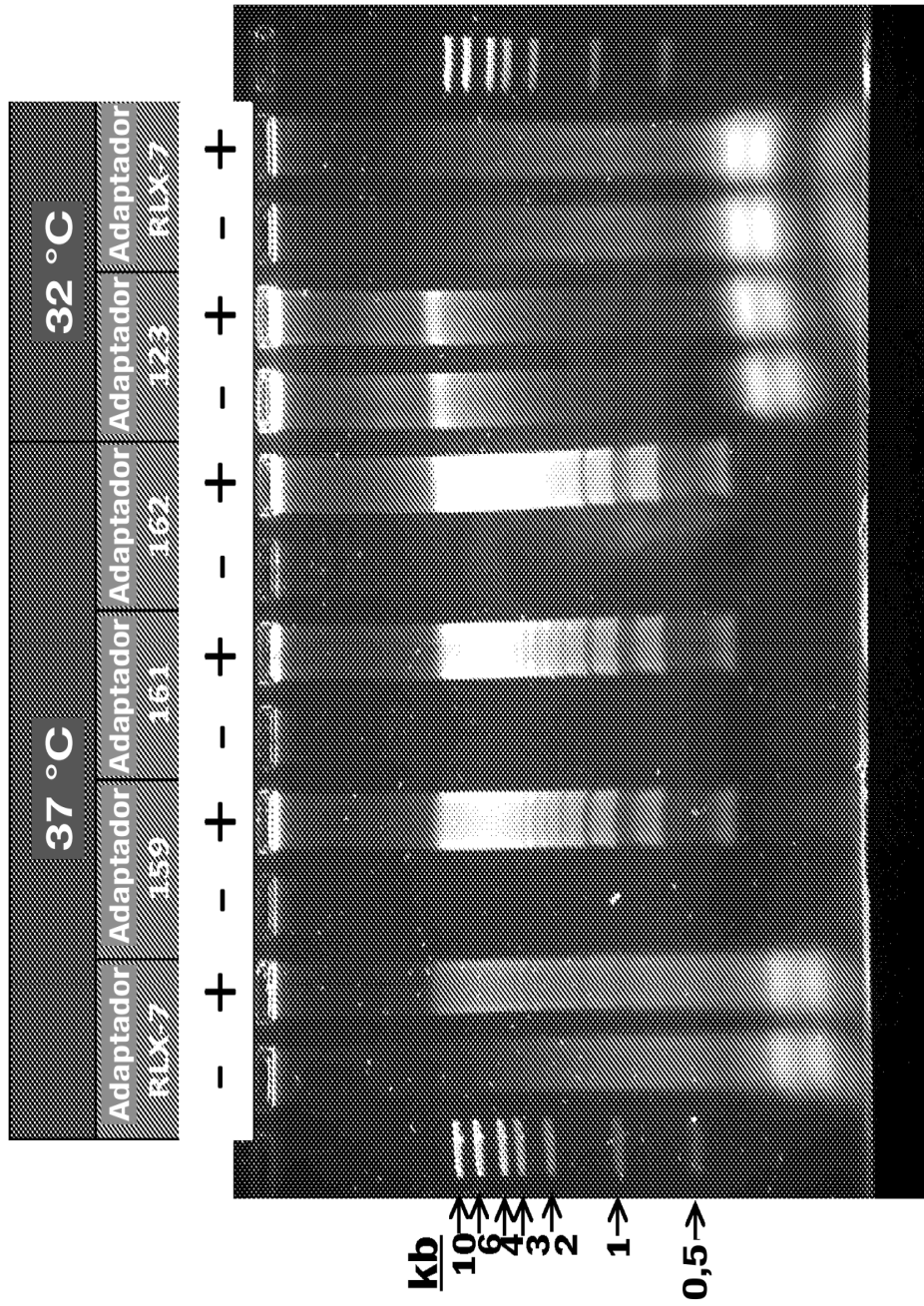


Fig. 4