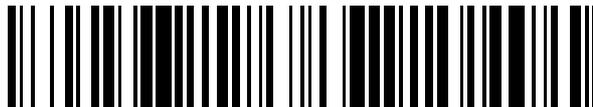


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 638**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6848** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.06.2013 PCT/US2013/046010**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13188839**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2013 E 13731243 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 2861757**

54 Título: **Nuevas composiciones, métodos y kits para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

30 Prioridad:

**14.06.2012 US 201261659587 P**

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

**02.07.2020**

73 Titular/es:

**LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION (100.0%)  
5823 Newton Drive  
Carlsbad, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

**BORNARTH, CAROLE;  
LAU, MICHAEL y  
STEVENS, JUNKO**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

ES 2 770 638 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

Nuevas composiciones, métodos y kits para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

## 5 Campo

Esta descripción se refiere generalmente a composiciones, métodos y kits para amplificar ácidos nucleicos al tiempo que se reduce la amplificación no específica y/o los productos de amplificación no deseados.

## 10 Antecedentes

Si bien la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las técnicas relacionadas son muy útiles para una variedad de aplicaciones, la amplificación de ácidos nucleicos que no son diana debido a reacciones secundarias no deseadas puede presentar un problema significativo. Dichas reacciones secundarias pueden producirse como resultado del cebado incorrecto de ácidos nucleicos que no son diana y/o la oligomerización de cebadores, a veces denominada formación de dímeros de cebadores, y la posterior amplificación de estos artefactos de cebado. Esto es especialmente cierto en aplicaciones en las que la PCR se lleva a cabo con el uso de una mezcla de ácidos nucleicos con ácidos nucleicos de fondo significativos mientras que el ácido nucleico diana está presente en un número bajo de copias (ver, *por ejemplo*, Chou y otros, Nucl. Acids Res. 20:1717 (1992)). La generación de productos amplificados de manera no específica se ha atribuido al menos en parte a la actividad de la ADN polimerasa a temperatura ambiente que extiende los cebadores que se asocian de manera no específica (ver, *por ejemplo*, Chou y otros, *más arriba*; Li y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4580 (1990)). En consecuencia, la inhibición de la actividad de la ADN polimerasa a temperatura ambiente es beneficiosa para controlar la generación de amplicones secundarios.

25 Se han descrito varias técnicas de "arranque en caliente" que, según se informa, disminuyen la formación de productos de amplificación secundarios no deseados. De acuerdo con ciertas técnicas de "arranque en caliente manual", un componente crítico para la actividad de la ADN polimerasa (*por ejemplo*, iones divalentes y/o la propia ADN polimerasa) no se añade a la mezcla de reacción hasta que la temperatura de la mezcla sea lo suficientemente alta como para evitar la asociación no específica de los cebadores (ver, *por ejemplo*, Chou y otros, *más arriba*; D'Aquila y otros, Nucl. Acids Res. 19:3749 (1991)). Las técnicas menos laboriosas emplean la separación física o la inactivación reversible de al menos un componente de la reacción de amplificación. Por ejemplo, el magnesio o la ADN polimerasa pueden secuestrarse en una microesfera de cera, que se funde a medida que aumenta la temperatura de reacción, para liberar el componente secuestrado solo a la temperatura elevada. De acuerdo con otras técnicas, la ADN polimerasa se inactiva o modifica de forma reversible, por ejemplo, mediante una modificación química reversible de la ADN polimerasa, la unión de un anticuerpo a la ADN polimerasa o moléculas oligonucleotídicas que se unen a la ADN polimerasa (ver, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núm. 5,677,152 y 5,338,671, y Dang y otros, J. Mol. Biol. 264:268 (1996)). A una temperatura de reacción elevada, la modificación química se invierte, o la molécula de anticuerpo o la molécula oligonucleotídica se desnaturaliza, para liberar una ADN polimerasa funcional. Sin embargo, algunas de estas técnicas parecen ser subóptimas, dado que puede detectarse cierta actividad de la ADN polimerasa a temperaturas de reacción más bajas a pesar de la inactivación, o requieren una exposición prolongada de la mezcla de reacción a altas temperaturas para activar completamente la ADN polimerasa, lo que puede dar como resultado la inactivación permanente de algunos componentes de la mezcla de reacción. La patente de Estados Unidos núm. 8,129,150 describe el uso de diferentes polimerasas, cada una inactivada por un mecanismo diferente, en combinación. Paul y otros Methods in Molecular Biology 630:301-318 (2010) resume las estrategias de arranque en caliente disponibles.

45 Ciertas técnicas de amplificación de ácidos nucleicos usadas actualmente incluyen una etapa para detectar y/o cuantificar los productos de amplificación que comprende un colorante de ácido nucleico, por ejemplo, pero sin limitarse a, SYBR® Green I (Life Technologies, Carlsbad, CA), que incluye ciertas técnicas de detección en tiempo real y/o de punto final (ver, *por ejemplo*, Ririe y otros, Anal. Biochem. 245:154 (1997)). Normalmente, el colorante de ácido nucleico se asocia con segmentos bicatenarios de los productos de amplificación y/o los dúplex de cebador y molde y emite una señal fluorescente detectable a una longitud de onda que es característica del colorante de ácido nucleico particular. Ciertos métodos de amplificación comprenden una etapa de detección para evaluar la pureza del(de los) producto(s) de amplificación asociado(s) con el colorante de ácido nucleico, por ejemplo, pero sin limitarse a, el análisis de la curva de disociación después de la PCR, también conocido como análisis de la curva de fusión. Dado que la curva de fusión de un amplicón depende de su longitud y secuencia (entre otras cosas), generalmente los amplicones pueden distinguirse por sus curvas de fusión (ver, *por ejemplo*, Zhang y otros, Hepatology 36:723 (2002)). Una curva de disociación o fusión puede obtenerse durante ciertas reacciones de amplificación mediante la supervisión de la fluorescencia del colorante de ácido nucleico a medida que las temperaturas de reacción pasan la temperatura de fusión del(de los) amplicón(ones). La disociación de un amplicón bicatenario se observa como una disminución repentina de la fluorescencia a la longitud de onda de emisión característica del colorante de ácido nucleico. De acuerdo con ciertas técnicas de análisis de la curva de disociación, un producto de amplificación se clasifica como "puro" cuando la curva de fusión muestra una temperatura de fusión única y constante, que a veces se muestra gráficamente como un pico en un gráfico de la derivada negativa de la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura (-dF/dt vs. T). Por el contrario, la aparición de múltiples picos en dicha curva de disociación de una amplificación simple normalmente indica la presencia de productos de reacciones secundarias no deseadas. Cuando se emplean dichas técnicas de detección de productos de amplificación basadas en colorantes de ácido nucleico, a menudo es conveniente: 1) al menos disminuir y preferentemente eliminar la formación de

productos de reacciones secundarias no deseadas y 2) al menos disminuir y preferentemente eliminar los picos de fluorescencia resultantes de la desnaturalización de segmentos bicatenarios de otros ácidos nucleicos, *es decir*, que no son productos de amplificación (*por ejemplo*, dímeros de cebadores) y/o productos de amplificación no específicos (por ejemplo, debido a eventos de cebado incorrecto).

5 Ciertas técnicas de amplificación adicionales también pueden producir productos de amplificación no deseados debido, entre otras cosas, a la asociación no específica de cebadores, sondas de ligado, sondas de escisión, cebadores promotores, etcétera, y la actividad enzimática posterior a temperaturas subóptimas. Por ejemplo, mientras se combinan los componentes de reacción, a menudo a la temperatura del local, o mientras la composición de reacción se calienta hasta una temperatura de reacción deseada. Al menos algunas de estas técnicas pueden beneficiarse de una reducción en la fluorescencia de fondo. Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones y métodos que disminuyan y/o eliminen 1) la formación de productos de reacciones secundarias no deseadas y 2) la fluorescencia de fondo resultante de estos productos de reacciones secundarias no deseadas.

15 Breve descripción

Las presentes enseñanzas están dirigidas a composiciones, métodos y kits para amplificar ácidos nucleicos diana al tiempo que se reduce la amplificación no específica (*por ejemplo*, la fluorescencia) y los productos de amplificación no deseados, a veces denominados en la técnica amplicones secundarios o productos secundarios falsos.

20 En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden una polimerasa de ácido nucleico y una mezcla de reacción de arranque en caliente doble que inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico a una primera temperatura (*por ejemplo*, una temperatura <40 °C). La mezcla de reacción de arranque en caliente doble comprende al menos dos mecanismos de arranque en caliente diferentes que se usan para inhibir o 25 inhibir sustancialmente la actividad polimerasa de una polimerasa de ácido nucleico a una primera temperatura. Dichos mecanismos de arranque en caliente incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos o combinaciones de anticuerpos que bloquean la actividad de la ADN polimerasa a temperaturas más bajas, oligonucleótidos que bloquean la actividad de la ADN polimerasa a temperaturas más bajas, modificaciones químicas reversibles de la ADN polimerasa que se disocian a temperaturas elevadas, modificaciones de aminoácidos de la ADN polimerasa que proporcionan una reducción de la actividad a temperaturas más bajas, proteínas de fusión que incluyen dominios de unión al ADN hiperestables y topoisomerasa, ligandos dependientes de la temperatura que inhiben la ADN polimerasa, proteínas de unión a cadena simple que secuestran cebadores a temperaturas más bajas, cebadores modificados o dNTP modificados.

35 En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos durante periodos de tiempo prolongados en comparación con los mecanismos de arranque en caliente convencionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos durante al menos 24 horas a temperatura ambiente. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble disminuye la amplificación no específica y/o la formación de productos no 40 específicos en aproximadamente 20-100 % en comparación con una mezcla de reacción de arranque en caliente que solo tiene un mecanismo de arranque en caliente simple. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble disminuye la amplificación no específica y/o la formación de productos no específicos en aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 %. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en aproximadamente 2 a 4 veces en comparación con una mezcla de reacción que solo tiene un mecanismo de arranque en caliente simple. En ciertas 45 realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5 o 4 veces.

50 En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden una polimerasa de ácido nucleico termoestable y una mezcla de reacción de arranque en caliente doble que inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico a una temperatura menor que aproximadamente 40 °C y de manera que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble no inhiba sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico a una temperatura mayor que aproximadamente 40 °C. En ciertas realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico puede ser una ADN polimerasa dependiente de ADN o una ADN polimerasa dependiente de ARN. En ciertas 55 realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico puede ser termoestable.

60 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la actividad polimerasa de una polimerasa de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, estos métodos implican poner en contacto la polimerasa con una mezcla de reacción de arranque en caliente doble, donde la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico a una primera temperatura (*por ejemplo*, una temperatura <40 °C). La inhibición de la polimerasa puede ser reversible (*por ejemplo*, por calentamiento a una temperatura mayor que dicha primera temperatura, normalmente a una temperatura de al menos aproximadamente 40 °C). La mezcla de reacción de arranque en caliente doble comprende al menos dos mecanismos de arranque en caliente diferentes que se usan para inhibir o inhibir sustancialmente la actividad polimerasa de una polimerasa de ácido nucleico a una primera temperatura 65 (*por ejemplo*, temperatura ambiente). Dichos mecanismos de arranque en caliente incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos o combinaciones de anticuerpos que bloquean la actividad de la ADN polimerasa a temperaturas más bajas,

oligonucleótidos que bloquean la actividad de la ADN polimerasa a temperaturas más bajas, modificaciones químicas reversibles de la ADN polimerasa que se disocian a temperaturas elevadas, modificaciones de aminoácidos de la ADN polimerasa que proporcionan una reducción de la actividad a temperaturas más bajas, proteínas de fusión que incluyen dominios de unión al ADN hiperestables y topoisomerasa, ligandos dependientes de la temperatura que inhiben la ADN polimerasa, proteínas de unión a cadena simple que secuestran cebadores a temperaturas más bajas, cebadores modificados o dNTP modificados. En ciertas realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico puede ser una ADN polimerasa dependiente de ADN o una ADN polimerasa dependiente de ARN. En ciertas realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico puede ser termoestable.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para sintetizar una molécula de ácido nucleico. Dichos métodos implican poner en contacto un ácido nucleico molde con una composición que comprende una polimerasa de ácido nucleico termoestable, una mezcla de reacción de arranque en caliente doble, uno o más nucleósidos y/o desoxinucleósidos trifosfatos y al menos un cebador, en donde la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico (actividad polimerasa comparada en mezclas de reacción sin un mecanismo de arranque en caliente doble) a una temperatura más baja (*por ejemplo*, temperatura ambiente), llevar la mezcla resultante a una temperatura más alta suficiente para aliviar la inhibición de la polimerasa y polimerizar el ácido nucleico molde.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para reducir la fluorescencia no específica con el uso de la mezcla de reacción de arranque en caliente doble. De acuerdo con dichos métodos, una polimerasa de ácido nucleico se pone en contacto con la mezcla de reacción de arranque en caliente doble a una primera temperatura en condiciones adecuadas para que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhiba sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico. Cuando la mezcla resultante se calienta a una segunda temperatura adecuada, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble detiene la inhibición de la polimerasa de ácido nucleico o de la actividad de la polimerasa de ácido nucleico.

En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos durante periodos de tiempo prolongados en comparación con los mecanismos de arranque en caliente convencionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos durante al menos 24 horas a temperatura ambiente. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble disminuye la amplificación no específica y/o la formación de productos no específicos en aproximadamente 20-100 % en comparación con una mezcla de reacción de arranque en caliente que solo tiene un mecanismo de arranque en caliente simple. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble disminuye la amplificación no específica y/o la formación de productos no específicos en aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 %. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en aproximadamente 2 a 4 veces en comparación con una mezcla de reacción que solo tiene un mecanismo de arranque en caliente simple. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5 o 4 veces.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para reducir la fluorescencia no específica con el uso de una mezcla de reacción de arranque en caliente doble. De acuerdo con dichos métodos, a una primera temperatura se forma una composición de reacción que comprende una polimerasa de ácido nucleico, una mezcla de reacción de arranque en caliente doble, al menos un NTP o dNTP, un ácido nucleico diana, al menos un cebador y al menos un colorante de unión a ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el al menos un cebador comprende un par de cebadores. A la primera temperatura (*por ejemplo*, una temperatura <40 °C, tal como la temperatura ambiente o del local), la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico. La composición de reacción se calienta posteriormente a una segunda temperatura de reacción que provoca que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble restablezca la actividad de la polimerasa de ácido nucleico. La composición de reacción se somete al menos a un ciclo de amplificación y se genera al menos un amplicón. Los amplicones bicatenarios pueden detectarse, ya sea en "tiempo real" o después de completada la reacción de amplificación debido a la fluorescencia del colorante de unión a ácido nucleico asociado con los amplicones.

En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos durante periodos de tiempo prolongados en comparación con los mecanismos de arranque en caliente convencionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos durante al menos 24 horas a temperatura ambiente. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble disminuye la amplificación no específica y/o la formación de productos no específicos en aproximadamente 20-100 % en comparación con una mezcla de reacción de arranque en caliente que solo tiene un mecanismo de arranque en caliente simple. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble disminuye la amplificación no específica y/o la formación de productos no específicos en aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 %. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en aproximadamente 2 a 4 veces en comparación con una mezcla de reacción que solo tiene un mecanismo de arranque en caliente simple. En ciertas

realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5 o 4 veces.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para amplificar un ácido nucleico diana con el uso de la mezcla de reacción de arranque en caliente doble. De acuerdo con ciertos métodos de este tipo, a una primera temperatura se forma una composición de reacción que comprende una polimerasa de ácido nucleico, una mezcla de reacción de arranque en caliente doble, al menos un NTP o dNTP, un ácido nucleico diana, al menos un cebador y al menos un colorante de unión a ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el al menos un cebador comprende un par de cebadores. A la primera temperatura, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico. La composición de reacción se calienta posteriormente a una segunda temperatura de reacción que provoca que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble detenga la inhibición de la polimerasa de ácido nucleico o de la actividad de la polimerasa de ácido nucleico. La composición de reacción se somete al menos a un ciclo de amplificación y se genera una multiplicidad de amplicones. Los amplicones bicatenarios pueden detectarse, ya sea en "tiempo real" o después de completada la reacción de amplificación debido a la fluorescencia del colorante de unión a ácido nucleico asociado con los amplicones.

En ciertas realizaciones, también se proporcionan kits para realizar ciertos de los presentes métodos. En ciertas realizaciones, los kits comprenden una mezcla de reacción de arranque en caliente doble. En ciertas realizaciones, los kits comprenden además al menos una polimerasa de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, los kits comprenden además uno o más de: al menos un cebador o un par de cebadores, un colorante de unión a ácido nucleico, una sonda indicadora y una transcriptasa inversa.

Estas y otras características de las presentes enseñanzas se proporcionan en el presente documento.

#### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Comparación de la mezcla maestra Fast SYBR® Green sola (línea "con cuadrados"), mezcla maestra de qPCR Platinum® SYBR® Green sola (línea "con cruces") y mezcla maestra Fast SYBR® Green en combinación con mezcla maestra de qPCR Platinum® SYBR® Green en una relación 1:1 (línea "con triángulos"). A: Amplificación de ADNc en preincubación de 0 h a la temperatura del local ("T0"); B: Amplificación de NTC (productos no específicos) en T0; C: Amplificación de ADNc en preincubación de 24 h a la temperatura del local ("T24"); y D: Amplificación de NTC en T24.

Figura 2: Amplificación de ácidos nucleicos con el uso de mezcla maestra Fast SYBR® Green y mezcla maestra de qPCR Platinum® SYBR® Green, solas o en combinación. A: Análisis de la curva de fusión de ADNc de A2M y NTC en T0; B: Análisis de la curva de fusión de ADNc de A2M y NTC en T24; C: Análisis de la curva de fusión de ADNc de COL1A1 y NTC en T0; D: Análisis de la curva de fusión de ADNc de COL1A1 y NTC en T24; E: Comparación de Ct promedio y  $\Delta Ct$  para la mezcla maestra Fast SYBR® Green y la mezcla maestra de qPCR Platinum® SYBR® Green, solas o en combinación; F: Análisis de la curva de fusión de la mezcla maestra Fast SYBR® Green y la mezcla maestra de qPCR Platinum® SYBR® Green, solas o en combinación.

Figura 3: Comparación de la mezcla maestra Fast SYBR® Green sola (línea "con rombos") y la combinación de mezcla maestra Fast SYBR® Green y anticuerpo contra Taq Platinum® (línea "con cruces"). A: Amplificación de ADNc en T0; B: Amplificación de NTC en T0; C: Amplificación de ADNc en T24; y D: Amplificación de NTC en T24.

Figura 4: Amplificación de ácidos nucleicos con el uso de mezcla maestra Fast SYBR® Green y anticuerpo contra Taq Platinum®, solos o en combinación. A: Análisis de la curva de fusión de A2M con el uso de mezcla maestra Fast SYBR® Green sola en T0 y T24; B: Análisis de la curva de fusión de A2M con el uso de una combinación de mezcla maestra Fast SYBR® Green y anticuerpo contra Taq Platinum® en T0 y T24; C: Análisis de la curva de fusión de la mezcla maestra Fast SYBR® Green y anticuerpo contra Taq Platinum®, solos o en combinación.

Figura 5: Comparación de la mezcla maestra de PCR Power SYBR® Green sola (línea "con rombos") y la combinación de mezcla de PCR Power SYBR® Green y anticuerpo contra Taq Platinum® (línea "con cruces"). A: Amplificación de ADNc en T0; B: Amplificación de NTC en T0; C: Amplificación de ADNc en T24; y D: Amplificación de NTC en T24.

Figura 6: Amplificación de ácidos nucleicos con el uso de mezcla maestra de PCR Power SYBR® Green y anticuerpo contra Taq Platinum®, solos o en combinación. A: Análisis de la curva de fusión de A2M con el uso de mezcla maestra de PCR Power SYBR® Green sola en T0 y T24; B: Análisis de la curva de fusión de A2M con el uso de una combinación de mezcla maestra de PCR Power SYBR® Green y anticuerpo contra Taq Platinum® en T0 y T24; C: Análisis de la curva de fusión de mezcla maestra de PCR Power SYBR® Green y anticuerpo contra Taq Platinum®, solos o en combinación.

#### Descripción detallada

En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden una polimerasa de ácido nucleico y una mezcla de reacción de arranque en caliente doble que inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico a una primera temperatura (por ejemplo, una temperatura <40 °C). En algunas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble comprende al menos dos mecanismos de arranque en caliente diferentes que se usan para inhibir o inhibir sustancialmente la actividad polimerasa de una polimerasa de ácido nucleico a una primera temperatura (por ejemplo, más baja). Dichos mecanismos de arranque en caliente pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a, anticuerpos o combinaciones de anticuerpos que bloquean la actividad de la ADN polimerasa a temperaturas más bajas, oligonucleótidos que bloquean la actividad de la ADN polimerasa a temperaturas más bajas, modificaciones químicas reversibles de la ADN polimerasa que se disocian a temperaturas elevadas, modificaciones de aminoácidos de

la ADN polimerasa que proporcionan una reducción de la actividad a temperaturas más bajas, proteínas de fusión que incluyen dominios de unión al ADN hiperestables y topoisomerasa, ligandos dependientes de la temperatura que inhiben la ADN polimerasa, proteínas de unión a cadena simple que secuestran cebadores a temperaturas más bajas, cebadores modificados o dNTP modificados.

5 En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos durante períodos de tiempo prolongados en comparación con los mecanismos de arranque en caliente convencionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos durante al menos 24 horas a temperatura ambiente. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble disminuye la amplificación no específica y/o la formación de productos no específicos en aproximadamente 20-100 % en comparación con una mezcla de reacción de arranque en caliente que solo tiene un mecanismo de arranque en caliente simple. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble disminuye la amplificación no específica y/o la formación de productos no específicos en aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 %. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en aproximadamente 2 a 4 veces en comparación con una mezcla de reacción que solo tiene un mecanismo de arranque en caliente simple. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5 o 4 veces.

20 En ciertas realizaciones, se proporcionan composiciones que comprenden una polimerasa de ácido nucleico termoestable y una mezcla de reacción de arranque en caliente doble que inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico a una temperatura menor que aproximadamente 40 °C y de manera que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble no inhiba sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico a una temperatura mayor que aproximadamente 40 °C. En ciertas realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico puede ser una ADN polimerasa dependiente de ADN o una ADN polimerasa dependiente de ARN. En ciertas realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico puede ser termoestable.

30 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para inhibir la actividad polimerasa de una polimerasa de ácido nucleico. Estos métodos implican poner en contacto la polimerasa con una mezcla de reacción de arranque en caliente doble, donde la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico a una primera temperatura (*por ejemplo*, una temperatura <40 °C). La inhibición de la polimerasa puede ser reversible (*por ejemplo*, por calentamiento a una segunda temperatura de al menos aproximadamente 40 °C). La mezcla de reacción de arranque en caliente doble comprende al menos dos mecanismos de arranque en caliente diferentes que se usan para inhibir o inhibir sustancialmente la actividad polimerasa de una polimerasa de ácido nucleico a una primera temperatura. Dichos mecanismos de arranque en caliente incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos o combinaciones de anticuerpos que bloquean la actividad de la ADN polimerasa a temperaturas más bajas, oligonucleótidos que bloquean la actividad de la ADN polimerasa a temperaturas más bajas, modificaciones químicas reversibles de la ADN polimerasa que se disocian a temperaturas elevadas, modificaciones de aminoácidos de la ADN polimerasa que proporcionan una reducción de la actividad a temperaturas más bajas, proteínas de fusión que incluyen dominios de unión al ADN hiperestables y topoisomerasa, ligandos dependientes de la temperatura que inhiben la ADN polimerasa, proteínas de unión a cadena simple que secuestran cebadores a temperaturas más bajas, cebadores modificados o dNTP modificados. En ciertas realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico puede ser una ADN polimerasa dependiente de ADN o una ADN polimerasa dependiente de ARN. En ciertas realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico puede ser termoestable.

50 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para sintetizar una molécula de ácido nucleico. Dichos métodos implican poner en contacto un ácido nucleico molde con una composición que comprende una polimerasa de ácido nucleico termoestable, una mezcla de reacción de arranque en caliente doble, uno o más nucleósidos y/o desoxinucleósidos trifosfatos y al menos un cebador, en donde la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico a la primera temperatura, llevar la mezcla resultante a una segunda temperatura suficiente para aliviar la inhibición de la polimerasa y polimerizar el ácido nucleico molde. En algunas realizaciones, la primera temperatura es una temperatura ambiente (*por ejemplo*, la temperatura del local). En ciertas realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico puede ser una ADN polimerasa dependiente de ADN o una ADN polimerasa dependiente de ARN. En ciertas realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico puede ser termoestable.

60 En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para evitar o reducir los eventos de cebado incorrecto que comprenden una mezcla de reacción de arranque en caliente doble. De acuerdo con dichos métodos, una polimerasa de ácido nucleico se pone en contacto con la mezcla de reacción de arranque en caliente doble a una primera temperatura en condiciones adecuadas para que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhiba sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico. Cuando la mezcla resultante se calienta a una segunda temperatura adecuada, el mecanismo de arranque en caliente doble detiene la inhibición de la polimerasa o de la actividad polimerasa y permite que se produzca la extensión del cebador.

65

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para reducir la formación de productos de amplificación no específicos que comprenden una mezcla de reacción de arranque en caliente doble. De acuerdo con dichos métodos, un ácido nucleico diana se pone en contacto con una polimerasa de ácido nucleico, una mezcla de reacción de arranque en caliente doble, al menos un cebador y al menos un dNTP. En ciertas realizaciones, el al menos un cebador comprende un par de cebadores. A la primera temperatura, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico. La composición de reacción se calienta posteriormente a una segunda temperatura que evita que la reacción de arranque en caliente doble inhiba la polimerasa de ácido nucleico. El ácido nucleico diana en la composición de reacción puede someterse después al menos a un ciclo de amplificación. En ciertas realizaciones, la polimerasa de ácido nucleico es termoestable. En ciertas realizaciones adicionales, la polimerasa de ácido nucleico es una ADN polimerasa dependiente de ADN o una ADN polimerasa dependiente de ARN. Por ejemplo, la polimerasa de ácido nucleico puede seleccionarse del grupo que consiste en, pero sin limitarse a, ADN polimerasa *Taq*, ADN polimerasa *Tfi*, ADN polimerasa *Tfi*, ADN polimerasa *Pfu* y ADN polimerasa Vent™. En algunas realizaciones adicionales, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble comprende al menos dos mecanismos de arranque en caliente diferentes. En algunas realizaciones, los al menos dos mecanismos de arranque en caliente diferentes pueden seleccionarse del grupo que consiste en anticuerpos o combinaciones de anticuerpos que bloquean la actividad de la ADN polimerasa a temperaturas más bajas, oligonucleótidos que bloquean la actividad de la ADN polimerasa a temperaturas más bajas, modificaciones químicas reversibles de la ADN polimerasa que se disocian a temperaturas elevadas, modificaciones de aminoácidos de la ADN polimerasa que proporcionan una reducción de la actividad a temperaturas más bajas, proteínas de fusión que incluyen dominios de unión al ADN hiperestables y topoisomerasa, ligandos dependientes de la temperatura que inhiben la ADN polimerasa, proteínas de unión a cadena simple que secuestran cebadores a temperaturas más bajas, cebadores modificados o dNTP modificados.

En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble proporciona una mayor inhibición de la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos en comparación con los mecanismos de arranque en caliente convencionales. En otras realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos durante períodos de tiempo prolongados en comparación con los mecanismos de arranque en caliente convencionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos durante al menos 24 horas a temperatura ambiente. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble disminuye la amplificación no específica y/o la formación de productos no específicos en aproximadamente 20-100 % en comparación con una mezcla de reacción de arranque en caliente que solo tiene un mecanismo de arranque en caliente simple. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble disminuye la amplificación no específica y/o la formación de productos no específicos en aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 %. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en aproximadamente 2 a 4 veces en comparación con una mezcla de reacción que solo tiene un mecanismo de arranque en caliente simple. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5 o 4 veces.

En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para reducir la fluorescencia no específica que comprenden una mezcla de reacción de arranque en caliente doble. De acuerdo con dichos métodos, a una primera temperatura se forma una composición de reacción que comprende una polimerasa de ácido nucleico, una mezcla de reacción de arranque en caliente doble, al menos un NTP o dNTP, un ácido nucleico diana, al menos un cebador y al menos un colorante de unión a ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el al menos un cebador comprende un par de cebadores. A la primera temperatura, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico. La composición de reacción se calienta posteriormente a una segunda temperatura de reacción que provoca que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble permita que se produzca la actividad de la polimerasa de ácido nucleico. La composición de reacción se somete al menos a un ciclo de amplificación y se genera una multiplicidad de amplicones. Los amplicones bicatenarios pueden detectarse, ya sea en "tiempo real" o después de completada la reacción de amplificación debido a la fluorescencia del colorante de unión a ácido nucleico asociado con los amplicones.

En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos durante períodos de tiempo prolongados en comparación con los mecanismos de arranque en caliente convencionales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe la amplificación no específica de ácidos nucleicos y/o la formación de productos no específicos durante al menos 24 horas a temperatura ambiente. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble disminuye la amplificación no específica y/o la formación de productos no específicos en aproximadamente 20-100 % en comparación con una mezcla de reacción de arranque en caliente que solo tiene un mecanismo de arranque en caliente simple. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble disminuye la amplificación no específica y/o la formación de productos no específicos en aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 %. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en aproximadamente 2 a 4 veces en comparación con una mezcla de reacción que solo tiene un mecanismo de arranque en caliente simple. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5 o 4 veces.

- En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para amplificar un ácido nucleico diana con el uso de la mezcla de reacción de arranque en caliente doble. De acuerdo con ciertos métodos de este tipo, a una primera temperatura se forma una composición de reacción que comprende una polimerasa de ácido nucleico, una mezcla de reacción de arranque en caliente doble, al menos un NTP o dNTP, un ácido nucleico diana, al menos un cebador y al menos un colorante de unión a ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el al menos un cebador comprende un par de cebadores. A la primera temperatura, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble inhibe o inhibe sustancialmente la actividad polimerasa de la polimerasa de ácido nucleico. La composición de reacción se calienta posteriormente a una segunda temperatura de reacción que provoca que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble detenga la inhibición de la polimerasa de ácido nucleico o de la actividad de la polimerasa de ácido nucleico. La composición de reacción se somete al menos a un ciclo de amplificación y se genera una multiplicidad de amplicones. Los amplicones bicatenarios pueden detectarse, ya sea en "tiempo real" o después de completada la reacción de amplificación debido a la fluorescencia del colorante de unión a ácido nucleico asociado con los amplicones.
- En ciertas realizaciones, también se proporcionan kits para realizar ciertos de los presentes métodos. En ciertas realizaciones, los kits comprenden una mezcla de reacción de arranque en caliente doble. En ciertas realizaciones, los kits comprenden además al menos una polimerasa de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, los kits comprenden además uno o más de: al menos un cebador o un par de cebadores, un colorante de unión a ácido nucleico, una sonda indicadora y una transcriptasa inversa.
- Para describir y señalar de manera más clara y concisa el objeto de la presente descripción, se proporcionan las siguientes definiciones para términos específicos, que se utilizan en la siguiente descripción y en las reivindicaciones adjuntas. A lo largo de la memoria descriptiva, la ejemplificación de términos específicos debe considerarse como ejemplos no limitantes.
- Como se usa en esta memoria descriptiva, las palabras "un" o "una" significan al menos uno, a menos que se indique específicamente lo contrario. En esta memoria descriptiva, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. Por ejemplo, pero no como una limitación, "un ácido nucleico diana" significa que puede estar presente más de un ácido nucleico diana; por ejemplo, una o más copias de una especie de ácido nucleico diana particular, así como dos o más especies diferentes de ácido nucleico diana. El término "y/o" significa que los términos antes y después de la barra se pueden considerar juntos o por separado. Con fines ilustrativos, pero no como una limitación, "X y/o Y" puede significar "X" o "Y" o "X" e "Y".
- Se apreciará que hay un "aproximadamente" implícito antes de las temperaturas, concentraciones, tiempos, etcétera, descritos en el presente documento, de manera que las desviaciones leves e insustanciales están dentro del alcance de las presentes enseñanzas en el presente documento. Además, el uso de "comprenden", "comprende", "que comprende", "contienen", "contiene", "que contiene", "incluyen", "incluye", y "que incluye" no pretende ser limitante. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la detallada son solamente ilustrativas y explicativas y no son restrictivas de la invención.
- A menos que se indique específicamente en la memoria descriptiva anterior, las realizaciones en la memoria descriptiva anterior que mencionan "que comprende" varios componentes también se contemplan como "que consiste en" o "que consiste esencialmente en" los componentes mencionados; las realizaciones en la memoria descriptiva que mencionan "que consiste en" varios componentes también se contemplan como "que comprende" o "que consiste esencialmente en" los componentes mencionados; y las realizaciones en la memoria descriptiva que mencionan "que consiste esencialmente en" varios componentes también se contemplan como "que consiste en" o "que comprende" los componentes mencionados (este uso indistinto no se aplica al uso de estos términos en las reivindicaciones).
- Los encabezados de sección usados en el presente documento son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del objeto deseado en modo alguno. En el caso de que alguna bibliografía referida en el presente documento contradiga cualquier término definido en esta memoria descriptiva, esta memoria descriptiva controla. Si bien las presentes enseñanzas se describen junto con diversas realizaciones, no se pretende que las presentes enseñanzas se limiten a dichas realizaciones. Por el contrario, las presentes enseñanzas abarcan diversas alternativas, modificaciones y equivalentes, como apreciarán los expertos en la técnica.
- Los términos "amplicón" y "producto de amplificación" como se usan en el presente documento generalmente se refieren al producto de una reacción de amplificación. Un amplicón puede ser bicatenario o monocatenario, y puede incluir las cadenas componentes separadas obtenidas por desnaturalización de un producto de amplificación bicatenario. En ciertas realizaciones, el amplicón de un ciclo de amplificación puede servir como un molde en un ciclo de amplificación posterior.
- Los términos "asociación" e "hibridación", que incluyen, sin limitación, variaciones de las palabras de origen "hibridar" y "asociar", se usan indistintamente y significan la interacción de apareamiento de bases de nucleótidos de un ácido nucleico con otro ácido nucleico que da como resultado la formación de un dúplex, triplex u otra estructura de orden superior. La interacción principal es normalmente específica de bases de nucleótidos, *por ejemplo*, A:T, A:U y G:C, mediante enlaces de hidrógeno de tipo Watson-Crick y Hoogsteen. En ciertas realizaciones, el apilamiento de bases y las interacciones hidrófobas también pueden contribuir a la estabilidad del dúplex. Las condiciones en las cuales los cebadores y las sondas se asocian con secuencias complementarias se conocen bien en la técnica, *por ejemplo*, como se describe en Nucleic

Acid Hybridization, A Practical Approach, Hames y Higgins, eds., IRL Press, Washington, D.C. (1985) y Wetmur y Davidson Mol. Biol. 31:349 (1968).

En general, que esta asociación tenga lugar depende, entre otras cosas, de la longitud de las partes complementarias de las partes complementarias de los cebadores y sus sitios de unión correspondientes en las secuencias flanqueantes de la diana y/o en los amplicones, o las partes complementarias correspondientes de una sonda indicadora y su sitio de unión; el pH, la temperatura, la presencia de cationes monovalentes y divalentes, la proporción de nucleótidos de G y C en la región de hibridación, la viscosidad del medio y la presencia de agentes desnaturalizantes. Dichas variables influyen en el tiempo requerido para la hibridación. Por lo tanto, las condiciones de reasociación preferidas dependerán de la aplicación particular. Sin embargo, dichas condiciones las pueden determinar de forma rutinaria los expertos en la técnica, sin experimentación indebida. Preferiblemente, las condiciones de reasociación se seleccionan para permitir que los cebadores y/o las sondas se hibriden selectivamente con una secuencia complementaria en la secuencia flanqueante o amplicón diana correspondiente, pero no se hibriden en ningún grado significativo con diferentes ácidos nucleicos diana o secuencias no diana en la composición de reacción a la segunda temperatura de reacción.

El término "hibridar selectivamente" y variaciones del mismo, significa que, en condiciones de rigurosidad adecuadas, una secuencia dada (por ejemplo, pero sin limitarse a un cebador) se asocia con una segunda secuencia que comprende una cadena complementaria de nucleótidos (por ejemplo, pero sin limitarse a una secuencia flanqueante de la diana o un sitio de unión a cebador de un amplicón), pero no se asocia a secuencias no deseadas, tales como ácidos nucleicos que no son diana, sondas u otros cebadores. Normalmente, a medida que la temperatura de reacción aumenta hacia la temperatura de fusión de una secuencia bicatenaria particular, la cantidad relativa de hibridación selectiva generalmente aumenta y el cebado incorrecto generalmente disminuye. En esta memoria descriptiva, una afirmación de que una secuencia se hibrida o se hibrida selectivamente con otra secuencia abarca situaciones donde la totalidad de ambas secuencias se hibridan o se hibridan selectivamente entre sí, y situaciones donde solo una parte de una o ambas secuencias se hibrida o se hibrida selectivamente con la otra secuencia completa o con una parte de la otra secuencia.

Como se usa en el presente documento, el término "rigurosidad" se usa para definir la temperatura y la composición del solvente existentes durante la hibridación y las etapas de procesamiento posteriores en las que se formará un híbrido compuesto por dos secuencias de nucleótidos complementarias. La rigurosidad también define la cantidad de homología, las condiciones necesarias y la estabilidad de los híbridos formados entre dos secuencias de nucleótidos. A medida que aumentan las condiciones de rigurosidad, se favorece la hibridación selectiva y se desfavorece la hibridación cruzada no específica. El aumento de las condiciones de rigurosidad corresponde normalmente a una temperatura de incubación más alta, concentraciones de sales más bajas y/o un pH más alto, con relación a las condiciones de rigurosidad más bajas en las que es más probable que se produzca un cebado incorrecto. Los expertos en la técnica entienden que las condiciones de rigurosidad adecuadas para permitir la hibridación selectiva de un cebador o par de cebadores a una secuencia flanqueante de la diana y/o al amplicón correspondiente pueden determinarse de manera habitual con el uso de técnicas bien conocidas y sin experimentación indebida (ver, *por ejemplo*, PCR: The Basics from Background to Bench, McPherson y Moller, Bios Scientific Publishers, 2000).

Como se usa en el presente documento, las mezclas o mecanismos de reacción de arranque en caliente doble que "inhiben sustancialmente" la actividad polimerasa se refieren a mezclas de reacción que proporcionan menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 25 %, menos de aproximadamente 20 %, con mayor preferencia menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 7,5 % o menos de aproximadamente 5 %, y con la máxima preferencia menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 1 %, menos de aproximadamente 0,5 %, menos de aproximadamente 0,25 % de actividad polimerasa o que carecen por completo de actividad polimerasa. La actividad polimerasa que se "inhibe sustancialmente" como se usa en el presente documento se refiere a la actividad polimerasa que se inhibe al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97,5 %, 99 %, 99,75 %, 100 % o >100 % en presencia de dichos mecanismos de arranque en caliente o mezclas de reacción de arranque en caliente.

La expresión "o combinaciones de los mismos", como se usa en el presente documento, se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los términos citados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de los mismos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, ACB, CBA, BCA, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AAB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. El experto en la materia entenderá que, por lo general, no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que el contexto lo demuestre de otra manera.

Los términos "desnaturalizar" y "desnaturalización", como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier proceso en el que un polinucleótido bicatenario, que incluye, sin limitación, un fragmento de ADN genómico (ADNg) que comprende al menos un ácido nucleico diana, un amplicón bicatenario o un polinucleótido que comprende al menos un segmento bicatenario se convierte en dos polinucleótidos monocatenarios o en un polinucleótido monocatenario o sustancialmente monocatenario, según corresponda. La desnaturalización de un polinucleótido bicatenario incluye, sin limitación, una variedad de técnicas térmicas y químicas que hacen que un ácido nucleico bicatenario sea monocatenario o sustancialmente monocatenario, por ejemplo, pero sin limitarse a, la liberación de los dos componentes monocatenarios individuales de un polinucleótido bicatenario o un dúplex que comprende dos oligonucleótidos. Los expertos en la técnica

apreciarán que la técnica de desnaturalización empleada generalmente no es limitante a menos que interfiera sustancialmente con una etapa posterior de asociación o enzimática de una reacción de amplificación, o en ciertos métodos, la detección de una señal fluorescente.

5 Como se usa en el presente documento, el término "Tm" se usa en referencia a la temperatura de fusión. La temperatura de fusión es la temperatura a la cual la mitad de una población de moléculas de ácido nucleico bicatenarias se disocia en cadenas simples.

10 El término "ligando del surco menor", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula pequeña que encaja en el surco menor del ADN bicatenario, a veces de una manera específica de secuencia. En general, los ligandos del surco menor son moléculas largas y planas que pueden adoptar una forma de media luna y, por lo tanto, encajan perfectamente en el surco menor de una doble hélice, a menudo desplazando el agua. Las moléculas de unión al surco menor típicamente comprenden varios anillos aromáticos conectados por enlaces con libertad de torsión, por ejemplo, pero no limitado a anillos de furano, benceno o pirrol.

15 "Cebado incorrecto" o "cebado de manera incorrecta", como se usa en el presente documento, se refiere a la hibridación de un cebador o una sonda a un ácido nucleico que no es diana. Como se conoce en la técnica, los cebadores (con exclusión de los cebadores aleatorios) se diseñan generalmente para hibridarse con una secuencia seleccionada que flanquea un ácido nucleico diana o con un sitio de unión a cebador de un amplicón y para dirigir la síntesis de ADN o la extensión del cebador a partir de ese sitio. El cebado incorrecto puede producirse cuando un cebador o una sonda se hibrida con un ácido nucleico que no es diana, a menudo en condiciones de rigurosidad baja o disminuida, y después sirve como punto de inicio para la extensión del cebador a partir de ese sitio que no es diana, lo que da lugar a la síntesis de ciertos productos de amplificación secundarios no deseados.

25 Los términos "no específica" o "de fondo" cuando se usan en referencia a la fluorescencia se refieren a la señal detectable emitida por las moléculas de colorante de unión a ácido nucleico asociadas con ácidos nucleicos bicatenarios distintos a los amplicones deseados. Los amplicones deseados comprenden los productos de amplificación de ácidos nucleicos diana, que incluyen en algunas realizaciones, secuencias de control o estándar interno que pueden incluirse en ciertas composiciones de reacción de las enseñanzas actuales, entre otras cosas, con fines de normalización y/o cuantificación. Por lo tanto, la señal fluorescente resultante de la asociación de moléculas de colorante de ácido nucleico con amplicones secundarios falsos, a menudo el resultado de cebado incorrecto, unión incorrecta y/o formación de dímeros de cebadores, es una fuente de fluorescencia no específica.

35 El término "colorante de unión a ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula fluorescente que es específica para un polinucleótido bicatenario o que al menos muestra un aumento de la fluorescencia sustancialmente mayor cuando se asocia con polinucleótidos bicatenarios que con un polinucleótido monocatenario. Normalmente, las moléculas de colorante de unión a ácido nucleico se asocian con segmentos bicatenarios de polinucleótidos al intercalarse entre los pares de bases del segmento bicatenario, uniéndose en los surcos mayores o menores del segmento bicatenario, o ambos. Los ejemplos no limitantes de colorantes de unión a ácido nucleico incluyen bromuro de etidio, DAPI, derivados de Hoechst que incluyen, sin limitación, Hoechst 33258 y Hoechst 33342, intercalantes que comprenden un quelato de lantánido (por ejemplo, pero sin limitarse a, un derivado de naftaleno diimida que porta dos quelatos fluorescentes de  $\beta$ -dicetona-Eu<sup>3+</sup> tetradentados (NDI-(BHHCT-Eu<sup>3+</sup>)<sub>2</sub>), ver, *por ejemplo*, Nojima y otros, Nucl. Acids Res. Supl. núm. 1 105 (2001), y ciertos colorantes de cianina asimétricos tales como SYBR® Green y PicoGreen®.

45 Como se usa en el presente documento, los términos "polinucleótido", "oligonucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente y se refieren a polímeros monocatenarios y bicatenarios de monómeros nucleótidos, que incluyen, sin limitación, 2'-desoxirribonucleótidos (ADN) y ribonucleótidos (ARN) unidos por enlaces fosfodiéster internucleótidos, o análogos internucleótidos, y contraiones asociados, *por ejemplo*, H<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, trietilamonio, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> y similares. Un polinucleótido puede estar compuesto enteramente de desoxirribonucleótidos, enteramente de ribonucleótidos, o mezclas químicas de los mismos y puede incluir análogos de nucleótidos. Las unidades de monómeros nucleótidos pueden comprender cualquiera de los nucleótidos descritos en el presente documento, incluyendo, pero no limitado a nucleótidos y/o análogos de nucleótidos. Los polinucleótidos varían normalmente en tamaño desde unas pocas unidades monoméricas, *por ejemplo*, 5-40 cuando se denominan a veces en la técnica oligonucleótidos, hasta varios miles de unidades de nucleótidos monoméricos. A menos que se indique lo contrario, siempre que se represente una secuencia de polinucleótidos, se entenderá que los nucleótidos están en el orden 5' a 3' de izquierda a derecha y que "A" indica desoxiadenosina, "C" indica desoxicitosina, "G" indica desoxiguanosina, "T" indica desoxitimidina y "U" indica desoxuridina, a menos que se indique lo contrario.

60 El término "nucleótido" se refiere a un éster fosfato de un nucleósido, *por ejemplo*, ésteres trifosfatos, en donde el sitio más común de esterificación es el grupo hidroxilo unido a la posición C-5 de la pentosa.

65 El término "nucleósido" se refiere a un compuesto que consiste en una base de nucleósido de purina, desazapurina o pirimidina, *por ejemplo*, adenina, guanina, citosina, uracilo, timina, desazaadenina, desazaguanosina y similares, unida a una pentosa en la posición 1', que incluye las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo. Cuando la base de nucleósido es purina o 7-desazapurina, la pentosa se une a la nucleobase en la posición 9 de la purina o desazapurina, y cuando la nucleobase es pirimidina, la pentosa se une a la nucleobase en la posición 1 de la pirimidina.

El término "análogo" incluye análogos sintéticos que tienen restos de base modificados, restos de azúcar modificados y/o restos de éster fosfato modificados. Los análogos de fosfato comprenden generalmente análogos de fosfato en donde el átomo de fósforo está en el estado de oxidación +5 y uno o más de los átomos de oxígeno se sustituye con un resto que no es de oxígeno, *por ejemplo*, azufre. Los análogos de fosfato ilustrativos incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilotioato, fosforanilidato, fosforamidato, boronofosfatos, que incluyen los contraiones asociados, *por ejemplo*, H<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>. Los análogos de base de ejemplo incluyen: 2,6-diaminopurina, hipoxantina, pseudouridina, C-5-propino, isocitosina, isoguanina, 2-tiopirimidina. Los análogos de azúcares ilustrativos incluyen: modificaciones en 2' o 3' donde la posición 2' o 3' es hidrógeno, hidroxilo, alcoxi, *por ejemplo*, metoxi, etoxi, aliloxi, isopropoxi, butoxi, isobutoxi y fenoxi, azido, amino o alquilamino, fluoro, cloro y bromo.

Como se usa en el presente documento, el término "recipiente de reacción" se refiere generalmente a cualquier contenedor, cámara, dispositivo o unidad en donde puede producirse una reacción de acuerdo con las presentes enseñanzas. En algunas realizaciones, un recipiente de reacción puede ser un microtubo, por ejemplo, pero sin limitarse a, un tubo de reacción de 0,2 ml o uno de 0,5 ml tal como un tubo MicroAmp® Optical (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) o un tubo de microcentrífuga u otros contenedores de este tipo en la práctica común en laboratorios de biología molecular. En algunas realizaciones, un recipiente de reacción comprende un pocillo de una placa de múltiples pocillos, un sitio en un portaobjetos de vidrio o un canal o cámara de un dispositivo microfluídico que incluye, sin limitación, una placa TaqMan® Low Density Array o una TaqMan® Open Array para PCR en tiempo real (ambas de Life Technologies Corp.). Por ejemplo, pero no como una limitación, una pluralidad de recipientes de reacción pueden residir en el mismo soporte. En algunas realizaciones, los dispositivos tipo laboratorio en un chip disponibles, por ejemplo, de Caliper, Fluidigm y Life Technologies Corp., que incluyen el chip Ion 316™ e Ion 318™, pueden servir como recipientes de reacción en los métodos descritos. Se reconocerá que una variedad de recipientes de reacción están disponibles comercialmente o pueden diseñarse para el uso en el contexto de las presentes enseñanzas.

Como se usa en el presente documento, el término "arranque en caliente" se refiere generalmente a un medio para limitar la disponibilidad de un componente de reacción esencial (*por ejemplo*, una polimerasa) cuando la mezcla de reacción se mantiene a una primera temperatura (normalmente una temperatura más baja) hasta que se alcanza una segunda temperatura (normalmente una temperatura más alta) lo que permite que el componente esencial participe en la reacción. Las reacciones de arranque en caliente implican normalmente la incubación a una primera temperatura (*por ejemplo*, más baja) y la posterior elevación a una segunda temperatura (*por ejemplo*, más alta) que permite que tenga lugar la reacción deseada. La activación de la reacción de arranque en caliente se logra preferentemente mediante una incubación a una temperatura que es igual o mayor que la temperatura de hibridación (asociación) del cebador usada en la reacción de amplificación para garantizar la especificidad de unión del cebador. El tiempo de incubación requerido para recuperar la actividad enzimática depende de la temperatura y el pH de la mezcla de reacción y de la estabilidad de la enzima. Se puede usar una amplia gama de condiciones de incubación; las condiciones óptimas pueden determinarse empíricamente para cada reacción. En general, una mezcla de reacción de arranque en caliente doble se incuba a una primera temperatura para inhibir la síntesis de ácidos nucleicos (*por ejemplo*, la actividad polimerasa) y después se eleva a una segunda temperatura para aliviar o detener la inhibición. La optimización de las condiciones de incubación para la reactivación de las polimerasas de ácido nucleico no ejemplificadas, o para mezclas de reacción no ejemplificadas, puede determinarse mediante experimentación habitual siguiendo la orientación proporcionada en el presente documento.

En ciertas realizaciones, la primera temperatura es más baja que dicha segunda temperatura. En algunas realizaciones, la primera temperatura es <40 °C. En ciertas realizaciones, la primera temperatura es aproximadamente igual o menor que aproximadamente 40 °C, 35 °C, 30 °C, 25 °C, 20 °C, 15 °C, 10 °C, 5 °C o menos. En algunas realizaciones, la primera temperatura es la temperatura ambiente. En algunas realizaciones adicionales, la primera temperatura es la temperatura del local. En algunas realizaciones, la segunda temperatura es >40 °C. En ciertas realizaciones, la primera temperatura es aproximadamente igual o mayor que aproximadamente 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C, 100 °C o más. Existen varios métodos para realizar reacciones de arranque en caliente que incluyen, pero sin limitarse a, el uso de técnicas manuales, barreras, modificaciones químicas y/o modificaciones estructurales de uno o más de los componentes esenciales de la reacción. Las condiciones de reacción adecuadas para dichos métodos de arranque en caliente se conocen en la técnica y se describen en más detalle en el presente documento y en los Ejemplos.

Como se usa en el presente documento, el término "mezcla de reacción de arranque en caliente doble" se refiere a la combinación de reactivos o disoluciones de reactivos que se usan para bloquear la extensión con la polimerasa de ácido nucleico a bajas temperaturas (*por ejemplo*, temperatura ambiente) hasta que se alcancen las condiciones de arranque en caliente de la temperatura de desnaturalización inicial en una reacción de amplificación (*por ejemplo*, PCR). A la temperatura de amplificación elevada, la polimerasa de ácido nucleico ya no se inhibe y permite la extensión del cebador. Como se usa en el presente documento, la mezcla de reacción de arranque en caliente doble significa incluir una mezcla de reacción que comprende al menos dos mecanismos diferentes para el arranque en caliente. En consecuencia, las "mezclas de reacción de arranque en caliente doble" pueden incluir más de dos mecanismos de arranque en caliente (*por ejemplo*, "mezcla de reacción de arranque en caliente triple", "mezcla de reacción de arranque en caliente cuádruple", "mezcla de reacción de arranque en caliente múltiple", etcétera). Los posibles mecanismos de arranque en caliente pueden incluir, pero sin limitarse a, anticuerpos o combinaciones de anticuerpos que bloquean la actividad de la polimerasa de ácido nucleico a temperaturas más bajas y que se disocian de la polimerasa a temperaturas elevadas (ver,

por ejemplo, Eastlund y otros, LifeSci. Quarterly 2:2 (2001), Mizuguchi y otros, J. Biochem. (Tokio) 126:762 (1999)); oligonucleótidos que bloquean la actividad de la polimerasa de ácido nucleico a temperaturas más bajas y que se disocian de la polimerasa a temperaturas elevadas (ver, por ejemplo, Dang y otros, J. Mol. Biol. 264:268 (1996)); modificación química reversible de la polimerasa de ácido nucleico de manera que la actividad de la polimerasa de ácido nucleico se
   
 5 bloquea a temperaturas más bajas y las modificaciones se invierten o disocian a temperaturas elevadas (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 5,773,258 y Moretti y otros, Biotechniques 25:716 (1998)); mutaciones de aminoácidos de la polimerasa de ácido nucleico que proporcionan una reducción de la actividad a temperaturas más bajas (ver, por
   
 10 ejemplo, Kermekchiev y otros, Nucl. Acids Res. 31:6139 (2003)); proteínas de fusión a polimerasa de ácido nucleico que incluyen dominios de unión al ADN hiperestables y topoisomerasas (ver, por ejemplo, Pavlov y otros, Proc. Natl. Acad.
   
 Sci. USA 99:13510 (2002)); ligandos que inhiben la polimerasa de ácido nucleico de una manera dependiente de la temperatura (por ejemplo, ADN polimerasa Taq HotMaster™ de Eppendorf (Hauppauge, NY) y 5 PRIME (Gaithersburg,
   
 MD)); proteínas de unión a cadena simple que secuestran cebadores a bajas temperaturas (ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2008/0138878); pirofosfatasa termoestable que hidroliza el
   
 15 pirofosfato inorgánico a temperaturas elevadas (ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2006/0057617); bloqueadores termolábiles, tales como una proteína de bloqueo de polimerasa (ver, por ejemplo, la
   
 publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2007/0009922); secuencias que compiten con cebadores (ver, por ejemplo, Puskas y otros, Genome Res. 5:309 (1995) y Vestheim y otros, Front. Zool. 5:12 (2008)); constructos
   
 de cebadores modificados (ver, por ejemplo, Ailenberg y otros, Biotechniques 29:22 (2000) y Kaboev y otros, Nucl. Acids Res. 28:E94 (2000)); cebadores modificados que mejoran la selectividad de hibridación (ver, por ejemplo, las patentes de
   
 20 Estados Unidos núm. 6,794,142 y 6,001,611); cebadores con modificaciones en 3' que pueden eliminarse mediante actividad exonucleasa 3'-5' (ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2003/0119150
   
 y la patente de Estados Unidos núm. 6,482,590); cebadores con nucleobases modificadas que pueden eliminarse por irradiación UV (ver, por ejemplo, Young y otros, Chem. Commun. (Camb) 28:462 (2008)); modificaciones del cebador que
   
 pueden eliminarse por desprotección térmica (ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos
   
 25 núm. 2003/0162199 y Lebedev y otros, Nucl. Acids Res. 36:e131 (2008)); o modificación de los dNTP con grupos de modificación termolábiles (ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2003/0162199
   
 y Koukhareva y otros, Nucl. Acids Symp. Ser. (Oxford), 259 (2008)).

Como se usa en el presente documento, las mezclas de reacción de arranque en caliente doble que comprenden "al
   
 30 menos dos mecanismos diferentes" abarcan aquellas mezclas de reacción que pueden comprender al menos dos
   
 mecanismos de arranque en caliente diferentes que funcionan de manera similar o usan componentes similares. Por
   
 ejemplo, las mezclas de reacción de arranque en caliente doble pueden comprender reactivos o disoluciones de reactivos
   
 diseñados para dos mecanismos de arranque en caliente diferentes basados en anticuerpos, o dos mecanismos de
   
 35 arranque en caliente diferentes basados en oligonucleótidos, o un mecanismo de arranque en caliente basado en
   
 anticuerpos y uno basado en oligonucleótidos, o un mecanismo de arranque en caliente basado en anticuerpos y uno
   
 basado en modificaciones químicas, o cualquier combinación de este tipo disponible.

El término "grupo indicador" se usa en un sentido amplio en el presente documento y se refiere a cualquier etiqueta,
   
 40 marcador o resto identificable.

El término "ácido nucleico diana" o "diana" se refiere a la secuencia de ácido nucleico que se amplifica y/o detecta
   
 específicamente con el uso de las composiciones, métodos y kits de las presentes enseñanzas (a diferencia de un
   
 producto de amplificación secundaria, que es el resultado de una reacción secundaria falsa, normalmente debido al
   
 45 cebado incorrecto). En ciertas realizaciones, un ácido nucleico diana sirve como molde en una reacción de extensión del
   
 cebador. En algunas realizaciones, un ácido nucleico diana sirve como molde de amplificación. En algunas realizaciones,
   
 un ácido nucleico diana sirve como una cadena molde en una estructura de escisión de ácido nucleico. En ciertas
   
 realizaciones, el ácido nucleico diana comprende ADN y está presente en el ADN genómico (ADNg) o el ADN mitocondrial
   
 (ADNmt). En ciertas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende ARN, por ejemplo, pero sin limitación, ARN
   
 50 ribosomal (ARNr), ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia (ARNt) o una molécula de ARN tal como un precursor
   
 de microARN (miARN), que incluye, sin limitación, un pri-miARN, un pre-miARN o un pri-miARN y un pre-miARN. En
   
 algunas realizaciones, el ácido nucleico diana comprende una molécula de ARN pequeña que incluye, sin limitación, un
   
 miARN, un ARNp, un ARNtp, un ARNpno u otro ARNnc. No es necesario que el ácido nucleico diana constituya la totalidad
   
 de una molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, pero no como limitación, un ácido nucleico grande, por ejemplo, un
   
 55 fragmento de ADNg, puede comprender una multiplicidad de ácidos nucleicos diana diferentes. Normalmente, un ácido
   
 nucleico diana tiene al menos un extremo definido. En muchas reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, el ácido
   
 nucleico diana tiene dos extremos definidos.

El término "termoestable" cuando se usa en referencia a una enzima, se refiere a una enzima (tal como un polipéptido
   
 que tiene actividad de polimerasa de ácido nucleico) que es resistente a la inactivación por calor. Una enzima
   
 60 "termoestable" se diferencia de una polimerasa "termolábil", que puede inactivarse mediante tratamiento térmico. Las
   
 proteínas termolábiles pueden inactivarse a temperaturas fisiológicas y pueden clasificarse como mesotermoestables
   
 (inactivación a aproximadamente 45 °C a aproximadamente 65 °C) y termoestables (inactivación a más de
   
 aproximadamente 65 °C). Por ejemplo, las actividades de las ADN polimerasas termolábiles T5 y T7 pueden inactivarse
   
 65 totalmente mediante la exposición de las enzimas a una temperatura de aproximadamente 90 °C durante
   
 aproximadamente 30 segundos. Una actividad polimerasa termoestable es más resistente a la inactivación por calor que
   
 una polimerasa termolábil. Sin embargo, una polimerasa termoestable no se refiere a una enzima que es totalmente

resistente a la inactivación por calor; por lo tanto el tratamiento térmico puede reducir la actividad polimerasa hasta cierto punto. Normalmente una polimerasa termoestable también tendrá una temperatura óptima más alta que las ADN polimerasas termolábiles.

5 La concentración de trabajo se refiere a la concentración de un reactivo que está en o cerca de la concentración óptima usada en una disolución para realizar una función particular (tal como la amplificación o digestión de una molécula de ácido nucleico). La concentración de trabajo de un reactivo también se describe de manera equivalente como una "concentración 1X" o una "disolución 1X" (si el reactivo está en disolución) del reactivo. En consecuencia, también se pueden describir concentraciones más altas del reactivo en función de la concentración de trabajo; por ejemplo, una  
10 "concentración 2X" o una "disolución 2X" de un reactivo se define como una concentración o disolución que es el doble de la concentración de trabajo del reactivo; una "concentración 5X" o una "disolución 5X" es cinco veces más alta que la concentración de trabajo, y así sucesivamente.

15 Como se usa en el presente documento, "polimerasa de ácido nucleico" se refiere a una enzima que cataliza la polimerización de nucleótidos. Generalmente, la enzima iniciará la síntesis en el extremo 3' del cebador asociado a una secuencia molde de ácido nucleico, y avanzará hacia el extremo 5' de la cadena molde. "ADN polimerasa", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a cualquier polipéptido que puede catalizar la extensión 5' a 3' de un cebador hibridado mediante la adición de desoxinucleótidos didesoxirribonucleótidos y/o ciertos análogos de nucleótidos de manera dependiente del molde lo que cataliza la polimerización. Por ejemplo, pero sin limitarse a, la adición secuencial  
20 de desoxirribonucleótidos al extremo 3' de un cebador que se asocia a un molde de ácido nucleico durante una reacción de extensión del cebador. Los ejemplos no limitantes de ADN polimerasas incluyen ADN polimerasas dependientes de ARN que incluyen, sin limitación, transcriptasas inversas y ADN polimerasas dependientes de ADN. Las ADN polimerasas conocidas incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu) (Lundberg y otros, 1991, *Gene*, 108:1), ADN polimerasa I de *E. coli* (Lecomte y Doubleday, 1983, *Nucleic Acids Res.* 11:7505), ADN polimerasa T7 (Nordstrom y otros, 1981, *J. Biol. Chem.* 256:3112), ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth) (Myers y Gelfand 1991, *Biochemistry* 30:7661), ADN polimerasa de *Bacillus stearothermophilus* (Stenesh y McGowan, 1977, *Biochim Biophys Acta* 475:32), ADN polimerasa de *Thermococcus litoralis* (Tli) (también denominada ADN polimerasa Vent, Cariello y otros, 1991, *Nucleic Acids Res.* 19: 4193), ADN polimerasa 9°Nm (producto discontinuado de New England Biolabs), ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma) (Díaz y Sabino, 1998 *Braz J. Med. Res.* 31:1239), ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) (Chien y otros, 1976, *J. Bacteriol.* 127: 1550), ADN polimerasa de *Pyrococcus kodakaraensis* KOD (Takagi y otros, 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4504), ADN polimerasa JDF-3 (solicitud de patente WO 0132887) y ADN polimerasa de *Pyrococcus GB-D* (PGB-D) (Juncosa-Ginesta y otros, 1994, *Biotechniques*, 16:820). La actividad polimerasa de cualquiera de las enzimas anteriores puede determinarse por medios bien conocidos en la técnica. Una unidad de actividad de ADN polimerasa, de acuerdo con la invención en cuestión, se define como la cantidad de enzima  
35 que cataliza la incorporación de 10 nmol de dNTP totales en forma polimérica en 30 minutos a temperatura óptima (*por ejemplo*, 72 °C para la ADN polimerasa Pfu). Debe apreciarse que ciertas ADN polimerasas (*por ejemplo*, pero sin limitarse a ciertas ADN polimerasas eubacterianas de Tipo A y ADN polimerasa *Taq*) pueden comprender además una actividad nucleasa específica de estructura. Las enzimas transcriptasas inversas adecuadas para la práctica de la presente invención también se conocen bien en la técnica y pueden obtenerse de varias fuentes. Dichas enzimas incluyen, pero no se limitan a, M-MLV, VIH, ASLV y variantes y mutantes de las mismas.

40 Como se usa en este documento, los términos "amplificación", "amplificación de ácido nucleico" o "amplificación" se refieren a la producción de copias múltiples de un molde de ácido nucleico, o la producción de copias de secuencias de ácidos nucleicos múltiples que son complementarias del molde de ácido nucleico.. Los términos (que incluyen el término "polimerizar") también pueden referirse a extender un molde de ácido nucleico (*por ejemplo*, por polimerización). La reacción de amplificación puede ser una reacción de extensión mediada por polimerasa tal como, p. ej., una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, cualquiera de las reacciones de amplificación conocidas puede ser adecuada para su uso como se describe en este documento. El término "amplificación" que normalmente se refiere a un aumento "exponencial" en el ácido nucleico diana se puede usar en este documento para describir aumentos tanto lineales como exponenciales en los números de una secuencia diana seleccionada de ácido nucleico.  
50

El término "mezcla de reacción de amplificación" y/o "mezcla maestra" puede referirse a una disolución acuosa que comprende los diversos (algunos o todos) reactivos usados para amplificar un ácido nucleico diana. Dichas reacciones también pueden realizarse con el uso de soportes sólidos (*por ejemplo*, una matriz). Las reacciones también se pueden  
55 realizar en formato único o múltiple, según lo desee el usuario. Estas reacciones incluyen normalmente enzimas, tampones acuosos, sales, cebadores de amplificación, ácido nucleico diana y trifosfatos de nucleósidos. Dependiendo del contexto, la mezcla puede ser una mezcla de reacción de amplificación completa o incompleta. El método utilizado para amplificar el ácido nucleico diana puede estar disponible para un experto en la técnica. Se puede utilizar cualquier medio *in vitro* para multiplicar las copias de una secuencia diana de ácido nucleico. Estos incluyen un método de amplificación lineal, logarítmico y/o cualquier otro. Si bien esta descripción puede describir generalmente la PCR como la reacción de amplificación de ácidos nucleicos, se espera que los detergentes modificados descritos en el presente documento sean eficaces en otros tipos de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, que incluyen las reacciones de amplificación mediadas por polimerasas (tales como la amplificación dependiente de helicasa (HDA), la amplificación por recombinasa polimerasa (RPA) y la amplificación de círculo rodante (RCA)), así como las reacciones de amplificación mediadas por ligasa (tales como la reacción de detección por ligasa (LDR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) y las versiones de cada una para interrupciones) y las combinaciones de reacciones de amplificación de ácidos nucleicos tales como LDR y  
60

PCR (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 6,797,470). Por ejemplo, los detergentes modificados pueden usarse en, por ejemplo, varias reacciones mediadas por ligado, donde por ejemplo se emplean sondas de ligado en lugar de cebadores de PCR. Los métodos ilustrativos adicionales incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; ver, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núm. 4,683,202; 4,683,195; 4,965,188; y/o 5,035,996), procedimientos isotérmicos (con el uso de una o más ARN polimerasas (ver, *por ejemplo*, la publicación PCT núm. WO 2006/081222), desplazamiento de cadena (ver, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. RE39007E), destrucción parcial de moléculas cebadoras (ver, *por ejemplo*, publicación PCT núm. WO 2006/087574)), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (ver, *por ejemplo*, Wu, y otros, Genomics 4: 560-569 (1990)) y/o Barany, y otros Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193 (1991)), sistemas de ARN replicasa Q $\beta$  (ver, *por ejemplo*, la publicación PCT núm. WO 1994/016108), sistemas basados en transcripción de ARN (*por ejemplo*, TAS, 3SR), amplificación de círculo rodante (RCA) (ver, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 5,854,033; la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/265897; Lizardi y otros, Nat. Genet. 19: 225-232 (1998); y/o Banér y otros Nucleic Acid Res., 26: 5073-5078 (1998)) y amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) (Little, y otros Clin. Chem 45:777-784 (1999)), entre otros. Estos sistemas, junto con los muchos otros sistemas disponibles para el experto en la técnica, pueden ser adecuados para el uso en la polimerización y/o amplificación de ácidos nucleicos diana para el uso como se describe en el presente documento.

La "eficiencia de amplificación" puede referirse a cualquier producto que se pueda cuantificar para determinar el número de copias (*por ejemplo*, el término puede referirse a un amplicón de PCR, un producto de ligado de LCR y/o un producto similar). La eficiencia de amplificación y/o polimerización puede determinarse mediante varios métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero sin limitarse a, determinación de curvas de dilución de calibración y cálculo de la pendiente, determinación con el uso del software qBase como se describe en Hellemans y otros, Genome Biology 8:R19 (2007), determinación con el uso del cálculo de delta Cq ( $\Delta\Delta Cq$ ) como se describe en Livak y Schmittgen, Methods 25:402 (2001) o por el método descrito en Pfaffl, Nucl. Acids Res. 29:e45 (2001).

En general, el ciclado térmico de PCR incluye una etapa de desnaturalización inicial a alta temperatura, seguido de una serie repetitiva de ciclos de temperatura diseñados para permitir la desnaturalización del molde, la asociación del cebador y la extensión de los cebadores asociados por la polimerasa. Generalmente, las muestras se calientan inicialmente durante aproximadamente 2 a 10 minutos a una temperatura de aproximadamente 95 °C para desnaturalizar la muestra de ADN bicatenario. Después, al comienzo de cada ciclo, las muestras se desnaturalizan durante aproximadamente 10 a 60 segundos, dependiendo de las muestras y del tipo de instrumento usado. Después de la desnaturalización, los cebadores pueden asociarse al ADN diana a una temperatura más baja, de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 20 a 60 segundos. La extensión de los cebadores por la polimerasa a menudo se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 72 °C. La cantidad de tiempo usada para la extensión dependerá del tamaño del amplicón y del tipo de enzimas usadas para la amplificación y se determina fácilmente mediante experimentación habitual. Además, la etapa de asociación puede combinarse con la etapa de extensión, lo que da como resultado un ciclo de dos etapas. El ciclado térmico también puede incluir cambios de temperatura adicionales en los ensayos de PCR. El número de ciclos usados en el ensayo depende de muchos factores, que incluyen los cebadores usados, la cantidad de muestra de ADN presente y las condiciones de ciclado térmico. El experto en la técnica puede determinar fácilmente el número de ciclos que se usarán en cualquier ensayo con el uso de experimentación habitual. Opcionalmente, puede añadirse una etapa de extensión final después de completar el ciclado térmico para garantizar la síntesis de todos los productos de amplificación.

La PCR con las composiciones descritas puede realizarse en instrumentos de PCR "estándar", *por ejemplo*, sistemas de PCR estándar Applied Biosystems 7900HT, 7500 y 7300, o en instrumentos de PCR "rápida", *por ejemplo*, sistemas de PCR rápida en tiempo real Applied Biosystems StepOne™, StepOne Plus™, 7500 y 7900HT, o sistemas de PCR en tiempo real ViiA™ 7 o QuantStudio™ 12K Flex.

En algunas realizaciones, las condiciones de ciclado térmico ilustrativas para la amplificación por PCR con el uso de las composiciones y métodos descritos en el presente documento son las siguientes:

50 Etapa de UNG (opcional): 50 °C durante 2 minutos  
 Activación: 95 °C durante 2 minutos.  
 Desnaturalización: 95-97 °C durante 15 segundos  
 Asociación/Extensión: 60-62 °C durante 1 minuto (X hasta 40 ciclos)

55 En algunas realizaciones, las condiciones de ciclado térmico ilustrativas para la amplificación por PCR con el uso de las composiciones y métodos descritos en el presente documento son las siguientes:

60 Etapa de UNG (opcional): 50 °C durante 2 minutos  
 Activación: 95 °C durante 2 minutos.  
 Desnaturalización: 95-97 °C durante 15 segundos  
 Asociación: 55-60 °C durante 15 segundos  
 Extensión: 72 °C durante 1 minuto (X hasta 40 ciclos)

En algunas realizaciones, las composiciones descritas en el presente documento se usan para el ciclado térmico rápido de PCR. En una realización, las condiciones de ciclado térmico rápido para la amplificación por PCR con el uso de la composición y los métodos descritos en el presente documento son las siguientes:

65 Etapa de UNG (opcional): 50 °C durante 2 minutos

Activación: 95 °C durante 2 minutos.  
 Desnaturalización: 95-97 °C durante 1-3 segundos  
 Extensión: 60-62 °C durante 20-30 segundos (X hasta 40 ciclos)

5 En algunas realizaciones, cuando se realiza un ciclado térmico rápido de PCR, se recomienda una concentración de cebadores de aproximadamente 400 nM.

10 En ciertas realizaciones, las técnicas de amplificación comprenden al menos un ciclo de amplificación, por ejemplo, pero sin limitarse a, las etapas de: desnaturalizar un ácido nucleico bicatenario para separar las cadenas componentes; hibridar un cebador con una secuencia flanqueante de la diana o un sitio de unión a cebador de un amplicón (o complementos de cualquiera, según corresponda); y sintetizar una cadena de nucleótidos de manera dependiente del molde con el uso de una ADN polimerasa. El ciclo puede o no repetirse. En ciertas realizaciones, un ciclo de amplificación comprende una multiplicidad de ciclos de amplificación, por ejemplo, pero sin limitarse a 20 ciclos, 25 ciclos, 30 ciclos, 35 ciclos, 40 ciclos, 45 ciclos o más de 45 ciclos de amplificación.

15 En algunas realizaciones, la amplificación comprende el ciclado térmico con el uso de un instrumento, tal como, pero sin limitarse a, un sistema termociclador de PCR GeneAmp® 9700, 9600, 2700 o 2400, un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 12K Flex, un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems® ViiA™ 7, un sistema de PCR rápida en tiempo real Applied Biosystems® 7500, un sistema de PCR rápida en tiempo real 7900HT y similares (todos disponibles de Life Technologies Corp., Carlsbad, CA). En ciertas realizaciones, se generan amplicones monocatenarios en una reacción de amplificación, por ejemplo, pero sin limitarse a, PCR asimétrica o A-PCR.

20 Se han desarrollado dispositivos que pueden realizar una reacción de ciclado térmico y la detección de composiciones de reacción que contienen un colorante de unión a ácido nucleico, mediante la emisión de un haz de luz de una longitud de onda especificada, la lectura de la intensidad de la señal fluorescente emitida por las moléculas de colorante de unión a ácido nucleico asociadas con ácidos nucleicos bicatenarios y la visualización de la intensidad de fluorescencia después de cada ciclo. Los dispositivos que comprenden un termociclador, un emisor de haz de luz y un detector de señal fluorescente se han descrito, *por ejemplo*, en las patentes de Estados Unidos núm. 5,928,907; 6,015,674; y 6,174,670, e incluyen, sin limitación, el sistema de detección de secuencias ABI Prism® 7700, el sistema termociclador de PCR GeneAmp® 9700, 9600, 2700 o 2400, el sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems® ViiA™ 7, el sistema de PCR rápida en tiempo real Applied Biosystems® 7500, el sistema de PCR rápida en tiempo real 7900HT y similares (todos disponibles de Life Technologies Corp., Carlsbad, CA).

25 En algunas realizaciones, la amplificación comprende una reacción en dos etapas que incluye, sin limitación, una etapa de preamplificación en donde se produce un número limitado de ciclos de amplificación (por ejemplo, pero sin limitarse a, 2, 3, 4 o 5 ciclos de amplificación), después el amplicón resultante se diluye generalmente y partes del amplicón diluido se someten a ciclos adicionales de amplificación en una etapa de amplificación posterior (ver, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 6,605,451 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2004/0175733). En algunas realizaciones, una etapa de preamplificación, una etapa de amplificación posterior, o ambas, incluyen una mezcla de reacción de arranque en caliente doble.

30 En ciertas realizaciones, una reacción de amplificación comprende amplificación múltiple, en la que una multiplicidad de ácidos nucleicos diana diferentes y/o una multiplicidad de especies de productos de amplificación diferentes se amplifican simultáneamente con el uso de una multiplicidad de conjuntos de cebadores diferentes. En ciertas realizaciones, una reacción de amplificación múltiple y una reacción de amplificación simple, que incluyen una multiplicidad de reacciones simples o de otros múltiplos (por ejemplo, pero sin limitarse a una reacción doble, triple, cuádruple, quíntuple o séxtuple) se realizan en paralelo.

35 Los métodos ilustrativos para polimerizar y/o amplificar ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, reacciones de extensión mediadas por polimerasa. P. ej., la reacción de extensión mediada por la polimerasa puede ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En otras realizaciones, la reacción de amplificación de ácido nucleico es una reacción multiplexada. Por ejemplo, los métodos ilustrativos para polimerizar y/o amplificar y detectar ácidos nucleicos adecuados para el uso como se describe en el presente documento están disponibles comercialmente como TaqMan® (ver, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núm. 4,889,818; 5,079,352; 5,210,015; 5,436,134; 5,487,972; 5,658,751; 5,210,015; 5,487,972; 5,538,848; 5,618,711; 5,677,152; 5,723,591; 5,773,258; 5,789,224; 5,801,155; 5,804,375; 5,876,930; 5,994,056; 6,030,787; 6,084,102; 6,127,155; 6,171,785; 6,214,979; 6,258,569; 6,814,934; 6,821,727; 7,141,377; y/o 7,445,900). Los ensayos TaqMan® se llevan a cabo normalmente realizando una amplificación de ácidos nucleicos en un polinucleótido diana con el uso de una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad nucleasa 5' a 3', un cebador capaz de hibridarse con dicho polinucleótido diana y una sonda oligonucleotídica capaz de hibridarse con dicho polinucleótido diana en 3' con relación a dicho cebador. La sonda oligonucleotídica incluye normalmente un marcador detectable (*por ejemplo*, una molécula indicadora fluorescente) y una molécula atenuadora capaz de atenuar la fluorescencia de dicha molécula indicadora. En ciertas realizaciones, el marcador detectable y la molécula atenuadora forman parte de una única sonda. A medida que avanza la amplificación, la polimerasa digiere la sonda para separar el marcador detectable de la molécula atenuadora. El marcador detectable (*por ejemplo*, fluorescencia) se supervisa durante la reacción, donde la detección del marcador corresponde a la producción de la amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, cuanto mayor es la señal, mayor es la cantidad de amplificación). Las variaciones de los ensayos TaqMan® (*por ejemplo*, el ensayo

TaqMan® enriquecido LNA™) se conocen en la técnica y serían adecuadas para el uso en los métodos descritos en el presente documento.

Otro sistema ilustrativo adecuado para el uso como se describe en el presente documento utiliza sondas bicatenarias en métodos de hibridación por desplazamiento (ver, *por ejemplo*, Morrison y otros Anal. Biochem., 18:231-244 (1989); y/o Li, y otros Nucleic Acids Res., 30(2,e5) (2002)). En dichos métodos, la sonda normalmente incluye dos oligonucleótidos complementarios de diferentes longitudes, donde uno incluye un marcador detectable y el otro incluye una molécula atenuadora. Cuando no está unido a un ácido nucleico diana, el atenuador suprime la señal del marcador detectable. La sonda se vuelve detectable tras la hibridación de desplazamiento con un ácido nucleico diana. Se pueden usar múltiples sondas, cada una de las cuales contiene diferentes marcadores detectables, de manera que se pueden consultar múltiples ácidos nucleicos diana en una sola reacción.

Métodos ilustrativos adicionales para polimerizar y/o amplificar y detectar ácidos nucleicos diana adecuados para el uso como se describe en el presente documento implican "balizas moleculares", que son sondas oligonucleotídicas monocatenarias en forma de horquilla. En presencia de la secuencia diana, la sonda se despliega, se une y emite una señal (*por ejemplo*, fluorescencia). Una baliza molecular incluye normalmente al menos cuatro componentes: 1) el "lazo", una región de 18-30 nucleótidos que es complementaria a la secuencia diana; 2) dos "tallos" de 5-7 nucleótidos que se encuentran en cada extremo del lazo y que son complementarios entre sí; 3) en el extremo 5', un marcador detectable; y 4) en el extremo 3', un resto atenuador que evita que el marcador detectable emita una sola cuando la sonda está en forma de lazo cerrado (*por ejemplo*, no está unida a un ácido nucleico diana). Por lo tanto, en presencia de una diana complementaria, la parte de "tallo" de la baliza se separa, lo que da como resultado que la sonda hibrida con la diana. También se conocen otros tipos de balizas moleculares y pueden ser adecuados para uso en los métodos descritos en este documento. Las balizas moleculares se pueden usar en una variedad de sistemas de ensayo. Uno de dichos sistemas es la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA®), un proceso isotérmico de una sola etapa para polimerizar y/o amplificar el ARN a ADN bicatenario sin ciclos de temperatura. Una reacción NASBA normalmente requiere virus de mieloblastosis aviar (AMV), transcriptasa inversa (RT), ARN polimerasa T7, ARNasa H y dos cebadores oligonucleotídicos. Después de la amplificación, el ácido nucleico diana amplificado se puede detectar utilizando una baliza molecular. Otros usos para balizas moleculares son conocidos en la técnica y serían adecuados para uso en los métodos descritos en el presente documento.

El sistema Scorpions™ es otro formato de ensayo ilustrativo que puede usarse en los métodos descritos en el presente documento. Los cebadores Scorpions™ son moléculas bifuncionales en las que un cebador está unido covalentemente a la sonda, junto con un marcador detectable (*por ejemplo*, un fluoróforo) y un resto atenuador no detectable que atenúa la fluorescencia del marcador detectable. En presencia de un ácido nucleico diana, el marcador detectable y el atenuador se separan, lo que conduce a un aumento de la señal emitida del marcador detectable. Normalmente, un cebador usado en la reacción de amplificación incluye un elemento de sonda en el extremo 5' junto con un elemento "bloqueador de PCR" (*por ejemplo*, un monómero de hexaetilenglicol (HEG) (Whitcombe, y otros Nat. Biotech. 17: 804-807 (1999)) al inicio del lazo de horquilla. La sonda normalmente incluye una secuencia de tallo autocomplementaria con un marcador detectable en un extremo y un atenuador en el otro. En los ciclos de amplificación iniciales (*por ejemplo*, PCR), el cebador se hibrida con la diana y la extensión se produce debido a la acción de la polimerasa. El sistema Scorpions™ puede usarse para examinar e identificar mutaciones puntuales con el uso de múltiples sondas que pueden etiquetarse de manera diferente para distinguir entre las sondas. Usando la PCR como ejemplo, después de completar un ciclo de extensión, la región diana recién sintetizada se unirá a la misma cadena que la sonda. Después del segundo ciclo de desnaturalización y alineamiento, la sonda y el objetivo se hibridan. La secuencia de horquilla después se hibrida con una parte del producto de PCR recién producido. Esto da como resultado la separación del marcador detectable del atenuador y produce la emisión de la señal. Otros usos para dichas sondas marcadas se conocen en la técnica y serían adecuados para el uso en los métodos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, los métodos se realizan antes o junto con una reacción de secuenciación. El término "secuenciación" se usa en un sentido amplio en el presente documento y se refiere a cualquier técnica conocida en la técnica que permita identificar el orden de al menos algunos nucleótidos consecutivos en al menos parte de un polinucleótido, por ejemplo, pero sin limitarse a, un ácido nucleico diana o un amplicón. Algunos ejemplos no limitantes de técnicas de secuenciación incluyen el método de terminador didesoxi de Sanger y el método de escisión química de Maxam y Gilbert, que incluyen las variaciones de esos métodos; secuenciación por hibridación; secuenciación por síntesis; y mapeo de restricción. Algunos métodos de secuenciación comprenden electroforesis, que incluye electroforesis capilar y electroforesis en gel; secuenciación por hibridación que incluye hibridación a micromatrices; espectrometría de masas; detección de molécula única; y detección de iones/protones. En algunas realizaciones, la secuenciación comprende secuenciación directa, secuenciación de dúplex, secuenciación cíclica, secuenciación por extensión de una base (SBE), secuenciación en fase sólida o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la secuenciación comprende detectar el producto de secuenciación con el uso de un instrumento, por ejemplo, pero sin limitarse a un secuenciador de ADN ABI Prism® 377, un analizador genético ABI Prism® 310, 3100, 3100-Avant, 3730 o 3730xl, un analizador de ADN ABI Prism® 3700, un secuenciador Ion PGM™ o un secuenciador Ion Proton™ (todos disponibles de Life Technologies Corp., Carlsbad, CA), o un espectrómetro de masas. En algunas realizaciones, la secuenciación comprende incorporar un dNTP, que incluye un dATP, un dCTP, un dGTP, un dTTP, un dUTP, un dITP o combinaciones de los mismos, e incluir análogos didesoxirribonucleótidos de dNTP, en un producto de amplificación.

Las polimerasas de ácido nucleico que pueden emplearse en las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos descritas pueden ser cualquiera que funcione para llevar a cabo la reacción deseada que incluye, por ejemplo, una polimerasa de ácido nucleico de procarionta, fúngica, viral, de bacteriófago, vegetal y/o de eucariota. Como se usa en el presente documento, el término "ADN polimerasa" se refiere a una enzima que sintetiza una cadena de ADN *de novo* con el uso de una cadena de ácido nucleico como molde. La ADN polimerasa utiliza un ADN o ARN existente como molde para la síntesis de ADN y cataliza la polimerización de desoxirribonucleótidos junto con la cadena del molde, el cual lee. La nueva hebra de ADN sintetizada es complementaria a la hebra molde. La ADN polimerasa puede añadir nucleótidos libres solo al extremo 3'-hidroxilo de la nueva cadena de formación. Sintetiza oligonucleótidos a través de la transferencia de un monofosfato de nucleósido de un desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) al grupo 3'-hidroxilo de una cadena de oligonucleótido en crecimiento. Esto da como resultado el alargamiento de la nueva cadena en una dirección 5' a 3'. Dado que la ADN polimerasa solo puede añadir un nucleótido a un grupo 3'-OH preexistente, para comenzar una reacción de síntesis de ADN, la ADN polimerasa necesita un cebador al que pueda agregar el primer nucleótido. Los cebadores adecuados pueden comprender oligonucleótidos de ARN o ADN, o quimeras de los mismos (*por ejemplo*, cebadores quiméricos de ARN/ADN). Las ADN polimerasas pueden ser una ADN polimerasa naturales o una variante de enzima natural que tenga la actividad mencionada anteriormente. Por ejemplo, puede incluir una ADN polimerasa que tiene una actividad de desplazamiento de cadena, una ADN polimerasa que carece de actividad exonucleasa 5' a 3', una ADN polimerasa que tiene una actividad de transcriptasa inversa o una ADN polimerasa que tiene una actividad endonucleasa.

Las polimerasas de ácido nucleico adecuadas también pueden comprender holoenzimas, partes funcionales de las holoenzimas, polimerasa química o cualquier polimerasa modificada que pueda efectuar la síntesis de una molécula de ácido nucleico. Dentro de esta descripción, una ADN polimerasa también puede incluir una polimerasa, transferasa terminal, transcriptasa inversa, telomerasa y/o polinucleótido fosforilasa. Los ejemplos no limitantes de polimerasas pueden incluir, por ejemplo, ADN polimerasa T7, ADN polimerasa y mitocondrial de eucariota, ADN polimerasa de procarionta I, II, III, IV y/o V; polimerasa de eucariota  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$ ,  $\iota$  y/o  $\kappa$ ; ADN polimerasa I de *E. coli*; subunidades alfa y/o épsilon de ADN polimerasa III de *E. coli*; polimerasa IV de *E. coli*, polimerasa V de *E. coli*; ADN polimerasa I de *T. aquaticus*; ADN polimerasa I de *B. stearothermophilus*; polimerasas de *Euryarchaeota*; desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT); polimerasa 4 de *S. cerevisiae*; polimerasas de síntesis a través de lesiones; transcriptasa inversa; y/o telomerasa. Los ejemplos no limitantes de ADN polimerasas termoestables adecuadas que pueden usarse incluyen las ADN polimerasas *Taq*, *Tfi*, *Tfi*, *Pfu* y *Vent*<sup>™</sup>, cualquier ADN polimerasa modificada genéticamente, cualquiera que tenga una actividad exonucleasa 3' a 5' reducida o insignificante (*por ejemplo*, la ADN polimerasa SuperScript<sup>™</sup>) y/o ADN polimerasas modificadas genéticamente (*por ejemplo*, aquellas que tienen la mutación del sitio activo F667Y o el equivalente de F667Y (*por ejemplo*, en *Tth*), AmpliTaq@FS, ThermoSequenase<sup>™</sup>), AmpliTaq@ Gold, ADN polimerasa *Taq* Platinum®, Therminator I, Therminator II, Therminator III, Therminator Gamma (todas disponibles de New England Biolabs, Beverly, MA), y/o cualquiera de los derivados y fragmentos de las mismas. Otras polimerasas de ácido nucleico también pueden ser adecuadas como entendería un experto en la técnica.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona mezclas de reacción para polimerizar y/o amplificar una secuencia de ácido nucleico de interés (*por ejemplo*, una secuencia diana). En algunas realizaciones, la mezcla de reacción puede comprender además un marcador detectable. Los métodos también pueden incluir una o más etapas de detección del marcador detectable para cuantificar el ácido nucleico amplificado. Como se usa en el presente documento, el término "marcador detectable" se refiere a cualquiera de una variedad de moléculas de señalización indicativas de amplificación. Por ejemplo, SYBR® Green y otros colorantes de unión al ADN son marcadores detectables. Dichos marcadores detectables pueden comprender o pueden ser, p. ej., agentes de intercalación o agentes no de intercalación de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, un agente intercalante es un agente o resto capaz de insertarse de forma no covalente entre pares de bases apiladas de una molécula de ácido nucleico bicatenaria. Un agente no intercalante es uno que no se inserta en la molécula de ácido nucleico de doble cadena. El agente de unión a ácido nucleico puede producir una señal detectable directa o indirectamente. La señal puede ser detectable directamente con el uso, por ejemplo, de fluorescencia y/o absorbancia, o indirectamente con el uso, por ejemplo, de cualquier resto o ligando que se afecte de manera detectable por la proximidad al ácido nucleico bicatenario es adecuado, tal como un resto marcado sustituido o ligando de unión unido al agente de unión a ácido nucleico. Normalmente es necesario para que el agente de unión a ácido nucleico produzca una señal detectable cuando se une a un ácido nucleico de doble cadena que sea distinguible de la señal producida cuando ese mismo agente está en disolución o unido a un ácido nucleico de una cadena. Por ejemplo, los agentes intercalantes tales como bromuro de etidio presentan una fluorescencia más intensa cuando se intercalan en el ADN bicatenario que cuando se unen a ADN monocatenario, ARN o en disolución (*ver, por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núm. 5,994,056; 6,171,785; y/o 6,814,934). De manera similar, la actinomicina D emite fluorescencia en la parte roja del espectro UV/VIS cuando se une a ácidos nucleicos monocatenarios, y emite fluorescencia en la parte verde del espectro UV/VIS cuando se une a ácidos nucleicos bicatenarios. Y en otro ejemplo, se ha informado que el psoralen fotorreactivo 4-aminometil-4'-5',8-trimetilpsoralen (AMT) muestra una disminución de la absorción a longitudes de onda largas y fluorescencia al intercalarse en ADN bicatenario (Johnson y otros Photochem. & Photobiol., 33: 785-791 (1981)). Por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 4,257,774 describe la unión directa de intercalantes fluorescentes al ADN (*por ejemplo*, sales de etidio, daunomicina, mepacrina y naranja de acridina, 4',6-diamidino- $\alpha$ -fenilindol). Los agentes no intercalantes (*por ejemplo*, ligandos del surco menor como se describe en el presente documento tales como Hoechst 33258, distamicina, netropsina) también pueden ser adecuados para el uso. Por ejemplo, Hoechst 33258 (Searle, y otros Nucl. Acids Res. 18 (13): 3753-3762 (1990)) muestra fluorescencia alterada con una cantidad creciente de diana. Los ligantes al surco menor se describen con más detalle en otras partes de este documento.

Otros colorantes de unión al ADN están disponibles para el experto en la técnica y pueden usarse solos o en combinación con otros agentes y/o componentes de un sistema de ensayo. Los colorantes de unión al ADN ilustrativos pueden incluir, por ejemplo, acridinas (*por ejemplo*, naranja de acridina, acriflavina), actinomicina D (Jain, y otros J. Mol. Biol. 68:21 (1972)), antramincina, BOBO™-1, BOBO™-3, BO-PRO™-1, cbromomicina, DAPI (Kapuseinski, y otros Nucl. Acids Res. 6(112): 3519 (1979)), daunomicina, distamicina (*por ejemplo*, distamicina D), colorantes descritos en la patente de Estados Unidos núm. 7,387,887, elipticina, sales de etidio (*por ejemplo*, bromuro de etidio), fluorocumanina, intercalantes fluorescentes como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 4,257,774, GelStar® (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, Me.), Hoechst 33258 (Searle y Embrey, Nucl. Acids Res. 18:3753-3762(1990)), Hoechst 33342, homidio, JO-PRO™-1, colorantes LIZ, LO-PRO™-1, mepacrina, mitramicina, colorantes NED, netropsina, 4',6-diamidino- $\alpha$ -fenilindol, proflavina, POPO™-1, POPO™-3, PO-PRO™-1, yoduro de propidio, polipiridilos de rutenio, S5, SYBR® Gold, SYBR® Green I (patentes de Estados Unidos núm. 5,436,134 y 5,658,751), SYBR® Green II, SYTOX® azul, SYTOX® verde, SYTO® 43, SYTO® 44, SYTO® 45, SYTOX® azul, TO-PRO®-1, SYTO® 11, SYTO® 13, SYTO® 15, SYTO® 16, SYTO® 20, SYTO® 23, naranja de tiazol (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.), TOTO™-3, YO-PRO®-1 y YOYO®-3 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), entre otros. SYBR® Green I (*por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núm. 5,436,134; 5,658,751; y/o 6,569,927), por ejemplo, se ha usado para supervisar reacciones de PCR. Otros colorantes de unión al ADN también pueden ser adecuados como entendería un experto en la técnica.

Para el uso como se describe en el presente documento, uno o más marcadores detectables y/o agentes atenuadores pueden unirse a uno o más cebadores y/o sondas (*por ejemplo*, un marcador detectable). El marcador detectable puede emitir una señal cuando está libre o cuando se une a uno de los ácidos nucleicos diana. El marcador detectable también puede emitir una señal cuando está cerca de otro marcador detectable. Los marcadores detectables también se pueden usar con moléculas atenuadoras, de modo que la señal solo sea detectable cuando no esté lo suficientemente cerca de la molécula atenuadora. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sistema de ensayo puede hacer que el marcador detectable se libere de la molécula atenuadora. Se puede usar cualquiera de varios marcadores detectables para marcar los cebadores y las sondas usadas en los métodos descritos en el presente documento. Como se mencionó anteriormente, en algunas realizaciones, el marcador detectable puede unirse a una sonda, que puede incorporarse a un cebador, o puede unirse de otra manera al ácido nucleico diana amplificado (*por ejemplo*, un agente de unión a ácido nucleico detectable tal como un colorante intercalante o no intercalante). Cuando se usa más de un marcador detectable, cada uno debe diferir en sus propiedades espectrales de modo que los marcadores puedan distinguirse entre sí, o de manera que los marcadores detectables juntos emitan una señal que no es emitida por ningún marcador detectable solo. Los marcadores detectables ilustrativos incluyen, por ejemplo, un colorante fluorescente o fluoróforo (*por ejemplo*, un grupo químico que puede excitarse por la luz para emitir fluorescencia o fosforescencia), "colorantes aceptores" capaces de atenuar una señal fluorescente de un colorante donante fluorescente, y similares. Los marcadores detectables adecuados pueden incluir, por ejemplo, fluoresceínas (*por ejemplo*, 5-carboxi-2,7-diclorofluoresceína; 5-carboxifluoresceína (5-FAM); 5-hidroxitriptamina (5-HAT); 6-JOE; 6-carboxifluoresceína (6-FAM); FITC; 6-carboxi-1,4-dicloro-2',7'-diclorofluoresceína (TET); 6-carboxi-1,4-dicloro-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína (HEX); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína (JOE); fluoróforos Alexa fluor® (*por ejemplo*, 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750); fluoróforos BODIPY® (*por ejemplo*, 492/515, 493/503, 500/510, 505/515, 530/550, 542/563, 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650-X, 650/665X, 665/676, FL, FL ATP, FI-Ceramida, R6G SE, TMR, conjugado de TMR-X, TMR-X, SE, TR, TR ATP, TR-X SE), cumarinas (*por ejemplo*, 7-amino-4-metilcumarina, AMC, AMCA, AMCA-S, AMCA-X, ABQ, CPM metilcumarina, faloidina con cumarina, hidroxycumarina, CMFDA, metoxicumarina), calceína, calceína AM, azul calceína, colorantes de calcio (*por ejemplo*, carmín de calcio, verde de calcio, naranja de calcio, blanco de calcoflúor), azul Cascade, amarillo Cascade; colorantes Cy™ (*por ejemplo*, 3, 3.18, 3.5, 5, 5.18, 5.5, 7), GFP cian, Fluorosensor de AMP cíclico (FICRhr), proteínas fluorescentes (*por ejemplo*, proteína fluorescente verde (*por ejemplo*, GFP, EGFP), proteína fluorescente azul (*por ejemplo*, BFP, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalama1), proteína fluorescente cian (*por ejemplo*, ECFP, Cerulean, CyPet), proteína fluorescente amarilla (*por ejemplo*, YFP, Citrine, Venus, YPet), pares donante/aceptor de FRET (*por ejemplo*, fluoresceína/tetrametilrodamina, IAEDANS/fluoresceína, EDANS/dabcyl, fluoresceína/fluoresceína, BODIPY® FL/BODIPY® FL, Fluoresceína/QSY7 y QSY9), LysoTracker® y LysoSensor™ (*por ejemplo*, LysoTracker® Azul DND-22, LysoTracker® Azul-Blanco DPX, LysoTracker® Amarillo HCK-123, LysoTracker® Verde DND-26, LysoTracker® Rojo DND-99, LysoSensor™ Azul DND-167, LysoSensor™ Verde DND-189, LysoSensor™ Verde DND-153, LysoSensor™ Amarillo/Azul DND-160, LysoSensor™ Amarillo/Azul dextrano de PM 10.000), Verde Oregón (*por ejemplo*, 488, 488-X, 500, 514); rodaminas (*por ejemplo*, 110, 123, B, B 200, BB, BG, B extra, 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA), 5 GLD, 6-carboxirrodamina 6G, Lisamina, Lisamina Rodamina B, Falicidina, Faloidina, Rojo, Rhod-2, ROX (6-carboxi-X-rodamina), 5-ROX (carboxi-X-rodamina), Sulforrodamina B can C, Sulforrodamina G Extra, TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina), tetrametilrodamina (TRITC), WT), Rojo Texas, Rojo Texas-X, VIC y otros marcadores descritos, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2009/0197254, entre otros como conocerá el experto en la técnica. También pueden usarse otros marcadores detectables (ver, *por ejemplo*, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2009/0197254), como conocerán los expertos en la técnica. Cualquiera de estos sistemas y marcas detectables, así como muchos otros, se pueden usar para detectar ácidos nucleicos diana amplificados.

Algunos marcadores detectables pueden estar basados en secuencias (también denominados en el presente documento "marcador detectable específico de locus"), por ejemplo, sondas de nucleasa 5'. Dichas sondas pueden comprender una o más marcadores detectables. En la técnica se conocen varios marcadores detectables, por ejemplo (las sondas TaqMan® descritas en el presente documento (ver también la patente de Estados Unidos núm. 5,538,848) varias balizas

moleculares de tallo y lazo (ver, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núm. 6,103,476 y 5,925,517 y Tyagi y Kramer, *Nature Biotechnology* 14:303-308 (1996)), balizas sin tallo o lineales (ver, *por ejemplo*, la publicación PCT núm. WO 99/21881; la patente de Estados Unidos núm. 6,485,901), PNA Molecular Beacons™ (ver, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núm. 6,355,421 y 6,593,091), balizas de PNA lineales (ver, *por ejemplo*, Kubista y otros, SPIE 4264:53-58 (2001)), sondas que no son de FRET (ver, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 6,150,097), sondas Sunrise®/Amplifluor® (patente de Estados Unidos núm. 6,548,250), sondas de tallo y lazo y dúplex Scorpions™ (Solinas y otros, *Nucleic Acids Research* 29:E96 (2001) y la patente de Estados Unidos núm. 6,589,743), sondas de lazo abultado (patente de Estados Unidos núm. 6,590,091), sondas de pseudonudo (patente de Estados Unidos núm. 6,589,250), ciclicones (patente de Estados Unidos núm. 6,383,752), sonda MGB Eclipse™ (Epoch Biosciences), sondas en horquilla (patente de Estados Unidos núm. 6,596,490), sondas Light-up de ácido nucleico peptídico (PNA) (Svanvik, y otros *Anal Biochem* 281:26-35 (2001)), sondas de nanopartículas autoensambladas, sondas modificadas con ferroceno descritas, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 6,485,901; Mhlanga y otros, *Methods* 25:463-471 (2001); Whitcombe y otros, *Nature Biotechnology* 17:804-807 (1999); Isacson y otros, *Molecular Cell Probes* 14:321-328 (2000); Svanvik y otros, *Anal Biochem* 281:26-35 (2000); Wolffs y otros, *Biotechniques* 766:769-771 (2001); Tsourkas y otros, *Nucleic Acids Research* 30:4208-4215 (2002); Riccelli y otros, *Nucleic Acids Research* 30:4088-4093 (2002); Zhang y otros, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (Shanghai) 34:329-332 (2002); Maxwell y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9606-9612 (2002); Broude y otros, *Trends Biotechnol.* 20:249-56 (2002); Huang y otros, *Chem Res. Toxicol.* 15:118-126 (2002); y Yu y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 14:11155-11161 (2001); QuantiProbes® (www.qiagen.com), HyBeacons® (French, y otros *Mol. Cell. Probes* 15:363-374 (2001)), sondas de desplazamiento (Li, y otros *Nucl. Acids Res.* 30:e5 (2002)), HybProbes (Cardullo, y otros *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8790-8794 (1988)), MGB Alert (www.nanogen.com), Q-PNA (Fiandaca, y otros *Genome Res.* 11:609-611 (2001)), Plexor® (www.Promega.com), cebadores LUX™ (Nazarenko, y otros *Nucleic Acids Res.* 30:e37 (2002)), cebadores DzyNA (Todd, y otros *Clin. Chem.* 46:625-630 (2000)). Los marcadores detectables también pueden comprender restos atenuadores no detectables que atenúan la fluorescencia del marcador detectable, que incluyen, por ejemplo, atenuadores Black Hole (Biosearch), atenuadores Iowa Black® (IDT), atenuador QSY (Molecular Probes) y atenuadores de sulfonato/carboxilato de Dabsyl y DabcyI (Epoch). Los marcadores detectables también pueden comprender dos sondas, en donde, por ejemplo, un fluoróforo está en una sonda y un atenuador en la otra, en donde la hibridación de las dos sondas juntas en una diana atenúa la señal, o en donde la hibridación en una diana altera la firma de la señal a través de un cambio en la fluorescencia. Los sistemas ilustrativos también pueden incluir sistemas de ligando FRET, salicilato/DTPA (ver, *por ejemplo*, Oser y otros *Angew. Chem Int. Engl.* 29(10):1 167 (1990)), hibridación por desplazamiento, sondas homólogas y/o ensayos descritos en la patente europea núm. EP 070685 y/o la patente de Estados Unidos núm. 6,238,927. Los marcadores detectables pueden comprender además derivados de sulfonato de colorantes de fluoresceína con SO<sub>3</sub> en lugar del grupo carboxilato, formas de fosforamidita de fluoresceína, formas de fosforamidita de Cy5 (disponibles, por ejemplo, de Amersham).

Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles para detectar y/o cuantificar una variedad de ácidos nucleicos diana de una muestra de ensayo. Un ácido nucleico diana es cualquier ácido nucleico para el cual un sistema de ensayo está diseñado para identificar o detectar que está presente (o no) y/o cuantificar en una muestra de ensayo. Dichos ácidos nucleicos pueden incluir, por ejemplo, los de agentes infecciosos (*por ejemplo*, virus, bacterias, parásitos y similares), un proceso de enfermedad tal como cáncer, diabetes o similares, o para medir una respuesta inmunitaria. Las "muestras de ensayo" ilustrativas incluyen varios tipos de muestras, como las muestras biológicas. Las muestras biológicas ilustrativas incluyen, por ejemplo, un fluido corporal (*por ejemplo*, sangre, saliva, fluido espinal), una muestra de tejido, un producto alimenticio (*por ejemplo*, carne) o bebida (*por ejemplo*, leche), o similares. Los ácidos nucleicos expresados pueden incluir, por ejemplo, genes para los cuales la expresión (o la falta de la misma) se asocia con afecciones médicas tales como enfermedades infecciosas (*por ejemplo*, infecciones bacterianas, virales, fúngicas, protozoarias) o cáncer. Los métodos descritos en el presente documento también pueden usarse para detectar contaminantes (*por ejemplo*, bacterias, virus, hongos y/o protozoos) en productos farmacéuticos, alimenticios o bebidas. Los métodos descritos en el presente documento también pueden usarse para detectar alelos raros en presencia de alelos de tipo silvestre (*por ejemplo*, un alelo mutante en presencia de 10<sup>6</sup>-10<sup>9</sup> alelos de tipo silvestre). Los métodos son útiles para, por ejemplo, detectar una enfermedad residual mínima (*por ejemplo*, células cancerosas restantes raras durante la remisión, especialmente mutaciones en el gen p53 u otros genes supresores de tumores previamente identificados dentro de los tumores), y/o medir la carga mutacional (*por ejemplo*, la frecuencia de mutaciones somáticas específicas presentes en tejidos normales, tales como sangre u orina).

También se proporcionan kits para realizar los métodos descritos en este documento. Como se usa en el presente documento, el término "kit" se refiere a un conjunto empaquetado de componentes relacionados, normalmente uno o más compuestos o composiciones. El kit puede comprender un par de oligonucleótidos para polimerizar y/o amplificar al menos un ácido nucleico diana de una muestra, uno o más detergentes, una polimerasa de ácido nucleico), una mezcla de reacción de arranque en caliente doble y/o una o más sondas correspondientes marcadas con un marcador detectable. El kit también puede incluir muestras que contienen ácidos nucleicos diana predefinidos para usarse en reacciones de control. El kit también puede incluir opcionalmente disoluciones de reserva, tampones, enzimas, marcadores detectables o reactivos requeridos para la detección, tubos, membranas y similares que pueden usarse para completar la reacción de amplificación. En algunas realizaciones, se incluyen múltiples conjuntos de cebadores. En una realización, el kit puede incluir uno o más de, por ejemplo, un tampón (*por ejemplo*, Tris), una o más sales (*por ejemplo*, KCl), glicerol, dNTP (dA, dT, dG, dC, dU), BSA (albúmina de suero bovino) recombinante, un colorante (*por ejemplo*, colorante de referencia pasivo ROX), uno o más detergentes, polietilenglicol (PEG), polivinilpirrolidona (PVP) y/o gelatina (*por ejemplo*, de pescado o bovina).

**EJEMPLOS**

Las mezclas maestras disponibles comercialmente con diferentes mecanismos de arranque en caliente se combinaron y probaron para demostrar la eficacia de una mezcla de reacción de arranque en caliente doble. El diseño experimental se describe en la Tabla 1:

Tabla 1

| Diseño experimental | Condiciones de reacción  |
|---------------------|--|
| Conjunto 1          | - Mezcla maestra Fast SYBR® Green (sola)<br>Mezcla maestra Fast SYBR® Green + Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix (relación 1:1)<br>- Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix (sola) |
| Conjunto 2          | Mezcla maestra Fast SYBR® Green (sola)<br>Mezcla maestra Fast SYBR® Green + Anticuerpo contra Taq Platinum®  |
| Conjunto 3          | Mezcla maestra de PCR Power SYBR® Green (sola)<br>Mezcla maestra de PCR Power SYBR® Green + Anticuerpo contra Taq Platinum®  |

Todas las reacciones se realizaron con 2 ng de ADNc de referencia humana universal (UHR) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y cebadores a 200 nM (se probaron 24 dianas) en un volumen final de 10 µl. Se realizaron cuatro réplicas para cada reacción. La amplificación se realizó en un sistema de PCR en tiempo real ViiA™ 7 (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) después de la incubación a la temperatura del local durante 0 horas o 24 horas (T0 y T24, respectivamente). Después de la incubación a la temperatura del local, la amplificación se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las condiciones de ciclado térmico se establecieron de la siguiente manera:

| Modo de ciclado estándar (cebador con T <sub>m</sub> ≥ 60 °C) |             |          |          |
|---|-------------|----------|----------|
| Etapa   | Temperatura | Duración | Ciclos   |
| Activación de UDG   | 50 °C       | 2 min    | Mantener |
| ADN polimerasa AmpliTaq®,<br>Activación de UP                 | 95 °C       | 2 min    | Mantener |
| Desnaturalizar  | 95 °C       | 15 s     | 40       |
| Asociar/Extender  | 60 °C       | 1 min    |          |

| Modo de ciclado estándar para Cebador con T <sub>m</sub> ≤ 60 °C |             |          |          |
|--|-------------|----------|----------|
| Etapa  | Temperatura | Duración | Ciclos   |
| Activación de UDG  | 50 °C       | 2 min    | Mantener |
| ADN polimerasa AmpliTaq®,<br>Activación de UP                    | 95 °C       | 2 min    | Mantener |
| Desnaturalizar   | 95 °C       | 15 s     | 40       |
| Asociar  | 55-60 °C    | 15 s     |          |
| Extender   | 72 °C       | 1 min    |          |

En algunos casos, Power SYBR® Green qPCR SuperMix o la mezcla maestra Fast SYBR® Green se incubó durante toda la noche (16-20 horas) con anticuerpo contra Taq Platinum®. Todos los componentes probados están disponibles comercialmente y se compraron de Life Technologies Corporation.

En las Figuras 1A-1D, el ácido nucleico diana se amplificó con 24 conjuntos de cebadores con el uso de una mezcla de reacción de arranque en caliente simple o doble. Las mezclas de reacción de arranque en caliente simple usaron mezcla maestra Fast SYBR® Green sola (línea "con cuadrados") o Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix sola (línea "con cruces"). La mezcla de reacción de arranque en caliente doble usó una combinación 1:1 de mezcla maestra Fast SYBR® Green y Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix (línea "con triángulos"). Los tres conjuntos de reacciones se incubaron a la temperatura del local durante 0 horas ("T0") o 24 horas ("T24") antes de la amplificación. En muchos de los ensayos, la combinación de los dos mecanismos de arranque en caliente diferentes dio como resultado una disminución en la formación de productos no específicos (ver las Figuras 1A (T0, ADNc), 1B (T0, producto no específico ("NTC")), 1C (T24, ADNc) y 1D (T24, NTC)).

En las Figuras 2A-2D, se seleccionaron amplicones individuales y se analizaron mediante el análisis de la curva de fusión. La Figura 2A demuestra que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble produce una reducción de 4 veces en la formación de productos no específicos en comparación con la mezcla de reacción de arranque en caliente simple (mezcla maestra Fast SYBR® Green) y una reducción de 2 veces en comparación con la otra mezcla de reacción de arranque en caliente simple (Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix) después de 0 horas a la temperatura del local. La Figura 2B demuestra que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble proporciona una reducción de 2 veces en la formación de productos no específicos en comparación con cada una de las mezclas de reacción de arranque en caliente simple después de una preincubación de 24 horas a la temperatura del local. Las Figuras 2C y 2D muestran que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble proporciona al menos una reducción de 50 % en productos no específicos en la preincubación de 0 horas a la temperatura del local (Figura 2C) y una reducción de 100 % en productos no específicos después de 24 horas de preincubación a la temperatura del local (Figura 2D). La Figura 2E compara el Ct promedio y el análisis de ACt de las reacciones de amplificación del efecto de las mezclas de reacción de arranque en caliente simple y doble sobre la reducción de la formación de productos no específicos. La Figura 2F muestra una comparación de los análisis de la curva de fusión de las mezclas de reacción de arranque en caliente simple y doble que demuestran que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce significativamente la formación de productos no específicos a 0 y 24 horas de preincubación a la temperatura del local (como se muestra por una reducción en la señal  $\Delta R_n$  de NTC).

En las Figuras 3A-3D, el ácido nucleico diana se amplificó con 24 conjuntos de cebadores con el uso de una mezcla de reacción de arranque en caliente simple o doble. Las mezclas de reacción de arranque en caliente simple usaron mezcla maestra Fast SYBR® Green sola (línea "con rombos") o en combinación con anticuerpo contra *Taq* Platinum® (línea "con cruces"). Ambos conjuntos de reacciones se incubaron a la temperatura del local durante 0 horas ("T0") o 24 horas ("T24") antes de la amplificación. En muchos de los ensayos, la combinación de los dos mecanismos de arranque en caliente diferentes dio como resultado una disminución en la formación de productos no específicos (ver las Figuras 3A (T0, ADNc), 3B (T0, producto no específico ("NTC")), 3C (T24, ADNc) y 3D (T24, NTC)).

En las Figuras 4A-4D, se seleccionaron amplicones individuales y se analizaron mediante el análisis de la curva de fusión. La Figura 4A demuestra que la mezcla de reacción de arranque en caliente simple, mezcla maestra Fast SYBR® Green, produce productos no específicos, especialmente después de una preincubación de 24 horas a la temperatura del local. La Figura 4B demuestra que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble da como resultado una reducción de 75 % en la formación de productos no específicos en T0 y una reducción de 100 % en la formación de productos no específicos en T24. La Figura 4C demuestra que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos tanto en T0 como en T24 y que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en 20-25 % (dependiendo del valor umbral usado).

En las Figuras 5A-5D, el ácido nucleico diana se amplificó con 24 conjuntos de cebadores con el uso de una mezcla de reacción de arranque en caliente simple o doble. Las mezclas de reacción de arranque en caliente simple usaron mezcla maestra de PCR *Power* SYBR® Green sola (línea "con rombos") o en combinación con anticuerpo contra *Taq* Platinum® (línea "con cruces"). Ambos conjuntos de reacciones se incubaron a la temperatura del local durante 0 horas ("T0") o 24 horas ("T24") antes de la amplificación. En muchos de los ensayos, la combinación de los dos mecanismos de arranque en caliente diferentes dio como resultado una disminución en la formación de productos no específicos (ver las Figuras 5A (T0, ADNc), 5B (T0, producto no específico ("NTC")), 5C (T24, ADNc) y 5D (T24, NTC)).

En las Figuras 6A-6D, se seleccionaron amplicones individuales y se analizaron mediante el análisis de la curva de fusión. La Figura 6A demuestra que la mezcla de reacción de arranque en caliente simple, mezcla maestra de PCR *Power* SYBR® Green, produce productos no específicos, especialmente después de una preincubación de 24 horas a la temperatura del local. La Figura 6B demuestra que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble da como resultado una reducción de 50 % en la formación de productos no específicos en 24 horas. La Figura 6C demuestra que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos tanto en T0 como en T24 (como se muestra por una caída en los valores de Ct) y que la mezcla de reacción de arranque en caliente doble reduce la formación de productos no específicos en 3 veces en T0 y en 10 % en T24.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende:
  - a) una primera polimerasa de ácido nucleico;
  - 5 b) un primer mecanismo de arranque en caliente que comprende anticuerpos o combinaciones de anticuerpos que se unen a la primera polimerasa de ácido nucleico; y
  - c) un segundo mecanismo de arranque en caliente que comprende un agente que media una modificación química reversible de la primera polimerasa, o un oligonucleótido o un ligando dependiente de la temperatura que se une a la primera polimerasa;

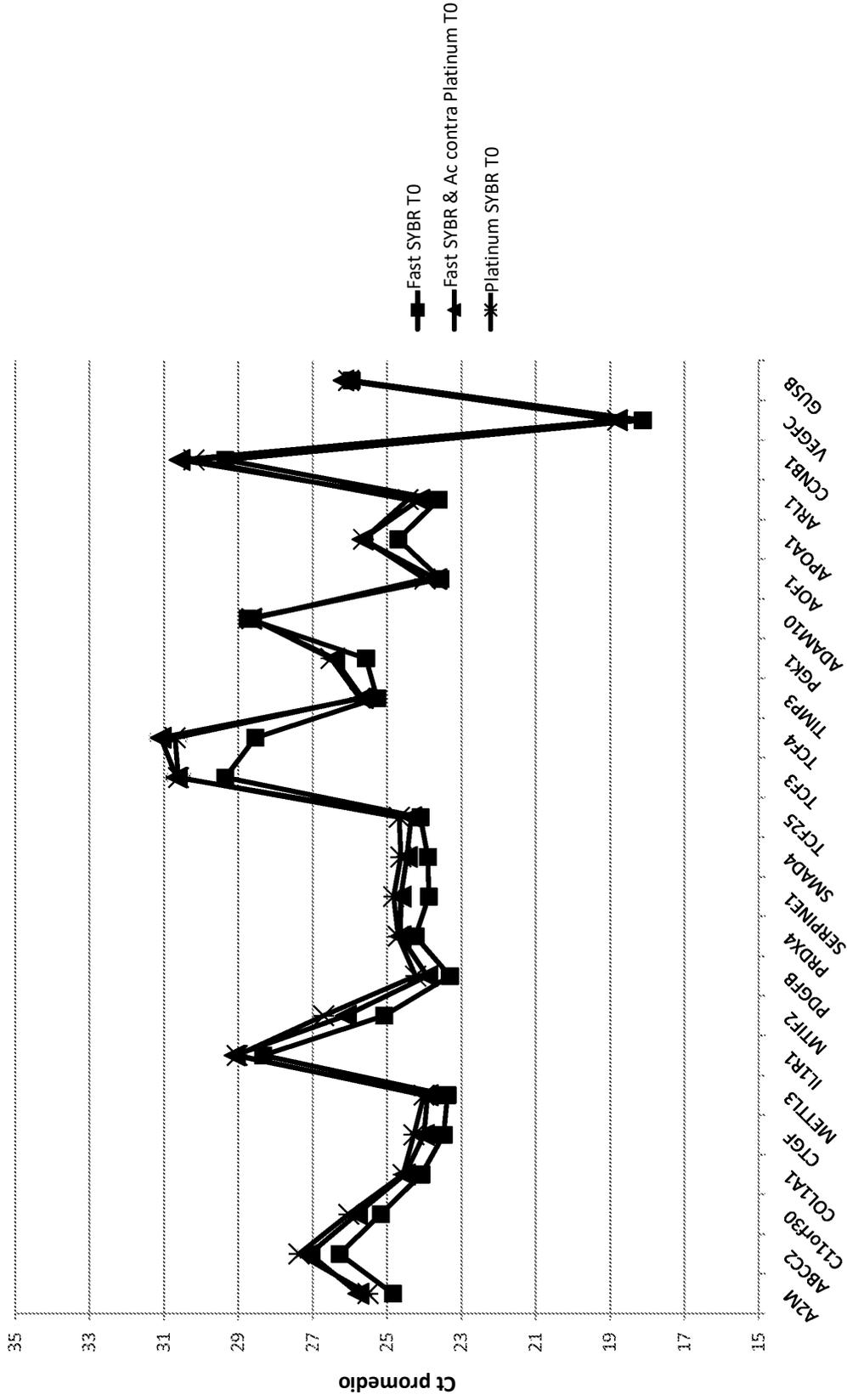
10 en donde el primer mecanismo de arranque en caliente y el segundo mecanismo de arranque en caliente, juntos, son capaces de inhibir sustancialmente la actividad de la primera polimerasa a una primera temperatura, pero no a una segunda temperatura más alta.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde la polimerasa de ácido nucleico es una ADN polimerasa dependiente de ADN o una ADN polimerasa dependiente de ARN.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde la polimerasa de ácido nucleico es termoestable.
4. La composición de la reivindicación 1, en donde la polimerasa de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ADN polimerasa *Taq*, ADN polimerasa *Tfi*, ADN polimerasa *Tfi*, ADN polimerasa *Pfu*.
5. La composición de la reivindicación 1, en donde el primer y el segundo mecanismo de arranque en caliente inhiben sustancialmente la actividad polimerasa de la primera polimerasa de ácido nucleico a una temperatura menor que aproximadamente 40 °C y en donde el primer y el segundo mecanismo de arranque en caliente no inhiben sustancialmente la actividad polimerasa de la primera polimerasa de ácido nucleico a una temperatura mayor que aproximadamente 40 °C.
6. Un método para amplificar un ácido nucleico diana que comprende:
  - a) poner en contacto el ácido nucleico diana con una composición que comprende una primera polimerasa de ácido nucleico, un primer mecanismo de arranque en caliente que comprende anticuerpos o combinaciones de anticuerpos que se unen a la primera polimerasa de ácido nucleico, un segundo mecanismo de arranque en caliente que comprende un agente que media una modificación química reversible de la primera polimerasa o un oligonucleótido o ligando dependiente de la temperatura que se une a la primera polimerasa, al menos un cebador y al menos un dNTP a una primera temperatura, para formar así una composición de reacción;
  - 30 b) calentar la composición de reacción a una segunda temperatura; y
  - c) amplificar el ácido nucleico diana en la composición de reacción;

35 en donde el primer y el segundo mecanismo de arranque en caliente, juntos, inhiben la primera polimerasa de ácido nucleico a la primera temperatura, pero no a la segunda temperatura.
- 40 7. El método de la reivindicación 6, en donde la polimerasa de ácido nucleico es termoestable.
8. El método de la reivindicación 6, en donde la polimerasa de ácido nucleico es una ADN polimerasa dependiente de ADN o una ADN polimerasa dependiente de ARN.
- 45 9. El método de la reivindicación 6, en donde la primera polimerasa de ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en ADN polimerasa *Taq*, ADN polimerasa *Tfi*, ADN polimerasa *Tfi*, ADN polimerasa *Pfu*.
10. El método de la reivindicación 6, en donde la composición comprende al menos un colorante de unión a ácido nucleico.
- 50 11. Un conjunto empaquetado de componentes relacionados, que comprende:
  - a) la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
  - b) un par de oligonucleótidos para polimerizar y/o amplificar al menos un ácido nucleico diana de una muestra, dNTP, una sonda marcada de manera detectable y/o un colorante.
- 55 12. El conjunto empaquetado de componentes relacionados de la reivindicación 11, en donde a) y uno o más de los componentes de b) están en contenedores o tubos separados.
13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además al menos un colorante de unión a ácido nucleico.
- 60 14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el segundo mecanismo de arranque en caliente es un oligonucleótido dependiente de la temperatura.

15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o el método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el oligonucleótido comprende un análogo de nucleótido.

ADNc T0 con mezcla maestra Fast SYBR® Green & Platinum® SYBR® Green

qPCR SuperMix



Ensayo

Figura 1A

NTC T0 con mezcla maestra Fast SYBR® Green & Platinum® SYBR® Green  
qPCR SuperMix

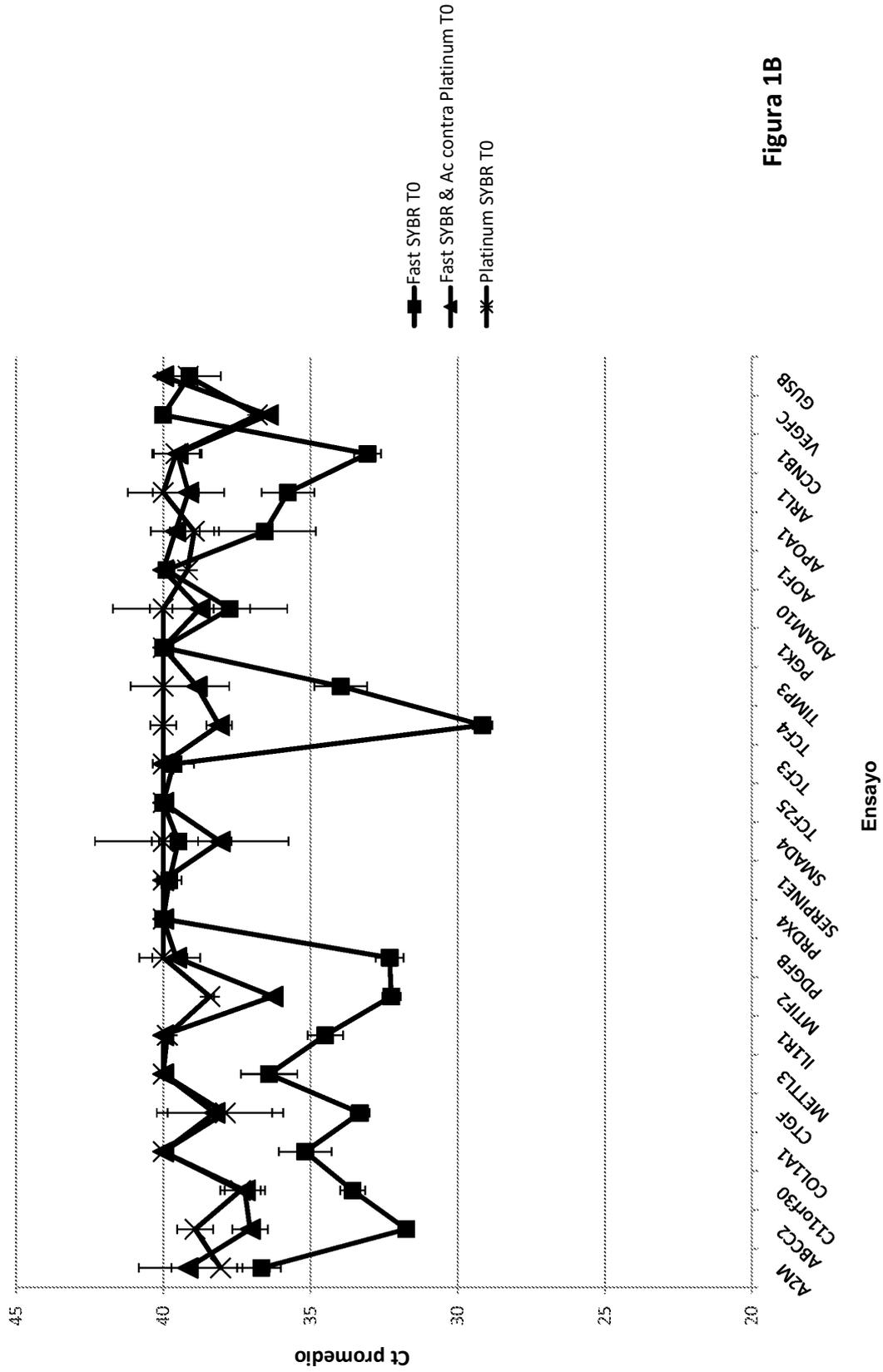


Figura 1B

ADNc T24 con mezcla maestra Fast SYBR® Green & Platinum® SYBR®  
Green qPCR SuperMix

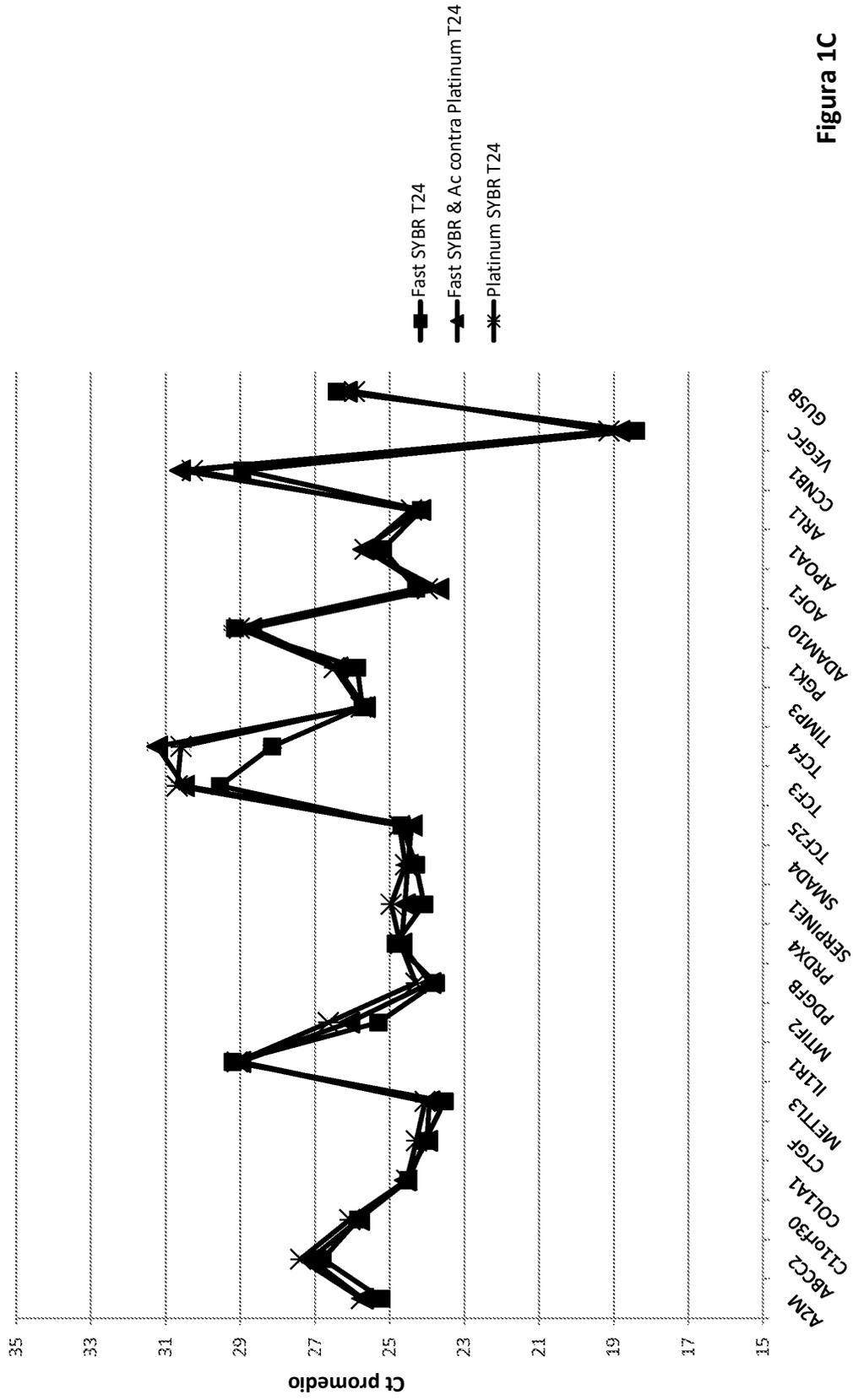


Figura 1C

NTC T24 con mezcla maestra Fast SYBR® Green & Platinum® SYBR® Green  
qPCR SuperMix

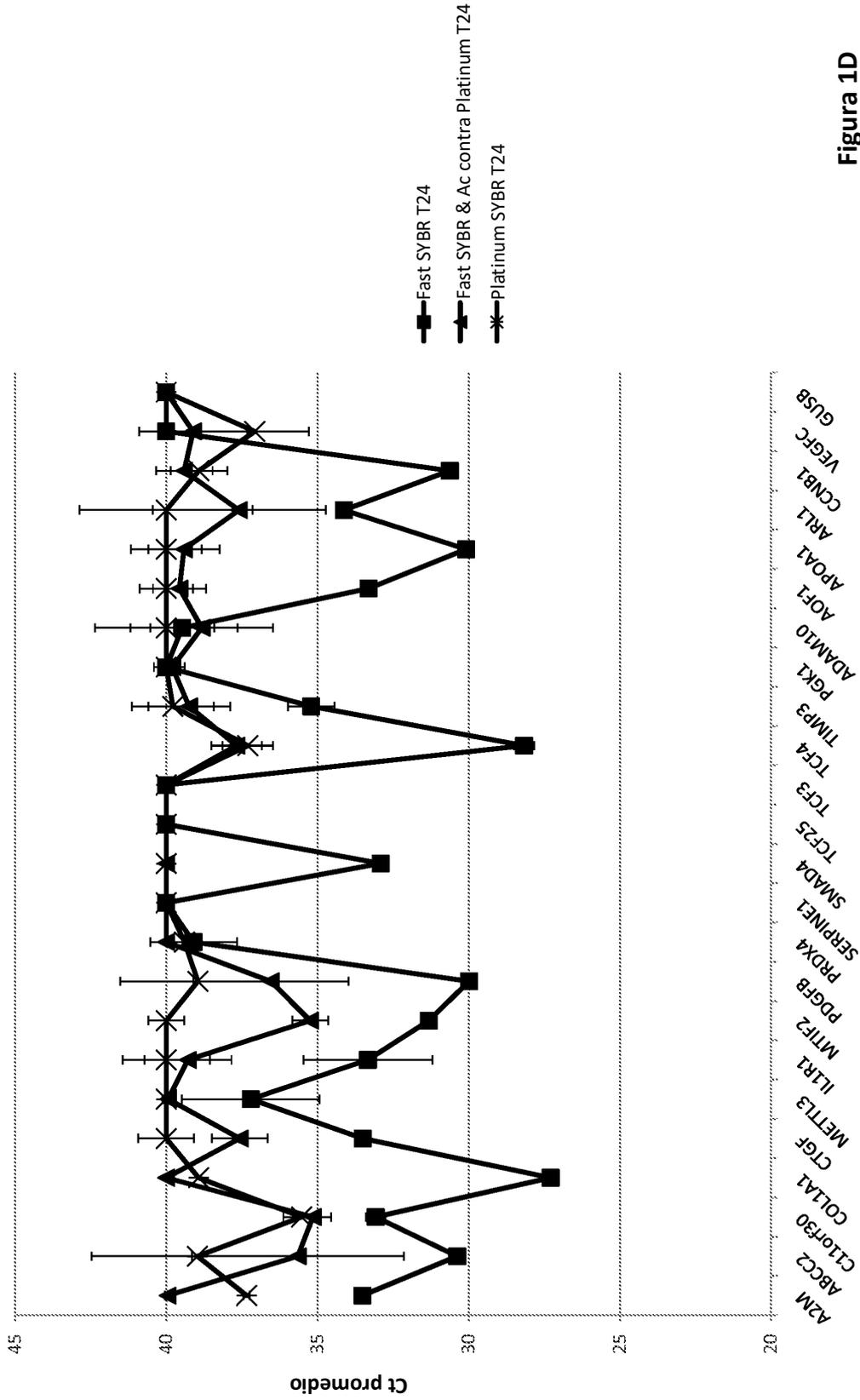
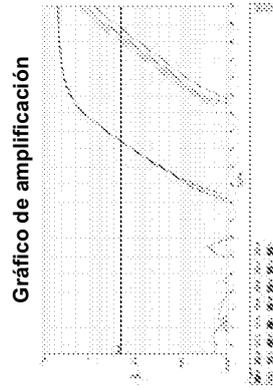
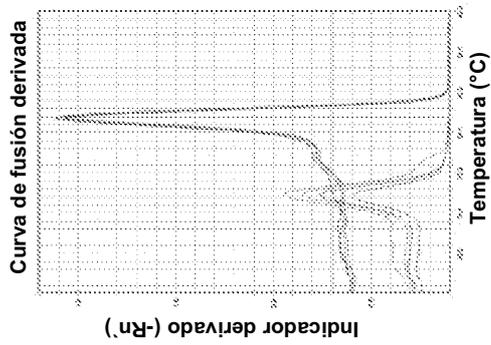


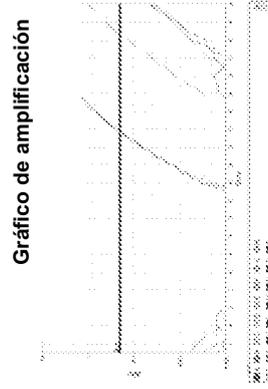
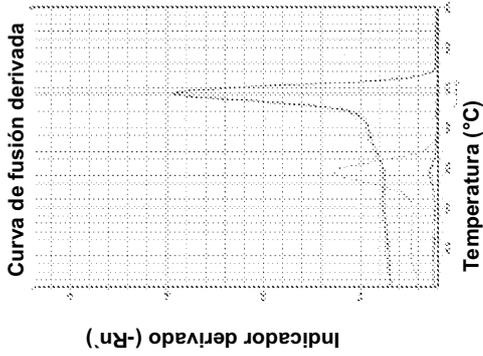
Figura 1D

Ensayo

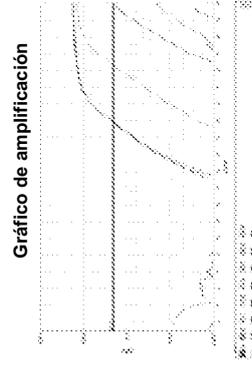
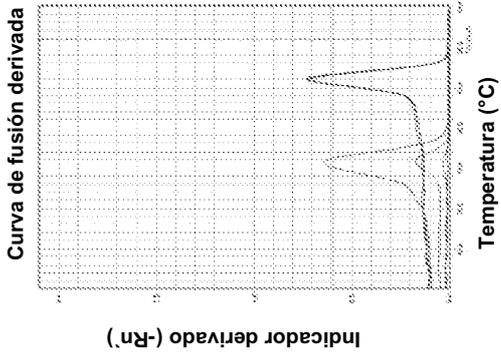
Ensayo de A2M - ADNc/NTC - T0



Fast SYBR®



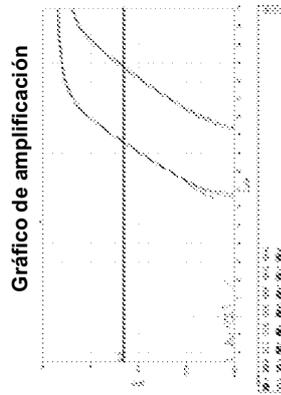
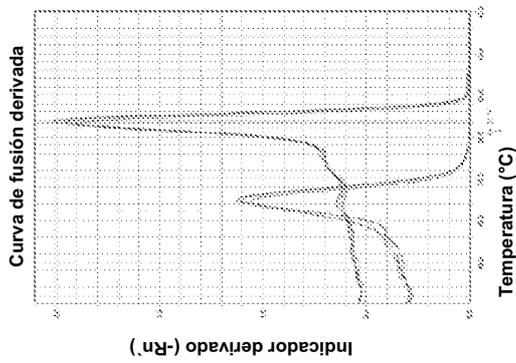
Mezcla de Fast SYBR® & Platinum® SYBR®



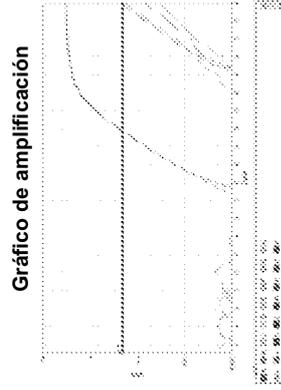
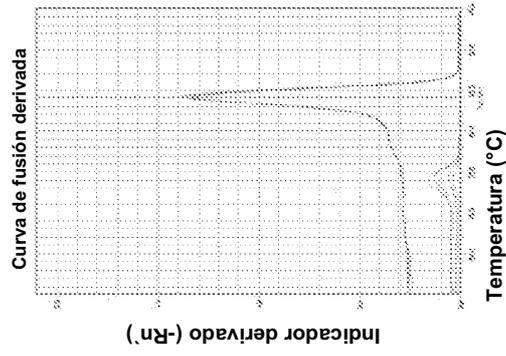
Platinum® SYBR®

Figura 2A

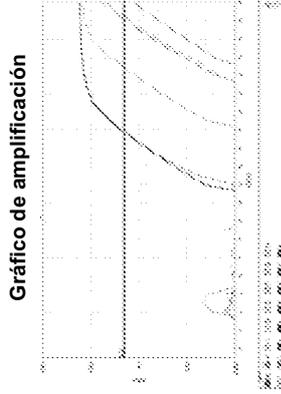
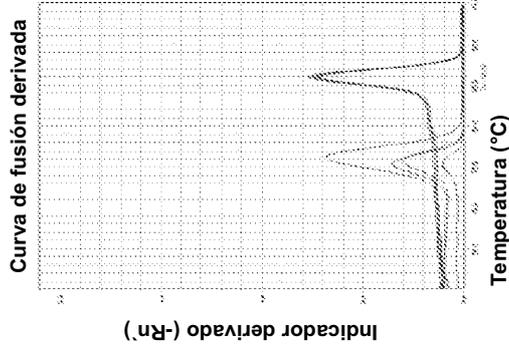
Ensayo de A2M - ADNc/NTC - T24



Fast SYBR®



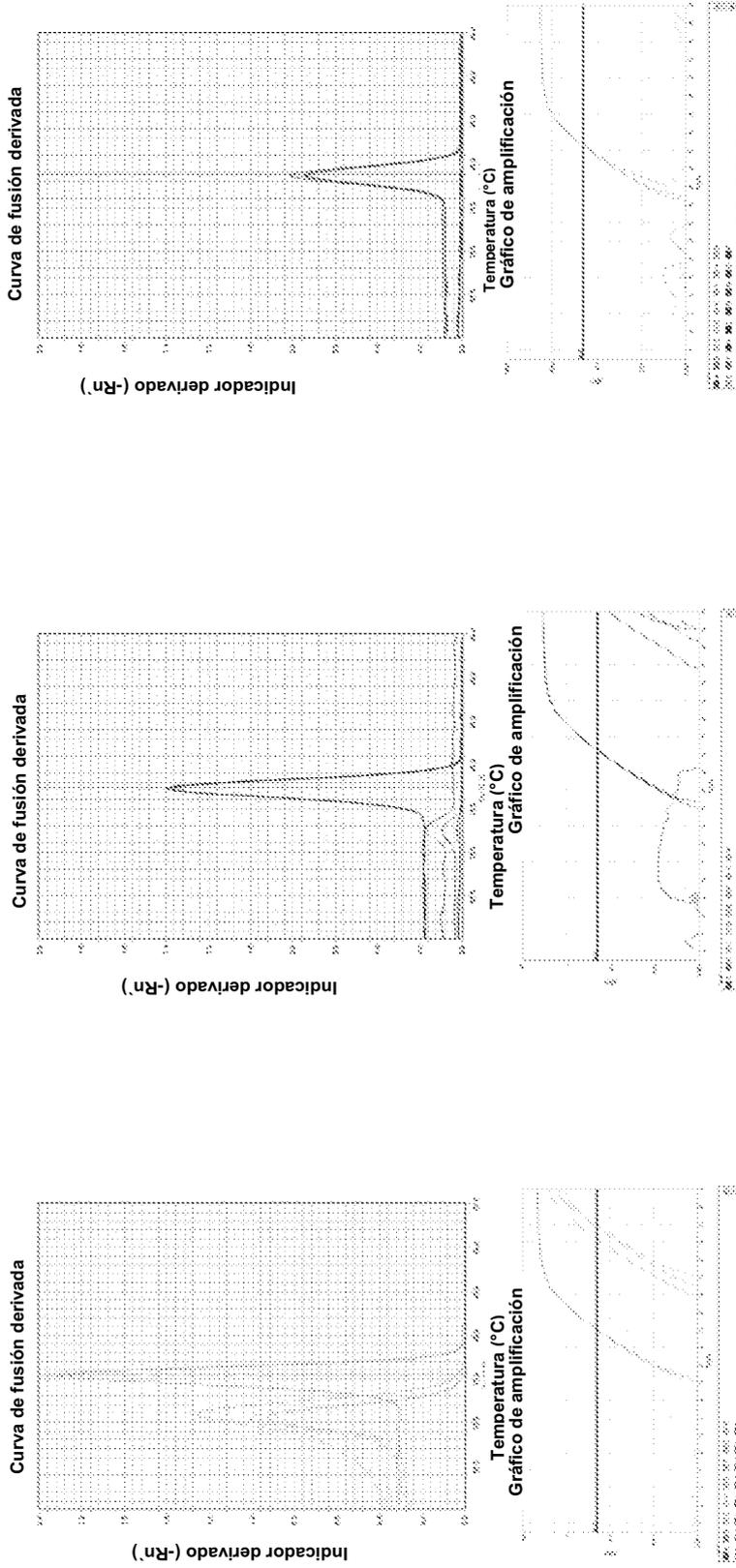
Mezcla de Fast SYBR® & Platinum® SYBR®



Platinum® SYBR®

Figura 2B

Ensayo de COL1 A1 - ADNc/NTC - T0



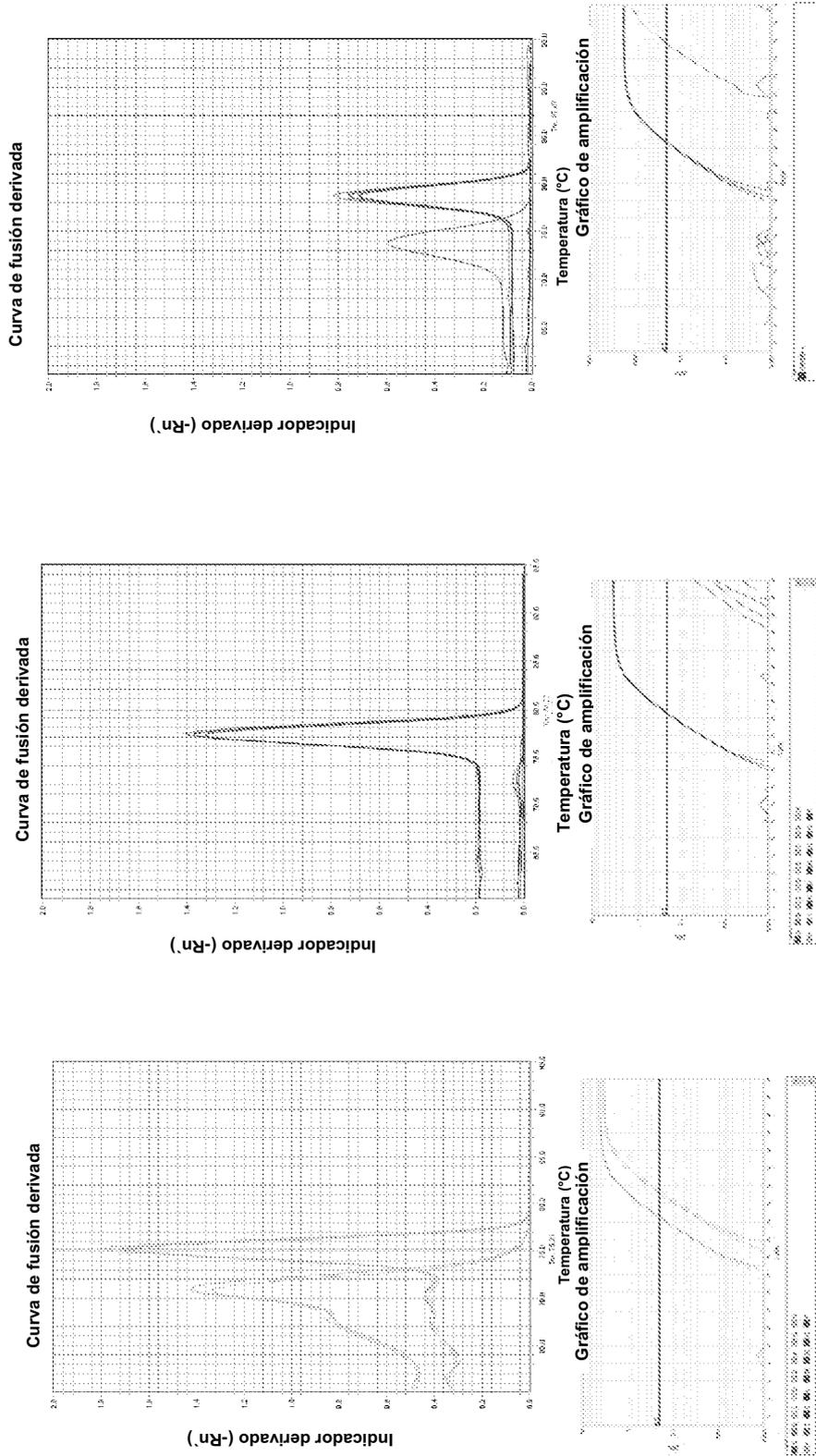
Fast SYBR®

Mezcla de Fast SYBR® & Platinum® SYBR®

Platinum® SYBR®

Figura 2C

Ensayo de COL1 A1 - ADNc/NTC - T24



Fast SYBR®

Mezcla de Fast SYBR® & Platinum® SYBR®

Platinum® SYBR®

Figura 2D

Comparación de Ct promedio y  $\Delta Ct$  para Fast SYBR® & Platinum® SYBR®

| A2M   | T0            |              |               | T24           |              |       | $\Delta Ct$ (24H - 0H) |  |
|---|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|-------|------------------------|--|
|   | ADNc promedio | NTC promedio | ADNc promedio | ADNc promedio | NTC promedio | cDNA  | NTC                    |  |
| <b>Fast SYBR</b>                                  | 24.84         | 36.66        | 25.22         | 33.51         | 0.38         | -3.15 |                        |  |
| <b>Fast SYBR &amp; Anticuerpo contra Platinum</b> | 25.77         | 39.16        | 25.72         | 39.95         | -0.05        | 0.78  |                        |  |
| <b>Platinum SYBR</b>                              | 25.51         | 38.05        | 25.75         | 37.34         | 0.24         | -0.71 |                        |  |

| COL1A1  | T0            |              |               | T24           |              |       | $\Delta Ct$ (24H - 0H) |  |
|---|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|-------|------------------------|--|
|   | ADNc promedio | NTC promedio | ADNc promedio | ADNc promedio | NTC promedio | cDNA  | NTC                    |  |
| <b>Fast SYBR</b>                                  | 24.07         | 35.17        | 24.50         | 27.25         | 0.43         | -7.89 |                        |  |
| <b>Fast SYBR &amp; Anticuerpo contra Platinum</b> | 24.52         | 40.00        | 24.59         | 40.00         | 0.07         | 0.00  |                        |  |
| <b>Platinum SYBR</b>                              | 24.57         | 40.00        | 24.54         | 38.93         | -0.03        | -1.07 |                        |  |

| IL1R1   | T0            |              |               | T24           |              |       | $\Delta Ct$ (24H - 0H) |  |
|---|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|-------|------------------------|--|
|   | ADNc promedio | NTC promedio | ADNc promedio | ADNc promedio | NTC promedio | cDNA  | NTC                    |  |
| <b>Fast SYBR</b>                                  | 28.33         | 34.49        | 29.21         | 33.33         | 0.88         | -1.16 |                        |  |
| <b>Fast SYBR &amp; Anticuerpo contra Platinum</b> | 29.09         | 40.00        | 29.00         | 39.28         | -0.09        | -0.72 |                        |  |
| <b>Platinum SYBR</b>                              | 29.03         | 39.36        | 29.08         | 40.00         | 0.05         | 0.14  |                        |  |

Figura 2E

Análisis de la curva de fusión de Fast SYBR® y Platinum SYBR®

| Mezcla maestra<br>Tiempo | Fast SYBR |           | Fast SYBR & Ac<br>contra Platinum |           | Platinum SYBR |           |
|--------------------------|-----------|-----------|-----------------------------------|-----------|---------------|-----------|
|                          | T0        | T24       | T0                                | T24       | T0            | T24       |
| A2M                      | 4         | 4         | 1                                 | 0         | 1             | 3         |
| ABCC2                    | 4         | 4         | 4                                 | 4         | 2             | 2         |
| ADAM10                   | 3         | 1         | 2                                 | 1         | 0             | 0         |
| AOF1                     | 0         | 4         | 0                                 | 1         | 1             | 0         |
| APOA1                    | 4         | 4         | 1                                 | 1         | 1             | 0         |
| ARL1                     | 4         | 4         | 1                                 | 2         | 0             | 0         |
| CL1orf50                 | 4         | 4         | 4                                 | 4         | 3             | 4         |
| CCNB1                    | 4         | 4         | 1                                 | 1         | 1             | 1         |
| COL1A1                   | 4         | 4         | 0                                 | 0         | 0             | 1         |
| CTGF                     | 4         | 4         | 2                                 | 4         | 1             | 0         |
| METTL3                   | 4         | 3         | 0                                 | 0         | 0             | 0         |
| HJRI1                    | 4         | 4         | 0                                 | 1         | 0             | 0         |
| MTIF2                    | 4         | 4         | 4                                 | 4         | 4             | 0         |
| PDGFB                    | 4         | 4         | 1                                 | 3         | 0             | 1         |
| PRDX4                    | 0         | 1         | 0                                 | 0         | 0             | 1         |
| SERPINE1                 | 1         | 0         | 0                                 | 0         | 0             | 0         |
| SMAD4                    | 2         | 4         | 2                                 | 0         | 0             | 0         |
| TCF25                    | 0         | 0         | 0                                 | 0         | 0             | 0         |
| TCF3                     | 1         | 0         | 1                                 | 0         | 0             | 0         |
| TCF4                     | 4         | 4         | 4                                 | 3         | 0             | 2         |
| TIMP3                    | 4         | 4         | 2                                 | 2         | 0             | 1         |
| VEGFC                    | 0         | 0         | 4                                 | 1         | 4             | 3         |
| GUSB                     | 2         | 0         | 0                                 | 0         | 1             | 0         |
| FGK1                     | 0         | 0         | 0                                 | 1         | 0             | 0         |
| <b>Total</b>             | <b>65</b> | <b>65</b> | <b>34</b>                         | <b>34</b> | <b>19</b>     | <b>19</b> |

| Número de<br>NTC no 40 | Fast SYBR |          | Fast SYBR & Ac<br>contra Platinum |          | Platinum SYBR |          |
|------------------------|-----------|----------|-----------------------------------|----------|---------------|----------|
|                        | T0        | T24      | T0                                | T24      | T0            | T24      |
| Umbral de 0,2          | 68        | 66       | 39                                | 39       | 23            | 18       |
| Umbral automático      | 68        | 66       | 42                                | 42       | 25            | 26       |
| Valor umbral           | 0.167369  | 0.187027 | 0.125522                          | 0.102389 | 0.105091      | 0.084407 |

\* Anomalia definida como cualquier pico de la curva de fusión por encima de 0,2 ΔRn

Figura 2F

ADNc T0 con mezcla maestra Fast SYBR® Green & Anticuerpo contra Taq Platinum®

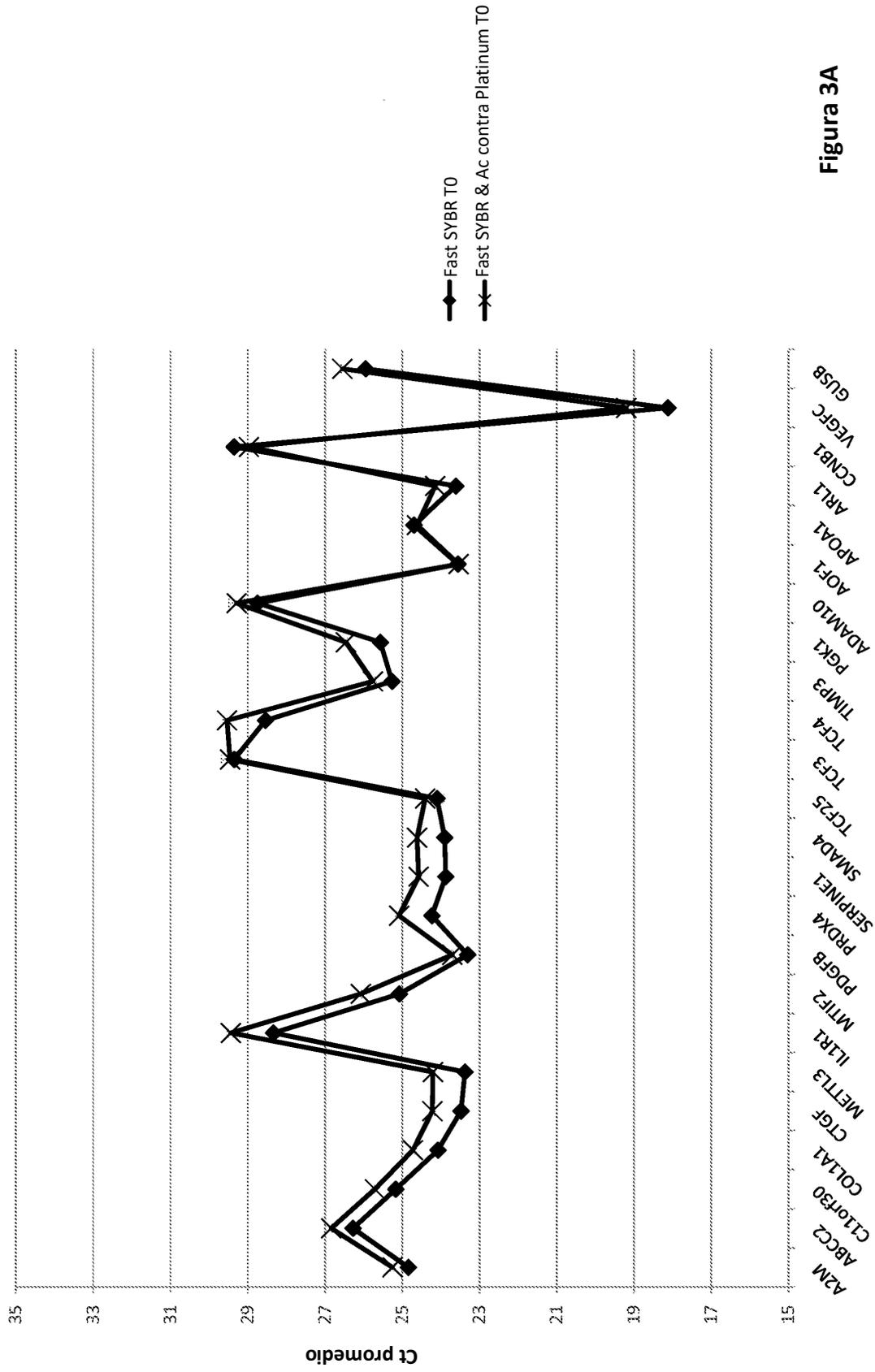


Figura 3A

Ensayo

NTC T0 con mezcla maestra Fast SYBR® Green & Anticuerpo contra Taq Platinum®

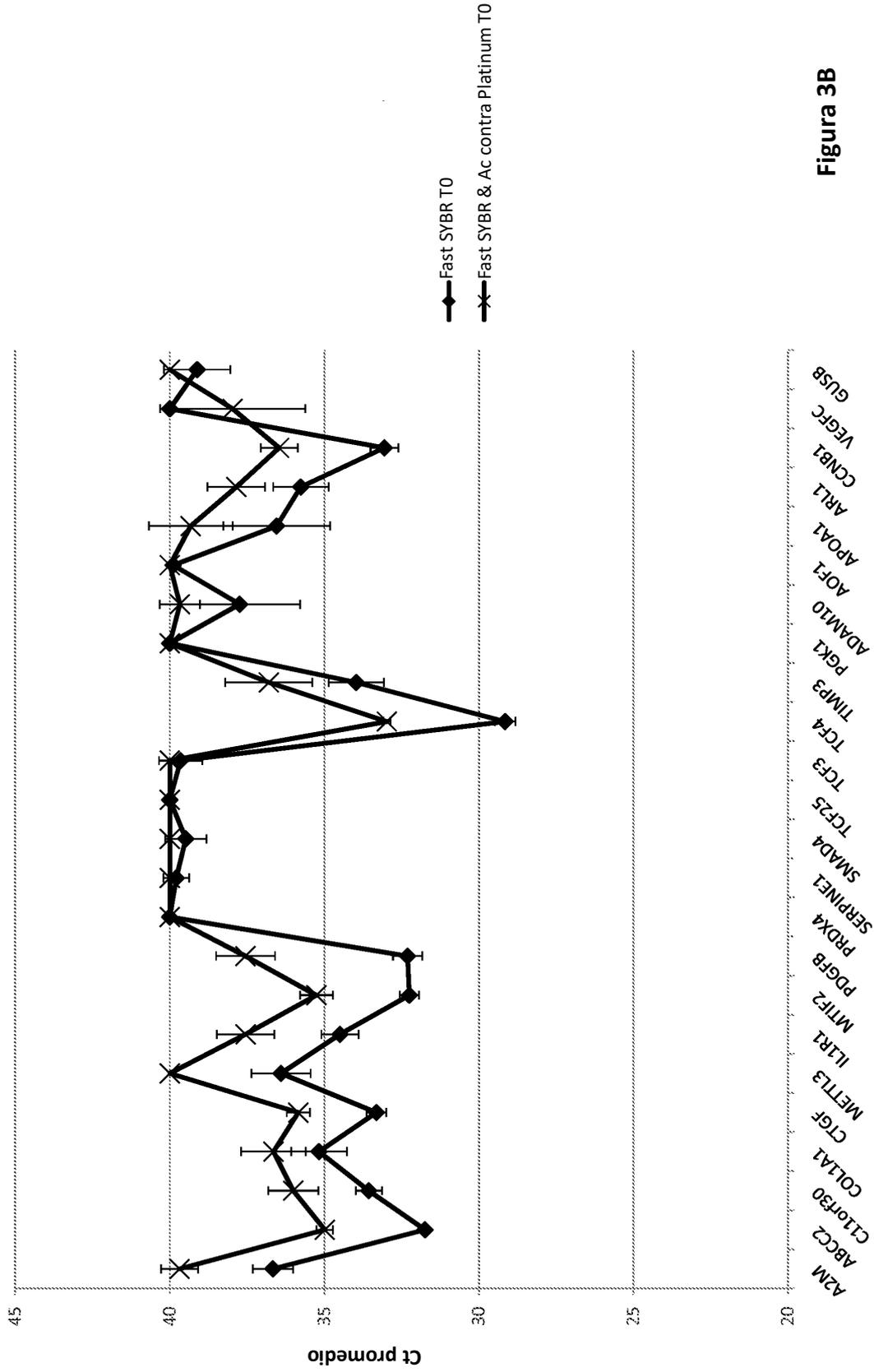
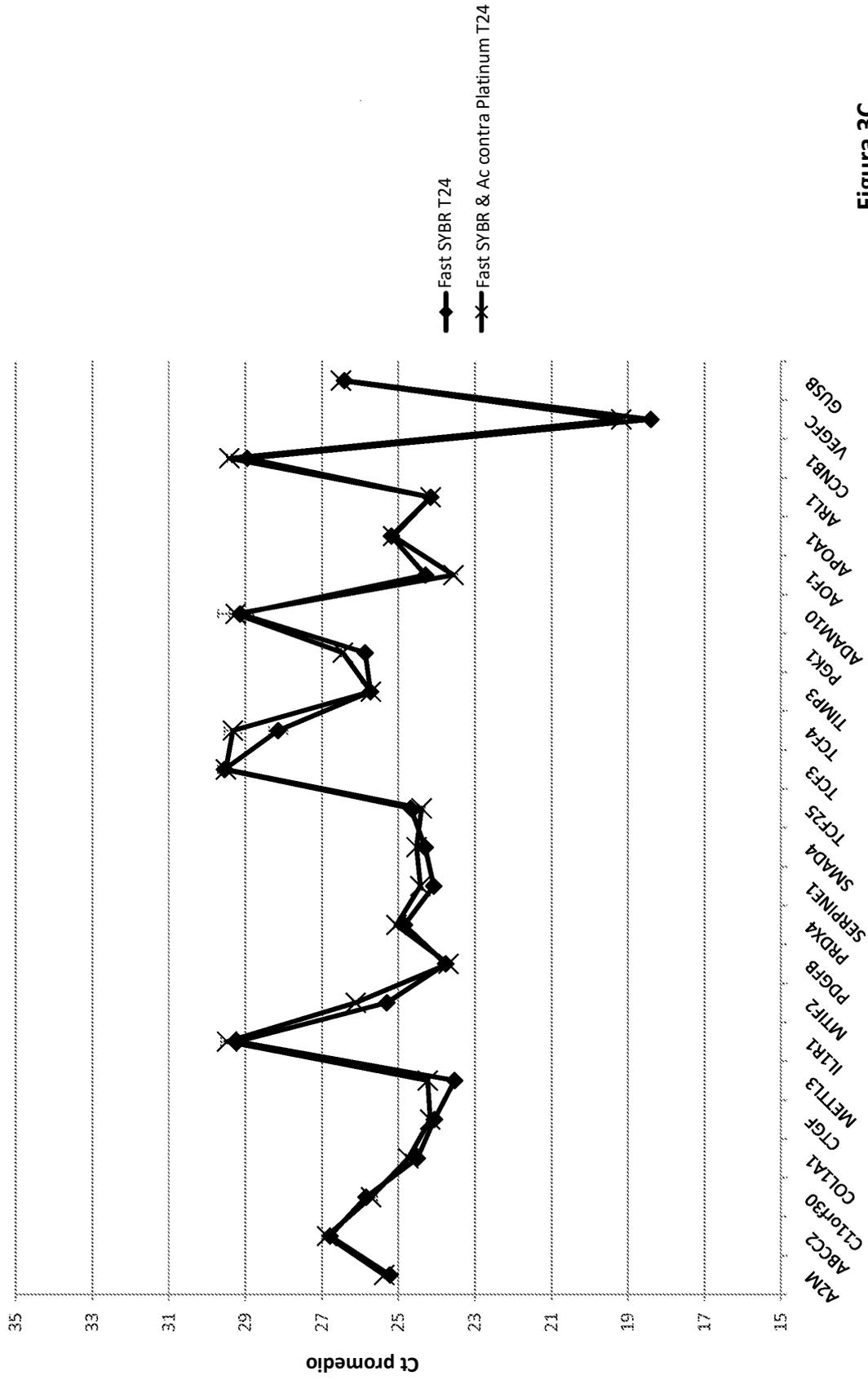


Figura 3B

ADNc T24 con mezcla maestra Fast SYBR® Green & Anticuerpo contra Taq Platinum®



Ensayo

Figura 3C

NTC T24 con mezcla maestra Fast SYBR® Green & Anticuerpo contra Taq Platinum®

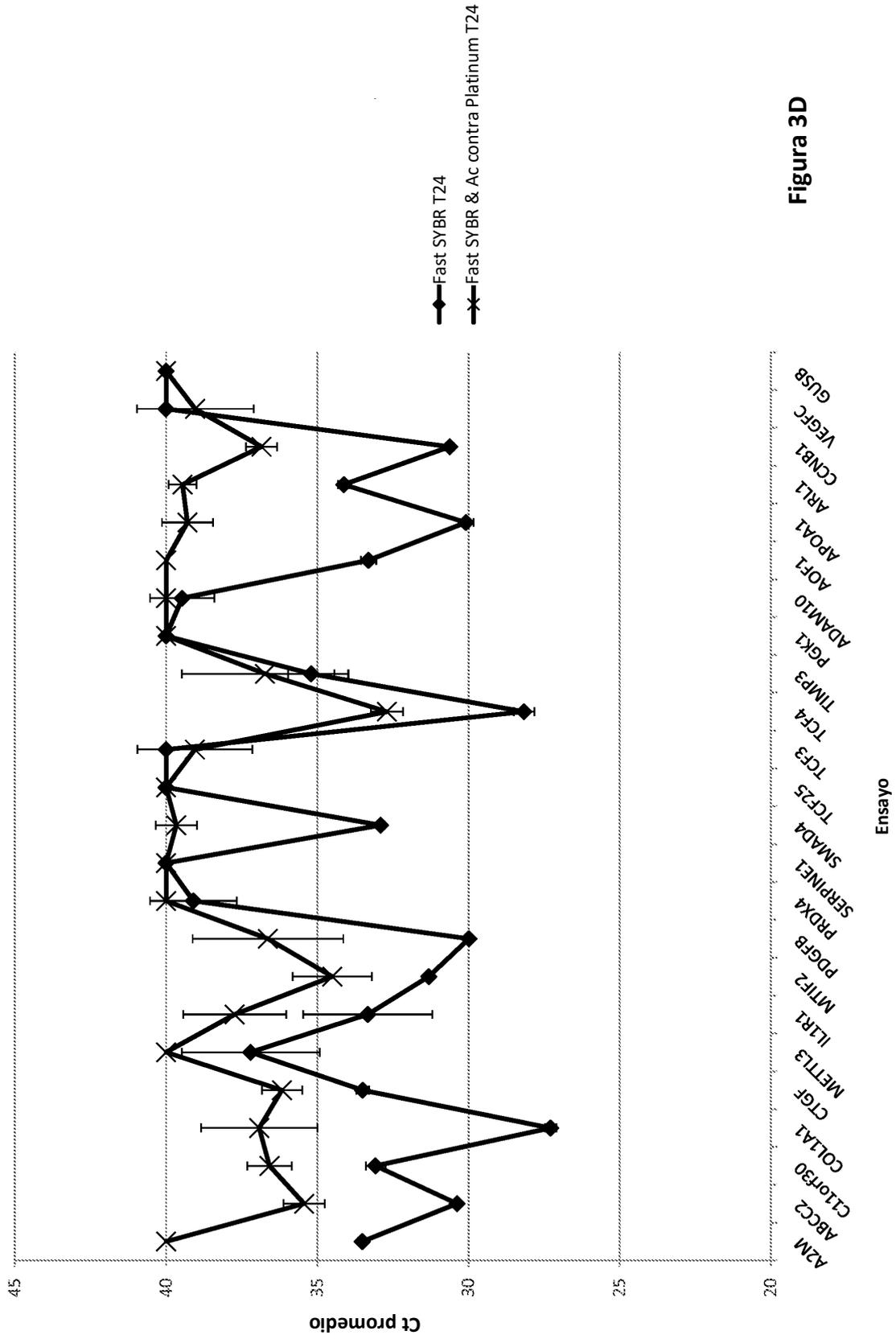


Figura 3D

Ensayo de A2M: Análisis de la curva de fusión con mezcla maestra Fast SYBR®

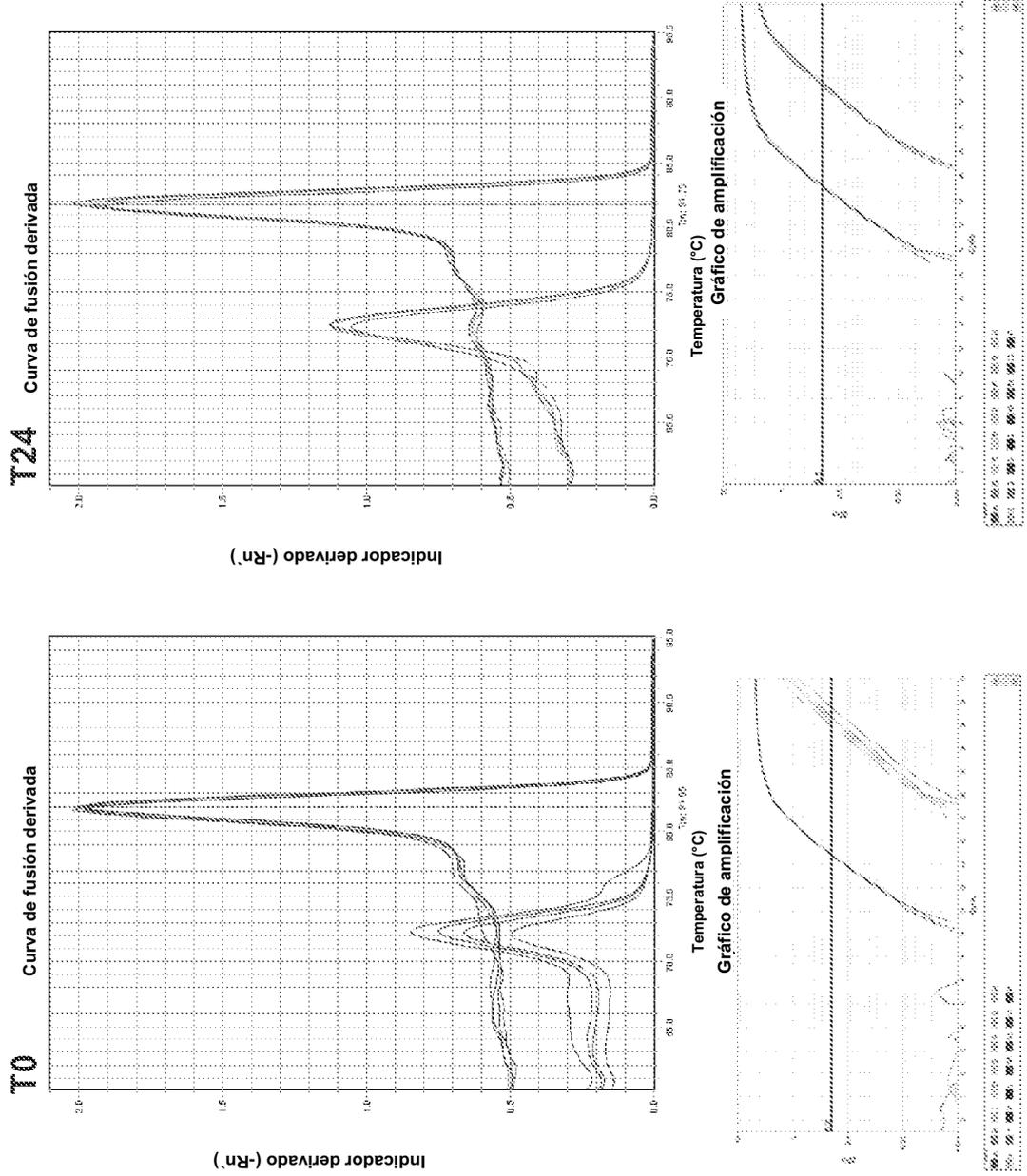
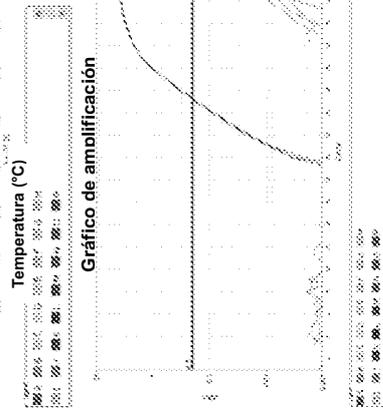
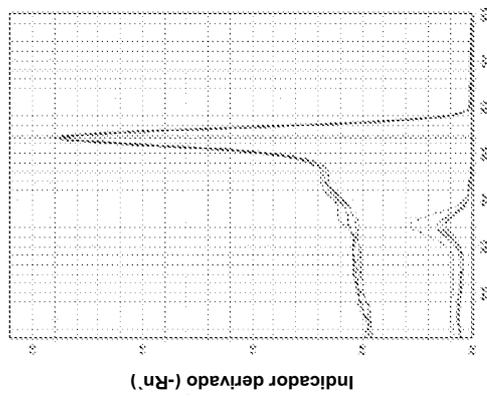


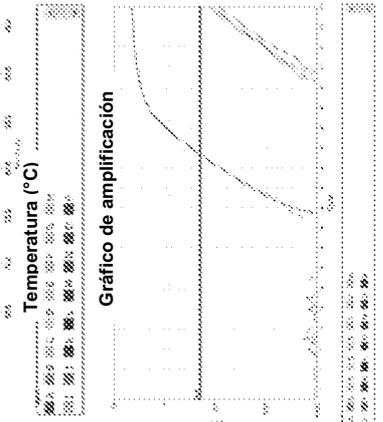
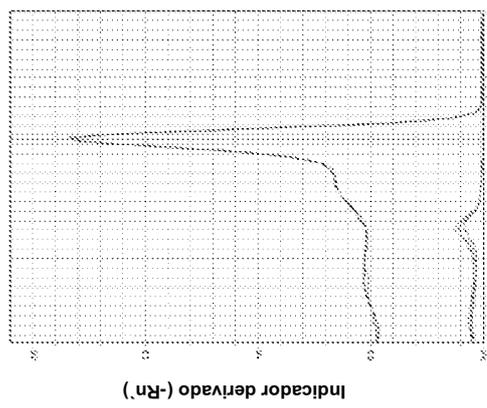
Figura 4A

Ensayo de A2M Análisis de la curva de fusión con mezcla maestra Fast SYBR® & Anticuerpo contra Taq Platinum®

**T0** Curva de fusión derivada



**T24** Curva de fusión derivada



| A2M                           | T0            |              | T24           |              |
|-------------------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
|                               | ADnc promedio | NTC promedio | ADnc promedio | NTC promedio |
| Fast SYBR                     | 24.84         | 36.66        | 25.22         | 33.51        |
| Fast SYBR & Anticuerpo contra | 25.25         | 39.69        | 25.37         | 40.00        |
| Platinum                      | -0.41         | -3.02        | -0.15         | -6.49        |

Figura 4B

Análisis de la curva de fusión con mezcla maestra Fast SYBR® & Anticuerpo contra Tag Platinum®

| Mezcla maestra<br>Tiempo | Fast SYBR |           | Fast SYBR & Ac contra Platinum |           |
|--------------------------|-----------|-----------|--------------------------------|-----------|
|                          | T0        | T24       | T0                             | T24       |
| A2M                      | 4         | 4         | 1                              | 0         |
| ABCC2                    | 4         | 4         | 4                              | 4         |
| ADAM10                   | 3         | 1         | 1                              | 0         |
| AOF1                     | 0         | 4         | 0                              | 0         |
| APOA1                    | 4         | 4         | 1                              | 1         |
| ARL1                     | 4         | 4         | 4                              | 2         |
| C11orf30                 | 4         | 4         | 4                              | 4         |
| CCNB1                    | 4         | 4         | 4                              | 4         |
| COL1A1                   | 4         | 4         | 4                              | 4         |
| CTGF                     | 4         | 4         | 4                              | 4         |
| METHL3                   | 4         | 3         | 0                              | 0         |
| HLR1                     | 4         | 4         | 4                              | 3         |
| MTIF2                    | 4         | 4         | 4                              | 4         |
| PDGFB                    | 4         | 4         | 4                              | 3         |
| PRDX4                    | 0         | 1         | 0                              | 0         |
| SERPINE1                 | 1         | 0         | 0                              | 0         |
| SMAD4                    | 2         | 4         | 0                              | 1         |
| TCF25                    | 0         | 0         | 0                              | 0         |
| TCF3                     | 1         | 0         | 0                              | 1         |
| TCF4                     | 4         | 4         | 4                              | 4         |
| TIMP3                    | 4         | 4         | 4                              | 3         |
| VEGFC                    | 0         | 0         | 2                              | 1         |
| GUSB                     | 2         | 0         | 0                              | 0         |
| PGK1                     | 0         | 0         | 0                              | 1         |
| <b>Total</b>             | <b>65</b> | <b>65</b> | <b>49</b>                      | <b>44</b> |

\* Anomalia definida como cualquier pico de la curva de fusión por encima de 0,2 ΔRn

**A2M**  
**Fast SYBR**

| T0 | ADNc promedio | NTC promedio | ADNc promedio | T24 | NTC promedio |
|----|---------------|--------------|---------------|-----|--------------|
|    | 24.84         | 36.66        | 25.22         |     | 33.51        |
|    | 25.25         | 39.69        | 25.37         |     | 40.00        |

**Fast SYBR & Anticuerpo contra Platinum**

**SMAD4**  
**Fast SYBR**

| T0 | ADNc promedio | NTC promedio | ADNc promedio | T24 | NTC promedio |
|----|---------------|--------------|---------------|-----|--------------|
|    | 23.90         | 39.48        | 24.30         |     | 32.91        |
|    | 24.62         | 40.00        | 24.53         |     | 39.66        |

**Fast SYBR & Anticuerpo contra Platinum**

**METHL3**  
**Fast SYBR**

| T0 | ADNc promedio | NTC promedio | ADNc promedio | T24 | NTC promedio |
|----|---------------|--------------|---------------|-----|--------------|
|    | 23.37         | 36.40        | 23.53         |     | 37.21        |
|    | 24.21         | 40.00        | 24.23         |     | 40.00        |

**Fast SYBR & Anticuerpo contra Platinum**

**APOA1**  
**Fast SYBR**

| T0 | ADNc promedio | NTC promedio | ADNc promedio | T24 | NTC promedio |
|----|---------------|--------------|---------------|-----|--------------|
|    | 24.70         | 36.84        | 25.18         |     | 30.08        |
|    | 24.52         | 39.32        | 25.14         |     | 38.29        |

**Fast SYBR & Anticuerpo contra Platinum**

**Número de NTC no 40**

| Fast SYBR | T24      | Fast SYBR & Ac contra Platinum | T24      |
|-----------|----------|--------------------------------|----------|
| T0        |          | T0                             |          |
| 68        | 66       | 50                             | 48       |
| 68        | 66       | 54                             | 53       |
| 0.167369  | 0.187027 | 0.106496                       | 0.108216 |

**Umbral de 0,2**

**Umbral automático**

**Umbral**

Figura 4C

ADNc T0 con mezcla maestra Power SYBR® Green & Anticuerpo contra Taq Platinum®

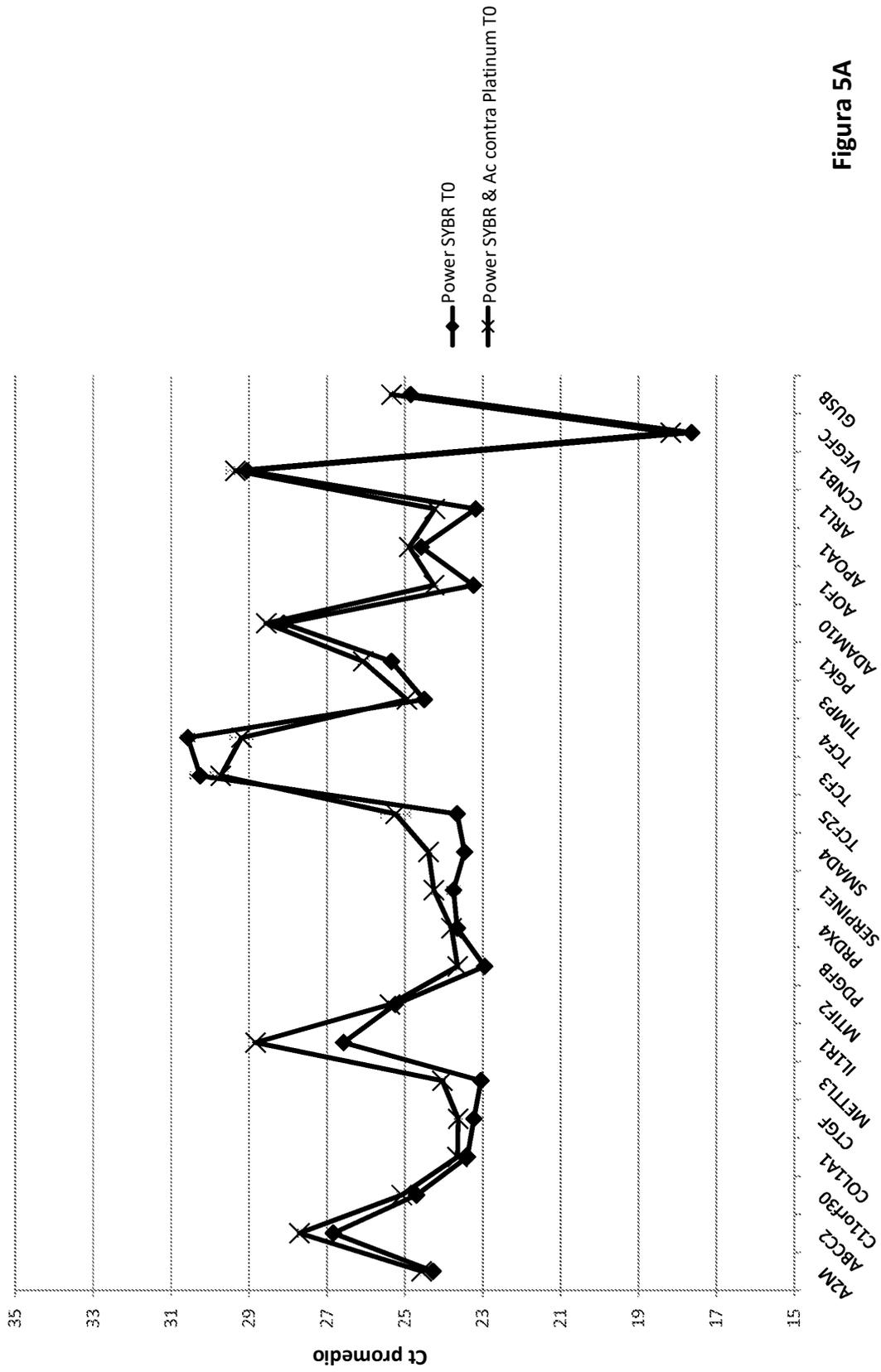


Figura 5A

NTC T0 con mezcla maestra Power SYBR® Green & Anticuerpo contra Taq Platinum®

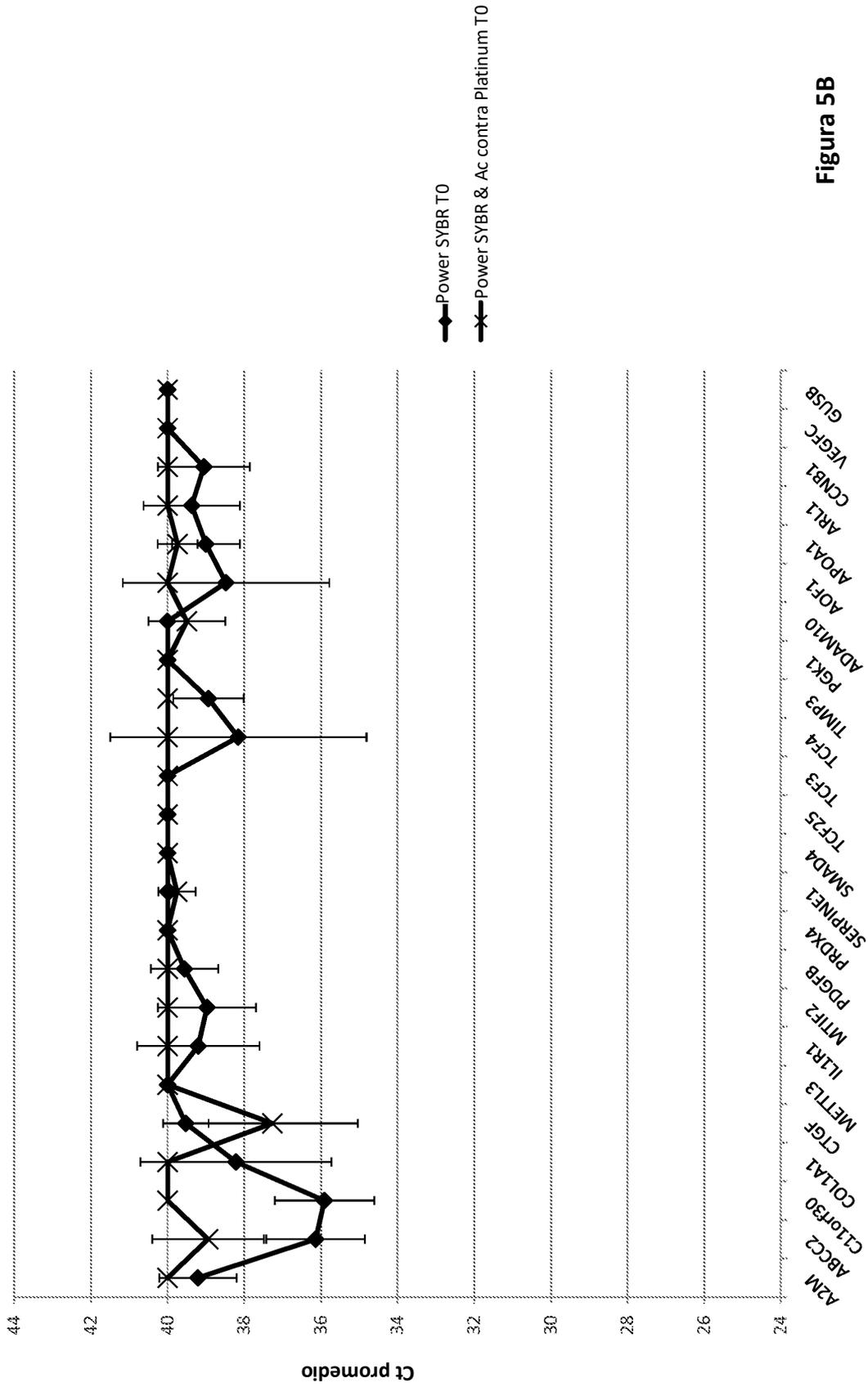


Figura 5B

ADNc T24 con mezcla maestra Power SYBR® Green & Anticuerpo contra Taq Platinum®

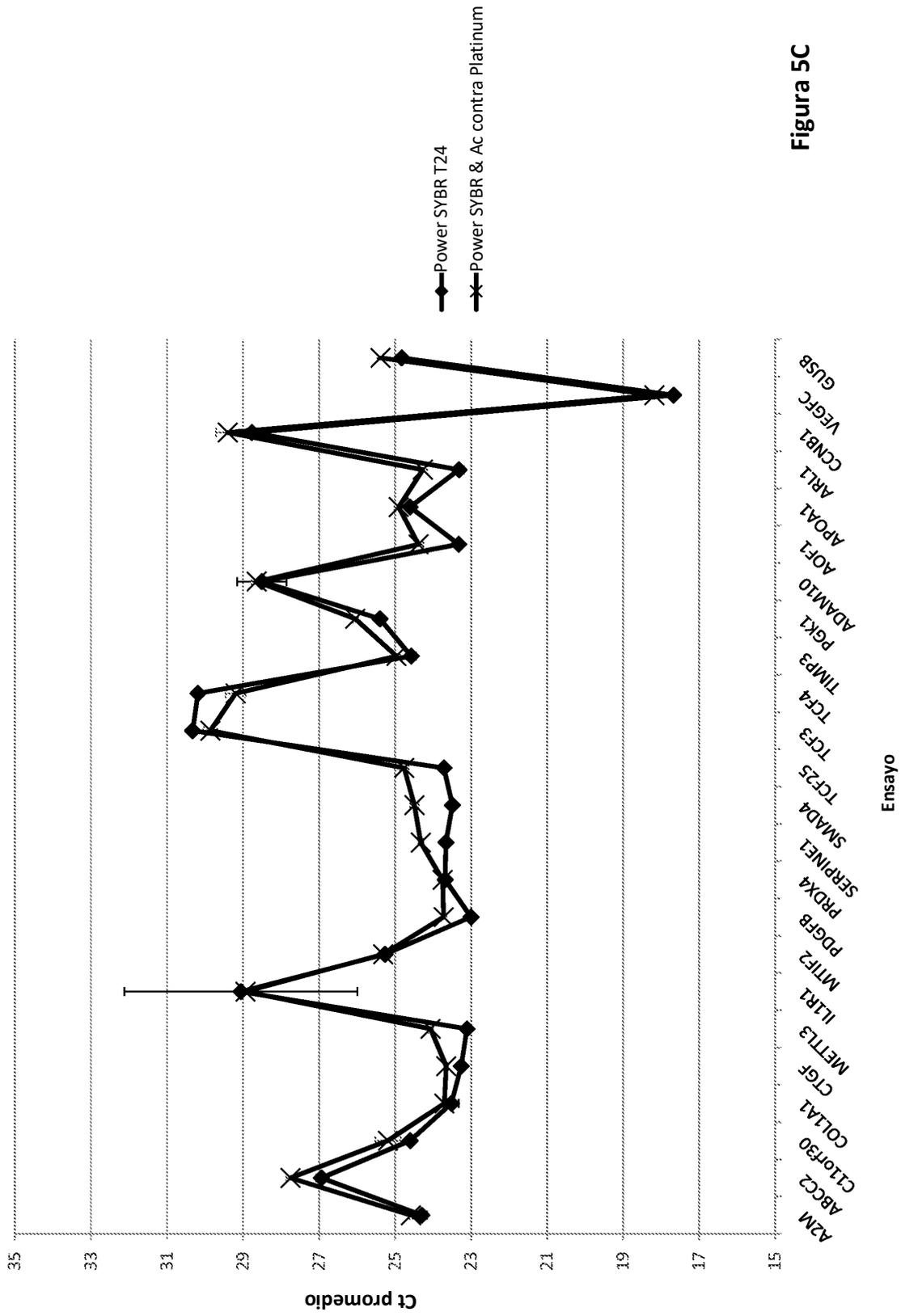


Figura 5C

NTC T24 con mezcla maestra Power SYBR® Green & Anticuerpo contra Taq Platinum®

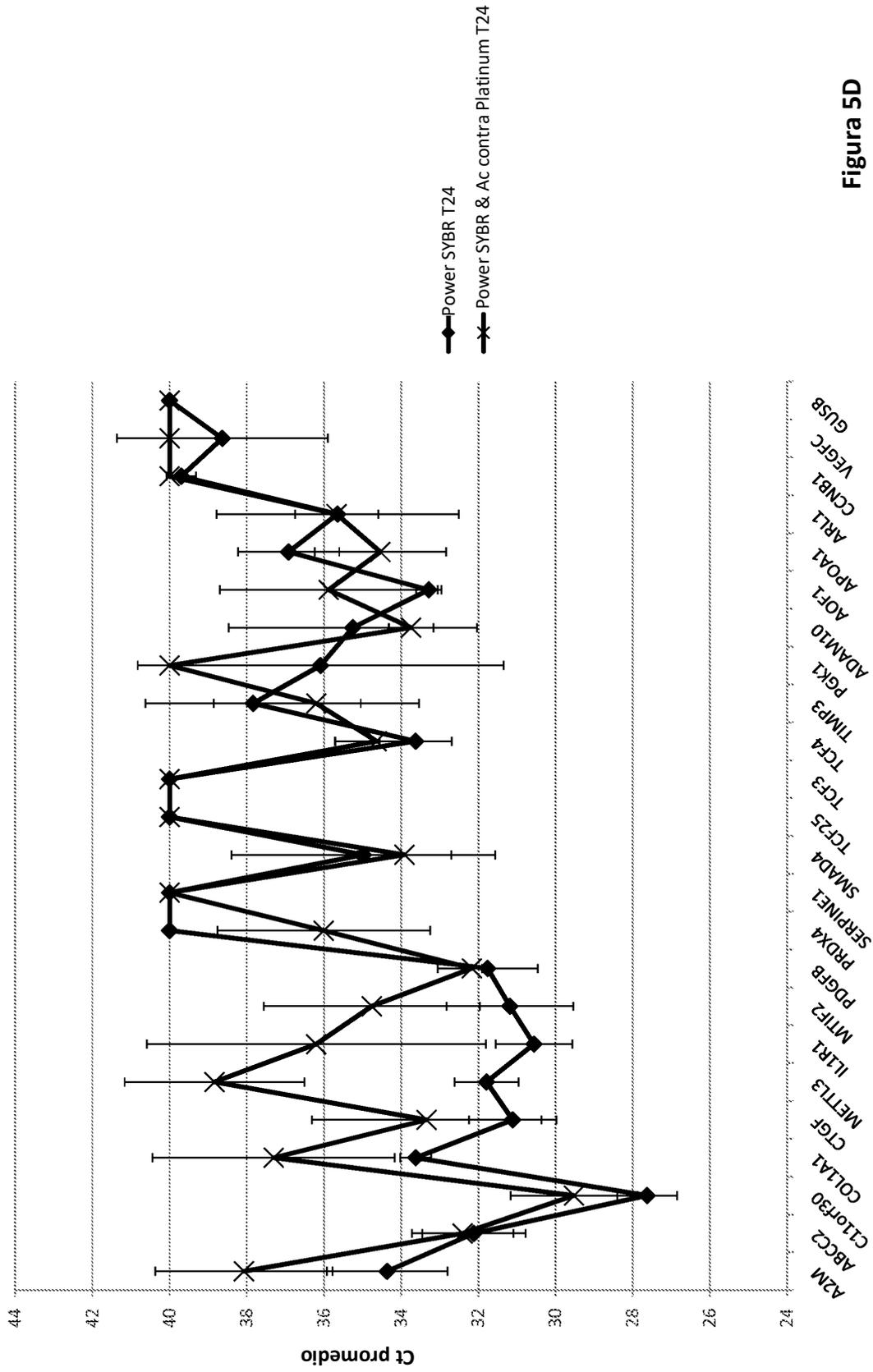


Figura 5D

Ensayo de A2M: Mezcla maestra de PCR Power SYBR®  
Green: Análisis de la curva de fusión

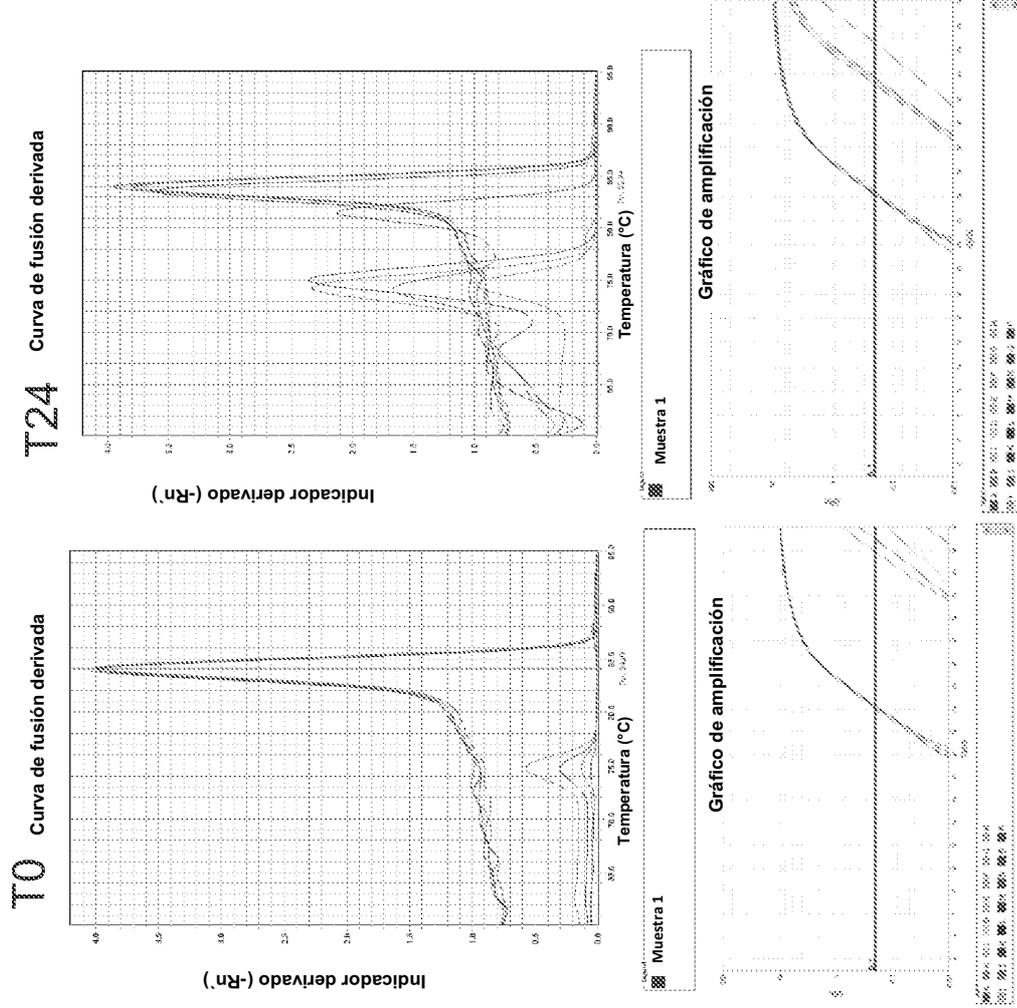


Figura 6A

Ensayo de A2M: Mezcla maestra de PCR Power SYBR® Green & Anticuerpo  
contra Taq Platinum®: Análisis de la curva de fusión

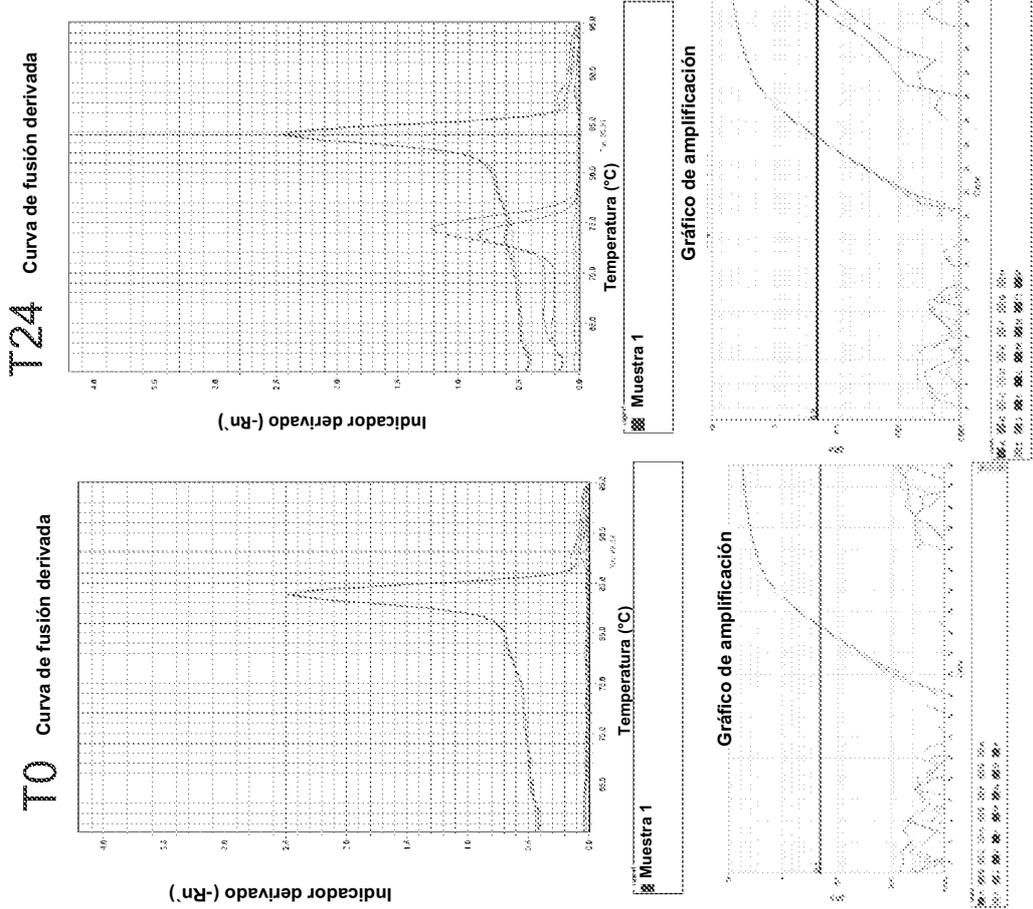


Figura 6B

Ensayo de Gumbo 1: Mezcla maestra de PCR Power SYBR® Green & Anticuerpo contra Taq Platinum® : Análisis de la curva de fusión

| Mezcla maestra<br>Tiempo | Power SYBR |           | Power SYBR & Ac contra Platinum |           |
|--------------------------|------------|-----------|---------------------------------|-----------|
|                          | T0         | T24       | T0                              | T24       |
| A2M                      | 2          | 4         | 0                               | 2         |
| ABCC2                    | 4          | 4         | 2                               | 4         |
| ADAM10                   | 0          | 3         | 1                               | 4         |
| AOX1                     | 2          | 4         | 0                               | 3         |
| APOA1                    | 3          | 4         | 1                               | 4         |
| ARL1                     | 1          | 4         | 0                               | 4         |
| C11orf30                 | 4          | 4         | 0                               | 4         |
| CCNB1                    | 2          | 2         | 0                               | 0         |
| COL1A1                   | 3          | 4         | 0                               | 2         |
| CTGF                     | 2          | 4         | 3                               | 4         |
| METTL3                   | 0          | 4         | 0                               | 1         |
| IL1R1                    | 1          | 4         | 0                               | 2         |
| MTIF2                    | 4          | 4         | 0                               | 4         |
| PDGFB                    | 1          | 4         | 0                               | 4         |
| PRDX4                    | 0          | 0         | 0                               | 3         |
| SERPINE1                 | 0          | 0         | 1                               | 0         |
| SMAD4                    | 0          | 3         | 0                               | 4         |
| TCF25                    | 0          | 0         | 0                               | 1         |
| TCF3                     | 0          | 0         | 1                               | 1         |
| TCF4                     | 2          | 4         | 0                               | 4         |
| TIMP3                    | 3          | 2         | 1                               | 3         |
| VEGFC                    | 0          | 1         | 0                               | 0         |
| GUSB                     | 0          | 0         | 0                               | 0         |
| PGK1                     | 2          | 2         | 2                               | 2         |
| <b>Total</b>             | <b>36</b>  | <b>65</b> | <b>12</b>                       | <b>60</b> |

| AZM                                     | T0            |              | T24           |              |
|---|---------------|--------------|---------------|--------------|
|   | ADNc promedio | NTC promedio | ADNc promedio | NTC promedio |
| Power SYBR                              | 24.28         | 39.21        | 24.30         | 34.36        |
| Power SYBR & Anticuerpo contra Platinum | 24.57         | 40.00        | 24.58         | 38.07        |

| METTL3                                  | T0            |              | T24           |              |
|---|---------------|--------------|---------------|--------------|
|   | ADNc promedio | NTC promedio | ADNc promedio | NTC promedio |
| Power SYBR                              | 23.05         | 40.00        | 23.11         | 31.79        |
| Power SYBR & Anticuerpo contra Platinum | 24.04         | 40.00        | 24.07         | 38.83        |

| Número de NTC no 40 | Power SYBR |          | Power SYBR & Ac contra Platinum |          |
|---------------------|------------|----------|---------------------------------|----------|
|                     | T0         | T24      | T0                              | T24      |
| Umbral de 0,2       | 34         | 64       | 10                              | 56       |
| Umbral automático   | 34         | 64       | 12                              | 58       |
| Umbral              | 0.207303   | 0.202486 | 0.122834                        | 0.112996 |

\* Anomalia definida como cualquier pico de la curva de fusión por encima de 0,2 ΔRn

Figura 6C