

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 075**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/6851** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2013** **E 17186097 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** **EP 3260558**

54 Título: **Nuevas composiciones y métodos para mejorar la especificidad de la PCR**

30 Prioridad:

**02.11.2012 US 201261721968 P**  
**20.12.2012 US 201261740242 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.12.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DONG, SHOULIAN y**  
**LIU, CHUNMEI**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

**ES 2 800 075 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 y métodos para mejorar la especificidad de la PCR

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio en virtud del artículo 35 U.S.C. 119(e) de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 61/740,242, presentada el 20 de diciembre de 2012, y el beneficio en virtud del artículo 35 U.S.C. 119(e) de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 61/721,968, presentada el 2 de noviembre de 2012.

10

Campo

Esta descripción se refiere generalmente al campo de la biología molecular. En particular, esta descripción se refiere a cebadores novedosos para usar en la detección y discriminación de ácidos nucleicos.

15

Antecedentes

Los ensayos capaces de detectar y cuantificar la presencia de una molécula particular de ácido nucleico en una muestra son de importancia sustancial en la medicina forense, la medicina, la epidemiología y la salud pública. Tales ensayos pueden usarse, por ejemplo, para identificar el agente causal de una enfermedad infecciosa, para predecir la probabilidad de que un individuo sufra una enfermedad genética, para determinar la pureza del agua potable o la leche, o para identificar muestras de tejido. El deseo de aumentar la utilidad y aplicabilidad de tales ensayos a menudo se frustra por la sensibilidad del ensayo. Por lo tanto, es altamente deseable desarrollar ensayos de detección más sensibles.

20

25

Los ensayos de detección de ácido nucleico pueden basarse en cualquier característica de la molécula de ácido nucleico, como su tamaño, secuencia y, si es ADN, su susceptibilidad a la digestión por endonucleasas de restricción. La sensibilidad de tales ensayos puede aumentarse al alterar la manera en que la detección se informa o señala al observador. Por lo tanto, por ejemplo, la sensibilidad del ensayo puede incrementarse mediante el uso de reactivos marcados de forma detectable. Se ha usado una amplia variedad de tales marcadores para este propósito. Los marcadores detectables incluyen, por ejemplo, isótopos radiactivos, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, marcadores bioluminiscentes y marcadores enzimáticos.

30

35

Aunque el uso de reactivos marcados altamente detectables puede mejorar la sensibilidad de los ensayos de detección del ácido nucleico, la sensibilidad de tales ensayos se limita por factores que incluyen, pero no se limitan a, las reacciones no específicas que aumentan la señal de fondo y las limitaciones en la discriminación entre secuencias que difieren en uno o unos pocos nucleótidos. En respuesta a estos problemas, se han desarrollado una variedad de métodos de detección y cuantificación mediante el uso de la amplificación de ADN.

40

45

La amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usa un par de cebadores cuyas secuencias determinan la especificidad de la amplificación. Sin embargo, la secuencia del amplicón fuera de las regiones de cebado tiene poca o ninguna contribución a la especificidad de amplificación. En una amplificación por la PCR típica, los cebadores directo e inverso se usan para dirigir y amplificar preferentemente una secuencia de ADN de interés. En los ensayos TaqMan®, también se proporciona una sonda recogida dentro de la secuencia del amplicón para detectar y seguir selectivamente el producto de amplificación. El resto de las secuencias objetivo fuera de las regiones del cebador y la sonda no se usan. El documento WO200804525 proporciona métodos, composiciones y kits que usan cebadores de retroceso que forman estructuras de horquilla 3', estructuras de horquilla 5' y estructuras de horquilla doble. Las estructuras de horquilla pueden usarse para detectar secuencias objetivo. El documento WO2007127999 describe cebadores que se diseñan para incorporar una secuencia de especialidad 5' para proporcionar un producto de amplificación que se pliega intramolecularmente en una estructura secundaria que puede escindirse. El documento US2008248469 proporciona un método para identificar un nucleótido de interés en un polinucleótido objetivo mediante la formación de una cadena de amplificación que comprende una región final de horquilla; la hibridación de la región final de horquilla de la cadena de amplificación con una región de horquilla de un polinucleótido objetivo, para formar un producto de amplificación autocomplementario. El documento WO2004013354 proporciona un método para amplificar secuencias de ácido nucleico mediante el uso de un cebador formador de horquilla y un segundo cebador para la extensión del producto de extensión del primer cebador. El documento WO2011100057 describe métodos y composiciones para detectar la presencia o cantidad de uno o más ácidos nucleicos objetivo en una muestra. La detección depende de una interacción intramolecular entre un segmento universal y una segunda parte del ácido nucleico objetivo etiquetado. La interacción intramolecular incluye la formación de una horquilla que tiene una rama entre un segmento universal en un extremo del ácido nucleico objetivo etiquetado y un segundo segmento universal en el extremo opuesto del ácido nucleico objetivo etiquetado. Todavía existe la necesidad de aumentar la especificidad de las reacciones de amplificación, especialmente para la amplificación de muestras que difieren en uno o unos pocos nucleótidos. Los ejemplos de tales análisis incluyen, pero no se limitan a, la genotipificación, la detección de alelos raros y la amplificación previa de secuencias mutantes.

50

55

60

65

Resumen

En la presente se proporcionan composiciones, métodos y kits para la detección de moléculas de ácido nucleico objetivo.

5 En un aspecto, se proporcionan oligonucleótidos (denominados en la presente "cebadores STAR (Restricción de Amplificación Específica del Objetivo)" o "cebadores \*\*") que comprenden (i) una etiqueta de secuencia que se denomina en la presente "secuencia de la etiqueta STAR" y (ii) una secuencia que hibrida con el ácido nucleico objetivo y desde el cual se extiende el cebador, lo que copia el ácido nucleico objetivo, en la generación de un producto de extensión. La secuencia de la etiqueta STAR es complementaria a una parte del producto de extensión 3' del cebador STAR, la parte complementaria del producto de extensión se denomina en la presente la región objetivo de la etiqueta STAR. Cuando un cebador STAR hibrida con un ácido nucleico objetivo y se extiende, el producto de extensión comprende la secuencia de la etiqueta STAR en el extremo 5' y el complemento de la secuencia de la etiqueta STAR (es decir, la región objetivo de la etiqueta STAR) en la región 3' del producto de extensión. Por lo tanto, el producto de extensión del cebador STAR puede plegarse para autoalinearse lo que forma así una estructura de tallo-lazo.

15 La secuencia de la etiqueta STAR comprende una secuencia igual a la totalidad o a una parte de una parte de hibridación del ácido nucleico objetivo de un segundo cebador para usarse con el oligonucleótido en una reacción de amplificación o es complementaria a todo o a una parte del sitio de unión objetivo de un segunda secuencia de cebador que se usa para amplificar el producto de extensión en una reacción de amplificación. El primer y segundo cebadores son un par de cebadores directos e inversos. La secuencia compartida entre la secuencia de la etiqueta STAR y el segundo cebador, o su complemento y el segundo cebador, puede tener una longitud de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 nucleótidos. En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR está en o cerca del terminal 5' del cebador STAR.

20 En un aspecto, se proporcionan composiciones que comprenden un cebador STAR. En ciertas modalidades, se proporcionan composiciones que comprenden un primer cebador oligonucleotídico y un segundo cebador oligonucleotídico, en donde el primer cebador comprende una secuencia de la etiqueta STAR que es igual a la totalidad o una parte de la secuencia de hibridación del ácido nucleico objetivo del segundo cebador.

25 En ciertas modalidades, se proporciona un par de cebadores de amplificación directo e inverso, en donde al menos uno de los pares comprende una secuencia de la etiqueta STAR que es igual a la totalidad o a una parte de la secuencia de hibridación del ácido nucleico objetivo del otro cebador. En ciertas modalidades, ambos cebadores del par comprenden una secuencia de la etiqueta STAR.

30 En un aspecto, se proporciona un producto de extensión de polinucleótidos que comprende una secuencia de la etiqueta STAR en el extremo 5' y una secuencia complementaria a la secuencia de la etiqueta STAR al lado 3' de la secuencia de la etiqueta STAR, en donde la secuencia de la etiqueta STAR y la secuencia complementaria proveen el producto de extensión capaz de formar una estructura de tallo-lazo.

35 En otro aspecto, los cebadores STAR pueden usarse como una herramienta universal pero conveniente para mejorar la especificidad de la PCR.

40 En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para inhibir o reducir sustancialmente la amplificación no deseada de un ácido nucleico objetivo, que comprende poner en contacto el ácido nucleico objetivo con uno o más cebadores STAR, en donde el cebador STAR comprende una secuencia de la etiqueta STAR 5', y extender el cebador STAR para formar un producto de extensión, mediante el cual el producto de extensión inhibe o reduce sustancialmente la amplificación no deseada del ácido nucleico objetivo.

45 En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para detectar una o más moléculas del ácido nucleico objetivo, los métodos que comprenden hibridar una o más moléculas del ácido nucleico objetivo con uno o más cebadores STAR, en donde el cebador STAR comprende una secuencia de la etiqueta STAR 5', que extiende el cebador STAR para formar uno o más productos de extensión, amplificar los productos de extensión para formar uno o más productos de amplificación, y detectar la presencia o ausencia de al menos un producto de amplificación, lo que detecta así la una o más moléculas del ácido nucleico objetivo.

50 En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para detectar una o más moléculas del ácido nucleico objetivo, los métodos que comprenden hibridar una o más moléculas del ácido nucleico objetivo con uno o más cebadores STAR, en donde el cebador STAR comprende una secuencia de la etiqueta STAR 5', que extiende el cebador STAR para formar uno o más productos de extensión; amplificar los productos de extensión para formar uno o más productos de amplificación en presencia de una sonda detectora, en donde la sonda detectora comprende al menos un nucleótido del cebador STAR; y detectar la presencia o ausencia de al menos un producto de amplificación, lo que detecta así la una o más moléculas del ácido nucleico objetivo.

55 En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para distinguir entre ácidos nucleicos objetivo metilados y no metilados. En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para detectar dos o más ácidos nucleicos objetivo diferentes a partir de una única reacción de hibridación. En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para distinguir dos alelos diferentes en una muestra de ácido nucleico objetivo.

60

65

5 En ciertas modalidades, se proporcionan composiciones, en donde la composición comprende una o más moléculas de ácido nucleico y al menos un oligonucleótido, en donde el oligonucleótido comprende una secuencia de la etiqueta STAR y en donde el oligonucleótido es un oligonucleótido de la presente descripción. En ciertas modalidades, la composición comprende además una polimerasa de ácido nucleico. En ciertas modalidades, la composición comprende además un cebador directo o inverso. En ciertas modalidades, la composición comprende además una sonda detectora.

10 En ciertas modalidades, se proporcionan kits que pueden usarse para llevar a cabo reacciones de hibridación, extensión y amplificación mediante el uso de los oligonucleótidos que se describen en la presente. En ciertas modalidades, se proporcionan kits para la detección o medición de productos de síntesis de ácidos nucleicos o productos de amplificación de ácidos nucleicos que comprenden uno o más oligonucleótidos que se describen en la presente, que incluyen los cebadores STAR.

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

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa esquemáticamente el diseño de los cebadores STAR de acuerdo con ciertas modalidades que se describen en la presente.

20 La Figura 2 muestra esquemáticamente los diseños y aplicaciones alternativas de los cebadores STAR: la Figura 2A representa un diseño alternativo de los cebadores STAR; La Figura 2B representa el uso de un cebador STAR en la detección de la metilación; y la Figura 2C representa la genotipificación con sondas genéricas mediante el uso de los cebadores STAR.

25 La Figura 3 representa esquemáticamente a los cebadores STAR con varias longitudes de solapamiento con un sitio de unión de cebador en las secuencias objetivo.

30 La Figura 4 representa gráficamente la supresión de la amplificación de secuencias objetivo y fuera del objetivo por los cebadores STAR con varias longitudes de solapamiento: secuencia objetivo con la etiqueta STAR (línea de diamante) perfectamente apareado (PM), secuencia fuera del objetivo con la etiqueta STAR PM (línea de cuadrados), secuencia objetivo con la etiqueta STAR con disparidad (MM) (línea de triángulos) y secuencia fuera del objetivo con la etiqueta STAR con MM (línea de círculos).

35 La Figura 5 representa esquemáticamente una modalidad de un flujo de trabajo del ensayo de próxima generación miARN TaqMan® mediante el uso de adaptadores de ligadura (o ligadores) 5' y 3', férulas de ligadura de 5' y 3' y un cebador STAR.

40 La Figura 6 representa gráficamente la reducción de la amplificación del adaptador (ligador) con el uso del cebador STAR en comparación con un cebador de control.

La Figura 7 representa gráficamente el aumento de la sensibilidad de la detección por la qPCR del miARN objetivo mediante el uso de un cebador STAR en comparación con un cebador de control.

45 La Figura 8 representa esquemáticamente los ensayos para la diferenciación de los miARN let-7c y let-7b humanos mediante el uso de un cebador directo estándar y mediante el uso de un cebador directo STAR.

Descripción detallada

50 En la presente se proporcionan composiciones, métodos y kits para la detección de ácidos nucleicos objetivo.

La amplificación del ADN por la PCR requiere un par de cebadores cuyas secuencias determinan la especificidad de la amplificación. Sin embargo, la secuencia del amplicón fuera de las regiones de cebado típicamente no se usa en la construcción de secuencias de cebador o sonda. Cuando la especificidad del cebador es limitada, especialmente cuando un objetivo que se desea y un objetivo no deseada difieren solo en sus secuencias internas, ambos pueden amplificarse por el mismo par de cebadores. Por lo tanto, las secuencias internas del amplicón deben usarse para una mayor discriminación. Con este fin, los cebadores de Restricción de amplificación dirigida a secuencia (STAR), que se describen en la presente, se diseñaron y probaron para amplificar selectivamente el objetivo que se desea mientras se suprime simultáneamente la formación del producto de amplificación no deseada.

60 Un oligonucleótido cebador STAR (que también se refiere como "cebador \*\*") comprende (i) una parte con una secuencia de la etiqueta STAR y (ii) una parte con una secuencia que hibrida con el ácido nucleico objetivo y desde el cual se extiende el cebador, y copia el ácido nucleico objetivo, en la generación de un producto de extensión. La secuencia de la etiqueta STAR es complementaria a una parte del producto de extensión 3' del cebador STAR, la parte complementaria del producto de extensión se denomina en la presente la región objetivo de la etiqueta STAR. Cuando un cebador STAR hibrida con un ácido nucleico objetivo y se extiende, el producto de extensión comprende la secuencia de la etiqueta STAR en el extremo 5' y el complemento de la secuencia de la etiqueta STAR (es decir, la región objetivo de la etiqueta

STAR) en la región 3' del producto de extensión. Por lo tanto, el producto de extensión del cebador STAR puede plegarse para autoalinearse lo que forma así una estructura de tallo-lazo. El cebador STAR se diseña para tener una secuencia de la etiqueta STAR de 5' capaz de formar una estructura de tallo-lazo en el producto de extensión y la secuencia de la etiqueta STAR puede diseñarse contra una región cebadora, una región de sonda o cualquier secuencia interna del amplicón del producto de extensión, lo que proporciona una flexibilidad de diseño superior para aplicaciones desafiantes.

En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR está en o cerca del extremo 5" del cebador STAR. En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR no se solapa con la secuencia de reconocimiento de extensión objetivo del cebador STAR. En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR se solapa parcialmente, pero no completamente, con la secuencia de reconocimiento de extensión objetivo del cebador STAR. La secuencia de reconocimiento de extensión objetivo se refiere a la parte del cebador STAR que se hibrida con el ácido nucleico objetivo y desde el cual se extiende el cebador para formar un producto de extensión. En ciertas modalidades, la secuencia de reconocimiento de extensión objetivo es específica para el ácido nucleico objetivo. En ciertas modalidades, la secuencia de reconocimiento de extensión objetivo se dirige a una secuencia universal, por ejemplo, en un adaptador común ligado al extremo del ácido nucleico objetivo. En ciertas modalidades, la secuencia de reconocimiento de extensión objetivo comprende una secuencia de poli (T) para hibridarse, por ejemplo, con un ácido nucleico objetivo poliadenilado.

En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR es complementaria a todo o a una parte del sitio de unión de otra secuencia de cebador que se usa para amplificar el producto de extensión en una reacción de amplificación (véase, por ejemplo, la Figura 1). Cuando se extiende el cebador STAR, el producto de extensión puede plegarse sobre sí mismo para formar así una estructura de tallo-lazo entre la secuencia de la etiqueta STAR en el extremo 5' del producto de extensión y el complemento de la secuencia de la etiqueta STAR en la región 3' del producto de extensión. La estructura de tallo-lazo que se forma por el producto de extensión del cebador STAR excluye el alineamiento del otro cebador que se usa para amplificar la molécula objetivo, lo que inhibe así la amplificación del objetivo no deseada.

En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR es complementaria a una parte de la secuencia interna de los amplicones. En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR es complementaria a una parte de la secuencia del amplicón interno y al sitio de unión de otra secuencia de cebador. La estructura de tallo-lazo que se forma por el producto de extensión de tal cebador STAR bloquea el alineamiento de otro cebador o la extensión por una ADN polimerasa, lo que bloquea así cualquier amplificación adicional del producto de extensión.

En ciertas modalidades, el cebador directo en una reacción de amplificación es un cebador STAR. En ciertas modalidades, el cebador inverso en una reacción de amplificación es un cebador STAR. En ciertas modalidades, los cebadores directo e inverso en una reacción de amplificación son cebadores STAR.

En ciertas modalidades, se proporciona un cebador STAR que comprende una secuencia de la etiqueta STAR que es igual a la secuencia de una secuencia en el ácido nucleico al que se dirige el cebador STAR. Por ejemplo, en algunas modalidades, el cebador STAR comprende una secuencia de la etiqueta STAR que es igual a una secuencia de hibridación del cebador en el ácido nucleico objetivo. En ciertas modalidades, el cebador STAR comprende una secuencia de la etiqueta STAR que es igual a una parte del ácido nucleico objetivo que está 3' de una secuencia de hibridación cebador en el ácido nucleico objetivo. En ciertas modalidades, el cebador STAR comprende una secuencia de la etiqueta STAR que es igual a la totalidad o a una parte de una secuencia de hibridación del cebador y una parte del ácido nucleico objetivo que está 3' de una secuencia de hibridación del cebador en el ácido nucleico objetivo. En tales modalidades, un producto de extensión, que se forma por la extensión del cebador STAR que se hibrida con el ácido nucleico objetivo más allá de la otra secuencia de hibridación del cebador del ácido nucleico objetivo, tiene dos partes de secuencia complementarias que permiten que el producto de extensión forme una estructura de tallo-lazo.

En ciertas modalidades, se proporciona un producto de extensión de polinucleótidos que comprende un cebador STAR en el extremo 5' y una secuencia complementaria a la secuencia de la etiqueta STAR del cebador STAR 3' del cebador STAR de modo que el producto de extensión sea capaz de formar una estructura de tallo-lazo mediante el uso de las secuencias complementarias. En ciertas modalidades, un producto de extensión que se basa en el en cebador STAR es capaz de formar una estructura de tallo-lazo a temperaturas de extensión de la PCR. En ciertas modalidades, un producto de extensión que se basa en el cebador STAR en la estructura de tallo-lazo excluye el alineamiento de un cebador diferente al producto de extensión.

En ciertas modalidades, un cebador STAR puede diseñarse para comprender una secuencia de la etiqueta STAR 5' que puede formar una estructura de tallo-lazo a temperaturas de extensión de la PCR una vez que se extiende el cebador (ver Figura 2A). La secuencia de la etiqueta STAR puede seleccionarse para solaparse total o parcialmente con otro cebador que se usa en la amplificación de la molécula objetivo para excluir el alineamiento del otro cebador. Sin desear limitarse a una teoría particular, parece que la formación del a tallo-lazo es más rápida que el alineamiento del cebador a la molécula objetivo y la estructura de tallo-lazo es más estable debido a la entropía favorable. Por lo tanto, el cebador STAR previene efectivamente el alineamiento y la extensión del otro cebador, lo que conduce a una eficiencia de la PCR muy reducida.

En ciertas modalidades, se proporcionan oligonucleótidos del cebador STAR en los que la secuencia de la etiqueta STAR se diseña para retroceder y extenderse en la PCR (véase, por ejemplo, la Figura 2A). En ciertas modalidades, la secuencia más hacia el 5' en el cebador STAR se diseña en la misma cadena del dominio del cebador para apuntar a secuencias

particulares contenidas dentro de los amplicones (Ver "x" en el cebador y el amplicón en la Figura 2A). La secuencia puede extenderse desde otro cebador en la segunda ronda de la PCR, por lo que se pliega y autorreplica la secuencia 5' cuando se combina perfectamente, por lo que hace que el producto de extensión sea inaccesible para la amplificación. El extremo 5' del cebador STAR puede diseñarse para que sea igual al objetivo para suprimir la amplificación. Los ácidos nucleicos objetivo con disparidades con la secuencia de la etiqueta STAR se amplifican normalmente.

En ciertas modalidades, se proporciona una composición que comprende un primer y un segundo cebador donde el primer cebador comprende una secuencia de la etiqueta STAR que es igual a la totalidad o a una parte de la secuencia de unión al objetivo del segundo cebador. En ciertas modalidades, la misma secuencia compartida entre el primer y el segundo cebadores en la composición tiene una longitud de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 nucleótidos. En ciertas modalidades, la secuencia compartida es de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 nucleótidos de longitud.

En ciertas modalidades, se proporcionan un par de cebadores de amplificación en donde al menos uno de los cebadores comprende una secuencia de la etiqueta STAR, en donde la secuencia de la etiqueta STAR comprende toda una parte de la secuencia de unión al objetivo del otro cebador. En ciertas modalidades, el cebador que comprende la secuencia de la etiqueta STAR es un cebador directo y el otro cebador es un cebador inverso. En ciertas modalidades, el cebador que comprende la secuencia de la etiqueta STAR es un cebador inverso y el otro cebador es un cebador directo. En ciertas modalidades, ambos cebadores del par de cebadores de amplificación comprenden una secuencia de la etiqueta STAR.

En ciertas modalidades, la longitud del cebador STAR está entre aproximadamente 20-60 nucleótidos. En ciertas modalidades, el cebador STAR tiene una longitud de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos. En ciertas modalidades, el cebador STAR tiene aproximadamente 20 a aproximadamente 45, aproximadamente 25 a aproximadamente 50, aproximadamente 25 a aproximadamente 45, o aproximadamente 30 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades, el cebador STAR tiene aproximadamente 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45 nucleótidos de longitud.

En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nucleótidos. En ciertas modalidades, la longitud de la secuencia de la etiqueta STAR está entre aproximadamente 30-35 nucleótidos. En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR es de aproximadamente 10 a aproximadamente 30, de aproximadamente 10 a aproximadamente 35, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25, de aproximadamente 20 a aproximadamente 40, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25, o de aproximadamente 30 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud.

En ciertas modalidades, el cebador STAR es un cebador directo. En ciertas modalidades, el cebador STAR es un cebador inverso. En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR está completamente contenida dentro de la segunda región de unión del cebador. En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR está completamente contenida dentro de la secuencia objetivo secuencia abajo de la segunda región de unión del cebador (*es decir*, en la región del ácido nucleico objetivo a amplificar). En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR une la segunda región de unión del cebador y el ácido nucleico objetivo a amplificar. En ciertas modalidades, el solapamiento de la secuencia de la etiqueta STAR con la segunda región de unión del cebador puede ser de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 nucleótidos. Preferentemente, este solapamiento es de 11, 12 o 13 nucleótidos. En modalidades particulares, el solapamiento de la secuencia de la etiqueta STAR con la segunda región de unión del cebador es de 12 nucleótidos. En ciertas modalidades, el solapamiento de la secuencia de la etiqueta STAR con la secuencia objetivo secuencia abajo de la segunda región de unión del cebador puede ser de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 nucleótidos. Preferentemente, este solapamiento es de 11, 12 o 13 nucleótidos. En modalidades particulares, el solapamiento de la secuencia de la etiqueta STAR con la secuencia objetivo secuencia abajo de la segunda región de unión del cebador es de 12 nucleótidos. En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR es una combinación perfecta con el ácido nucleico objetivo. En ciertas modalidades, la secuencia de la etiqueta STAR contiene una disparidad con el ácido nucleico objetivo.

En ciertas modalidades, los cebadores STAR pueden usarse como una herramienta universal pero conveniente para la mejora de la especificidad de la PCR. Los cebadores STAR pueden ser ampliamente aplicables para usar en la genotipificación, en la detección del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), en la detección de alelos raros, en la amplificación previa de secuencias mutantes, en la detección de mutantes raros, en el análisis de metilación del ADN, en la supresión selectiva del ADN de fondo no deseado, en la sustracción de la biblioteca y similares. Además, los cebadores STAR pueden usarse para la supresión de la amplificación selectiva de adaptadores de ligadura ligados en la amplificación previa del miARN ligado al adaptador y el ensayo de distinción TaqMan® del miARN homólogo (véase, la cotitulada y copendiente Solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 61/721,968, presentada el 2 de noviembre de 2012, y la solicitud PCT núm. PCT/US2013/068350, titulada "Small RNA Capture, Detection and Quantification," presentada al mismo tiempo).

En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para inhibir o reducir sustancialmente la amplificación no deseada de un ácido nucleico objetivo, que comprende poner en contacto el ácido nucleico objetivo con uno o más cebadores STAR, en donde el cebador STAR comprende una secuencia de la etiqueta STAR 5', y extender el cebador STAR para formar

un producto de extensión, mediante el cual el producto de extensión inhibe o reduce sustancialmente la amplificación no deseada del ácido nucleico objetivo.

5 En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para detectar una o más moléculas del ácido nucleico objetivo, los métodos que comprenden hibridar una o más moléculas del ácido nucleico objetivo con uno o más cebadores STAR, en donde el cebador STAR comprende una secuencia de la etiqueta STAR 5', que extiende el cebador STAR para formar uno o más productos de extensión, amplificar los productos de extensión para formar uno o más productos de amplificación, y detectar la presencia o ausencia de al menos un producto de amplificación, lo que detecta así la una o más moléculas del ácido nucleico objetivo.

10 En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para detectar una o más moléculas del ácido nucleico objetivo, los métodos que comprenden hibridar una o más moléculas del ácido nucleico objetivo con uno o más cebadores STAR, en donde el cebador STAR comprende una secuencia de la etiqueta STAR 5', que extiende el cebador STAR para formar uno o más productos de extensión; amplificar los productos de extensión para formar uno o más productos de amplificación en presencia de una sonda detectora, en donde la sonda detectora comprende al menos un nucleótido del cebador STAR; y detectar la presencia o ausencia de al menos un producto de amplificación, lo que detecta así la una o más moléculas del ácido nucleico objetivo.

20 En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para detectar dos o más moléculas del ácido nucleico objetivo diferentes a partir de una única reacción de hibridación, que comprende hibridar un primer cebador STAR y un primer ácido nucleico objetivo, y un segundo cebador STAR y un segundo ácido nucleico objetivo, en donde el primer cebador STAR hibrida con el primer ácido nucleico objetivo y el segundo cebador STAR hibrida con el segundo ácido nucleico objetivo; extender el primer cebador STAR y el segundo cebador STAR para formar productos de extensión; dividir los productos de extensión en una primera reacción de amplificación para formar un primer producto de amplificación y una segunda reacción de amplificación para formar un segundo producto de amplificación, en donde un cebador en la primera reacción de amplificación corresponde al primer ácido nucleico objetivo y no al segundo ácido nucleico objetivo y un cebador en la segunda reacción de amplificación corresponde al segundo ácido nucleico objetivo y no al primer ácido nucleico, en donde una primera sonda detectora en la primera reacción de amplificación difiere de una segunda sonda detectora en la segunda reacción de amplificación, en donde la primera sonda detectora comprende al menos un nucleótido del primer cebador STAR y la segunda sonda detectora comprende al menos un nucleótido del segundo cebador STAR; y detectar los dos ácidos nucleicos objetivo diferentes.

35 En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para distinguir dos alelos diferentes en un ácido nucleico objetivo, que comprenden combinar dicho ácido nucleico objetivo con un primer cebador STAR y un segundo cebador STAR, en donde dicho primer cebador STAR comprende una secuencia de la etiqueta STAR que corresponde a un primer alelo, y el segundo cebador STAR que comprende una secuencia de la etiqueta STAR que corresponde a un segundo alelo, y un cebador inverso o directo común que se hibrida con dicho ácido nucleico objetivo; extender el primer y segundo cebadores STAR para formar un primer y segundo producto de extensión, respectivamente; amplificar los productos de extensión primero y segundo para formar productos de amplificación primero y segundo, respectivamente; y detectar la presencia o ausencia del primer y segundo productos de amplificación, en donde la presencia del primer producto de amplificación indica la presencia del segundo alelo y la presencia del segundo producto de amplificación indica la presencia del primer alelo. Por ejemplo, los diseños de cebadores STAR se pueden usar para el análisis de genotipificación con un par de sondas genéricas TaqMan® que se incorporan a los cebadores STAR (ver Figura 2C).

45 Por ejemplo, una reacción se usa para amplificar un locus particular en una muestra de ácido nucleico con dos cebadores STAR, uno con una secuencia de la etiqueta STAR complementaria a un primer alelo del locus y el otro con una secuencia de la etiqueta STAR complementaria a un segundo alelo del locus y un cebador común inverso o directo que hibrida con el ácido nucleico objetivo del locus; extender los cebadores STAR para formar productos de extensión; amplificar los productos de extensión para formar productos de amplificación; y detectar la presencia o ausencia de los productos de amplificación. Se pueden usar sondas detectoras marcadas, tales como sondas TaqMan, que hibridan con los cebadores STAR. En ciertas modalidades, las sondas detectoras difieren para el primer y el segundo cebador STAR. Por ejemplo, una sonda detectora marcada con un colorante se usa con el primer cebador STAR y una sonda detectora marcada con un colorante diferente se usa con el segundo cebador STAR.

55 Cuando el primer alelo está presente en una muestra de ácido nucleico, el uso de un cebador STAR con una secuencia de la etiqueta STAR que se diseña para ser complementaria a la primera secuencia del alelo resultará en un producto de extensión en donde la secuencia de la etiqueta STAR y la región objetivo de la etiqueta son complementarias, lo que permite que el producto de extensión se pliegue para autoalinearse en una estructura de tallo-lazo. Por lo tanto, la amplificación del producto de extensión que comprende el primer alelo se suprime y la cantidad de producto de amplificación se reduce en gran medida o está ausente. El cebador STAR con la secuencia de la etiqueta STAR que se diseña para ser complementaria a la segunda secuencia del alelo resultará en un producto de extensión en donde la secuencia de la etiqueta STAR y la región objetivo de la etiqueta son dispares. Con esta disparidad, el producto de extensión que comprende el segundo alelo no se autoalinea, o al menos no en un grado suficiente, para no suprimir la amplificación. Por lo tanto, la ausencia del producto de amplificación del cebador STAR dirigido al primer alelo ("el primer producto de amplificación del alelo") y la presencia del producto de amplificación del cebador STAR dirigido al segundo alelo ("el segundo producto de amplificación del alelo") indica la presencia del primer alelo en la muestra de ácido nucleico

objetivo. La presencia del primer producto de amplificación de alelos y la ausencia del segundo producto de amplificación de alelos indica la presencia del segundo alelo en la muestra de ácido nucleico objetivo.

En ciertas modalidades, se proporcionan métodos para distinguir entre ácidos nucleicos objetivo metilados y no metilados. Mediante el uso del ADN genómico convertido con bisulfito, se pueden usar cebadores STAR para cuantificar la metilación del ADN. Véase, por ejemplo, la Figura 2B. Los cebadores STAR pueden diseñarse para la supresión de la amplificación del ADN metilado mediante el direccionamiento contra la dC en el ácido nucleico objetivo, o para la supresión de la amplificación del ADN no metilado mediante el direccionamiento contra el dU en el ácido nucleico objetivo.

Por ejemplo, se usa una reacción para amplificar el ácido nucleico objetivo tratado con bisulfito con un cebador STAR, en donde dicho cebador STAR comprende una secuencia de la etiqueta STAR que corresponde a secuencias objetivo de la etiqueta STAR no metiladas en el ácido nucleico objetivo, y un cebador común inverso o directo que hibrida con dicho ácido nucleico objetivo; extender el cebador STAR para formar un producto de extensión; amplificar los productos de extensión para formar productos de amplificación; y detectar la presencia o ausencia de los productos de amplificación, en donde la presencia del producto de amplificación indica la presencia de metilación y la ausencia del producto de amplificación indica la ausencia de la metilación.

El tratamiento con bisulfito convierte las citosinas no metiladas en uracilo y no cambia las citosinas metiladas. Cuando el ácido nucleico objetivo no está metilado en la base de nucleótidos que se interroga por su estado de metilación, el uso de un cebador STAR con una secuencia de la etiqueta STAR que se diseña para ser complementaria a una secuencia objetivo no metilada (por ejemplo, una secuencia de la etiqueta STAR que comprende una "A" para ser complementaria a un dU convertido en la región objetivo de la etiqueta STAR en la base de nucleótidos interrogada) resultará en un producto de extensión en donde la secuencia de la etiqueta STAR y la región objetivo de la etiqueta son complementarias, lo que permite que el producto de extensión se pliegue para autoalinearse en una estructura de tallo-lazo. Por lo tanto, se suprime la amplificación del producto de extensión y la cantidad de producto de amplificación se reduce en gran medida o está ausente, lo que indica la ausencia de metilación en el ácido nucleico objetivo. Cuando el ácido nucleico objetivo se metila en la base de nucleótidos que se interroga por su estado de metilación, el uso del cebador STAR con la secuencia de la etiqueta STAR que se dirige a la secuencia objetivo no metilada resultará en un producto de extensión en donde la secuencia de la etiqueta STAR y la región objetivo de la etiqueta no coinciden (la "A" de la secuencia de la etiqueta STAR y la "C" de la región objetivo de la etiqueta STAR). Con esta disparidad, el producto de extensión no se autoalinea, o al menos no en un grado suficiente, para no suprimir la amplificación. Por lo tanto, la presencia del producto de amplificación indica la metilación en el ácido nucleico objetivo.

En otra modalidad, se usa una reacción similar para amplificar el ADN con un cebador STAR que comprende una secuencia de la etiqueta STAR específica del ADN metilado. El uso de un cebador STAR con una secuencia de la etiqueta STAR que se diseña para ser complementaria a una secuencia objetivo metilada (por ejemplo, una secuencia de la etiqueta STAR que comprende una "G" para ser complementaria a una dC en la región objetivo de la etiqueta STAR en la base de nucleótidos interrogada para la metilación) resultará en un producto de extensión en donde la secuencia de la etiqueta STAR y la región objetivo de la etiqueta son complementarias cuando el ADN objetivo se metila. Esta complementariedad permite que el producto de extensión se pliegue y se autoalinee en una estructura de tallo-lazo. Por lo tanto, se suprime la amplificación del producto de extensión y la cantidad de producto de amplificación se reduce en gran medida o está ausente, lo que indica la presencia de la metilación en el ácido nucleico objetivo. Cuando el ácido nucleico objetivo no está metilado en la base de nucleótidos que está siendo interrogada por su estado de metilación, el uso del cebador STAR con la secuencia de la etiqueta STAR que se dirige a la secuencia objetivo metilada resultará en un producto de extensión en donde la secuencia de la etiqueta STAR y la región objetivo de la etiqueta no coinciden (la "G" de la secuencia de la etiqueta STAR y el "U" de la región objetivo de la etiqueta STAR). Con esta disparidad, el producto de extensión no se autoalinea, o al menos no en un grado suficiente, para no suprimir la amplificación. Por lo tanto, la presencia del producto de amplificación indica la no metilación en el ácido nucleico objetivo.

En otra modalidad, las dos reacciones se combinan para cuantificar la metilación del ADN.

En ciertas modalidades, se proporcionan composiciones, en donde la composición comprende una o más moléculas de ácido nucleico y al menos un oligonucleótido, en donde el oligonucleótido comprende una secuencia de la etiqueta STAR y en donde el oligonucleótido es un oligonucleótido de la presente descripción. En ciertas modalidades, la composición comprende además una polimerasa de ácido nucleico. En ciertas modalidades, la composición comprende además un cebador directo o inverso. En ciertas modalidades, la composición comprende además una sonda detectora.

En ciertas modalidades, se proporcionan kits que pueden usarse para llevar a cabo reacciones de hibridación, extensión y amplificación mediante el uso de los oligonucleótidos que se describen en la presente. Los kits preferentes pueden comprender uno o más recipientes (como viales, tubos y similares) que se configuran para contener los reactivos que se usan en los métodos que se describen en la presente y, opcionalmente, pueden contener instrucciones o protocolos para usar dichos reactivos. Los kits que se describen en la presente pueden comprender uno o más componentes que se seleccionan del grupo que consiste en uno o más oligonucleótidos que se describen en la presente (que incluye, pero no se limitan a los cebadores STAR, los cebadores directos e inversos y las sondas detectoras), una o más polimerasas de ADN, tales como una polimerasa termoestable, una o más transcriptasas inversas, o cualquier otra polimerasa de ADN o ARN, uno o más agentes capaces de extinguir una o más de los marcadores, uno o más tampones o sales tamponantes,

5 uno o más nucleótidos, una o más moléculas objetivo/molde (que pueden usarse para determinar el rendimiento de la reacción, *es decir*, reacciones de control) y otros reactivos para el análisis o la manipulación adicional de los productos o intermediarios que se producen por los métodos que se describen en la presente. Tales componentes adicionales pueden incluir componentes que se usan para la clonación y/o secuenciación y componentes o equipos necesarios para la detección o cuantificación de la molécula de ácido nucleico de interés.

10 En ciertas modalidades, se proporcionan además kits para usar en la síntesis de una molécula de ácido nucleico, dicho kit que comprende uno o más oligonucleótidos que se describen en la presente, que incluyen los cebadores STAR. En ciertas modalidades, se proporcionan kits para usar en la amplificación de una molécula de ácido nucleico, dicho kit que comprende uno o más oligonucleótidos que se describen en la presente, que incluyen los cebadores STAR. En ciertas modalidades, se proporcionan kits para la detección o medición de productos de síntesis de ácidos nucleicos o productos de amplificación de ácidos nucleicos que comprenden uno o más oligonucleótidos que se describen en la presente, que incluyen los cebadores STAR.

15 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 usan en la siguiente descripción y en las reivindicaciones adjuntas. A lo largo de la descripción, la ejemplificación de términos específicos debe considerarse como ejemplos no limitantes.

20 Como se usa en esta descripción, las palabras "un" o "una" significan al menos uno, a menos que se indique de otra forma. En esta descripción, el uso del singular incluye al plural a menos que se indique de otra forma. Por ejemplo, pero no como una limitación, "un ácido nucleico objetivo" significa que puede estar presente más de un ácido nucleico objetivo; por ejemplo, una o más copias de una especie de ácido nucleico objetivo particular, así como dos o más especies diferentes de ácido nucleico objetivo. El término "y/o" significa que los términos antes y después de la barra se pueden considerar juntos o por separado. Con fines ejemplares, pero no como una limitación, "X y/o Y" puede significar "X" o "Y" o "X" e "Y".

25 Se apreciará que hay un "aproximadamente" implícito antes de las temperaturas, concentraciones, tiempos, *etcétera*, que se describen en la presente descripción, tal que las desviaciones leves e insustanciales están dentro del alcance de las presentes enseñanzas en la presente. También, el uso de "comprenden", "comprende", "que comprende", "contienen", "contiene", "que contiene", "incluyen", "incluye", y "que incluye" no pretenden ser limitantes. Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada son solamente ilustrativas y explicativas y no son restrictivas de las enseñanzas.

30 A menos que se indique específicamente en la descripción anterior, las modalidades en la descripción anterior que mencionan "que comprende" varios componentes también se contemplan como "que consiste en" o "que consiste esencialmente en" los componentes que se mencionan; las modalidades en la descripción que mencionan "que consiste en" varios componentes también se contemplan como "que comprende" o "que consiste esencialmente en" los componentes que se mencionan; y las modalidades en la descripción que mencionan "que consiste esencialmente en" varios componentes también se contemplan como "que consiste en" o "que comprende" los componentes que se mencionan (este uso indistinto no se aplica al uso de estos términos en las reivindicaciones).

35 Los encabezados de sección que se usan en la presente son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitantes del objeto que se desea en modo alguno. En el caso de que alguna bibliografía contradiga cualquier término que se define en esta descripción, esta descripción controla. Si bien las presentes enseñanzas se describen junto con diversas modalidades, no se pretende que las presentes enseñanzas se limiten a dichas modalidades. Por el contrario, las presentes enseñanzas abarcan diversas alternativas, modificaciones y equivalentes, como apreciarán los expertos en la técnica.

40 Los términos "amplicón" y "producto de amplificación" como se usan en la presente 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 modalidades, el amplicón de un ciclo de amplificación puede servir como un molde en un ciclo de amplificación posterior.

45 Los términos "alineamiento" e "hibridación", que incluyen, sin limitación, variaciones de las palabras de origen "hibridar" y "alinear", se usan indistintamente y significan la interacción de apareamiento de bases de nucleótidos de un ácido nucleico con otro ácido nucleico que resulta en 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 modalidades, 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 alinean 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).

50 En general, que este alineamiento 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 que se corresponden en las secuencias flanqueantes objetivo y/o en los amplicones, o las partes complementarias que se corresponden a una sonda indicadora y su sitio de

- 5 unión; al 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. Tales variables influyen en el tiempo que se requiere para la hibridación. Por lo tanto, las condiciones de alineamiento preferentes dependerán de la aplicación particular. Sin embargo, tales condiciones las pueden determinar de forma rutinaria los expertos en la técnica, sin experimentación indebida. Preferentemente, las condiciones de alineamiento se seleccionan para permitir que los cebadores y/o las sondas se hibriden selectivamente con una secuencia complementaria en la secuencia flanqueante o amplicón objetivo que se corresponde, pero no se hibriden en ningún grado significativo con diferentes ácidos nucleicos objetivo o secuencias no objetivo en la composición de reacción a la segunda temperatura de reacción.
- 10 El término "hibridar selectivamente" y variaciones de este, significa que, en condiciones de exigencia adecuadas, una secuencia dada (por ejemplo, pero sin limitarse a, un cebador) se alinea con una segunda secuencia que comprende una cadena complementaria de nucleótidos (por ejemplo, pero sin limitarse a, una secuencia flanqueante del objetivo o un sitio de unión al cebador de un amplicón), pero no se alinea a secuencias no deseadas, tales como ácidos nucleicos que no son objetivo, sondas u otros cebadores. Típicamente, 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 descripción, 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.
- 15 Como se usa en la presente, el término "exigencia" se usa para definir la temperatura y la composición del solvente existente durante la hibridación y las etapas de procesamiento posteriores en las que se formará un híbrido compuesto por dos secuencias de nucleótidos complementarias. La exigencia también define la cantidad de homología, las condiciones necesarias y la estabilidad de los híbridos que se forman entre dos secuencias de nucleótidos. A medida que aumentan las condiciones de exigencia, se favorece la hibridación selectiva y se desfavorece la hibridación cruzada no específica. El aumento de las condiciones de exigencia 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 exigencia más bajas en las que es más probable que se produzca un cebado incorrecto. Los expertos en la técnica entienden que las condiciones de exigencia adecuadas para permitir la hibridación selectiva de un cebador o par de cebadores a una secuencia flanqueante objetivo y/o al amplicón que se corresponde pueden determinarse de manera habitual mediante el uso de técnicas bien conocidas y sin experimentación indebida (véase, *por ejemplo*, PCR: The Basics from Background to Bench, McPherson y Moller, Bios Scientific Publishers, 2000).
- 20 La expresión "o combinaciones de estos", como se usa en la presente, se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los términos que se citan que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de estos" 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. Para continuar 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.
- 25 Los términos "desnaturalizar" y "desnaturalización", como se usan en la presente, se refieren a cualquier proceso en donde un polinucleótido bicatenario, que incluye, sin limitación, un fragmento de ADN genómico (ADNg) que comprende al menos un ácido nucleico objetivo, 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 que se emplea generalmente no es limitante a menos que interfiera sustancialmente con una etapa posterior de alineamiento o enzimática de una reacción de amplificación, o en ciertos métodos, la detección de una señal fluorescente.
- 30 Como se usa en la presente, 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.
- 35 El término "ligando del surco menor", como se usa en la presente, 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 mediante el desplazamiento del 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.
- 40 El término medición de "punto final" se refiere a un método en donde la recolección de datos ocurre solo una vez que la reacción se ha detenido.

Los términos "en tiempo real" y "en tiempo real continuo" son intercambiables y se refieren a un método en donde la recopilación de datos se produce a través del seguimiento periódico durante el curso de la reacción de polimerización. Por lo tanto, los métodos combinan amplificación y detección en un solo paso.

5

Como se usa en la presente, el término "PCR cuantitativa" se refiere al uso de la PCR para cuantificar la expresión génica.

Como se usa en la presente, los términos "Ct" y "umbral de ciclo" se refieren al tiempo en que la intensidad de fluorescencia es mayor que la fluorescencia de fondo. Se caracterizan por el punto en el tiempo (o ciclo de la PCR) donde se detecta por primera vez la amplificación objetivo. En consecuencia, cuanto mayor sea la cantidad del ADN objetivo en el material de partida, más rápido aparecerá un aumento significativo en la señal fluorescente, lo que produce un Ct más bajo.

10

Como se usa en la presente, el término "cebador" se refiere a un oligonucleótido monocatenario que se produce sintéticamente o biológicamente que se extiende por unión covalente de monómeros de nucleótidos durante la amplificación o polimerización de una molécula de ácido nucleico. La amplificación del ácido nucleico a menudo se basa en la síntesis del ácido nucleico por una polimerasa de ácido nucleico o transcriptasa inversa. Muchas de tales polimerasas o transcriptasas inversas requieren la presencia de un cebador que puede extenderse para iniciar tal síntesis de ácido nucleico. Un cebador es típicamente de 11 bases o más; lo más preferentemente, un cebador tiene 17 bases o más, aunque pueden usarse cebadores más cortos o más largos en dependencia de la necesidad. Como apreciarán los expertos en la materia, los oligonucleótidos que se describen en la presente pueden usarse como uno o más cebadores en diversas reacciones de extensión, síntesis o amplificación.

15

20

Los términos "complementariedad" y "complementario" son intercambiables y se refieren a la capacidad de los polinucleótidos para formar pares de bases entre sí. Los pares de bases se forman típicamente por enlaces de hidrógeno entre unidades de nucleótidos en cadenas o regiones de polinucleótidos antiparalelos. Las cadenas o regiones polinucleotídicas complementarias pueden formar pares de bases de la manera de Watson-Crick (por ejemplo, A a T, A a U, C a G). El 100% de complementariedad se refiere a la situación en donde cada unidad de nucleótidos de una cadena o región polinucleotídica puede unirse con cada unidad de nucleótidos de una segunda cadena o región polinucleotídica. "Complementariedad menos que perfecta" se refiere a la situación en donde algunas, pero no todas, las unidades de nucleótidos de dos cadenas o dos unidades pueden unirse entre sí por enlaces de hidrógeno.

25

30

Como se usa en la presente, el término "complemento inverso" se refiere a una secuencia que se alineará/apareará en bases o substancialmente se alineará/apareará en bases a un segundo oligonucleótido de acuerdo con las reglas que se definen por el apareamiento de bases Watson-Crick y la naturaleza antiparalela del ADN-ADN, ARN-ARN y ARN-ADN de doble hélice. Por lo tanto, como ejemplo, el complemento inverso de la secuencia de ARN 5'-AAUUUGC será 5'-GCAAUUU. Los esquemas de apareamiento de base alternativos, que incluyen, entre otros, el apareamiento de GU, también pueden incluirse en complementos inversos.

35

Como se usa en la presente, el término "sonda" se refiere a los ácidos nucleicos sintéticos o que se producen biológicamente (ADN o ARN) que, por diseño o selección, contienen secuencias de nucleótidos específicas que les permiten hibridarse, bajo condiciones que se definen, específicamente (*es decir*, preferentemente) para secuencias del ácido nucleico objetivo.

40

Como se usa en la presente, se usa "substancialmente menos extensible" para caracterizar un oligonucleótido que se extiende de manera ineficiente o no se extiende en una reacción de extensión y/o amplificación cuando el nucleótido más 3' del oligonucleótido no es complementario a la base que se corresponde al ácido nucleico objetivo/molde.

45

Como se usa en la presente, el término "molde" es intercambiable con "molécula objetivo" o "ácido nucleico objetivo" y se refiere a una molécula de ácido nucleico bicatenario o monocatenario que debe amplificarse, copiarse o extenderse, sintetizarse o secuenciarse. En el caso de una molécula de ADN de doble cadena, la desnaturalización de sus cadenas para formar una primera y una segunda cadena se realiza para amplificar, secuenciar o sintetizar estas moléculas. Un cebador, complementario a una parte de un molde se hibrida en condiciones apropiadas y la polimerasa (ADN polimerasa o transcriptasa inversa) puede sintetizar una molécula de ácido nucleico complementaria a dicho molde o a una parte de este. La molécula recién sintetizada, de acuerdo con la presente, puede ser igual o más corta en longitud que el molde original. La incorporación de la disparidad durante la síntesis o extensión de la molécula recién sintetizada puede resultar en uno o varios pares de bases dispares. Por lo tanto, la molécula sintetizada no necesita ser exactamente complementaria al molde. El molde puede ser una molécula de ARN, una molécula de ADN o una molécula híbrida de ADN/ARN. Una molécula recién sintetizada puede servir como molde para la posterior síntesis o amplificación del ácido nucleico.

50

55

60

Como se usa en la presente, el término "reacción de extensión" se refiere a una reacción de elongación en donde un cebador hibridado con un ácido nucleico objetivo se extiende para formar un "producto de extensión" que comprende una cadena complementaria al ácido nucleico objetivo.

65

El polinucleótido objetivo puede obtenerse de cualquier fuente y puede comprender cualquier número de componentes de composición diferentes. Por ejemplo, el objetivo puede ser un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN), un ARN de

transferencia (ARNt), un ARN interferente pequeño (ARNip), un microARN (miARN) u otro ARN pequeño maduro, y puede comprender análogos de ácido nucleico u otras moléculas miméticas de ácidos nucleicos. El objetivo puede estar metilado, no metilado o ambos. El objetivo pueden ser citosinas tratadas con bisulfito y no metiladas convertidas en uracilo. Además, se apreciará que "polinucleótido objetivo" puede referirse al propio polinucleótido objetivo, así como a sus sustitutos, por ejemplo, productos de amplificación y secuencias naturales. Los polinucleótidos objetivo de las presentes enseñanzas pueden derivar de cualquiera de una variedad de fuentes, que incluyen sin limitación, virus, arqueas, protistas, procariotas y eucariotas, por ejemplo, pero sin limitarse a, plantas, hongos y animales. Estas fuentes pueden incluir, pero no están limitadas a, sangre completa, una biopsia de tejido, linfa, médula ósea, líquido amniótico, cabello, piel, semen, agentes de guerra biológica, secreciones anales, secreciones vaginales, transpiración, saliva, hisopos bucales, diferentes muestras ambientales (por ejemplo, agrícola, agua y suelo), muestras de investigación en general, muestras purificadas en general, células cultivadas y células lisadas. Se apreciará que los polinucleótidos objetivo se pueden aislar de muestras mediante el uso de cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, el Applied Biosystems ABI Prism® 6100 Nucleic Acid PrepStation (Life Technologies, Foster City, CA) y la Estación de trabajo automatizada de ácidos nucleicos ABI Prism® 6700 (Life Technologies, Foster City, CA), el kit de aislamiento de ARN Ambion® mirVana™ (Life Technologies, Austin, TX), y los similares. Se apreciará que los polinucleótidos objetivo se pueden partir o cortar antes del análisis, que incluye el uso de procedimientos tales como fuerza mecánica, ultrasonidos, escisión con endonucleasa de restricción o cualquier método conocido en la técnica. En general, los polinucleótidos objetivo de las presentes enseñanzas serán monocatenarios, aunque en algunas modalidades el polinucleótido objetivo puede ser bicatenario, y puede resultar de la desnaturalización una cadena simple.

Como se usa en la presente, los términos "horquilla" y "tallo-lazo" son intercambiables y se usan para indicar la estructura de un oligonucleótido en donde una o más partes del oligonucleótido forman pares de bases con una o más partes del oligonucleótido. Cuando las dos partes están apareadas con bases para formar una parte bicatenaria del oligonucleótido, la parte bicatenaria puede denominarse tallo. Por lo tanto, en dependencia del número de partes complementarias que se usan, se pueden formar varios tallos (preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10).

El término "incorporar" como se usa en la presente, significa convertirse en parte de una molécula o cebador de ADN o ARN.

El término "colorante de unión a ácido nucleico", como se usa en la presente, 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. Típicamente, 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, al unirse en los surcos mayores o menores del segmento bicatenario, o ambos. Los ejemplos no limitantes de colorantes de unión a ácido nucleico incluyen el bromuro de etidio, el DAPI, los derivados de Hoechst que incluyen, sin limitación, Hoechst 33258 y Hoechst 33342, los 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>), véase, *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®.

Como se usa en la presente, 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 quiméricas de los mismos y puede incluir análogos de nucleótidos. Las unidades de monómeros nucleótidos pueden comprender cualquiera de los nucleótidos que se describen en la presente, que incluyen, pero no se limitan 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 de otra forma, 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 de otra forma.

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.

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 nucleósidos 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 los 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 ejemplares incluyen: fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforanilidato, fosforamidato, boronofosfatos, que incluyen a los contraiones asociados, *por ejemplo*, H<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>. Los análogos de base ejemplares incluyen: 2,6-diaminopurina, hipoxantina, pseudouridina, C-5-propino, isocitosina, isoguanina, 2-tiopirimidina. Los análogos de azúcares ejemplares 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 la presente, 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 modalidades, 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 modalidades, un recipiente de reacción comprende un pocillo de una placa de múltiples pocillos, un sitio en un portaobjetos de vidrio o una 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 modalidades, 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 que se describen. Se reconocerá que una variedad de recipientes de reacción están disponibles comercialmente o pueden diseñarse para usar en el contexto de las presentes enseñanzas.

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

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 "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 polimerasas de ADN termolábiles T5 y T7 pueden inactivarse 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. Típicamente una polimerasa termoestable también tendrá una temperatura óptima más alta que las polimerasas de ADN termolábiles.

La concentración de trabajo se refiere a la concentración de un reactivo que está en o cerca de la concentración óptima que se usa 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 "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.

Como se usa en la presente, los términos "amplificación", "amplificación de ácido nucleico" o "amplificación" se refieren a la producción de copias múltiples de un molde de ácido nucleico, o a 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, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Sin embargo, cualquiera de las reacciones de amplificación que se conocen puede ser adecuadas para usar como se describe en la presente. El término "amplificación" que típicamente se refiere a un aumento "exponencial" en el ácido nucleico objetivo se puede usar en este documento para describir aumentos tanto lineales como exponenciales en los números de una secuencia objetivo seleccionada del ácido nucleico.

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 que se usan para amplificar un ácido nucleico objetivo. Tales reacciones también pueden realizarse mediante el uso de soportes sólidos (*por ejemplo*, un arreglo). Las reacciones también pueden realizarse en formato único o múltiple, según lo desee el usuario. Estas reacciones incluyen típicamente enzimas, tampones acuosos, sales, cebadores de amplificación, el ácido nucleico objetivo y trifosfatos de nucleósidos. En dependencia del contexto, la mezcla puede ser una mezcla de reacción de amplificación completa o incompleta. El método que se usa para amplificar el ácido nucleico objetivo puede estar disponible para un experto en la técnica. Se puede usar cualquier medio *in vitro* para multiplicar las copias de una secuencia objetivo 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 que se describen en la

presente 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 PCR (véase, 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 la PCR. Los métodos ejemplares adicionales incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; véase, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núm. 4,683,202; 4,683,195; 4,965,188; y/o 5,035,996), los procedimientos isotérmicos (con el uso de una o más polimerasas de ARN (véase, *por ejemplo*, la publicación PCT núm. WO 2006/081222), el desplazamiento de cadena (véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. RE39007E), la destrucción parcial de las moléculas cebadoras (véase, *por ejemplo*, la publicación PCT núm. WO 2006/087574)), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, *por ejemplo*, Wu, y otros, *Genomics* 4: 560-569 (1990)) y/o Barany, y otros *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193 (1991)), los sistemas de replicasa Q $\beta$  de ARN (véase, *por ejemplo*, la publicación PCT núm. WO 1994/016108), los sistemas basados en la transcripción de ARN (*por ejemplo*, TAS, 3SR), la amplificación de círculo rodante (RCA) (véase, *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 la 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 usar en la polimerización y/o amplificación de ácidos nucleicos objetivo para usar como se describe en la presente.

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 la 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, la determinación de curvas de dilución de calibración y cálculo de la pendiente, la determinación mediante el uso del software qBase como se describe en Hellemans y otros, *Genome Biology* 8:R19 (2007), la determinación mediante el uso del cálculo de delta delta Cq ( $\Delta\Delta Cq$ ) como se describe en Livak y Schmittgen, *Methods* 25:402 (2001) o por el método que se describe en Pfaffl, *Nucl. Acids Res.* 29:e45 (2001).

En ciertas modalidades, 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 del objetivo 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 mediante el uso de una polimerasa de ADN. El ciclo puede o no repetirse. En ciertas modalidades, 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.

En algunas modalidades, la amplificación comprende el ciclado térmico mediante el uso de un instrumento, por ejemplo, pero sin limitarse a, un sistema termociclador de PCR GeneAmp® 9700, 9600, 2700 o 2400, 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 modalidades, se generan amplicones monocatenarios en una reacción de amplificación, por ejemplo, pero sin limitarse a, la PCR asimétrica o A-PCR.

En algunas modalidades, la amplificación comprende una reacción en dos etapas que incluye, sin limitación, una etapa de amplificación previa 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 (véase, *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 ciertas modalidades, una reacción de amplificación comprende la amplificación múltiple, en donde una multiplicidad de ácidos nucleicos objetivo diferentes y/o una multiplicidad de especies de productos de amplificación diferentes se amplifican simultáneamente mediante el uso de una multiplicidad de conjuntos de cebadores diferentes. En ciertas modalidades, 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.

Los métodos ejemplares para polimerizar y/o amplificar ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, las reacciones de extensión mediadas por la polimerasa. Por ejemplo, la reacción de extensión mediada por la polimerasa puede ser la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En otras modalidades, la reacción de amplificación de ácido nucleico es una reacción que produce varios productos simultáneamente. Por ejemplo, los métodos ejemplares para polimerizar y/o amplificar y detectar ácidos nucleicos adecuados para usar como se describe en la presente están disponibles comercialmente como TaqMan® (véase, 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 realizan típicamente mediante la realización de una amplificación de ácidos nucleicos sobre un polinucleótido objetivo mediante el uso de una polimerasa de ácido nucleico que tiene actividad nucleasa 5' a 3', de un cebador capaz de hibridarse con dicho polinucleótido objetivo y de una sonda oligonucleotídica capaz de hibridarse con dicho polinucleótido objetivo en 3' con relación a dicho cebador. La sonda oligonucleotídica incluye típicamente un marcador detectable (*por ejemplo*, una molécula indicadora fluorescente) y una molécula atenuadora capaz de atenuar la fluorescencia de dicha molécula indicadora. En ciertas modalidades, 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 sigue 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 son adecuadas para usar en los métodos que se describen en la presente.

Como se usa en la presente, el término "sonda detectora" se refiere a una molécula que se usa en una reacción de amplificación, típicamente para el análisis de la PCR cuantitativa o en tiempo real, así como el análisis de punto final. Tales sondas detectoras se pueden usar para seguir la amplificación del polinucleótido objetivo. En algunas modalidades, las sondas detectoras presentes en una reacción de amplificación son adecuadas para seguir la cantidad de amplicón(s) producido(s) en función del tiempo. Tales sondas detectoras incluyen, pero no se limitan al ensayo de exonucleasa 5' (las sondas TaqMan® que se describen en la presente (véase también la patente de Estados Unidos núm. 5,538,848) varios modelos moleculares de tallo-lazo (véase, *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)), los modelos sin tallo o lineales (véase, *por ejemplo*, la publicación PCT núm. WO 99/21881, los PNA Molecular Beacons™ (véase, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núms. 6,355,421 y 6,593,091), los modelos de PNA lineales (véase, *por ejemplo*, Kubista y otros, SPIE 4264:53-58 (2001)), las sondas que no son de FRET (véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 6,150,097), las sondas Sunrise®/Amplifluor® (patente de Estados Unidos núm. 6,548,250), las sondas de tallo-lazo y los dúplex Scorpions™ (Solinas y otros, Nucleic Acids Research 29:E96 (2001) y la patente de Estados Unidos núm. 6,589,743), las sondas de lazo abultado (patente de Estados Unidos núm. 6,590,091), las sondas de pseudonudo (patente de Estados Unidos núm. 6,589,250), los ciclicones (patente de Estados Unidos núm. 6,383,752), la sonda MGB Eclipse™ (Epoch Biosciences), las sondas en horquilla (patente de Estados Unidos núm. 6,596,490), las sondas Light-up de ácido nucleico peptídico (PNA), las sondas de nanopartículas autoensambladas y las sondas modificadas con ferroceno que se describen, *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, 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). Las sondas detectoras también pueden incluir atenuadores, que incluyen sin limitación, los atenuadores de agujeros negros (Biosearch), Iowa Black (IDT), el atenuador QSY (Molecular Probes) y los atenuadores sulfonato/carboxilato Dabsyl y Dabcel (Epoch). Las sondas detectoras 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 objetivo atenúa la señal, o en donde la hibridación en un objetivo altera la firma de la señal a través de un cambio en la fluorescencia. Las sondas detectoras 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). En algunas modalidades, se usan marcadores de interquelación tales como bromuro de etidio, SYBR® Green I (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) y PicoGreen® (Life Technologies Corp.), lo que permite la visualización en tiempo real o punto final, de un producto de amplificación en ausencia de una sonda detectora. En algunas modalidades, la visualización en tiempo real puede comprender tanto una sonda detectora de intercalación como una sonda detectora basada en secuencia. En algunas modalidades, la sonda detectora se atenúa al menos parcialmente cuando no se hibrida con una secuencia complementaria en la reacción de amplificación, y no se atenúa al menos parcialmente cuando se hibrida con una secuencia complementaria en la reacción de amplificación. En algunas modalidades, las sondas detectoras de las presentes enseñanzas tienen una T<sub>m</sub> de 63-69 °C, aunque se apreciará que al guiarse por las presentes enseñanzas, la experimentación de rutina puede resultar en sondas detectoras con otras T<sub>m</sub>s. En algunas modalidades, las sondas pueden comprender además diversas modificaciones, tales como un aglutinante de surco menor (véase, *por ejemplo*, la patente de Estados Unidos 6,486,308) para proporcionar además características termodinámicas que se desean. En algunas modalidades, las sondas detectoras pueden corresponder a partes de identificación o complementos de la parte de identificación.

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

Los métodos ejemplares adicionales para polimerizar y/o amplificar y detectar ácidos nucleicos objetivo adecuados para usar como se describe en la presente implican "modelos moleculares", que son sondas oligonucleotídicas monocatenarias en forma de horquilla. En presencia de la secuencia objetivo, la sonda se despliega, se une y emite una señal (*por ejemplo*, fluorescencia). Un modelo molecular incluye típicamente al menos cuatro componentes: 1) el "lazo", una región de 18-30 nucleótidos que es complementaria a la secuencia objetivo; 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 objetivo). Por lo tanto, en presencia de un objetivo complementario, la parte de "tallo" del modelo se separa, lo que resulta en que la sonda hibrida con el objetivo. También se conocen otros tipos de modelos moleculares y pueden ser adecuados para usar en los métodos que se describen en la presente. Los modelos moleculares pueden usarse en una variedad de sistemas de ensayo. Uno de tales 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 el virus de mieloblastosis aviar (AMV), la transcriptasa inversa (RT), la polimerasa T7 de ARN, la ARNasa H y dos cebadores oligonucleotídicos. Después de la amplificación, el ácido nucleico objetivo amplificado puede detectarse mediante el uso de un modelo molecular. Otros usos para los modelos moleculares se conocen en la técnica y son adecuados para usar en los métodos que se describen en la presente.

El sistema Scorpions™ es otro formato de ensayo ejemplar que puede usarse en los métodos que se describen en la presente. 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 objetivo, el marcador detectable y el atenuador se separan, lo que conduce a un aumento de la señal que emite el marcador detectable. Típicamente, un cebador que se usa en la reacción de amplificación incluye un elemento de sonda en el extremo 5' junto con un elemento "bloqueador de la PCR" (*por ejemplo*, un monómero de hexaetilenglicol (HEG) (Whitcombe, y otros Nat. Biotech. 17: 804-807 (1999)) al inicio del lazo de la horquilla. La sonda típicamente 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*, la PCR), el cebador se hibrida con el objetivo 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. Mediante el uso de la PCR como ejemplo, después de completar un ciclo de extensión, la región objetivo 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 la PCR recién producido. Esto resulta en la separación del marcador detectable del atenuador y produce la emisión de la señal. Otros usos para tales sondas marcadas se conocen en la técnica y son adecuados para usar en los métodos que se describen en la presente.

En algunas modalidades, los métodos se realizan antes o junto con una reacción de secuenciación. El término "secuenciación" se usa en un sentido amplio en la presente y se refiere a cualquier técnica que se conoce 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 objetivo 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; la secuenciación por hibridación; la secuenciación por síntesis; y el mapeo de restricción. Algunos métodos de secuenciación comprenden la electroforesis, que incluye la electroforesis capilar y la electroforesis en gel; la secuenciación por hibridación que incluye la hibridación a microarreglos; la espectrometría de masas; la detección de molécula única; y la detección de iones/protones. En algunas modalidades, la secuenciación comprende la secuenciación directa, la secuenciación de dúplex, la secuenciación cíclica, la secuenciación por extensión de una base (SBE), la secuenciación en fase sólida o las combinaciones de estas. En algunas modalidades, la secuenciación comprende detectar el producto de secuenciación mediante 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 3730x1, 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 modalidades, la secuenciación comprende incorporar un dNTP, que incluye un dATP, un dCTP, un dGTP, un dTTP, un dUTP, un dITP o combinaciones de estos, e incluir análogos didesoxirribonucleotídicos de dNTP, en un producto de amplificación.

El término "polimerasa de ADN", como se usa en la presente, se refiere generalmente a cualquier polipéptido que puede catalizar la extensión 5' a 3' de un cebador hibridado mediante la adición de desoxinucleótidos didesoxirribonucleotídicos 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 de desoxirribonucleotídicos 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 polimerasas de ADN incluyen polimerasas de ADN dependientes de ARN que incluyen, sin limitación, transcriptasas inversas y polimerasas de ADN dependientes de ADN. Debe apreciarse que ciertas polimerasas de ADN (*por ejemplo*, pero sin limitarse a ciertas polimerasas de ADN eubacterianas de Tipo A y la polimerasa de ADN *Taq*) pueden comprender además una actividad nucleasa específica de estructura.

Las polimerasas de ácido nucleico que pueden emplearse en las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos que se describen pueden ser cualquiera que funcione para realizar la reacción que se desea que incluye, por ejemplo, una

polimerasa de ácido nucleico de procarionta, fúngica, viral, de bacteriófago, vegetal y/o de eucariota. Como se usa en la presente, el término "polimerasa de ADN" se refiere a una enzima que sintetiza una cadena de ADN *de novo* mediante el uso de una cadena de ácido nucleico como molde. La polimerasa de ADN usa 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 cadena de ADN que se sintetiza es complementaria a la cadena molde. La polimerasa de ADN 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 resulta en la elongación de la nueva cadena en una dirección 5' a 3'. Dado que la polimerasa de ADN solo puede añadir un nucleótido a un grupo 3'-OH preexistente, para comenzar una reacción de síntesis de ADN, la polimerasa de ADN 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 polimerasas de ADN pueden ser una polimerasa de ADN natural o una variante de enzima natural que tenga la actividad mencionada anteriormente. Por ejemplo, puede incluir una polimerasa de ADN que tiene una actividad de desplazamiento de cadena, una polimerasa de ADN que carece de actividad exonucleasa 5' a 3', una polimerasa de ADN que tiene una actividad de transcriptasa inversa o una polimerasa de ADN que tiene una actividad endonucleasa.

Las polimerasas de ácido nucleico adecuadas también pueden comprender holoenzimas, partes funcionales de las holoenzimas, polimerasa quimérica o cualquier polimerasa modificada que pueda efectuar la síntesis de una molécula de ácido nucleico. Dentro de esta descripción, una polimerasa de ADN también puede incluir una polimerasa, transferasa terminal, transcriptasa inversa, telomerasa y/o polinucleótido fosforilasa. Los ejemplos no limitantes de polimerasas pueden incluir, por ejemplo, la polimerasa T7 de ADN, la polimerasa de ADN y mitocondrial de eucariota, la polimerasa de ADNI, II, III, IV y/o V de procarionta; la polimerasa de eucariota  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\zeta$ ,  $\iota$  y/o  $\kappa$ ; la polimerasa I de ADN I de *E. coli*; las subunidades alfa y/o épsilon de la polimerasa III de ADN de *E. coli*; la polimerasa IV de *E. coli*, la polimerasa V de *E. coli*; la polimerasa I de ADN de *T. aquaticus*; la polimerasa I de ADN de *B. stearothermophilus*; las polimerasas de *Euryarchaeota*; la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT); la polimerasa 4 de *S. cerevisiae*; las polimerasas de síntesis a través de lesiones; la transcriptasa inversa; y/o la telomerasa. Los ejemplos de polimerasas de ADN que se pueden usar en los métodos, kits y composiciones que se proporcionan en la presente incluyen, pero no se limitan a: la polimerasa de ADN de *Thermus thermophilus* (Tth), la polimerasa de ADN de *Thermus aquaticus* (Taq), la polimerasa de ADN de *Thermotoga neopolitana* (Tne), la polimerasa de ADN de *Thermotoga maritima* (Tma), la polimerasa de ADN de *Thermococcus litoralis* (Tli o VENT™), la polimerasa de ADN de *Pyrococcus furiosus* (Pfu), la polimerasa de ADN DEEPVENT™, la polimerasa de ADN de *Pyrococcus woosii* (Pwo), la polimerasa de ADN de *Bacillus stearothermophilus* (Bst), la polimerasa de ADN de *Bacillus caldophilus* (Bca), la polimerasa de ADN de *Sulfolobus acidocaldarius* (Sac), la polimerasa de ADN de *Thermoplasma acidophilum* (TAc), la polimerasa de ADN de *Thermus flavus* (Tfl/Tub), la polimerasa de ADN de *Thermus ruber* (Tru), la polimerasa de ADN de *Thermus brockianus* (DYNAZYME™), la polimerasa de ADN de *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Mth), la polimerasa de ADN de *Mycobacterium* (Mtb, Mlep), y mutantes, variantes y derivados de estas. Las polimerasas de ARN tales como T3, T5 y SP6 y los mutantes, variantes y derivados de estas también se pueden usar de acuerdo con las presentes enseñanzas. En general, se puede usar cualquier polimerasa de ADN de tipo I de acuerdo con las presentes enseñanzas, aunque se pueden usar otras polimerasas de ADN que incluyen, pero no se limitan a, las polimerasas de ADN de tipo III o de la familia A, B, C, etc. Adicionalmente, pueden usarse de acuerdo a las presentes enseñanzas, cualquiera de las polimerasas de ADN modificadas genéticamente, cualquiera que tenga una actividad exonucleasa 3'-5' reducida o insignificante (*por ejemplo*, la polimerasa de ADN SuperScript™) y/o las polimerasas de ADN 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™), AmpliTaq® Gold, la polimerasa de ADN 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 estas. Otras polimerasas de ácido nucleico también pueden ser adecuadas como entendería un experto en la técnica.

Las polimerasas que se usan de acuerdo con la invención pueden ser cualquier enzima que pueda sintetizar una molécula de ácido nucleico a partir de un molde de ácido nucleico, típicamente en la dirección 5' a 3'. Las polimerasas de ácido nucleico que se usan en los métodos, kits y composiciones que se proporcionan en la presente pueden ser mesófilas o termófilas. Las polimerasas de ADN mesófilas ejemplares incluyen la polimerasa de ADN T7, la polimerasa de ADN T5, la polimerasa de ADN del fragmento Klenow, la polimerasa de ADN III y similares. Las polimerasas de ADN termoestables ejemplares que pueden usarse en los métodos de las presentes enseñanzas incluyen la Taq, Tne, Tma, Pfu, Tfl, Tth, el fragmento Stoffel, la polimerasa de ADN VENT™ y DEEPVENT™, y los mutantes, variantes y derivados de estas (Patente de Estados Unidos 5,436,149; patente de los Estados Unidos núm. 4,889,818; U.S. Pat. No. 4,965,188; U.S. Pat. No. 5,079,352; U.S. Pat. No. 5,614,365; U.S. Pat. No. 5,374,553; U.S. Pat. No. 5,270,179; U.S. Pat. No. 5,047,342; patente núm. 5,512,462; publicaciones PCT núms. WO 92/06188, WO 92/06200 y WO 96/10640; Barnes, Gene 112:29-35 (1992); Lawyer, y otros, PCR Meth. Appl. 2:275-287 (1993); Flaman, y otros, Nucl. Acids Res. 22 (15): 3259-3260 (1994)). Los ejemplos de las polimerasas de ADN que carecen sustancialmente de actividad de exonucleasa 3' incluyen, pero no se limitan a la polimerasa de ADN Taq, Tne (exo-), Tma (exo-), Pfu (exo-), Pwo (exo-) y Tth, y los mutantes, variantes y derivados de estas.

Las polimerasas de ADN para usar en la presente se pueden obtener en el mercado, por ejemplo, en Life Technologies Corp. (Carlsbad, CA), Pharmacia (Piscataway, N.J.), Sigma (St. Louis, Missouri) y en Boehringer Mannheim.

Las enzimas para usar en las composiciones, métodos, composiciones y kits que se proporcionan en la presente también pueden incluir cualquier enzima que tenga actividad de transcriptasa inversa. Tales enzimas incluyen, pero no se limitan a, la transcriptasa inversa retroviral, la transcriptasa inversa de retrotransposón, la transcriptasa inversa de hepatitis B, la transcriptasa inversa del virus del mosaico de la coliflor, la transcriptasa inversa bacteriana, la polimerasa de ADN Tth, la polimerasa de ADN Taq (Saiki, y otros, Science 239: 487-491 (1988); las patentes de los Estados Unidos Núms. 4,889,818 y 4,965,188), la polimerasa de ADN (Publicación PCT Núm. WO 96/10640), la polimerasa de ADN Tma (patente de los Estados Unidos núm. 5,374,553) y los mutantes, fragmentos, variantes o derivados de estas (véanse, por ejemplo, la solicitud de patente de los Estados Unidos en trámite, de propiedad común, números de serie 08/706,702 y 08/706,706, ambas presentadas el 9 de septiembre de 1996). Como entenderá un experto en la materia, las transcriptasas inversas modificadas y la polimerasa de ADN que tienen actividad de transcriptasa inversa pueden obtenerse mediante técnicas de ingeniería genética o recombinantes que son bien conocidas en la técnica. Las transcriptasas inversas o polimerasas mutantes pueden, por ejemplo, obtenerse mutando el gen o los genes que codifican la transcriptasa inversa o la polimerasa de interés mediante mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria. Tales mutaciones pueden incluir mutaciones puntuales, mutaciones de eliminación y mutaciones de inserción. En algunas modalidades, se usan una o más mutaciones puntuales (*por ejemplo*, la sustitución de uno o más aminoácidos con uno o más aminoácidos diferentes) para construir transcriptasas inversas mutantes o polimerasas mutantes para usar en la invención. Los fragmentos de transcriptasas inversas o polimerasas también pueden obtenerse mediante mutación por eliminación mediante técnicas recombinantes que se conocen bien en la técnica, o mediante digestión enzimática de la(s) transcriptasa(s) o polimerasa(s) de interés mediante el uso de cualquiera de un número de enzimas proteolíticas bien conocidas.

En algunas modalidades, las enzimas para usar en los métodos que se proporcionan en la presente incluyen aquellas que están reducidas o sustancialmente reducidas en la actividad de RNasa H. Tales enzimas que se reducen o reducen sustancialmente en la actividad de RNasa H pueden obtenerse mutando el dominio de RNasa H dentro de la transcriptasa inversa de interés, por ejemplo, mediante una o más mutaciones puntuales, una o más mutaciones de eliminación, o una o más mutaciones de inserción como se describió anteriormente. Una enzima "sustancialmente reducida en la actividad de la RNasa H" se refiere a una enzima que tiene menos de aproximadamente 30%, menos de aproximadamente 25%, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 7,5 %, o menos de aproximadamente 5%, o menos de aproximadamente 5% o menos de aproximadamente 2%, de la actividad de RNasa H del tipo salvaje que se corresponde o de la enzima RNasa H<sup>+</sup> tal como las transcriptasas inversas de tipo salvaje del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV), del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) o del virus del sarcoma de Rous (RSV). La actividad de RNasa H de cualquier enzima se puede determinar por una variedad de ensayos, tales como los que se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos núm. 5,244,797, en Kotewicz, M.L., y otros, Nucl. Acidos Res. 16:265 (1988), en Gerard, y otros, FOCUS 14 (5): 91 (1992), y en la patente de Estados Unidos núm. 5,668,005.

Los polipéptidos que tienen actividad de transcriptasa inversa para usar en los métodos que se proporcionan en la presente pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, de Life Technologies Corp. (Carlsbad, CA), de Pharmacia (Piscataway, NJ), de Sigma (Saint Louis, Mo.) o de Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianápolis, Ind.). Alternativamente, las polimerasas o las transcriptasas inversas que tienen actividad de polimerasa se pueden aislar de sus fuentes virales o bacterianas naturales de acuerdo con procedimientos convencionales para aislar y purificar proteínas naturales que se conocen bien por un experto en la técnica (véase, por ejemplo., Houts, G.E. y otros, *J. Virol.* 29:517 (1979)). Además, los polipéptidos que tienen actividad de transcriptasa inversa pueden prepararse mediante técnicas de ADN recombinante que son familiares para un experto en la técnica (véase, *por ejemplo*, Kotewicz, y otros, Nucl. Acidos Res. 16:265 (1988); Soltis y Skalka, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3372-3376 (1988)).

Los polipéptidos ejemplares que tienen actividad de transcriptasa inversa para usar en los métodos que se proporcionan en la presente incluyen la transcriptasa inversa M-MLV, la transcriptasa inversa del RSV, la transcriptasa inversa del AMV, la transcriptasa inversa del virus asociado a Rous (RAV), la transcriptasa inversa del virus asociado a mieloblastosis (MAV) y la transcriptasa inversa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), y otras que se describen en el documento WO 98/47921 y los derivados, variantes, fragmentos o mutantes de estas, y combinaciones de estas. En una modalidad adicional, las transcriptasas inversas se reducen o reducen sustancialmente en la actividad de RNasa H, y pueden seleccionarse del grupo que consiste en la transcriptasa inversa del M-MLV H, la transcriptasa inversa del RSV H, la transcriptasa inversa del AMV H, la transcriptasa inversa del RAV H, la transcriptasa inversa del MAV H y la transcriptasa inversa H del VIH, y los derivados, variantes, fragmentos o mutantes de estas, y las combinaciones de estas. Las transcriptasas inversas de particular interés incluyen las del AMV RT y del M-MLV RT, y opcionalmente las del AMV RT y del M-MLV RT que tienen actividad RNasa H reducida o sustancialmente reducida (*por ejemplo*, AMV RT alfa H-/BH+ y M-MLV RT H-). Las transcriptasas inversas para usar en la invención incluyen las SuperScript™, SuperScript™ II, ThermoScript™ y ThermoScript™ II disponibles de Life Technologies Corp. Véase, en general, la publicación PCT núm. WO 98/47921, patentes de Estados Unidos núms. 5,244,797 y 5,668,005.

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 objetivo). En algunas modalidades, 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 la presente, el término "marcador detectable" se refiere a cualquiera de una variedad de moléculas de señalización indicativas de la amplificación. Por ejemplo, el SYBR® Green y otros colorantes de unión al ADN son marcadores detectables. Tales marcadores detectables

pueden comprender o pueden ser, por ejemplo, agentes de intercalación o agentes no de intercalación de ácido nucleico. Como se usa en la presente, 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 mediante el uso, por ejemplo, de fluorescencia y/o absorbancia, o indirectamente mediante 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 que se une al agente de unión a ácido nucleico. Típicamente 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 que se produce cuando ese mismo agente está en disolución o unido a un ácido nucleico de una cadena. Por ejemplo, los agentes intercalantes tales como el bromuro de etidio presentan una fluorescencia más intensa cuando se intercalan en el ADN bicatenario que cuando se unen al ADN monocatenario, al ARN o en disolución (véase, *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 el 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*, las sales de etidio, la daunomicina, la mepacrina y la naranja de acridina, 4',6-diamidino- $\alpha$ -fenilindol). Los agentes no intercalantes (*por ejemplo*, ligandos del surco menor como se describe en la presente tales como el Hoechst 33258, la distamicina, la netropsina) también pueden ser adecuados para usar. Por ejemplo, el Hoechst 33258 (Searle, y otros Nucl. Acids Res. 18(13):3753-3762 (1990) muestra una fluorescencia que se altera con una cantidad creciente del objetivo. Los aglomerantes 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 ejemplares pueden incluir, por ejemplo, las acridinas (*por ejemplo*, naranja de acridina, acriflavina), la actinomicina D (Jain, y otros J. Mol. Biol. 68:21 (1972)), la antramincina, el BOBO<sup>TM</sup>-1, BOBO<sup>TM</sup>-3, BO-PRO<sup>TM</sup>-1, la cbromomicina, el DAPI (Kapuseinski, y otros Nucl. Acids Res. 6(112): 3519 (1979)), la daunomicina, la distamicina (*por ejemplo*, la distamicina D), los colorantes que se describen en la patente de Estados Unidos núm. 7,387,887, la elipticina, las sales de etidio (*por ejemplo*, el bromuro de etidio), la fluorcumanina, los 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)), el Hoechst 33342, homidio, el JO-PRO<sup>TM</sup>-1, los colorantes LIZ, LO-PRO<sup>TM</sup>-1, la mepacrina, la mitramicina, los colorantes NED, la netropsina, 4',6-diamidino- $\alpha$ -fenilindol, la proflavina, el POPO<sup>TM</sup>-1, POPO<sup>TM</sup>-3, PO-PRO<sup>TM</sup>-1, el yoduro de propidio, los polipiridilos de rutenio, el S5, el SYBR® Gold, SYBR® Green I (patentes de Estados Unidos núm. 5,436,134 y 5,658,751), el SYBR® Green II, el SYTOX® azul, SYTOX® verde, SYTO® 43, SYTO® 44, SYTO® 45, SYTOX® azul, el TO-PRO®-1, el SYTO® 11, SYTO® 13, SYTO® 15, SYTO® 16, SYTO® 20, SYTO® 23, el naranja de tiazol (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.), I TOTO<sup>TM</sup>-3, el YO-PRO®-1 y YOYO®-3 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), entre otros. El SYBR® Green I (véase, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núm. 5,436,134; 5,658,751; y/o 6,569,927), por ejemplo, se usa para seguir reacciones de la PCR. Otros colorantes de unión al ADN también pueden ser adecuados como entendería un experto en la técnica.

Para usar como se describe en la presente, 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 objetivo. El marcador detectable también puede emitir una señal cuando está cerca de otro marcador detectable. Los marcadores detectables también pueden usarse 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 modalidades, 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 que se usan en los métodos que se describen en la presente. Como se mencionó anteriormente, en algunas modalidades, el marcador detectable puede unirse a una sonda, que puede incorporarse a un cebador, o puede unirse de otra manera al ácido nucleico objetivo amplificado (*por ejemplo*, un agente de unión al 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 se emite por ningún marcador detectable solo. Los marcadores detectables ejemplares incluyen, por ejemplo, un colorante fluorescente o fluoróforo (*por ejemplo*, un grupo químico que puede excitarse por la luz para emitir fluorescencia o fosforescencia), los "colorantes aceptores" capaces de atenuar una señal fluorescente de un colorante donante fluorescente, y similares. Los marcadores detectables adecuados pueden incluir, por ejemplo, las 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); los fluoróforos Alexa fluor® (*por ejemplo*, 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750); los 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, el conjugado de TMR-X, TMR-X, SE, TR, TR ATP, TR-X SE), las 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, los colorantes de calcio (*por ejemplo*, carmín de calcio, verde de calcio, naranja de calcio, blanco de calcoflúor), azul Cascade, amarillo Cascade; los colorantes Cy<sup>TM</sup> (*por ejemplo*, 3, 3.18, 3.5, 5, 5.18, 5.5, 7), GFP cian, Fluorosensor de AMP cíclico (FiCRhR), las proteínas fluorescentes (*por ejemplo*, la proteína fluorescente verde (*por ejemplo*, GFP, EGFP), la proteína fluorescente azul (*por ejemplo*, BFP, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal), la proteína fluorescente cian (*por ejemplo*, ECFP, Cerulean, CyPet), la proteína fluorescente amarilla (*por ejemplo*, YFP, Citrine, Venus, YPet), los 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<sup>TM</sup> (*por ejemplo*, LysoTracker® Azul DND-22, LysoTracker® Azul-Blanco DPX, LysoTracker® Amarillo HCK-123, LysoTracker® Verde DND-26, LysoTracker® Rojo DND-99, LysoSensor<sup>TM</sup> Azul DND-167, LysoSensor<sup>TM</sup> Verde DND-189, LysoSensor<sup>TM</sup> Verde DND-153, LysoSensor<sup>TM</sup> Amarillo/Azul DND-160, LysoSensor<sup>TM</sup> Amarillo/Azul dextrano de PM 10.000), Verde Oregón (*por ejemplo*, 488, 488-X, 500, 514); las 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 que se describen, *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 (*véase, 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 marcadores detectables, así como muchos otros, pueden usarse para detectar ácidos nucleicos objetivo amplificados.

Algunos marcadores detectables pueden basarse en secuencias (también denominados en la presente "marcador detectable específico de locus"), *por ejemplo*, las sondas de nucleasa 5'. Tales sondas pueden comprender una o más marcadores detectables. En la técnica se conocen varios marcadores detectables, *por ejemplo* (las sondas TaqMan® que se describen en la presente (*véase también* la patente de Estados Unidos núm. 5,538,848) varios modelos moleculares de tallo y lazo (*véase, 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)), los modelos sin tallo o lineales (*véase, por ejemplo*, la publicación PCT núm. WO 99/21881; la patente de Estados Unidos núm. 6,485,901), los PNA Molecular Beacons<sup>TM</sup> (*véase, por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos núm. 6,355,421 y 6,593,091), los modelos de PNA lineales (*véase, por ejemplo*, Kubista y otros, SPIE 4264:53-58 (2001)), las sondas que no son de FRET (*véase, por ejemplo*, la patente de Estados Unidos núm. 6,150,097), las sondas Sunrise®/Amplifluor® (patente de Estados Unidos núm. 6,548,250), las sondas de tallo y lazo y los dúplex Scorpions<sup>TM</sup> (Solinas y otros, Nucleic Acids Research 29:E96 (2001) y la patente de Estados Unidos núm. 6,589,743), las sondas de lazo abultado (patente de Estados Unidos núm. 6,590,091), las sondas de pseudonudo (patente de Estados Unidos núm. 6,589,250), los ciclicones (patente de Estados Unidos núm. 6,383,752), la sonda MGB Eclipse<sup>TM</sup> (Epoch Biosciences), las sondas en horquilla (patente de Estados Unidos núm. 6,596,490), las sondas Light-up de ácido nucleico peptídico (PNA) (Svanvik, y otros Anal Biochem 281:26-35 (2001)), las sondas de nanopartículas autoensambladas, las sondas modificadas con ferroceno que se describen, *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); las QuantiProbes® (www.qiagen.com), HyBeacons® (French, y otros Mol. Cell. Probes 15:363-374 (2001)), las 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), los cebadores LUX<sup>TM</sup> (Nazarenko, y otros Nucleic Acids Res. 30:e37 (2002)), los 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*, los atenuadores Black Hole (Biosearch), los atenuadores Iowa Black® (IDT), el atenuador QSY (Molecular Probes) y los atenuadores de sulfonato/carboxilato de Dabsyl y Dabcyl (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 un objetivo atenúa la señal, o en donde la hibridación en un objetivo altera la firma de la señal a través de un cambio en la fluorescencia. Los sistemas ejemplares también pueden incluir los sistemas de ligando FRET, salicilato/DTPA (*véase, por ejemplo*, Oser y otros Angew. Chem Int. Engl. 29(10):1167 (1990)), la hibridación por desplazamiento, las sondas homólogas y/o ensayos que se describen en la patente europea núm. EP 070685 y/o la patente de Estados Unidos núm. 6,238,927. Los marcadores detectables pueden comprender además los derivados de sulfonato de colorantes de fluoresceína con SO<sub>3</sub> en lugar del grupo carboxilato, las formas de fosforamidita de fluoresceína, las formas de fosforamidita de Cy5 (disponibles, *por ejemplo*, de Amersham).

Las composiciones y los métodos que se describen en la presente pueden ser útiles para detectar y/o cuantificar una variedad de ácidos nucleicos objetivo de una muestra de ensayo. Un ácido nucleico objetivo es cualquier ácido nucleico para el cual un sistema de ensayo se diseña para identificar o detectar que está presente (o no) y/o cuantificar en una muestra de ensayo. Tales ácidos nucleicos pueden incluir, *por ejemplo*, los de agentes infecciosos (*por ejemplo*, de virus, bacterias, parásitos y similares), de un proceso de enfermedad tal como cáncer, diabetes o similares, o para medir una respuesta inmunitaria. Las "muestras de ensayo" ejemplares incluyen varios tipos de muestras, como las muestras

biológicas. Las muestras biológicas ejemplares 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 que se describen en la presente también pueden usarse para detectar contaminantes (*por ejemplo*, bacterias, virus, hongos y/o protozoos) en productos farmacéuticos, alimenticios o bebidas. Los métodos que se describen en la presente también pueden usarse para detectar alelos raros en presencia de alelos de tipo silvestre (*por ejemplo*, un alelo mutante en presencia de  $10^6$ - $10^9$  alelos de tipo silvestre). Los métodos son útiles para, por ejemplo, detectar una enfermedad residual mínima (*por ejemplo*, las células cancerosas restantes raras durante la remisión, especialmente mutaciones en el gen p53 u otros genes supresores de tumores que previamente se identifican 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).

La detección de la señal puede ser mediante el uso de cualquier reactivo o instrumento que detecte un cambio en la fluorescencia de un fluoróforo. Por ejemplo, la detección se puede realizar mediante el uso de cualquier ciclador térmico espectrofotométrico. Los ejemplos de cicladores térmicos espectrofotométricos incluyen, pero no se limitan a, Applied Biosystems (AB) PRISM® 7000, el sistema de PCR en tiempo real AB 7300, el sistema de PCR en tiempo real AB 7500, AB PRISM® 7900HT, Bio-Rad ICycler IQ™, Cepheid SmartCycler® II, Corbett Research Rotor-Gene 3000, Idaho Technologies RAPID™, MJ Research Chromo 4™, Roche Applied Science LightCycler®, Roche Applied Science LightCycler®2.0, Stratagene Mx3000P™ y Stratagene Mx4000™. Cabe señalar que los nuevos instrumentos se desarrollan a un ritmo rápido y se pueden usar instrumentos similares para los métodos.

También se proporcionan kits para realizar los métodos que se describen en la presente. Como se usa en la presente, el término "kit" se refiere a un conjunto empaquetado de componentes que se relacionan, típicamente uno o más compuestos o composiciones. El kit puede comprender un par de oligonucleótidos para polimerizar y/o amplificar al menos un ácido nucleico objetivo de una muestra, uno o más detergentes, una polimerasa de ácido nucleico y/o una o más sondas marcadas que se corresponden con un marcador detectable. El kit también puede incluir muestras que contienen ácidos nucleicos objetivo que se definen previamente para usarse en reacciones de control. El kit también puede incluir opcionalmente disoluciones de reserva, tampones, enzimas, marcadores detectables o reactivos que se requieren para la detección, tubos, membranas y similares que pueden usarse para completar la reacción de amplificación. En algunas modalidades, se incluyen múltiples conjuntos de cebadores. En una modalidad, 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). También se contemplan otras modalidades de sistemas y kits particulares que son entendidos por un experto en la materia.

Los métodos y composiciones pueden usarse para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos en una muestra. La muestra puede incluir uno o más moldes y/o uno o más ácidos nucleicos objetivo. La muestra puede ser purificada o no purificada. La muestra puede ser una muestra biológica, como sangre, saliva, lágrimas, tejido, orina, heces, etc., que se ha tratado para usar en los métodos que se proporcionan en la presente. Alternativamente, si la muestra biológica no interfiere con los métodos que se proporcionan en la presente, puede usarse sin tratar (o sin purificar).

## Ejemplos

Ejemplo 1: Restricción de la amplificación por cebadores STAR con varias longitudes de solapamiento

Los cebadores inversos STAR se diseñaron con diferentes longitudes de solapamiento (0, 4, 5, 6, 9, 11 y 13 nucleótidos) con el sitio de unión del cebador directo en la secuencia objetivo y se usaron para evaluar su eficacia en la supresión de la amplificación objetivo. Véase la Figura 3. Dos polinucleótidos objetivo se usaron en las reacciones de amplificación: una secuencia objetivo en la cual la región STAR estaba intacta y perfectamente apareada (PM) con la secuencia de la etiqueta STAR y una secuencia fuera del objetivo con una inserción (lin-4) entre la 6<sup>ta</sup> y 7<sup>ma</sup> base desde el extremo 3' de la región objetivo de la etiqueta STAR. Además de un conjunto de cebadores STAR con una etiqueta STAR perfectamente apareada (PM), se usó un conjunto de cebadores STAR con una disparidad de una única base C a A (MM) que se introdujo en la región STAR. La PCR en tiempo real se ejecutó con la mezcla maestra Power SYBR® Master Mix con 150 nM de cada cebador directo e inverso en el instrumento de la PCR en tiempo real Step-One Plus (condiciones de ciclo térmico: 95 °C/10 min, 40 ciclos de 95 °C/15 seg. y 60 °C/1 min).

Los resultados ejemplares se muestran en la Figura 4. Se observó un cambio de Ct para el objetivo que comienza con un solapamiento de 4 nucleótidos, mientras que el cebador MM STAR no tuvo ningún efecto. La amplificación del objetivo se suprimió drásticamente cuando el solapamiento alcanzó 11 nucleótidos, mientras que la amplificación fuera del objetivo no se vio afectada. El aumento del solapamiento a 13 nucleótidos aumentó el Ct del objetivo en 13,4 y aumentó el Ct fuera del objetivo en 2,7.

Ejemplo 2: Supresión del fondo de ligadura y mejora de la detección del miARN por los cebadores STAR.

El flujo de trabajo que se muestra en la Figura 4 es un ejemplo de un ensayo de miARN TaqMan® de próxima generación como se describe en la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos, copropietaria, núm. 61/721,968, presentada el 2 de noviembre de 2012, y la solicitud PCT Núm. PCT/US2013/068350, titulada "Small RNA Capture, Detection and Quantification," presentada al mismo tiempo. En este ensayo, los adaptadores de ligadura se unen a los extremos 5' y 3' del miRNA. Sin embargo, en este paso de ligadura, se pueden formar subproductos de ligadura adaptador-adaptador y posteriormente amplificarse para crear un fondo no deseado en el ensayo.

Se diseñó y probó un cebador STAR con un solapamiento de 12 nucleótidos con el cebador directo en el ensayo de miARN de ligadura de doble extremo. El ARN total más 45 miARN sintéticos se ligaron primero a adaptadores de ligadura 5' y 3' (que se denominan "ligadores" en la Figura 5), luego se transcribió inversamente por la SuperScript® III en tampón RT. Una décima parte del material transcrito inverso se amplificó en un paso de amplificación previa por 12 ciclos en una mezcla maestra de amplificación previa 1x con 250 nM de cada uno de los cebadores directo e inverso. Se usó un cebador inverso estándar como control. Cada miARN objetivo se amplificó y se detectó en el instrumento de la PCR en tiempo real Vii7A con su ensayo TaqMan® específico. Para el ensayo de detección, se usaron 900 nM del cebador directo e inverso y la sonda TaqMan® 250 nM en 1x de mezcla maestra Master Expression en condiciones de ciclo térmico estándar (95 °C/10 min, 40 ciclos de 95 °C/15 segundos y 60 °C/1 min). Los valores de Ct se calcularon con la línea de base automática y el umbral de  $\Delta R_n$  de 0,2. Como se muestra en la Figura 6, el cebador STAR redujo significativamente la cantidad de fondo de amplificación del adaptador de ligadura ligado. La Figura 7 muestra el aumento de la sensibilidad de detección de cada miARN con el uso del cebador STAR en comparación con el uso del cebador inverso estándar de control.

### Ejemplo 3: Diferenciación del miARN homólogo por los cebadores STAR

Los miARN humanos let-7 son altamente homólogos, con una única diferencia de base entre let-7b y let-7c. Se usaron un par de cebadores estándar que diferenciaron a let-7b y let-7c del resto de la familia, pero amplificaron tanto let-7b como let-7c. Se generaron moldes de miARN como en el Ejemplo 2 y las condiciones de la PCR fueron similares a las del Ejemplo 2, excepto que se usó el instrumento de la PCR en tiempo real 7900 HTS. Incluso con una sonda dispar con let-7b, el ensayo estándar detectó tanto let-7b como let-7c por igual (Tabla 1). El uso de un cebador STAR que se diseñó con una secuencia de la etiqueta STAR contra let-7b (Figura 8) para la reacción de amplificación suprimió la reactividad cruzada let-7b y let-7c (calculada como  $2^{\Delta C_t^{(cb)}}$ ) de 109 % a 2 % (véase la Tabla 1). La reactividad cruzada se calculó como  $100/2^{\Delta C_t}(\text{let-7c} - \text{let-7b})$ .

<b>Tabla 1</b>		
<b>Molde</b>	<b>let-7b</b>	<b>let-7c</b>
Ensayo estándar let-7c	109%	100 %
Ensayo STAR let-7c	2 %	100 %

**REIVINDICACIONES**

1. Un cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de etiqueta de Restricción de amplificación dirigida a secuencia (STAR) 5' y una secuencia de hibridación del ácido nucleico objetivo, en donde la secuencia de la etiqueta STAR es capaz de formar una estructura de tallo-lazo tras la extensión del oligonucleótido a lo largo del ácido nucleico objetivo, en donde la secuencia de la etiqueta STAR comprende una secuencia igual a la totalidad o a una parte de una parte de hibridación del ácido nucleico objetivo de un segundo cebador para usarse con el oligonucleótido en una reacción de amplificación, o en donde la secuencia de la etiqueta STAR es complementaria a todo o a una parte del sitio de unión objetivo de un segundo cebador para usarse con el cebador oligonucleotídico en una reacción de amplificación; y en donde el cebador oligonucleotídico y el segundo cebador son un par de cebadores directo e inverso.
2. El cebador oligonucleotídico de la reivindicación 1, en donde la secuencia de la etiqueta STAR comprende una parte de una secuencia de amplicón interno del ácido nucleico objetivo.
3. El cebador oligonucleotídico de la reivindicación 2, en donde la secuencia de la etiqueta STAR comprende una secuencia igual a la totalidad o a una parte de una parte de hibridación del ácido nucleico objetivo del segundo cebador y una secuencia de amplicón interno del ácido nucleico objetivo.
4. El cebador oligonucleotídico de la reivindicación 2, en donde la secuencia de la etiqueta STAR comprende una secuencia complementaria a todo o a una parte del segundo cebador y una secuencia de amplicón interno del ácido nucleico objetivo.
5. Una composición que comprende un primer cebador oligonucleotídico y un segundo cebador oligonucleotídico como se define en la reivindicación 1.
6. La composición de la reivindicación 5, en donde la secuencia que se comparte entre el primer y el segundo cebador tiene una longitud de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 nucleótidos.
7. Un método para detectar un ácido nucleico que comprende:
  - hibridar el ácido nucleico objetivo con un cebador oligonucleotídico de la reivindicación 1;
  - extender el cebador oligonucleotídico para formar un producto de extensión;
  - amplificar el producto de extensión para formar un producto de amplificación; y
  - detectar la presencia o ausencia del producto de amplificación, lo que detecta así el ácido nucleico objetivo.
8. Un método para inhibir o bloquear sustancialmente la amplificación no deseada de un ácido nucleico objetivo que comprende:
  - hibridar el ácido nucleico objetivo con un cebador oligonucleotídico de la reivindicación 1;
  - extender el cebador oligonucleotídico para formar un producto de extensión;
  - incubar el producto de extensión con una mezcla de reacción de amplificación; y
  - detectar la presencia o ausencia del producto de extensión.
9. Un método para inhibir o bloquear sustancialmente la amplificación no deseada de un ácido nucleico objetivo que comprende:
  - hibridar el ácido nucleico objetivo con un cebador oligonucleotídico de la reivindicación 1; y
  - extender el cebador oligonucleotídico para formar un producto de extensión, en donde el producto de extensión inhibe o reduce sustancialmente la amplificación no deseada del ácido nucleico objetivo.
10. El cebador oligonucleotídico de la reivindicación 1, en donde la secuencia de la etiqueta STAR tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nucleótidos.
11. El cebador oligonucleotídico de la reivindicación 1, en donde la secuencia que se comparte entre el cebador que comprende la secuencia de la etiqueta STAR y el segundo cebador tiene una longitud de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 nucleótidos.

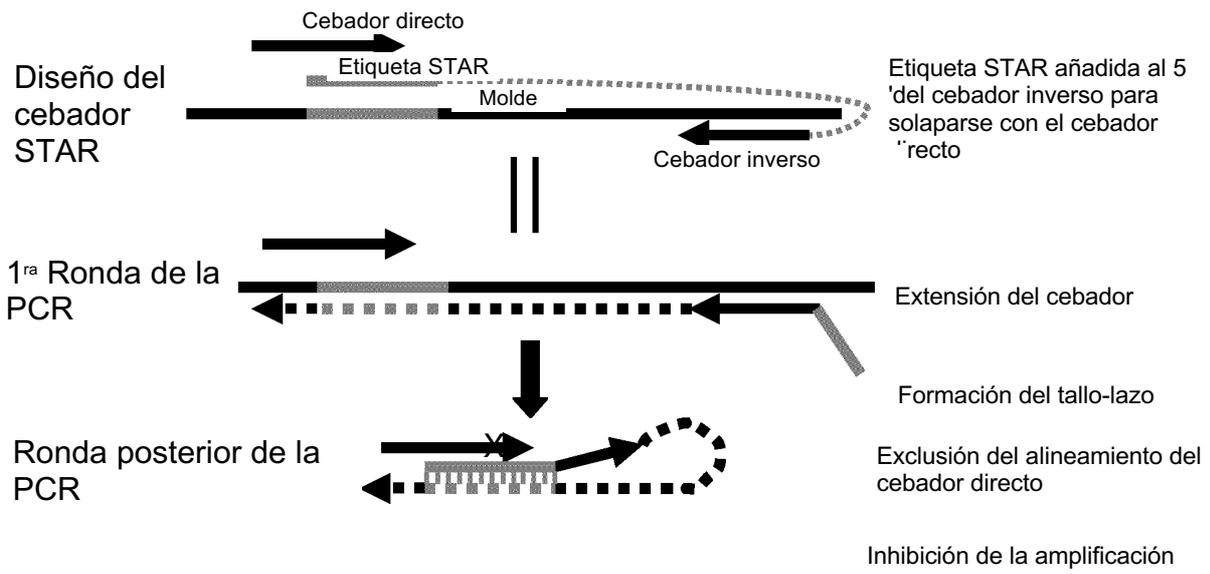


Figura 1

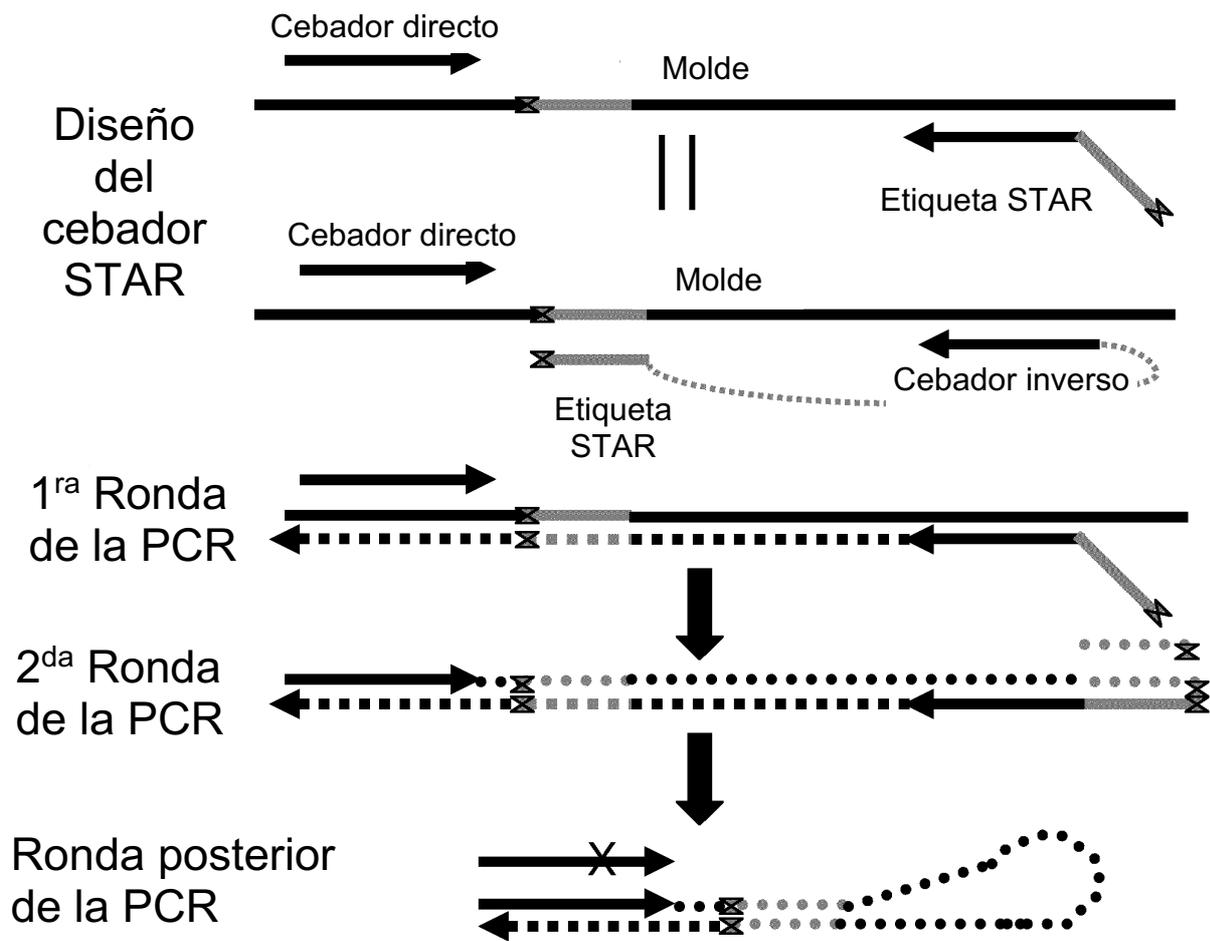


Figura 2A

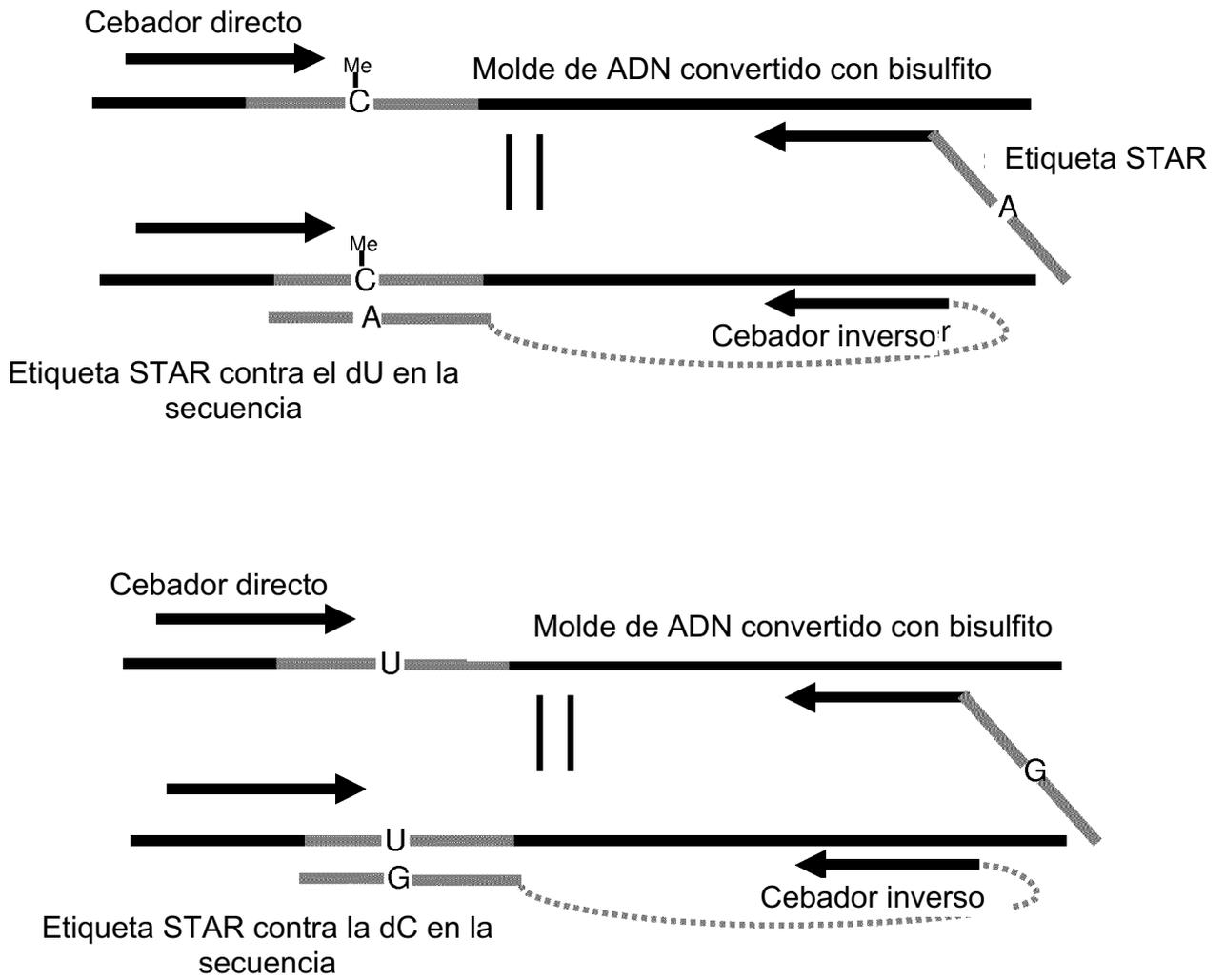


Figura 2B

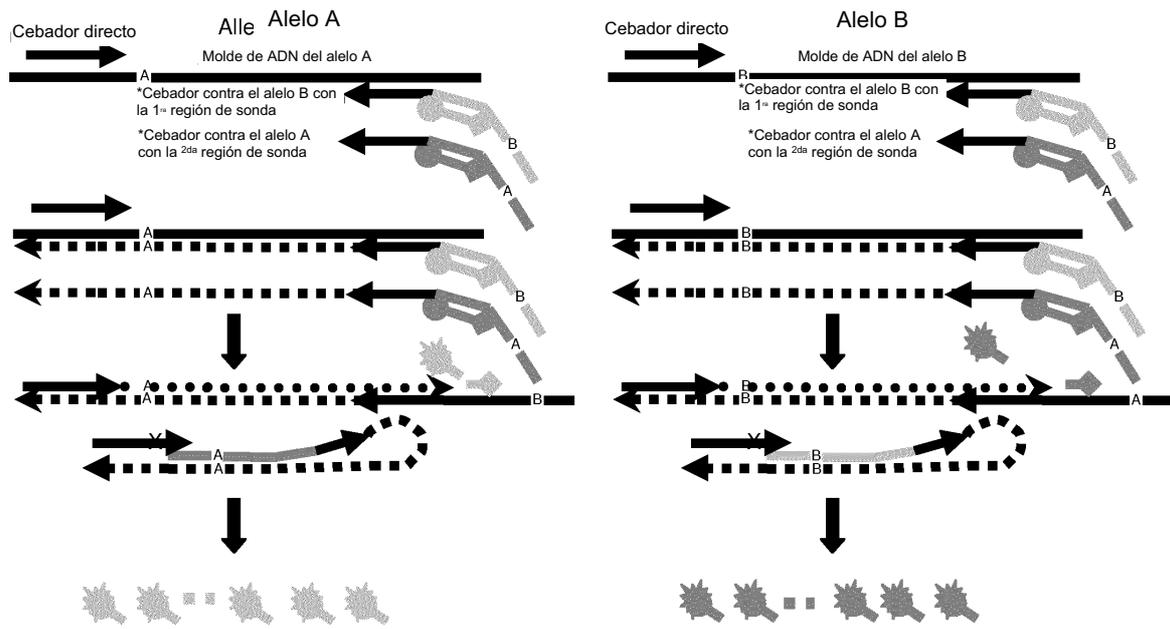


Figura 2C

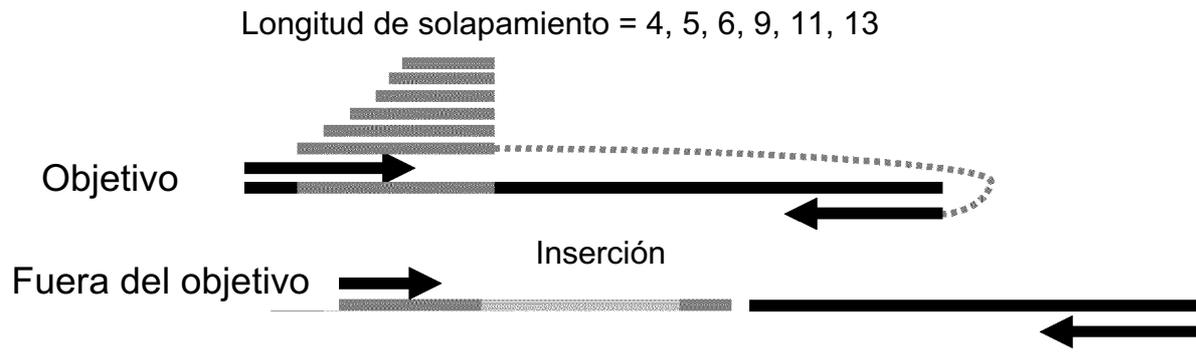


Figura 3

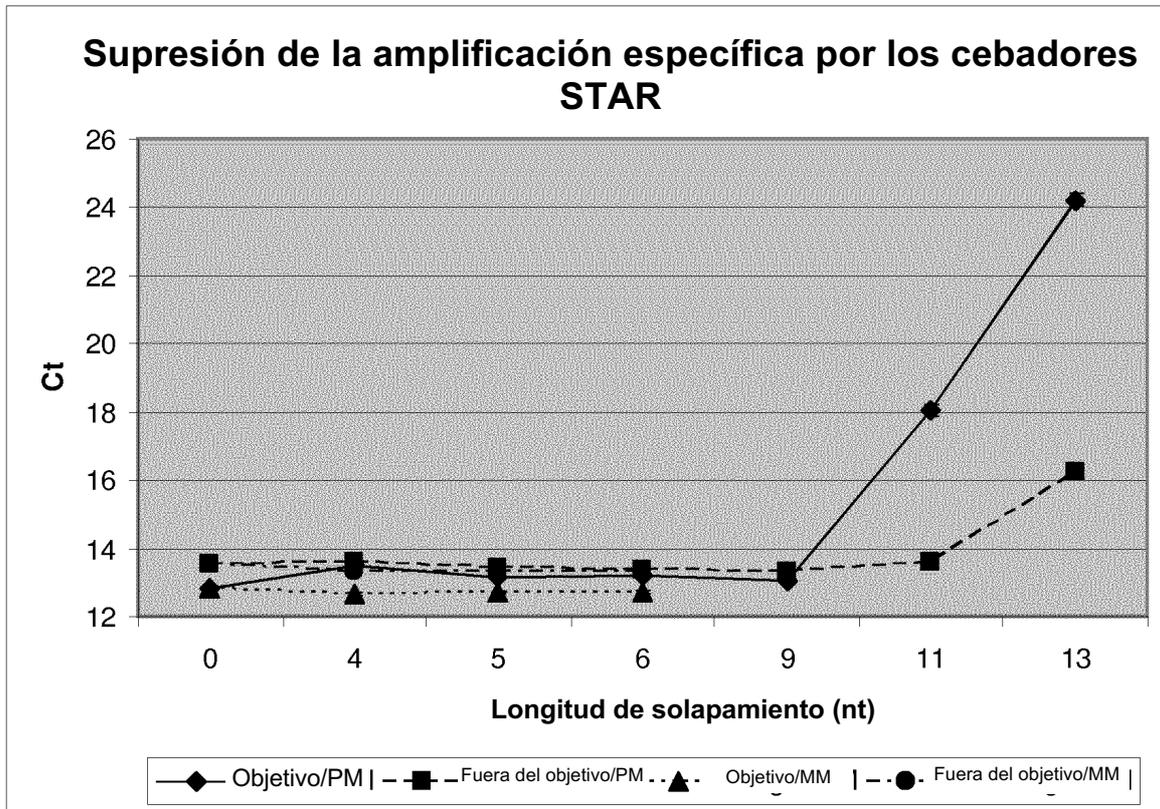


Figura 4

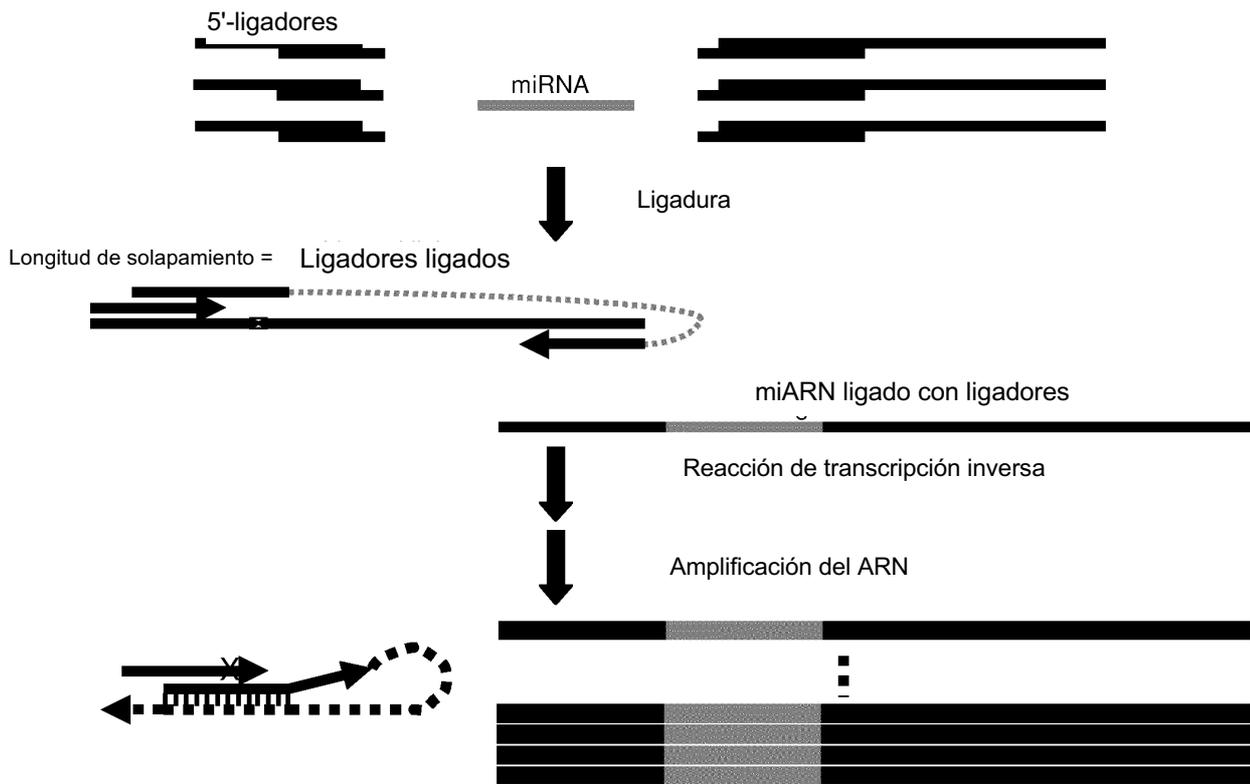


Figura 5

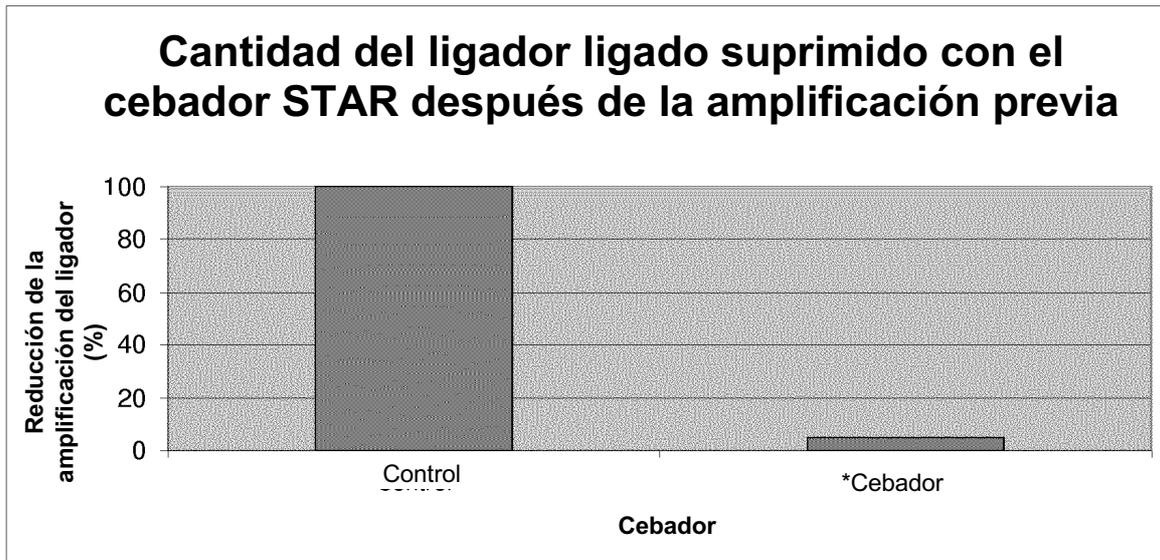


Figura 6

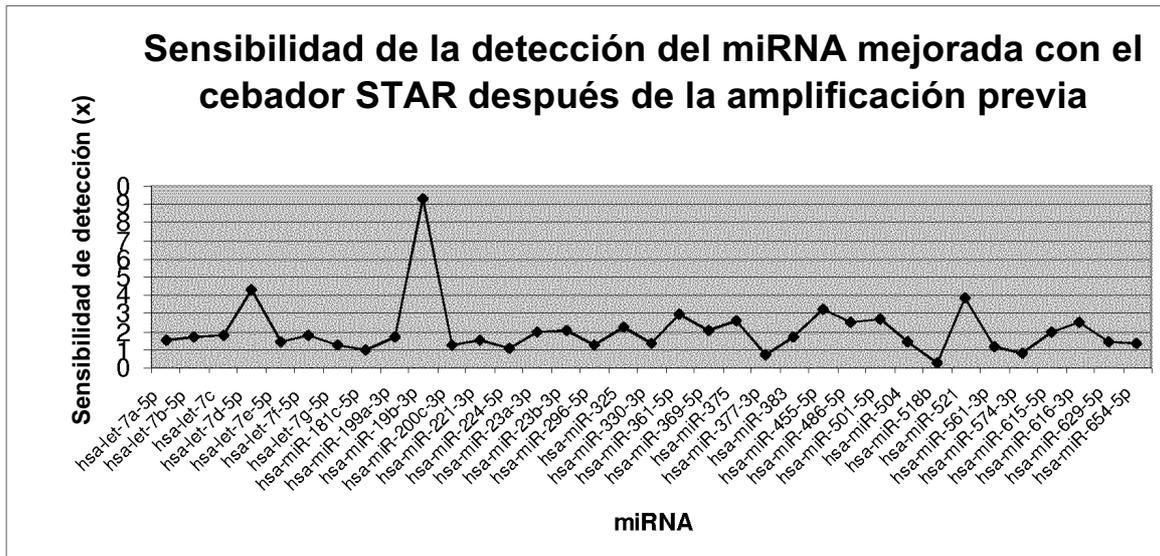


Figura 7

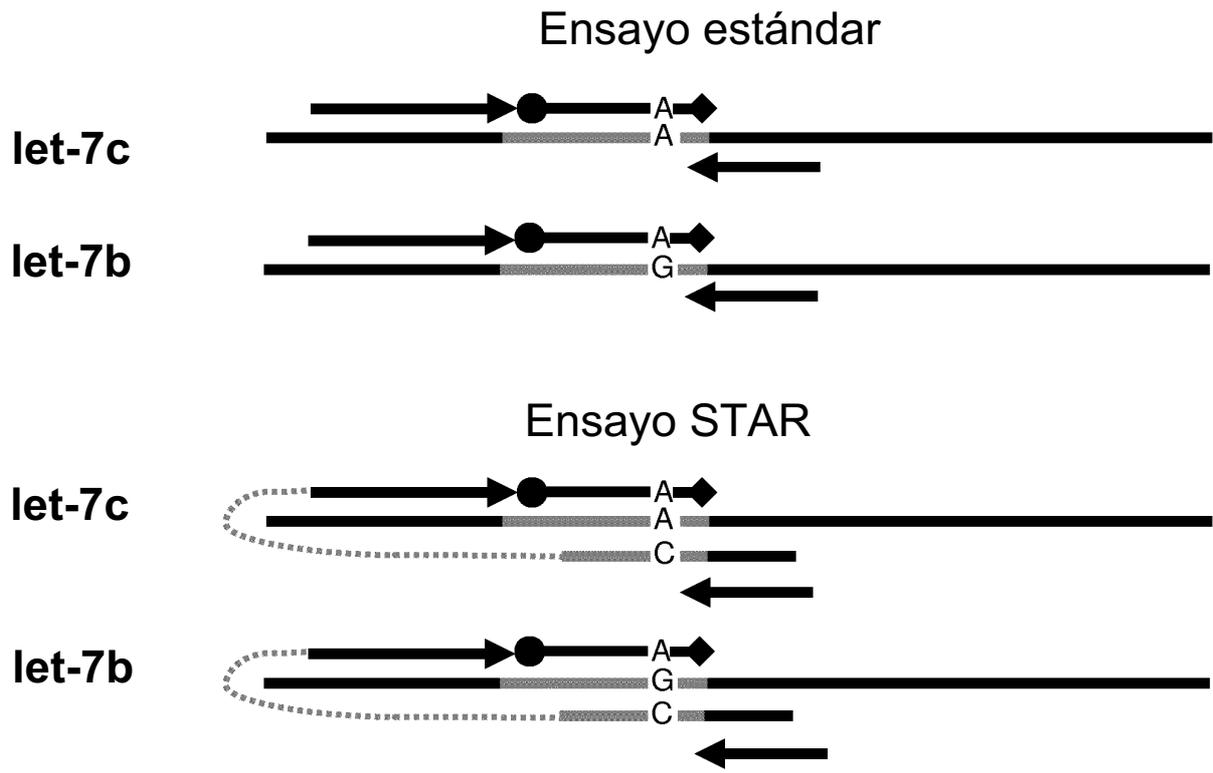


Figura 8