

COMPOSICIONES, MÉTODOS Y KITS PARA LA SÍNTESIS Y DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad conforme a 35 USC §119 (e) a la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/319.151, presentada el 6 de abril de 2016, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

CAMPO

[0002] Las presentes enseñanzas se encuentran en el campo de la biología molecular y el análisis genético. La presente invención se refiere a composiciones, métodos y kits útiles para la síntesis de ácidos nucleicos. Más específicamente, se proporcionan composiciones, métodos y kits para la amplificación, detección y/o cuantificación de moléculas de ácido nucleico, especialmente aquellas que tienen un bajo número de copias y/o en presencia de inhibidores, como en un lisado crudo.

ANTECEDENTES

[0003] En su forma más simple, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN mediante dos cebadores oligonucleótidos que hibridan con cadenas opuestas y flanquean la región de interés en el ADN diana. Una serie repetitiva de pasos de reacción que involucran desnaturalización de la plantilla, recocido del cebador y la extensión de los cebadores recocidos por la ADN polimerasa da como resultado la acumulación exponencial de un fragmento específico cuyos terminales están definidos por los extremos 5' de los cebadores. La PCR es capaz de producir un enriquecimiento selectivo de una secuencia específica de ADN por un factor de 10^9 . Véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 4.683.202, 4.683.195, 4.800.159, y 4.965.188, y Saiki et al., 1985, Science 230:1350.

[0004] Las mezclas maestras de PCR disponibles comercialmente mejoran la eficiencia y reducen los errores asociados con el ensamblaje de un gran número de reacciones de PCR necesarias para el análisis de alto rendimiento. Estas mezclas maestras contienen una combinación de reactivos que serán comunes a todas las reacciones de PCR. Por ejemplo, la mezcla maestra puede contener un amortiguador, una sal tal como $MgCl_2$, desoxinucleósidos trifosfatos (dNTP) y una ADN polimerasa termoestable. Típicamente, las mezclas maestras se fabrican y distribuyen como soluciones concentradas o polvos liofilizados que posteriormente se diluyen o

disuelven cuando se ensamblan las reacciones finales.

[0005] Para un análisis preciso de los ácidos nucleicos, las mezclas maestras de PCR deberían proporcionar resultados de PCR fiables, robustos y reproducibles. Además, las mezclas maestras de PCR deberían permitir la detección de ácidos nucleicos diana de bajo número de copias. Por ejemplo, muchas aplicaciones médicas, diagnósticas y forenses dependen de la amplificación de una secuencia de ADN particular en una muestra en la cual la secuencia está presente en cantidades muy bajas. Además, muchas de tales aplicaciones se basan en la amplificación de una secuencia de ácido nucleico de una muestra cruda o no purificada, como un lisado crudo celular o de tejido.

[0006] Por consiguiente, existe la necesidad de composiciones de PCR que funcionen de forma fiable con todos los tipos de muestras de ácido nucleico, incluidas las preparaciones de muestras crudas y/o aquellas con dianas en cantidades bajas.

SÍNTESIS

[0007] En la presente se proporcionan composiciones, kits y métodos para la síntesis, detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos mediante síntesis de ácidos nucleicos dependientes de polimerasa, que incluyen, por ejemplo, el uso de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan composiciones que comprenden una ADN polimerasa, una sal, un agente antiespumante y una combinación de un dNTP y un derivado de dNTP.

[0008] En ciertas formas de realización, las presentes enseñanzas proporcionan una composición que comprende una ADN polimerasa termoestable. En algunas formas de realización, la ADN polimerasa termoestable se selecciona de una ADN polimerasa Taq; una ADN polimerasa Tne; una ADN polimerasa Tma; una ADN polimerasa Pfu; una ADN polimerasa KOD; una ADN polimerasa Tfl; una ADN polimerasa Tth; una ADN polimerasa de fragmento de Stoffel; una ADN polimerasa VENT™; una ADN polimerasa DEEPVENT™; y mutantes, variantes o derivados de estas. En algunas formas de realización, la ADN polimerasa termoestable es una ADN polimerasa derivada de Taq.

[0009] En ciertas formas de realización, las presentes enseñanzas proporcionan una composición que comprende una sal de potasio, una sal de magnesio y/o una sal de sodio. En algunas formas de realización, la concentración de sal va de alrededor de 5 mM a alrededor de 200 mM.

[0010] En algunas formas de realización, la composición comprende un agente antiespumante a base de silicona. En algunas formas de realización, el agente

antiespumante a base de silicona se selecciona de XIAMETER® AFE-1010, AFE-1430, AFE-1510, AFE-1520, AFE-2210, Antifoam A, Antifoam B, Antifoam C, Antifoam H-10, Antifoam SE-15, Antifoam SE-35, Antifoam SO-25, Antifoam Y-30 y Antifoam 289. En algunas formas de realización, la composición comprende un agente antiespumante que no es a base de silicona. En algunas formas de realización, el agente antiespumante que no es a base de silicona se selecciona de sulfonatos orgánicos, poliéteres, fosfatos orgánicos, glicoles acetilénicos, fluorocarburos, poliaminas de polialqueno y compuestos de polialquilenimina, lo que incluye, entre otros, Antifoam 204 y Antifoam O-30. En algunas formas de realización, la concentración del agente antiespumante va de alrededor de 0,001 % a 0,1 %.

[0011] En algunas formas de realización, el dNTP se selecciona de dGTP, dCTP, dATP y dTTP. En algunas formas de realización, el dNTP es dGTP. En algunas formas de realización, el dGTP está en una concentración que va de 0,05 mM a 1,0 mM

[0012] En algunas formas de realización el derivado de dNTP se selecciona de 7-desaza-2-desoxi-GTP, 7-deaza-dATP, alfa-tio-dATP, alfa-tio-dTTP, alfa-tio-dGTP, y alfa-tio-dCTP. En algunas formas de realización, el derivado de dNTP es 7-deaza-2-desoxi-GTP. En algunas formas de realización, el derivado de dNTP es 7-deaza-2-desoxi-dGTP. En algunas formas de realización, el 7-deaza-2-desoxi-dGTP está en una concentración que va de 0,05 mM a 1,0 mM.

[0013] En algunas formas de realización, la composición comprende un dGTP y un 7-deaza-2-desoxi-dGTP en una relación que va de alrededor de 1:2 a alrededor de 2:1. En algunas formas de realización, la composición comprende un dGTP y un 7-deaza-2-desoxi-dGTP en una relación que va de alrededor de 1:2 a alrededor de 1:10. En algunas formas de realización, la composición comprende un dGTP y un 7-deaza-2-desoxi-dGTP en una relación que va de alrededor de 2:1 a alrededor de 10:1. En algunas formas de realización, la composición comprende un dGTP y un 7-deaza-2-desoxi-dGTP en una relación de alrededor de 1:1.

[0014] En ciertas formas de realización, la composición proporcionada comprende además un agente bloqueador de inhibidor de la PCR. En algunas formas de realización, el agente bloqueador de inhibidor de la PCR es una proteína. En algunas formas de realización, la proteína bloqueadora de inhibidor de la PCR se selecciona de una albúmina, una gelatina y una combinación de estas. En algunas formas de realización, la composición comprende una gelatina y una albúmina sérica. En ciertas formas de realización, la gelatina se selecciona de una gelatina bovina, una gelatina de pescado y una combinación de estas. En ciertas formas de realización, la gelatina

bovina está en una concentración que va de 0,01 % a 1,0 % y/o dicha gelatina de pescado está en una concentración que va de 0,01 % a 1,0 %. En algunas formas de realización, la albúmina sérica es una albúmina sérica bovina. En ciertas formas de realización, la albúmina de suero bovino está en una concentración que va de 0,05 mg/ml a 5 mg/ml.

[0015] En ciertas formas de realización, la composición proporcionada comprende además un detergente. En alguna forma de realización, el detergente es un detergente no iónico. En algunas formas de realización, el detergente no iónico se selecciona del grupo que consiste en TRITON X-100®, Nonidet P-40, TWEEN 80, Brij 30, Brij 35 y Brij 58. En algunas formas de realización, el detergente no iónico es un detergente distinto de Tween-20. En algunas formas de realización, el detergente no iónico está presente en la composición a una concentración que va de 0,005 % a 0,1 %. En ciertas formas de realización, la composición proporcionada comprende además un colorante de control de referencia pasiva. En algunas formas de realización, el colorante de control de referencia pasiva es un colorante fluorescente. En algunas formas de realización, el colorante de referencia pasiva fluorescente pasivo es un colorante ROX o un colorante MUSTANG PURPLE. En algunas formas de realización, el colorante de referencia pasiva está en una concentración de alrededor de 25 nM a alrededor de 500 nM.

[0016] En una cierta forma de realización, la presente enseñanza proporciona una composición que comprende una ADN polimerasa termoestable, cloruro de potasio, un silicio que comprende un agente antiespumante, dGTP y 7-desaza-2-desoxi-dGTP donde la 7-deaza-2- desoxi-dGTP se encuentra en una concentración de alrededor de 0,05 mM a 1,0 mM, un detergente no iónico distinto de Tween-20, gelatina bovina a una concentración de 0,01 % a 1,0 %, gelatina de pescado a una concentración de 0,01 % a 1,0 %, y albúmina de suero bovino en una concentración de 0,05 mg/ml a 5,0 mg/ml.

[0017] En ciertas formas de realización, las presentes enseñanzas proporcionan métodos para realizar la síntesis de ácido nucleico que comprende poner en contacto una composición proporcionada en la presente con una muestra biológica que comprende un polinucleótido diana con un cebador específico de la diana, en cualquier orden o combinación de componentes, para formar una mezcla de reacción y realizar una reacción de síntesis de ácido nucleico en la mezcla de reacción para formar un producto de amplificación. En algunas formas de realización, la reacción de síntesis de ácido nucleico es una reacción en cadena de polimerasa (PCR). En algunas formas de

realización, la reacción de síntesis de ácido nucleico es una reacción de amplificación. En algunas formas de realización, la reacción de síntesis de ácido nucleico es una reacción de extensión de cebador.

[0018] En algunas formas de realización, los métodos proporcionados comprenden además la determinación de un genotipo del polinucleótido diana mediante el producto de amplificación. En algunas formas de realización, los métodos proporcionados comprenden además determinar el número de copias del polinucleótido diana mediante el producto de amplificación.

[0019] En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, el tiempo de ejecución de la PCR realizada mediante las composiciones o mezclas de reacción como se describe en la presente se reduce en comparación con una PCR equivalente realizada con una mezcla de reacción de PCR estándar. En algunas formas de realización, la PCR realizada mediante las composiciones o mezclas de reacción como se describe en la presente produce un producto de amplificación en un período de tiempo más corto en comparación con una PCR equivalente realizada con una mezcla de reacción de PCR estándar.

[0020] En algunas formas de realización, la PCR es una PCR simplex. En algunas formas de realización, la PCR es una PCR multiplex. Los términos "simplex" o "simplex PCR", como se usan en la presente, se refieren a un ensayo que proporciona la amplificación de un solo producto dentro de un recipiente de reacción. El producto se ceba mediante un par de cebadores distintos. Una reacción simplex puede incluir además una sonda etiquetada específica para el producto amplificado, en donde la sonda está etiquetada de manera detectable con una porción detectable, tal como un colorante fluorescente. Los términos "múltiplex" o "PCR multiplex", como se usan en la presente, se refieren a un ensayo que proporciona la amplificación simultánea de dos o más productos dentro de este recipiente de reacción. Cada producto se ceba con un par de cebadores distintos. Una reacción multiplex puede incluir además sondas etiquetadas específicas para cada producto, en donde las sondas están etiquetadas de manera detectable con diferentes porciones detectables. En algunas formas de realización, PCR multiplex incluye aquellas en las que: (i) una multiplicidad de dianas se amplifican en una sola muestra; dos o más dianas en una muestra o (ii) múltiples muestras se amplifican simultáneamente; dos dianas en dos muestras diferentes dentro de una sola reacción sustancialmente al mismo tiempo.

[0021] En algunas formas de realización de los métodos proporcionados, la muestra biológica es un lisado, tal como un lisado de sangre o un lisado que comprende células

derivadas de la vía oral. En algunas formas de realización, la muestra biológica es de saliva, orina o suero. En algunas formas de realización, el lisado es un lisado crudo. En algunas formas de realización, las muestras biológicas comprenden uno o más inhibidores de la PCR que incluyen, entre otros, IgG, hematina, heparina, EDTA, citrato de sodio o cualquier combinación de estos.

[0022] En ciertas formas de realización, las presentes enseñanzas proporcionan kits que comprenden las composiciones proporcionadas en la presente. En alguna forma de realización, los kits comprenden además un par de cebadores y/o una sonda etiquetada específica para un producto de síntesis de ácido nucleico (por ejemplo, amplificación por PCR) y/o detección de una diana de ADN.

[0023] En ciertas formas de realización, las presentes enseñanzas proporcionan kits que comprenden las composiciones proporcionadas en la presente, una muestra de ácido nucleico de control y un par de cebadores y/o una sonda etiquetada específica para un producto de síntesis de ácido nucleico (por ejemplo, amplificación por PCR) y/o detección de una diana de ADN en la muestra de ácido nucleico de control.

[0024] Las características descritas anteriormente y otras están ejemplificadas por las siguientes figuras y la descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0025] Las Figuras 1A - 1G muestran gráficas de ΔR_n como una función del ciclo de PCR para una muestra de dos microlitros de un lisado crudo de mucosa oral amplificado en ejecuciones duplicadas del ensayo de número de copias de RNasa P TaqMan™ mediante una forma de realización de las composiciones descritas en la presente (panel superior izquierdo) y una mezcla maestra de PCR disponible comercialmente (panel superior derecho). El panel inferior muestra gráficos individuales para los resultados con ambas mezclas maestras en cada volumen de solución de lisis agregada.

[0026] Las Figuras 2A - 2G muestran gráficos de ΔR_n como una función del ciclo de PCR para cantidades variables de muestra de saliva cruda amplificada en ejecuciones duplicadas del ensayo de número de copias de RNasa P TaqMan™ mediante una forma de realización de las composiciones descritas en la presente (panel superior izquierdo) y una mezcla maestra de PCR disponible comercialmente (panel superior derecho). El panel inferior muestra gráficos individuales para los resultados con ambas mezclas maestras en cada volumen de saliva cruda.

[0027] La Figura 3 muestra un diagrama de genotipificación a partir de ensayos realizados en lisados crudos de sangre mediante una forma de realización de las

composiciones descritas en la presente.

[0028] Las Figuras 4A - 4B son gráficos de los resultados de un ensayo de variación del número de copias realizado con lisado crudo de sangre (barras de la izquierda) y con las muestras de ADN purificadas correspondientes (barras de la derecha). Los ensayos se realizaron con una forma de realización de las composiciones descritas en la presente.

[0029] Las Figuras 5A - 5D muestran gráficos de la señal de fluorescencia verde SYBR® como una función del ciclo de PCR para mezclas de reacción que comprenden cantidades variables de agente antiespumante, Antifoam 204, en concentraciones que oscilan entre el 0 % y el 0,1 %. Las reacciones (10 uL) se realizaron en 96 repeticiones en una placa de microtitulación de 384 cavidades mediante un sistema de PCR en tiempo real ViiA 7.

[0030] Las Figuras 6A - 6D muestran gráficos de la señal de fluorescencia verde SYBR® como una función del ciclo de PCR para mezclas de reacción que comprenden cantidades variables de agente antiespumante, SE-15, en concentraciones que oscilan entre el 0 % y el 0,1 %. Las reacciones (10 uL) se realizaron en 96 repeticiones en una placa de microtitulación de 384 cavidades mediante un sistema de PCR en tiempo real ViiA 7.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0031] En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan composiciones, métodos y kits para la síntesis, detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos. En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan composiciones, métodos y kits para la síntesis, detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos mediante síntesis de ácido nucleico mediada por polimerasa, que incluyen, entre otros, la extensión del cebador o la reacción en cadena de polimerasa (PCR). En algunas formas de realización, las composiciones proporcionadas en la presente son particularmente eficaces y demuestran un rendimiento superior con muestras de ácido nucleico crudas o no purificadas, tales como lisados crudos o extractos crudos.

[0032] En algunas formas de realización, las composiciones descritas en la presente son útiles en una amplia gama de ensayos que implican detectar, cuantificar y/o caracterizar ácidos nucleicos diana. Por ejemplo, las composiciones se pueden usar en ensayos de genotipificación, incluido, entre otros, polimorfismo de nucleótido único (SNP), análisis de microsatélites y otra genotipificación de mutaciones, para la determinación del número de copias y el análisis de variación, para detectar la expresión de genes y para detectar pequeñas expresiones de ARN (por ejemplo, la

expresión de microARN).

[0033] Los kits que comprenden las composiciones también se describen, al igual que los métodos para usar las composiciones y los kits.

[0034] En un aspecto, en la presente se proporcionan composiciones de mezcla maestra de PCR ensambladas que muestran una sensibilidad, precisión y especificidad de rendimiento superiores en comparación con las mezclas de reactivos de PCR estándar cuando se ejecutan en instrumentos de PCR estándar. En algunas formas de realización, el uso de las mezclas maestras de PCR ensambladas proporcionadas en la presente da como resultado una amplificación, detección y/o cuantificación superiores de las moléculas diana de ácido nucleico presentes en preparaciones de muestras crudas o no purificadas en comparación con el uso de composiciones de PCR estándar. En algunas formas de realización, el uso de las mezclas maestras de PCR ensambladas proporcionadas en la presente da como resultado una amplificación, detección y/o cuantificación superiores de las moléculas diana de ácido nucleico presentes en un bajo número de copias en la preparación de la muestra en comparación con el uso de composiciones de mezcla maestra de PCR estándar.

[0035] En algunas formas de realización, el uso de las composiciones de PCR ensambladas proporcionadas en la presente para la genotipificación da como resultado una sensibilidad y especificidad mejoradas en comparación con el uso de composiciones de PCR estándar. En algunas formas de realización, el uso de las composiciones de PCR ensambladas proporcionadas en la presente para el análisis de expresión génica da como resultado valores de sensibilidad mejorados en comparación con el uso de composiciones de PCR estándar. En algunas formas de realización, tales composiciones de PCR ensambladas para el análisis de genotipificación o de expresión génica mediante lisados crudos o muestras de ácido nucleico no purificadas generan resultados comparables a los resultados obtenidos con muestras de ácido nucleico purificadas correspondientes.

[0036] En algunas formas de realización, el uso de las composiciones de PCR ensambladas proporcionadas en la presente para la determinación del número de copias y/o el análisis de la variación del número de copias da como resultado una sensibilidad, precisión y especificidad mejoradas en comparación con el uso de composiciones de PCR estándar. En algunas formas de realización, el uso de las composiciones de PCR ensambladas proporcionadas en la presente para la determinación del número de copias y/o el análisis de la variación del número de

copias da como resultado una mayor tasa de retirada y concordancia con el número de copias en comparación con el uso de composiciones de PCR estándar. En algunas formas de realización, el uso de las composiciones de PCR ensambladas que se proporcionan en la presente para la determinación y/o el análisis del número de copias mejora los rangos de números de copias más bajos (máximo a mínimo) y los valores nulos en comparación con el uso de composiciones de PCR estándar. Tales mejoras en el análisis de la variación del número de copias se encuentran cuando se usan muestras de ácido nucleico crudas, tales como lisados crudos, o muestras de ácido nucleico purificado. En algunas formas de realización, el uso de las composiciones de PCR ensambladas proporcionadas en la presente para el análisis de la variación del número de copias mediante lisados crudos como muestras de ácido nucleico genera resultados comparables a los resultados obtenidos con las muestras de ácido nucleico purificadas correspondientes.

[0037] En algunas formas de realización, la sensibilidad superior de las PCR ensambladas con las composiciones descritas en la presente permite tiempos reducidos de ejecución de PCR en instrumentación FAST o de PCR estándar. En algunas formas de realización, las composiciones de PCR son para uso en PCR simplex y reacciones de detección. En algunas formas de realización, las composiciones de PCR son para uso en PCR multiplex y reacciones de detección. Normalmente, la PCR multiplex reduce el costo de funcionamiento y el uso de la muestra al detectar dianas multiplex simultáneamente de una sola reacción.

[0038] En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan composiciones ensambladas que comprenden una ADN polimerasa termoestable, una sal, un agente antiespumante y dNTP. En algunas formas de realización, en la presente se proporcionan composiciones ensambladas que comprenden una ADN polimerasa termoestable, una sal, un agente antiespumante y una combinación de al menos un dNTP y al menos un derivado de dNTP.

[0039] En algunos aspectos, las composiciones de las presentes enseñanzas comprenden una o más polimerasas. Tales polimerasas pueden ser cualquier enzima capaz de replicar una molécula de ADN. En algunas formas de realización, las composiciones pueden comprender una ADN polimerasa dependiente de ADN, una enzima para la transcripción inversa (ADN polimerasa dependiente de ARN), y/o una combinación de ambos tipos de enzimas. En algunas formas de realización, una combinación de ADN polimerasas dependientes de ADN y/o una combinación de ADN polimerasa dependiente de ARN puede estar presente en las composiciones descritas

en la presente.

[0040] En algunas formas de realización, las polimerasas, como se usan en la presente, son ADN polimerasas termoestables. En algunas formas de realización, las ADN polimerasas termoestables, como se usan en la presente, no se inactivan de manera irreversible cuando se someten a temperaturas elevadas durante el tiempo necesario para efectuar la desestabilización de ácidos nucleicos monocatenarios o la desnaturalización de ácidos nucleicos bicatenarios durante la síntesis de ácidos nucleicos o la amplificación por PCR. La desnaturalización irreversible de la enzima se refiere a la pérdida sustancial de la actividad enzimática. Preferentemente, una ADN polimerasa termoestable no se desnaturalizará irreversiblemente a alrededor de 90 °-100 °C en condiciones tales como las que se requieren normalmente para la amplificación por PCR.

[0041] Las ADN polimerasas de acuerdo con las presentes enseñanzas se pueden aislar de fuentes naturales o recombinantes, mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las publicaciones de PCT n.º WO 92/06200; WO 96/10640; patentes estadounidenses n.º 5.455.170; 5.912.155; y 5.466.591, cuyas descripciones se incorporan completamente en la presente por referencia en su totalidad), a partir de una variedad de bacterias termófilas que están disponibles comercialmente (por ejemplo, de la mano de American Type Culture Collection, Rockville, Md.) o que pueden obtenerse mediante técnicas de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la publicación de PCT n.º WO 96/10640 y la patente estadounidense n.º 5.912.155). Son adecuadas para usar como fuentes de polimerasas termoestables o los genes de estas para la expresión en sistemas recombinantes, por ejemplo, las bacterias termófilas *Thermus thermophilus*, *Thermococcus litoralis*, *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus woosii* y otras especies del género *Pyrococcus*, *Bacillus sterothermophilus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Thermoplasma acidophilum*, *Thermus flavus*, *Thermus ruber*, *Thermus brockianus*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermotoga maritima* y otras especies del género *Thermotoga*, y *Methanobacterium thermoautotrophicum*, y mutantes, variantes o derivados de estas. En algunas formas de realización, las composiciones, métodos y kits provistos en la presente comprenden ADN polimerasas termoestables seleccionadas del grupo que consiste en ADN polimerasa Taq, ADN polimerasa Tne, ADN polimerasa Tma, ADN polimerasa Tfi, ADN polimerasa Pfu, ADN polimerasa Pwo, ADN polimerasa VENT™, ADN polimerasa DEEPVENT™, mutantes o derivados de estas que tienen actividad de ADN polimerasa, y cualquier combinación de los

anteriores. La ADN polimerasa Taq y sus formas mutantes están disponibles comercialmente, por ejemplo, de la mano de Life Technologies (Carlsbad, CA), o se pueden aislar de su fuente natural (por ejemplo, de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* para la polimerasa de Taq), como se describió anteriormente (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses 4.889.818 y 4.965.188, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente como referencia en su totalidad). La ADN polimerasa se puede aislar de su fuente natural, la bacteria termófila *Thermotoga neapolitana* (véase, por ejemplo, la publicación de PCT n.º WO 96/10640 y la patente estadounidense n.º 5.912.155) y la ADN polimerasa Tma se pueden aislar de su fuente natural, la bacteria termófila *Thermotoga maritima* (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.374.553, cuya descripción se incorpora en la presente como referencia en su totalidad). Las polimerasas termoestables de ejemplo incluyen, entre otras, la ADN polimerasa AmpliTaq y la ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific).

[0042] Sin embargo, debe entenderse que las ADN polimerasas de otros organismos también se pueden usar en la presente sin apartarse del alcance o de las formas de realización preferidas de esta. Como alternativa al aislamiento, las ADN polimerasas están disponibles comercialmente de la mano de, por ejemplo, Life Technologies (Carlsbad, CA), New England BioLabs (Beverly, MA), Finnzymes Oy (Espoo, Finlandia), Stratagene (La Jolla, CA), Boehringer Mannheim Biochemicals (Indianápolis, IN) y Perkin Elmer Cetus (Norwalk CT). Ha de entenderse que una variedad de ADN polimerasas se puede utilizar en las presentes composiciones, métodos y kits, que incluyen polimerasas no descritas específicamente en la presente, sin apartarse del alcance o formas de realización preferidas de esta.

[0043] En ciertas formas de realización, la concentración de la ADN polimerasa termoestable en la composición y las mezclas de reacción descritas en la presente van de alrededor de 0,01 a alrededor de 500 unidades por microlitro, de alrededor de 0,01 a alrededor de 50 unidades por microlitro, de alrededor de 0,01 a alrededor de 25 unidades por microlitro, de alrededor de 0,01 a alrededor de 10 unidades por microlitro, de alrededor de 0,1 a alrededor de 5 unidades por microlitro, de alrededor de 0,1 a alrededor de 2 unidades por microlitro, de alrededor de 0,1 a alrededor de 1 unidad por microlitro o de alrededor de 0,1 a alrededor de 0,5 unidades por microlitro (unidades por microlitro = U/μl), lo que incluye todas las concentraciones y rangos de concentración dentro de cualquiera de los anteriores.

[0044] En algunas formas de realización, las composiciones proporcionadas en la presente comprenden un agente antiespumante. Un agente antiespumante, como se

usa en la presente, es un químico de acción superficial que actúa para facilitar la liberación de gas y para contrarrestar la formación de espuma causada, por ejemplo, al mezclar una reacción. Los agentes antiespumantes pueden prevenir, eliminar y/o reducir la espuma. Los agentes antiespumantes pueden impartir adicionalmente propiedades superficiales auxiliares positivas, tales como humectación, dispersión, emulsificación y solubilización. En algunas formas de realización, el agente antiespumante de la composición proporcionada es diferente de un detergente. En algunas formas de realización, una combinación de diferentes agentes antiespumantes puede estar presente en las composiciones descritas en la presente. En algunas formas de realización, el agente o agentes antiespumantes están presentes en una cantidad eficaz para mejorar la sensibilidad de una reacción de PCR.

[0045] Se pueden usar muchos compuestos químicos como agentes antiespumantes, los cuales incluyen, entre otros, éteres de alquilpolioxialquilenglicol; ésteres; alcoholes; siloxanos; silicios; sulfitos; sulfonatos; ácidos grasos y sus derivados. Una variedad de tales agentes es conocida y está disponible comercialmente de la mano de fuentes que incluyen J. T. Baker, Spectrum Chemicals, Dow Corning Corporation y Sigma-Aldrich Company. Las composiciones antiespumantes pueden comprender un solo componente o múltiples componentes que pueden combinarse al simplemente mezclarlos de forma conjunta. En algunas formas de realización, los agentes antiespumantes para uso en las composiciones proporcionadas incluyen, entre otros, polímeros de siloxano, mezclas de dispersiones de poliéter a base de polipropileno no siliconado orgánico, emulsiones de silicona, emulsiones de simeticona no iónicas, antiespumantes de tipo éster de ácido graso orgánico. Por ejemplo, los organosiloxanos, una clase bien conocida de agentes antiespumantes a base de silicona, incluyen aceites de silicio puros tales como dimetilpolisiloxanos así como copolímeros de bloque de polisiloxano/polioxialquilenos tales como dimetilpolisiloxanos. En algunas formas de realización, el agente antiespumante es un agente antiespumante a base de silicio y se selecciona de XIAMETER® AFE-1010, AFE-1430, AFE-1510, AFE-1520, AFE-2210, Antifoam A, Antifoam B, Antifoam C, Antifoam H-10, Antifoam SE-15, Antifoam SE-35, Antifoam SO-25, Antifoam Y-30 y Antifoam 289.

[0046] En algunas formas de realización, el agente antiespumante es un agente antiespumante que no es a base de silicio. Ejemplos de agentes antiespumantes que no son a base de silicio incluyen, entre otros, sulfonatos orgánicos, poliéteres, fosfatos orgánicos, glicoles acetilénicos, fluorocarbonos, poliaminas de polialqueno, y compuestos de polialquilenimina, que incluyen, entre otros, Antifoam 204 y Antifoam

O-30.

[0047] En ciertas formas de realización, el agente o agentes antiespumantes presentes en las composiciones o mezclas de reacción descritas en la presente están a una concentración que va de alrededor de 0,0005 % a alrededor de 0,5 %, de alrededor de 0,001 % a alrededor de 0,1 %, de 0,002 % a alrededor de 0,05 %, o de 0,005 % a alrededor de 0,02 %, o de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,05 %, lo que incluye todas las concentraciones y rangos de concentración dentro de cualquiera de los anteriores.

[0048] En algunas formas de realización, las composiciones proporcionadas en la presente comprenden al menos un desoxinucleósido trifosfato (dNTP). En ciertas formas de realización, la composición puede comprender, además, una combinación de uno o más desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP) y uno o más derivados de dNTP. En algunas formas de realización, la composición comprende de dos a ocho dNTP y/o derivados de dNTP diferentes. En algunas formas de realización, la composición comprende dos, tres, cuatro, cinco o seis dNTP y/o derivados de dNTP diferentes. Ejemplos de dNTP que pueden incluirse en las composiciones, mezclas de reacción o kits provistos en la presente incluyen, entre otros, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP y/o dITP. Ejemplos de posibles derivados de dNTP incluyen, entre otros, 7-deaza-dGTP (tal como 7-deaza-2-desoxi-dGTP), 7-deaza-dATP, alfa-tio-dATP, alfa-tio-dTTP, alfa-tio-dGTP, y/o alfa-tio-dCTP. En ciertas formas de realización, la composición puede comprender, además, una combinación de uno o más desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP) y uno o más derivados de dNTP. En ciertas formas de realización, la composición puede comprender además uno o más dideoxirribonucleósido trifosfato (ddNTP) y/o uno o más derivados de ddNTP. Los dNTP, ddNTP y derivados de cada uno de ellos están disponibles comercialmente de la mano de fuentes que incluyen Thermo Fisher Scientific, New England Biolabs y Sigma-Aldrich Company. Dichos dNTP, ddNTP y derivados de cada uno de ellos pueden estar sin etiquetar, o pueden etiquetarse de manera detectable al acoplarlos mediante métodos conocidos en la técnica con radioisótopos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{32}P o ^{35}S), vitaminas (por ejemplo, biotina), porciones fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, Texas Red o ficoeritrina), etiquetas quimioluminiscentes, dioxigenina (DIG) y similares. Los dNTP, ddNTP y sus derivados etiquetados también pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, de la mano de Life Technologies (Carlsbad, CA) o Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO).

[0049] La concentración de dNTP individuales, ddNTP, y/o derivados de cada uno de

estos en la composición no tiene por qué ser idéntica. En algunas formas de realización de las presentes composiciones, pueden añadirse dNTP y/o ddNTP para dar una concentración de cada dNTP y/o ddNTP que vaya de alrededor de 0,001 mM a alrededor de 100 mM, de alrededor de 0,01 mM a alrededor de 10 mM, de alrededor de 0,1 mM a alrededor de 1 mM, o preferentemente de alrededor de 0,2 mM a alrededor de 0,8 mM, lo que incluye cualquier concentración o rango de concentraciones dentro de cualquiera de los anteriores. En ciertas formas de realización, las concentraciones de cada dNTP y/o ddNTP en la composición son tales que su concentración final en la PCR ensamblada va de alrededor de 0,015 mM a alrededor de 5 mM, de alrededor de 0,05 a alrededor de 2 mM, de alrededor de 0,1 mM a alrededor de 1 mM, de alrededor de 0,1 mM a alrededor de 0,5 mM, de alrededor de 0,15 mM a alrededor de 0,65 mM, de alrededor de 0,15 mM a alrededor de 0,35 mM, o de alrededor de 0,35 mM a alrededor de 0,65 mM, lo que incluye cualquier concentración o rango de concentraciones dentro de cualquiera de los anteriores. En algunas formas de realización de las presentes composiciones, pueden agregarse derivados de dNTP y/o derivados de ddNTP para dar una concentración de cada derivado de dNTP y/o derivado de ddNTP que vaya de alrededor de 0,001 mM a alrededor de 100 mM, de alrededor de 0,01 mM a alrededor de 10 mM, de alrededor de 0,1 mM a alrededor de 1 mM, o preferentemente de alrededor de 0,2 mM a alrededor de 0,8 mM, lo que incluye cualquier concentración o rango de concentraciones dentro de cualquiera de los anteriores. En ciertas formas de realización, las concentraciones de cada dNTP y/o ddNTP en la composición son tales que su concentración final en la PCR ensamblada va de alrededor de 0,015 mM a alrededor de 5 mM, de alrededor de 0,05 a alrededor de 2 mM, de alrededor de 0,1 mM a alrededor de 1 mM, de alrededor de 0,1 mM a alrededor de 0,5 mM, de alrededor de 0,15 mM a alrededor de 0,65 mM, de alrededor de 0,15 mM a alrededor de 0,35 mM, o de alrededor de 0,35 mM a alrededor de 0,65 mM, lo que incluye cualquier concentración o rango de concentraciones dentro de cualquiera de los anteriores.

[0050] En ciertas formas de realización, la composición comprende una combinación de un dNTP y un derivado correspondiente del mismo nucleótido de este, tal como una combinación de un dNTP y el correspondiente derivado alfa-tio-dNTP de este nucleótido o una combinación de un dNTP y el derivado deaza-dNTP correspondiente de este nucleótido. Por ejemplo, en una forma de realización, la composición proporcionada comprende tanto dGTP como alfa-tio-dGTP. En otra forma de

realización, la composición proporcionada comprende tanto dGTP como 7-deaza-dGTP. En otra forma de realización más, la composición comprende una combinación de dATP y 7-deaza-dATP.

[0051] Cuando tanto un dNTP como un derivado de este están presentes en la composición, la concentración relativa o relación de concentración de dNTP con respecto al derivado pueden variar. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la concentración relativa de dNTP:derivado de dNTP es 1:1. En algunas formas de realización, la concentración de dNTP:concentración del derivado de dNTP va de alrededor de 100:1 a alrededor de 1:1, de alrededor de 50:1 a alrededor de 1,2:1, de alrededor de 25:1 a alrededor de 1,5:1, de alrededor de 10:1 a alrededor de 2:1. En otras formas de realización, la concentración de dNTP:concentración del derivado dNTP va de alrededor de 1:1 a alrededor de 1:100, de alrededor de 1:1,2 a alrededor de 1:50, de alrededor de 1:25 a alrededor de 1:1,5, de alrededor de 1:110 a alrededor de 1:2. En algunas formas de realización, la concentración de dNTP:concentración del derivado de dNTP va de alrededor de 2:1 a alrededor de 1:2. En algunas formas de realización, la concentración de dNTP:concentración del derivado de dNTP va de alrededor de 10:1 a alrededor de 2:1. En algunas formas de realización, la concentración de dNTP:concentración del derivado de dNTP va de alrededor de 1:2 a alrededor de 1:10. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, la concentración de dGTP:concentración de alfa-tio-dGTP va de alrededor de 100:1 a alrededor de 1,5:1 o de alrededor de 50:1 a alrededor de 12:1. En otras formas de realización, la concentración de dGTP:concentración de alfa-tio-dGTP va de alrededor de 1:1,5 a alrededor de 1:100 o de alrededor de 1:12 a alrededor de 1:50. En algunas formas de realización, la concentración de dGTP:concentración de alfa-tio-dGTP va de alrededor de 2:1 a alrededor de 1:2. En algunas formas de realización, la concentración de dGTP:concentración de alfa-tio-dGTP va de alrededor de 10:1 a alrededor de 2:1. En algunas formas de realización, la concentración de dGTP:concentración de alfa-tio-dGTP va de alrededor de 1:2 a alrededor de 1:10. En ciertas formas de realización, la concentración de dGTP:concentración de 7-deaza-dGTP va de alrededor de 100:1 a alrededor de 1,5:1 o de alrededor de 50:1 a alrededor de 12:1. En otras formas de realización, la concentración de dGTP:concentración de 7-deaza-dGTP va de alrededor de 1:1,5 a alrededor de 1:100 o de alrededor de 1:12 a alrededor de 1:50. En algunas formas de realización, la concentración de dGTP:concentración de 7-deaza-dGTP va de alrededor de 2:1 a alrededor de 1:2. En algunas formas de realización, la concentración de dGTP:concentración de 7-deaza-dGTP va de

alrededor de 10:1 a alrededor de 2:1. En algunas formas de realización, la concentración de dGTP:concentración de 7-deaza-dGTP va de alrededor de 1:2 a alrededor de 1:10.

[0052] En algunas formas de realización, en la presente se proporciona una composición de PCR ensamblada que comprende una ADN polimerasa termoestable, una sal de magnesio, un agente antiespumante y una combinación de dATP, dCTP, dUTP y 7-deaza-dGTP. En una forma de realización, en la presente se proporciona una composición de PCR ensamblada que comprende una ADN polimerasa termoestable, una sal de magnesio, un agente antiespumante y una combinación de dCTP, dGTP, dUTP y 7-deaza-dATP. En una forma de realización, se proporciona en la presente una composición de PCR ensamblada que comprende una ADN polimerasa termoestable, una sal de potasio, un agente antiespumante y una combinación de dGTP y 7-deaza-dGTP. En una forma de realización, se proporciona en la presente una composición de PCR ensamblada que comprende una ADN polimerasa termoestable, una sal de potasio, un agente antiespumante y una combinación de dATP y 7-deaza-dATP. En una forma de realización, en la presente se proporciona una composición de PCR ensamblada que comprende una ADN polimerasa termoestable, una sal de magnesio, un agente antiespumante y una combinación de dGTP y 7-deaza-dGTP. En una forma de realización, se proporciona en la presente una composición de PCR ensamblada que comprende una ADN polimerasa termoestable, una sal de magnesio, un agente antiespumante y una combinación de dATP y 7-deaza-dATP. En ciertas formas de realización, el agente antiespumante es un agente antiespumante a base de silicona. En una forma de realización, el agente antiespumante a base de silicona se selecciona de XIAMETER® AFE-1010, AFE-1430, AFE-1510, AFE-1520, AFE-2210, Antifoam A, Antifoam B, Antifoam C, Antifoam H-10, Antifoam SE-15, Antifoam SE-35, Antifoam SO-25, Antifoam Y-30 y Antifoam 289. En otras formas de realización, el agente antiespumante es un agente antiespumante que no es a base de silicona. En una forma de realización, el agente antiespumante que no es a base de silicona se selecciona de sulfonatos orgánicos, poliéteres, fosfatos orgánicos, glicoles acetilénicos, fluorocarbonos, poliaminas de polialqueno, y compuestos de polialquilenimina, que incluyen, entre otros, Antifoam 204 y Antifoam O-30.

[0053] Las composiciones proporcionadas también pueden comprender uno o más agentes bloqueadores inhibidores de la PCR. Dichos agentes bloqueadores de inhibidor de la PCR se pueden agregar a las composiciones o mezclas de reacción

descritas en la presente para ayudar a superar la inhibición de las reacciones de la PCR mediante una variedad de compuestos que se encuentran a menudo en muestras biológicas utilizadas para la preparación, aislamiento o purificación de ácidos nucleicos. En algunas formas de realización, los agentes bloqueadores de inhibidor de la PCR pueden reducir la cantidad de inhibición de la PCR por parte de un inhibidor o inhibidores de la PCR desde un porcentaje superior a cero hasta un 100 % en comparación con el nivel de inhibición observado en ausencia de dichos agentes bloqueadores de inhibidor de la PCR. Por ejemplo, la inhibición se puede reducir al menos alrededor de un 0,5 %, alrededor de un 1 %, alrededor de un 2 %, alrededor de un 5 %, alrededor de un 10 %, alrededor de un 20 %, alrededor de un 50 %, alrededor de un 75 %, alrededor de un 90 %, alrededor de un 95 % o alrededor del 100 % o cualquier porcentaje intermedio.

[0054] En algunas formas de realización, el agente bloqueador del inhibidor de PCR tal como se describe en la presente es una proteína. En algunas formas de realización, tales proteínas pueden incluir, entre otras, albúminas, gelatinas y proteínas de fijación a ADN, o variantes, fragmentos o derivados de péptidos o polipéptidos de estos. En algunas formas de realización, otros agentes bloqueadores de inhibidor de la PCR que no son a base de proteína para su uso en las presentes enseñanzas pueden incluir, por ejemplo, mesilato de deferoxamina. En algunas formas de realización, las composiciones pueden comprender una combinación de agentes bloqueadores de inhibidor de la PCR y/o proteínas. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las composiciones comprenden una albúmina, una gelatina o una combinación de albúmina y gelatina. En algunas formas de realización, la albúmina o la gelatina se pueden seleccionar de albúmina sérica, gelatina de pescado o una combinación de albúmina sérica y gelatina de pescado. La albúmina sérica puede ser de cualquier animal, por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA), albúmina sérica humana (HSA). En algunas formas de realización, la albúmina se deriva de otras especies de animales que son bien conocidas por las personas del oficio de nivel medio. En algunas formas de realización, la albúmina es una albúmina recombinante, tal como BSA recombinante (rBSA). La gelatina puede ser de cualquier animal, por ejemplo, gelatina de pescado, gelatina bovina. En algunas formas de realización, la gelatina se deriva de otras especies de animales que son bien conocidas por las personas del oficio de nivel medio. En algunas formas de realización, la gelatina es una gelatina recombinante, tal como la gelatina humana recombinante. En algunas formas de realización, las proteínas de fijación a ADN pueden incluir, entre otras, la proteína 32 del gen T4 (T4

gp32).

[0055] Ciertos compuestos o agentes bloqueadores de inhibidor de la PCR se pueden agregar a las presentes composiciones para dar una concentración en la composición que vaya de alrededor de 0,0001 mg/ml a alrededor de 10 mg/ml, de alrededor de 0,001 mg/ml a alrededor de 8 mg/ml, de alrededor de 0,01 mg/ml a alrededor de 6 mg/ml, de alrededor de 0,05 mg/ml a alrededor de 4 mg/ml, de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 3 mg/ml o de alrededor de 0,5 mg/ml a alrededor de 2 mg/ml, lo que incluye cualquier concentración o rango de concentraciones dentro de cualquiera de los anteriores. Ciertos agentes bloqueadores de inhibidor de la PCR también pueden agregarse como un porcentaje de la concentración final de la composición, por ejemplo, de alrededor de 0,001 % a alrededor de 15 %, de alrededor de 0,05 % a alrededor de 10 %, de alrededor de 0,01 % a alrededor de 5 %, o de alrededor de 0,1 % a alrededor de 1 %, lo que incluye cualquier concentración o rango de concentraciones dentro de cualquiera de los anteriores. En algunas formas de realización, las composiciones como se describen en la presente comprenden una proteína bloqueadora de inhibidor de la PCR, tal como albúmina, a una concentración tal que su concentración en una PCR ensamblada va de alrededor de 0,001 mg/ml a alrededor de 10,0 mg/ml, de 0,005 mg/ml a alrededor de 5,0 mg/ml, de alrededor de 0,01 mg/ml a alrededor de 4,0 mg/ml, de alrededor de 0,05 mg/ml a alrededor de 3,0 mg/ml o de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 2,0 mg/ml, lo que incluye cualquier concentración o rango de concentraciones dentro de cualquiera de los anteriores. En otra forma de realización, las composiciones como se describen en la presente comprenden una proteína bloqueadora de inhibidor de la PCR, tal como gelatina a una concentración tal que su concentración en una PCR ensamblada va de alrededor de 0,005 % (p/v) a alrededor de 2 % (p/v), de alrededor de 0,01 % (p/v) a alrededor de 1,0 % (p/v), y más específicamente de alrededor de 0,05 % (p/v) a alrededor de 0,5 % (p/v), lo que incluye cualquier concentración o rango de concentraciones dentro de cualquiera de los anteriores. En aun otra forma de realización, las composiciones como se describen en la presente comprenden una combinación de albúmina y gelatina en cualquiera de las concentraciones anteriores. En algunas formas de realización preferidas, la albúmina va de alrededor de 0,05 mg/ml a 5 mg/ml y la gelatina está en una concentración que va de alrededor de 0,01 % (p/v) a alrededor de 1 %. En algunas formas de realización, la albúmina es albúmina de suero bovino (BSA), y la gelatina es una gelatina de pescado y/o una gelatina bovina.

[0056] En algunas formas de realización, la composición puede comprender uno, dos,

tres, cuatro, cinco o más proteínas y/o agentes bloqueadores de inhibidor de la PCR. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la composición comprende una albúmina, una gelatina de pescado y una gelatina bovina. En algunas formas de realización, la concentración de cada proteína y/o agente bloqueador de inhibidor de la PCR son iguales. En algunas formas de realización, la concentración de cada proteína y/o agente bloqueador de inhibidor de la PCR son diferentes. En algunas formas de realización, uno o más agentes bloqueadores de inhibidor de la PCR se agregan a las composiciones o mezclas de reacción para ayudar a superar la inhibición de la PCR mediante una variedad de inhibidores que se encuentran a menudo en muestras biológicas. Tales inhibidores incluyen, por ejemplo, heparina (sangre); hematina (sangre); EDTA (sangre); citrato (sangre); inmunoglobina G (sangre, suero); ácido húmico (tierra, heces); lactoferrina (leche, saliva, otros fluidos secretores); urea (orina); polisacáridos vegetales (plantas); melanina (piel, cabello); mioglobina (tejido); y colorante índigo (textiles). La adición de agentes bloqueadores de inhibidor de la PCR, tanto individualmente como en combinación, puede aumentar la tolerancia a dichos contaminantes inhibidores de la PCR. Por lo tanto, las presentes composiciones pueden comprender además agentes que trabajan solos o en combinación para aumentar la tolerancia a diversos inhibidores de la PCR que incluyen, por ejemplo, ácido húmico, hematina y heparina. En algunas formas de realización, cada agente o proteína bloqueadora de inhibidor de la PCR en la composición o mezcla de reacción puede bloquear un inhibidor o grupo de inhibidores diferentes a los de la otra proteína o agente bloqueador de inhibición de la PCR en la composición o mezcla de reacción. En algunas formas de realización, los diferentes agentes o proteínas bloqueadoras de inhibidor de la PCR en la composición o mezcla de reacción pueden bloquear el mismo inhibidor o grupo de inhibidores. En algunas formas de realización, los diferentes agentes o proteínas bloqueadoras de inhibidor de la PCR en la composición o mezcla de reacción pueden bloquear un número superpuesto de inhibidores de un grupo de inhibidores. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la gelatina es eficaz para reducir la inhibición de la PCR en al menos ácido húmico y heparina, y la albúmina es eficaz en la reducción de la inhibición de la PCR en al menos ácido húmico y hematina.

[0057] De acuerdo con las presentes enseñanzas, las composiciones proporcionadas en la presente pueden comprender uno o más cebadores que facilitan la síntesis de una molécula de ADN (por ejemplo, una molécula de cADN monocatenaria o una molécula de cADN bicatenaria) complementaria con respecto a la totalidad o porción

de la plantilla de ácido nucleico (ARN o ADN). Además, estos cebadores pueden usarse para amplificar moléculas de ácido nucleico de acuerdo con las presentes enseñanzas. Los cebadores oligonucleotídicos pueden ser cualquier oligonucleótido de dos o más nucleótidos (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15, 20, 25, etc.) de longitud. Tales cebadores incluyen, entre otros, cebadores específicos de la diana (que son preferentemente cebadores específicos del gen), cebadores oligo (dT), cebadores aleatorios o cebadores arbitrarios. Los cebadores adicionales que se pueden usar para la amplificación de las moléculas de ADN de acuerdo con los métodos descritos en la presente serán evidentes para una persona del oficio de nivel medio. Debe entenderse que una amplia gama de cebadores puede ser útil en las presentes composiciones, métodos y kits, incluidos los que no se describen específicamente en la presente, sin apartarse del alcance o las formas de realización preferidas de estos.

[0079] En algunas formas de realización, la concentración final de cebadores puede variar de alrededor de 25 nM a alrededor de 2000 nM, tal como de alrededor de 50 nM a alrededor de 1700 nM, de alrededor de 75 nM a alrededor de 1500 nM, de alrededor de 100 nM a alrededor de 1200 nM, de alrededor de 200 nM a alrededor de 1000 nM, o cualquier rango intermedio. En algunas formas de realización de ejemplo, la concentración de cada cebador está entre alrededor de 400 nM y alrededor de 900 nM, incluyendo todas las cantidades o rangos intermedios.

[0058] De acuerdo con las presentes enseñanzas, las composiciones pueden comprender además sondas para la detección de ácidos nucleicos diana. Se conocen varias sondas en la técnica, por ejemplo (sondas TaqMan™ (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.538.848), varias balizas moleculares de bucle troncal (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6.103.476 y 5.925.517 y Tyagi y Kramer, 1996, Nature Biotechnology 14:303-308), balizas sin vástago o lineales (véase, por ejemplo, WO 99/21881), PNA Molecular Beacons™ (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 6.355.421 y 6.593.091), balizas de PNA lineales (véase, por ejemplo, Kubista et al., 2001, SPIE 4264:53-58), sondas no FRET (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.150.097), sondas Sunrise™/Amplifluor™ (patente estadounidense n.º 6.548.250), sondas Scorpion™ de vástago-bucle y dúplex (véase, por ejemplo, Solinas et al., 2001, Nucleic Acids Research 29:E96 y la patente estadounidense n.º 6.589.743), sondas de bucle de bulto (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.590.091), sondas de pseudo nudos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.589.250), ciclicones (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.383.752), sonda MGB Eclipse™ (Epoch Biosciences), sondas de

horquilla (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.596.490), sondas de luz de ácido nucleico peptídico (PNA), sondas de nanopartículas autoensambladas y sondas modificadas con ferroceno descritas, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.485.901; Mhlanga et al., 2001, *Methods* 25:463-471; Whitcombe et al., 1999, *Nature Biotechnology*. 17:804-807; Isacson et al., 2000, *Molecular Cell Probes*. 14:321-328; Svanvik et al., 2000, *Anal Biochem*. 281:26-35; Wolffs et al., 2001, *Biotechniques* 766:769-771; Tsourkas et al., 2002, *Nucleic Acids Res*. 30:4208-4215; Riccelli et al., 2002, *Nucleic Acids Res*. 30:4088-4093; Zhang et al., 2002 *Shanghai*. 34:329-332; Maxwell et al., 2002, *J. A.m. Chem. Soc*. 124:9606-9612; Broude et al., 2002, *Trends Biotechnol*. 20:249-56; Huang et al., 2002, *Chem Res. Toxicol*. 15:118-126; y Yu et al., 2001, *J. A.m. Chem. Soc* 14:11155-11161. Las sondas pueden comprender colorantes indicadores tales como, por ejemplo, 6-carboxifluoresceína (6-FAM) o tetraclorofluorescina (TET). Las sondas de detección también pueden comprender porciones extintoras tales como tetrametilrodamina (TAMRA), extintores de agujero negro (Biosearch), Iowa Black (IDT), extintores QSY (Thermo Fisher Scientific), y desactivadores de sulfonato/carboxilato Dabsyl y Dabcel (Epoch). Las sondas pueden también comprender dos sondas, en donde, por ejemplo, un flúor está en una sonda, y un extintor en la otra, en donde la hibridación de las dos sondas juntas en una diana extingue la señal, o en donde la hibridación sobre una diana altera la señal de firma mediante un cambio en la fluorescencia.

[0081] Los marcadores detectables de ejemplo incluyen, por ejemplo, un colorante fluorescente o fluoróforo (por ejemplo, un grupo químico que puede excitarse mediante luz para emitir fluorescencia o fosforescencia), "colorantes aceptores" capaces de extinguir una señal fluorescente de un colorante de donante fluorescente, y similares. Los marcadores detectables adecuados pueden incluir, por ejemplo, fluoresceínas (por ejemplo, 5-carboxi-2,7-diclorofluoresceína; 5-carboxifluoresceína (5-FAM); 5-HAT (hidroxi triptamina); 6-HAT; 6-JOE; 6-carboxifluoresceína (6-FAM); FITC); fluores Alexa (por ejemplo, 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750); fluoróforos BODIPY® (por ejemplo, 492/515, 493/503, 500/510, 505/515, 530/550, 542/563, 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650- X, 650/665-X, 665/676, FL, FL ATP, FI-Ceramida, R6G SE, TMR, conjugado TMR-X, TMR-X, SE, TR, TR ATP, TR-X SE), cumarinas (por ejemplo, 7-amino-4-metilcumarina, AMC, AMCA, AMCA-S, AMCA-X, ABQ, CPM metilcumarina, cumaloidina, hidroxycumarina, CMFDA, metoxicoumarina), calceína, calceína AM, azul de calceína, colorantes de calcio (por ejemplo, calcio carmesí, calcio verde, calcio

naranja, calcoflúor blanco), Cascade Blue, Cascade Yellow; Colorantes CyTM (por ejemplo, 3, 3,18, 3,5, 5, 5,18, 5,5, 7), GFP cian, fluorosensor AMP cíclico (FiCRhR), proteínas fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde (por ejemplo, GFP, EGFP), proteína azul fluorescente (por ejemplo, BFP, EBFP, EBFP2, Azurita, mKalama1), proteína fluorescente cian (por ejemplo, ECFP, Cerulean, CyPet), proteína amarilla fluorescente (por ejemplo, YFP, Citrine, Venus, YPet), pares donante/aceptor FRET (por ejemplo, fluoresceína/tetrametilrodamina, IAEDANS/fluoresceína, EDANS/dabcyl, fluoresceína/fluoresceína, BODIPY[®] FL/BODIPY[®] FL, fluoresceína/QSY7 y QSY9), LysoTracker y LysoSensor (por ejemplo, LysoTracker Azul DND-22, LysoTracker Azul-Blanco DPX, LysoTracker Amarillo HCK-123, LysoTracker Verde DND-26, LysoTracker Rojo DND-99, LysoSensor Azul DND-167, LysoSensor Verde DND-189, LysoSensor Verde DND-153, LysoSensor Amarillo/Azul DND-160, LysoSensor Amarillo/Azul 10.000 MW de dextrano), Oregon Green (por ejemplo, 488, 488-X, 500, 514); rodaminas (por ejemplo, 110, 123, B, B 200, BB, BG, B extra, 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA), 5 GLD, 6-carboxi rodamina 6G, Lisamina, Lisamina rodamina B, Falicidina, Faloidina, Red, Rhod-2, 5-ROX (carboxi-X-rodamina), Sulforodamina B can C, Sulforodamina G Extra, Tetrametilrodamina (TRITC), WT), Texas Red, Texas Red-X, VIC y otras etiquetas descritas en, por ejemplo, la publicación estadounidense n.º 2009/0197254), entre otros, como conocerían las personas del oficio de nivel medio.

[0059] En algunas formas de realización, las sondas se diseñan de acuerdo con los métodos y principios descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 6.727.356 (cuya descripción se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). Algunas sondas pueden basarse en la secuencia, por ejemplo, sondas nucleasa 5' y algunas, tales como SYBR[®] Green, pueden ser colorantes de fijación al ADN no específicos de secuencia. En algunas formas de realización preferidas, la sonda detectora es una sonda TaqMan[™] (Applied Biosystems, Foster City, CA). Debe entenderse que en la técnica se conoce una amplia variedad de sondas que se pueden usar en las presentes composiciones, métodos y kits, incluso las que no se describen específicamente en la presente.

[0060] En algunas formas de realización, la concentración de la sonda en una solución de trabajo puede variar de alrededor de 5 nM a alrededor de 750 nM, tal como de alrededor de 10 nM a alrededor de 600 nM, de alrededor de 25 nM a alrededor de 500 nM, de alrededor de 50 nM a alrededor de 400 nM, de alrededor de 75 nM a alrededor de 300 nM, o cualquier número intermedio. En algunas formas de realización

ejemplares, la concentración de cada sonda está entre alrededor de 100 nM y alrededor de 250 nM, lo que incluye todas las cantidades o rangos intermedios.

[0061] De acuerdo con las presentes enseñanzas, uno o más componentes adicionales y/o aditivos se pueden incorporar en las presentes composiciones, métodos y kits para optimizar la síntesis de ácidos nucleicos a partir de una plantilla de ácido nucleico. En algunas formas de realización, la composición puede comprender componentes y/o aditivos adicionales que son capaces de facilitar o mejorar las reacciones de síntesis de ácidos nucleicos (por ejemplo, reactivos para facilitar o mejorar la PCR). Los componentes y/o aditivos que mejoran la síntesis de ácidos nucleicos pueden ser compuestos orgánicos o inorgánicos. Algunos componentes y/o aditivos útiles en las presentes composiciones, métodos y kits incluyen polipéptidos así como componentes no polipeptídicos. Dichos componentes y/o aditivos pueden incluir, entre otros, por ejemplo, proteínas de fijación a ADN de fijación monocatenaria (SSB), compuestos que contienen azufre, compuestos que contienen acetato, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, formamida, betaína, cloruro de tetrametilamonio (TMAC), ectoína, azida de sodio, kathon, polioles, NaN_3 , amortiguadores, tensioactivos, detergentes (por ejemplo, TWEEN 20, NP-40, tritina X-100, y CHAPS), un componente o compuesto utilizado para la PCR de inicio en caliente, un control de referencia pasiva para minimizar las variaciones de muestra a muestra y/o de cavidad a cavidad en los ensayos cuantitativos de detección de ADN en tiempo real y/o glicosilasa de uracilo ADN, por nombrar sólo algunos. La composición puede comprender además agentes de apiñamiento tales como Ficoll 70, glicógeno y polietilenglicol (PEG). Las personas del oficio de nivel medio podrán identificar reactivos y/o aditivos adicionales para usar de acuerdo con las presentes composiciones, métodos y kits.

[0062] En algunos aspectos, las composiciones o kits proporcionados en la presente pueden comprender glicerol. En algunas formas de realización, el glicerol está presente en la composición a una concentración tal que su concentración va de alrededor de 5 a alrededor de 50 % (p/v), o de alrededor de 10 % (p/v) a alrededor de 30 % (p/v), lo que incluye todas las concentraciones o rango de concentraciones entre cualquiera de las cantidades anteriores.

[0063] En algunos aspectos, las composiciones o kits proporcionados en la presente pueden comprender NaN_3 . En algunas formas de realización, el NaN_3 está presente en la composición a una concentración tal que su concentración va de alrededor de 0,005 % (p/v) a alrededor de 0,05 % (p/v), o de alrededor de 0,01 % (p/v) a alrededor de 0,1 % (p/v).

[0064] En algunos aspectos, las composiciones o kits proporcionados en la presente pueden comprender un detergente o una combinación de detergentes. En algunas formas de realización, los detergentes están presentes en una cantidad efectiva para mejorar la sensibilidad de una reacción de PCR. Los detergentes pueden ser detergentes aniónicos, detergentes catiónicos, detergentes zwitteriónicos, y/o detergentes no iónicos. En algunas formas de realización, los detergentes no iónicos pueden ser, entre otros, TRITON X-100®, Nonidet P-40 (NP-40), TWEEN 20, TWEEN 80, Brij 30, Brij 35 y/o Brij 58. En algunas formas de realización, la composición comprende cualquier detergente no iónico, tal como TWEEN 20. En algunas formas de realización, la composición comprende un detergente no iónico distinto de TWEEN 20. En algunas formas de realización, la composición no contiene TWEEN 20 detectable. En algunas formas de realización, la composición proporcionada en la presente comprende un detergente no iónico distinto de TWEEN 20 presente en una cantidad eficaz para mejorar la sensibilidad de una reacción de PCR. En algunas formas de realización, la composición comprende TRITON X-100®. En algunas formas de realización, la composición comprende NP-40. En algunas formas de realización, la composición comprende Brij 30, Brij 35 o Brij 58. En algunas formas de realización, la composición comprende cualquier combinación de los detergentes mencionados anteriormente. El detergente puede estar presente en la composición a una concentración que va de alrededor de 0,001 % a alrededor de 0,50 % (p/v), de alrededor de 0,005 a alrededor de 0,1 % (p/v), o de alrededor de 0,01 % (p/v) a alrededor de 0,05 % (p/v), lo que incluye todas las concentraciones o rango de concentraciones entre cualquiera de las cantidades anteriores.

[0065] En algunos aspectos, las composiciones, mezclas de reacción o kits proporcionados en la presente pueden comprender un componente amortiguador, tal como una solución salina amortiguada. En algunas formas de realización, el agente amortiguador proporciona condiciones de pH apropiadas para mantener la estabilidad de la enzima ADN polimerasa. Los términos "estable" y "estabilidad" como se usan en la presente generalmente significan la retención por una composición, como una composición enzimática, de al menos el 70 %, preferentemente al menos el 80 %, y con máxima preferencia al menos el 90 %, de la actividad enzimática original (en unidades) después de que la enzima o composición que contiene la enzima se haya almacenado durante alrededor de 3 días a una temperatura de alrededor de la temperatura ambiente (por ejemplo, de alrededor de 20 °C a alrededor de 25 °C), de alrededor de una a ocho semanas a una temperatura de alrededor de 4 °C, de

alrededor de dos a seis meses a una temperatura de alrededor de -20 °C, y de alrededor de seis meses o más a una temperatura de alrededor de -80 °C. Ejemplos de tales agentes amortiguadores pueden incluir, por ejemplo, TRIS, TRICINE, BIS-TRICINE, HEPES, MOPS, TES TAPS, PIPES y CAPS. En algunas formas de realización, la concentración de amortiguador de las composiciones y/o mezclas de reacción como se describe en la presente está entre alrededor de 1 mM y alrededor de 500 mM, entre alrededor de 5 mM y alrededor de 250 mM, entre alrededor de 10 mM y alrededor de 200 mM, entre alrededor de 25 mM y alrededor de 150 mM, y entre alrededor de 50 mM y alrededor de 100 mM, lo que incluye cualquier concentración o rango que se encuentre dentro de las cantidades anteriores. Debe entenderse que en la técnica se conoce una amplia variedad de amortiguadores (o sales de amortiguador), incluyendo aquellos no descritos específicamente en la presente, que se pueden usar de acuerdo con las presentes composiciones, métodos y kits.

[0066] Ejemplos de sales adecuadas para su inclusión en las composiciones proporcionadas en la presente incluyen, entre otras, cloruro de potasio, acetato de potasio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, acetato de amonio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de manganeso, acetato de manganeso, sulfato de manganeso, cloruro de sodio, acetato de sodio, cloruro de litio y acetato de litio. En ciertas formas de realización, la composición comprende más de un componente de sal (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, etc.). Por ejemplo, las composiciones descritas en la presente pueden comprender dos sales diferentes. En otras formas de realización, las composiciones comprenden tres sales diferentes. En otras formas de realización más, las composiciones comprenden cuatro sales diferentes. En una forma de realización, la composición comprende una sal particular a una concentración que va de alrededor de 0,5 mM a alrededor de 1000 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 500 mM, de alrededor de 5 mM a alrededor de 250 mM, de alrededor de 10 mM a alrededor de 100 mM, de alrededor de 5 mM a alrededor de 50 mM, y de alrededor de 2 mM a alrededor de 10 mM, incluyendo cualquier concentración o rango que se encuentre dentro de los rangos anteriores. Sin limitación, en ciertas formas de realización donde la composición comprende una sal tal como cloruro de potasio, acetato de potasio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, cloruro de amonio y/o acetato de amonio, la composición comprende la sal a una concentración tal que en una PCR ensamblada va de alrededor de 5 mM a alrededor de 250 mM, de 5 mM a alrededor de 150 mM, de alrededor de 10 mM a alrededor de 120 mM, de alrededor de 20 mM a alrededor de

100 mM, de alrededor de 30 mM a alrededor de 90 mM, o de alrededor de 40 a alrededor de 80 mM, incluyendo cualquier concentración que se encuentre dentro de los rangos anteriores. Sin limitación, en ciertas formas de realización donde la composición comprende una sal tal como acetato de magnesio, sulfato de magnesio, cloruro de manganeso, acetato de manganeso o sulfato de manganeso, la composición comprende la sal a una concentración tal que en una PCR ensamblada va de alrededor de 0,5 mM a alrededor de 100 mM, de alrededor de 1 mM a alrededor de 75 mM, de alrededor de 1,5 mM a alrededor de 50 mM, de alrededor de 2 mM a alrededor de 30 mM, de alrededor de 3 mM a alrededor de 15 mM, de alrededor de 4 mM a alrededor de 10 mM, o de alrededor de 1 mM a alrededor de 5 mM, incluida cualquier concentración que se encuentre dentro de los rangos anteriores. Debe entenderse que en la técnica se conoce una amplia variedad de sales o soluciones salinas que pueden usarse de acuerdo con las presentes composiciones, métodos y kits, incluidas las que no se describen específicamente en la presente.

[0067] En algunos aspectos, las composiciones o kits proporcionados en la presente pueden comprender un componente de control de referencia pasiva. En algunas formas de realización, el control de referencia pasiva minimiza las variaciones de muestra a muestra y/o de cavidad a cavidad en ensayos cuantitativos de detección de ácido nucleico en tiempo real y/o puede incluirse a una concentración que permita su uso como control detectable. En una forma de realización, se incluye un cromóforo de referencia, específicamente un fluoróforo, como control de referencia pasiva. En una forma de realización, el cromóforo de referencia es el colorante fluorescente. En algunas formas de realización, el colorante fluorescente es un colorante ROX (Thermo Fisher Scientific). En algunas formas de realización, el colorante fluorescente es un colorante MUSTANG PURPLE (Thermo Fisher Scientific). La referencia pasiva se puede incluir en la composición a una concentración tal que su concentración en la PCR ensamblada vaya de alrededor de 10 a alrededor de 750 nM o de alrededor de 20 nM a alrededor de 500 nM, o de alrededor de 50 nM a alrededor de 200 nM, incluida cualquier concentración que se encuentre dentro de los rangos anteriores.

[0068] En algunos aspectos, se puede incluir glicosilasa de uracil ADN (UNG o UDG) en las composiciones o kits proporcionados en la presente. La enzima está disponible comercialmente de la mano de varias fuentes comerciales, por ejemplo, Thermo Fisher Scientific, Enzymatics, New England Biolabs, Genscript o USB. En algunas formas de realización, la UNG es termolábil. En otras formas de realización, la UNG es termoestable. La UNG termolábil o termoestable se puede incluir en la composición a

una concentración tal que su concentración en la PCR final ensamblada vaya de alrededor de 0,0001 U/μl a alrededor de 50 U/μl, de alrededor de 0,0005 U/μl a alrededor de 10 U/μl, de alrededor de 0,001 U/μl a alrededor de 5 U/μl, de 0,005 U/μl a alrededor de 1,0 U/μl, o de 0,01 U/μl a alrededor de 0,5 U/μl (U/μl = unidades por microlitro), incluida cualquier concentración o rango que se encuentre dentro de los anteriores rangos.

[0069] Las reacciones de amplificación no deseadas, que pueden ocurrir durante el proceso de PCR, generalmente comienzan durante el ensamblaje de las mezclas de reacción, o mientras el termociclador se calienta a la temperatura inicial de desnaturalización. Estas reacciones espurias pueden minimizarse al realizar una amplificación de "inicio en caliente". En general, las técnicas de inicio en caliente limitan la disponibilidad de un componente esencial de reacción hasta que se alcanza una temperatura elevada, a menudo >60 °C.

[0070] Las composiciones, kits y métodos de acuerdo con las presentes enseñanzas pueden incluir mecanismos, componentes o pasos de "inicio en caliente", como un medio para prevenir, reducir o eliminar la síntesis de ácidos nucleicos no específicos. Existen varios métodos para realizar reacciones de inicio en caliente que incluyen técnicas manuales, barreras, inactivación de polimerasa reversible y cebadores de horquilla especialmente diseñados. En algunas formas de realización, los componentes o compuestos utilizados para las reacciones de inicio en caliente, como en la PCR, pueden ser cualquiera de los que evitan la amplificación no específica de ADN mediante la inactivación de la actividad de polimerasa a temperatura inferior, tal como durante la fase de recocido, al tiempo que permite la reactivación o la activación de la actividad de la polimerasa a una temperatura más alta, tal como durante la fase de extensión. Tales ejemplos de componentes de inicio en caliente pueden incluir, entre otros, por ejemplo, un anticuerpo, una modificación química (por ejemplo, de la polimerasa), un oligonucleótido, un aptámero, un cebador diseñado especialmente, una proteína de fijación, y/o una microesfera de cera de secuestro. Las microesferas de cera para la PCR de inicio en caliente están disponibles comercialmente, por ejemplo, los tubos de reacción de almacenamiento HotStart™ (Thermo Fisher Scientific). La selección de un aptámero de inicio en caliente adecuado puede realizarse mediante un método conocido en la técnica o puede usarse un aptámero de inicio en caliente disponible comercialmente. De manera similar, la selección de un cebador de horquilla de inicio en caliente adecuado puede realizarse mediante un método conocido en la técnica o puede usarse un cebador de inicio en caliente

disponible comercialmente. Los anticuerpos para la PCR de inicio en caliente pueden generarse o seleccionarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Alternativamente, se puede usar un anticuerpo disponible comercialmente, por ejemplo, el anticuerpo TaqStart (Clontech) que es efectivo con cualquiera ADN polimerasa derivada de Taq, incluidos los mutantes de eliminación nativos, recombinantes y N-terminales. En algunos casos, un cebador de inicio en caliente adecuado puede ser un cebador especialmente diseñado para tener estructura secundaria (tal como un cebador de horquilla) que impide el recocido del cebador hasta que las temperaturas de ciclo hagan que se desnaturalice y despliegue. Una concentración apropiada del compuesto o reactivo para la PCR de inicio en caliente en las mezclas de reacción ensambladas se puede determinar mediante varios métodos conocidos en la técnica o, para un producto comercial, puede sugerirla el fabricante. Algunos de los mecanismos, componentes o pasos de inicio en caliente se describen con más detalle a continuación.

[0071] En general, los métodos manuales de inicio en caliente generalmente, aunque no siempre, requieren que el investigador retenga un componente crítico, generalmente magnesio o polimerasa, hasta que la reacción se haya calentado. Luego se agrega el componente retenido para iniciar la reacción. Un segundo método utiliza una barrera física (por ejemplo, cera) para separar un componente crítico de la plantilla y los cebadores. La patente estadounidense n.º 5.565.339 describe el uso de una barrera de cera para separar los diferentes reactivos de PCR entre sí en un tubo de ensayo. La patente estadounidense n.º 5.413.924 describe el uso de una microesfera de cera de parafina para secuestrar la ADN polimerasa.

[0072] Un método alternativo de amplificación de inicio en caliente es la inactivación de la polimerasa reversible. La polimerasa se hace reaccionar con un anticuerpo o un oligonucleótido aptámero que se fija al dominio de fijación a nucleótido de la polimerasa, haciendo que la polimerasa sea inactiva. Por ejemplo, se introduce en la mezcla de reacción un anticuerpo monoclonal para la polimerasa Taq, como el anticuerpo de ADN polimerasa anti-Taq disponible de la mano de Sigma. Al calentarse, el compuesto se disocia de la polimerasa, restaurando la actividad enzimática. En otro ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.677.152 describe un método en el que la ADN polimerasa se modifica químicamente para garantizar que solo se active a temperaturas elevadas.

[0073] Otro enfoque para lograr la amplificación de inicio en caliente es diseñar cebadores que se recuecen a sí mismos para formar estructuras de horquilla

específicas. Los cebadores de horquilla no podrán recocer al ácido nucleico diana mientras estén en la conformación de la horquilla. Los cebadores de horquilla permanecerán en una conformación de horquilla hasta que se calienten a una temperatura de desnaturalización. Sin embargo, si la estructura de horquilla incluye una extensión monocatenaria, entonces la estructura de horquilla en sí misma se asemeja a un cebador recocado a una plantilla y puede dar como resultado una extensión de cadena.

[0074] Diversos otros componentes o mecanismos de inicio en caliente, además de los descritos anteriormente, también son bien conocidos por las personas del oficio de nivel medio y serán fácilmente seleccionables en función de su capacidad para trabajar de acuerdo con las presentes enseñanzas. En ciertas formas de realización, se proporcionan composiciones, mezclas de reacción, kits y métodos que comprenden al menos dos mecanismos, componentes o pasos de inicio en caliente diferentes que se usan para inhibir o inhibir sustancialmente la actividad de polimerasa de una polimerasa de ácido nucleico bajo una primera condición (como a una temperatura más baja) y permitir la activación de la polimerasa bajo una segunda condición (como a una temperatura más alta). Dichos mecanismos de inicio en caliente incluyen, entre otros, los descritos anteriormente, incluyendo anticuerpos o combinaciones de anticuerpos que bloquean la actividad de la ADN polimerasa a temperaturas más bajas, oligonucleótidos que bloquean la actividad de la ADN polimerasa a temperaturas más bajas, modificaciones químicas reversibles de la ADN polimerasa que se disocian a temperaturas elevadas, modificaciones de aminoácidos de la ADN polimerasa que proporcionan actividad reducida a temperaturas más bajas, proteínas de fusión que incluyen dominios de fijación al ADN hiperestable y topoisomerasa, ligandos dependientes de la temperatura que inhiben la ADN polimerasa, proteínas de fijación monocatenaria que secuestran cebadores a temperaturas más bajas, cebadores modificados o dNTP modificados.

[0075] En algunas formas de realización, las composiciones comprenden una ADN polimerasa termoestable, una sal, un agente antiespumante, dNTP, una combinación de agentes bloqueadores de inhibidor de la PCR, un amortiguador, un componente de inicio en caliente, glicerol, un detergente no iónico y un colorante de referencia pasiva. En otras formas de realización, la composición comprende una ADN polimerasa termoestable, una sal de potasio, una sal de magnesio, un agente antiespumante a base de silicio, dNTP que incluyen una combinación de dNTP/derivado de dNTP, una albúmina, gelatina de pescado, un amortiguador, un componente de inicio en caliente,

glicerol, un detergente no iónico distinto de TWEEN 20, y un colorante de referencia pasiva. Los componentes pueden sustituirse o modificarse según lo determinen las personas del oficio de nivel medio. Debe entenderse que una amplia variedad de componentes adicionales conocidos en la técnica pueden ser útiles en las presentes composiciones, métodos y kits, incluyendo aquellos no descritos específicamente en la presente. Las personas del oficio de nivel medio también entenderán los métodos necesarios para determinar las condiciones o concentraciones particulares para el uso óptimo de cada componente de acuerdo con las presentes enseñanzas.

[0076] En un aspecto, las composiciones pueden proporcionarse como una solución madre concentrada o pueden mezclarse. Como se usa en la presente, el término "madre concentrada" significa una concentración que requiere dilución adicional para lograr una concentración óptima para usar en una solución para realizar una función particular (como la amplificación por PCR). Por ejemplo, las composiciones pueden ser soluciones madre de alrededor de 2X, alrededor de 3X, alrededor de 4X, alrededor de 5X, alrededor de 6X, alrededor de 10X, etc., incluyendo cualquier cantidad entre cualquiera de las anteriores. En algunas formas de realización, las composiciones pueden requerir más de 2X, más de 3X, más de 4X, más de 5X, más de 6X, más de 10X, etc., incluida cualquier cantidad entre cualquiera de las diluciones anteriores, para lograr una concentración de trabajo, u óptima, para usar, por ejemplo, en métodos de síntesis o amplificación de ácidos nucleicos. En algunas formas de realización, las composiciones descritas en la presente también pueden proporcionarse a una concentración de trabajo o como una "solución o mezcla de trabajo". Como se usan en la presente, "concentración de trabajo" o "solución o mezcla de trabajo" se utilizan para referirse a una solución o mezcla que se encuentra en o cerca de la concentración óptima utilizada para realizar una función o reacción particular (como amplificación o PCR). En algunas formas de realización, una composición que está en una concentración de trabajo no necesita dilución o necesita dilución mínima antes de su uso. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una composición que está en una concentración de trabajo está en alrededor de 1X, alrededor de 1,25X, alrededor de 1,5X, alrededor de 1,8X, alrededor de 2X o alrededor de 2,2X de la concentración final en la mezcla de reacción ensamblada.

[0077] En algunas formas de realización, las composiciones de las presentes enseñanzas se pueden formular como mezclas maestras. Las mezclas maestras pueden mejorar la eficiencia y reducir los errores asociados con el ensamblaje de un gran número de reacciones requeridas para el análisis de alto rendimiento. En algunas

formas de realización, las mezclas maestras pueden contener una combinación de reactivos comunes a todas las reacciones. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la mezcla maestra puede contener un amortiguador, una sal, tal como $MgCl_2$, desoxinucleósido trifosfatos (dNTP), una ADN polimerasa termoestable, un detergente, y un agente bloqueador de inhibidor de la PCR. Para su uso en ciertos ensayos, cada reacción contendría entonces una parte alícuota de la mezcla maestra común y una plantilla de ácido nucleico diana específica y al menos un cebador. En algunas formas de realización, las mezclas maestras pueden fabricarse y distribuirse como una solución o mezcla madre concentrada. La mezcla maestra se puede diluir entonces cuando se ensamblan las reacciones finales. En otras formas de realización, la mezcla maestra puede producirse y distribuirse como una solución o mezcla de trabajo.

[0078] En algunos aspectos, la invención también está dirigida a composiciones que son mezclas de reacción. Como se usa en la presente, "mezcla de reacción" se refiere a una mezcla de dos o más sustancias que juntas pueden causar una reacción; o en donde una mezcla de dos o más sustancias puede causar una transformación o cambio químico. En algunas formas de realización, las mezclas de reacción comprenden: (a) al menos una polimerasa; (b) al menos un agente bloqueador de inhibidor de la PCR; (c) al menos un detergente; (d) al menos un agente antiespumante; (e) al menos una sal; (f) un amortiguador; (g) al menos un dNTP y/o derivado de dNTP; (h) al menos un cebador; (i) y una muestra de ácido nucleico. En algunas formas de realización, la mezcla de reacción puede comprender además una sonda etiquetada (por ejemplo, una sonda TaqManTM). En algunas formas de realización, la polimerasa de la mezcla de reacción es una ADN polimerasa termoestable. En algunas formas de realización, la ADN polimerasa termoestable de la mezcla de reacción es una ADN polimerasa Taq. En algunas formas de realización, el agente bloqueador de inhibidor de la PCR de la mezcla de reacción es una proteína. En algunas formas de realización, la proteína bloqueadora de inhibidor de la PCR de la mezcla de reacción se selecciona de albúmina, gelatina o una combinación de albúmina y gelatina. En algunas formas de realización, el detergente de la mezcla de reacción es un detergente no iónico. En algunas formas de realización, el detergente no iónico de la mezcla de reacción es un detergente no iónico distinto de Tween-20. En algunas formas de realización, el agente antiespumante de la mezcla de reacción es un agente a base de silicona. En algunas formas de realización, el agente a base de silicona de la mezcla de reacción se selecciona de XIAMETER[®] AFE-1010, AFE-

1430, AFE-1510, AFE-1520, AFE-2210, Antifoam A, Antifoam B, Antifoam C, Antifoam H- 10, Antifoam SE-15, Antifoam SE-35, Antifoam SO-25, Antifoam Y-30 y Antifoam 289. En algunas otras formas de realización, el agente antiespumante de la mezcla de reacción es un agente que no es a base de silicona. En algunas formas de realización, el agente de la mezcla de reacción que no es a base de silicona se selecciona de sulfonatos orgánicos, poliéteres, fosfatos orgánicos, glicoles acetilénicos, fluorocarbonos, poliaminas de polialqueno, y compuestos de polialquilenimina, que incluyen, entre otros, Antifoam 204 y Antifoam O-30.

[0079] En algunas formas de realización, el dNTP de la mezcla de reacción se selecciona de dGTP, dCTP, dATP y dTTP. En algunas formas de realización, el derivado de dNTP de la mezcla de reacción se selecciona de 7-deaza-dGTP (tal como 7-deaza-2-desoxi-dGTP), 7-deaza-dATP, alfa-tio-dATP, alfa-tio-dTTP, alfa-tio-dGTP y alfa-tio-dCTP. En algunas formas de realización, la mezcla de reacción comprende una mezcla de dNTP/derivado de dNTP que comprende alguna combinación de los dNTP y derivados de dNTP mencionados anteriormente. En algunas formas de realización, la plantilla de ácido nucleico de la mezcla de reacción es ADN. En algunas formas de realización, el ADN en la mezcla de reacción es ADN genómico (gADN) o ADN complementario (cADN).

[0080] En algunas formas de realización, las composiciones descritas en la presente pueden envasarse en un recipiente adecuado capaz de contener la composición y que no interaccionará significativamente con los componentes de la composición. El contenedor puede estar diseñado para permitir un fácil suministro de la forma de dosis mediante individuos o mediante un instrumento de manejo de líquidos. Los contenedores de la composición se pueden empaquetar adicionalmente en unidades de múltiples paquetes. En algunas formas de realización, las unidades de múltiples paquetes pueden contener además recipientes adicionales que comprenden aditivos u otros reactivos que se añaden a la composición antes de usar en una mezcla de reacción, tal como en una PCR.

[0081] En algunas formas de realización, las composiciones descritas en la presente pueden estar en forma líquida, tal como en una solución hidratada. En otras formas de realización, las composiciones descritas en la presente pueden estar en forma de gel. Un "gel" como se usa en la presente es una composición que no es sólida o no está congelada a -20 °C. En aun otras formas de realización, las composiciones descritas en la presente pueden estar en forma deshidratada o seca, tal como en una composición liofilizada.

[0082] En la presente también se describen kits que comprenden las composiciones o recipientes envasados que comprenden las composiciones. En algunas formas de realización, las composiciones se pueden ensamblar en kits para uso en síntesis de ácidos nucleicos o reacciones de amplificación. Los kits pueden comprender además reactivos adicionales utilizados en uno o más ensayos utilizados para sintetizar, detectar o cuantificar ácidos nucleicos. En una forma de realización, la composición puede estar presente en un kit para uso en la amplificación de una molécula de ácido nucleico, tal como en PCR.

[0083] En algunas formas de realización, los kits comprenden un portador, tal como una caja, caja de cartón, tubo o similar, que tiene en confinamiento cercano dentro suyo un recipiente, tal como un vial, tubo, ampolla, placa, botella y similares. Cuando se incluye más de una enzima en un kit (por ejemplo, una ADN polimerasa y una transcriptasa inversa o una ADN polimerasa y UNG), las enzimas pueden estar en un solo recipiente como mezclas de dos o más enzimas (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, etc.), o en recipientes separados. Los kits de la invención también pueden comprender (en el mismo recipiente o en recipientes separados), una solución salina, un agente antiespumante, un amortiguador adecuado, una mezcla de dNTP y/o derivado de dNTP, una sonda y/o un cebador. En algunas formas de realización, la ADN polimerasa, la sal, el agente antiespumante, las mezclas de dNTP y/o derivado de dNTP y el amortiguador se combinan en un solo tubo o recipiente.

[0084] En otro aspecto, los kits pueden comprender composiciones de mezcla maestra para uso en síntesis de ácido nucleico o reacciones de amplificación. Dichas composiciones pueden formularse como material concentrado (por ejemplo, 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, etc.). En algunas formas de realización, las composiciones pueden formularse como material concentrado en un solo tubo o recipiente, que comprende una ADN polimerasa, una sal, un agente antiespumante y dNTP. En algunas formas de realización, tales composiciones madre concentradas pueden comprender además una combinación de agentes bloqueadores de inhibidores de PCR, un detergente no iónico que no sea TWEEN 20, un componente de inicio en caliente y/o un colorante de referencia pasiva en una solución amortiguada. En algunas formas de realización adicionales, tales soluciones de amortiguación pueden comprender glicerol, DMSO y/o una segunda sal.

[0085] En una forma de realización, el kit puede comprender además, sumado a la composición o mezcla maestra, al menos un par de cebadores específicos para la amplificación por PCR de una diana de ácido nucleico, y/o al menos una sonda

específica para la diana de ácido nucleico amplificado. Por ejemplo, la sonda puede ser una sonda TaqMan™, una sonda HydrolEasy™, una sonda de fijación al surco menor (MGB), una sonda de ácido nucleico bloqueado (LNA), una sonda SYBR Green o SYBR GreenER™, o una sonda de tecnología de sonda cíclica (CPT).

[0086] En otra forma de realización, el kit puede comprender además una muestra de ácido nucleico de control, y al menos un par de cebadores específico para la amplificación por PCR de una diana de ácido nucleico en la muestra de ácido nucleico de control, y/o al menos una sonda específica para la diana de ácido nucleico amplificado en la muestra de ácido nucleico de control. También se puede incluir en el kit una sonda para detectar la amplificación.

[0087] Los componentes del kit que no sean la composición pueden proporcionarse en contenedores individuales o en un solo contenedor, según corresponda. En algunas formas de realización, se pueden proporcionar instrucciones, manuales y/o protocolos para usar el kit de forma conveniente. Muchos ensayos son adecuados para usar en la síntesis de ácidos nucleicos diana mediante las composiciones y mezclas de reacción descritas y se contemplan en la presente como entendería la persona del oficio de nivel medio.

[0088] En la presente también se describen métodos para usar las composiciones y los kits descritos. Las composiciones, mezclas de reacción y kits tal como se proporcionan en la presente pueden usarse en una variedad de ensayos que se basan en síntesis de ácidos nucleicos para detectar, cuantificar y/o caracterizar una diana o dianas de ácido nucleico. En algunas formas de realización, tales ensayos comprenden mezclar cualquiera de las composiciones proporcionadas en la presente con una muestra de ácido nucleico y uno o más cebadores y realizar dicho ensayo. En ciertas formas de realización, los métodos implican la amplificación de ácido nucleico, tal como mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR).

[0089] En ciertos aspectos, los métodos proporcionados en la presente también pueden emplear una sonda de hidrólisis para la detección de ácidos nucleicos. Las sondas de hidrólisis aprovechan la actividad exonucleasa 5' de algunas polimerasas. Durante la fase de extensión o elongación de una reacción de PCR, una polimerasa, tal como la polimerasa Taq, utiliza un cebador corriente arriba como un sitio de fijación y luego se extiende. La sonda de hidrólisis se escinde luego durante la extensión de la polimerasa en su extremo 5' por la actividad 5'-exonucleasa de la polimerasa.

[0090] Los términos "corriente arriba" y "corriente abajo" se usan en la presente en relación con la síntesis de la cadena naciente que es cebada por un cebador

específico del objetivo. Así, por ejemplo, una sonda específica de la diana hibridada con respecto a una región del ácido nucleico diana que está "corriente abajo" de la región del ácido nucleico diana con respecto a la cual se hibrida el cebador está ubicada a 3' del cebador y estará en la trayectoria de una polimerasa que extiende el cebador en una dirección de 5' a 3'.

[0091] El ensayo TaqMan® (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 5.210.015, incorporada a la presente por referencia en su totalidad) es un ejemplo de un ensayo que se basa en sonda de hidrólisis. En el ensayo TaqMan®, las sondas de hidrólisis se etiquetan típicamente con un indicador en el extremo 5' y un extintor en el extremo 3'. Cuando el indicador y el extintor están fijos en la misma sonda, se ven forzados a permanecer cerca. Esta cercanía apaga efectivamente la señal del indicador, incluso cuando la sonda se hibrida con respecto a la secuencia objetivo. Las sondas de hidrólisis se escinden durante la extensión de la polimerasa en su extremo 5' por la actividad 5'-exonucleasa de Taq. Cuando esto ocurre, el fluoróforo indicador se libera de la sonda y, posteriormente, ya no está cerca del extintor. Esto produce un aumento perpetuo en la señal del indicador con cada fase de extensión a medida que la reacción de PCR continúa sus ciclos. Para lograr una señal máxima con cada ciclo, las sondas de hidrólisis a menudo se diseñan con una T_m que es alrededor de 10 °C superior a los cebadores en la reacción. Los usos de la reacción de la sonda de hidrólisis en tiempo real también se describen en las patentes estadounidenses 5.538.848, 6.653.473, 7.485.442 y 7.205.105, cuyas divulgaciones se incorporan en la presente por referencia en su totalidad. En algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente implican el uso de un ensayo TaqMan para el análisis y/o detección de ácidos nucleicos. Por ejemplo, las composiciones de la presente divulgación se pueden usar en métodos que implican sondas y/o ensayos TaqMan. Dichos ensayos pueden incluir, entre otros, ensayos de expresión génica (por ejemplo, ensayos de expresión génica TaqMan™), ensayos de variación de número de copias (por ejemplo, ensayos de número de copias TaqMan™), ensayos de genotipificación (por ejemplo, ensayos de genotipificación de metabolismo de fármaco TaqMan™ o ensayos de genotipificación de SNP TaqMan™), ensayos de miARN (por ejemplo, ensayos de MicroARN TaqMan™) o ensayos de cuantificación de ARN (por ejemplo, ensayos de reacción de cadena de polimerasa de transcripción inversa de dos etapas, y ensayos de matriz de baja densidad TaqMan™).

[0092] Como se usa en la presente, el término "recipiente de reacción" se refiere generalmente a cualquier recipiente en el que pueda ocurrir una reacción de acuerdo

con las presentes enseñanzas. En algunas formas de realización, un recipiente de reacción puede ser un microtubo, por ejemplo, entre otros, un tubo de reacción de 0,2 ml o 0,5 ml, tal como un tubo óptico MicroAmp™ (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific) o un tubo de microcentrifuga, u otros recipientes del tipo en la práctica común de los laboratorios de biología molecular. En algunas formas de realización, un recipiente de reacción puede ser una cavidad en una placa de microtitulación (por ejemplo, placa de 96 cavidades, placa de 384 cavidades) tal como una placa de matriz TaqMan™ (Applied Biosystems™; Thermo Fisher Scientific), una mancha sobre un portaobjetos de vidrio, una cavidad en una tarjeta o placa de matriz TaqMan™ de Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific) o un orificio pasante de una placa OpenArray™ de TaqMan™ de Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific). Por ejemplo, una pluralidad de recipientes de reacción puede residir en el mismo soporte. En algunas formas de realización, los dispositivos de tipo laboratorio en un chip, disponibles por ejemplo a través de Caliper y Fluidigm, pueden proporcionar recipientes de reacción. En algunas formas de realización, pueden emplearse diversos enfoques microfluídicos. Se reconocerá que una variedad de recipientes de reacción está disponible en la técnica y se encuentra dentro del alcance de las presentes enseñanzas.

[0093] Los términos "amplicón" y "producto de amplificación" o "producto amplificado" como se usan en la presente se refieren generalmente al producto de una reacción de amplificación. Un amplicón puede ser bicatenario o monocatenario, y puede incluir las cadenas componentes separadas obtenidas al desnaturalizar un producto de amplificación bicatenario. En ciertas formas de realización, el amplicón de un ciclo de amplificación puede servir como una plantilla en un ciclo de amplificación posterior.

[0094] Como se usa en la presente, el término "amplificación" se refiere a cualesquiera medios por los cuales se reproduzca al menos una parte de un polinucleótido diana, un sustituto del polinucleótido diana, o combinaciones de estos, normalmente de una manera dependiente de la plantilla, los cuales incluyen, entre otros, una amplia gama de técnicas para amplificar secuencias de ácido nucleico, ya sea lineal o exponencialmente. Se puede usar cualquiera de varios métodos para amplificar el polinucleótido diana. Se puede utilizar cualesquiera medios in vitro para multiplicar las copias de una secuencia diana de ácido nucleico. Estos incluyen el método de amplificación lineal o logarítmica, o cualquier otro. Los métodos de ejemplo incluyen la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la destrucción parcial de las moléculas cebadoras (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud PCT WO

2006/087574), la reacción en cadena de la ligasa (véase, por ejemplo, Wu, et al. Genomics 4: 560-569 (1990) y Barany, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193 (1991), los sistemas de replicasa de ARN Q β (véase, por ejemplo, WO 1994/016108), sistemas basados en la transcripción de ARN (por ejemplo, TAS, 3SR), la amplificación por círculo rodante (RCA) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.854.033; Lizardi, et al. Nat. Genet. 19: 225-232 (1998); y Banér, et al. Nucleic Acid Res. 26: 5073-5078 (1998)), y la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) (Little, et al. Clin. Chem. 45: 777-784 (1999)), entre otros. Muchos sistemas son adecuados para usar en la amplificación de ácidos nucleicos diana y se contemplan en la presente como entenderían las personas del oficio de nivel medio. En algunas formas de realización de los presentes métodos, la reacción de amplificación de ácido nucleico puede ser realizada mediante PCR. En algunas formas de realización, la PCR puede ser una PCR cuantitativa (qPCR). En ciertas formas de realización, la qPCR se puede realizar mediante una PCR en tiempo real. En otras formas de realización, la PCR puede ser una PCR de punto final. En otras formas de realización, la PCR puede ser una PCR digital. En aun otras formas de realización, la PCR puede comprender ciclos térmicos. En algunas formas de realización, los ciclos térmicos pueden optimizarse para ciclos térmicos rápidos.

[0095] En algunas formas de realización, los métodos para amplificar un ácido nucleico mediante PCR comprenden agregar una composición tal como se proporciona en la presente que comprende una ADN polimerasa termoestable, una sal, un agente antiespumante y dNTP y/o derivados de dNTP a un recipiente de reacción; agregar una muestra de ácido nucleico y un cebador al recipiente de reacción para formar una mezcla de reacción; y realizar la PCR en la muestra de ácido nucleico. En algunas formas de realización, la PCR continúa ocurriendo por hasta 72 horas (por ejemplo, por hasta 4 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 60 horas o 72 horas) después de agregar la composición, la muestra de ácido nucleico y el cebador al recipiente de reacción.

[0096] En algunas formas de realización, los métodos para amplificar un ácido nucleico diana pueden ser amplificaciones por PCR multiplex en las que se amplifican simultáneamente dianas múltiples. El número de dianas amplificadas puede ser de hasta 2 dianas, 5 dianas, 10 dianas, 25 dianas, 50 dianas, 100 dianas, 1000 dianas, 5000 dianas, etc., incluso todos los números intermedios. En algunas formas de realización, una de las dianas multiplexadas es un control positivo interno endógeno o exógeno para la amplificación. En algunas formas de realización, los métodos para

detectar un ácido nucleico diana pueden ser ensayos de PCR multiplex y/o detección en los que se detectan simultáneamente múltiples dianas. En ciertas formas de realización, el número de dianas amplificadas y/o detectadas puede ser de hasta 25 dianas, 10 dianas, 8 dianas, 6 dianas, 5 dianas, 4 dianas, 3 dianas o 2 dianas. En una forma de realización, una de las dianas multiplexadas es un control positivo interno endógeno o exógeno para la amplificación y/o detección. En algunas formas de realización, una multiplicidad de dianas se amplifica y detecta simultáneamente. En algunas formas de realización, una multiplicidad de dianas se amplifica y detecta en el mismo recipiente de reacción. En algunas formas de realización, se pueden combinar diversas opciones de colorante indicador y colorante pasivo de sonda TaqMan™ para la PCR multiplex. Por ejemplo, las sondas TaqMan™ con colorantes indicadores FAM™, VIC™ y ABY™ en combinación con una composición de PCR que contiene colorante de referencia pasiva ROX pueden usarse para un ensayo de amplificación y detección de PCR multiplex de 3-plex. Para otro ejemplo, las sondas TaqMan™ con colorantes indicadores FAM™, VIC™, ABY™ y JUN™ en combinación con una composición de PCR que contiene un colorante de referencia pasiva MUSTANG PURPLE™ pueden usarse para un ensayo de amplificación y detección de PCR multiplex de 4-plex. En algunas formas de realización, la síntesis de ácido nucleico (tal como una reacción de amplificación de ácido nucleico o una PCR) y la detección de ácido nucleico (por ejemplo, de un amplicón) pueden ocurrir simultáneamente. Por consiguiente, en algunas formas de realización, la síntesis de ácido nucleico y la detección de ácido nucleico tienen lugar en el mismo recipiente de reacción.

[0097] En general, los ciclos térmicos de la PCR incluye una etapa de desnaturalización inicial a alta temperatura, seguida de una serie repetitiva de ciclos de temperatura diseñados para permitir la desnaturalización de la plantilla, recocido del cebador y extensión de los cebadores recocidos por la polimerasa. Generalmente, las muestras se calientan inicialmente por alrededor de 2 a 10 minutos a una temperatura de alrededor de 95 °C para desnaturalizar la muestra de ADN bicatenaria. Luego, al comienzo de cada ciclo, las muestras se desnaturalizan por alrededor de 10 a 60 segundos, según las muestras y el tipo de instrumento utilizado. Después de la desnaturalización, se permite el recocido de los cebadores con respecto al ADN objetivo a una temperatura inferior, que normalmente va de alrededor de 40 °C a alrededor de 60 °C por alrededor de 20 a 60 segundos. La extensión de los cebadores por la polimerasa se realiza a menudo a una temperatura que oscila entre alrededor de 60 °C y alrededor de 72 °C. La cantidad de tiempo utilizada para la extensión

dependerá del tamaño del amplicón y del tipo de enzimas utilizado para la amplificación y se determina fácilmente mediante experimentación de rutina. Además, la etapa de recocido se puede combinar con la etapa de extensión, lo que da como resultado un ciclo de dos etapas. Los ciclos térmicos también pueden incluir cambios de temperatura adicionales en los ensayos de PCR. El número de ciclos utilizado en el ensayo depende de muchos factores, los cuales incluyen los cebadores utilizados, la cantidad de ADN de muestra presente y las condiciones de los ciclos térmicos. Una persona del oficio de nivel medio puede determinar fácilmente el número de ciclos a usar en cualquier ensayo mediante experimentación de rutina. Opcionalmente, se puede agregar una etapa final de extensión después de completar los ciclos térmicos para asegurar la síntesis de todos los productos de amplificación.

[0098] En una forma de realización, las condiciones de ciclo térmico de ejemplo para amplificaciones por PCR que usan las composiciones y mezclas de reacción descritas en la presente son las siguientes:

Etapa UNG (opcional): 50 °C, 2 minutos (por ejemplo, para evitar la contaminación por amplicón/arrastre de las PCR anteriores)

Activación: 95 °C, 20 segundos.

Desnaturalización: 95 - 97 °C/1-3 segundos

Extensión: 60 - 62 °C/20 - 30 segundos (x 40 ciclos)

[0099] En una forma de realización, cuando la composición descrita en la presente se usa para la plataforma de matriz de baja densidad TaqMan® (TLDA), se recomienda una activación de 92 °C por 10 minutos.

[00100] La composición y las mezclas de reacción proporcionadas también pueden usarse para reacciones de amplificación en las que se produce un número limitado de ciclos (por ejemplo, entre otros, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 ciclos de amplificación), tales como en las reacciones de preamplificación. En ciertas formas de realización, se realiza una etapa de preamplificación mediante las composiciones y mezclas de reacción proporcionadas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 9.206.475, cuya descripción se incorpora por referencia en su totalidad. En algunas formas de realización, se realiza una preamplificación con un par de cebadores directos e inversos universales. En algunas formas de realización, se realiza la preamplificación por menos de 20 ciclos, por ejemplo, 2-18 ciclos. En algunas formas de realización, la etapa de pre-amplificación se trunca antes de alcanzar una meseta de reacción de amplificación. En algunas formas de realización, los métodos descritos en la presente pueden incluir una etapa de preamplificación que

se realiza antes de la amplificación mediante las composiciones y mezclas de reacción proporcionadas en la presente.

[00101] La PCR con la composición descrita se puede realizar en instrumentos de PCR "estándar", por ejemplo, los sistemas de PCR estándar Applied Biosystems™ 7900HT, 7500 y 7300, o en instrumentos de PCR "rápidos", por ejemplo, los sistemas de PCR en tiempo real rápidos Applied Biosystems™ StepOne, StepOne Plus, 7500 y 7900HT. En algunas formas de realización, la PCR con las composiciones descritas comprende ciclos térmicos que utilizan un instrumento tal como, entre otros, un termociclador GeneAmp® PCR System 9700, 9600, 2700 o 2400, un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems® ViiA™ 7, un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 12K Flex, un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ Dx, un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 6 Flex, un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 7 Flex, un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 3, un sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 5, y similares (todos de Thermo Fisher Scientific). Otros ejemplos de termocicladores espectrofotométricos para uso en los métodos incluyen, entre otros, Bio-Rad ICycler IQ™, Cepheid SmartCycler™ II, Corbett Research Rotor-Gene 3000, Idaho Technologies R.A.P.I.D.™, MJ Research Chromo 4™, Roche Applied Science LightCycler™, Roche Applied Science LightCycler®2.0, Stratagene Mx3000P™ y Stratagene Mx4000™.

[00102] En algunos aspectos, las composiciones, kits y métodos proporcionados en la presente ofrecen una ventaja sobre las composiciones, kits y métodos estándar o tradicionales (tales como otras mezclas maestras o kits disponibles comercialmente) utilizados para la síntesis y/o detección de ácidos nucleicos. En algunas formas de realización, tales ventajas incluyen, entre otras, cualquiera de los siguientes:

- a) se puede usar para amplificar ácidos nucleicos (por ejemplo, mediante qPCR en tiempo real) directamente de muestras no procesadas (por ejemplo, puede amplificar dianas directamente de saliva y sangre)
- b) mejora la precisión de los resultados de la variación de número de copias;
- c) proporciona mayor tolerancia a diversos inhibidores de PCR;
- e) proporciona mayor especificidad y sensibilidad;
- f) se puede utilizar con protocolos de ciclos térmicos rápidos para lecturas más rápidas; y/o
- g) permite la capacidad de multiplexar (por ejemplo, (i) puede amplificar una multiplicidad de dianas mediante una sola muestra; dos o más dianas en una muestra o (ii) puede amplificar múltiples muestras; dos dianas en dos muestras

diferentes) en una sola reacción sustancialmente al mismo tiempo.

[00103] En algunas formas de realización, la precisión de la variación de número de copias en las PCR se mejora en al menos 1 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 % o al menos 25 % al usar las composiciones, kits y métodos proporcionados en la presente en comparación con la variación de número de copias observada en las PCR al usar composiciones, kits y métodos estándar o tradicionales. En algunas formas de realización, la sensibilidad de detección de entrada en las PCR se incrementa en al menos 10 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces o 1000 veces al usar las composiciones, kits y métodos proporcionados en la presente en comparación con la sensibilidad de detección de entrada observada en las PCR al usar composiciones, kits y métodos estándar o tradicionales. En algunas formas de realización, la especificidad y la sensibilidad en las PCR tienen una precisión de al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % para la genotipificación al usar las composiciones, kits y métodos proporcionados en la presente. En algunas formas de realización, cualesquiera de las ventajas (a) a (g), enumeradas anteriormente, son al menos comparables a las observadas al usar las composiciones, kits y métodos estándar o tradicionales para la síntesis y/o detección de ácidos nucleicos.

[00104] Como se usa en la presente, "nucleótido" se refiere a una combinación de base-azúcar-fosfato. Un "nucleósido" se refiere a una combinación de base y azúcar. Los nucleótidos son unidades monoméricas de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN y ARN). El término nucleótido incluye formas mono, di y trifosfato de desoxirribonucleósidos y ribonucleósidos y sus derivados. Los dNTP pueden no estar etiquetados, o pueden estar etiquetados de forma detectable al acoplarlos mediante métodos conocidos en la técnica con radioisótopos (por ejemplo, H³, C¹⁴, P³² o S³⁵), vitaminas (por ejemplo, biotina), porciones fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, Texas Red, o ficoeritrina), etiquetas quimioluminiscentes, dioxigenina y similares. Los dNTP etiquetados pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, a través de Thermo Fisher Scientific o Sigma-Aldrich Company.

[00105] Como se usa en la presente, "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a una molécula producida sintética o biológicamente que comprende una secuencia de nucleótidos ligada covalentemente a la cual puede unirse un enlace fosfodiéster entre la posición 3' de la pentosa de un nucleótido y la posición 5' de la pentosa del nucleótido adyacente. Además, un polinucleótido u oligonucleótido pueden contener residuos de azúcar modificados o no naturales (por ejemplo, arabinosa) y/o residuos de base modificados. Un polinucleótido u oligonucleótido también pueden comprender

grupos bloqueadores que impiden la interacción de la molécula con proteínas, enzimas o sustratos particulares.

[00106] Como se usa en la presente, "ácido nucleico" incluye compuestos que tienen una pluralidad de nucleótidos naturales y/o unidades de nucleótidos no naturales (o "derivadas"). Un "ácido nucleico" puede comprender además unidades de no nucleótidos, por ejemplo, péptidos. Por lo tanto, "ácido nucleico" abarca compuestos tales como ADN, ARN, ácidos nucleicos peptídicos, ácidos nucleicos que contienen fosfotioato, ácidos nucleicos que contienen fosfonato y similares. No hay un límite particular en cuanto al número de unidades en un ácido nucleico, siempre que el ácido nucleico contenga 2 nucleótidos más, o derivados de nucleótidos, o combinaciones de estos, específicamente 5, 10, 15, 25, 50, 100 o más. Los ácidos nucleicos pueden abarcar formas tanto monocatenarias como bicatenarias, e híbridos total o parcialmente en dúplex (por ejemplo, ARN-ADN, ARN-PNA o ADN-PNA).

[00107] Como se usa en la presente, el término "cebador" puede referirse a más de un cebador y se refiere a un oligonucleótido, ya sea que ocurra naturalmente, como en una digestión de restricción purificada, o producido sintéticamente, que es capaz de actuar como un punto de inicio de síntesis a lo largo de una cadena complementaria cuando se coloca en condiciones en las que se cataliza la síntesis de un producto de extensión de cebador que complementa una cadena de ácido nucleico. Dichas condiciones incluyen la presencia de cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósidos diferentes y un agente inductor de polimerización, como la ADN polimerasa o la transcriptasa inversa, en un amortiguador adecuado ("amortiguador" incluye sustituyentes que son cofactores, o que afectan el pH, la fuerza iónica, etc.) y a una temperatura adecuada. El cebador es preferentemente monocatenario para una máxima eficiencia en la amplificación. Un cebador tiene normalmente 11 bases o más; más específicamente, un cebador tiene 17 bases o más, aunque se pueden usar cebadores más cortos o más largos según la necesidad. Como apreciarán las personas del oficio de nivel medio, los oligonucleótidos pueden usarse como uno o más cebadores en diversas reacciones de extensión, síntesis o amplificación.

[00108] El complemento de una secuencia de ácido nucleico como se usa en la presente se refiere a un oligonucleótido o un polinucleótido que, cuando se alinea con la secuencia de ácido nucleico, de manera que el extremo 5' de una secuencia está emparejado con el extremo 3' de la otra, está en "asociación antiparalela". Ciertas bases que no se encuentran comúnmente en los ácidos nucleicos naturales pueden incluirse en los ácidos nucleicos de la presente invención e incluyen, por ejemplo,

inosina y 7-desazaguanina. La complementariedad no necesita ser perfecta; dúplex estables pueden contener pares de bases con errores de apareamiento o bases sin apareamiento. Las personas de nivel medio del oficio de tecnología de ácidos nucleicos pueden determinar empíricamente la estabilidad de dúplex al considerar varias variables que incluyen, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, la composición de la base y la secuencia del oligonucleótido, la fuerza iónica y la incidencia de pares de bases con errores de apareamiento.

[00109] La estabilidad de un dúplex de ácido nucleico se mide por la temperatura de fusión ("Tm"). La Tm de un dúplex de ácido nucleico particular en condiciones específicas es la temperatura a la que se han disociado la mitad de los pares de bases.

[00110] Cuando se hace referencia a una ADN polimerasa termoestable, una unidad de actividad es la cantidad de enzima que incorporará 10 nanomoles de dNTP en material insoluble en ácido (es decir, ADN o ARN) en 30 minutos en condiciones estándar de síntesis de ADN cebadas.

[00111] Como se usa en la presente, los términos "diana", "secuencia diana", "plantilla diana" o "secuencia de ácido nucleico diana" se refieren a una secuencia o región de ácido nucleico de un ácido nucleico que ha amplificarse, detectarse o ambas cosas. Normalmente, en una PCR, la secuencia diana reside entre las dos secuencias de cebador utilizadas para la amplificación.

[00112] El término "o combinaciones de estos/as" como se usa en la presente se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los términos enumerados 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. Aún en este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AAB, BBC, AAABCCCC, CBBAAB, CABABB, etc. La persona del oficio de nivel medio entenderá que normalmente no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que el contexto indique de otra manera lo contrario.

[00113] Las muestras ejemplares de ácidos nucleicos incluyen ADN y/o ARN. En una forma de realización, el ácido nucleico es un ácido nucleico aislado y/o purificado. Un ácido nucleico aislado o purificado está sustancialmente libre de otros componentes, tales como proteínas, polisacáridos u otros componentes celulares, bacterianos o virales. En otra forma de realización, el ácido nucleico no está aislado o purificado. En

algunas formas de realización, la muestra de ácido nucleico está dentro de una muestra biológica. Por ejemplo, el ácido nucleico puede estar presente en una mezcla compleja, tal como un lisado crudo o un extracto de célula completa. En otra forma de realización, el ácido nucleico puede estar in situ y existir dentro de su entorno celular, bacteriano o viral normal.

[00114] El ácido nucleico diana se puede obtener de cualquier fuente y puede comprender cualquier número de componentes constitutivos diferentes. Por ejemplo, la diana puede ser un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN), ARN mensajero (mARN), ARN de transferencia (tARN), ARN interferente pequeño (siARN), microARN (miARN) u otro ARN pequeño maduro, y puede comprender análogos de ácido nucleico u otros miméticos de ácido nucleico. La diana puede ser metilada, no metilada, o ambas cosas. La diana puede ser citosinas tratadas con bisulfito y no metiladas convertidas en uracilo. Además, se apreciará que "ácido nucleico diana" puede referirse al propio ácido nucleico diana, así como a sustitutos de este, por ejemplo, productos de amplificación y secuencias nativas.

[00115] Las muestras de ácido nucleico de las presentes enseñanzas pueden obtenerse a partir de cualquier número de fuentes biológicas, incluso, entre otras, virus, arqueas, protistas, procariotas y eucariotas, por ejemplo, de una muestra biológica obtenida de un organismo eucariótico, con máxima preferencia un mamífero tal como un primate, por ejemplo, un chimpancé o humano; vaca; perro; gato; un roedor, por ejemplo, cobayo, rata, ratón; conejo; o un pájaro reptil; o pez. El ácido nucleico se puede obtener de células, tejidos, órganos u organismos en diferentes etapas de desarrollo. Las muestras de ácido nucleico también pueden obtenerse a partir de células cancerosas y células precancerosas obtenidas de animales, incluso humanos. El ácido nucleico también se puede obtener de líneas de cultivo celular, que incluyen líneas de cultivo celular transformadas y no transformadas. Las muestras de ácido nucleico pueden extraerse de una variedad de fuentes. Estas incluyen, entre otras, por ejemplo, ropa, tierra, papel, superficies metálicas, aire, agua, partes de plantas, así como piel humana y/o animal, cabello, sangre, suero, heces, leche, saliva, orina y/u otros fluidos secretores.

[00116] Se apreciará que las muestras de ácido nucleico y los ácidos nucleicos diana pueden extraerse de muestras biológicas y de otra índole mediante cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, el DNA Extract All Reagents Kit (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific), los sistemas de preparación de muestra MagMax™ (Thermo Fisher Scientific), el kit de preparación de

muestra de FFPE de ARN TargetPrep (Abbott Laboratories), el kit de aislamiento de ácido nucleico total para FFPE RecoverAll™ y el kit de aislamiento de ARN de FFPE PureLink™ (Ambion™, Thermo Fisher Scientific), la estación de preparación de ácido nucleico ABI Prism® 6100 y la estación de trabajo de ácido nucleico automatizada ABI Prism® 6700 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific), y similares.

[00117] La "muestra biológica" incluye secciones de tejidos tales como biopsias y autopsias, y secciones congeladas tomadas con fines histológicos. Dichas muestras incluyen sangre o fracciones o productos de sangre (por ejemplo, suero, plaquetas, glóbulos rojos y similares), linfa, médula ósea, esputo, lavado broncoalveolar, líquido amniótico, cabello, piel, células cultivadas, por ejemplo, cultivos primarios, explantes y células transformadas, heces, orina, etc. Antes de la preparación del ácido nucleico diana, las muestras biológicas pueden ser tejidos nuevos, congelados o conservados con formalina o paraformalina e incrustados en parafina (FFPE).

[00118] Las composiciones de PCR proporcionadas son compatibles con los métodos de extracción de ácido nucleico crudo y pueden tolerar los inhibidores de PCR que se transfieren de la preparación de la muestra. Las composiciones de PCR son compatibles con lisados crudos de células o tejidos tales como los preparados a partir de, por ejemplo, sangre en forma líquida, sangre seca sobre papel, hisopados bucales (por ejemplo, mucosa oral), saliva cruda, orina, suero, folículos pilosos, hoja de planta, y FFPE.

[00119] Como se usa en la presente, el término "muestra cruda" se refiere a un espécimen de origen biológico que se sospecha que contiene ácidos nucleicos, que no se ha sometido a procedimientos para el aislamiento o la purificación de esos ácidos nucleicos. Por ejemplo, una muestra de sangre u orina es una muestra cruda. Además, una muestra de sangre sobre papel que contiene un reactivo de lisis, tal como papel FTA (disponible comercialmente a través de Whatman), también se considera una muestra cruda. Un hisopado bucal de células de la mejilla es otro ejemplo de una muestra cruda. Las muestras crudas incluyen, entre otras, sangre, sangre diluida, sangre sobre papel, hisopados bucales e hisopados bucales en un sustrato para el almacenamiento de muestras, tal como papel FTA. Las células en una muestra cruda pueden lisarse opcionalmente para crear un "lisado crudo". Una persona del oficio de nivel medio reconocerá una enorme variedad de otras muestras crudas o lisados crudos cuyo análisis se facilitaría con las presentes enseñanzas.

[00120] Después de la amplificación o síntesis, los fragmentos de ácido nucleico amplificados o sintetizados pueden aislarse para un uso o caracterización adicionales.

Esta etapa se realiza generalmente mediante la separación de los fragmentos de ácido nucleico amplificados o sintetizados por tamaño o por cualquier medio físico o bioquímico, que incluye la electroforesis en gel, la electroforesis capilar, la cromatografía (que incluye de tamaño, de afinidad y la inmunocromatografía), la inmunoadsorción y la centrifugación con gradiente de densidad. Un método de ejemplo es la separación de fragmentos de ácido nucleico mediante electroforesis en gel, que proporciona un medio rápido y altamente reproducible de separación sensible de una multitud de fragmentos de ácido nucleico, y permite la comparación directa y simultánea de los fragmentos en varias muestras de ácidos nucleicos.

[00121] En una forma de realización, uno o más de los fragmentos de ácido nucleico amplificados o sintetizados se eliminan del gel que se usó para la identificación (ver arriba), de acuerdo con técnicas estándar tales como la extracción química, la electroelución o la escisión física. Los fragmentos de ácido nucleico únicos aislados pueden luego insertarse en vectores estándar, que incluyen vectores de expresión, adecuados para la transfección o transformación de una variedad de células procarióticas (bacterianas) o eucariotas (levaduras, plantas o animales, incluso humanos y otros mamíferos). Alternativamente, los ácidos nucleicos producidos por los métodos pueden caracterizarse aún más, por ejemplo, mediante secuenciación (es decir, determinar la secuencia de nucleótidos de los fragmentos de ácido nucleico), mediante los métodos descritos a continuación y otros que son estándar en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 4.962.022 y 5.498.523, que se dirigen a métodos de secuenciación de ADN). También se pueden emplear métodos de secuenciación clásicos, tales como el método de terminación de cadena de Sanger (Sanger, F., et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 74: 5463-5467 (1977)) y el método de escisión química de Maxam y Gilbert (Maxam, A. M. y Gilbert, W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560-564 (1977)).

[00122] En una forma de realización, los ácidos nucleicos producidos por los métodos pueden caracterizarse adicionalmente mediante secuenciación de próxima generación. Tal como se usa en la presente, el término "secuenciación de próxima generación" o "NGS" generalmente se refiere a tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, que incluyen, entre otras, secuenciación de firma masivamente paralela, secuenciación de alto rendimiento, secuenciación por ligación (por ejemplo, secuenciación SOLiD), secuenciación de semiconductores de ion de protón, secuenciación de nanoesferas de ADN, secuenciación de una sola molécula y secuenciación de nanoporos.

[00123] Las ADN polimerasas adecuadas para la amplificación y/o secuenciación pueden incluir cualquiera de las descritas anteriormente en la presente. En algunas formas de realización, tal polimerasa incluye, entre otros, la ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* (Tth), ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq), ADN polimerasa de *Thermotoga neopolitana* (Tne), ADN polimerasa de *Thermotoga maritima* (Tma), ADN polimerasa de *Thermococcus litoralis* (Tli o VENT™), ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu), ADN polimerasa DEEPVENT™, ADN polimerasa de *Pyrococcus woosii* (Pwo), ADN polimerasa de *Pyrococcus* sp KOD2 (KOD), ADN polimerasa de *Bacillus sterothermophilus* (Bst), ADN polimerasa de *Bacillus caldophilus*, ADN polimerasa de *Sulfolobus acidocaldarius* (Sac), ADN polimerasa de *Thermoplasma acidophilum* (Tac), ADN polimerasa de *Thermus flavus* (Tfl/Tub), ADN polimerasa de *Thermus ruber* (Tru), ADN polimerasa de *Thermus brockianus* (DYNAZYME™), ADN polimerasa de *Metanobacterium thermoautotrophic* (Mt), ADN polimerasa de *Mycobacterium* (Mtb, Mlep), ADN polimerasa de *E. coli* pol I, fragmento de Klenow, ADN polimerasa T5, ADN polimerasa T7 y en líneas generales ADN polimerasas de tipo pol I; mutantes, variantes y derivados de estas, y combinaciones de las anteriores.

[00124] Las polimerasas de ácido nucleico adecuadas pueden ser mesófilas o termófilas, y son preferentemente termófilas y termoestables. Como se usa en la presente, el término "polimerasa de ácido nucleico termoestable" se refiere a una enzima que es relativamente estable al calor cuando se compara, por ejemplo, con polimerasas de nucleótidos de *E. coli* y que cataliza la polimerización de trifosfatos de nucleósido. En general, la enzima iniciará la síntesis en el extremo 3' del cebador recocido a la secuencia diana, y procederá en la dirección 5' a lo largo de la plantilla, y, si posee una actividad nucleasa 5' a 3', hidroliza la sonda recocida que interviene para liberar tanto fragmentos de sonda etiquetados como no etiquetados, hasta que finalice la síntesis. Una enzima termoestable representativa aislada de *Thermus aquaticus* (Taq) se describe en la patente estadounidense N.º 4.889.818 y un método para usarla en la PCR convencional se describe en Saiki et al., 1988, Science 239:487.

[00125] Las ADN polimerasas mesófilas adecuadas incluyen la familia Pol I de ADN polimerasas (y sus respectivos fragmentos Klenow), cualquiera de las cuales puede aislarse de organismos tales como *E. coli*, *H. influenzae*, *D. radiodurans*, *H. pylori*, *C. aurantiacus*, *R. prowazekii*, *T. pallidum*, *Synechocystis* sp., *B. subtilis*, *L. lactis*, *S. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. smegmatis*, bacteriófago L5, phi-C31, T7, T3, T5, SP01, SP02, mitocondrial de *S. cerevisiae* MIP-1, y *C. elegans* y *D.*

melanogaster eucariotas (Astatke, M. et al., 1998, *J Mol. Biol.* 278, 147-165), ADN polimerasa tipo pol III aislada de cualquier fuente, y mutantes, derivados o variantes de estos, y similares.

[00126] En ciertas formas de realización, la polimerasa de ácido nucleico tiene actividad exonucleasa 5'→3'. Como se define en la presente, "actividad nucleasa 5'→3'" o "actividad nucleasa 5" a 3'" se refiere a esa actividad de una polimerasa de ácido nucleico específica de la plantilla que incluye ya sea una actividad exonucleasa 5'→3' tradicionalmente asociada con algunas ADN polimerasas mediante las cuales se eliminan los nucleótidos del extremo 5' de un oligonucleótido de manera secuencial (es decir, la ADN polimerasa I de *E. coli* tiene esta actividad, mientras que el fragmento Klenow no lo tiene), o una actividad endonucleasa 5'→3' en donde se produce la escisión a más de un enlace fosfodiéster (nucleótido) del extremo 5', o ambas. La ADN polimerasa Taq tiene una actividad exonucleasa 5'-3' de reemplazo de cadena dependiente de la síntesis de ADN (véase Gelfand, "Taq DNA Polymerase" en PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich, Ed., Stockton Press, N.Y. (1989), capítulo 2). En algunas formas de realización, los métodos que comprenden la reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) se contemplan en la presente. En tales métodos, las composiciones y mezclas de reacción proporcionadas en la presente pueden comprender además una enzima que tiene actividad de transcriptasa inversa. Las enzimas adecuadas que tienen actividad de transcriptasa inversa pueden ser, por ejemplo, las transcriptasas inversas retrovirales tales como la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV), la transcriptasa inversa del virus del sarcoma de Rous (RSV), la transcriptasa inversa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la transcriptasa inversa de AMV, la transcriptasa inversa de RAV, la transcriptasa inversa de MAV, las transcriptasas inversas de ASLV, así como las transcriptasas inversas de lentivirus, o mutantes, variantes o derivados correspondientes de estas que tienen actividad de transcriptasa inversa. Como se usa en la presente, "mutantes, variantes o derivados" se refiere a todas las permutaciones de una especie química, que pueden existir o producirse, que aún conservan la actividad química definitiva de esa especie química. Algunas enzimas preferidas para uso en la invención incluyen aquellas que son enzimas RNasa H⁺ tales como, por ejemplo, transcriptasas inversas RNasa H⁺ M-MLV o RNasa H⁺ AMV. Alternativamente, las transcriptasas inversas pueden tener una actividad de RNasa H reducida, sustancialmente reducida o eliminada (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N.º 7.078.208, cuya divulgación se incorpora

completamente por referencia en su totalidad). La RNasa H es una ribonucleasa 5' y 3' procesiva que es específica para la cadena de ARN de los híbridos de ARN-ADN (Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, Nueva York: Wiley & Sons (1984)). La actividad de la RNasa H puede determinarse mediante una variedad de ensayos, tales como los descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 5.244.797, en Kotewicz, M. L., et al., Nucl. Acids Res. 16:265 (1988) y en Gerard, G. F., et al., FOCUS 14 (5):91 (1992).

[00127] La transcriptasa inversa puede comprender una mutación en comparación con la transcriptasa inversa natural. Por ejemplo, la transcriptasa inversa se puede modificar para que contenga una mutación que proporcione una mayor estabilidad y/o funcionalidad de la transcriptasa inversa. Las enzimas adecuadas también pueden incluir aquellas en las que la actividad de la desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) se ha reducido, sustancialmente reducido o eliminado. Las transcriptasas inversas que exhiben tales funcionalidades aumentadas o reducidas se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses N.º 7.056.716 y 7.078.208.

[00128] Tal como se presenta en la presente, las composiciones de PCR ensambladas que se proporcionan en la presente son efectivas para reducir los tiempos de ejecución de PCR en comparación con una PCR equivalente con una mezcla maestra disponible comercialmente. Este fue particularmente el caso cuando la muestra de ácido nucleico agregada a la PCR era un lisado crudo y/o la secuencia diana estaba presente en un número bajo de copias. En algunas formas de realización, esta reducción de los tiempos de ejecución de PCR se demuestra por valores de Ct más bajos. En algunas formas de realización, el valor de Ct es al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, o al menos 1000 veces menor al usar las composiciones de PCR ensambladas que se proporcionan en la presente en comparación con una PCR equivalente con una composición o mezcla maestra disponibles comercialmente.

[00129] Como se usan en la presente, los términos "Ct" o "valor de Ct" se refieren al ciclo de umbral y significan el ciclo de un ensayo de amplificación por PCR en el que la señal de un indicador que es indicativa de la generación de amplicón (por ejemplo, fluorescencia) se vuelve detectable por primera vez por encima de un nivel de fondo. En algunas formas de realización, el ciclo de umbral o "Ct" es el número de ciclo en el cual la amplificación por PCR se vuelve exponencial. En una forma de realización, la señal de un indicador, tal como fluorescencia, se describe como delta Rn. Como se usan en la presente, los términos "dRn" o "delta Rn" se refieren a la diferencia en la

señal indicadora normalizada (R_n) que se resta de la señal de fondo (línea de base) que luego se normaliza mediante una señal de referencia pasiva. Delta R_n puede determinarse mediante la fórmula $R_n^+ - R_n^-$, donde R_n^+ es el valor R_n para una reacción que involucra todos los componentes, incluso la plantilla, y R_n^- es el valor para una muestra sin reaccionar.

[00130] De acuerdo con diversas formas de realización, un valor de C_t puede determinarse mediante un derivado de una curva de PCR. Por ejemplo, se puede realizar un método de derivada de primer, segundo o cualquier otro orden en una curva de PCR para determinar un valor de C_t . En diversas formas de realización, una característica de una derivada puede usarse en la determinación de un valor de C_t . Dichas características pueden incluir, entre otras, una inflexión positiva de una segunda derivada, una inflexión negativa de una segunda derivada, un cruce por cero de la segunda derivada o una inflexión positiva de una primera derivada. En diversas formas de realización, un valor de C_t puede determinarse mediante un método de umbral y de línea de base. Por ejemplo, un límite superior de una fase exponencial de una curva de PCR puede establecerse mediante un método de derivada, mientras que una línea de base para una curva de PCR puede determinarse para establecer un límite inferior de una fase exponencial de una curva de PCR. Desde los límites superior e inferior de una curva de PCR, se puede establecer un valor de umbral a partir del cual se determina un valor de C_t . Otros métodos para la determinación de un valor de C_t conocido en la técnica incluyen, por ejemplo, entre otros, varias formas de realización de un método de punto de ajuste, y diversas formas de realización de un método sigmoidal (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses N.º 6.303.305; 6.503.720; 6.783.934, 7.228.237 y la solicitud estadounidense N.º 2004/0096819; cuyas divulgaciones se incorporan en la presente por referencia en su totalidad).

[00131] Como se usa en la presente, los términos "recocido" e "hibridación" se usan indistintamente y significan la interacción complementaria de apareamiento de bases de un ácido nucleico con otro ácido nucleico que da como resultado la formación de un dúplex, un tríplex u otra estructura de orden superior. En algunas formas de realización, la interacción primaria es específica de base, por ejemplo, A/T y G/C, mediante enlaces de hidrógeno de tipo Watson/Crick y Hoogsteen. En algunas formas de realización, el apilamiento de bases y las interacciones hidrófobas también pueden contribuir a la estabilidad de dúplex. Las condiciones para hibridar sondas y cebadores de ácido nucleico a secuencias diana complementarias y sustancialmente complementarias son bien conocidas, por ejemplo, como se describe en Nucleic Acid

Hybridization, A Practical Approach, B. Hames y S. Higgins, eds., IRL Press, Washington, DC (1985) y J. Wetmur y N. Davidson, Mol. Biol. 31:349 et seq. (1968). En general, si tal recocido tiene lugar está influenciado, entre otras cosas, por la longitud de las sondas y las secuencias diana complementarias, el pH, la temperatura, la presencia de cationes mono y divalentes, la proporción de nucleótidos G y C en la región de hibridación, la viscosidad del medio y la presencia de desnaturalizantes. Tales variables influyen en el tiempo requerido para la hibridación. Por lo tanto, las condiciones de recocido preferidas dependerán de la aplicación particular. Sin embargo, la persona del oficio de nivel medio puede determinar tales condiciones sin experimentación indebida. Además, en general, las sondas y los cebadores de las presentes enseñanzas están diseñados para ser complementarios de una secuencia diana, de modo que se produzca la hibridación de la diana y las sondas o cebadores. Se apreciará, sin embargo, que esta complementariedad no necesita ser perfecta; puede haber cualquier número de errores de apareamiento de pares de bases que interfieran con la hibridación entre la secuencia diana y los ácidos nucleicos monocatenarios de las presentes enseñanzas. Sin embargo, si el número de errores de apareamiento de pares de bases es tan grande que no se puede producir hibridación alguna incluso en las condiciones de hibridación menos estrictas, la secuencia no es una secuencia diana complementaria. Así, por "sustancialmente complementario" en la presente se entiende que las sondas o cebadores son suficientemente complementarios de la secuencia diana para la hibridación en las condiciones de reacción seleccionadas.

[00132] El término "etiqueta", como se usa en la presente, se refiere a cualquier átomo o molécula que se pueden usar para proporcionar una señal detectable, y que se pueden unir a un ácido nucleico o proteína. Las etiquetas pueden proporcionar señales detectables por fluorescencia, radioactividad, colorimetría, gravimetría, difracción o absorción de rayos X, magnetismo, actividad enzimática y similares. En algunas formas de realización, la señal detectable es una señal cuantificable.

[00133] Por ejemplo, una etiqueta puede ser cualquier porción que: (i) proporcione una señal detectable; (ii) interactúe con una segunda etiqueta para modificar la señal detectable proporcionada por la primera o la segunda etiqueta; o (iii) confiera una función de captura, por ejemplo, afinidad hidrófoba, anticuerpo/antígeno, formación iónica de complejos. La persona del oficio de nivel medio apreciará que se pueden usar muchas especies diferentes de etiquetas indicadoras en las presentes enseñanzas, ya sea individualmente o en combinación con una o más etiquetas

diferentes. Las etiquetas de ejemplo incluyen, entre otras, fluoróforos, radioisótopos, puntos cuánticos, cromógenos, enzimas, antígenos que incluyen, entre otros, etiquetas de epítipo, metales pesados, colorantes, grupos de fosforescencia, grupos de quimioluminiscencia, porciones de detección electroquímica, etiquetas de afinidad, proteínas de fijación, fósforos, quelatos de tierra rara y colorantes de infrarrojo cercano.

[00134] Las etiquetas detectables adecuadas incluyen, por ejemplo, fluoresceínas (por ejemplo, 5-carboxi-2,7-diclorofluoresceína; 5-carboxifluoresceína (5-FAM); 5-HAT (hidroxi triptamina); 6-HAT; 6-JOE; 6- carboxifluoresceína (6-FAM); FITC); fluores Alexa (por ejemplo, 350, 405, 430, 488, 500, 514, 532, 546, 555, 568, 594, 610, 633, 635, 647, 660, 680, 700, 750); fluoróforos BODIPY[™] (por ejemplo, 492/515, 493/503, 500/510, 505/515, 530/550, 542/563, 558/568, 564/570, 576/589, 581/591, 630/650- X, 650/665-X, 665/676, FL, FL ATP, FI-Ceramida, R6G SE, TMR, conjugado TMR-X, TMR-X, SE, TR, TR ATP, TR-X SE), cumarinas (por ejemplo, 7-amino-4-metilcumarina, AMC, AMCA, AMCA-S, AMCA-X, ABQ, CPM metilcumarina, cumaloidina, hidroxycumarina, CMFDA, metoxicoumarina), calceína, calceína AM, azul de calceína, colorantes de calcio (por ejemplo, calcio carmesí, calcio verde, calcio naranja, calcoflúor blanco), Cascade Blue, Cascade Yellow; colorantes Cy[™] (por ejemplo, 3, 3.18, 3.5, 5, 5.18, 5.5, 7), GFP cian, Fluorosensor AMP cíclico (FiCRhR), proteínas fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde (por ejemplo, GFP. EGFP), proteína azul fluorescente (por ejemplo, BFP, EBFP, EBFP2, Azurita, mKalama1), proteína fluorescente cian (por ejemplo, ECFP, Cerulean, CyPet), proteína amarilla fluorescente (por ejemplo, YFP, Citrine, Venus, YPet), donante FRET pares/aceptor (por ejemplo, fluoresceína/tetrametilrodamina, IAEDANS/fluoresceína, EDANS/DABCYL, fluoresceína/fluoresceína, BODIPY[™] FL/BODIPY[™] FL, fluoresceína/QSY7 y QSY9), LysoTracker[™] y LysoSensor[™] (por ejemplo, LysoTracker[™] azul DND-22, LysoTracker[™] Azul-Blanco DPX, LysoTracker[™] Amarillo HCK-123, LysoTracker[™] Verde DND-26, LysoTracker[™] Rojo DND-99, LysoSensor[™] Azul DND-167, LysoSensor[™] Verde DND-189, LysoSensor[™] Verde DND-153, LysoSensor[™] Amarillo/Azul DND-160, LysoSensor Amarillo/Azul 10,000 MW de dextrano), Oregon Green (por ejemplo, 488, 488-X, 500, 514); rodaminas (por ejemplo, 110, 123, B, B 200, BB, BG, B extra, 5-carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA), 5 GLD, 6-carboxirodamina 6G, Lisamina, Lisamina rodamina B, Falicidina, Faloidina, Red, Rhod -2, 5-ROX (carboxi-X-rodamina), Sulforodamina B puede C, Sulforfodamina G Extra, Tetrametilrodamina (TRITC), WT), Texas Red, Texas Red-X, VIC y otras

etiquetas descritas en, por ejemplo, la publicación estadounidense n.º 2009/0197254), entre otros, como sabrían las personas del oficio de nivel medio. También se pueden usar otras etiquetas detectables (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente estadounidense N.º 2009/0197254), como sabrían las personas del oficio de nivel medio.

[00135] Pares de moléculas indicadoras fluorescentes-moléculas extintoras se han incorporado a las sondas de oligonucleótidos para supervisar los eventos biológicos en función de que la molécula indicadora fluorescente y la molécula extintora están separadas o ubicadas a una distancia mínima de extinción con respecto a la otra. Por ejemplo, se han desarrollado sondas donde la intensidad de la fluorescencia de la molécula indicadora aumenta debido a la separación de la molécula indicadora de la molécula de extinción. También se han desarrollado sondas que pierden su fluorescencia porque la molécula extintora se ubica en proximidad a la molécula informadora. Estas sondas de pares de moléculas indicadoras-extintoras se han utilizado para supervisar los ensayos de hibridación y las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos, especialmente las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), al supervisar ya sea la aparición o desaparición de la señal de fluorescencia generada por la molécula indicadora. (Por ejemplo, véase la patente estadounidense N.º 6.030.787).

[00136] Los pares de indicadores-extintores de ejemplo pueden seleccionarse de colorantes de xanteno, que incluyen fluoresceínas y colorantes de rodamina. Muchas formas adecuadas de estos compuestos están ampliamente disponibles comercialmente con sustituyentes en sus porciones de fenilo que pueden usarse como el sitio para la fijación o como la funcionalidad de fijación para la fijación a un oligonucleótido. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas, que tienen un grupo amino en la posición alfa o beta. Entre dichos compuestos de naftilamino se incluyen 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftalensulfonato y 2-p-touidinil-6-naftalensulfonato. Otros colorantes incluyen 3-fenil-7-isocianatocumarina, acridinas, tales como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina; N-(p-(2-benzoxazolil)fenil)maleimida; benzoxadiazoles, estilbenos, pirenos, y similares.

[00137] Preferentemente, las moléculas indicadoras y extintoras se seleccionan de los colorantes de fluoresceína y rodamina. Estos colorantes y las metodologías de enlace adecuadas para la fijación a oligonucleótidos se describen en muchas referencias, por ejemplo, Marshall, *Histochemical J.*, 7: 299-303 (1975); Menchen et al., patente estadounidense N.º 5.188.934; Menchen et al., solicitud de patente europea

87310256.0; y Bergot et al., solicitud Internacional PCT/US90/05565.

[00138] Los encabezados de sección utilizados en la presente son solo para fines organizativos y no deben interpretarse como limitativos del tema deseado de manera alguna. Toda la bibliografía citada en la divulgación, que incluye, entre otros, patentes, solicitudes de patentes, artículos, libros y tratados, se incorpora expresamente por referencia en su totalidad para cualquier propósito. En el caso de que alguna de las publicaciones incorporadas contradiga algún término definido en esta divulgación, prevalecerá esta divulgación.

[00139] Aunque las presentes enseñanzas se han descrito en términos de estas formas de realización de ejemplo, la persona del oficio de nivel medio entenderá fácilmente que son posibles numerosas variaciones y modificaciones de estas formas de realización ejemplares sin experimentación indebida. Todas estas variaciones y modificaciones están dentro del alcance de las enseñanzas actuales. Los aspectos de las presentes enseñanzas se pueden entender mejor a la luz de los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos del alcance de las enseñanzas de manera alguna.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: composición de ejemplo

[00140] Se formuló una composición de ejemplo como una solución madre concentrada doble que comprende una ADN polimerasa termoestable, una sal de potasio, una sal de magnesio, un agente antiespumante a base de silicio, dNTPS que incluye una combinación de dGTP y 7-deaza-dGTP, BSA, gelatina de pescado, una solución amortiguadora, un componente de inicio en caliente, glicerol, un detergente no iónico distinto de TWEEN 20 y un colorante de referencia pasiva. La composición de PCR de ejemplo se probó en varios ensayos como se describe en los ejemplos a continuación.

Ejemplo 2: sensibilidad superior de la PCR de muestras no purificadas con la composición ejemplar

[00141] El rendimiento de la composición de PCR del Ejemplo 1 en un ensayo de número de copias TaqMan™ se comparó con el rendimiento de una composición disponible comercialmente, TaqMan™ Fast Advanced Master Mix ("MM"; Applied Biosystems™, número de catálogo 4444557) mediante dos muestras diferentes de ácido nucleico. Los ensayos se realizaron de acuerdo con los protocolos del fabricante para el ensayo y MM, pero sustituyendo la composición de ejemplo por MM en un conjunto de ensayos.

[00142] Se preparó una muestra de ácido nucleico cruda a partir de la mucosa oral que se extrajo con un hisopado bucal y un DNA Extract All Reagents Kit según el protocolo del fabricante (Applied Biosystems™, número de catálogo 4402599). Brevemente, se obtuvo una muestra de mucosa oral al frotar un 4N6FLOQSwab en la mejilla de cada lado de la boca de un participante. Se agregó el hisopo a 200 microlitros de reactivo de lisis y se lo incubó a 95 °C durante 3 minutos. Después de que la muestra se enfrió a temperatura ambiente, se agregaron 200 microlitros de reactivo de estabilización a cada muestra de solución de lisis para formar un lisado crudo de mucosa oral.

[00143] Se realizó un ensayo de número de copias de RNasa P de TaqMan™ mediante 2 microlitros del lisado crudo y una cantidad adicional de solución de lisis. Las reacciones se realizaron por duplicado.

[00144] Una sola PCR ensamblada de 20 µl contiene los siguientes componentes:

- 1 µl de ensayo de RNasa P (20X; cebador de PCR directo e inverso y sonda TaqMan™)
- 2 µl de lisado crudo
- 1, 2, 3, 4 o 7 µl de solución de lisis
- 10 µl TaqMan™ Fast Advanced Master Mix o la composición del Ejemplo 1
- Agua libre de RNasa hasta un volumen de PCR total de 20 µl

[00145] La PCR se realizó mediante un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems® ViiA™ 7 con las siguientes condiciones de ciclo térmico:

Etapa de UNG (Opcional): 50 °C, 2 minutos.

Activación: 95 °C, 20 segundos.

(Desnaturalización: 95 °C/1 segundo;

Extensión: 60 °C/20 segundos) x 40 ciclos.

[00146] Los números de ciclo de umbral (Ct) determinados para cada ensayo mediante la composición del Ejemplo 1 o el MM comercial se muestran en las Figuras 1A - 1G. La composición del Ejemplo 1 dio como resultado la amplificación y detección del gen de copia única RNasa P de 2 microlitros de lisado crudo de un hisopado bucal, mientras que no se obtuvo ninguna señal mediante la mezcla maestra de PCR disponible comercialmente. Mediante la composición del Ejemplo 1, la señal de la RNasa P se detectó incluso en presencia de 1, 2, 3 o 4 µl adicionales de solución de lisis. Esta detección de señal de un lisado crudo más una solución de lisis adicional indica que las condiciones de reacción permitirían el uso de lisado de muestra adicional en el ensayo. Por consiguiente, la composición de ejemplo proporcionada en

la presente soporta una amplificación más robusta de una muestra de lisado crudo y es más tolerante a los inhibidores de PCR que se transfieren del extracto crudo que la mezcla maestra disponible comercialmente.

[00147] Se usó una muestra de saliva nueva y cruda como la fuente de ADN para una comparación de la composición ejemplar con una mezcla maestra de PCR disponible comercialmente en un ensayo de número de copias. La muestra de saliva no se trató previamente con un proceso o solución de lisis. Se realizó un ensayo de número de copias de RNasa P TaqMan™ con 1-9 microlitros de saliva cruda. Las reacciones se realizaron por duplicado.

[00148] Una sola PCR ensamblada de 20 µl contiene los siguientes componentes:

1 µl de ensayo de RNasa P (20X; cebador de PCR directo e inverso y sonda TaqMan™)

10 µl TaqMan™ Fast Advanced Master Mix o la composición del Ejemplo 1

1-9 µl de saliva cruda

Agua libre de RNasa hasta un volumen de PCR total de 20 µl

[00149] La PCR se realizó como el sistema de PCR en tiempo real ViiA™ 7 con las condiciones de ciclo térmico como se indicó anteriormente. Los números de ciclo de umbral (Ct) determinados para cada ensayo mediante la composición del Ejemplo 1 o el MM comercial se muestran en las Figuras 2A - 2G para volúmenes variables de saliva cruda. La composición del Ejemplo 1 dio como resultado la amplificación y detección del gen de copia única RNasa P de todas las muestras de saliva analizadas, mientras que solo la muestra de saliva de 1 µl condujo a una señal mediante la mezcla maestra de PCR disponible comercialmente. Cada una de las muestras de 1, 2, 3, 4 y 9 µl de saliva cruda generó una respuesta clara y detectable con la composición de PCR de ejemplo (Figuras 2A - 2G, panel superior, recuadro izquierdo). La mezcla maestra de PCR disponible comercialmente resultó no ser compatible con más de 5 % del volumen de reacción proveniente de la saliva. No se obtuvo ninguna señal de las muestras de 2, 3, 4 o 9 µl de lisado crudo de saliva cruda con la mezcla maestra de PCR disponible comercialmente (Figuras 2A - 2G, panel superior, recuadro derecho). Por consiguiente, la composición de ejemplo proporcionada en la presente soporta una amplificación más robusta de una muestra de saliva cruda y es más tolerante a los inhibidores de PCR que se transfieren de la saliva cruda que la mezcla maestra disponible comercialmente.

Ejemplo 3: genotipificación de la muestra de lisado crudo con la composición de ejemplo

[00150] Se preparó una muestra de ácido nucleico crudo a partir de sangre mediante un DNA Extract All Reagents Kit de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, se incubaron muestras de sangre con la solución de lisis a 95 °C durante 3 minutos, a las que luego se agregó la solución de estabilización para generar lisados crudos de sangre.

[00151] Se realizó un ensayo de genotipificación CYP2C19*.g.-806C> T TaqMan™ (ensayo de genotipificación SNP de Applied Biosystems TaqMan™ con número de identificación C_469857_10) con 2 microlitros de cada uno del lisado crudo de sangre y la composición de PCR de ejemplo del Ejemplo 1. El ensayo de genotipificación se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realizaron cincuenta ciclos de PCR para el ensayo.

[00152] La gráfica de genotipificación que resultó del análisis de los lisados de sangre crudos se muestra en la Figura 3. La sonda TaqMan™ MGB etiquetada con VIC detectó el Alelo 1 (el alelo menor) y la sonda TaqMan™ etiquetada con FAM detectó el Alelo 2. En la gráfica de la Figura 3, las líneas indican la traza de intensidad de la señal en cada ciclo de PCR y los cúmulos muestran las intensidades en el ciclo 40. Estos resultados muestran que la composición de ejemplo proporcionada en la presente puede generar resultados precisos de genotipificación con muestras de ácido nucleico crudo. El ensayo de PCR y genotipificación con la composición de ejemplo tolera los inhibidores de PCR presentes en muestras de ácido nucleico crudo.

Ejemplo 4: comparación de muestras de lisado crudo y de ADN purificado con la
composición ejemplar

[00153] Se realizó una comparación entre muestras de lisado crudo y ADN purificado en la variación de número de copias. El lisado crudo se preparó a partir de sangre mediante el DNA Extract All Reagents Kit de Applied Biosystems™ según el protocolo del fabricante. La muestra de ADN purificada se generó mediante el sistema de preparación de muestras MagMax™ según el protocolo del fabricante (Thermo Fisher Scientific). El ADN purificado se cuantificó y se normalizó a 5 ng/μl.

[00154] Los ensayos de variación de número de copias TaqMan™ se realizaron con lisados crudos y ADN purificado a partir de 18 muestras de sangre. El ensayo de variación de número de copias Hs00010003_cn, 48DGV ID se realizó con la composición de PCR de ejemplo del Ejemplo 1 en una PCR de 10 μl con ya sea 2 μl de lisado crudo o 10 ng de ADN purificado. El número de copias se calculó mediante el método $\Delta\Delta C_t$ con el gen RNasa P como gen de normalización y se utilizó el Software CopyCaller™ v2.1 de Applied Biosystems™ para el cálculo del número de copias. Las

Figuras 4A - 4B representan los resultados; las barras en el lado izquierdo indican los números de copias del lisado crudo y las barras en el lado derecho indican los números de copias de las muestras de ADN purificadas correspondientes. El resultado de la variación de número de copias fue comparativo entre las muestras de lisado bruto y de ADN purificado debido a la alta tolerancia a los inhibidores de la composición de PCR de ejemplo proporcionada en la presente. Por consiguiente, la composición de ejemplo proporcionada en la presente funciona bien en los ensayos de variación de número de copias mediante muestras de lisado crudo. Estos resultados muestran que la composición de ejemplo proporcionada en la presente puede generar resultados precisos de número de copias mediante muestras de ácido nucleico crudo. El ensayo de PCR y número de copias con la composición de ejemplo tolera los inhibidores de PCR presentes en muestras de ácido nucleico crudo.

Ejemplo 5: comparación de concentraciones variables de diferentes agentes antiespumantes

[00155] Fast SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) se compró y usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante en una concentración 1X con componentes adicionales agregados como se describe a continuación. 10pg/μl de cADN de plantilla (hechos con el Universal Human Reference RNA de Agilent y el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit de Applied Biosystem de acuerdo con las instrucciones del fabricante) y 200 nM de los cebadores directos e inversos de la diana del gen 18s se agregaron a la mezcla maestra. Se agregaron concentraciones variables (0 %, 0,01 %, 0,05 % y 0,1 %) de ya sea Antifoam 204 (Sigma) (Figuras 5A - 5D) o Antifoam SE-15 (Sigma) (Figuras 6A - 6D) a la mezcla maestra antes de dividir en partes alícuotas 10 ul reacciones/cavidad en una placa de microtitulación de 384 cavidades (cada una de las cuatro concentraciones diferentes de antiespumante puestas a prueba en réplicas de 96 cavidades). Antes de la amplificación, pero después de la colocación en placas y la centrifugación a 1000 rpm por 60 segundos, se inspeccionó visualmente la formación de burbujas en cada cavidad de reacción. Luego se realizó la amplificación mediante las condiciones de ciclo rápido predeterminadas para el sistema de PCR en tiempo real ViiA 7 (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En las Figuras 5A - 5D y las Figuras 6A - 6D, las curvas horizontales y rojas de los gráficos representan la señal de fluorescencia del colorante de referencia pasiva ROX, mientras que las curvas verdes siguen la fluorescencia del colorante verde SYBR® de la diana de PCR durante el ciclo térmico.

[00156] Como se muestra en las Figuras 5A - 5D, sin la adición de Antifoam 204, la gráfica de arriba a la izquierda muestra que se observaron 87 burbujas antes del ciclo y que esas burbujas desaparecieron en cualquier lugar entre los ciclos 0 - 36 (indicado por el aumento de la fluorescencia de ROX). Con la adición de 0,01 % de Antifoam 204, se contaron 60 burbujas antes de la PCR y aparentemente se eliminaron antes del primer ciclo de la reacción. Con la adición de 0,05 % y 0,1 % de Antifoam 204, no se observaron burbujas después de la centrifugación de la placa y no afectaron la señal pasiva ROX.

[00157] Como se muestra en las Figuras 6A - 6D, sin la adición de Antifoam SE-15, la gráfica de arriba a la izquierda muestra que se observaron 92 burbujas antes del ciclo y que esas burbujas desaparecieron en cualquier lugar entre los ciclos 0 - 40 (indicado por el aumento de la fluorescencia de ROX). Con la adición de 0,01 % de Antifoam SE-15, se contaron 10 burbujas antes de la PCR y aparentemente se eliminaron antes del segundo ciclo de la reacción. Con la adición de 0,05 % y 0,1 % de Antifoam SE-15, no se observaron burbujas después de la centrifugación de la placa y no afectaron la señal pasiva ROX.