

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 204**

51 Int. Cl.:
C12P 19/34

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06817236 .0**
96 Fecha de presentación: **20.10.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1948816**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.07.2008**

54 Título: **Métodos mejorados para BEAMING**

30 Prioridad:
24.10.2005 US 729235 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.05.2012

73 Titular/es:
**THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY
JOHNS HOPKINS TECHNOLOGY TRANSFER 100
N. CHARLES STREET 5TH FLOOR
BALTIMORE, MD 21201, US**

72 Inventor/es:
**VOGELSTEIN, Bert;
DIEHL, Frank;
KINZLER, Kenneth, W. y
LI, Ming**

74 Agente/Representante:
Sugrañes Moliné, Pedro

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 381 204 T3

DESCRIPCIÓN

Métodos mejorados para BEAMING

5 **Campo técnico de la invención**

Esta invención se refiere al área de bioquímica analítica y diagnóstico. En particular, se refiere a detectar diferencias sutiles y raras en moléculas de ácido nucleico.

10 **Antecedentes de la invención**

La probabilidad de curar cánceres, a través de cirugía sola, es alta en aquellos individuos cuyos tumores primarios se detectan en un estadio relativamente temprano. Tal detección temprana es por tanto uno de los enfoques más prometedores para limitar la morbilidad del cáncer en el futuro (1). En la actualidad, puede usarse la prueba de Papanicolaou para detectar cánceres de cuello uterino, la mamografía puede detectar cánceres de mama, los niveles de PSA sérico pueden significar la presencia de cáncer de próstata y la colonoscopia y pruebas de sangre oculta en heces pueden detectar cánceres de colon (2). Sin embargo, problemas de sensibilidad, especificidad, costes o cumplimiento han complicado la puesta en práctica generalizada de estas pruebas (3-5). Además, no están aún disponibles métodos para la detección temprana de la mayoría de otros tipos de cáncer.

El descubrimiento de las bases genéticas de la neoplasia ha conducido a nuevos enfoques para detectar tumores de manera no invasiva (6-8). Muchos de estos enfoques se basan en la detección *ex vivo* de formas mutantes de los oncogenes y genes supresores de tumores que son responsables del inicio y progresión de los tumores. Este enfoque se usó por primera vez para detectar tumores de vejiga y colon a través del examen de orina y deposiciones, respectivamente (9, 10), y se ha usado desde entonces para detectar varios otros tipos de tumores (11-14). Ya que los genes mutantes no sólo son "marcadores" para el cáncer, sino que son las causas directas de crecimiento tumoral (1), tienen ventajas conceptuales importantes con respecto a marcadores convencionales tales como sangre oculta en heces y PSA sérico. En particular, los marcadores convencionales no están implicados patológicamente en el proceso tumorigénico y son mucho menos específicos para la neoplasia que las mutaciones.

La evaluación de muestras de sangre de pacientes para detectar moléculas de ADN mutante es un enfoque particularmente atractivo ya que tales pruebas podrían detectar muchas formas de cánceres diferentes. Adicionalmente, puede obtenerse fácilmente sangre de pacientes durante las visitas ambulatorias de rutina y se conocen bien métodos para preparar y almacenar plasma y suero y son fiables. Por consiguiente, numerosos estudios han intentado identificar formas o cantidades anómalas de ADN en plasma o suero (6, 11-15). Desafortunadamente, los resultados de muchos de estos estudios son contradictorios. Algunos notifican altas tasas de detección de cánceres, otros muy bajas, a pesar del uso de cohortes de pacientes y técnicas similares. Además, varios estudios han mostrado que la pérdida de heterocigosidad puede detectarse de manera rutinaria en ADN circulante, incluso en pacientes con tumores relativamente no agresivos. Para detectar la pérdida de heterocigosidad en tales muestras, las células neoplásicas dentro de un tumor deben contribuir a más del 50% del ADN circulante total.

Los estudios anteriores, aunque prometedores, conducen a varias cuestiones que deben responderse para generar confianza en el uso de ADN anómalo, circulante como biomarcador de tumores malignos. En primer lugar, ¿cuántas copias de un fragmento génico dado están presentes en la circulación en pacientes con cáncer? En segundo lugar, ¿cuál es la naturaleza de este ADN, por ejemplo, intacto frente a degradado? En tercer lugar, ¿qué fracción de estos fragmentos génicos tienen una secuencia de ADN anómala (por ejemplo, mutante)? Y en cuarto lugar, ¿cómo varía esta fracción con el estadio de la enfermedad? Para responder a estas cuestiones, es necesario desarrollar tecnologías que puedan cuantificar simultáneamente el número de moléculas de ADN normales y mutantes en una muestra dada, incluso cuando la fracción de moléculas mutantes es muy pequeña. Tales ensayos sensibles y precisos para la detección y cuantificación de variantes raras entre un gran exceso de secuencias normales tienen aplicaciones importantes en muchas áreas de investigación biomédica. Los ejemplos en la investigación científica básica incluyen el análisis de la fidelidad de replicación en diversos sistemas *in vitro* y la determinación de las tasas de mutación en células tras el tratamiento con mutágenos. Los ejemplos en la medicina clínica incluyen la identificación de mutaciones en la sangre, la orina o las deposiciones de pacientes con cáncer y la identificación de secuencias de ADN fetal en el plasma de mujeres embarazadas.

Dressmen *et al.* dan a conocer un enfoque, denominado BEAMing (perlas, emulsiones, amplificación e imanes), que permite la transformación de una población de fragmentos de ADN en una población de perlas que contienen cada una miles de copias de la secuencia idéntica. Se ha mostrado que la población de perlas generadas de este modo representa de manera precisa la población de ADN inicial. Debido a que pueden generarse 10^6 perlas en un único tubo de ensayo y analizarse mediante citometría de flujo convencional, esta técnica tiene la capacidad de no sólo identificar variaciones genéticas presentes en la población de ADN original, sino también cuantificar de manera precisa su número en comparación con secuencias de tipo natural. Además de su uso para descubrir tales variantes raras, las perlas generadas a través del procedimiento de BEAMing proporcionan moldes excelentes para la secuenciación de nucleótidos, por ejemplo, secuenciación mediante síntesis. Las perlas también pueden usarse

como moldes para ambos métodos de alto rendimiento recientemente descritos para este fin.

Las ventajas de tener tantas copias como sea posible por perla para aplicaciones tanto de citometría de flujo como de secuenciación son claras. Se estima que el número de copias por perla de 1 micrómetro producidas mediante BEAMing es de 10^4 - 10^5 . Hay una necesidad en la técnica de una técnica que pueda aumentar este número en al menos dos órdenes de magnitud. Thomas *et al.* dan a conocer el uso de amplificación por círculo rodante en cascada para amplificar sondas de candado circularizadas mediante un mecanismo que combina la replicación por círculo rodante con la síntesis de desplazamiento de hebra.

El documento US 2005/0227264 da a conocer métodos para amplificar material genético usando una emulsión de agua en aceite en un flujo continuo. La emulsión incluye una pluralidad de gotitas de agua que comprenden microrreactores para amplificar una o más especies de moldes de ácido nucleico. La emulsión se procesa térmicamente haciéndola fluir por zonas de temperatura controlada estacionaria para amplificar los moldes de ácido nucleico mediante PCR.

El documento WO 03/106678 da a conocer un método de realización de una reacción química introduciendo una primera fase discontinua que comprende al menos uno de los reactantes en una segunda fase continua formando una emulsión, sometiendo la emulsión a un cambio físico o químico de manera que la primera fase discontinua coalesce para dar una fase sustancialmente continua y proporcionando condiciones en las que la reacción química puede tener lugar en la primera fase continua recién formada.

Sumario de la invención

Una realización de la invención proporciona un método para amplificar una región de moléculas de ADN de analito. Se amplifica una región de moléculas de ADN de analito usando una ADN polimerasa de alta fidelidad para formar un conjunto de primeros amplicones. Se forman microemulsiones que comprenden dichos primeros amplicones y perlas de reactivo. Las perlas de reactivo están unidas a una pluralidad de moléculas de un cebador para amplificar el conjunto de primeros amplicones. Los primeros amplicones se amplifican en las microemulsiones. Se forman perlas de producto que están unidas a una pluralidad de copias de segundos amplicones. Se rompen las microemulsiones. Se amplifican los segundos amplicones usando amplificación por círculo rodante para formar terceros amplicones.

Esta y otras realizaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras leer la memoria descriptiva que proporciona a la técnica métodos para el análisis, el diagnóstico, y la selección de diferencias en ácidos nucleicos sutiles y raras y las condiciones o agentes que provocan tales diferencias.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Efecto del tamaño de amplicón de PCR sobre la concentración de ADN plasmática y la frecuencia de mutación. (A) Se determinó la concentración de fragmentos de APC totales (tipo natural más mutante) de diversos tamaños usando PCR digital de ADN plasmático de tres pacientes diferentes (pacientes 29, 30 y 32). (B) Se determinó la fracción de fragmentos de APC mutantes mediante secuenciación digital de productos de PCR.

Figura 2. Esquema del ensayo basado en BEAM. (A) Se prepararon perlas extendidas mediante modificaciones del procedimiento BEAMing descrito en Dressman *et al* (16) (B) Se realizaron extensiones de una única base en las perlas extendidas (esferas de oro). Las secuencias de ADN normal contenían una G en la posición investigada, mientras que las secuencias mutantes contenían una A.

Figura 3. Procesamiento de los datos de citometría de flujo obtenidos mediante BEAMing. (A) Gráfico de puntos de las señales de dispersión frontal (FCS) y dispersión lateral (SCC) de las perlas. (B) Histograma de perlas individuales con respecto a la señal de PE. Sólo las perlas que contenían productos de PCR extendidos tenían señales de PE, tal como se representa en la figura 2B. (C) Gráfico de puntos que muestra los perfiles de intensidad de fluorescencia de Cy5 y FITC de perlas positivas para PE. Las perlas se agrupaban en tres poblaciones distintas de color rojo, verde y azul. La secuenciación de perlas individuales clasificadas de cada población mostró que las perlas rojas y verdes contenían secuencias de tipo natural y mutantes homogéneas, respectivamente, mientras que las perlas azules contenían una mezcla de secuencias de tipo natural y mutantes.

Figura 4. Ejemplos de perfiles de citometría de flujo de perlas generadas a partir de ADN plasmático. Se muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia de Cy5 y FITC de perlas positivas para PE a partir de cuatro pacientes. Se indican los pacientes, las mutaciones y la fracción de fragmentos de APC mutantes.

Figura 5. Fracción de fragmentos génicos de APC mutantes en el plasma de pacientes con diversos tumores colorrectales (adenomas (Ad) y carcinomas en estadio de Dukes A, B y D). En cada mutación analizada, se usaron ADN de células linfoides normales o ADN plasmático de donantes sanos como controles ("Normal"). Los "mutantes" observados en ensayos con ADN celular normal representan errores generados durante el proceso de PCR en vez de mutaciones presentes en el ADN de molde (véase el texto). Las líneas rojas representan los valores medios, mínimos y máximos de los controles normales.

Figura 6: Esquema del ensayo "BEAMing Up"

Figura 7: Correlación entre la cantidad total de ADN de molde por PCR en emulsión y la fracción de emulsiones que contienen una única molécula de ADN. Se amplificaron los amplicones *PIK3CA* exón 9, *PIK3CA* exón 20, y *KRAS* exón 2 a partir de ADN de linfocitos normales y se cuantificaron mediante un ensayo Picogreen. Se mezclaron cantidades iguales de los productos de PCR individuales, se diluyeron y se usaron como moldes para la PCR en emulsión. Para distinguir perlas de un único molde de perlas de múltiples moldes, se hibridaron sondas fluorescentes específicas de secuencia con las perlas tras la PCR en emulsión.

Figura 8: Cuantificación de diferentes razones de moldes mediante BEAMing. Se mezclaron amplicones *PIK3CA* con amplicones *KRAS* en una razón de 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000 y se usaron como moldes para la PCR en emulsión. (A) Ejemplos de perfiles de citometría de flujo. Se hibridaron sondas de *KRAS* marcadas con Cy5 y sondas de *PIK3CA* marcadas con FAM con las perlas. (B) Relación entre la razón de moldes de entrada y las proporciones de perlas generadas en la mezcla de *PIK3CA* y *KRAS*. (n=2; pendiente=1,0; R2=0,9999). (C) Relación entre la razón de entrada y las proporciones de perlas generadas en la mezcla de *TP53* y *PIK3CA* (n=2; pendiente=1,0; R2=0,9988).

Figura 9: Amplificación por círculo rodante (ACR) en perlas. (A). Se hibridaron sondas FAM específicas de la secuencia p53 para detectar ADN unido a perlas magnéticas (aumento de 100x) tras diferentes tiempos de incubación. (B) Intensidad fluorescente relativa de sondas FAM hibridadas con las perlas tras ACR.

Figura 10: "BEAMing Up" para la cuantificación de mutaciones en presencia de una cantidad excesiva de ADN de tipo natural. (A) Ejemplo de perfiles de citometría de flujo para la cuantificación de 273 mutaciones del codón *TP53* en una serie de diluciones. (B) Relación entre la razón de mutaciones de entrada y las proporciones de perlas mutantes generadas en *TP53* (n=8; pendiente=1,0; R2=0,9998). (C) Ejemplo de datos de citometría de flujo para la cuantificación de la mutación A3140G de *PIK3CA* en una serie de diluciones. (D) Relación entre la razón de mutaciones de entrada y las proporciones de perlas mutantes generadas en *PIK3CA* (n=8; pendiente=1,0; R2=0,9998). (E) Relación lineal estadística entre la razón de mutaciones de entrada y las proporciones de perlas mutantes generadas en *kras2*. (n=8; pendiente=1,1; R2=0,999).

Figura 11: Cuantificación de las tasas de error de polimerasas comúnmente usadas para PCR. (A). Ejemplo de perfiles de citometría de flujo de *PIK3CA* exón 20 A3140G. (B) Comparación de la tasa de error de diferentes polimerasas por ciclo en *PIK3CA* exón 20 A3140G (n=8-16). (C). Comparación de la tasa de error de diferentes polimerasas por ciclo en *TP53* exón 8 G818A (n=8-16).

Tablas

Tabla 1. Secuencias de cebadores usados para el dimensionamiento de fragmentos

Tabla 2. Secuencias de cebadores usados para BEAMing

Tabla 3. Secuencias de cebadores usados para la extensión de una única base

Tabla 4. Cuantificación de mutaciones del gen APC en plasma.

Tabla 5. Secuencias genómicas mutantes analizadas

Tabla 6. Cebadores usados para el análisis de *TP53*

Tabla 7; Cebadores usados para el análisis de *PIK3CA*

Tabla 8: Cebadores usados para el análisis de *KRAS2*

Descripción detallada de la invención

Los inventores han desarrollado métodos que mejoran la sensibilidad de ensayos para diferencias en ácidos nucleicos raros y sutiles. Los ensayos se denominan ensayos BEAMing, e implican la amplificación de moléculas de ácido nucleico en perlas en microemulsiones. Una mejora implica el uso de una ADN polimerasa de alta fidelidad en una reacción de amplificación preparatoria. Otra mejora implica el uso de una amplificación por círculo rodante para amplificar los ácidos nucleicos unidos a las perlas como resultado de BEAMing. Otra mejora implica el uso de una reacción de extensión de una única base para determinar una característica de secuencia en un producto amplificado de BEAMing que se ha amplificado adicionalmente usando una amplificación por círculo rodante (isotérmica). Estas mejoras que pueden usarse individualmente o en combinaciones proporcionan un aumento de la sensibilidad y/o las razones de señal con respecto a ruido.

ADN polimerasas de alta fidelidad que pueden usarse son aquellas que proporcionan una tasa de fidelidad superior

(tasa de errores inferior) que Taq polimerasa. Preferiblemente, proporcionan una tasa de error de menos de 10^{-5} , más preferiblemente una tasa de error de menos de 5×10^{-6} , e incluso más preferiblemente una tasa de error de menos de 10^{-6} . Las polimerasas adecuadas incluyen: ADN polimerasa Phusion™ (NEB), Taq High Fidelity™ y PfuUltra™. Se usan en una reacción en cadena de la polimerasa con ciclado térmico, tal como es convencional en la técnica.

Se forman microemulsiones con perlas y cebadores tal como se enseñó anteriormente. Debido a que BEAMing requiere ciclado térmico, puede usarse un emulsionante que es termoestable. Un emulsionante de este tipo es Abil® EM90 (Degussa - Goldschmidt Chemical, Hopewell, VA). Pueden usarse otros emulsionantes tal como se conocen en la técnica.

Los amplicones pueden ser de cualquier tamaño que se amplifique eficazmente usando reacción en cadena de la polimerasa. En el caso de moldes obtenidos a partir de suero de pacientes con cáncer, los amplicones son preferiblemente menores de o iguales a 300 pb, o menores de o iguales a 200 pb, o menores de o iguales a 100 pb. Los moldes a partir de suero de pacientes con cáncer de colon se degradan aparentemente en tamaños pequeños. Por tanto, la amplificación de un amplicón más pequeño da como resultado una detección más eficaz y sensible. La dependencia de la detección del tamaño es bastante fuerte tal como se muestra en la figura 1,

La reacción de extensión de una única base con didesoxinucleótidos marcados de manera diferencial proporciona un medio sensible para detectar características de secuencia. Si tras la detección de productos, se encuentran perlas individuales con múltiples, marcadores distintos, por ejemplo, que representan un nucleótido mutante y uno de tipo natural, pueden desecharse del análisis adicional. Marcadores múltiples, distintos en este contexto indica que estaba presente una perla en una microemulsión con dos moldes distintos de ADN de analito, en vez del molde individual deseado, o que se produjo un error de manera temprana en una reacción de amplificación en una microemulsión, de manera que se amplificaron tanto los moldes erróneos como los correctos.

Un medio para detectar una característica de secuencia en un amplicón unido a una perla emplea una reacción de extensión de una única base (SBE). Esta reacción emplea normalmente didesoxinucleótidos trifosfato marcados para garantizar que sólo se produce la adición de un único monómero. Los didesoxinucleótidos trifosfato pueden marcarse convenientemente con cualquier tipo de marcador detectable, incluyendo restos radiactivos, fluorescentes y luminiscentes. Pueden unirse diferentes marcadores a diferentes didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) de modo que pueden detectarse diferentes productos en la misma muestra. Antes de la adición de todos los reactivos necesarios para el inicio de la reacción de SBE, pueden añadirse ddNTP no marcados para bloquear la extensión no específica. Normalmente, se añade al menos un ddNTP no marcado a una concentración de cinco a 40 veces superior a la concentración de los ddNTP marcados. Preferiblemente, la concentración es al menos de diez a veinte veces superior. Por ejemplo, si A es la base mutante y C es la base de tipo natural, durante la SBE, puede usarse Rox-ddATP para el mutante, FITC-ddCTP para el tipo natural, ddGTP y ddTTP para bloquear la extensión no específica a la razón de 1:2-10: 20:20. El ddNTP no marcado reduce la incorporación no específica.

Otra etapa opcional para mejorar la especificidad y/o sensibilidad de la reacción de SBE es desnaturalizar los dúplex de ácido nucleico bicatenario unidos a las perlas antes de la reacción de SBE. Por ejemplo, las dobles hebras pueden calentarse o tratarse con hidróxido de sodio. Tras la separación de las dos hebras, las hebras individuales que no están unidas a las perlas pueden separarse de las perlas y las hebras unidas a las perlas, y las hebras individuales pueden desecharse.

Pueden formarse microemulsiones según cualquier técnica conocida en la técnica. Anteriormente para BEAMing, se usaba una barra de agitación magnética para crear microemulsiones. También pueden usarse otros medios, incluyendo, sin limitación, homogeneizadores de tejidos, ya sean de tipo mecánico o sonicador. Los homogeneizadores mecánicos adecuados incluyen el tipo rotor-estator tal como el tipo paleta. Los homogeneizadores de tejidos parecen formar microemulsiones de tamaño más uniforme que las barras de agitación magnética.

Otra etapa de amplificación usada tras romperse las microemulsiones emplea amplificación isotérmica, también conocida como amplificación por círculo rodante. Con el fin de generar el círculo rodante, puede usarse una sonda de inversión molecular o una sonda de candado. La sonda puede requerir relleno, o no, antes de una reacción de ligación dirigida por el molde para generar un círculo. Si se requiere relleno, la región que va a rellenarse será normalmente de desde 1 hasta 30 nucleótidos. La amplificación isotérmica puede amplificar la señal detectada en última instancia bastante significativamente. Tras la amplificación isotérmica, puede detectarse una característica de secuencia usando reacción de SBE (extensión de una única base), tal como se describió anteriormente. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos del amplicón en las perlas puede determinarse mediante cualquier método de secuenciación conocido en la técnica, incluyendo secuenciación mediante síntesis.

Las muestras que pueden usarse como fuentes de ADN de analito incluyen sangre, plasma, orina, deposiciones, esputos, lágrimas, saliva, y médula ósea. Tejidos sólidos también pueden proporcionar ADN de analito. Pueden obtenerse muestras de pacientes con cáncer, de familiares emparentados, de mujeres embarazadas y de recién nacidos. Las fuentes de ADN de analito pueden tratarse, por ejemplo, con agentes de prueba, y pueden

determinarse los efectos de los agentes de prueba sobre el ADN de analito.

Los datos descritos en los ejemplos demuestran de manera concluyente que pueden encontrarse fragmentos del gen *APC* a partir de las células neoplásicas de tumores colorrectales en la circulación y que el número de tales fragmentos depende del estadio del tumor. Estos resultados tienen implicaciones tanto para la biología del tumor colorrectal como para las pruebas de diagnóstico prácticas, tal como se trata a continuación.

Estudios previos han mostrado que la concentración de ADN total en el plasma de pacientes con cáncer es a menudo elevada (19, 20). Los presentes resultados apoyan esta conclusión sólo en pacientes en estadio avanzado, porque estaban presentes más fragmentos del gen *APC* totales (tipo natural más mutante) en el plasma de pacientes con cánceres de Dukes D que en aquéllos con tumores en estadio más temprano. Los presentes resultados muestran adicionalmente que este ADN "extra" en pacientes en estadio avanzado no se deriva de las propias células neoplásicas, ya que sólo una fracción minoritaria de los fragmentos de *APC* son mutantes mientras que todos los fragmentos de *APC* de las células neoplásicas son mutantes.

Pero hay todavía un gran número de fragmentos de ADN mutante circulando en pacientes con cáncer. Suponiendo que el volumen de distribución de ADN en estado estacionario es similar al de oligonucleótidos en primates (60-70 ml/kg), una fracción del 8% de moléculas mutantes entre 47.800 fragmentos por ml de plasma (como en pacientes con Dukes D) correspondería a $1,6 \times 10^7$ fragmentos mutantes presentes en una persona de 70 kg en cualquier momento dado (24). La semivida de este ADN tumoral se estima en 16 min. basándose en los datos obtenidos a partir del aclaramiento de ADN fetal en plasma materno (25). Esto se traduce en $\sim 6 \times 10^8$ fragmentos mutantes liberados del tumor cada día. Para pacientes con una carga tumoral de 100 g en tamaño ($\sim 3 \times 10^{10}$ células neoplásicas), se estima de ese modo que se alimenta un 3,3% del ADN tumoral a la circulación diariamente. Para un cáncer de Dukes B de 30 g en el que el 1,3% de los 4000 fragmentos de *APC* circulantes por ml de plasma son mutantes, la estimación correspondiente es que se alimenta un 0,15% del ADN tumoral a la circulación cada día.

Por tanto, ¿cuál es la fuente de este ADN mutante y cómo llegan fragmentos del gen *APC* mutantes al plasma? Los presentes datos proporcionan varias claves. La capacidad para llegar a la circulación claramente no estaba relacionada con el tamaño tumoral, ya que los tumores benignos que se estudiaron eran tan grandes como los cánceres (tabla 4), aunque los primeros raramente daban lugar a fragmentos de ADN mutante. De manera similar, el tamaño de los cánceres no era el parámetro crítico, ya que no había correlación significativa entre la carga tumoral (incluyendo depósitos metastásicos) y la cantidad de ADN mutante en la circulación. Por otro lado, el grado de invasión se correlacionaba de hecho con el número de fragmentos de ADN mutante. Las lesiones que no eran invasivas (tumores benignos) no alimentaban comúnmente moléculas de ADN mutante al plasma. Ya que los tumores invadían a través de más capas de la pared intestinal en tumores de Dukes B frente a Dukes A, y a través del intestino hasta sitios distantes en tumores de Dukes D frente a Dukes B, el número de moléculas de ADN mutante circulantes aumentó progresivamente (figura 5).

Otra clave la proporciona el tamaño de las moléculas de ADN mutante. Los datos en la figura 1 muestran que las secuencias mutantes están enriquecidas en fragmentos de ADN pequeños y podrían no identificarse en absoluto en fragmentos de 1296 pb.

Basándose en estas observaciones, se propone que los fragmentos de ADN mutantes encontrados en la circulación se derivan de células neoplásicas necróticas que habían sido absorbidas por macrófagos. A medida que los tumores se agrandan e invaden, es más probable que su suministro de sangre se les quede pequeño. Por tanto, los tumores invasivos contienen generalmente grandes regiones de necrosis, mientras que los tumores benignos raramente las tienen (26-29). Se cree que las células necróticas no liberan ADN al medio extracelular (30). Sin embargo, las células que mueren de necrosis o apoptosis se fagocitan de manera rutinaria por macrófagos u otras células eliminadoras. De manera interesante, se ha mostrado que los macrófagos que absorben células necróticas liberan ADN digerido al medio, mientras que los macrófagos que absorben células apoptóticas no (30). Además, el tamaño del ADN liberado a partir de macrófagos es pequeño (30). Todas estas observaciones son consecuentes con un modelo en el que la hipoxia induce la necrosis de tumores, conduciendo a la fagocitosis de células tumorales y a la posterior liberación del ADN digerido en la circulación. A medida que los tumores se vuelven más agresivos, el grado de esta necrosis aumenta y la cantidad absoluta de ADN mutante circulante se eleva de manera correspondiente. Debido a que la necrosis implica la destrucción no sólo de células neoplásicas, sino también de células estromales e inflamatorias circundantes dentro del tumor, es probable que el ADN liberado de regiones necróticas contenga secuencias de ADN de tipo natural así como secuencias mutantes. Esto puede explicar el aumento en ADN circulante total (no mutante) observado en el plasma de pacientes con cánceres avanzados.

La capacidad para detectar y cuantificar moléculas de ADN mutante en la circulación tiene una importancia clínica obvia, y esta línea de investigación la han seguido varios investigadores. Los presentes resultados proporcionan información al campo de varios modos. En primer lugar, es improbable que el ADN mutante circulante pueda usarse para detectar tumores premalignos, basándose en el hecho de que no se pudo detectar tal ADN incluso en adenomas muy grandes. De manera similar, es improbable que la pérdida de detección de heterocigosidad u otras técnicas que requieren que una mayoría del ADN circulante se derive de células neoplásicas permita tal detección, ya que la proporción de fragmentos de ADN mutante en el plasma era pequeña, promediando sólo el 11% de los

fragmentos de ADN total incluso en cánceres metastásicos, grandes. No se pueden reconciliar fácilmente estas observaciones con datos previos que notifican la presencia de grandes fracciones de ADN mutante en la circulación, incluso a partir de tumores premalignos. Sin embargo, es posible que tumores de órganos distintos del colon, en los que se basaban varios de los informes previos, se comporten de manera diferente con respecto a su contribución al ADN circulante.

Por el lado positivo, los presentes datos muestran que incluso cánceres relativamente tempranos dan lugar a fragmentos de ADN mutante circulantes que pueden detectarse con ensayos suficientemente sensibles y específicos. De hecho, más del 60% de los cánceres que no se habían metastatizado todavía dieron lugar a fragmentos mutantes detectables en el plasma. Incluso tumores de Dukes A, que son por definición apenas invasivos, eran detectables con ensayos basados en BEAMing. Prácticamente todos los tumores de Dukes A y la mayoría de los tumores de Dukes B pueden curarse con cirugía convencional sola, sin la necesidad de terapias adyuvantes (31).

En términos prácticos, los ensayos basados en plasma para detectar fragmentos de ADN mutante son inferiores en varios modos a técnicas más convencionales para la detección de cáncer colorrectal de manera temprana. La colonoscopia es el método de referencia, con tasas de sensibilidad >80% para adenomas y >90% para cánceres (32). En particular, los adenomas detectados mediante colonoscopia pueden eliminarse a menudo a través del colonoscopia, aliviando la necesidad de cirugía. Desafortunadamente, una variedad de problemas limitan la aplicabilidad generalizada de la colonoscopia (o bien convencional o bien virtual) al examen de pacientes asintomáticos (3, 5, 33). Esto ha estimulado el desarrollo de tecnologías no invasivas. Una de las más prometedoras de éstas es el análisis de ADN fecal para detectar mutaciones (34). Debido a la frecuente presencia de moléculas de ADN mutante en heces a partir de tanto adenomas como cánceres tempranos, el análisis del ADN fecal es superior al plasma con respecto a la sensibilidad. Sin embargo, los ensayos basados en plasma tienen ventajas potenciales con respecto a su facilidad de puesta en práctica y cumplimiento.

Para muchos tipos de tumores, no hay actualmente ningún método alternativo para el diagnóstico presintomático, a diferencia del caso de los cánceres colorrectales. En estos otros tipos de tumores, la evaluación del ADN circulante podría ser particularmente útil. Incluso si tales ensayos pudiesen detectar sólo una fracción de pacientes con cánceres tratables, podría evitarse mucha morbilidad.

“BEAMing Up” representa un avance para la detección y cuantificación precisas de variantes genéticas raras en una población de moléculas de ADN. El enfoque proporciona señales robustas y razones de señal con respecto a ruido extremadamente altas. Ya que decenas de millones de moléculas de molde de ADN puede analizarse fácilmente mediante citometría de flujo, su sensibilidad para la detección de mutaciones es muy alta. De hecho, su sensibilidad está limitada actualmente no por ningún problema intrínseco con el propio método, sino simplemente por la tasa de error de las polimerasas actualmente disponibles usadas para PCR.

Como primera aplicación de esta tecnología, se han determinado las tasas de error de cuatro polimerasas que representan tipos representativos de formulaciones de PCR disponibles comercialmente. Una era la polimerasa de *Thermus aquaticus* (*Taq*) convencional, la segunda era *Taq* High Fidelity, una combinación de *Taq* ADN polimerasa más la enzima de corrección de lectura de la especie *Pyrococcus* GB-D que contiene una actividad exonucleasa 3' a 5'), la tercera era PfuUltra, un mutante modificado por ingeniería genética de la ADN polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) combinada con un factor de potenciación de la polimerasa registrado, y la cuarta era Phusion, una proteína de fusión que consiste en un dominio de unión a ADN bicatenario y una polimerasa de de tipo *Pfu*.

Es interesante intentar comparar los presentes resultados de la determinación de errores con los que se usan convencionalmente para este fin. Por ejemplo, el proveedor de *Taq* y *Taq* High Fidelity clonaba productos de PCR producidos por las dos enzimas en vectores de plásmido, luego transforma bacterias con los plásmidos. La frecuencia de mutación se determinaba dividiendo las mutaciones totales entre las células transformadas totales. La tasa de error se determinaba dividiendo la frecuencia de mutación entre el número de aminoácidos que pueden provocar cambios fenotípicos en los dos genes marcadores independientes amplificados (130 y 134 para *rpsL* y *lacZ*, respectivamente). Las tasas de error para *Taq* usando este ensayo eran de $4,2 \times 10^{-5}$ y $1,9 \times 10^{-5}$ epc para *rpsL* y *lacZ*, respectivamente. Estas tasas de error eran similares a las que encontraron los presentes inventores para *Taq* ($2,3\text{--}3,4 \times 10^{-5}$ epc), a pesar de la naturaleza completamente diferente de las secuencias investigadas y los ensayos usados. Obsérvese que las tasas de error determinadas mediante BEAMing son ligeras subestimaciones, ya que se ignoran perlas que han resultado de amplificación de múltiples moldes (figura 8a). La estimación de los presentes inventores para la fidelidad relativa de *Taq* High Fidelity era considerablemente diferente de la notificada por el fabricante, de 1,3 a 1,7 veces más precisa que *Taq* en los ensayos en lugar de 6 veces más precisa.

El fabricante de PfuUltra usaba un sistema de lacl similar al descrito anteriormente, empleando la clonación de productos de PCR y la evaluación fenotípica de colonias. Calcularon una tasa de error de $4,3 \times 10^{-7}$ para PfuUltra y $1,4 \times 10^{-6}$ para Phusion. El fabricante de Phusion usaba el mismo ensayo y encontró una tasa de error de $4,4 \times 10^{-7}$ epc para Pfusion pero de $6,93 \times 10^{-7}$ para PfuUltra. Los presentes inventores encontraron que tanto PfuUltra como Phusion daban como resultado tasas de error similares ($6,0$ y $4,8 \times 10^{-7}$, respectivamente).

Pueden deducirse algunos puntos importantes a partir de estas comparaciones. En primer lugar, las tasas de error determinadas con BEAMing Up son notablemente similares a las determinadas mediante ensayos convencionales a pesar de las enormes diferencias entre las secuencias analizadas y las técnicas usadas para medir mutaciones. En segundo lugar, hay ventajas en ambos enfoques. Los ensayos biológicos con lacZ, lacI o rpsL proporcionan estimaciones promedio de muchos tipos diferentes de mutaciones a lo largo de amplicones relativamente grandes. En cambio, los ensayos basados en BEAMing proporcionan tasas de error en posiciones específicas. Afirmaciones generales sobre tasas de error de polimerasas pueden verse apoyadas de la mejor manera por ensayos biológicos convencionales (o por múltiples ensayos BEAMing que investigan diferentes posiciones del mismo amplicón). Pero en muchas aplicaciones de investigación biomédica, no es la tasa de error generalizada la que determina la fiabilidad de los datos experimentales, sino más bien la tasa de mutación en la posición específica analizada. Esto es cierto, por ejemplo, en ensayos en los que se investigan cambios de metilación o mutaciones específicas en muestras de pacientes con cáncer. Puesto que la ADN polimerasa puede tener un sesgo de espectro mutacional y el ruido de PCR puede acumularse preferentemente en puntos calientes (3, 4, 5), al incluir ADN normal como control negativo en ensayos BEAMing, el límite de sensibilidad del ensayo particular se determina de manera fiable de un modo que sería imposible con enfoques convencionales.

Finalmente, queda claro que la técnica descrita en el presente documento es considerablemente más sencilla y requiere menos tiempo que las usadas históricamente para determinaciones de la tasa de error. BEAMing Up elimina la necesidad de clonación, transformación bacteriana, selección de colonias y confirmación de mutaciones mediante secuenciación de colonias. También elimina la necesidad de suposiciones sobre el número de residuos que pueden mutarse para dar como resultado un fenotipo específico y de ese modo proporciona una medida más directa de la frecuencia de mutación. Debe demostrar ser útil para muchos tipos de experimentos en los que la fidelidad de procesos relacionados con la replicación o transcripción es importante. Debe facilitar la identificación de mutaciones raras en muestras clínicas. Y debido a la mucha mayor cantidad de ADN por perla, la técnica podría ser útil para aumentar la longitud o precisión de lectura de estudios de secuenciación de alto rendimiento usando perlas unidas a ADN como moldes.

La descripción anterior describe generalmente la presente invención. Puede obtenerse una comprensión más completa en referencia a los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en el presente documento para fines de ilustración sólo, y no pretenden limitar el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Materiales y métodos para los ejemplos 2-5

Recogida de muestras, extracción de ADN y secuenciación.

PCR en tiempo real

Se diseñaron cebadores para generar amplicones de ~100 pb que incluían uno o más sitios de mutación. Se añadió una etiqueta universal (5'-tcccgcgaaattaatacgcac-3') al extremo 5' de, o bien el cebador directo o bien el inverso para generar cada amplicón. Esta etiqueta universal era idéntica a la unida a las perlas usadas para BEAMing. Las secuencias de estos cebadores se enumeran en la tabla 2, que se publica como información de apoyo en el sitio web de PNAS. Se realizó la PCR en reacciones de 50 µl que contenían 10 µl de tampón HF de Phusion™ 5 X, 0,2 mM de cada ddNTP, 1 µM de cada cebador, una dilución 1/50.000 de SYBR® green I (Invitrogen), 1,5 U de ADN polimerasa Phusion™ (NEB, Beverly, MA) y 15 µl de ADN plasmático purificado (equivalente a 100 µl de plasma) o ADN genómico purificado a partir de células mononucleares normales de la sangre de voluntarios sanos. Se llevaron a cabo las amplificaciones con un sistema de detección de PCR iCycler (BioRad, Hercules, CA). Las condiciones de ciclado de PCR para todos los amplicones fueron las siguientes: 98°C durante 1 min.; 3 ciclos de 98°C durante 10 s, 70°C durante 10 s, 72°C durante 10 s; 3 ciclos de 98°C durante 10 s, 67°C durante 10 s, 72°C durante 10 s; 3 ciclos de 98°C durante 10 s, 64°C durante 10 s, 72°C durante 10 s; 30 ciclos de 98°C durante 10 s, 61°C durante 10 s, 72°C durante 10 s. Se realizó cada reacción por duplicado y se generó una curva de calibración en cada placa de 96 pocillos usando diversas cantidades de ADN genómico humano normal. Se determinó la concentración de productos de PCR usando un ensayo de cuantificación de ADNbc PicoGreen™ (Invitrogen).

BEAMing

Se sintetizó un oligonucleótido común (5'-tcccgcgaaattaatacgcac-3') con un grupo biotina doble en el extremo 5' y con un ligador de seis carbonos (C6) entre la biotina y los otros nucleótidos (IDT, Coralville, IA). Se acopló este oligonucleótido a perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (MyOne™, Dynal, Oslo, Noruega) según el protocolo publicado previamente (16). Se prepararon las emulsiones de agua en aceite mediante modificaciones del método descrito por Ghadessy y Holliger (17) usando un protocolo de homogeneización originalmente descrito por Bemath *et al.* (18). Para cada PCR en emulsión, se añadió una alícuota de 240 µl de una mezcla de PCR acuosa a 960 µl de Abil® EM90 al 7% (p/v) (Degussa - Goldschmidt Chemical, Hopewell, VA) en aceite mineral (M3516; Sigma). La fase acuosa contenía Tris-HCl 67 mM pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 16,6 mM, MgCl₂ 6,7 mM, 2-mercaptoetanol

10 mM, 0,2 mM de cada dNTP, cebador directo 0,05 μ M (5'-tccgcgcgaattaatacgac-3') y cebador inverso 8 μ M, 0,2 U/ μ l de Taq polimerasa Platinum® (Invitrogen), 3 X 10⁵/ μ l de perlas acopladas a oligonucleótidos y 0,1 pg/ μ l de ADN de molde. Los cebadores inversos se enumeran en la tabla 2, que se publica como información de apoyo en el sitio web de PNAS. Se agitó con vórtex la mezcla de agua-aceite durante 10 s, entonces se emulsionó durante 50 s usando un homogeneizador Ultra-Turrax® (T25 basic; IKA, Wilmington, NC) con un dispositivo OmniTip™ desechable (Omni International Inc., Marietta, GA) a la velocidad mínima. Se alicuotaron las emulsiones en ocho pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos y se ciclaron en las siguientes condiciones: 94°C durante 2 min.; 50 ciclos de 94°C durante 10 s, 58°C durante 15 s, y 70°C durante 15 s. Tras la PCR, se reunieron las emulsiones en un tubo de 15 ml y se demulsionaron a través de la adición de 10 ml de tampón NX (NaCl 100 mM, Triton X-100 al 1%, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, SDS al 1%). Tras agitar con vórtex durante 10 s, se sedimentaron las perlas mediante centrifugación durante 5 min. a 4.100 g. Se eliminó la fase superior y se resuspendieron las perlas en 800 μ l de tampón NX y se transfirieron a un tubo de 1,5 ml. Se recogieron las perlas usando un imán (MPC-S, Dynal) y se lavaron con 800 μ l de tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM). Se convirtió el ADN bicatenario en las perlas en ADN monocatenario mediante incubación en 800 μ l de NaOH 0,1 M durante 2 min. a temperatura ambiente. Se lavaron las perlas dos veces con 800 μ l de tampón de lavado usando el imán y finalmente se resuspendieron en 200 μ l de tampón de lavado. Se realizaron extensión de una única base y citometría de flujo tal como se describe en la información de apoyo publicada en el sitio web de PNAS.

Recogida de muestras y extracción de ADN

Se recogieron muestras de tejido, muestras de sangre coincidentes y datos clínicos por Indivumed a partir de pacientes quirúrgicos del Hospital Israelita y la Clínica Alten Eichen (ambos en Hamburgo, Alemania) siguiendo criterios de SOP estrictamente controlados. La junta de Ética de la Asociación de Médicos de Hamburgo, Alemania dio la aprobación de la IRB y se recogieron datos y muestras de los pacientes tras obtener el consentimiento informado y por escrito. Las muestras usadas en el estudio actual se eligieron aleatoriamente de los que contribuyeron a través de este protocolo. Poco antes de la cirugía, se tomaron 18 ml de sangre con EDTA a partir de un catéter central, se enfrió hasta 8°C inmediatamente, y se transportó al laboratorio en el plazo de 30 minutos para la preparación de plasma. Se sedimentaron las células sanguíneas durante 15 min. a 200 g en un tubo Leucosep® (Greiner, Frickenhausen, Alemania) lleno con 15 ml de disolución Ficoll-Paque. Tras la centrifugación del sobrenadante (es decir, plasma) se transfirió a tubos de 1,5 ml, se congeló inmediatamente, y se almacenó a -80°C. Se descongelaron las muestras de plasma a temperatura ambiente durante 5 min. y se sedimentó cualquier residuo restante a 16.000 g durante 5 min. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se digirió con 500 μ g/ml de proteinasa K (Invitrogen, Carlsbad, CA) en Tris-HCl 2,5 mM, EDTA 0,25 mM pH 7,5 y SDS al 1% durante la noche. Se extrajo el ADN dos veces con fenol-cloroformo (VWR, n.º de cat. IB05174) y se precipitó con dos volúmenes de etanol en presencia de acetato de amonio 3,3 M y seeDNA™ al 3,3% (v/v) (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se disolvió el ADN a partir de 1 ml de plasma en 150 μ l de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5. Se purificó el ADN tumoral con el kit de tejido DNeasy (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante.

PCR digital y secuenciación del ADN

Se usó PCR digital seguida por secuenciación directa de productos de PCR generados a partir de moléculas de moldes individuales para determinar el estado de mutación de APC de los tumores de colon primarios y para analizar fragmentos de ADN plasmático de diferentes tamaños.

Se diluyó ADN tumoral en placas de PCR de 96 pocillos de modo que una o dos moléculas de moldes estaban contenidas dentro de cada reacción de 10 μ l. Para obtener una amplificación robusta y uniforme, se realizaron reacciones de PCR anidadas. La primera amplificación comprendía una región de 1296 pb de la región de agrupación de mutaciones de APC (F1 5'-ACGTCATGTGGATCAGCCTATTG-3'; R1 5'-GGTAATTTTGAAGCAGTCTGGGC-3'). La segunda amplificación se dividió en dos reacciones de PCR separadas (A y B), incluyendo cada una la mitad de esta región (cebadores para A: F2 A 5'-TCTGGACAAAGCAGTAAAACCG-3'; R2 A 5'-CTTGGTGGCATGTTTGTG-3'; cebadores para B: F2 B 5'-GCTCAGACACCCAAAAGTCC-3'; R2 B 5'-ACGTGATGACTTTGTTGGCATGGC-3'). La mezcla de PCR contenía tampón de PCR 1 X, 1 μ M de cada oligonucleótido, 1 mM de cada dNTP, DMSO al 6%, y 0,05 U/ μ l de Taq polimerasa Platinum® (Invitrogen). Se usó el siguiente perfil de temperaturas para la amplificación: 94°C durante 2 min.; 3 ciclos de 94°C durante 30 s, 67°C durante 30 s, 70°C durante 1 min.; 3 ciclos de 94°C durante 30 s, 64°C durante 30 s, 70°C durante 1 min.; 3 ciclos de 94°C durante 30 s, 61°C durante 30 s, 70°C durante 1 min.; 50 ciclos de 94°C durante 30 s, 61°C durante 30 s, 70°C durante 1 min. Se añadió un μ l de la primera amplificación a cada una de las segundas reacciones de PCR de 10 μ l. La segunda PCR empleó las siguientes condiciones de ciclado: 2 min. a 94°C; 15 ciclos de 94°C durante 30 s, 58°C durante 30 s, 70°C durante 1 min. Se purificaron los productos de PCR usando el sistema de purificación de PCR AMPure® (Agencourt, Beverly MA) y se realizaron reacciones de secuenciación con BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se resolvieron las reacciones de secuenciación en un secuenciador de ADN capilar 384 automatizado (Spectrumedix, State College, PA). Se realizó el análisis de datos usando el paquete Mutation Explorer® (SoftGenetics, State College, PA). De 12 adenomas relativamente grandes (> 1 cm), se encontró que 11 contenían mutaciones de APC dentro de la región analizada. De 34 pacientes con carcinomas de Dukes A o B, se encontró que 16 contenían mutaciones del gen APC, y de 10 pacientes con carcinomas de Dukes D, se

encontró que 6 contenían mutaciones del gen *APC*. Se obtuvo plasma de estos 33 pacientes para el análisis de ADN circulante, tal como se describe en Resultados.

Para el análisis del espectro de tamaño del ADN plasmático en tres pacientes con cánceres avanzados, se realizó PCR digital como anteriormente para ADN tumoral excepto porque se usaron cebadores que producían amplicones de diferentes tamaños (se enumeran las secuencias de cebadores en la tabla 1, que se publica como información de apoyo en el sitio web de PNAS). Los componentes de la reacción y las condiciones de ciclado de temperatura para la primera y segunda PCR eran los mismos que se describieron anteriormente excepto porque el tiempo de extensión se redujo a la mitad para fragmentos menores de 500 pb. Se usó electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR de cada pocillo para contar el número total de moldes de *APC* contenidos en diversas diluciones de ADN plasmático. Se usaron estos mismos productos de PCR en reacciones de secuenciación para determinar el número de moldes que contenían secuencias de *APC* mutantes, tal como se describió anteriormente.

Extensión de una única base (SBE)

Se realizaron reacciones de extensión de una única base en 80 µl de tampón SBE 1 X (Tris-HCl 150 mM pH 9,5, MgCl₂ 67 mM) que contenía 3 X 10⁶ perlas magnéticas a partir de la PCR en emulsión, ddATP marcado con FITC 2,5 µM (Perkin-Elmer, Wellesley, MA), ddGTP marcado con Cy5 3,5 µM (GE Healthcare), 25 µM de ddCTP y ddUTP no marcado (USB, Cleveland, Ohio), cebador biotinilado 0,3 µM, 20 U/µl de ThermoSequenase™ (GE Healthcare). Los cebadores usados para la SBE se enumeran en la tabla 3, que se publica como información de apoyo en el sitio web de PNAS. Se usó esta composición cuando la secuencia de tipo natural en la posición investigada era G y la secuencia mutante era A; se realizaron sustituciones apropiadas para los ddNTP indicados cuando se investigaban otras bases. También se indica que la estreptavidina presente en las perlas MyOne™ se desnaturaliza durante la PCR en emulsión y no se une a biotina después de eso, de modo que el cebador usado para SBE sólo se une a productos de PCR extendidos mediante hibridación y no a las propias perlas. Se llevaron a cabo las reacciones a 94°C durante 2 min., 65°C durante 1 min. y 70°C durante 2 min. Tras la reacción de extensión, se recuperaron las perlas mediante separación magnética, se lavaron una vez con 200 µl de tampón de lavado más BSA al 0,1%, y se resuspendieron entonces en 180 µl de tampón de unión (Tris-HCl 5 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM, NaCl 1 M). Se mezclaron las perlas con 20 µl de ficoeritrina conjugada con estreptavidina 10 µg/ml (PE, Invitrogen) para marcar el cebador conjugado con biotina y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Se recuperaron las perlas con el imán y se lavaron dos veces con 200 µl de tampón de lavado, entonces se resuspendieron en 400 µl de tampón de lavado.

Citometría de flujo

Se analizaron las perlas con un citómetro de flujo LSR II o se clasificaron con un aparato FACSaria™ (ambos de BD Biosciences, San José, CA). Se fijó normalmente la velocidad de flujo a 5000 acontecimientos por segundo y se recogió un mínimo de 2 X 10⁶ acontecimientos para cada población de perlas. Se sincronizaron estos acontecimientos para excluir dobletes y otros agregados. Para los cálculos de la frecuencia de mutación, sólo se consideraron perlas individuales con una señal de PE al menos 10 veces por encima de la señal de fondo media. En casos seleccionados, se recuperaron perlas mediante clasificación de flujo y se usaron perlas individuales en reacciones de secuenciación. Se logró esto diluyendo en primer lugar las perlas clasificadas en placas de PCR de 96 pocillos de modo que uno de cada dos pocillos (en promedio) contenía una perla. Entonces se convirtió el ADN monocatenario unido a cada perla en ADN bicatenario mediante una ADN polimerasa y se liberó mediante una digestión con enzimas de restricción que sólo escindían la secuencia de cebador universal en las perlas. Se realizó la reacción de la ADN polimerasa en un volumen de 2 µl bajo una capa de aceite mineral y contenía tampón de PCR 1 X, 1 µM del oligonucleótido inverso usado para BEAMing, 1 mM de cada dNTP y 0,05 U/µl de Taq polimerasa Platinum®. Se usó el siguiente perfil de temperatura para la polimerización con Taq: 95°C durante 2 min., 58°C durante 15 s y 70°C durante 1 min. Se añadieron tres µl de una mezcla que contenía 0,5 µl de tampón 3 10 X (NEB), y 0,04 µl de Ase I 10 U/µl (NEB) a la reacción de la polimerasa y se incubó a 37°C durante 30 min. Entonces se usó la reacción de 5 µl completa como molde para una reacción de PCR de 25 µl. Los componentes de la reacción eran los mismos que para la polimerización con Taq excepto porque se incluyeron los dos cebadores usados para la PCR en emulsión (tabla 2, que se publica como información de apoyo en el sitio web de PNAS). Se purificaron los productos de PCR con AMPure® y se secuenciaron, tal como se describió anteriormente (PCR digital y secuenciación del ADN).

EJEMPLO 2

Se degrada ADN mutante circulante.

Se usó PCR en tiempo real o PCR digital para determinar el número de genes *APC* circulantes totales en 33 pacientes con tumores colorrectales y diez donantes de edad coincidente sin tumor. El número de copias del gen *APC* era significativamente superior en pacientes en estadio avanzado (Dukes D) que en pacientes con cánceres en estadio temprano (p < 0,0001, prueba de la t de Student), consecuente con estudios previos (19, 20). En pacientes en estadio avanzado, la mediana del número de fragmentos del gen *APC* por ml de plasma era de 47.800 mientras

que la mediana del número era de 3.500 y 4.000 para pacientes con cánceres de Dukes A y Dukes B, respectivamente (tabla 4). No había diferencia significativa entre el número de copias circulantes en pacientes con cáncer en estadio temprano (Dukes A o B), pacientes con adenomas (4300 fragmentos de *APC*/ml de plasma) e individuos normales (3460 fragmentos de *APC*/ml de plasma; intervalo de 1150 a 8280 fragmentos/ml). También parecía haber pocas diferencias entre el número de fragmentos de *APC* determinado mediante estos ensayos cuando la posición de los amplicones dentro de *APC* variaba (datos no mostrados).

Para determinar el tamaño de fragmentos génicos mutantes en ADN circulante, se analizó ADN plasmático de tres pacientes con cánceres colorrectales avanzados (Dukes D, metastásicos en hígado) que se mostró que contenían mutaciones del gen *APC* en sus tumores. Variando el tamaño de los amplicones generados mediante PCR, era posible determinar el número de fragmentos génicos normales y mutantes presentes en plasma secuenciando productos de PCR derivados de una o unas cuantas moléculas de moldes (PCR digital, tal como se describe en Materiales y métodos). El tamaño de los amplicones variaba desde 100 hasta 1296 pb y abarcaba la mutación presente en cada paciente. El número de fragmentos de *APC* totales (tipo natural más mutante) aumentó en de 5 a 20 veces a medida que el tamaño de los amplicones disminuía desde 1296 hasta 100 pb (figura 1A). La fracción de moléculas mutantes era sorprendentemente dependiente del tamaño del amplicón, aumentando en más de 100 veces a lo largo del intervalo de tamaño sometido a prueba (figura 1B). Por ejemplo, aunque podían identificarse fragmentos de *APC* de >1296 pb en el plasma de los tres pacientes, no se encontraron secuencias de *APC* mutantes en ~1000 fragmentos de este tamaño. Con amplicones muy pequeños (~100 pb), se encontró que al menos el 8% de los fragmentos del gen *APC* plasmáticos eran mutantes en los tres pacientes.

Se concluye que los fragmentos de ADN mutante presentes en la circulación de pacientes con cáncer se degradan en comparación con el ADN circulante derivado de células no neoplásicas. Esta conclusión es consecuente con estudios previos de otros tipos de tumores (21, 22) y tiene importantes implicaciones para la detección de tales moléculas mutantes. En particular, pueden usarse amplicones pequeños para enriquecer secuencias de ADN derivadas de células cancerosas.

EJEMPLO 3 (ejemplo de referencia)

Desarrollo de un ensayo cuantitativo para la detección de mutaciones raras

Los resultados descritos anteriormente se obtuvieron secuenciando cientos de productos de PCR derivados cada uno de una o unas cuantas moléculas de moldes de ADN. En estudios preliminares, se encontró que tales técnicas basadas en PCR digital eran suficientemente sensibles para detectar moléculas de ADN mutante circulantes en pacientes con cánceres avanzados, pero no en pacientes con cánceres en estadio temprano. Para aumentar la sensibilidad y fiabilidad de estos ensayos, se desarrolló una extensión de BEAMing que permitía examinar muchas más moléculas de molde de un modo conveniente. El enfoque consiste en cuatro etapas: (i) se usó PCR en tiempo real para determinar el número de fragmentos del gen *APC* en la muestra de plasma (figura 2A, etapa 1); (ii) se usó BEAMing para convertir el ADN plasmático amplificado en una población de perlas (figura 2A etapa 2 - 4); (iii) se determinó el estado mutacional de las perlas extendidas mediante extensión de una única base (figura 2B); y (iv) se usó citometría de flujo para medir simultáneamente las señales de FITC, Cy5 y PE de perlas individuales.

La figura 3 muestra un resultado de citometría de flujo representativo en el que la interpretación de los perfiles se confirmó experimentalmente. En el ejemplo mostrado, se analizó un total de 342.573 perlas mediante citometría de flujo. Se usó la población de perlas individuales (295.645) para el análisis de fluorescencia (figura 3A). De éstas, 30.236 presentaban una señal de PE (figura 3B), lo que indica que se habían extendido durante la PCR en emulsión. Las señales de FITC y Cy5 reflejaban el número de perlas que contenían secuencias mutantes o de tipo natural, respectivamente. Las perlas que contenían secuencias de ADN de tipo natural (30.186) tenían una señal de Cy5 alta pero una señal de FITC de fondo ("perlas rojas" en la figura 3C). Las perlas extendidas sólo con secuencias de ADN mutantes (22) tenían señales de FITC altas pero señales de Cy5 de fondo ("perlas verdes"). Veintiocho tenían tanto señales de FITC como de Cy5 ("perlas azules"). Tales perlas doblemente marcadas resultaban de o bien la presencia de un molde tanto mutante como de tipo natural en la gotita que contenía la perla o bien un error en los ciclos tempranos de la PCR en emulsión (véase a continuación). Estas perlas doblemente marcadas se eliminaron del análisis, y sólo se consideraron perlas marcadas de manera homogénea para la enumeración de mutaciones. Obsérvese que esta estrategia de análisis conservativa da como resultado una ligera subestimación de la fracción de mutaciones, ya que excluye mutantes que estaban presentes en las gotitas que también contenían uno o más fragmentos de tipo natural. Se recogieron las perlas en cada una de estas tres poblaciones mediante clasificación por flujo y se usaron perlas individuales de la clasificación como moldes en la secuenciación de ADN convencional. Todas las 131 perlas sometidas a análisis de secuenciación mostraron los patrones esperados, ilustrándose ejemplos en la figura 3C.

EJEMPLO 4

Límites a la sensibilidad de los ensayos para mutaciones de ADN plasmático

Los resultados descritos anteriormente muestran que el enfoque de BEAMing, en principio, puede detectar una fracción muy pequeña de fragmentos que contienen secuencias mutantes dentro de un conjunto mucho mayor de fragmentos que contienen secuencias de tipo natural. Debido a que se usan >50 millones de perlas en una única PCR en emulsión y la citometría de flujo puede realizarse a velocidades de >50.000 perlas por s, la capacidad para enumerar tales mutaciones no está limitada por las propias perlas. En su lugar, otras dos características limitan la sensibilidad. En primer lugar, hay un número finito de fragmentos de ADN presentes en muestras clínicas. Tal como se indicó anteriormente, este número oscilaba entre 1.350 y 230.000 fragmentos por ml en los pacientes con tumores (tabla 4) y entre 1150 y 8280 fragmentos/ml en pacientes control. Esto proporciona un límite superior a la sensibilidad de los ensayos. Por ejemplo, un cálculo usando la distribución de Poisson muestra que si se analizaban 4000 fragmentos, la frecuencia de mutación tendría que ser superior a 1 en 1333 fragmentos (es decir, 3 dividido entre el número total de fragmentos analizados) para que el ensayo logre una sensibilidad del 95%. Una segunda característica limitante son las tasas de error de las polimerasas usadas para la PCR. En el presente enfoque, se emplean dos etapas de PCR: la primera es una PCR convencional que emplea fragmentos de ADN plasmático como moldes y la segunda es una PCR en emulsión de aceite en agua que usa los productos de la PCR iniciales como moldes. En la PCR en emulsión, los errores que se producen durante las rondas tempranas de PCR pueden dar como resultado perlas heterogéneas que contienen secuencias tanto de tipo natural como mutantes. Se eliminan fácilmente de la consideración, tal como se describe en la figura 3C. Sin embargo, los errores introducidos en la primera PCR no pueden eliminarse, ya que dan lugar a perlas con secuencias mutantes heterogéneas, indistinguibles de las que resultan de mutaciones genuinas en los moldes de ADN plasmático originales.

La fracción de moléculas mutantes presentes tras la primera PCR iguala el producto de la tasa de mutación de la polimerasa y el número de ciclos llevados a cabo. BEAMing proporciona un modo cuantitativo para determinar la tasa de error de cualquier polimerasa usada en PCR, sin requerir clonación en vectores bacterianos (Li *et al.*, datos sin publicar). De 19 cambios de bases diferentes evaluados en ADN normal, las tasas de error con la polimerasa usada en el presente estudio promediaban $3,0 \times 10^{-7}$ mutaciones/pb/ciclo de PCR y oscilaban entre $1,7 \times 10^{-7}$ y $6,5 \times 10^{-7}$ mutaciones/pb/ciclo de PCR, dependiendo del sitio de mutación evaluado. Como resultado, sólo se puntuaron muestras de plasma como positivas para mutaciones si su frecuencia en la muestra era significativamente superior a la tasa de error máxima de la polimerasa encontrada experimentalmente (es decir, $1,95 \times 10^{-5}$ tras 30 ciclos). Como resultado de la tasa de error relativamente baja con la polimerasa usada, era el número de moléculas presentes en la muestra de plasma original, más que la tasa de error de la polimerasa *per se*, la que limitaba la sensibilidad.

Estas cuestiones sugieren que la sensibilidad de los ensayos para ADN mutante circulante podría aumentarse en el futuro mediante (i) el desarrollo de polimerasas nuevas o modificadas con tasas de error reducidas y (ii) el uso de más plasma por ensayo (es decir, más moléculas de moldes).

EJEMPLO 5

Cuantificación de fragmentos de APC mutante en plasma de pacientes con tumores colorrectales

Basándose en los principios derivados de los experimentos descritos anteriormente, se determinó si podían detectarse fragmentos de ADN tumoral en pacientes con tumores colorrectales de diversos tipos. Se seleccionaron mutaciones del gen APC para esta evaluación, ya que >85% de los tumores colorrectales contienen mutaciones de este gen, independientemente del estadio del tumor (23). Se evaluaron mutaciones en la región de agrupación de mutaciones mediante secuenciación del ADN purificado a partir de los tumores de 56 pacientes. Se observaron mutaciones en 33 de estos pacientes (59%) y, tal como se esperaba, la proporción de tumores con estas mutaciones no difería significativamente entre tumores de diversos estadios (véase Materiales y métodos).

Entonces se diseñó un ensayo BEAMing para cada una de las mutaciones identificadas en los 33 tumores y se aplicó al ADN purificado a partir del plasma de los correspondientes pacientes (tabla 4). En cada caso, se usó ADN de linfocitos normales o plasma de pacientes sin cáncer como controles negativos. Se usó ADN de los tumores de los 33 pacientes como controles positivos. Se encontró que los seis pacientes con lesiones avanzadas (Dukes D, definido como tener al menos una lesión metastásica distante) contenían fragmentos de ADN mutante en su plasma. Entre 16 pacientes que albergaban cánceres con un pronóstico favorable (Dukes A o B, definido como no tener implicación de ganglios linfáticos ni metástasis distantes), se encontró que diez (63%) contenían fragmentos de ADN mutante en su plasma. En cambio, entre 11 pacientes con tumores benignos, grandes (adenomas), se encontró que sólo el plasma de 1 paciente contenía fragmentos de ADN mutante. Se muestran resultados de citometría de flujo representativos en la figura 4 y se resumen en la tabla 4.

La fracción de moléculas mutantes encontradas en el plasma de los 17 casos con mutaciones detectables también variaba según el estadio del tumor ($p < 0,0001$, prueba exacta de Fisher). En los casos avanzados (Dukes D), un promedio del 11,1% (intervalo del 1,9% al 27%) de los fragmentos del gen APC totales eran mutantes. En pacientes sin metástasis (Dukes B), un promedio del 0,9% (intervalo del 0,03% al 1,75%) de los fragmentos del gen APC

plasmáticos eran mutantes. En pacientes con tumores en estadio inferior (Dukes A), la fracción era incluso inferior, promediando el 0,04% (intervalo del 0,01% al 0,12%). Y en un paciente con un tumor benigno, sólo el 0,02% de los fragmentos de ADN plasmático eran mutantes. La mediana de la fracción de perlas positivas encontradas en las muestras de ADN control de pacientes sin cáncer era del 0,0009% (intervalo del 0,003% al 0,0005%).

La tabla 4 también enumera la concentración de fragmentos de APC totales (tipo natural más mutante) en estos plasmas de pacientes. No había una relación directa entre la concentración de fragmentos de APC totales y la carga mutacional. Aunque pacientes con cánceres avanzados tendían a tener concentraciones superiores de fragmentos de APC totales que los otros pacientes, este aumento no se debía a ADN de células neoplásicas. Además, no se encontró correlación entre la carga tumoral (volumen de tumor primario más sitios metastásicos) y o bien la concentración de fragmentos de APC o bien el porcentaje de fragmentos de APC mutantes en la circulación.

EJEMPLO 6

Resumen

El enfoque descrito en el presente documento supone cuatro etapas principales (figura 5).

Etapla 1. Amplificación por PCR de muestras de ADN.

Etapla 2. BEAMing. Se forman emulsiones de aceite en agua (w/o) en las que se amplifican moléculas de ADN individuales dentro de cada compartimento acuoso y se unen a perlas.

Etapla 3. Relleno de huecos. Se hibridó una sonda de candado (6) o circularizable (7, 8) con las secuencias en las perlas. Se rellenó un hueco de 0-30 pb con una polimerasa y se ligaron los extremos.

Etapla 4. Amplificación por círculo rodante. Se amplifican adicionalmente las secuencias que van a investigarse en las perlas a través de amplificación por círculo rodante.

Etapla 5. Extensión de una única base. Se usan terminadores de didesoxinucleótidos marcados de manera fluorescente para distinguir perlas que contienen secuencias que divergen en posiciones de interés.

Etapla 6. Citometría de flujo. Se analiza la población de perlas para determinar las proporciones que contiene cada secuencia de interés.

Materiales y métodos para los ejemplos 6-9:

Amplificación de ADN genómico humano

Se usó la ADN polimerasa Phusion™ (NEB) para la amplificación inicial de ADN genómico a menos que se indique lo contrario en el texto. Se diseñaron cebadores para generar amplicones de 100 pb. Se añadió una etiqueta universal (5'-tccgcgaaattaatacgac-3'), cuya secuencia era idéntica a la recubierta sobre las perlas usadas para BEAMing, al extremo 5' del cebador directo o inverso. Se realizó la PCR en reacciones de 50 µl que contenían 10 µl de tampón HF Phusion™ 5 X, 0,2 mM de cada dNTP, 1 µM de cada cebador, 1,5 U de ADN polimerasa Phusion™ (NEB) y 15 µl de ADN de línea celular purificado. Las condiciones de ciclado de PCR fueron las siguientes: 98°C durante 1 min.; 3 ciclos de 98°C durante 10 s, 70°C durante 10 s, 72°C durante 10 s; 3 ciclos de 98°C durante 10 s, 67°C durante 10 s, 72°C durante 10 s; 3 ciclos de 98°C durante 10 s, 64°C durante 10 s, 72°C durante 10 s; 30 ciclos de 98°C durante 10 s, 61°C durante 10 s, 72°C durante 10 s. Se cuantificó la cantidad de producto de PCR usando un kit de cuantificación de ADNbc PicoGreen™ (Invitrogen).

BEAMing

Se acopló un oligonucleótido marcado en su extremo 5' con un grupo biotina doble a perlas magnéticas de 1 micrómetro recubiertas con estreptavidina (DynaL MyOne™) tal como se describe en Dressman *et al.* Se preparó una mezcla de PCR de 240 µl y se añadió a 960 µl de Abil® EM90 al 7% (p/v) (Degussa AG) en aceite mineral (Sigma). La mezcla de PCR contenía Tris-HCl 67 mM pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 16,6 mM, MgCl₂ 6,7 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, 0,2 mM de cada ddNTP, 0,05 µM de cebador directo idéntico en secuencia a la etiqueta universal descrita anteriormente, cebador inverso 8 µM, 0,2 U/µl de Taq polimerasa Platinum® (Invitrogen), 10 X 108 perlas acopladas a oligonucleótidos y ~ 20 pg de ADN de molde. Se agitó con vórtex la mezcla de agua-aceite durante 10 s a velocidad máxima (Vortex Genie 2) y luego se emulsionó durante 50 s usando un homogeneizador Ultra-Turrax (T25) con un dispositivo OmniTip desechable (Omni International, Inc.) a la velocidad mínima. Se transfirieron las emulsiones a una placa de PCR de 96 pocillos, usando 100 µl/pocillo. Las condiciones de ciclado de PCR fueron 94°C durante 2 min.; 50 ciclos de 94°C durante 10 s, 58°C durante 15 s, y 70°C durante 15 s. Tras la PCR, se rompió la emulsión en 10 ml de tampón NX-SDS (NaCl 100 mM, Triton X-100 al 1%, Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, SDS al 1%) mediante centrifugación durante 5 min. a 4.500 g. Entonces se incubaron las perlas con NaOH 0,1 M

durante 2 min. para eliminar la hebra no biotinilada del producto de PCR, se recogieron con un imán, y se resuspendieron en tampón de PCR 1x.

Amplificación por círculo rodante en las perlas

Se hibridó una sonda de candado (100 nM) con $\sim 10^7$ perlas en 2xSSC, formamida al 20% y ADN de esperma de salmón sonicado 0,5 ug/ul a 37°C durante 15 minutos. Se ligó la sonda en ADN ligasa de T4 10 U/μl (NEB), Tris-acetato 10 mM pH 7,5, MgAc2 10 mM, NaCl 250 mM, ATP 1 mM y BSA 0,2 ug/ul a 37°C durante 15 min. Entonces se resuspendieron las perlas en 100 ul de mezcla de tampón de ADN polimerasa φ29 1x (NEB), BSA 0,1 ug/ul y dNTP 0,3 mM que contenía ADN polimerasa Phi29 1 U/ul (NEB) y se incubaron a 37°C desde 5 min. hasta 6 h.

Relleno de huecos y amplificación por círculo rodante en las perlas

Se hibridó una sonda circularizable (150 nM) con $\sim 10^7$ perlas en tampón de reacción Ampligase 1x Ampligase (Epicentre) a 55°C durante 15 min. Entonces, se añadieron dNTP 50 uM (USB), ADN de fragmento Stoffel 0,05 U/ul (Applied Biosystems) y Ampligase 1U/ul y se realizó la extensión más el ligamiento a 55°C durante 30 min. Entonces se resuspendieron las perlas en 100 ul de mezcla de tampón de reacción de ADN polimerasa φ29 1x (NEB), BSA 0,1 ug/ul y dNTP 0,3 mM que contenía ADN polimerasa Phi29 1 U/ul (NEB) y se incubaron a 37°C durante 1 h a menos que se indique lo contrario en el texto.

Detección de ADN amplificado en perlas

Para detectar la presencia de secuencias amplificadas en perlas, se hibridó un oligonucleótido marcado con fluoresceína complementario a las secuencias amplificadas durante la ACR con las perlas en tampón de SBE (Tris-HCl 150 mM pH 9,5, MgCl2 67 mM, formamida al 5%) a 50°C durante 15 minutos.

Para detectar mutaciones genéticas específicas en el ADN amplificado unido a las perlas, se realizaron extensiones de una única base (SBE) en 150 ul de tampón de SBE que contenía 10^7 perlas, un cebador de SBE marcado con Cy5 250 nM, ddNTP marcado con FITC 5 μM (Perkin-Elmer), ddNTP marcado con Rox 0,25 μM (Perkin-Elmer), 10 uM de cada ddNTP sin marcar (USB), y 0,4 U/μl de ThermoSequenase™ (GE Healthcare) a 50°C durante 15 min. Entonces se resuspendieron las perlas en 200 ul de Tris 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, pH 7,5.

Citometría de flujo

Se analizaron las perlas con un citómetro de flujo LSR II y se analizaron los datos con el software FACSDiva™ (BD Biosciences). Se fijó normalmente la velocidad de flujo a 5000-10.000 acontecimientos por segundo. Se sincronizaron los acontecimientos para excluir dobletes y agregados. Para los cálculos de la frecuencia de mutación, sólo se consideraron perlas individuales que presentaban hibridación con el cebador de SBE.

EJEMPLO 7

BEAMing

Como parte del proceso de optimización requerido para el éxito de los experimentos descritos a continuación, se identificaron condiciones que producían gotitas acuosas relativamente uniformes dentro de la emulsión de agua en aceite usada para BEAMing. Usando compartimentos de 3 micrómetros en promedio, se determinó la relación entre la concentración de moldes de ADN y la fracción de perlas que se produjeron a partir de moldes individuales. Cuando había dos o más moldes de ADN dentro de una gotita acuosa, se produjeron perlas que contenían más de una secuencia de ADN homogénea. Con muestras de ADN diluidas, se esperaba que muy pocas perlas contuviesen algún molde de ADN, y por tanto la mayoría de las perlas serían “negativas”, es decir, no se extenderían. Tal como se muestra en la figura 7, concentraciones de ADN crecientes dieron como resultado fracciones progresivamente mayores de perlas de múltiples moldes, tal como se esperaba. La fracción de perlas de moldes individuales era máxima a ~ 30 pg de molde por PCR en emulsión. A esta concentración, el 12% de las perlas eran de molde individual, el 9% eran de doble molde, y el 79% restante de las perlas eran negativas. En experimentos posteriores, se usaron por tanto de 20 a 40 pg de ADN de molde por reacción.

Otro modo de evaluar la calidad de las perlas producidas mediante BEAMing y su naturaleza de molde individual era a través de experimentos de mezclado. Para este fin, se mezclaron moldes que contenían moldes de KRAS2 y PIK3CA a diversas razones y se midió la proporción de perlas que contenían extensiones o bien de KRAS22 o bien de PIK3CA mediante citometría de flujo tras BEAMing. Si moldes individuales eran suficientes para generar productos de extensión de PCR robustos en perlas, entonces debía haber una relación lineal entre la razón de moléculas de entrada y la razón de perlas que contenían uno o el otro tipo de molde. A la inversa, si se requería más de una molécula de molde para la extensión en perlas, o si una gran fracción de compartimentos acuosos contenía más de una molécula de molde, entonces esta razón se desviaría. Por ejemplo, cuando la proporción de moléculas de moldes de PIK3CA era baja, habría muy pocas perlas que contuviesen un producto de extensión de PIK3CA que

no contuviesen también un producto de extensión de KRAS2. Tal como se muestra en la figura 8a y 8b, los resultados de este experimento de mezclado demuestran claramente una relación lineal entre la razón de moldes de entrada y las proporciones de perlas generadas, incluso a razones tan bajas como 1:1000 ($R^2=0,999$, pendiente=1,0). Se encontró una relación lineal similar cuando se realizó un experimento independiente usando una mezcla de moldes de p53 y KRAS2 (figura 8C, $R^2=0,998$, pendiente=1,0).

EJEMPLO 8

Amplificación por círculo rodante en perlas producidas mediante BEAMing

Para aumentar la cantidad de ADN extendido en las perlas, se investigó una variedad de enfoques para la amplificación por círculo rodante usando productos de PCR extendidos en perlas como moldes. El más satisfactorio de estos procedimientos se muestra esquemáticamente en la figura 6 detallada en la sección de Métodos. Una sonda de candado o circularizable, con extremos complementarios a dos secuencias no adyacentes en las perlas, se apareó en primer lugar con el ADN unido a las perlas. Entonces se rellenó la secuencia intermedia de 0-30 pb con una polimerasa y se ligaron los extremos. Debido a que el extremo 3' del producto de PCR unido a las perlas estaba próximo al oligo candado (9), el extremo 3' pudo usarse como cebador en una amplificación por círculo rodante con la polimerasa $\phi 29$. La amplificación por círculo rodante continuó linealmente durante al menos 6 horas, y el ADN unido a las perlas pudo visualizarse fácilmente en un microscopio de fluorescencia tras la hibridación con la sonda FAM específica de secuencia (figura 9a). Si se eliminaba cualquiera de las etapas enzimáticas mostradas en la figura 9a, no se observaban señales aumentadas en las perlas (datos no mostrados).

Además de la señal aumentada por perla mostrada en la figura 9a, la razón de señal con respecto a ruido obtenida tras el análisis de las perlas también aumentó. Para evaluar la SNR, se usó un oligonucleótido marcado con fluoresceína complementario a la hebra de producto de PCR original unida a las perlas. Tras la hibridación con las perlas originales producidas mediante BEAMing, la intensidad de señal promedio era 25 veces superior a la observada en perlas que se habían producido mediante BEAMing con un molde no relacionado, produciendo una SNR de 25:1. Tras la ACR, la SNR aumentó hasta más de 9000 veces (figura 9b). Basándose en las señales relativas obtenidas, se estimó que la longitud de las hebras de ADN unidas a las perlas había aumentado desde 100 bases hasta 40.000 bases mediante ACR. El motivo por el que la SNR aumenta es porque la señal de fluorescencia de fondo tras la hibridación con perlas sin un producto de PCR complementario se debe a autofluorescencia más unión no específica de la sonda a las perlas. Esta señal de fluorescencia de fondo no aumenta mucho mediante ACR, mientras que la hibridación específica aumenta drásticamente.

Para garantizar que el procedimiento de amplificación descrito en la figura 9 (en lo sucesivo denominado BEAMing Up) copiaba fielmente las secuencias presentes en las perlas originales, se realizó PCR en emulsión usando moldes que representan mezclas de secuencias de p53 de ADN mutante y de tipo natural. Las mutaciones se ubicaban en una región del producto de PCR que se rellenó mediante la polimerasa tras el apareamiento con la sonda circularizable (figura 6). Se muestran datos de citometría de flujo a partir de estos experimentos en la figura 10a y se representan gráficamente en la figura 10b. A partir de estos datos, queda claro que la fracción de perlas que contienen secuencias de p53 mutantes era proporcional a la fracción de moléculas de moldes de p53 mutantes usadas para BEAMing. Esto era cierto a lo largo de un intervalo muy amplio de fracciones de entrada ($R^2=0,9998$, pendiente=1,0). De manera similar, se encontraron relaciones lineales entre fracciones de entrada y fracciones de perlas con experimentos de ACR/PCR en emulsión independientes usando mutantes de PIK3CA y KRAS (figura 10c, d, e).

EJEMPLO 9

Tasas de error de polimerasas comúnmente usadas para PCR

El examen de la figura 10a muestra que había algunas perlas que contenían secuencias de p53 mutantes homogéneas incluso cuando el molde usado para producirlas era ADN genómico humano normal (panel que muestra un 0% de mutaciones). Estas mutaciones aparentes estaban provocadas por errores durante la PCR inicial usada para generar los moldes para BEAMing. Los errores de PCR introducidos durante las etapas de ACR o PCR en emulsión no darían como resultado perlas "mutantes", ya que tales perlas se clasificarían como perlas de múltiples moldes y por tanto no se incluirían en el análisis. Sin embargo, los errores durante la PCR inicial usada para generar moldes serían indistinguibles de mutaciones que se producen *in vivo*: gotitas que contienen tales moléculas mutantes individuales darían lugar a perlas que contienen secuencias mutantes homogéneas. Por consiguiente, se sospechaba que los procedimientos descritos en el presente documento podrían usarse para evaluar directamente las tasas de error de polimerasas comúnmente usadas para PCR.

Para determinar las tasas de error, se amplificó el exón 20 del gen PIK3CA a partir de ADN genómico de un individuo normal con cuatro polimerasas diferentes que representan cada una de las principales clases disponibles comercialmente: ADN polimerasa Platinum Taq (Invitrogen), Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen), PfuUltra Hotstart (Stratagene), y Phusion (NEB). Se llevaron a cabo múltiples reacciones de PCR según las recomendaciones de los fabricantes. Se realizaron treinta ciclos con cada polimerasa y la PCR en tiempo real mostró que los productos de

PCR estaban todavía aumentando exponencialmente a este punto de tiempo. Se produjeron cantidades equivalentes de ADN a partir de cada polimerasa en las condiciones usadas, y se usaron 20 pg de ADN para cada reacción de BEAMing Up.

Los resultados de estas comparaciones se muestran en los perfiles de citometría de flujo ilustrados en la figura 11a y representados gráficamente de manera estadística en la figura 11b. Taq tenía la mayor tasa de error ($3,4 \times 10^{-5}$ errores por pb por ciclo) y la tasa de error de Taq High Fidelity era tan sólo ligeramente inferior (figura 11b). En cambio, las polimerasas PfuUltra y Phusion tenían tasas de error drásticamente inferiores ($4,5$ y $5,5 \times 10^{-7}$, respectivamente). La comparación de los errores generados a través de la amplificación de una secuencia de ADN genómico completamente diferente (p53 exón 8) reveló resultados cualitativamente similares (figura 11 C). Aunque las tasas de error absolutas con las cuatro enzimas eran ligeramente inferiores a las encontradas con el amplicón PIK3CA exón 20, las tasas de error relativas de Phusion y PfuUltra eran al menos 18 veces inferiores a las otras dos enzimas con ambos amplicones.

Bibliografía

1. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. (2004) Nat Med 10, 789-99.
2. Smith, R. A., Cokkinides, V. & Eyre, H. J. (2005) CA Cancer J Clin 55, 31-44; quiz 55-6.
3. Breen, N. & Meissner, H. I. (2005) Annu Rev Public Health 26, 561-82.
4. Ransohoff, D. F. (2005) Nat Rev Cancer 5, 142-9.
5. Kaplan, R. M. (2005) Recent Results Cancer Res 166, 315-34.
6. Sidransky, D. (2002) Nat Rev Cancer 2, 210-9.
7. Verma, M. & Srivastava, S. (2003) Recent Results Cancer Res 163, 72-84; discussion 264-6.
8. Jaffer, F. A. & Weissleder, R. (2005) Jama 293, 855-62.
9. Sidransky, D., Von Eschenbach, A., Tsai, Y. C., Jones, P., Summerhayes, I., Marshall, F., Paul, M., Green, P., Hamilton, S. R., Frost, P. & *et al.* (1991) Science 252, 706-9.
10. Sidransky, D., Tokino, T., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., Levin, B., Frost, P. & Vogelstein, B. (1992) Science 256, 102-5.
11. Burchill, S. A. & Selby, P. J. (2000) J Pathol 190, 6-14.
12. Goessl, C. (2003) Expert Rev Mol Diagn 3, 431-42.
13. Lotze, M. T., Wang, E., Marincola, F. M., Hanna, N., Bugelski, P. J., Burns, C. A., Coukos, G., Damle, N., Godfrey, T. E., Howell, W. M., Panelli, M. C., Perricone, M. A., Petricoin, E. F., Sauter, G., Scheibenbogen, C., Shivers, S. C., Taylor, D. L., Weinstein, J. N. & Whiteside, T. L. (2005) J Immunother 28, 79-119.
14. Bremnes, R. M., Sirera, R. & Camps, C. (2005) Lung Cancer 49, 1-12.
15. Muller, H. M. & Widschwendter, M. (2003) Expert Rev Mol Diagn 3, 443-58.
16. Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100, 8817-22.
17. Ghadessy, F. J. & Holliger, P. (2004) Protein Eng Des Sel 17, 201-4.
18. Bernath, K., Hai, M., Mastrobattista, E., Griffiths, A. D., Magdassi, S. & Tawfik, D. S. (2004) Anal Biochem 325, 151-7.
19. Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M. & Yaros, M. J. (1977) Cancer Res 37, 646-50.
20. Sozzi, G., Conte, D., Mariani, L., Lo Vullo, S., Roz, L., Lombardo, C., Pierotti, M. A. & Tavecchio, L. (2001) Cancer Res 61, 4675-8.
21. Giacona, M. B., Ruben, G. C., Iczkowski, K. A., Roos, T. B., Porter, D. M. & Sorenson, G. D. (1998) Pancreas 17, 89-97.
22. Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R. D. & Knippers, R. (2001) Cancer Res

61, 1659-65.

23. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1996) *Cell* 87, 159-170.

5 24. Yu, R. Z., Geary, R. S., Monteith, D. K., Matson, J., Truong, L., Fitchett, J. & Levin, A. A. (2004) *J Pharm Sci* 93, 48-39.

25. Lo, Y. M., Zhang, J., Leung, T. N., Lau, T. K., Chang, A. M. & Hjelm, N. M. (1999) *Am J Hum Genet* 64, 218-24.

10 26. Thomlinson, R. H. & Gray, L. H. (1955) *Br J Cancer* 9, 539-49.

27. Cerar, A., Zidar, N. & Vodopivec, B. (2004) *Pathol Res Pract* 200, 657-62.

15 28. Chen, S., Yu, L., Jiang, C., Zhao, Y., Sun, D., Li, S., Liao, G., Chen, Y., Fu, Q., Tao, Q., Ye, D., Hu, P., Khawli, L. A., Taylor, C. R., Epstein, A. L. & Ju, D. W. (2005) *J Clin Oncol* 23, 1538-47.

29. Leek, R.D., Landers, R. J., Harris, A. L. & Lewis, C. E. (1999) *Br J Cancer* 79, 991-5.

20 30. Choi, J. J., Reich, C. F., 3rd & Pisetsky, D. S. (2005) *Immunology* 115, 55-62.

31. Meyerhardt, J. A. & Mayer, R. J. (2005) *N Engl J Med* 352, 476-87.

25 32. Winawer, S., Faivre, J., Selby, J., Bertaro, L., Chen, T. H., Kroborg, O., Levin, B., Mandel, J., O'Morain, C., Richards, M., Rennert, G., Russo, A., Saito, H., Semigfnovsky, B., Wong, B. & Smith, R. (2005) *Ann Oncol* 16, 31-3.

33. Lieberman, D. A. & Atkin, W. (2004) *Aliment Pharmacol Ther* 19 Suppl 1, 71-6.

34. Ahlquist, D. A. & Shuber, A. P. (2002) *Clin Chim Acta* 315, 157-68.

30 35. Thomas *et al.* (1999) *Arch. Parthol. Lab. Med.* 123, 1170-1176.

Bibliografía para los ejemplos 5-9

35 1. Shendure J *et al.* Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome. *Science*. 5741, 1728-1732 (2005).

2. Margulies M *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 437, 376-380 (2005).

40 3. Khrapko K *et al.* Mitochondrial mutational spectra in human cells and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 13798-13803 (1997).

45 4. Andre P, Kim A, Khrapko K & Thilly WG. Fidelity and mutational spectrum of Pfu DNA polymerase on a human mitochondrial ADN sequence. *Genome Res.* 7, 843-852 (1997).

5. Muniappan PB & Thilly WG. The DNA Polymerase β Replication Error Spectrum in the Adenomatous Polyposis Coli Gene Contains Human Colon Tumor Mutational Hotspots. *Cancer Res.* 62, 3271-3275 (2002).

50 6. Nilsson M *et al.* Padlock probes: Circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science*. 265, 2085-2088 (1994).

7. Lizardi PM *et al.* Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification. *Nat Genet.* 19,225-232 (1998).

55 8. Hardenbol P *et al.* Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes. *Nat. Biotechnol.* 21, 673-678 (2003).

9. Larsson C *et al.* In situ genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes. *Nature Meth.* 1, 227-232 (2004).

Tabla 1. Secuencias de cebadores usados para el dimensionamiento de fragmentos

Paciente n.º	Uso	Región diana, nt	Tamaño, pb	Cebador directo, 5'-3'	Cebador inverso, 5'-3'
29	1st PCR	3853-3952	100	GATGAAATAGGATGTAATCAGACGAC	CTTCAGCTGACCTAGTTCCAATC
		3853-4006	154	GATGAAATAGGATGTAATCAGACGAC	TGCTGGATTTGGTTCTAGGG
		3853-4049	195	GATGAAATAGGATGTAATCAGACGAC	TTGTGCCTGGCTGATTCTG
		3853-4155	296	GATGAAATAGGATGTAATCAGACGAC	GCTAAACATGAGTGGGTCTC
		3853-4249	397	GATGAAATAGGATGTAATCAGACGAC	TGCCACTTACCATCCACTG
		3510-4805	1296	ACGTCAATGTGGATCAGCCTATTG	GGTAATTTTGAAGCAGTCTGGGC
30	2ª PCR Secuenciación	3861-3952	92	GGATGTAATCAGACGACACAGG CAGACGACACAGGAAGCAGAT	CTTCAGCTGACCTAGTTCCAATC
		4002-4094	93	CAGCAGACTGCAGGGTTCTAG	CCACTTTTGGAGGGAGATTTC
		4002-4146	145	CAGCAGACTGCAGGGTTCTAG	ATGAGTGGGGTCTCCTGAAC
		4002-4206	205	CAGCAGACTGCAGGGTTCTAG	CTGGCAATCGAACGACTCTC
		4002-4299	298	CAGCAGACTGCAGGGTTCTAG	CTTGGTGGCATGGTTTGTG
		4002-4411	410	CAGCAGACTGCAGGGTTCTAG	TGCAGCTTGCCTAGGTCCAC
32	2ª PCR Secuenciación	3510-4805	1296	ACGTCAATGTGGATCAGCCTATTG	GGTAATTTTGAAGCAGTCTGGGC
		4010-4094	85	TGCAGGGTCTAGTTTATCTTCAG GGTTCTAGTTTATCTTCAGAAATCAGC	CCACTTTTGGAGGGAGATTTC
		4401-4501	99	TAAGCAAGCTGCAGTAAATGC	AAAATCCATCTGGAGTACTTTCC
		4401-4544	142	TAAGCAAGCTGCAGTAAATGC	ATGGCTCATCGAGGCTCAG
		4401-4687	285	TAAGCAAGCTGCAGTAAATGC	GGTCCTTTTCAGAAATCAATAGTTT T
		4401-4875	473	TAAGCAAGCTGCAGTAAATGC	TGCAACCTGTTTTGTGATGG
32	2ª PCR Secuenciación	3510-4805	1296	ACGTCAATGTGGATCAGCCTATTG	GGTAATTTTGAAGCAGTCTGGGC
		4413-4501	89	GCAGTAAATGCTGCAGTTCAGAG TTCAGAGGGTCCAGGTTCTTC	AAAATCCATCTGGAGTACTTTCC

Tabla 2. Secuencias de cebadores usadas para BEAMing

Región diana, nt	Tamaño, pb	Cebador de PCR en tiempo real, 5'-3'	Cebador de PCR en emulsión, 5'-3'
3791-3890	100	TAGAAGATACTCCAATATGTTTTCAAG	TCCAATATGTTTTTCAAGATGTAGTTC
	INV	Eti.-TCTGCTTCTGTGTCGTCTG	TCCCGCGAAATTAATACGAC
3853-3952	100	Eti.-GATGAATAGGATGTAATCAGACGAC	TCCCGCGAAATTAATACGAC
	INV	CTTCAGCTGACCTAGTTCCAATC	CTTCAGCTGACCTAGTTCCAATC
3870-3977	108	Eti.-TCAGACGACACAGGAAGCAG	TTGCTCACAGGATCTTCAG
	INV	ACTGCTGGAACCTTCGCTCAC	TCCCGCGAAATTAATACGAC
3952-4046	95	GATCCTGTGAGCGAAGTTCC	AGCGAAGTTCAGCAGTGTC
	INV	Eti.-TGCCTGGCTGATTCTGAAG	TCCCGCGAAATTAATACGAC
4002-4094	93	CAGCAGACTGCAGGGTTCTAG	TGCAGGGTCTAGTTTATCTTCAG
	INV	Eti.-CCACTTTTGAGGGAGATTTC	TCCCGCGAAATTAATACGAC
4063-4155	93	Eti.-TCTTCAGGAGCGAAATCTCC	ATGAGTGGGTCTCCTGAAC
	INV	GCTAAACATGAGTGGGTCTC	TCCCGCGAAATTAATACGAC
4085-4189	104	CCAAAAGTGTGCTCAGACA	GCTCAGACACCCAAAAGTCC
	INV	Eti.-CAAACTATCAAGTGAACCTGACAGAAG	TCCCGCGAAATTAATACGAC
4137-4239	103	Eti.-GACCCCACTCATGTTTAGCAG	CCACTGCATGTTCACTCTG
	INV	CATTCCACTGCATGGTTTAC	TCCCGCGAAATTAATACGAC
4153-4248	96	AGATGACTTCTGTCAGTTCACCTGAT	CTTCTGTCAGTTCACCTTGATAGTTT
	INV	Eti.-GCCACTTACCATTCCACTGC	TCCCGCGAAATTAATACGAC
4235-4332	98	Eti.-CCATGCGAGTGAATGGTAAG	AGGTGTTTTACTTCTGCTTGGTG
	INV	GGTGGAGGTGTTTTACTTCTGC	TCCCGCGAAATTAATACGAC
4225-4322	98	CCATGCGAGTGAATGGTAAG	TGGCATTATAAGCCCCAGTG
	INV	Eti.-GGTGGAGGTGTTTTACTTCTGC	TCCCGCGAAATTAATACGAC
4276-4380	105	GCCCTGGACAAACCATGC	GACAAACCATGCCACCAAG
	INV	Eti.-AGCAGTAGGTGCTTTATTTTAGG	TCCCGCGAAATTAATACGAC
4361-4455	95	Eti.-AAAAATAAGCACCTACTGCTGAAAAG	GGAAGAACCTGGACCCCTCTG
	INV	AGCATCTGGAAGAACCCTGGAC	TCCCGCGAAATTAATACGAC
4413-4514	102	AGTAAATGCTGCAGTTCAGAGG	CTGCAGTTCAGAGGGTCCAG
	INV	Eti.-CTGGATGAACAAAGAAATCCATC	TCCCGCGAAATTAATACGAC
4610-4710	101	CAGAATCAGAGCAGCCTAAAGAA	GCAGCCTAAAGAATCAAATGAAA
	INV	Eti.-ATCATCATCTGAATCATCTAATAGGTC	TCCCGCGAAATTAATACGAC

Tabla 3. Secuencias de cebadores usados para extensión de una única base

Región diana, nt	Paciente n.º	Cebador de extensión de una única base, 5'-3'	Base normal	Base mutante
3791-3890	3,6	ATGTAGTTCATTATCATCTTTGTCATCAGCTGAAGAT	G	T
3853-3952	19	GACCTAGTTCCAATCTTTTCTTTTATTTCTGCTATTT	G	A
3870-3977	13, 29, 14, 18	CACAGGATCTTCAGCTGACCTAGTTCCAATCTTTT	C	A
3952-4046	24	GCACCCTAGAACCAAATCCAGCAGACTG	C	T
4002-4094	33	ATCAGCCAGGCACAAAGCTGTTGAATTTT	C	T
	30	CAGCCAGGCACAAAGCTGTTGAATTTTCTT	C	A
	5	CAGCCAGGCACAAAGCTGTTGAATTTTCTT	C	G
4063-4155	23, 25	CATAGTGTTTCAGGTGGACTTTTGGGTGTCT	G	A
4085-4189	4	TGAACACTATGTTTCAGGAGACCCCACTCA	T	A
	31	CAGGAGACCCCACTCATGTTTAGCAGATG	T	A
4137-4239	12	ACGGAGCTGGCAATCGAACGACTCT	C	A
4153-4248	9	GTCGTTTCGATTGCCAGCTCCGTT	C	T
4235-4332	27	GGTTTGTCCAGGGCTATCTGGAAGATCAC	T	G
4225-4322	2,7	CCAGTGATCTTCCAGATAGCCCTGGA	C	T
4276-4380	22	GCAGAAGTAAACACCTCCACCACCTCCT	C	T
	8	CACCACCTCCTCAAACAGCTCAAACC	A	T
	1, 21, 17, 11	CCACCTCCTCAAACAGCTCAAACCAAG	C	T
4361-4455	20	TGCAGCATTTACTGCAGCTTGCTTAGGTC	C	A
4413-4514	32	GAGGGTCCAGGTTCTTCCAGATGCTGATACTTTATTA	C	T
	15,26	CCAGGTTCTTCCAGATGCTGATACTTTATTACATTT	T	G
	16	CAGATGCTGATACTTTATTACATTTTGCCACAGAA	A	G
4610-4710	28,10	CAAATGAAAACCAAGAGAAAGAGGCAGAAAAAA	C	A

Tabla 4. Cuantificación de mutaciones de APC en plasma

N.º	Sexo/edad (años)	Sitio	Estadio de Dukes (estadio de TNM)	Diámetro de la lesión (cm)	Mutación identificada en tumor primario (codón)	Fragmentos / ml de plasma	N.º de fragmentos analizados	% de fragmentos mutantes
1	M/50	Colon ascendente	Adenoma	3,0	C4348T (1450)	2600	2350	0,002%
2	M/67	Colon descendente	Adenoma	2,5	C4285T (1429)	5080	5080	0,001%
3	M/54	Recto	Adenoma	4,0	G3856T(1286) 4147-4148insA (1383)	4150	4150	0,002%
4	F/82	Recto	Adenoma	3,0	C4067G (1356)	1350	1350	0,001%
5	F/65	Recto	Adenoma	1,0	G3856T (1286)	4260	4260	0,001%
6	F/71	Colon ascendente	Adenoma	4,0	C4285T (1429)	4150	4150	0,001%
7	M/68	Ciego	Adenoma	6,5	A4345T (1449)	4760	4760	0,003%
8	M/93	Colon ascendente	Adenoma	0,8	C4216T (1406) 4666-4667insA (1544)	4320	4320	0,001%
9	F/78	Colon ascendente	Adenoma	3,0	C4348T (1450)	28570	28570	0,001%
10	F/59	Colon sigmoide	Adenoma	5,0		2160	2160	0,002%
11	F/73	Colon ascendente	Adenoma	5,0		8000	8000	0,02%
Mediana/media de muestras de plasma mutantes por muestras analizada								
						4300/6300		0,02%* 1/11 (9%)
12	F/81	Colon sigmoide	A (T2N0M0)	4,0	G4189T (1397)	7900	12000	0,01%
13	F/75	Colon sigmoide	A (T2N0M0)	2,5	3927-3931 del AAAGA (1309)	2160	2160	0,001%
14	M/60	Colon sigmoide	A (T2N0M0)	3,0	3927-3931 del AAAGA (1309)	4600	6900	0,04%
15	M/79	Flexión cólica derecha	A (T2N0M0)	3,0	4470delT (1490)	4600	3696	0,03%
16	M/70	Ileoecal	A (T2N0M0)	2,6	4481delA (1494)	6200	3105	0,07%
17	F/68	Colon ascendente	A (T2N0M0)	3,5	C4348T(1450) 3927-3931 del	2170	2170	0,001%
18	F/66	Colon sigmoide	A (T1N0M0)	2,5	AAAGA (1309)	1920	1920	0,001%
19	M/68	Recto	A (T2N0M0)	5,5	G3907T (1303)	2300	1170	0,12%

No.	Sexo/edad (años)	Sitio	Estadio de Dukes (estadio de TNM)	Diámetro de la lesión (cm)	Mutación identificada en tumor primario (codón)	Fragmentos / ml de plasma	N.º de fragmentos analizados	% de fragmentos mutantes
20					Mediana/media de muestras de plasma mutantes por muestras analizadas	3500/4000		0,04%/0,04%* 5/8 (63%)
21								
22	F/65	Ciego	B (T3N0M0)	3,5	G4396T (1466)	5300	5300	0,002%
23	M/71	Colon sigmoide	B (T3N0M0)	3,0	C4348T (1460)	2100	1863	0,19%
24	M/37	Colon descendente	B (T4N0M0)	10,0	C4330T (1444)	5400	4887	1,28%
26	M/64	Colon sigmoide	B (T3N0M0)	6,5	C4099T (1367)	3810	3810	0,001%
26	M/72	Colon sigmoide	B (T3N0M0)	3,0	C4012T (1338)	4800	4800	0,03%
	F/82	Flexura hepática	B (T3N0M0)	4,0	C4099T (1367)	3840 1	3840	1,46%
27	M/83	Colon ascendente	B (T3N0M0)	6,0	4470doIT (1490) 4260-4261 delCA (1420)	600	1404	1,75%
	M/61	Colon sigmoide	B (T3N0M0)	4,0		4200	4200	0,001%
					Mediana/media de muestras de plasma mutantes por muestras analizadas	4000/3900		1,28%/0,94%* 5/8 (63%)
28	F/83	Colon ascendente	D (T3N2M1)	6,0	4666-4667insA (1544)	230000	24867	6,6%
29	M/65	Colon sigmoide	D (T3N0M1)	3,0	G3925T (1309)	69600	1636	27,4%
30	F/33	Colon descendente	D(T4N1M1)	6,0	C4067A (1356)	18000	491	10,6%
31	M/64	Colon sigmoide	D (T4N2M1)	6,0	T4161A (1387) 4468-4469 delCA (1490)	26000	975	1,9%
32	M/56	Recto	D (T3N2M1)	3,0		103200	1187	18,9%
33	F/60	Recto	D (T3N2M1)	4,0	4059-4060insT (1354)	8400	850	2,0%

No.	Sexo/edad (años)	Sitio	Estadio de Dukes (estadio de TNM)	Diámetro de la lesión (cm)	Mutación identificada en tumor primario (codón)	Fragmentos / ml de plasma	No. de fragmentos analizados	% de fragmentos mutantes
					Mediana/media de muestras de plasma mutantes por muestras analizada	47800/75900		8,05%/11,06%* 6/6 /(100%)

*Calculado sólo para muestras en las que la frecuencia de mutación era significativamente superior que en muestras control, es decir, >0,003%.

Tabla 5: Secuencias genómicas mutantes analizadas

Fuente de ADN genómico	Cambio de aminoácido	Cambio de nucleótido
Línea celular de cáncer de colon Co3	<i>Tp53</i> exón 8 H273R	CGT a CAT
Línea celular de cáncer de colon Co38	<i>PIK3CA</i> exón 20 H1047R	CAT a CGT
Línea celular de cáncer de colon Co4	<i>KRAS2</i> exón 2 G12D	GGT a GAT

Tabla 6: Cebadores usados para el análisis de *p53*

1º cebador directo de PCR de <i>Tp53</i>	5'-ATCCTGAGTAGTGGAATCTACTGG-3'
1º cebador inverso de PCR de <i>Tp53</i>	5'-TCCCGCGAAATTAATACGACTTGCGGAGAT TCTCTTCCTC-3'
Cebador directo de PCR en emulsión de <i>Tp53</i>	5'TGGTAATCTACTGGGACGGAAC-3'
Sonda de candado de <i>Tp53</i>	5'- Fosfato - GTGTTTGTGCCTGTCTTCCTTTTACGACGG CTCTGCCTCCTGCCTGCTTCTTCGTGCCTC GTTCTCGTGTAGACTGGGACGGAACAGC-3'
Sonda de hibridación de <i>Tp53</i>	5'-FAM-GCT TTG AGG TGC GTG TTT GTG CC-3'
Cebador de SBE de <i>Tp53</i>	5'-Cy5-CCCGAACA GCTTTGAGGT GC-3'

Tabla 7: Cebadores usados para el análisis de *PIK3CA*

1º cebador directo de PCR de <i>PIK3CA</i> exón 20	5'-TCCCGCGAAATTAATACGACGCCTTAG ATAAACTGAGCAAGAG-3'
1º cebador inverso de PCR de <i>PIK3CA</i> exón 20	5'-GGAAGATCCAATCCATTTTGTG-3'
Cebador inverso de PCR en emulsión de <i>PIK3CA</i> exón 20	5'-CAATCCATTTTGTGTCCAG-3'
Sonda de candado de <i>PIK3CA</i> exón 20	5'- Fosfato - ATTTGTTTCATGAAATACTTCCTTTTACG ACGGCTCTGCCTCCTGCCTGCTTCTTC GTGCCTCGTTCTCGTGTAGATTGTTGTC CAGCCAC-3'
Cebador de hibridación de <i>PIK3CA</i> exón 20	5'-FAM- TTG TTG TCC AGC CAC CAT GA-3'
Cebador SBE de <i>PIK3CA</i> exón 20	5'-Cy5- TTG TTG TCC AGC CAC CAT GA-3'
1º cebador directo de PCR de <i>PIK3CA</i> exón 9	5'-TCCCGCGAAATTAATACGACTGACAAA GAACAGCTCAAAGC-3'
1º cebador inverso de PCR de <i>PIK3CA</i> exón 9	5'-TCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC-3'
Cebador inverso de PCR en emulsión de <i>PIK3CA</i> exón 9	5'-CTTACCTGTGACTCCATAGAAAATC-3'
Cebador de hibridación de <i>PIK3CA</i> exón 9	5'-Biotina- CCTGTGACTCCATAGAAAATCTTTCTCC TGCT-3'

Tabla 8: Cebadores usados para el análisis de *KRAS2*

1º cebador directo de PCR de <i>KRAS2</i> exón 2	5'-TCCCGCGAAATTAATACGACTGACTGAATA TAAACTTGTGGTAGTTG-3'
1º cebador inverso de PCR de <i>KRAS2</i> exón 2	5'-CATATTCGTCCACAAAATGATTC-3'
Cebador invertido de PCR en emulsión de <i>KRAS2</i> exón 2	5'-AATGATTCTGAATTAGCTGTATCGTC-3'

Sonda de candado de <i>KRAS2</i> exón 2	5'- Fosfato - GCTCCAACTACACATTCTTTTACGACGG CTCTGCCTCCTGCCCTGCTCTTCGTGCTCTC GTTCTCGTGTAGACGGCACTCTTGCTAC- 3'
Cebador de SBE de <i>KRAS2</i> exón 2	5'-Cy5-GGC ACT CTT GCC TAC GCC AC-3'

Lista de secuencias

- 5 <110> Vogelstein, Bert Diehl, Frank Kinzler, Kenneth Li, Meng
- <120> Métodos para BEAMING
- <130> 001107.00629
- 10 <150> 60/729.235
<151> 24-10-2005
- <160> 146
<170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- 15 <210> 1
<211> 26
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
- 20 <400> 1
gatgaaatag gatgtaatca gacgac 26
- <210> 2
<211> 26
25 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 2
gatgaaatag gatgtaatca gacgac 26
- 30 <210> 3
<211> 26
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 3
- 35 gatgaaatag gatgtaatca gacgac 26
- <210> 4
<211> 26
<212> ADN
40 <213> *Homo sapiens*
<400> 4
gatgaaatag gatgtaatca gacgac 26
- <210> 5
<211> 26
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 5
45 gatgaaatag gatgtaatca gacgac 26
- 50 <210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 6
55 acgtcatgtg gatcagccta ttg 23
- <210> 7
<211> 22
60 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*
 <400> 7
 ggatgtaatc agacgacaca gg 22

5 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8

10 cagacgacac aggaagcaga t 21

<210> 9
 <211> 21
 <212> ADN

15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9
 cagcagactg cagggttcta g 21

<220> 10
 <211> 21
 <212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10
 cagcagactg cagggttcta g 21

25 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN

30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11
 cagcagactg cagggttcta g 21

<210> 12
 <211> 21
 <212> ADN

35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12
 cagcagactg cagggttcta g 21

40 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*
 <400> 13

45 cagcagactg cagggttcta g 21

<210> 14
 <211> 23
 <212> ADN

50 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14
 acgtcatgtg gatcagccta ttg 23

<210> 15
 <211> 24
 <212> ADN

55 <213> *Homo sapiens*
 <400> 15
 tgcagggttc tagtttatct tcag 24

60 <210> 16
 <211> 26
 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*
 <400> 16

65 ggttctagtt tatcttcaga atcagc 26

<210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 17
 taagcaagct gcagtaaagc c 21

 <210> 18
 10 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 18
 taagcaagct gcagtaaagc c 21

 <210> 19
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 19
 taagcaagct gcagtaaagc c 21

 <210> 20
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 20
 taagcaagct gcagtaaagc c 21

 <210> 21
 30 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 21
 35 acgtcatgtg gatcagccta ttg 23

 <210> 22
 40 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22
 gcagtaaagc ctgcagttca gag 23

 <210> 23
 45 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 23
 ttcagagggt ccaggttctt c 21
 50
 <210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55 <400> 24
 cttcagctga cctagttcca atc 23

 <210> 25
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 25
 tgctggattt ggttctaggg 20

 65 <210> 26
 <211> 19

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 26
 ttgtgcctgg ctgattctg 19
 5
 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 27
 gctaaacatg agtggggtct c 21
 <210> 28
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 28
 tgccacttac cattccactg 20
 20 <210> 29
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 29
 25 ggtaattttg aagcagtctg ggc 23
 <210> 30
 <211> 23
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 30
 cttcagctga cctagttcca atc 23
 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 31
 ccacttttgg agggagattt c 21
 40
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 32
 atgagtgggg tctcctgaac 20
 <210> 33
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 33
 ctggcaatcg aacgactctc 20
 55 <210> 34
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 34
 60 cttggtggca tggttgtc 19
 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> *Homo sapiens*
 <400> 35

tgcagcttgc ttaggtccac 20
 <210> 36
 <211> 23
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 36
 ggtaatttg aagcagtctg ggc 23
 10 <210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 37
 15 ccacttttg agggagattt c 21
 <210> 38
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> *Homo sapiens*
 <400> 38
 aaaatccatc tggagtactt tcc 23
 <210> 39
 25 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 39
 atggctcatc gaggctcag 19
 30 <210> 40
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 40
 ggtccttttc agaatacaata gtttt 25
 <210> 41
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 41
 tgcaacctgt ttgtgatgg 20
 45 <210> 42
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 42
 50 ggtaatttg aagcagtctg ggc 23
 <210> 43
 <211> 23
 <212> ADN
 55 <213> *Homo sapiens*
 <400> 43
 aaaatccatc tggagtactt tcc 23
 <210> 44
 60 <211> 28
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 44
 tagaagatac tccaatatgt tttcaag 28
 65 <210> 45

<211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 45
 5 tctgcttcct gtgtcgtctg 20

 <210> 46
 <211> 26
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*
 <400> 46
 gatgaaatag gatgtaatca gacgac 26

 <210> 47
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 47
 cttcagctga cctagttcca atc 23
 20
 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 48
 tcagacgaca caggaagcag 20

 <210> 49
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 49
 actgctggaa cttcgctcac 20

 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 50
 35 gatcctgtga gcgaagtcc 20
 40
 <210> 51
 <211> 19
 <212> ADN
 45 <213> *Homo sapiens*
 <400> 51
 tgcctggctg attctgaag 19

 <210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 52
 50 cagcagactg cagggttcta g 21
 55
 <210> 53
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 53
 60 ccacttttg aggagattt c 21

 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> *Homo sapiens*

<400> 54
 tcttcaggag cgaaatctcc 20

 5 <210> 55
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 55
 gctaaacatg agtggggtct c 21
 10
 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 56
 ccaaaagtgg tgctcagaca 20

 <210> 57
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 57
 caaaactatc aagtgaactg acagaag 27

 25 <210> 58
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 58
 30 gacccactc atgttttagca g 21

 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 59
 cattccactg catggttcac 20

 <210> 60
 40 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 60
 agatgtactt ctgtcagttc acttgat 27
 45
 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 61
 gccacttacc attccactgc 20

 <210> 62
 <211> 20
 55 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 62
 ccatgcagtg gaatggtgag 20

 60 <210> 63
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 63
 65 ggtggagggtg ttttacttct gc 22

<210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5 <400> 64
 ccatgcagtg gaatgtaag 20

 <210> 65
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 65
 ggtggaggtg tttacttct gc 22

 <210> 66
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 66
 20 gccctggaca aaccatgc 18

 <210> 67
 <211> 24
 <212> ADN
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 67
 agcagtaggt gctttatct tagg 24

 <210> 68
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 68
 30 aaaataaagc acctactgct gaaaag 26

 <210> 69
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 69
 40 agcatctgga agaacctgga c 21

 <210> 70
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 70
 agtaaatgct gcagtcaga gg 22

 <210> 71
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 71
 50 ctggatgaac aagaaaatcc atc 23

 <210> 72
 <211> 23
 <212> ADN
 60 <213> *Homo sapiens*
 <400> 72
 cagaatcaga gcagcctaaa gaa 23

 <210> 73
 <211> 27
 65 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*
 <400> 73
 atcatcatct gaatcatcta ataggtc 27

 5 <210> 74
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 74
 10 tccaatatgt tttcaagat gtagttc 27

 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 75
 tccgcgaaa ttaatacgac 20

 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 76
 tccgcgaaa ttaatacgac 20
 20

 <210> 77
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 77
 cttcagctga cctagttcca atc 23
 30

 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 78
 ttcgctcaca ggatcttcag 20

 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 79
 40 tccgcgaaa ttaatacgac 20
 45

 <210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> *Homo sapiens*
 <400> 80
 agcgaagttc cagcagtgtc 20

 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 81
 tccgcgaaa ttaatacgac 20
 55

 <210> 82
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 82
 60 tgcagggttc tagtttatct tcag 24
 65

<210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 83
 tcccgcgaaa ttaatacgac 20

 <210> 84
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 84
 atgagtgggg tctcctgaac 20

 15 <210> 85
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 85
 tcccgcgaaa ttaatacgac 20

 <210> 86
 <211> 20
 25 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 86
 gctcagacac ccaaaagtcc 20

 30 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 87
 35 tcccgcgaaa ttaatacgac 20

 <210> 88
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> *Homo sapiens*
 <400> 88
 ccactgcatg gttcactctg 20

 <210> 89
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 89
 tcccgcgaaa ttaatacgac 20

 50 <210> 90
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 55 <400> 90
 cttctgtcag ttcacttgat agttttg 27

 <210> 91
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 91
 tcccgcgaaa ttaatacgac 20

 65 <210> 92
 <211> 23

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 92
 aggtgtttta cttctgcttg gtg 23
 5
 <210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 93
 tcccgcgaaa ttaatacgac 20
 <210> 94
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 94
 tggcattata agccccagtg 20
 20 <210> 95
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 95
 25 tcccgcgaaa ttaatacgac 20
 <210> 96
 <211> 19
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 96
 gacaaaccat gccaccaag 19
 <210> 97
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 97
 35 tcccgcgaaa ttaatacgac 20
 40 <210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 98
 ggaagaacct ggaccctctg 20
 <210> 99
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 99
 50 tcccgcgaaa ttaatacgac 20
 55 <210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 100
 60 ctgcagttca gaggtccag 20
 <210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> *Homo sapiens*
 <400> 101

tcccgcgaaa ttaatacgac 20

<210> 102
<211> 23
5 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 102
gcagcctaaa gaatcaaatg aaa 23

10 <210> 103
<211> 20
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 103

15 tcccgcgaaa ttaatacgac 20

<210> 104
<211> 37
<212> ADN
20 <213> *Homo sapiens*
<400> 104
atgtagtca ttatcatctt tgtcatcagc tgaagat 37

25 <210> 105
<211> 37
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 105
gacctagttc caatctttc tttatttct gctattt 37

30 <210> 106
<211> 35
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
35 <400> 106
cacaggatct tcagctgacc tagttccaat ctttt 35

40 <210> 107
<211> 28
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 107
gcaccctaga accaaatcca gcagactg 28

45 <210> 108
<211> 29
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 108
50 atcagccagg cacaaagctg ttgaatttt 29

<210> 109
<211> 30
<212> ADN
55 <213> *Homo sapiens*
<400> 109
cagccaggca caaagctgtt gaattttctt 30

60 <210> 110
<211> 30
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 110
cagccaggca caaagctgtt gaattttctt 30

65 <210> 111

<211> 30
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 111
 5 catagtgttc aggtggactt ttgggtgtct 30

 <210> 112
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*
 <400> 112
 tgaacactat gttcaggaga cccactca 29

 <210> 113
 <211> 29
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 113
 caggagaccc cactcatgtt tagcagatg 29
 20
 <210> 114
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 114
 acggagctgg caatcgaacg actct 25

 <210> 115
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 115
 gtcgttcgat tgccagctcc gtt 23

 <210> 116
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 116
 35 ggtttgtcca gggctatctg gaagatcac 29
 40
 <210> 117
 <211> 26
 <212> ADN
 45 <213> *Homo sapiens*
 <400> 117
 ccagtgatct tccagatagc cctgga 26

 <210> 118
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 118
 50 gcagaagtaa aacacctcca ccacctct 29
 55
 <210> 119
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 60 <400> 119
 caccacctcc tcaaacagct caaacc 26

 <210> 120
 <211> 27
 65 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 120
 ccacctctc aaacagctca aaccaag 27

 5 <210> 121
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 121
 tgcagcattt actgcagctt gcttaggtc 29

 10 <210> 122
 <211> 37
 <212> ADN
 <218> *Homo sapiens*
 15 <400> 122
 gaggggtccag gttctccag atgctgatac ttatta 37

 20 <210> 123
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 123
 ccaggttctt ccagatgctg atactttatt acattt 36

 25 <210> 124
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 124
 30 cagatgctga tactttatta catTTTgcca cagaa 35

 35 <210> 125
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 125
 caaatgaaaa ccaagagaaa gaggcagaaa aaa 33

 40 <210> 126
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 126
 atcctgagta gtggtaatct actgg 25

 45 <210> 127
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50 <400> 127
 tcccgcgaaa ttaatacgac ttgcggagat tctcttctc 40

 55 <210> 128
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 128
 tggtaatcta ctgggacgga ac 22

 60 <210> 129
 <211> 88
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 65 <400> 129

gtgtttgtgc ctgtcttctt tttacgaagg ctctgcctcc tgctgcttc ttcttgcttc 60
gttctcgtgt agactgggac ggaacagc 88

5 <210> 130
<211> 23
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 130
gcttgaggt gcgtgttgt gcc 23

10 <210> 131
<211> 20
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 131

15 cccgaacagc ttgaggtgc 20

20 <210> 132
<211> 44
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 132
tccgcgaaa ttaatacgac gccttagata aaactgagca agag 44

25 <210> 133
<211> 21
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 133
ggaagatcca atccatttt g 21

30 <210> 134
<211> 21
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 134
caatccattt ttgtgtcca g 21

40 <210> 135
<211> 91
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 135

atttgtttca tgaaatactt ccttttacga cggtctctgcc tcttgcttgc ttcttcgtgc 60
ctcgttctcg tgtagattgt tgtccagcca c 91

45 <210> 136
<211> 20
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 136
ttgtgtcca gccaccatga 20

55 <210> 137
<211> 20
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 137
ttgtgtcca gccaccatga 20

60 <210> 138
<211> 41

<212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 138
 tcccgcgaaa ttaatacgac tgacaaagaa cagctcaaag c 41
 5
 <210> 139
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 10 <400> 139
 tccatttag cacttacctg tgac 24
 <210> 140
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 140
 cttacctgtg actccataga aaatc 25
 20 <210> 141
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 141
 25 cctgtgactc catagaaaat ctttctctg ct 32
 <210> 142
 <211> 47
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 142
 tcccgcgaaa ttaatacgac tgactgaata taaactgtg gtagttg 47
 <210> 143
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 143
 catattcgtc cacaaaatga ttc 23
 40 <210> 144
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 144
 aatgattctg aattagctgt atcgtc 26
 <210> 145
 <211> 89
 50 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 145
 gctccaacta ccacattcct tttacgacgg ctctgcctcc tgcctgctct tcgtgctctc 60
 gttctcgtgt agacggcact cttgcctac 89
 55 <210> 146
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 146
 60 ggcactcttg cctacgccac 20

REIVINDICACIONES

1. Método para analizar una región de moléculas de ADN de analito, que comprende:
 - 5 amplificar una región de moléculas de ADN de analito usando una ADN polimerasa de alta fidelidad para formar un conjunto de primeros amplicones;
 - 10 formar microemulsiones que comprenden dichos primeros amplicones y perlas de reactivo, en el que las perlas de reactivo están unidas a una pluralidad de moléculas de un cebador para amplificar el conjunto de primeros amplicones;
 - 15 amplificar los primeros amplicones en las microemulsiones, mediante lo cual se forman perlas de producto que están unidas a una pluralidad de copias de segundos amplicones;
 - 20 romper las microemulsiones;
 - 25 amplificar los segundos amplicones usando amplificación por círculo rodante para formar terceros amplicones; y analizar los terceros amplicones.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la amplificación por círculo rodante emplea una sonda circularizable, comprendiendo dicha sonda una primera y una segunda región de complementariedad con una tercera y una cuarta región en dichos segundos amplicones, en el que dichas regiones primera y segunda no son contiguas en dicha sonda, y en el que dichas regiones tercera y cuarta no son contiguas en dichos segundos amplicones, en el que dichos segundos amplicones comprenden una quinta región de 1-30 nucleótidos entre dichas regiones tercera y cuarta, en el que tras la hibridación de la sonda circularizable con los segundos amplicones, el ligamiento dirigido por el molde de los extremos de la sonda circularizable forma un círculo.
3. Método según la reivindicación 1, en el que la amplificación por círculo rodante emplea una sonda de candado, comprendiendo dicha sonda una primera y una segunda región de complementariedad con una tercera y una cuarta región en dichos segundos amplicones, en el que dichas regiones primera y segunda son contiguas en dicha sonda, y en el que dichas regiones tercera y cuarta son contiguas en dichos segundos amplicones, en el que tras la hibridación de la sonda de candado con los segundos amplicones, el ligamiento dirigido por el molde de los extremos de la sonda de candado forma un círculo.
4. Método según la reivindicación 1, en el que los terceros amplicones se analizan mediante la etapa de:
 - 40 determinar una característica de secuencia de los terceros amplicones mediante extensión de una única base con al menos dos dideoxirribonucleótidos marcados de manera diferencial de un cebador unido a dichos terceros amplicones.
5. Método según la reivindicación 1, en el que se usan dos polimerasas de alta fidelidad en paralelo y se comparan para determinar su fidelidad relativa.
6. Método según la reivindicación 3, en el que el ADN de analito se ha tratado con un posible mutágeno.
7. Método según la reivindicación 4, en el que antes de la etapa de análisis, las perlas de producto se someten a condiciones de desnaturalización mediante lo cual los segundos amplicones se separan en hebras individuales, y en el que se desechan hebras individuales que no están unidas a las perlas de producto.
8. Método según la reivindicación 4, en el que antes de la etapa de análisis, las perlas de producto se incuban con desoxinucleótidos no marcados.

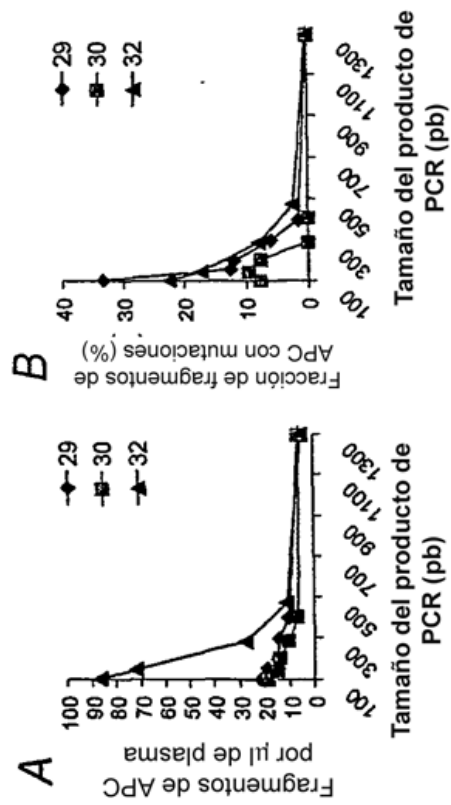


Figura 1

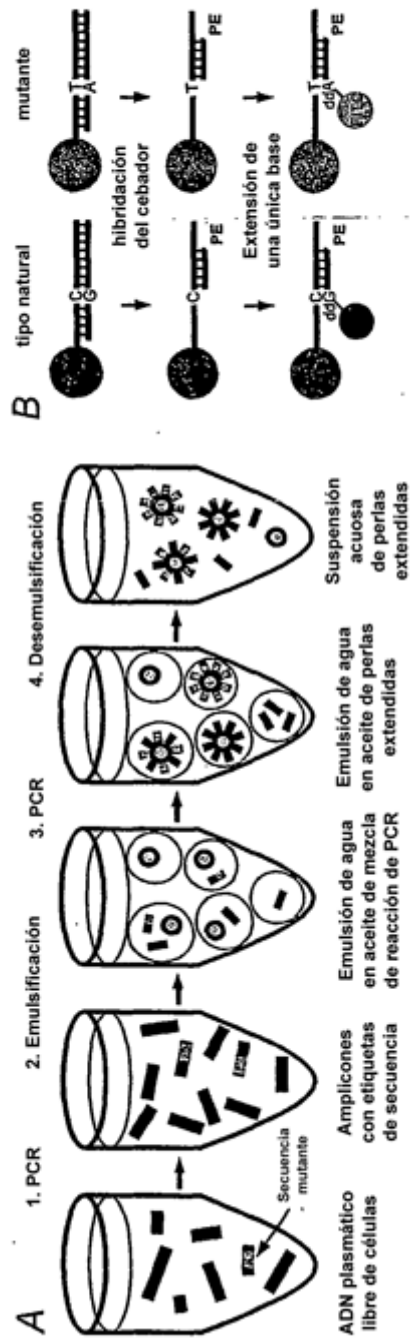


Figura 2

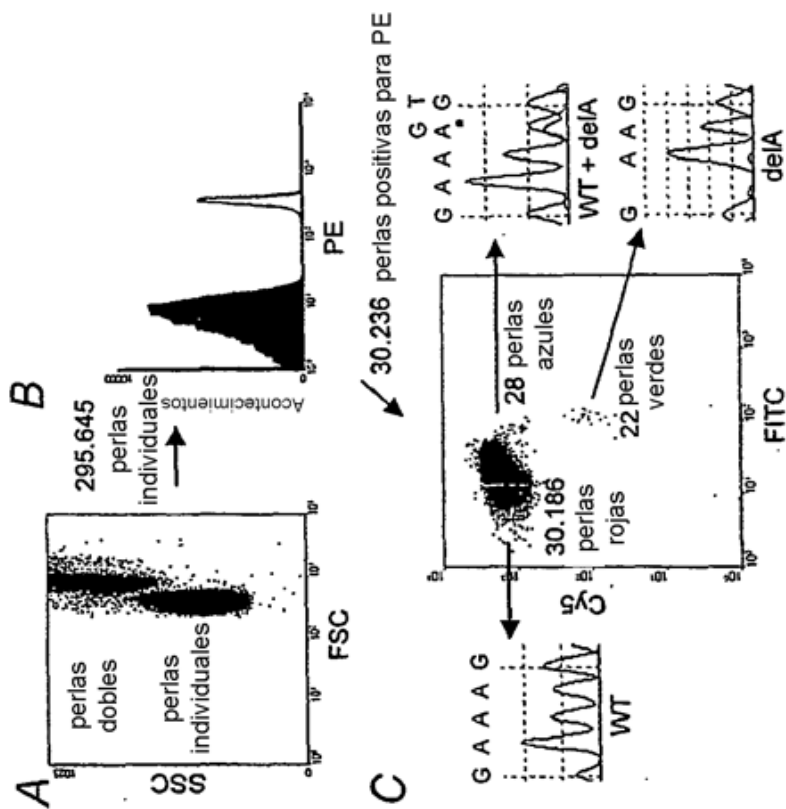


Figura 3

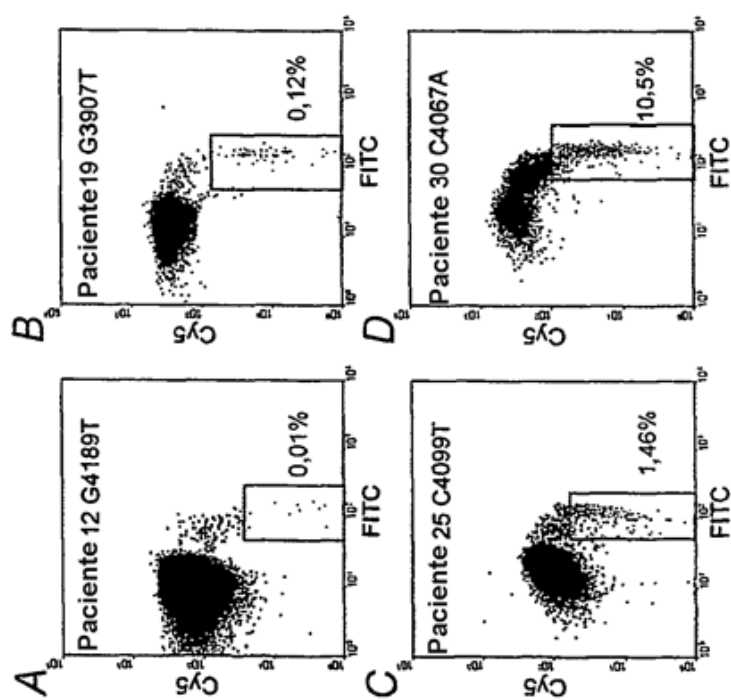


Figura 4

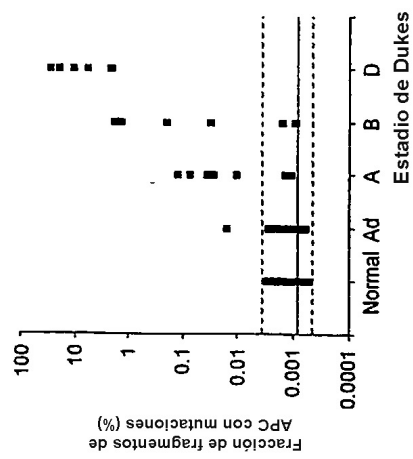


Figura 5

Figura 6:

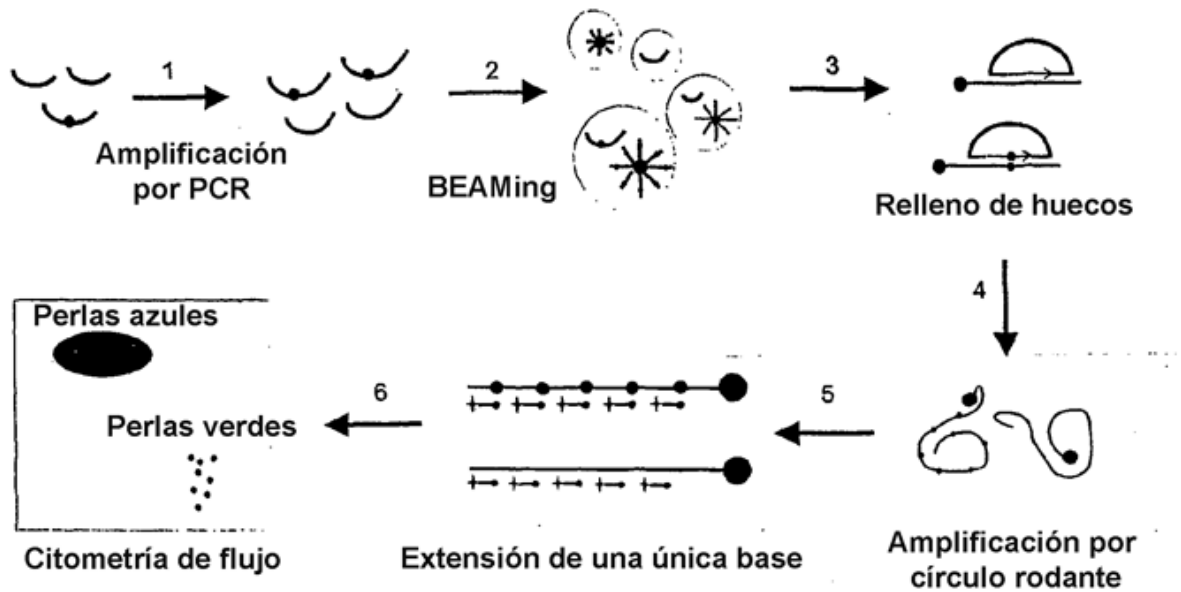


Figura 7

La correlación entre molde de PCR en emulsión y perlas de moldes individuales

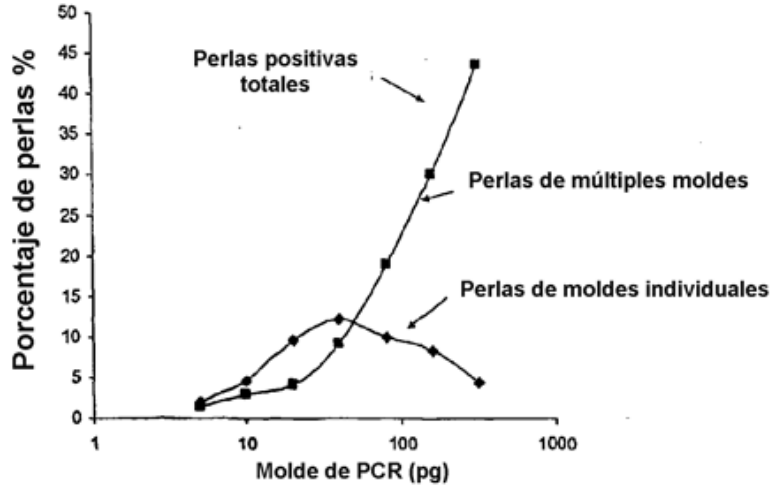
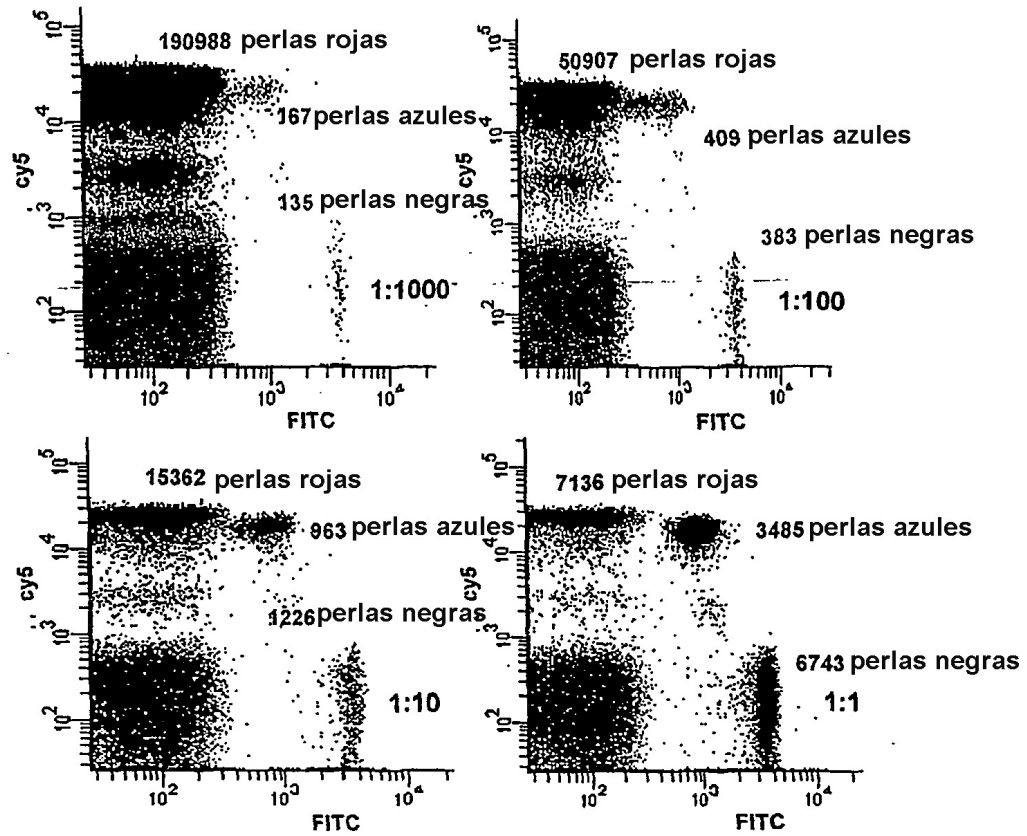
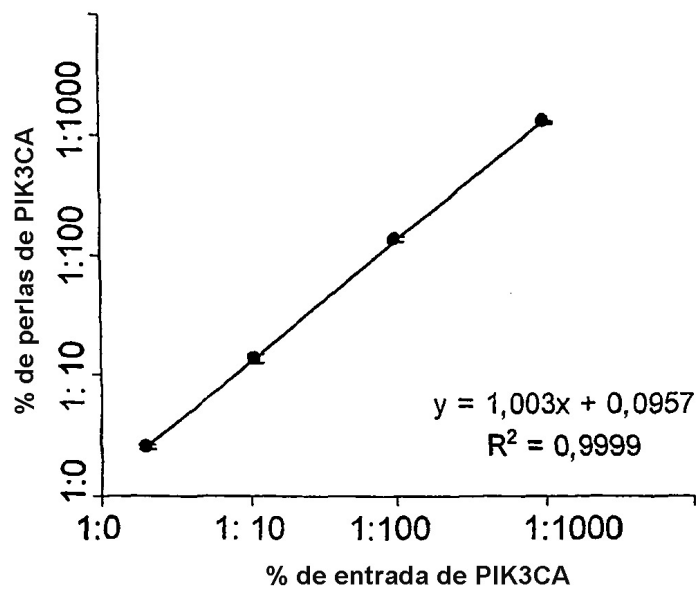


Figura 8

8a) Análisis de citometría de flujo del experimento de mezclado de moldes



8b)



8c)

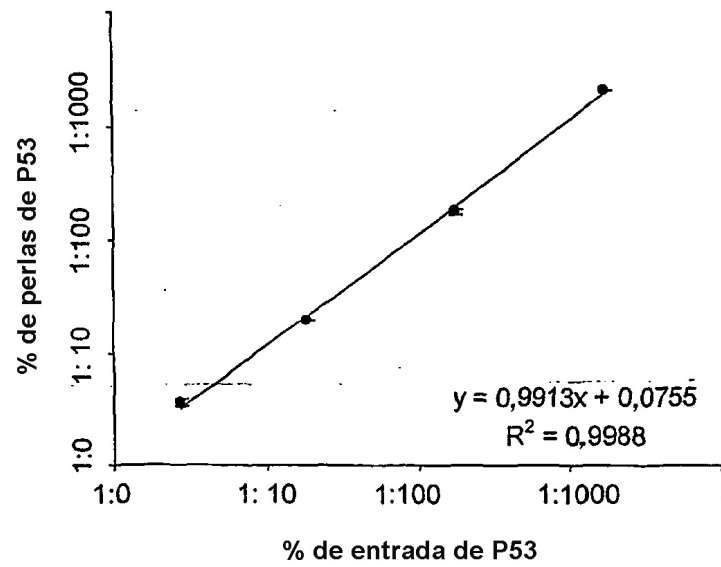
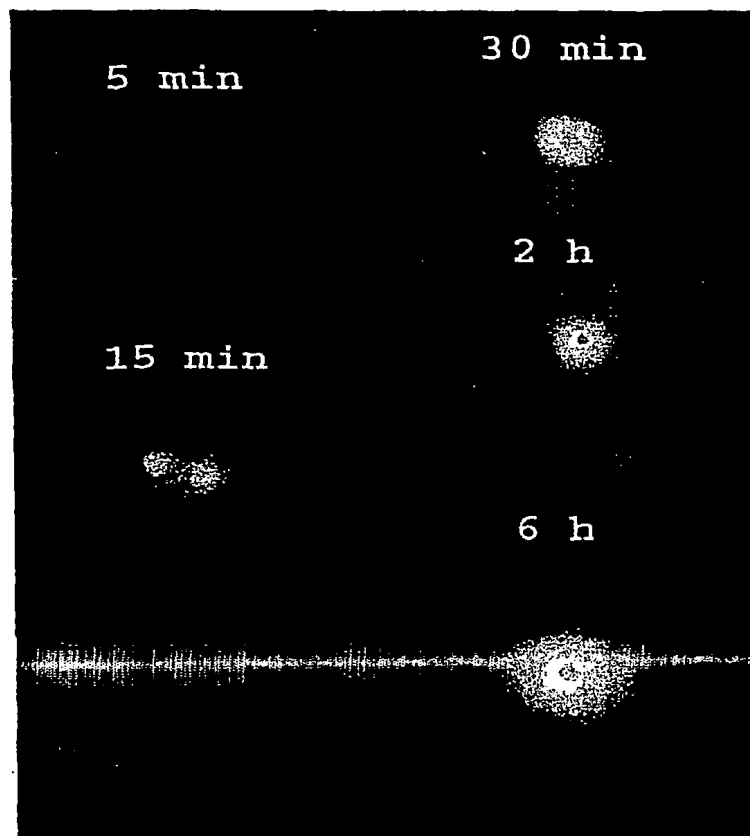


Figura 9: Amplificación por círculo rodante sobre perlas magnéticas

9a)



9b)

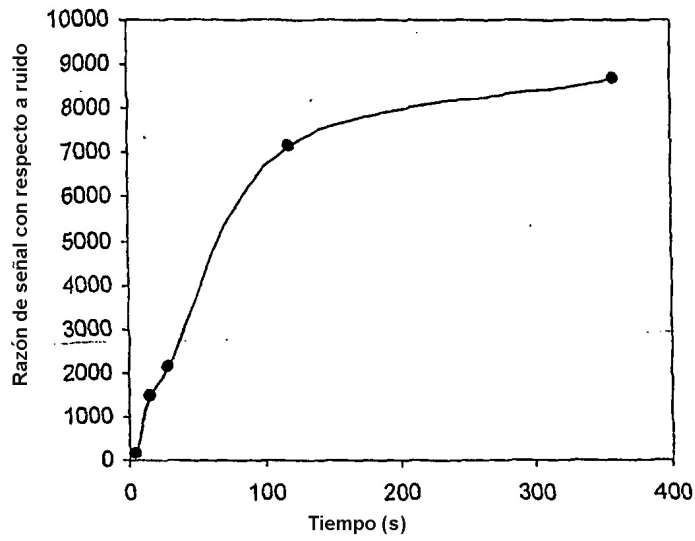
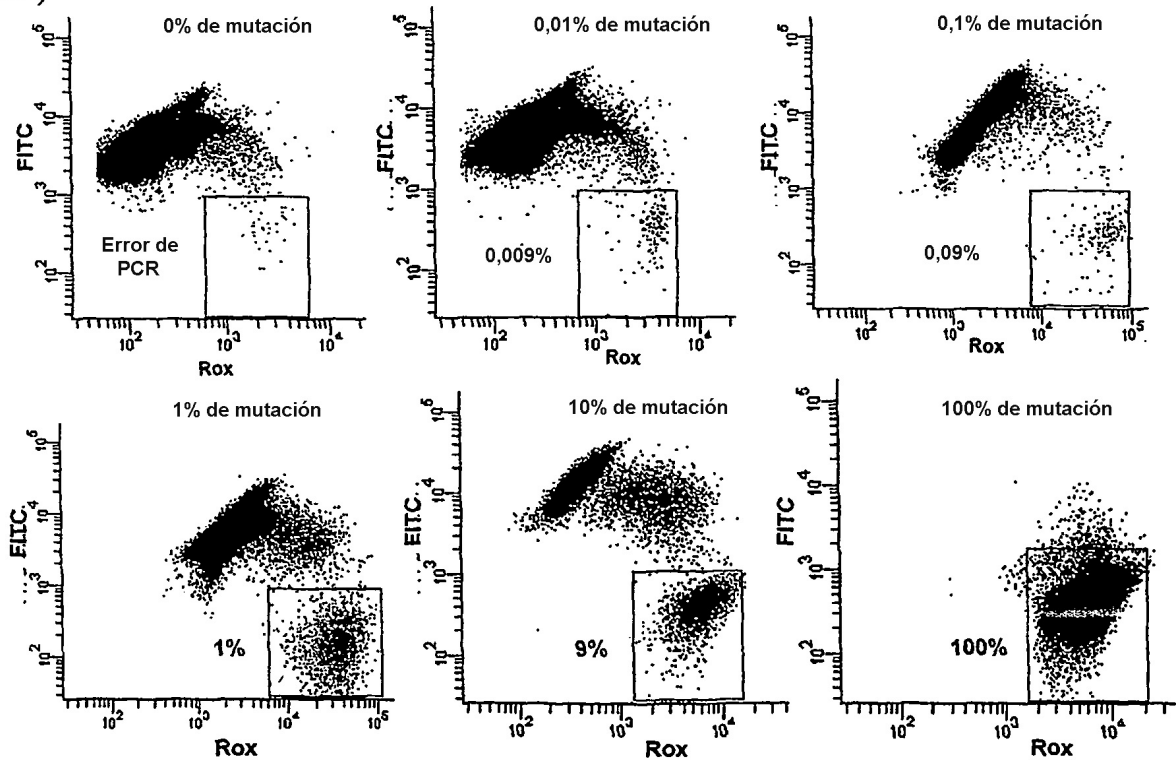
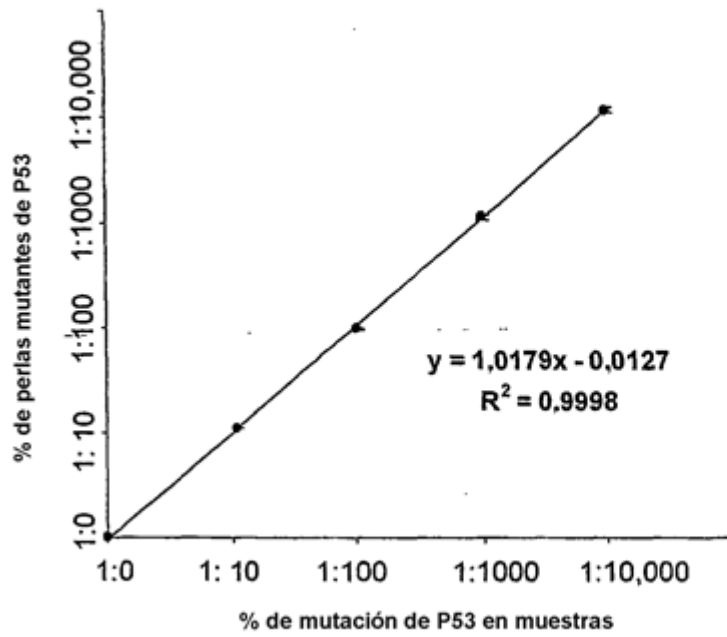


Figura 10

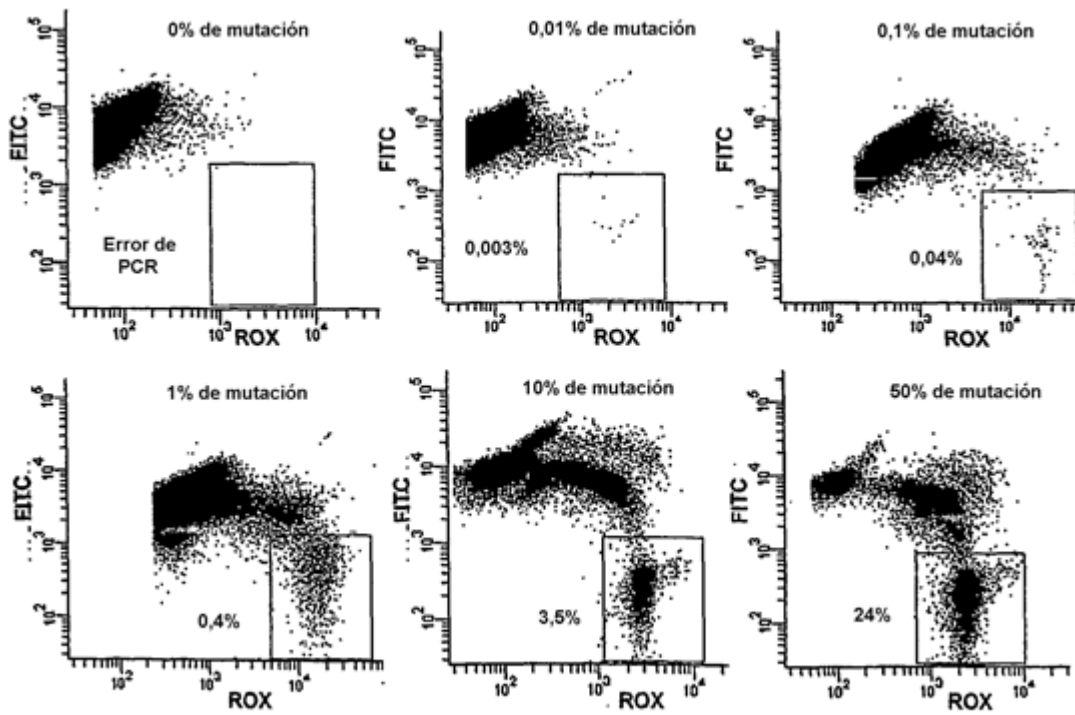
10a)



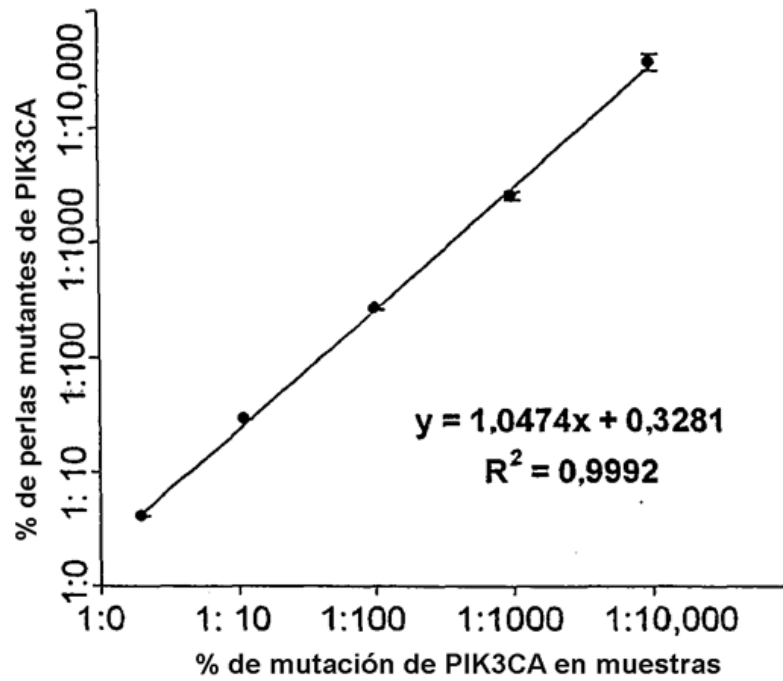
10b)



10c)



10d)



10e)

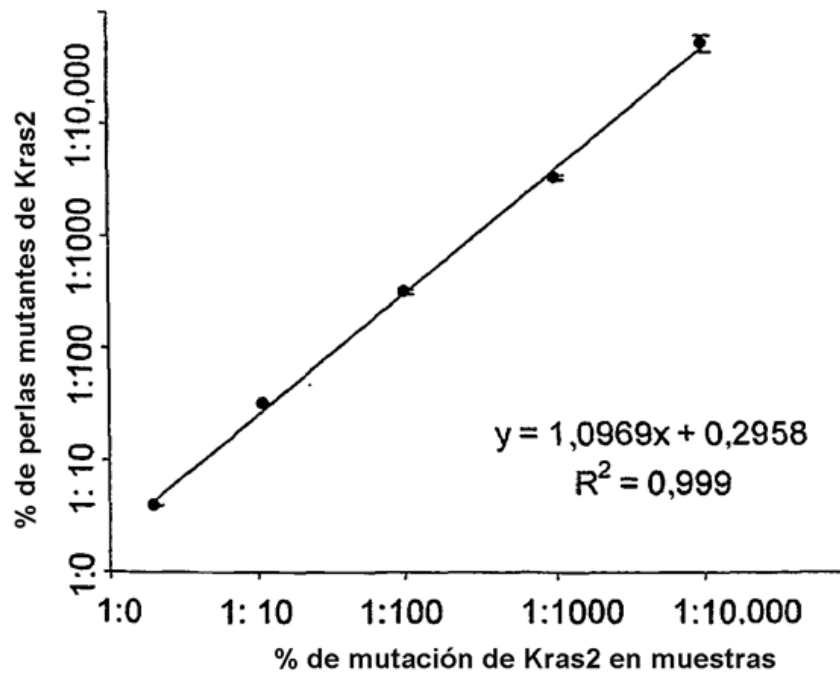
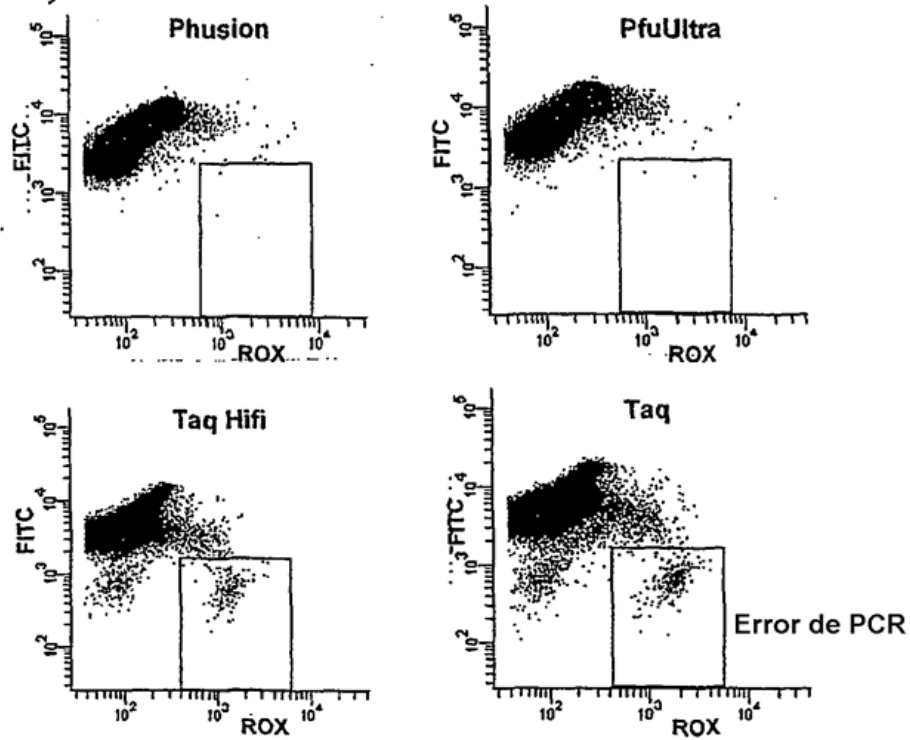
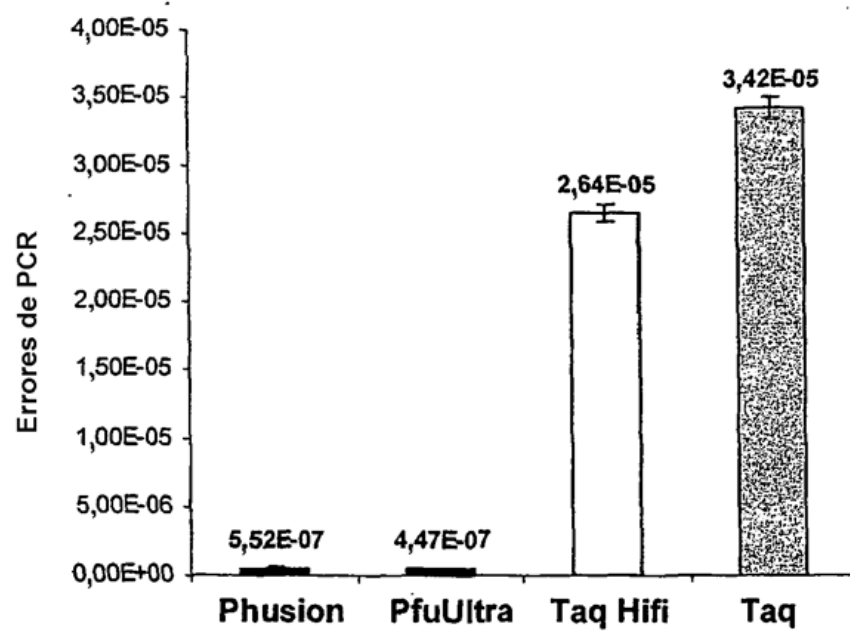


Figura 11

11a)



11b) Tasa de error de PCR de polimerasas en PIK3CA exón 20



11c) Tasa de error de PCR de polimerasas en TP53 exón 8