

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 853**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2010 E 10001883 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2224014**

54 Título: **Análisis miniaturizado de alto rendimiento de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

25.02.2009 EP 09002627

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

22.11.2013

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**FROELICH, THOMAS;
HEINDL, DIETER;
ROESLER, ANGELIKA y
HECKEL, TOBIAS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 430 853 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análisis miniaturizado de alto rendimiento de ácidos nucleicos

5 Esta invención está relacionada con el área de análisis de ácidos nucleicos y en particular la detección miniaturizada y altamente paralela de secuencias de ácidos nucleicos, y el análisis de diferencias en las secuencias de ácidos nucleicos.

10 La invención se basa en la idea de proporcionar un soporte sólido al que se unen los cebadores específicos de secuencia, siendo uno de ellos escindible y el otro no escindible, para poder analizar secuencias específicas o detectar la presencia de un SNP, una mutación o cualquier especie particular de DNA o RNA de interés.

Antecedentes de la materia

15 Recientemente, se describió un sistema de secuenciación de rendimiento ultraelevado basado en la secuenciación de pirofosfato que permite la secuenciación de un genoma bacteriano esencialmente en no más de una semana (WO 04/70007, WO 05/03375, Margulies, M., et al., Nature 437 (2005) 376-80). A partir de un DNA genómico fragmentado, se unen fragmentos de una sola molécula a cuentas que se capturan en una emulsión de mezcla de
20 reacción de PCR en aceite. Entonces, la amplificación resulta en una biblioteca de DNA amplificado de forma clónica en el que cada cuenta es portadora de varias copias del mismo fragmento.

Tras romper la emulsión y desnaturalizar los productos de PCR en cadenas sencillas, las cuentas se depositaron en múltiples pocillos de una placa picotitulada de fibra óptica de forma que un pocillo contenga no más de una única
25 cuenta. A continuación, en una secuenciación por reacción de síntesis, se realiza una reacción de extensión de los cebadores, en la que se proporcionan los 4 nucleósidos trifosfato diferentes A, G, C, y T o sus respectivos análogos en una serie repetitiva de eventos y la secuencia de la cadena naciente se infiere a partir de los productos químicos derivados a partir de la reacción de extensión catalizada por la polimerasa de DNA. En particular, la secuenciación mediante una reacción de síntesis es una reacción de secuenciación de pirofosfato, que se caracteriza por que la
30 generación de pirofosfato se detecta como sigue:

PPI + adenosina 5' fosfosulfato (APS) → ATP, catalizado en presencia de apirasa
ATP + luciferina → luz + oxiluciferina, catalizada en presencia de luciferasa.
Detección de la luminiscencia de la oxiluciferina

35 Con el sistema de secuenciación de rendimiento ultraelevado descrito en la WO 04/70007 y la WO 05/03375, pueden realizarse más de 1.000.000 de reacciones de secuenciación de pirofosfato de forma simultánea. La generación de pirofosfato inicia una cascada de reacción luminiscente y la luz se detecta finalmente con una cámara CCD.

40 Con respecto a esta tecnología, la WO 04/69849 describe un método para amplificar una pluralidad de ácidos nucleicos (por ejemplo, cada secuencia de una biblioteca de DNA, transcriptoma o genoma) de una forma rápida y económica en un único tubo de reacción. Más concretamente, la WO 04/69849 describe una amplificación clónica simultánea (por ejemplo, mediante PCR) de una pluralidad de muestras (tantas como varios cientos de miles) en un
45 recipiente de reacción. En este contexto, la WO 04/69849 proporciona un método para encapsular una pluralidad de muestras de DNA individualmente en una microcápsula de una emulsión (es decir un microreactor), realizando la amplificación de la pluralidad de muestras encapsuladas de ácidos nucleicos de forma simultánea, y liberando dicha pluralidad de cadenas de DNA amplificadas de las microcápsulas para subsiguientes reacciones. Por ejemplo, copias únicas de las especies molde de ácido nucleico se hibridan en las cuentas de captura que comprenden, por
50 ejemplo, oligonucleótidos de captura o grupos químicos que se unen a los moldes de ácidos nucleicos. Las cuentas se suspenden en una solución de amplificación completa y se emulsionan para producir microreactores (normalmente 100 a 200 micras de diámetro). Tras esto, la amplificación (por ejemplo, PCR) se utiliza para incrementar de forma clonal el número de copias de las especies de molde inicial en los microreactores, y estas copias se unen a las cuentas de captura en los microreactores. Alternativamente, las cuentas de captura se añaden a una mezcla de reacción de amplificación que comprende moldes de ácidos nucleicos y esta mezcla se emulsiona para producir microreactores. La amplificación (por ejemplo, PCR) se utiliza para incrementar de forma clonal el
55 número de copias de las especies de molde inicial en los microreactores, y estas copias se unen a las cuentas de captura en los microreactores. Así, los microreactores de acuerdo con la WO 05/03375 permiten la amplificación clonal simultánea y discreta de muchos moldes diferentes sin contaminación cruzada de los productos amplificados o reactivos, o dominación de un molde particular o grupo de moldes (por ejemplo, sesgo de PCR).

60 Sin embargo, de acuerdo con la WO 05/03375 es necesario realizar un paso de ligación del adaptador, en el que una pluralidad de diferentes moléculas de ácidos nucleicos se marca con una secuencia adaptadora que a continuación puede unirse a una cuenta con una secuencia adaptadora complementaria unida covalentemente.

65 Otra técnica de análisis de DNA importante es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) analítica. La cuantificación de la PCR, sin embargo, hasta la fecha se basa en formas de medida análogas. En algunos casos, sin

embargo, un principio de cuantificación digital sería muy deseable, por ejemplo en áreas como:

- detección del cáncer: cuantificación de alelos mutantes en un fondo en exceso de tipo salvaje
- detección de desequilibrio alélico
- expresión génica de transcritos raros y/o alelos mutantes en transcritos
- detección viral y cuantificación

Así, la disponibilidad de un contador digital de DNA/ cDNA/ mRNA aborda una necesidad no cubierta en la medicina molecular, muy relevante por ejemplo para el diagnóstico del cáncer, células tumorales circulantes, células embrionarias prenatales, en los que un evento específico se debe detectar de entre un elevado ruido de fondo.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un método mejorado y reactivos mejorados para el análisis simultáneo de múltiples moléculas de ácido nucleico.

En un aspecto particular, es objeto de la presente invención proporcionar un soporte sólido o una pluralidad de soportes sólidos que puedan utilizarse para mejorar el flujo de trabajo de la secuenciación descrito anteriormente o permitir el conteo digital de la PCR.

Varios soportes sólidos que comprenden ácidos nucleicos inmovilizados, como las cuentas que comprenden oligonucleótidos inmovilizados, son bien conocidos en la materia. El diseño exacto y la configuración de estas cuentas depende de la aplicación para la que se utilicen: Steinberg-Tatman, G., et al. (Bioconjugate Chemistry 17 (2006) 841-848) describe un método para la síntesis de cuentas con dos oligonucleótidos diferentes unidos a la superficie a través de un enlazante no escindible. Se utiliza un oligonucleótido como sonda de captura específico de secuencia y otro como secuencia decodificante.

Se han descrito realizaciones y aplicaciones específicas, por ejemplo, en las patentes WO 98/20019, WO 2008/061193, WO 2007/136736, y US 2007/087362.

La US 5.639.603 describe las cuentas con una o más colas decodificantes de oligonucleótidos inmovilizadas.

Xu, Xiaoyang; Rosi, Nathaniel, L.; Wang, Yuhuang; Huo, Fengwei; Mirkin, Chad A. Journal of the American Chemical Society 128(29) (2006) 9286-9287 describe partículas de oro con dos oligonucleótidos diferentes unidos a la superficie para conseguir nanoestructuras multipartículas ordenadas.

Las patentes WO 2001/062982 y US 5.641.658 describen una PCR sobre superficies de cuentas con dos cebadores inmovilizados. El método de PCR se denomina amplificación puente.

La WO 2001/012862 describe un método para generar una serie de oligonucleótidos mediante la escisión de diferentes oligonucleótidos que están unidos a un sustrato a través de un enlazante escindible diferente.

La WO 2007/111937 describe un chip de pares de cebadores, en el que al menos un cebador está unido a través de un enlace escindible, para el enriquecimiento de DNA genómico utilizado en secuenciación.

La KR 2007044677 describe cuentas con un primer y un segundo cebador de PCR inmovilizado para su utilización en una PCR en emulsión. La liberación de los cebadores se consigue modificando el valor del pH. Sin embargo, modificar el valor de pH tiene la desventaja de que puede producir potenciales reacciones colaterales no deseadas y además dificulta el posterior procesamiento de la muestra.

Breve descripción de la invención

Por lo tanto, la presente invención está dirigida a un método para tratar múltiples moléculas de ácido nucleico de interés, que comprende los pasos de

- a) proporcionar una pluralidad de cuentas, que se caracterizan por que cada cuenta comprende un par de cebadores de amplificación específicos de secuencia, y además se caracterizan por que uno de dichos cebadores está unido a la cuenta a través de un a través de un enlazante fotoescindible
- b) capturar las moléculas de ácido nucleico de interés de una muestra
- c) aislar de forma clonal dicha pluralidad de cuentas
- d) fotoescindir dicho primer cebador mientras el segundo cebador permanece unido de forma covalente,
- e) amplificar de forma clonal dichos ácidos nucleicos, creando así múltiples productos de amplificación
- f) analizar dichos productos de amplificación

En una primera realización principal, el paso c) comprende la generación de una emulsión en la que cada cuenta está encapsulada en una única micela. Preferiblemente, el paso f) comprende la distribución de dicha pluralidad de cuentas en las cavidades de una placa micro o picotitulada y la detección de dichos productos de amplificación.

- 5 En una primera realización en particular, el paso f) además comprende una reacción de secuenciación de dichos productos de amplificación. Preferiblemente, dicha reacción de secuenciación es una secuenciación mediante reacción de síntesis, por ejemplo una reacción de pirosecuenciación. En el caso de que las múltiples moléculas de ácido nucleico sean variantes del mismo tipo de ácido nucleico, tal método puede utilizarse para un análisis mutacional cuantitativo. En el caso de que la pluralidad de moléculas se corresponda con una pluralidad de diferentes RNA celulares o sus correspondientes cDNA, tal método puede utilizarse para monitorizar la expresión génica.
- 10 En una segunda realización particular, se monitoriza la generación de dichos productos de amplificación, por ejemplo mediante una PCR. Preferiblemente, dichos productos de amplificación se detectan mediante una entidad fluorescente de unión específica a DNA de doble cadena, una sonda de hibridación específica de secuencia. Además, dichos productos de amplificación pueden analizarse sometiendo dichos productos de amplificación a un gradiente térmico.
- 15 En una segunda realización principal, el paso c) comprende la distribución de dicha pluralidad de cuentas en las cavidades de una placa micro o picotitulada. Preferiblemente, los pasos e) y f) se realizan de forma simultánea mediante PCR a tiempo real. A continuación de la PCR puede realizarse un análisis de la curva de fusión.
- 20 También se encuentra dentro del alcance de la presente invención, en tanto que está relacionada con las realizaciones basadas en PCR, si al menos un cebador que esté unido a la cuenta a través de un enlazante escindible es portador de una señal detectable. Preferiblemente, dicha señal detectable se selecciona de entre un grupo que consiste en una señal de masa, marca de color, e-sígnal y un hapteno que sea detectable mediante un anticuerpo. Es altamente preferible una señal fluorescente que esté preferiblemente bloqueada mientras dicho cebador marcado no se haya elongado. Alternativamente; el cebador escindible es portador de una señal detectable.
- 25 En este caso, dichos productos de amplificación se detectan utilizando cebadores marcados o dNTP marcados. Por ejemplo, la señal detectable puede ser un hapteno como la biotina o la digoxigenina. En una realización particular, cada miembro de la pluralidad de cebadores que se unen a la cuenta a través de un enlazante escindible es portador de una señal detectable diferente.
- 30 En el caso de que la PCR se realice dentro del alcance de la presente invención y la pluralidad de ácidos nucleicos comprenda ácidos nucleicos estándar o ácidos nucleicos de referencia interna, la presente invención también es aplicable para la cuantificación absoluta de ácidos nucleicos. En el caso de que la PCR se realice dentro del alcance de la presente invención sobre una pluralidad de moléculas de ácido nucleico diferentes que son RNA celulares o sus correspondientes cDNA, la presente invención puede utilizarse para monitorizar la expresión génica.
- 35 En el caso de que la PCR se realice dentro del alcance de la presente invención y basada en los principios de la amplificación específica de alelo, es decir, si al menos un cebador comprende un residuo nucleotídico de discriminación en el extremo 3', el método de la invención puede aplicarse para realizar un análisis mutacional cuantitativo.
- 40 Como es conocido para el experto en la materia, los grupos de protección ortogonal pueden eliminarse de forma selectiva dependiendo de las condiciones aplicadas.
- 45 Breve descripción de las figuras
- Fig. 1. La Figura 1 ilustra el principio del ensayo en base a cebadores que son específicos de los ácidos nucleicos diana y están inmovilizados en un transportador sólido codificado (por ejemplo una cuenta). El cebador estacionario 1 se utiliza para la captura de la diana, mientras el cebador 2 se escindiría de forma fotolítica del transportador para dar lugar a una amplificación clonal de PCR de la diana capturada en emulsión.
- 50 Fig. 2. La Figura 2 ilustra la química de conjugación del éster de N-hidroxisuccinimida (NHS), en la que Rx=1 representa un cebador fotoescindible y Rx=2 un cebador estacionario.
- Fig. 3A-B. La medida de absorbancia de la Figura 3A demuestra la solubilización de una sonda de oligonucleótido modificada con fluoresceína (Id. de secuencia nº 1) cuando se escinde de forma fotolítica de cuentas de sefarosa. La medida de citometría de flujo en la Figura 3B muestra la fotoescisión indicada por la disminución de la intensidad de fluorescencia cuando las cuentas de sefarosa conjugadas con sondas de oligonucleótido modificada con fluoresceína (Id. de secuencia nº 1) se someten a una reacción de fotoescisión en suspensión o emulsión.
- 55 Fig. 4. La Figura 4 ilustra el ensayo de endonucleasas de restricción que detecta los productos de PCR convencionales y los productos de PCR inmovilizados en cuentas que son portadoras de un cebador estacionario y fotoescindible (Id. de secuencia nº 2, 3).
- 60 Fig. 5. La Figura 5 muestra la detección en gel de electroforesis y la identificación de DNA de doble cadena obtenido tras una PCR convencional o tras una PCR utilizando un cebador inmovilizado en una cuenta (Id. de secuencia nº 2, 3) en suspensión.
- 65

Fig. 6. La Figura 6 muestra la detección en gel de electroforesis y la identificación de DNA de doble cadena obtenido tras una PCR convencional o tras una PCR utilizando un cebador inmovilizado en una cuenta (Id. de secuencia nº 2, 3) en emulsión.

5 Fig. 7. La Figura 7 demuestra a través de un tratamiento con endonucleasas de restricción y electroforesis en gel que pueden obtenerse productos específicos de PCR con una PCR en emulsión y un cebador inmovilizado en una cuenta (Id. de secuencia nº 4, 5) utilizando cDNA de HeLa o un amplicón como molde.

10 Fig. 8. La Figura 8 ilustra el ensayo de endonucleasas de restricción que detecta los productos de PCR inmovilizados a un conjunto de cuentas distintas que son portadoras de un cebador estacionario y fotoescindible (Id. de secuencia nº 4-9) tras una PCR multiplex.

15 Fig. 9A-B. Los electroferogramas en las Figuras 9 A y B muestran la detección e identificación de DNA de doble cadena obtenido tras una PCR multiplex utilizando un conjunto de cebadores inmovilizados distintas cuentas (Id. de secuencia nº 4-9) en suspensión y en emulsión.

Descripción detallada de la invención

20 Así, la presente invención está dirigida a un soporte sólido que comprende al menos dos cebadores de amplificación específicos de secuencia en los que al menos un cebador está unido a dicho soporte mediante un enlazante escindible inducible.

25 En particular, si dicho soporte sólido es una cuenta, tal cuenta de acuerdo con la presente invención es especialmente útil para un método para analizar ácidos nucleicos poniendo en contacto dichos ácidos nucleicos con múltiples cuentas que comprenden un par de cebadores de captura y realizando a continuación una amplificación. En general, un método de acuerdo con la presente invención comprende las siguientes tres fases:

- 30
- selección de una o una mezcla de secuencias de interés sometiendo el DNA diana a las cuentas portadoras cada una de ellas de moléculas de captura específicas de secuencia individuales.
 - capturar estadísticamente una molécula diana por cuenta
 - amplificación mediante PCR; siendo el número de cuentas portadoras de material genético específico amplificado proporcional al número de moléculas diana específicas de secuencia.

35 Como consecuencia, la presente invención proporciona una posibilidad de for análisis muy en paralelo y miniaturizado de los ácidos nucleicos e incluye aplicaciones como la detección cualitativa y/o cuantitativa de genes de interés, análisis de la expresión génica y detección de mutaciones, pero no se limita a esto.

40 En el contexto de la presente invención, se deben aplicar las siguientes definiciones: "Múltiples moléculas de ácido nucleico" se entenderá como una población de moléculas caracterizadas porque al menos dos secuencias diferentes de ácido nucleico están representadas. En la mayoría de casos, una pluralidad de varias secuencias diferentes está representada.

45 "Pluralidad de cuentas" se entenderá como un número superior a 1000, preferiblemente más de 10.000 y más preferiblemente superior a 100.000 cuentas.

50 "Par de cebadores de amplificación específicos de secuencia" se entenderá como dos moléculas de oligonucleótido que juntas pueden actuar como un par de cebadores de amplificación de forma que durante una reacción de amplificación de ácidos nucleicos, se genera un producto de amplificación con una longitud definida.

55 "Enlazante escindible" se entenderá como una entidad química que comprende un enlace químico que con un tratamiento específico puede liberarse de forma que las partes que permanecen de la molécula quedan intactas. Preferiblemente, el enlazante escindible es un "enlazante escindible inducible" que se define como un enlazante escindible que puede liberarse al proporcionar un estímulo externo. Un ejemplo típico de enlazante escindible inducible es un enlazante fotoescindible, en el que el enlace se elimina mediante un tratamiento con luz de una longitud de onda definida.

60 "Capturar" se entenderá como (i) hibridar una población de moléculas de ácido nucleico con una secuencia específica de ácido nucleico que está inmovilizada sobre un soporte sólido, como una cuenta, y que es al menos parcialmente complementaria a la secuencia de interés que puede estar representada en dicha población de moléculas de ácido nucleico, y (ii) eliminar las moléculas de ácido nucleico no hibridadas de los complejos de hibridación formados.

65 "Aislar de forma clonal" se entenderá como separar una pluralidad de cuentas la una de la otra de forma que cada una de las cuentas se sitúe en una localización diferente. Preferiblemente tal localización es un micro o picopocillo.

"Amplificación clonal" se entenderá como una población de moléculas de ácido nucleico que se está amplificando de tal manera que los productos de amplificación que se originan de diferentes moléculas diana originales están separados físicamente los unos de los otros. Por ejemplo, todos los productos de amplificación que se originan de la misma molécula de ácido nucleico diana original pueden estar inmovilizados en una cuenta que está incluida en una micela.

"Emulsión" en el contexto de la presente invención se entenderá como una emulsión de agua en aceite, que se caracteriza por pequeñas gotas hidrofílicas que comprenden una única cuenta y que están encapsuladas en una micela que está rodeada por un líquido lipofílico.

"Secuenciación mediante síntesis" se entenderá como la determinación durante una reacción de extensión de un cebador, de si se ha incorporado un nucleósido trifosfato específico, que pueda elongarse durante el subsiguiente paso de la reacción de extensión del cebador.

"Someter a un gradiente térmico" se entenderá como calentar o enfriar una muestra de interés empezando a partir de una temperatura definida y acabando a una segunda temperatura definida. El gradiente puede ser un gradiente continuo, que es preferiblemente lineal, o alternativamente un gradiente por pasos. Si los productos de PCR o híbridos de sondas de ácido nucleico y moléculas diana se someten a tal gradiente, puede realizarse un análisis de la curva de fusión o una monitorización de la dependencia de la temperatura de la hibridación.

"PCR a tiempo real" se entenderá como una reacción en cadena de la polimerasa que se caracteriza por que el progreso de la reacción de amplificación se monitoriza al menos una vez en cada ciclo de amplificación. Preferiblemente, la amplificación se monitoriza con un colorante fluorescente intercalante o alternativamente, con una sonda de hibridación de ácido nucleico específica de amplicón como por ejemplo una sonda TaqMan nucleasa 5', una baliza molecular o un par de sondas de hibridación FRET.

"Bloquear la fluorescencia" se entenderá como una disminución de la emisión de fluorescencia de un compuesto fluorescente que está causada por una segunda entidad química que se encuentra cercana en el espacio a dicho compuesto fluorescente.

"Análisis mutacional cuantitativo" se entenderá como el método que comprende los pasos de (i) cribar una pluralidad de moléculas de ácido nucleico con secuencias esencialmente idénticas en busca de variaciones de la secuencia, y (ii) determinar la tasa o las tasas a las que al menos una o varias de tales variaciones de secuencia están presentes en dicha pluralidad de moléculas de ácido nucleico. Tales variaciones de secuencia pueden ser, por ejemplo, polimorfismos de un único nucleótido.

Preparación de un soporte sólido de acuerdo con la presente invención

La presente invención necesita una unión covalente reversible de un primer cebador de amplificación específico de secuencia a un soporte sólido a través de una molécula enlazante flexible y escindible de forma que el cebador pueda hibridarse con una molécula diana y liberarse a la solución para la amplificación y detección de la diana, mientras un segundo cebador de amplificación específico de secuencia permanece unido covalentemente a la superficie bajo las condiciones de escisión. La molécula enlazante escindible puede escindir-se mediante condiciones ácidas, básicas, luz o cualquier otro medio bien conocido para los expertos en la materia. Preferiblemente, es exactamente un cebador que está unido a una cuenta a través de un enlazante escindible.

En el caso de que el soporte sólido sea una cuenta o una pluralidad de cuentas, las cuentas poseen un tamaño promedio de entre alrededor de 10 nm a alrededor de 250 nm. Preferiblemente, las cuentas poseen un diámetro promedio de entre alrededor de 20 a alrededor de 100 nm. Muy preferiblemente, las cuentas poseen un diámetro promedio de entre alrededor de 30 nm y 80 nm. Por ejemplo, las cuentas pueden tener un diámetro promedio de alrededor de 40 nm.

El material de las cuentas a las que los dos cebadores deben unirse debe ser estable frente a la oxidación y la hidrólisis, y puede ser inorgánico, por ejemplo silicona o dióxido de titanio, u óxido de aluminio o vidrio; u orgánico, por ejemplo poliestireno, celulosa, poliamida y otros. Una cuenta es de un material puro o está compuesta de dos o más materiales, mientras los dos o más materiales estén mezclados o ensamblados de forma ordenada como en las partículas con núcleo.

La superficie de las cuentas puede ser porosa o plana. La superficie de una cuenta se funcionaliza de tal manera que puedan unirse los oligonucleótidos. Por lo tanto, la superficie de las cuentas posee una superficie con una función, lo que comprende grupos funcionales como grupos amino, tiol, carboxil, maleinimido, azido, alquino, hidrazina, hidroxilamino, ceto y aldehído, cloruro de triazina, quinonas, dieno, u otras funciones reactivas conocidas por los expertos en la materia.

La correspondiente modificación del oligonucleótido se determina por el grupo funcional de la superficie como puede verse en la siguiente tabla:

Tabla 1

Grupo funcional del oligonucleótido	Grupo funcional necesario en la cuenta
amino	carboxi o aldehído
alquino	azida
azida	alquino
hidrazina o hidroxilamino	aldehído, ceto o carboxi
cloruro de triazina	amino o tiol
tiol	Maleinimido, sulfonilalqueno o yodoacetilo
aldehído o ceto	Amino, hidracina, hidroxilamino
quinonas	amino
dienos	maleinimido

5 El grupo funcional se introduce en la superficie, por ejemplo mediante silanización de óxidos de vidrio-silicato lantánido con un silano modificado, o la cuenta en sí misma contiene *a priori* grupos funcionales que se han creado durante la producción de la cuenta, por ejemplo mediante copolimerización del poliestireno y un alqueno apropiado que contiene el grupo funcional. Los grupos funcionales presentes *a priori* podrían transformarse en otros grupos funcionales utilizando enlazantes heterobifuncionales. Tales enlazantes pueden ser escindibles o no escindibles. Mediante este procedimiento pueden obtenerse cuentas con diferentes funcionalidades ortogonales.

10 Ortogonal significa que un primer grupo funcional reacciona con un primer oligonucleótido modificado en presencia de un segundo grupo funcional que reacciona de forma simultánea con el segundo oligonucleótido modificado. Un par de tales grupos funcionales son succinilamidocarboxi y alquino, que requieren un oligonucleótido modificado amino y azida.

15 La unión secuencial de dos oligonucleótidos diferentes al mismo tipo de grupo funcional en superficie se consigue utilizando grupos protectores ortogonales (Steinberg-Tatman, G., et al., Bioconjugate Chemistry 17 (2006) 841-848).

20 Si la cuenta es una partícula de oro o la cuenta está recubierta con una película de metal, por ejemplo con oro, los oligonucleótidos modificados tiol se hacen reaccionar directamente con la superficie.

25 Los métodos generales para la unión covalente de un cebador a un soporte sólido son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, los oligonucleótidos cebadores se sintetizan en primer lugar mediante química estandar de fosforamidita. Tal cebador sintetizado puede modificarse posteriormente con una molécula enlazante escindible, tanto durante como a continuación de la síntesis del oligonucleótido. La unión de un cebador escindible y un cebador no escindible puede conseguirse mediante cualquier método de química de unión múltiple bien conocido descrito en la literatura para las tecnologías de microchip o cualquier otro método conocido. Ejemplos se describen y revisan en

30 - Wittebolle, Lieven; Verstuyft, Karmen; Verstraete, Willy; Boon. Nico. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 81(3) (2006) 476-480.

- Steinberg, Gali; Stromsborg, Katie; Thomas, Lynette; Barker, David; Zhao. Chanfeng. Biopolymers 73(5) (2004) 597-605,

35 - Di Giusto, Daniel, A.; King, Garry, C. Topics in Current Chemistry 261 (2005) (Immobilisation of DNA on Chips II) 131-168,

- Zatsepin, Timofei, S.; Stetsenko, Dmitry, A.; Gait, Michael, J.; Oretskaya, Tatiana, S., Bioconjugate Chemistry 16 (3) (2005) 471-489.

40 El soporte sólido y preferiblemente la cuenta, que de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos cebadores específicos de secuencia, en la que al menos uno de dichos cebadores es escindible, se prepara de una nueva forma no predecible combinando diferentes pasos de química de fase sólida y síntesis de oligonucleótido cuyos pasos individuales per se son conocidos en la materia. Así, el soporte sólido de acuerdo con la presente invención se prepara mediante un método que comprende los pasos de

45 - proporcionar un soporte sólido que sea portador de al menos uno o más grupos funcionales, y
- hacer reaccionar dichos uno o más grupos funcionales con el o los grupos reactivos de dos cebadores específicos de secuencia,

50 En la que una porción reactiva escindible está presente en uno de los espaciadores que conectan dicho soporte sólido con su grupo funcional o bien uno de sus grupos funcionales o dicha porción escindible está presente en uno de los espaciadores que conectan uno de dichos cebadores específicos de secuencia con su grupo reactivo.

Existen al menos seis alternativas para producir tal soporte sólido:

55 (i) en una primera realización, el método de acuerdo con la presente invención comprende los pasos de

- 5 - proporcionar un soporte sólido que comprende dos grupos funcionales independientes cada uno de los cuales portador de un grupo protector diferente,
 - desproteger un primer grupo funcional y hacer reaccionar dicho grupo con el grupo reactivo de un primer cebador, y dicho cebador se caracteriza por ser portador de una entidad escindible entre su grupo reactivo y la secuencia de nucleótidos en sí, y
 - desproteger el segundo grupo funcional y hacer reaccionar dicho grupo de dicha cuenta con el grupo reactivo de un segundo cebador.
- 10 (ii) en una segunda realización, el método de acuerdo con la presente invención comprende los pasos de
 - proporcionar un soporte sólido que comprende dos grupos funcionales independientes, cada uno de los cuales es portador de un grupo protector diferente, y en el que uno de dichos grupos funcionales está conectado al soporte sólido a través de un cebador escindible
 15 - desproteger un primer grupo funcional y hacer reaccionar dicho grupo con el grupo reactivo de un primer cebador, y
 - desproteger el segundo grupo funcional y hacer reaccionar dicho grupo de dicha cuenta con el grupo reactivo de un segundo cebador.
- 20 (iii) en una tercera realización, el método de acuerdo con la presente invención comprende los pasos de
 - proporcionar un soporte sólido que comprende dos grupos funcionales, cada uno de los cuales es portador de un grupo protector diferente, y estando conectados dichos grupos funcionales al soporte sólido a través de un enlazante ramificado,
 25 - desproteger un primer grupo funcional y hacer reaccionar dicho grupo con el grupo reactivo de un primer cebador, y dicho cebador se caracteriza por ser portador de una entidad escindible entre su grupo reactivo y la secuencia de nucleótido en sí misma, y
 - desproteger el segundo grupo funcional y hacer reaccionar dicho grupo de dicha cuenta con el grupo reactivo de un segundo cebador.
- 30 (iv) en una cuarta realización, el método de acuerdo con la presente invención comprende los pasos de
 - proporcionar un soporte sólido que comprende dos grupos funcionales, cada uno de los cuales es portador de un grupo protector diferente, y estando conectados dicho grupos funcionales al soporte sólido a través de un enlazante ramificado, en el que dicho grupo funcional está conectado al soporte sólido a través de un cebador escindible
 35 - desproteger un primer grupo funcional y hacer reaccionar dicho grupo con el grupo reactivo de un primer cebador, y
 - desproteger el segundo grupo funcional y hacer reaccionar dicho grupo de dicha cuenta con el grupo reactivo de un segundo cebador.
- 40 (v) en una quinta realización, el método de acuerdo con la presente invención comprende los pasos de
 - proporcionar un soporte sólido portador de exactamente un grupo funcional,
 - desproteger dicho grupo funcional, y
 45 - hacer reaccionar dicho grupo con una mezcla de un primer y un segundo cebador específico de secuencia, y dichos primer y segundo cebadores que comprenden idénticos grupos reactivos, se caracterizan porque al menos uno de dichos cebadores está conectado a su grupo reactivo a través de una porción escindible.
- (vi) en una sexta realización el método de acuerdo con la presente invención comprende los pasos de
 50 - proporcionar una cuenta portadora de exactamente un grupo funcional, y
 - desproteger dicho grupo funcional y hacer reaccionar dicho grupo con un oligonucleótido que representa un primer y un segundo cebador de amplificación, que están conectados mediante una porción escindible.
- 55 Diferentes tipos de enlazantes pueden utilizarse para preparar cuentas de acuerdo con la invención. Los enlazantes amino-modificados o enlazantes biotina-modificados pueden utilizarse para la unión de grupos amino o biotina al extremo de un oligonucleótido, y los enlazantes fotoescindibles internos pueden utilizarse en combinación con cualquier otro modificador.
- 60 Los enlazantes escindibles son bien conocidos en la materia y pueden clasificarse en dos clases. La primera clase requiere una especie reactiva, por ejemplo una especie reductiva, OH⁻ o H⁺ para conseguir la escisión. Ejemplos son los puentes disulfuro que pueden escindirse mediante reducción con tioles o "enlazantes" lábiles básicos como un monómero de RNA incorporado en el extremo de un oligonucleótido. La segunda clase se escinde mediante métodos físicos, por ejemplo mediante irradiación como la iluminación o el calentamiento.
- 65 Los enlazantes fotoescindibles son enlazantes en los que un enlace covalente se rompe mediante irradiación con luz. La longitud de onda de irradiación debe escogerse de tal manera que las nucleobases de los oligonucleótidos

unidos no absorban, para evitar reacciones colaterales como la dimerización T-T o la fotooxidación. Si se unen colorantes orgánicos a la cuenta, por ejemplo con una sonda de detección, la longitud de onda de irradiación no coincidirá con la absorción de tales colorantes.

5 Normalmente los enlazantes fotoescindibles adecuados se derivan por ejemplo a partir de ortonitrobenzilalcoholes, y son conocidos en la literatura. La fotoescisión se consigue mediante irradiación con luz UV de longitud de onda > 340 nm.

10 Los enlazantes fotoescindibles que pueden introducirse durante la síntesis de oligonucleótidos se describen por ejemplo en las siguientes referencias:

- WO 92/002528,

- WO 07/082713

- US 5.258.506

15 - Olejnik, Jerzy; Krzymanska-Olejnik, Edyta; Rothschild, Kenneth, J., *Nucleic Acids Research* 26(15) (1998) 3572-3576.

- Hausch, F., Jäschke, A., *Nucleic Acids Research* 28 (2000) e35.

- Hausch, F., Jäschke, A., *Tetrahedron* 57 (2001) 1261-1268.

20 - Wenzel, T., Ellsner, T., Fahr, K., Bimmler, J., Richter, S., Thomas, I., Kostrzewa, M., *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 22 (2003) 1579-1581.

- Dell'Aquila, Christelle; Imbach, Jean-Louis; Rayner, Bernard, *Tetrahedron Letters* 38(30) (1997) 5289-5292

- Ordoukhanian, Phillip; Taylor, John-Stephen. *Journal of the American Chemical Society* 117(37) (1995) 9570-1.

- Saran, Dayal; Burke, Donald, H., *Bioconjugate Chemistry* 18(1) (2007) 275-279.

- Piggott, Andrew, M.; Karuso, Peter, *Tetrahedron Letters* 46(47) (2005) 8241-8244.

25 Un modo particular de fotoescisión indirecta puede conseguirse mediante fotogeneración de especies reactivas como H⁺ o OH⁻, cuando la formación de tales especies reactivas resulta en la escisión de un enlace covalente lábil en ambiente básico o ácido. Las patentes WO 2006/117556 y WO 99/41007 describen métodos de fotogeneración de ácidos y bases. Los enlazantes lábiles en ambiente básico o ácido son bien conocidos en la materia (por ejemplo
30 Chitkul, B.; Atrash, B.; Bradley, M., *Tetrahedron Letters* 42(35) (2001) 6211-6214).

Un enlazante escindible térmicamente se describe en Keller, Keith, A.; Guo, Jianhua; Punna, Sreenivas; Finn, M., G., *Tetrahedron Letters* 46(7) (2005) 1181-1184.

35 Los oligonucleótidos inmovilizados están en cada caso unidos a la superficie de tal manera que se facilite la captura de diana inicial y que la PCR siga siendo eficiente incluso con un cebador inmovilizado. Esto se consigue dejando un espacio suficiente entre la superficie de la cuenta y la secuencia del cebador. Por lo tanto, enlazantes largos como los enlazantes con PEG o múltiples enlazantes cortos están unidos a los oligonucleótidos. Un segundo parámetro que influencia la captura es la densidad de carga de la superficie de la cuenta, que puede controlarse mediante un
40 proceso apropiado de producción de las cuentas o mediante dilución de los oligonucleótidos que se van a inmovilizar con compuestos no nucleotídicos con el mismo grupo funcional que el oligonucleótido a inmovilizar.

Utilización de un soporte sólido de acuerdo con la presente invención

45 Como se ha mencionado anteriormente, el soporte sólido de la presente invención puede ser una cuenta o una pluralidad de cuentas. Las cuentas de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse en un método para analizar múltiples moléculas de ácido nucleico de interés que comprende los siguientes pasos

50 a) proporcionar una pluralidad de cuentas, que se caracterizan por que cada cuenta comprende al menos un par de cebadores de amplificación específicos de secuencia, y que además se caracteriza por que al menos uno de dichos cebadores está unido a la cuenta a través de un enlazante escindible

b) capturar las moléculas de ácidos nucleicos de interés de una muestra

c) aislar de forma clonal dicha pluralidad de cuentas

d) escindir al menos uno de dichos cebadores

55 e) amplificar de forma clonal dichos ácidos nucleicos, creando así múltiples productos de amplificación

f) analizar dichos productos de amplificación.

60 Un esquema general de ejemplo se muestra en la Fig.1: Una muestra se somete a una población de cuentas que comprenden un par de cebadores de amplificación, uno de los cuales es fotoescindible (pasos a, b). La amplificación clonal se consigue mediante la realización de una PCR en emulsión (pasos c, d, e). A continuación, los productos de amplificación se analizan (paso f).

En detalle, los pasos generales se realizan como sigue:

65 a) proporcionar una pluralidad de cuentas

La preparación de dichas cuentas se ha descrito en detalle anteriormente.

b) capturar las moléculas de ácido nucleico de interés a partir de una muestra

5 Las moléculas diana se hibridan entonces con las cuentas que contienen el cebador escindible y el no escindible. Las condiciones de hibridación adecuadas con respecto al sistema de tamponado apropiado y las temperaturas de hibridación apropiadas son bien conocidas en la materia y pueden optimizarse de acuerdo con las condiciones específicas como las longitudes y secuencias de los cebadores de amplificación especialmente utilizados. Preferiblemente la hibridación se realiza utilizando un exceso molar de cuentas comparado con la secuencia o
10 secuencias que deben amplificarse, para capturar tantos ácidos nucleicos diana como sea posible. En particular, un exceso molar de 1:5 - 1:100, y preferiblemente de 1:10 - 1:50 se ha comprobado que es particularmente ventajoso. Si deben detectarse y/o analizarse múltiples secuencias diana diferentes, entonces debe utilizarse una biblioteca de cuentas con múltiples pares de cebadores diferentes de acuerdo con ellas.

15 c) aislamiento clonal de dicha pluralidad de cuentas

El aislamiento clonal es un prerrequisito con el fin de obtener datos cuantitativos con respecto a variaciones de secuencia que están presentes en la pluralidad de moléculas de ácidos nucleicos que están siendo analizadas. En principio, hay dos modos diferentes de aislamiento clonal.

20 En una primera realización, se añaden primero a las cuentas los reactivos de PCR como la DNA polimerasa termoestable, los desoxinucleósidos trifosfato y un tampón apropiado. A continuación, se genera una emulsión de agua en aceite que se caracteriza en que cada cuenta está encapsulada en una sola micela que contiene una solución acuosa que permite una reacción de amplificación de ácidos nucleicos. Las condiciones apropiadas se describen por ejemplo en el documento WO 04 / 069849.

25 En una realización muy preferible, unas 3.000 cuentas se contienen dentro de 1 microlitro de una emulsión de agua en aceite 1:2.

30 En una segunda realización alternativa, el paso c) comprende la distribución de dicha pluralidad de cuentas en las cavidades de una placa micro o picotitulada. El tamaño de las cavidades se corresponde con el diámetro de las cuentas de tal manera que una cavidad sólo puede contener una cuenta.

35 La distribución de las cuentas en las cavidades se puede obtener por ejemplo mediante agitación constante y suave o mediante centrifugación. Los reactivos de PCR, tales como la DNA polimerasa termoestable, los trifosfatos de desoxinucleósidos y un tampón apropiado se añaden ya sea antes o preferiblemente después de la distribución de las cuentas en las cavidades de la placa micro - o picotitulada. Alternativamente la adición de dichos reactivos de PCR se puede realizar después del paso d).

40 d) Escisión de un cebador

Las cuentas que comprenden dicho cebador que está unido a través de un enlazante escindible se expuso a continuación a las condiciones de escisión con el fin de cortar el enlazante unido al cebador escindible de la cuenta. En caso de haberse logrado el aislamiento clonal mediante la distribución de dicha pluralidad de cuentas en las
45 cavidades de una placa micro -o picotitulada, la molécula enlazante escindible puede escindirse mediante ácidos, bases, luz o cualquier otro medio bien conocido por los expertos en la materia. Preferiblemente, el enlazante es un enlazante fotoescindible porque así se evita la adición de un reactivo adicional.

50 En caso de haberse logrado el aislamiento clonal mediante la generación de una emulsión de agua en aceite, es incluso necesaria para utilizar un método de escisión, que se basa en la fotoactivación. En este sentido, hay varios métodos conocidos en la materia.

e) Amplificación clonal de dichos ácidos nucleicos para crear múltiples productos de amplificación

55 Las mezclas de reacción se exponen entonces a un protocolo de termociclado apropiado para realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos. El cebador de amplificación (no escindible) todavía inmovilizado, se hibrida con la molécula de ácido nucleico diana, así como a los productos amplificados manteniéndolos así en la superficie de la cuenta. El cebador de amplificación que se ha escindido de la cuenta es capaz de moverse libremente en la solución, de manera que se puede realizar una reacción de amplificación efectiva.

60 Como consecuencia, la presente invención proporciona también un método para la producción de una pluralidad de cuentas portadoras de moldes de ácidos nucleicos en el que cada cuenta comprende hasta y más de 1.000.000 de copias de una sola secuencia de ácidos nucleicos. Bajo condiciones optimizadas, cada cuenta puede comprender más de 20 millones de copias de un solo ácido nucleico.

65

Con el fin de evitar la generación de productos de amplificación inespecíficos, es altamente ventajoso aplicar un protocolo de PCR denominado de inicio caliente. Varios métodos son conocidos en la materia. Por ejemplo, es posible utilizar DNA polimerasa que está inactivada de forma reversible como resultado de una modificación química sensible al calor. (US 5.773.258, US 5.677.152). Un enfoque alternativo para lograr la inhibición sensible al calor de la DNA polimerasa Taq es la adición de anticuerpos monoclonales producidos contra la enzima purificada (Kellogg, D., E., et al., *Biotechniques* 16 (1994) 1134-7). Alternativamente, pueden añadirse a la mezcla de reacción fragmentos cortos de DNA de doble hebra (Kainz, P. et al. *Biotechniques* 28 (2000)278-82) o aptámeros de oligonucleótidos (US 5.693.502), (Lin, Y., Jayasena, S., D., J. Mol. Biol. 271 (1997) 100-11) con el fin de generar un efecto de inicio caliente. Todavía alternativamente, la PE 0 799 888 describe la adición de oligonucleótidos bloqueados en 3' a las reacciones de PCR. Debido al bloqueo en 3', estos oligonucleótidos no pueden actuar como cebadores. Los oligonucleótidos bloqueados están diseñados para competir / interactuar con los cebadores de PCR que se traduce en la reducción de productos no específicos. Otra alternativa es la utilización de cebadores oligonucleótidos fosforotioato en combinación con una exonucleasa III en las mezclas de reacción de PCR (PE 0 744 470). En este caso, una exonucleasa 3', que normalmente acepta sustratos de doble cadena, así como sustratos de DNA de cadena simple, degrada los artefactos dúplex, tales como dímeros de cebadores, así como amplicones por contaminación cruzada, dejando los cebadores de amplificación de cadena sencilla sin degradar. Del mismo modo, se ha sugerido el uso de cebadores abásicos con extremos 3' modificados y la eliminación dependiente de molde por endonucleasa IV de *E. coli* (US 5.792.607). Una realización particular de la idea general se encuentra en el documento PE 1 275 735. Su especificación da a conocer una composición para realizar una reacción de amplificación de ácidos nucleicos que comprende (i) una DNA polimerasa termoestable, (ii) una exonucleasa 3' - 5' termoestable, y (iii) al menos un cebador para la amplificación de ácidos nucleicos con un residuo terminal 3' modificado que no es extendido por dicha DNA polimerasa termoestable, así como métodos para realizar una reacción de PCR utilizando esta composición.

En una realización particular, la amplificación clonal puede llevarse a cabo en forma de una PCR específica de alelo. En este método de detección se utilizan variantes específicas de cebadores de amplificación durante la amplificación, que por lo general tiene un residuo de nucleótidos terminal de discriminación en el extremo 3' del cebador que es complementaria sólo a una variante especial de los ácidos nucleicos diana a detectar. US 5.595.890 describe por ejemplo tales métodos de amplificación específicos de alelo y su uso para detectar mutaciones puntuales clínicamente relevantes por ejemplo en el oncogén k-Ras. US 5.521.301 describe también métodos para la amplificación específica de alelo para el genotipado del sistema de grupos sanguíneos AB0. Por otro lado, US 5.639.611 describe el uso de amplificación específica de alelo en conexión con la detección de la mutación puntual responsable de la anemia por células falciformes. Tales métodos para la detección de variantes de secuencia, polimorfismos y, sobre todo, mutaciones puntuales requieren una amplificación específica de alelo en particular cuando la variante de secuencia a detectar está presente en una cantidad menor en comparación con una variante de la misma sección de ácidos nucleicos (o del mismo gen) que está presente en exceso. Esta situación por ejemplo se produce cuando el objetivo es detectar células tumorales que se difunden por los fluidos corporales tales como sangre, suero o plasma con la ayuda de la amplificación específica de alelo (US 5.496.699). Para este fin, el DNA se aisló en primer lugar a partir de fluidos corporales tales como sangre, suero o plasma que se compone de una cantidad relativamente pequeña de DNA a partir de células tumorales en difusión y un exceso de DNA de las células no proliferantes. Por lo tanto las mutaciones en el gen K-Ras que son significativas para el DNA tumoral tienen que detectarse sobre la base de unas pocas copias de DNA tumoral en presencia de un exceso de DNA de tipo salvaje.

f) análisis de dichos productos de amplificación

En el caso de lograr el aislamiento clonal del paso c) por medio de la generación de una emulsión de agua en aceite, es necesario que en un primer paso, la pluralidad de cuentas portadoras de productos de amplificación se distribuyan en las cavidades de una placa micro o picotitulada. A continuación existen dos realizaciones alternativas para el análisis de los productos de amplificación generados.

(i) Secuenciación

En una primera realización, el DNA unido a cada cuenta puede someterse a una reacción de secuenciación. Preferiblemente, dicha reacción de secuenciación es una secuenciación mediante reacción de síntesis, que se caracteriza en que se monitoriza la incorporación de desoxinucleósidos específicos en la cadena de DNA naciente de una reacción de extensión por cebador. Más preferiblemente, dicha secuenciación mediante reacción de síntesis es una reacción de secuenciación con pirofosfato, en la que dicha incorporación se está monitorizando por medio de la detección de la generación de pirofosfato (PE 932 700 , US 6.210.891).

Mediante la proporción de cuentas específicas de secuencia, se evita la preamplificación de una diana determinada mediante PCR que es necesaria de acuerdo con los métodos conocidos en la materia. En su lugar, de acuerdo con la presente invención, la emPCR sí se realiza con múltiples cuentas, pero todas las cuentas son portadoras del mismo par de cebadores de amplificación. Más precisamente, las cuentas poseen un cebador directo y otro reverso inmovilizado, ambos específicos del mismo gen. El cebador no escindible puede tener una secuencia adicional en el extremo 5' seguido de una secuencia de cebado de un gen específico. El cebador escindible posee una secuencia específica en el extremo 5', que antes de la reacción de secuenciación puede actuar como un sitio de unión del

cebador de secuenciación. La parte 3' de dicho cebador escindible tiene a continuación una secuencia específica de genes. Es menos preferible pero aún dentro del alcance de la presente invención, si la secuencia correspondiente al sitio de unión del cebador de secuenciación está presente en el extremo 5' del cebador no escindible.

5 Pueden juntarse muchas cuentas diferentes, cada una con diferentes parejas de cebadores para genes. La diana se hibrida a continuación sobre las cuentas en una reacción de captura. A continuación, se genera una emulsión adecuada para emPCR. La emulsión entonces se somete a las condiciones que romperán el enlazante escindible. Las cuentas se someten entonces a "amplificación clonal" mediante emPCR. Después de la rotura de la emulsión y del lavado, las cuentas se separan físicamente en una placa picotitulada y el producto de amplificación se descodifica / detecta y / o cuantifica mediante secuenciación, por ejemplo con el instrumento Genome Sequencer
10 FLX (Roche Applied Science N° de cat. 04 896 548 001).

En resumen, las principales ventajas son:

15 - que la Diana se puede añadir directamente a las cuentas
- no es necesaria la preamplificación de los genes o amplicones de interés
- Existe la posibilidad de suministrar un conjunto de cuentas de captura específicas de secuencia.

20 Los conjuntos de cuentas de captura específicas de secuencia se pueden agrupar en aplicaciones específicas como la expresión génica de genes oncológicos relevantes y otros.

(ii) análisis de la PCR

25 En una segunda realización alternativa, el DNA amplificado que todavía está unido a la cuenta puede analizarse directamente mediante métodos de detección apropiados. En otras palabras: se realice un ensayo de PCR que se caracteriza en que la generación del amplicón se somete a una medición final.

30 Las cuentas poseen un cebador directo y reverso inmovilizado, ambos específicos para una región de secuencia génica o de ácidos nucleicos de interés. Uno de los cebadores es escindible, y el segundo cebador no es escindible. Se juntan muchas cuentas diferentes, cada una contiene parejas de cebadores para diferentes genes/secuencias. La muestra de ácidos nucleicos diana se hibrida con las cuentas en una reacción de captura. Se genera una emulsión adecuada para emPCR. La emulsión se somete entonces a condiciones que rompe el enlazante escindible. A continuación, las cuentas se someten a "amplificación clonal" mediante emPCR. Después de romper en la emulsión y lavar las cuentas se separan físicamente en una PTP (placa picotitulada) y el producto de amplificación se detecta en un ensayo final. En una realización particular, dicha detección se realice mediante métodos de someter los amplicones generados en un gradiente térmico. Como consecuencia, es posible realizar un análisis de la curva de fusión. (US 6.174.670, US 5.871.908).

40 Los productos de amplificación se detectan preferiblemente mediante fluorescencia. Por ejemplo, la mezcla de amplificación puede contener ya una porción de unión a ácidos nucleicos de doble cadena como un colorante fluorescente de unión a DNA que emite una señal de fluorescencia correspondiente tras la interacción con los ácidos nucleicos de doble cadena tras la excitación con luz de una longitud de onda adecuada. Los colorantes SybrGreen1 y SybrGold (Molecular Probes) o colorantes como los descritos en WO 2004/038038 se ha demostrado que son particularmente adecuados para esta solicitud. También pueden utilizarse alternativamente otros colorantes intercalantes.
45

Debido al hecho de que la detección del amplicón con el formato SybrGreen no puede discriminar entre productos específicos y artefactos de amplificación tales como cebador / dímeros, se realiza generalmente después un análisis de la curva de fusión. Después de completar la reacción de PCR, la temperatura de la muestra se incrementa constitutivamente, y se detecta la fluorescencia siempre que SybrGreen está unido al DNA de doble cadena presente en las muestras. Tras la disociación del DNA de doble cadena la señal disminuye inmediatamente. Esta disminución se monitoriza con una fluorescencia apropiada frente a una gráfica de temperatura-tiempo como el que puede determinarse de tal manera que un primer valor derivado puede determinarse, en la que se observa la máxima disminución de fluorescencia. Dado que los DNA de doble cadena cebador / dímero son generalmente cortos, la disociación en el DNA monocatenario se produce a temperaturas más bajas en comparación con la disociación del producto de amplificación específico de doble cadena.
50
55

Alternativamente, la mezcla de amplificación puede contener ya una o más sondas de hibridación que se etiquetan con al menos una porción fluorescente. En este contexto de la presente invención, las balizas moleculares, sondas de hibridación y las sondas únicas marcadas son particularmente útiles.
60

Las sondas de hibridación de balizas moleculares se marcan con un primer componente y con un extintor, estando los marcajes situados preferiblemente en ambos extremos de la sonda. Como resultado de la estructura secundaria de la sonda, ambos componentes se encuentran espacialmente próximos en la solución. Después de la hibridación a la diana ácidos nucleicos ambos componentes se separan el uno del otro de tal manera que después de la
65

excitación con luz de una longitud de onda adecuada, se puede medir la emisión de fluorescencia del primer componente (US 5.118.801).

5 El formato de la prueba de hibridación de la sonda FRET es especialmente útil para todo tipo de ensayos de hibridación homogéneos (Matthews, J., A., Kricka, L., J., Analytical Biochemistry 169 (1988) 1-25). Se caracteriza por dos sondas de hibridación de cadena simple que se utilizan de forma simultánea y son complementarias a sitios adyacentes de la misma cadena del ácido nucleico diana amplificado. Ambas sondas se marcan con diferentes componentes fluorescentes. Cuando se excita con luz de una longitud de onda adecuada, un primer componente transfiere la energía absorbida en el Segundo componente de acuerdo con el principio de la transferencia de energía de resonancia por fluorescencia de tal manera que un componente de emisión de fluorescencia del segundo componente se puede medir cuando ambas sondas se unen a posiciones adyacentes de la molécula diana a detectar. Alternativamente para monitorizar el aumento de la fluorescencia del componente aceptor de FRET, también es posible monitorizar la disminución de la fluorescencia del componente donador de FRET como medición cuantitativa del evento de hibridación.

10 La sonda con marcaje único consta de un único oligonucleótido marcado con una única tinción fluorescente, ya sea en el extremo 5' o 3' (WO 02/14555). Pueden utilizarse dos diseños diferentes: sondas G-atenuantes y sondas nitroindol-desatenuantes. En la realización G-atenuantes, el colorante fluorescente está unido a una C en el extremo 5' o el extremo 3' del oligo. La fluorescencia disminuye significativamente cuando la sonda se hibrida a la diana, en el caso que dos G se encuentren en la cadena diana opuesta a C y en la posición 1 a un lado de la sonda de oligonucleótido complementario. En la realización de desatenuación por nitroindol, el colorante fluorescente está unido a nitroindol en el extremo 5' o 3' del oligonucleótido. El nitroindol de alguna manera disminuye la señal fluorescente de la sonda libre. La fluorescencia aumenta cuando la sonda se hibrida con el DNA diana debido a un efecto de desatenuación.

15 Todas las sondas de hibridación descritas anteriormente se utilizan para el análisis de la curva de fusión. En un ensayo de este tipo, los ácidos nucleicos diana se amplifican primero en una típica reacción de PCR con cebadores de amplificación adecuados. Las sondas de hibridación pueden ya estar presentes durante la reacción de amplificación o se añaden posteriormente. Después de completar la reacción de PCR, la temperatura de la muestra se incrementa constitutivamente, y se detecta la fluorescencia siempre que la sonda de hibridación se una al DNA diana. A la temperatura de fusión, las sondas de hibridación se liberan de su diana, y la señal fluorescente disminuye inmediatamente hasta el nivel de fondo. Esta disminución se monitoriza con una fluorescencia apropiada frente a la representación de temperatura-tiempo de tal manera que puede determinarse un primer valor de la derivada, en el que se observa la máxima disminución de fluorescencia.

20 En el caso de una solicitud caracterizada en que sólo uno, dos o unos pocos genes diana diferentes se amplifican, es posible discriminar los diferentes productos de amplificación por medio del sometimiento de los amplicones generados a un gradiente térmico y realizar un análisis de la curva de fusión. Si se utiliza el formato de detección SybrGreen, es posible de forma fácil discriminar entre al menos dos amplicones diferentes. Si se utiliza una sonda de hibridación basada en un formato en detección, con una o más sondas de hibridación marcadas con los mismos compuestos o compuestos fluorescentes es posible de forma fácil discriminar entre al menos 4 variaciones de secuencia de amplicón distintas que son amplificadas por los mismos o diferentes cebadores de amplificación. En el caso de utilizar diferentes marcajes para diferentes sondas de hibridación, es posible discriminar entre, respectivamente, más variaciones de secuencia de amplicón distintas.

25 De acuerdo con la presente Invención también hay otro escenario para la detección que se basa en la introducción de marcajes detectables. Por lo tanto, la presente invención proporciona una cuenta o pluralidad de cuentas que comprenden al menos dos cebadores de amplificación específicos de secuencia en el que al menos un cebador está unido a dicho soporte con un enlazante escindible, y dicho cebador comprende además un marcaje detectable.

30 En particular, la presente Invención también proporciona una biblioteca de cuentas, en la que cada cuenta comprende una pareja diferente de dos cebadores de amplificación específicos de secuencia en el que al menos un cebador está unido a dicho soporte con un enlazante escindible, y dicho cebador comprende además un marcaje detectable. En una realización muy particular, la cuenta es el marcaje por sí mismo o está modificada en la superficie con los marcajes detectables.

35 En este contexto, las cuentas portadoras de secuencias específicas de cebador están codificadas con cualquier tipo de marcaje detectable que permite la detección específica de las cuentas. Por ejemplo, el marcaje detectable puede ser una marcaje de masa, un marcaje de color o fluorescente o un marcaje e-Tag o Raman, pero no se limita a esto. Otros ejemplos son los haptenos como la digoxigenina o biotina o péptidos pequeños, todos ellos detectables por un anticuerpo.

40 Para cada cuenta de secuencia específica puede escogerse otro marcaje o un número específico o pluralidad de marcajes que codifican, ya sea mediante diferentes colores, diferente masa o otros medios para la cuenta unida a la secuencia específica. Dependiendo del número de marcajes diferentes disponibles, pueden analizarse múltiples secuencias diana.

Preferiblemente, el cebador que se une a la cuenta mediante un enlazante escindible lleva un marcaje detectable. Después de la escisión y alargando el cebador "escindible" se incorpora el marcaje en el producto de la PCR en las cuentas y puede ser detectado. Las cuentas que contienen el producto amplificado de diferentes secuencias pueden ser diferenciadas y se pueden contar, permitiendo así la posibilidad de detectar cuantitativamente y cualitativamente secuencias específicas. Por lo tanto, lo más preferiblemente, cada miembro de la pluralidad de cebadores que se unen a la cuenta a través de un enlazante escindible lleva un marcaje detectable diferente pluralidad de marcajes.

En el caso de marcar el cebador escindible con un marcaje fluorescente esto se puede realizar de forma que el marcaje se inactive mientras no se alargue por la polimerasa para formar un amplicón de PCR. Un mecanismo previsto de atenuación utiliza cebadores similares a las sondas de hibridación de marcaje único en los que se produce desatenuación tras la interacción con una cadena complementaria diana. Alternativamente, se podrán utilizar cebadores que son similares a balizas moleculares, en los que se produce una desatenuación tras la linearización del oligonucleótido. Como consecuencia, el uso de cebadores atenuados reduce al mínimo la posibilidad de cualquier señal de fondo de fluorescencia.

En el caso de que un cebador escindible se marque con un marcaje de hapteno como biotina y digoxigenina, el producto de amplificación puede detectarse mediante reacción de quimioluminiscencia utilizando avidina o anti-Dig en la correspondiente reacción de quimioluminiscencia posterior. En una realización particular, cada miembro de la pluralidad de cebadores que se unen a la cuenta con un cebador escindible lleva un número diferente de marcajes de biotina o Dig que pueden detectarse en una cascada de reacción mediante fluorescencia o quimioluminiscencia. Por lo tanto se utilice un conjugado POD-estreptavidina y un conjugado AP-anti Dig en combinación con sustratos fluorogénicos o quimiolumigénicos con diferentes características de emisión. Para la fluorescencia, como ejemplo se utilice la fluorescencia de un conjugado de fluoresceína y una anti-fluoresceína-galactosa. La dependencia de tiempo o fuerza de la señal de fluorescencia o quimioluminiscencia y la longitud de onda de emisión pueden también utilizarse de forma adicional para descodificar.

Alternativamente, el cebador escindible y / o el cebador no escindible se modifican con diferentes números de Iso-G e Iso-C (que son ortogonales a los pares de bases estándar). Iso-G e iso-C marcados con biotina y / o Dig se incorporan durante la reacción de amplificación y finalmente son detectados mediante una reacción en cascada tal como se ha mencionado anteriormente. También se pueden utilizar solapas ortogonales que son capaces de interaccionar de forma específica con un homólogo, pero no pueden interaccionar con el DNA o RNA unido al extremo 5' de los cebadores para "descodificación por hibridación" en una matriz en donde los homólogos de las solapas se inmovilizan en una posición específica conocida. Las solapas ortogonales adecuadas son análogos fr ácidos nucleicos como iso-G o iso-C que contienen oligonucleótidos, L-DNA, GNA y homo-DNA.

Muchas otras estrategias de codificación diferentes se conocidos en la literatura y algunas de ellas están disponibles comercialmente. Los ejemplos se dan a conocer en las siguientes referencias:

Fluorescencia:

Tong, Anthony, K.; Li, Zengmin; Jones, Gregg, S.; Russo, James, J.; Ju, Jingyue. *Nature Biotechnology* 19(8) (2001) 756-759,

Masa:

Kokoris, Mark; Dix, Kim; Moynihan, Kristen; Mathis, Janette; Erwin, Barb; Grass, Paul; Hines, Brian; Duesterhoeft, Andreas, *Molecular Diagnosis* 5 (2000) 329-340.

Espectroscopía Raman:

Sun, Lan; Yu, Chenxu; Irudayaraj, Joseph, *Analytical Chemistry* (Washington, DC, United States) 79(11) (2007) 3981-3988.

Ng, Patrick; Tan, Jack, J., S.; Ooi, Hong, Sain; Lee, Yen, Ling; Chiu, Kuo, Ping; Fullwood, Melissa, J.; Srinivasan, Kandhadayar, G.; Perbost, Clotilde; Du, Lei; Sung, Wing-Kin; Wei, Chia-Lin; Ruan, Yijun, *Nucleic Acids Research* 34(12) (2006) e84.

Revisiones sobre análisis multiplex:

Finkel, N., H., Lou, X., Wang, C., He, L., *Anal. Chem.* 76 (2004) 352A-359A. Braeckmans, K., Smedt, S., C., D., Leblans, M., Pauwels, R., Demeester, J., *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 447-456.

En una realización en particular, las cuentas codificadas también se pueden utilizar en combinación con los modos de detección de la utilización de cualquiera de las entidades fluorescentes como tintes fluorescentes de unión al dsDNA o sondas de hibridación como se ha descrito anteriormente.

(iii) PCR de tiempo real

En el caso del aislamiento clonal del paso c) se ha logrado por medio de la distribución de dicha pluralidad de cuentas en las cavidades de una placa micro -o picotitulada, la reacción de PCR del paso puede monitorizarse en tiempo real durante el paso e) como se ha descrito anteriormente utilizando un formato de detección apropiado. En otras palabras, los pasos e) y f) se llevan a cabo de forma simultánea a través de la realización de análisis de PCR en tiempo real.

Se agrupan muchas cuentas diferentes, que contiene cada una parejas de cebadores para diferentes genes. La Diana se hibrida con las cuentas. Un dispositivo tal como una placa picotitulada (PTP) se utiliza para separar físicamente las diferentes cuentas cada una con dos cebadores de PCR específicos para un gen. Uno de los cebadores inmovilizados en las cuentas contiene un enlazante escindible. Se añaden los reactivos de PCR a las cuentas separados físicamente en la PTP. Las cuentas se exponen entonces a las condiciones de escisión para cortar el enlazante unido al cebador escindible de la matriz de soporte. La mezcla de reacción se expone a un ciclo de PCR. El cebador aún inmovilizado (no escindible) hibrida con moléculas amplificadas en estrecha proximidad - manteniéndose en la superficie. La PCR se realiza dentro de los pocillos individuales de la PTP y se hace un seguimiento en tiempo real. También en esta realización, pueden someterse a continuación los amplicones a un gradiente térmico para realizar un análisis de la curva de fusión.

Con el fin de identificar los productos de amplificación en tiempo real, un experto en la materia reconocerá que se pueden aplicar los mismos modos de codificación de las cuentas. También un experto en la materia reconocerá que para detección del producto de amplificación, pueden utilizarse colorantes de unión a DNA de doble hebra o sondas de hibridación fluorescentes como se ha descrito anteriormente para el análisis final de la PCR.

Además, es posible utilizar cualquier tipo de formato de detección que se conozca en la técnica de PCR en tiempo real. En particular, también es posible utilizar el conocido formato de nucleasa 5' TaqMan. En este caso, una sonda de hibridación monocatenaria se marca con dos componentes. Cuando el primer componente se excita con luz de una longitud de onda adecuada, la energía absorbida se transfiere al componente del segundo, el denominado atenuador, de acuerdo con el principio de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Durante el paso de hibridación de la reacción de PCR, la sonda de hibridación se une al DNA diana y es degradado por la exonucleasa 5' - 3' de la polimerasa Taq durante la posterior fase de elongación. Como resultado, el componente fluorescente excitado y el atenuador están espacialmente separados el uno del otro y por lo tanto se puede medir una emisión de fluorescencia del primer componente (US 5.804.375). Sin embargo, este formato de ensayo es incompatible con posteriores análisis de curva de fusión.

(iv) Preparación de bibliotecas

Además de los métodos de análisis de múltiples moléculas de ácidos nucleicos directamente, la presente Invención proporciona además una biblioteca hecha por los métodos de la invención. La biblioteca se puede hacer mediante el uso de, por ejemplo, DNA genómico, DNAC celular total, una biblioteca de DNA genómico, una biblioteca de DNAC, o una biblioteca plasmídica como material de partida para la amplificación. La biblioteca puede derivar de cualquier población de ácidos nucleicos, por ejemplo, biológica o de origen sintético.

Por lo tanto, más precisamente, la presente Invención se dirige también a un método para la amplificación de múltiples moléculas de ácidos nucleicos de interés que comprende los pasos de

- a) proporcionar una pluralidad de cuentas, caracterizado porque cada cuenta comprende al menos un par de cebadores de amplificación específica de secuencia, caracterizado además porque al menos uno de dichos cebadores se une a la cuenta a través de un enlazante escindible
- b) la captura de las moléculas de ácidos nucleicos de interés a partir de una muestra
- c) aislamiento clonal de dicha pluralidad de cuentas
- d) escindir dicho cebador
- e) amplificar clonalmente dichos ácidos nucleicos creando así múltiples productos de amplificación
- f) almacenar dichos múltiples productos de amplificación clonal en las cavidades de una placa micro- o picotitulada

En el caso del paso c) se realiza mediante la preparación de una emulsión de acuerdo con la presente invención, a continuación, el paso f) comprende, inicialmente el paso de distribución de dicha pluralidad de cuentas en las cavidades de una placa micro o picotitulada. En el caso del paso c) comprende el paso de distribuir dicha pluralidad de cuentas en las cavidades de una placa micro o picotitulada, los productos de amplificación pueden almacenarse directamente dentro de la misma placa micro o picotitulada.

En el caso que bibliotecas preparadas previamente se amplifiquen de acuerdo con la invención, entonces es posible utilizar un tipo de cuenta con un par específico de cebadores de amplificación. En el caso de DNA genómico o DNAC total celular se amplifica de acuerdo con la de la invención, las cuentas deben comprender una población al azar de secuencias de cebador directas o reversas.

Además, la presente invención también está dirigida a una biblioteca preparada mediante los métodos descritos anteriormente.

5 Aplicaciones de la invención

(i) Secuenciación

10 El análisis de secuenciación de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para una serie de diferentes aplicaciones.

15 En muchos casos se desea analizar múltiples copias de un objetivo en particular para las posibles variaciones de secuencia. De acuerdo con la presente invención, se evita la preamplificación de una diana concreta mediante PCR que es necesario de acuerdo con los métodos conocidos en la material. En su lugar, de acuerdo con la presente invención, la emPCR en sí, se realiza con múltiples cuentas del mismo tipo, caracterizado por el hecho que todas las cuentas están llevando el mismo par de cebadores de amplificación.

20 Así, en un aspecto, el análisis de secuenciación de acuerdo con la presente invención se puede usar para el análisis cuantitativo mutacional. En este aspecto, los datos obtenidos a partir de la pluralidad de diferentes reacciones de secuenciación revelan una pluralidad de diferentes variaciones que se producen en los ácidos nucleicos diana de una muestra que se ha amplificado. Además, los datos obtenidos proporcionan información cuantitativa, sobre el porcentaje, con qué frecuencia cada variación de secuencia estaba originalmente presente en la muestra analizada.

25 Por otra parte, dicho análisis puede también realizarse en una aproximación multiplex. En este caso, se determinan las variaciones de secuencia de varios ácidos nucleicos diana diferentes que están presentes en una muestra. El número de diferentes dianas que pueden analizarse por este método sólo está limitado por el número de diferentes cuentas que se pueden proporcionar de tal manera que cada cuenta lleva un par específico de cebadores de amplificación.

30 En otro aspecto, también es posible analizar un gen complejo o locus génico, cuya secuencia no se puede amplificar mediante la realización de una sola reacción de PCR. En este caso, se proporcionan múltiples especies diferentes de cuentas, que se caracterizan porque cada cuenta lleva un par específico de cebadores de amplificación diseñados para amplificar una región particular del DNA diana que serán analizados. En este contexto, el diseño de los cebadores debe hacerse de tal manera que los tamaños de los productos de amplificación generados no superan una longitud, que no puede ser completamente secuenciada en el posterior paso de secuenciación. Por lo tanto, preferiblemente, los tamaños de amplicón generados están por debajo de 1.000 y más preferiblemente por debajo de 500 nucleótidos. También preferiblemente, las secuencias de los amplicones generados comprenden los solapamientos entre ellos de manera que la información de secuencia generada por último comprende un alto grado de confianza sin ningún hueco.

40 En particular, dicho análisis es útil para analizar múltiples polimorfismos encontrados en determinados genes o loci de genes, que se ha demostrado que se asocian con una predisposición de una determinada enfermedad o para el pronóstico de la enfermedad. Por ejemplo, el método de la invención puede utilizarse para analizar genes humanos, como el gen que codifica la distrofia muscular o los genes HNPCC.

45 En otro aspecto, el análisis de la secuenciación de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para monitorizar la expresión génica. En este aspecto, se utiliza cDNA que se ha preparado de tal manera que el extremo 5' tiene una secuencia diana que es capaz de actuar como un lado de unión a cebador para la posterior reacción de amplificación. Como un segundo cebador dentro de dicha reacción de amplificación, puede utilizarse un cebador oligo-dT. La introducción del lado de unión al cebador en el extremo 5' del cDNA se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, para la síntesis de la segunda hebra de cDNA, es posible utilizar un cebador que comprende una parte 5' y una parte 3'. La parte 5' comprende el lado de unión cebador que por sí mismo no se hibrida con la primera hebra de cDNA. La parte 3' comprende una secuencia al menos parcialmente y preferiblemente completamente al azar, de tal manera que es capaz de hibridarse con sustancialmente todas las moléculas de primera hebra de cDNA.

55 Alternativamente, si sólo se amplificó la expresión de un número limitado de ácidos nucleicos diana, la síntesis de la primera y segunda hebra de cDNA se llevan a cabo con una población que comprende un número limitado de secuencias cebadoras. Para la síntesis de la primera cadena de cDNA, se utiliza una composición de cebadores que comparten una primera parte común 5' correspondiente a una primera parte de unión al cebador de amplificación, pero que corresponde a un número diferente de dianas que deben monitorizarse y que tienen diferentes partes 3'. Del mismo modo, para la síntesis de la segunda cadena de cDNA, se utiliza una composición de cebadores que comparten una segunda parte común 5' correspondiente a una primera parte de unión al cebador de amplificación, pero que corresponde a un número diferente de dianas que deben monitorizarse y que tienen diferentes partes 3'.

65

De forma similar al método de análisis mutacional cuantitativo, los datos obtenidos mediante la posterior secuenciación también revelan información cuantitativa de la frecuencia con la que los cDNA se representan dentro de la muestra original.

5 En otro aspecto, el par de cebadores de amplificación específicos de secuencia pueden reemplazarse por una población de cebadores completamente aleatorizados. Si este es el caso, el método de acuerdo con la presente invención también se puede utilizar para secuenciar una población de moléculas de ácidos nucleicos con muchas secuencias diferentes, tal como una muestra de DNA genómico o una muestra de cDNA total.

10 (ii) PCR y PCR de tiempo real

Las realizaciones de PCR de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para la cuantificación absoluta o relativa de ácidos nucleicos.

15 En caso de cuantificación relativa, al menos dos pares de cebadores de amplificación específicos de secuencia se utilizan con el fin de amplificar dos secuencias diferentes de ácidos nucleicos que están presentes en una muestra. Los cebadores fotoescindibles preferiblemente comprenden diferentes marcadores para su posterior detección, es decir cada miembro de la pluralidad de cebadores que se unen a la cuenta a través de un enlazador escindible lleva un marcador detectable diferente. Alternativamente, si sólo un número limitado de dianas se puede analizar. Los
20 productos de amplificación se distinguen mediante el análisis de la curva de fusión, por medio de la utilización de sondas de hibridación marcadas diferencialmente o mediante el uso de cebadores codificados con digoxigenina o biotina. La muestra puede ser por ejemplo una muestra de DNA genómico, una muestra de cDNA o una muestra de RNA. En este último caso, se debe realizar una RT-PCR de un solo paso.

25 En el caso de cuantificación absoluta, la muestra se enriquece con una cantidad conocida de ácido nucleico estándar, que puede amplificarse con cebadores como se ha descrito anteriormente y detectarse por medio de cebadores marcados apropiadamente o sondas marcadas adecuadamente.

30 En el caso de monitorización de PCR final, la abundancia de señales positivas para cada tipo de secuencia diana amplificada se determina y compara entre ellas con el fin de obtener datos de cuantificación relativos o absolutos (en el caso de uso de un estándar conocido).

En el caso de PCR en tiempo real, los datos cuantitativos se obtienen durante los procesos de amplificación de acuerdo con los protocolos bien conocidos y utilizados con frecuencia en la materia.

35 Por lo tanto, con la monitorización de la PCR y de la PCR en tiempo real de acuerdo con la la invención es posible comparar la abundancia de diferentes RNA en una muestra original, o en otras palabras, es posible controlar la expresión génica en una manera relativa.

40 En un aspecto adicional, la actuales métodos de PCR así como los métodos de PCR en tiempo real se pueden utilizar para el análisis mutacional según los protocolos basados en la amplificación específica de alelo, que también se llama la tecnología ARMS (US 5.137.806, US 5.595.890, US 5.639.611). En esta realización particular, se utilizan los cebadores con residuo de nucleótido discriminante 3' que son capaces de amplificar una sola variación de secuencia particular, de una secuencia diana particular, pero no amplifican una segunda variación de secuencia conocida.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de cebadores y cebadores fotoescindibles

50 La síntesis de oligonucleótidos se llevó a cabo en una escala de 4 tiempos de 1 μ mol en un sintetizador ABI 394. Se utilizó tac CPG (Proligo) comercialmente disponible como material de soporte. Todos los demás productos químicos para la síntesis estándar se obtuvieron de Glen Research. Se utilizaron las fosforamiditas con grupos protectores terc-butilfenoxil-acetilo (conocidas como monómeros "Expedite" o "tac") de Proligo. Como reactivo de recubrimiento se utilizó anhídrido de terc-butilfenoxiacetol acético (tac2O) en tetrahidrofurano.

Se utilizaron los siguientes modificadores disponibles comercialmente:

60 - modificador C6 amino 5': (6-(4-monometoxitritilamino)hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita

- Espaciador fosforamidita 18 (18-O-dimetoxitritilhexaetilenglicol,1-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita

- Espaciador fotoescindible [4-(4,4'-dimetoxitritiloxi)butiramidometil]-1-(2-nitrofenil)-etil]-2-cianoetil-(N,N-diisopropil)-fosforamidita

65

- Biotina dT fosforamidita (5'-dimetoxitritiloxi-5-[N-((4-t-butilbenzoi)-biotinil)-aminoxil]-3-acrilimido]-2'-desoxiUridina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita)

5 - Biotina fosforamidita (1-dimetoxitritiloxi-2-(N-biotinil-4-aminobutil)-propil-3-O-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita)

- Fluoresceína fosforamidita (1-dimetoxitritiloxi-2-(N-tiourea-(di-O-pivaloil-fluoresceína)-4-aminobutil)-propil-3-O-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita)

10 - Fluoresceína fosforamidita dT (5' -dimetoxitritiloxi-5-N-((3',6'-dipivaloil-fluoresceinol)-aminoxil)-3-acrilimido]-2'-desoxiuridina-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita)

15 El protocolo estándar se utilizó para la síntesis. El producto se escindió del soporte durante 2 h a temperatura ambiente con 33 % de amoníaco y se purificó por cromatografía de fase inversa en una columna porosa Oligo R3 4,6 x 50 mm. Cromatografía: tampón A: acetato de trietilamonio 0,1 M en agua pH 6,8, tampón B: acetato de trietilamonio 0,1 M en agua / acetonitrilo 1:1, gradiente de 2 min 0 % de B a 100 % de B en 45 min. La absorción UV del eluyente se midió a 260 nm. Se obtuvo una fracción principal que contenía el oligonucleótido aminomodificado. El disolvente se eliminó en una centrifuga de vacío.

20 La siguiente tabla muestra secuencias y modificaciones de cebador de oligonucleótidos inmovilizados con cuentas de Sepharosa activadas con éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). Las letras mayúsculas representan secuencias adaptador genéricas para la codificación de cuentas, amplificación, enriquecimiento y pirosecuenciación, mientras que las letras minúsculas representan secuencias específicas de gen.

25 Tabla 2:

Id. de Secuencia	Gen Diana	Secuencia (5'->3')
Nº1	-	5'-AmMC6-(isp18) ₃ -PCL-C ^{FAM} dT-GTGCGTCCCTACTCTACC
Nº2	-	5'-AmMC6-(isp18) ₃ -CCTATCCCCTGTGTGCCTTG
Nº3	-	5'-AmMC6-(isp18) ₃ -PCL-T _B -CCATCTCATCCCTGCGTGTC
Nº4	NM_004048 (B2M)	5'-AmMC6-(isp18) ₃ - GCCTCCCTCGCGCCATCAGcctggtctttctatctctgtactac
Nº5	NM_004048 (B2M)	5'-AmMC6-(isp18) ₃ -PCL-T ^B - GCCTTGCCAGCCCGCTCAGqcatctcaaacctcatqa
Nº6	NM_199166 (ALAS)	5'-AmMC6-(isp18) ₃ - GCCTCCCTCGCGCCATCAGcctgqaatqagtcgccaccacg
Nº7	NM_199166 (ALAS)	5'-AmMC6-(isp18) ₃ -PCL-T ^B - GCCTTGCCAGCCCGCTCAGcaqctcccqctctaagcca
Nº8	NM_000194 (HPRT)	5'-AmMC6-(isp18) ₃ - GCCTCCCTCGCGCCATCAGcctgqactqtaqattttatcaqactqa
Nº9	NM_000194 (HPRT)	5'-AmMC6-(isp18) ₃ -PCL-T ^B - GCCTTGCCAGCCCGCTCAGtqqattatactqcctgaccaa
Nº10	NM_000190 (PBGD)	5'-AmMC6-(isp18) ₃ - GCCTCCCTCGCGCCATCAGgaggagccatgtctggtaa
Nº11	NM_000190 (PBGD)	5'-AmMC6-(isp18) ₃ -PCL-T ^B - GCCTTGCCAGCCCGCTCAGccagggtacgaggcttcaa

5'-AmMC6 ... 5'-amino-modificador C6
isp18 ... espaciador interno 18, hexa-etilenglicol
PCL ... enlazante fotoescindible 2-nitrobencilo
FAMdT ... Fluoresceína desoxi-timidina
TB = biotina desoxi-timidina
Mval el sitio de restricción está subrayado

Ejemplo 2:

Preparación de cuentas y fotoescisión

30 Los amino oligonucleótidos modificados que contienen un enlazante estacionario y fotoescindible (Id. de Secuencia Nº 1-9), respectivamente, se conjugaron con cuentas de sefarosa activadas con éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) (Roche/454-Life Sciences, Branford, CT, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo estándar. El mecanismo de reacción químico se representa en la fig. 2.

35 Para desencadenar la fotoescisión del enlazante nitrobencilo estas cuentas se sometieron a radiación UV en una cubeta de cuarzo QS1.000 (1 cm de longitud de trayectoria) utilizando una lámpara UV dual de 8 W (Camag, Berlín, Alemania) a 366 nm. La distancia entre la lámpara UV y la cubeta de cuarzo fue de 2 cm.

Ejemplo 3:

Análisis de la reacción de fotoescisión

5 (correspondiente a la Figura 3)

Este ejemplo describe la detección de la fotoescisión de sondas de oligonucleótidos modificados con fluoresceína inmovilizados en cuentas de sefarosa.

10 5×10^6 cuentas conjugadas con sondas de oligonucleótidos modificados con fluoresceína (Id. de Secuencia N° 1) se lavaron extensivamente, después se suspendió en 100 μ l de tampón Tris / HCl 50 mM pH 7,5 y se irradió durante 15 minutos tal como se ha descrito en el Ejemplo 2. A continuación las cuentas sí centrifugaron y el sobrenadante se analizó para los oligonucleótidos modificados con fluoresceína fotoescindidos (FAM) mediante la medición de la absorbancia utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) (Fig. 3A).

15 Además, $0,6 \times 10^6$ cuentas portadoras de sondas de oligonucleótidos modificados con fluoresceína (Id. de Secuencia N° 1) se suspendieron en 800 μ l de mezcla de reacción de PCR (Tabla 3).

Tabla 3

Reactivo	concentración final
Tween-80	0,01 %
BSA	0,10 %
MgSO ₄	2,5 mM
Glicerol	3,6 %
Tris-H ₂ SO ₄ pH 8,9	58,1 mM
NH ₄ -SO ₄	17,4 mM
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	cada uno 0,40 mM
Expand HiFi-Taq polimerasa	0,04 U/ml

20 Alternativamente, la misma cantidad de cuentas se suspendió en 190 μ l de mezcla de reacción de PCR que se emulsionó a su vez de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Manual del usuario de GS emPCR kit, Roche/454-Life Sciences, Branford, CT, EE.UU.). Las cuentas suspendidas o emulsionadas se irradiaron durante 15 min como se describe en el ejemplo 2. A partir de entonces las cuentas se lavaron extensivamente con isopropanol y Tris / HCl 50 mM pH 7,5. La fotoescisión se analizó mediante la medición de la intensidad de fluorescencia de las cuentas antes y después de la radiación utilizando un citómetro de flujo estándar (Fig. 3B) . Como se puede deducir de la figura, la fotoescisión por medio de radiación UV en ambos casos dio como resultado una pérdida significativa de la intensidad de fluorescencia de la población de cuentas.

30 Ejemplo 4:

PCR de cuentas fotoactivadas (correspondiente a las figuras 4 y 5)

35 Este ejemplo describe la detección de productos de PCR específicos usando PCR de cuentas y cebadores inmovilizados en cuentas fotoescindibles. El molde para la PCR de cuentas y un control estándar de PCR fue un amplicón artificial de 239 pb. El amplicón fue diseñado de tal manera que contenía un sitio de restricción MVA I y Nla III. Se espera que el tratamiento con endonucleasas de restricción de este amplicón después de la PCR de cuentas o la PCR control dé lugar a patrones característicos de fragmentos de diferente longitud como se predijo en la fig. 4.

40 $0,3 \times 10^6$ cuentas portadoras de sondas de oligonucleótidos estacionarias y fotoescindibles (Id de Secuencia N° 2, N° 3) se suspendieron en 100 μ l de mezcla de reacción de PCR (Tabla 3) que contiene 1 pg de un amplicón artificial de 239 pb. El amplicón incluye una secuencia que era complementaria a los oligonucleótidos en las cuentas. La suspensión se irradió durante 15 min como se describe en el ejemplo 2. A continuación, la suspensión se transfirió a cámaras de reacción de PCR (es decir, tubos de PCR). La PCR se realizó en un termociclador estándar como sigue:

- 45
- 1 ciclo (4 minutos a 94° C) - inicio caliente;
 - 40 ciclos (30 segundos a 94°C, 60 segundos a 58° C, 90 segundos a 68°C) - desnaturalización, hibridación, polimerización;
 - 25 ciclos (30 segundos a 94°C, 6 minutos a 58°C) - desnaturalización, polimerización;
 - 50 • Almacenamiento a 10°C.

Después de completar la reacción de PCR, las cuentas portadoras del material amplificado se retiraron, se lavaron en tampón Tris / HCl 50 mM pH 7,5 y se sometieron a un tratamiento con endonucleasas de restricción (alrededor de 5 U) durante 2 horas a 37° C. A continuación se centrifugaron las cuentas y el sobrenadante se analizó para productos de PCR específicos mediante electroforesis en gel de agarosa (fig. 5, derecha). Se realizó un control de reacción de PCR utilizando sondas de oligonucleótidos no inmovilizados (fig. 5, izquierda). Como puede verse en la

55

fig. 5, la PCR de cuentas proporcionó los fragmentos de DNA grandes y pequeños esperados, lo que indica que la reacción de fotoescisión y la PCR de cuentas funcionaron con éxito.

Ejemplo 5:

- 5 PCR de emulsión de cuentas fotoactivadas
(correspondiente a la Figura 6)
- 10 Este ejemplo describe la detección de productos de PCR específicos usando PCR de emulsión de cuentas y cebador inmovilizado en cuentas fotoescindibles.

0,4x10⁶ cuentas portadoras de sondas de oligonucleótidos estacionarias y fotoescindibles (Id de Secuencia N° 2 , N° 3) se suspendieron en 30 µl de tampón de captura (Tris / HCl 2 mM, pH 7,5, Mg(CH₃-COO)₂ 0,5 mM) que contenía 4 pg de un amplicón artificial de 239 pb. El amplicón incluyó una secuencia que era complementaria a los oligonucleótidos en las cuentas. El amplicón se hibridó con las cuentas en un termociclador estándar de la siguiente manera:

- 1 ciclo (5 minutos a 80°C) - desnaturalización;
- 1 ciclo (disminución de 0,1°C / segundo a 70 °C, 1 minuto a 70 °C) - hibridación;
- 1 ciclo (disminución de 0,1°C / segundo a 60 °C , 1 min a 60 °C) - hibridación;
- 1 ciclo (disminución de 0,1°C / segundo a 50 °C, 1 minuto a 50 °C) - hibridación;
- 1 ciclo (disminución de 0,1°C / segundo a 20 °C , 5 minutos a 20 °C) - hibridación.

- 25 A continuación las cuentas se emulsionaron de acuerdo con la instrucciones del fabricante (Manual de usuario de GS emPCR kit, Roche/454-Life Sciences, Branford, CT. USA). La emulsión se irradió durante 30 min tal como se ha descrito en el ejemplo 2. A continuación la emulsión se transfirió a unas cámaras de reacción de PCR (es decir, tubos de PCR). La PCR se realice en un termociclador estándar como sigue:

- 1 ciclo (4 minutos a 94 °C) - inicio caliente;
- 40 ciclos (30 segundos a 94 °C, 60 segundos a 58 °C, 90 segundos a 68 °C) - desnaturalización, hibridación, polimerización;
- 25 ciclos (30 segundos a 94 °C, 6 minutos a 58 °C) - desnaturalización, polimerización;
- Almacenamiento a 10 °C

- 35 Después de completar la reacción de PCR, las cuentas emulsionadas se recuperaron mediante una serie de pasos de lavado y centrifugaciones utilizando primero un exceso de isopropanol, segundo un exceso de tampón de etanol (Tris / HCl 10 mM, pH 7,5, etanol al 70 %) y tercero tampón Tris / HCl 50 mM pH 7,5. Las cuentas lavadas se sometieron a continuación a tratamiento con endonucleasas de restricción (alrededor de 5 U) durante 2 horas a 37 °C. A continuación se centrifugaron las cuentas y el sobrenadante se analizó para productos de PCR específicos mediante electroforesis en gel de agarosa. Se realizó un control de reacción de PCR utilizando sondas de oligonucleótidos no inmovilizados. Como se muestra en la fig. 6, la PCR de emulsión de cuentas y posterior tratamiento con endonucleasas de restricción proporcionó la generación de fragmentos de DNA esperados, lo que indica que la reacción de fotoescisión y la PCR de cuentas funcionaron con éxito.

45 Ejemplo 6:

PCR de emulsión de cuentas fotoactivadas usando cDNA como molde

- 50 (correspondiente a la Figura 7)
- Este ejemplo describe la detección de productos de PCR específicos de cDNA humano utilizando PCR de emulsión de cuentas y cebadores inmovilizados en cuentas fotoescindibles.

- 55 0,4x10⁶ cuentas portadoras de sondas de oligonucleótidos estacionarias y fotoescindibles para el gen de la beta-2 microglobulina (Id de Secuencia N° 4, N° 5) se suspendieron en 30 µl de tampón de captura (Tris / HCl 2 mM, pH 7,5, Mg(CH₃-COO)₂ 0,5 mM) que contenía cDNA humano obtenido de la línea celular HeLa.

- 60 El cDNA se incubó con las cuentas utilizando el procedimiento de hibridación de ejemplo 5. A continuación las cuentas se emulsionaron, se irradiaron y se sometieron a amplificación por PCR como se describe en el ejemplo 5.

- Después de completar la reacción de PCR, las cuentas emulsionadas se recuperaron como se ha descrito en el ejemplo 5. Las cuentas lavadas se sometieron a continuación a tratamiento con endonucleasas de restricción y se analizaron para productos de PCR específicos mediante electroforesis en gel de agarosa. Como control se realizó una PCR de emulsión de cuentas fotoactivadas utilizando 2,4 pg de un amplicón de 147 pb del gen de la beta-2 microglobulina como molde. El fragmento de DNA esperado, como se muestra en la Figura 7 indica que la

fotoescisión y posterior reacción de emPCR funcionaron con éxito con cDNA humano como molde. Se obtuvieron resultados similares utilizando cDNA HeLa y cuentas portadoras de sondas de oligonucleótidos fotoescindible específicas para el gen profobilínogeno desaminasa (Id de Secuencia N° 10, N° 11).

5 Ejemplo 7:

PCR de cuentas fotoactivadas multiplexada

(correspondiente a las Figuras 8 y 9)

10 Se realizaron los siguientes procedimientos en un solo tubo, incluyendo la captura de DNA moldes múltiples, amplificación de DNA, y la recuperación de un conjunto de cuentas unidas a su correspondiente molde de amplificación.

15 a) PCR de cuentas fotoactivadas multiplexada en suspensión

Este ejemplo describe la detección simultánea de productos de PCR específicos, múltiples usando PCR de cuentas fotoactivadas en suspensión (Fig. 8).

20 Un conjunto de distintas cuentas ($0,2 \times 10^6$ cuentas cada uno) unidos covalentemente a sondas de oligonucleótidos estacionarias y fotoescindibles específicas para los genes aminolaevulinato sintasa, beta-2 microglobulina y hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Id de Secuencia N° 4, N° 5, N° 6, N° 7, N° 8, N° 9) se suspendieron en 100 μ l de mezcla de reacción de PCR (Tabla 3). Esta suspensión se suplementó con amplicones (aprox. 0,5 pg cada uno) de los genes aminolaevulinato sintasa (127 pb), beta-2 microglobulina (174 pb) y la hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (181 pb). La suspensión se irradió y se sometió a amplificación por PCR como se describe en el ejemplo 4.

25 Después de completar la reacción de PCR, las cuentas se lavaron y se sometieron a tratamiento con endonucleasas de restricción como se describe en el ejemplo 4. Después de la centrifugación de las cuentas, el sobrenadante se analizó para productos de PCR específicos usando un chip de microfluidos cromatográfico (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.).

30 Los resultados se muestran en la fig. 9a. Claramente, se obtuvieron 3 picos diferentes, que representan tamaños de los fragmentos que corresponden a los tamaños teóricos de los fragmentos esperados de amplicones de 127 pb, 174 pb y 181 pb.

35 b) PCR de cuentas fotoactivadas multiplex en emulsión

Este ejemplo describe la detección simultánea de productos de PCR específicos, múltiples usando PCR de cuentas fotoactivadas en emulsión (fig. 8).

40 Un conjunto de distintas cuentas ($0,2 \times 10^6$ cuentas cada uno) unidos covalentemente a sondas de oligonucleótidos estacionarias y fotoescindibles específicas para los genes aminolaevulinato sintasa, beta-2 microglobulina y hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Id de Secuencia N° 4, N° 5, N° 6, N° 7, N° 8, N° 9) se suspendieron en 30 μ l de tampón de captura (Tris / HCl 2 mM, pH 7,5, Mg(CH₃-COO)₂ 0,5 mM). El tampón de captura contenía amplicones (aprox. 1,5 pg cada uno) de los genes aminolaevulinato sintasa (127 pb), beta-2 microglobulina (174 pb) e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (181 pb).

45 El DNA se hibridó con las cuentas de acuerdo con la el procedimiento del ejemplo 5. A continuación las cuentas se emulsionaron, irradiaron y se sometieron a amplificación mediante PCR como se describe en el ejemplo 5. Después de completar la reacción de PCR, las cuentas emulsionadas se recuperaron como se ha descrito en el ejemplo 5. Las cuentas lavadas se sometieron a continuación a tratamiento con endonucleasas de restricción (aproc. 5 U) durante 2 horas a 37 °C. Después de la centrifugación de las cuentas el sobrenadante se analizó para productos de PCR específicos (Fig. 9B) utilizando un chip de microfluidos cromatográfico (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.).

50 Los resultados se muestran en la fig. 9b. Una vez más, se obtuvieron 3 picos diferentes, que representan tamaños de fragmentos que corresponden a los tamaños teóricos de los fragmentos esperados de amplicones de 127 pb, 174 pb y 181 pb. Por lo tanto los resultados demuestran claramente que la presente invención es altamente valiosa para las aplicaciones multiplex en solución, así como en forma de PCR en emulsión.

55 Ejemplo 8:

Secuenciación de ácidos nucleicos utilizando PCR simple de cuentas fotoactivadas en emulsión

64

El siguiente experimento se realizó para analizar la detección específica de una secuencia diana obtenida después de una PCR de cuentas en emulsión utilizando un sistema de secuenciación de alto rendimiento basado en la secuenciación con pirofosfato (Margulies, M., et al., Nature 437 (2005) 376-80).

- 5 Para este protocolo se unieron de forma covalente $0,4 \times 10^6$ cuentas de sefarosa, con un diámetro medio de 25 a 35 μm , a sondas de oligonucleótidos estacionarias y fotoescindibles (Id de Secuencia N° 2, N° 3). Estas cuentas se mezclaron con 4 pg de un amplicón artificial de 239 pb. El amplicón incluyó una secuencia que era complementaria a los oligonucleótidos en las cuentas.
- 10 El amplicón se hibridó a las cuentas, emulsionadas, irradiadas y amplificadas mediante PCR usando el procedimiento del ejemplo 5. Después de completar la reacción de PCR, las cuentas emulsionadas se recuperaron como se ha descrito en el ejemplo 5. El DNA de las cuentas lavadas permaneció en forma de cadena sencilla y el cebador de secuenciación se hibridó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Manual de usuario de GS emPCR kit, Roche/454-Life Sciences, Branford, CT, EE.UU.). A continuación, se secuenciaron 250 000 cuentas de forma simultánea mediante secuenciación con pirofosfato utilizando el secuenciador Genome FLX de Roche/454-Life Sciences (Branford, CT, EE.UU.). El procesamiento de datos con el programa de ordenador GS Amplicon Variant Analyzer confirmó la detección exclusiva del amplicón indicado.
- 15

Ejemplo 9:

- 20 Secuenciación de ácidos nucleicos utilizando PCR de cuentas fotoactivadas multiplex en emulsión

25 El siguiente experimento se realizó para analizar la detección específica y la descodificación de secuencias diana obtenidas después de una PCR de cuentas en emulsión multiplex utilizando un sistema de secuenciación de alto rendimiento basado en la secuenciación con pirofosfato (Margulies, M., et al., Nature 437 (2005) 376-80).

30 Para este protocolo se utilizó un conjunto de cuentas distintas, con un diámetro medio de 25-35 μm , mientras que cada tipo de cuenta estaba unida de forma covalente a sondas de oligonucleótidos estacionarias y fotoescindibles específicas para los genes aminolaevulinato sintasa, beta-2 microglobulina e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Id de Secuencia N° 4, N° 5, N° 6, N° 7, N° 8, N° 9). $0,6 \times 10^6$ cuentas en $0,2 \times 10^6$ cuentas para cada tipo de cuenta se mezclaron con amplicones (aprox. 0,5 pg de cada uno) de los genes aminolaevulinato sintasa (127 pb), beta-2 microglobulina (174 pb) e hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (181 pb). Los amplicones se hibridaron a las cuentas, se emulsionaron, irradiaron y amplificaron mediante PCR usando el procedimiento del ejemplo 5. Después de completar la reacción de PCR, las cuentas emulsionadas se recuperaron como se ha descrito en el ejemplo 5.

35

40 El DNA de las cuentas lavadas permaneció en forma de cadena sencilla y el cebador de secuenciación se hibridó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (manual de usuario de GS emPCR kit, Roche/454-Life Sciences, Branford, CT, EE.UU.). A continuación, se secuenciaron 250 000 cuentas de forma simultánea mediante secuenciación con pirofosfato utilizando el secuenciador Genome FLX de Roche/454-Life Sciences (Branford, CT, EE.UU.). El procesamiento de datos con el programa de ordenador GS Amplicon Variant Analyzer confirmó la detección simultánea de una mezcla de diferentes amplicones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Cuentas para el análisis de alto rendimiento de ácidos nucleicos
 5 <130> 25938 FT
 <150> EP09002627
 <151> 2009-02-25
 <160> 11
 <170> PatentIn versión 3.2
 10 <210> 1
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> DNA de cadena sencilla
 <400> 1

 tgtgctccc tactctacc
 19

 20 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> DNA de cadena sencilla
 <400> 2

 cctatcccct gtgtgccttg
 20

 30 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> DNA de cadena sencilla
 <400> 3

 ccattctatc cctgctgtc
 20

 40 <210> 4
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> DNA de cadena sencilla
 <400> 4

 gcctccctcg cgccatcagc ctggtctttc tatctcttgt actac
 45

 50 <210> 5
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> DNA de cadena sencilla
 <400> 5

 gccttgccag cccgctcagg catcttcaa cctccatga
 39

 60 <210> 6

ES 2 430 853 T3

<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
5 <223> DNA de cadena sencilla
<400> 6

gcctccctcg cgccatcagc ctggaatgag tgcaccacca cg
42

10 <210> 7
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
15 <223> DNA de cadena sencilla
<400> 7

gccttgccag cccgctcagc agctcccgct ctaagtcca
39

20 <210> 8
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
25 <223> DNA de cadena sencilla
<400> 8

gcctccctcg cgccatcagc ctggactgta gattttatca gactga
46

30 <210> 9
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
35 <223> DNA de cadena sencilla
<400> 9

gccttgccag cccgctcagt ggattatact gcttgaccaa
40

40 <210> 10
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
45 <223> DNA de cadena sencilla
<400> 10

gcctccctcg cgccatcagg cggagccatg tctggtaa
38

50 <210> 11
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial
<220>
55 <223> DNA de cadena sencilla
<400> 11

gccttgccag cccgctcagc cagggtacga ggctttcaa
39

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende los pasos de
- 5 a) proporcionar una pluralidad de cuentas, caracterizado porque cada cuenta comprende un par de cebadores de amplificación específicos de secuencia, caracterizado además porque uno de dichos cebadores se unen a la cuenta mediante un enlazante fotoescindible,
b) capturar las moléculas de ácidos nucleicos de interés de una muestra,
c) aislar los clones de dicha pluralidad de cuentas,
10 d) inducir la fotoescisión de dicho primer cebador, mientras que el segundo cebador permanece unido de forma covalente,
e) amplificar de forma clonal dichos ácidos nucleicos creando así múltiples productos de amplificación,
f) analizar dichos productos de amplificación.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso c) comprende la generación de una emulsión en la que cada cuenta se encapsula en una micela simple.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el paso f) comprende la distribución de dicha pluralidad de cuentas en las cavidades de una placa micro o picotitulada y detector dichos productos de amplificación.
- 20 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el paso f) comprende además una reacción de secuenciación de dichos productos de amplificación.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha reacción de secuenciación es secuenciación mediante reacción de síntesis.
- 25 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que se monitoriza la generación de dichos productos de amplificación.
- 30 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dichos productos de amplificación se detectan mediante una entidad fluorescente de unión específica al DNA de doble cadena o una sonda de hibridación específica de secuencia.
8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dichos productos de amplificación se analizan mediante un gradiente térmico.
- 35 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el paso c) comprende la distribución de dicha pluralidad de cuentas en las cavidades de una placa micro o picotitulada.
- 40 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los pasos e) y f) se realizan de forma simultánea mediante PCR de tiempo real.
11. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 10, en el que dicho al menos un cebador que está unido a la cuenta mediante un enlazante escindible es portador de un marcaje detectable.
- 45 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho marcaje detectable se selecciona de un grupo que consiste de marcaje de masa, marcaje de color, marcaje e-tag y un hapteno que es detectable mediante un anticuerpo.
- 50 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, que se caracteriza en que dicho marcaje detectable es un marcaje fluorescente que está preferiblemente atenuado mientras dicho cebador marcado no haya sido elongado.
14. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 13 que se caracteriza en que cada miembro de la pluralidad de cebadores que se unen a la cuenta mediante un enlazante escindible es portador de un marcaje detectable diferente.
- 55 15. El uso de un método de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 5 para el análisis mutacional cuantitativo.
16. El uso de un método de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 5 para monitorizar la expresión génica.
- 60 17. El uso de un método de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 11 para el análisis mutacional cuantitativo mediante la realización de amplificación específica de alelo.
- 65 18. El uso de un método de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 11 para monitorizar la expresión génica.

19. El uso de un método de acuerdo con las reivindicaciones 6 a 11 para la cuantificación relativa o absoluta de ácidos nucleicos.

5 20. El uso de un método de acuerdo con las reivindicaciones 17 a 19, que se caracteriza en que cada miembro de la pluralidad de cebadores que se unen a la cuenta mediante un enlazante escindible es portador de un marcaje detectable diferente.

Fig.1

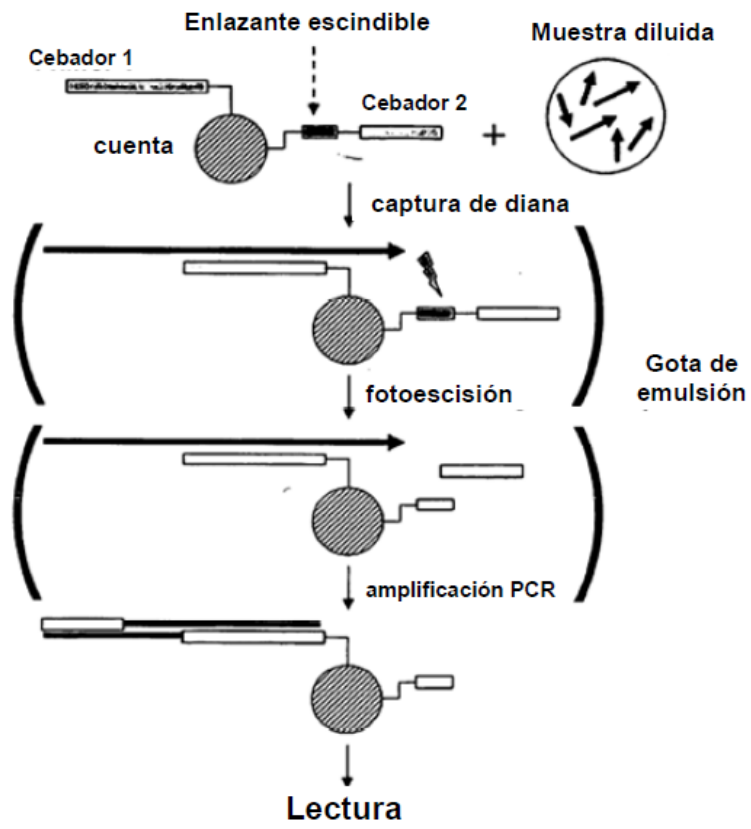
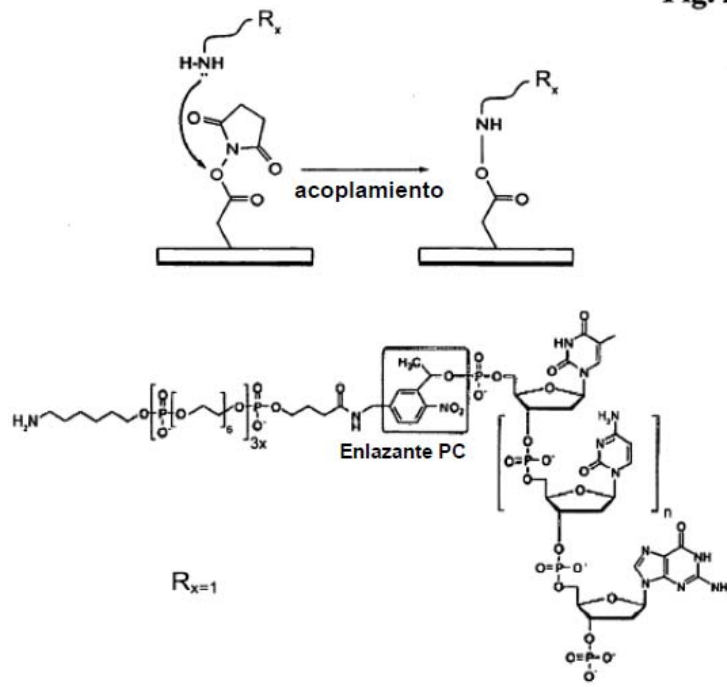


Fig. 2



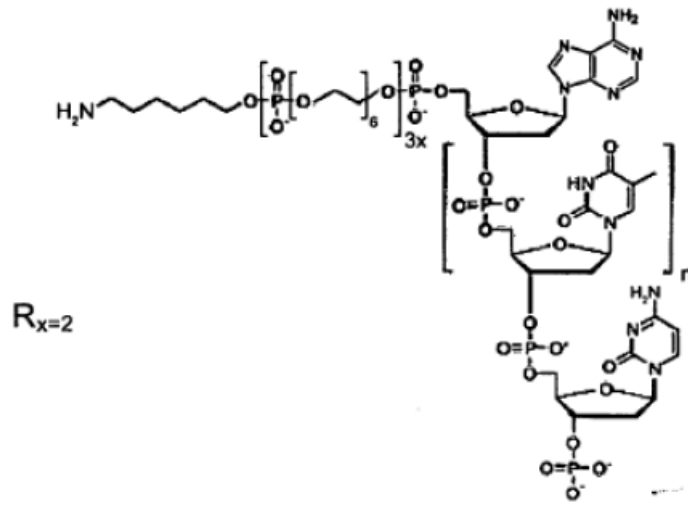


Fig. 3A

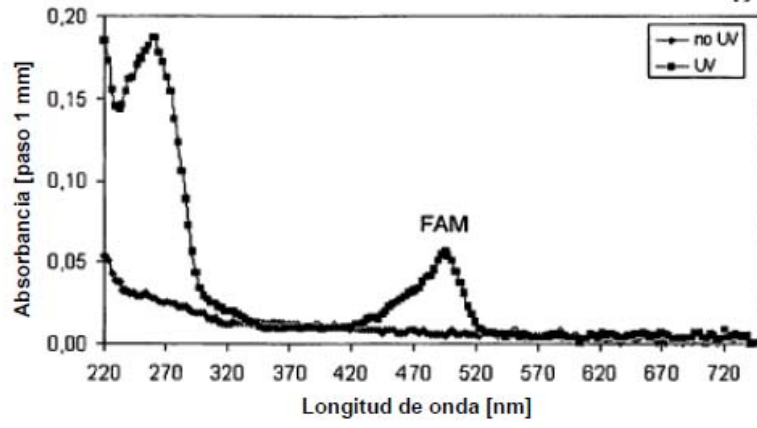


Fig. 3B

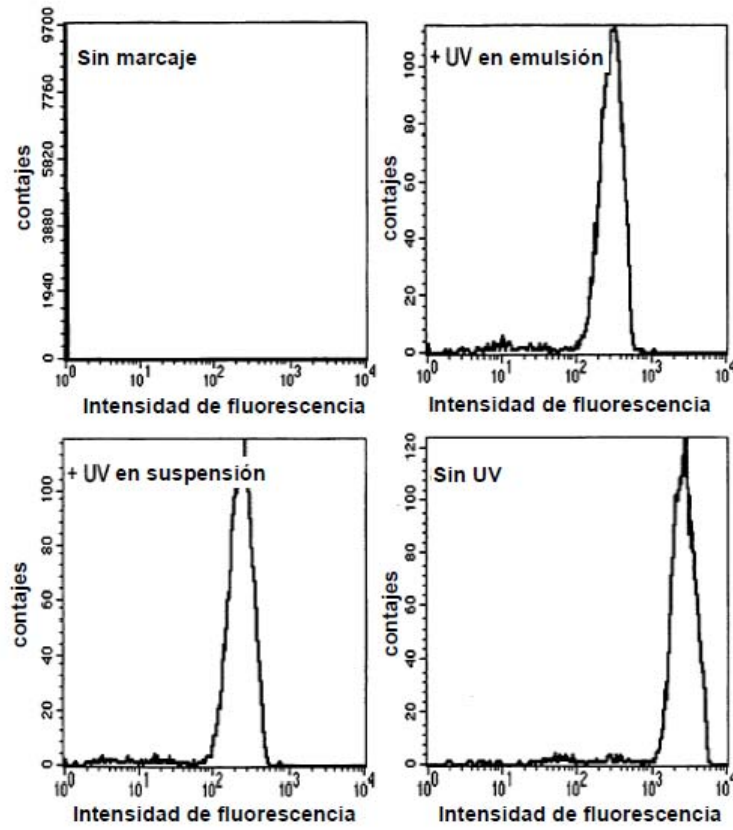


Fig.4

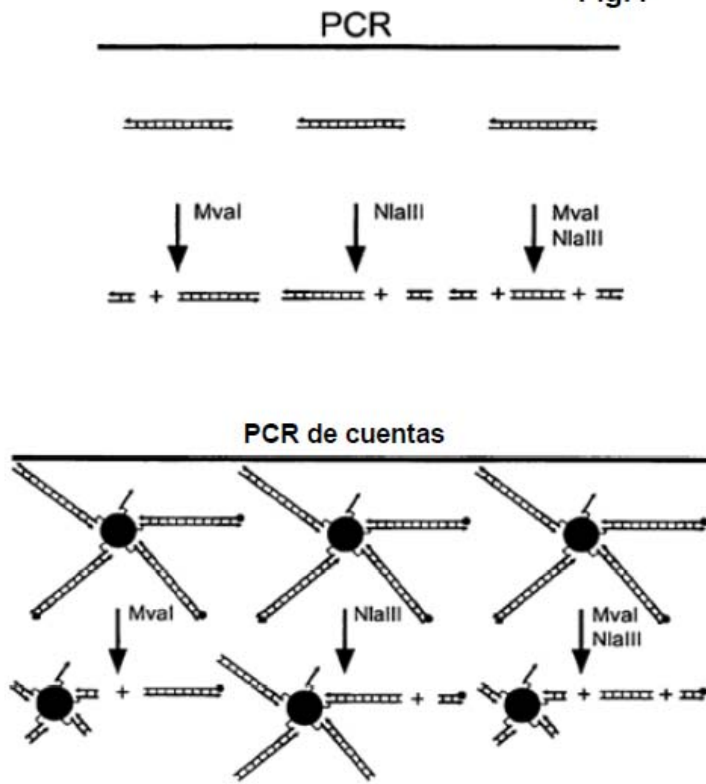


Fig.5

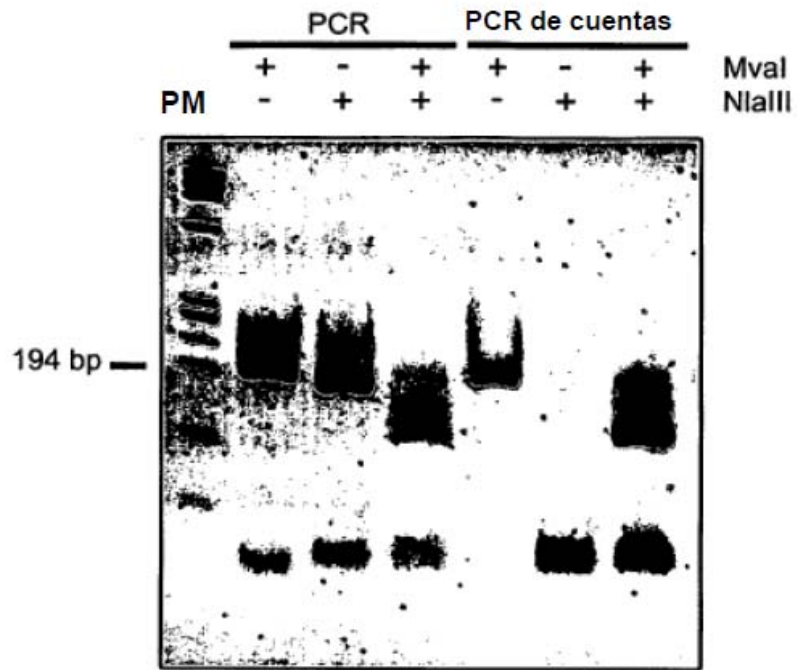


Fig.6

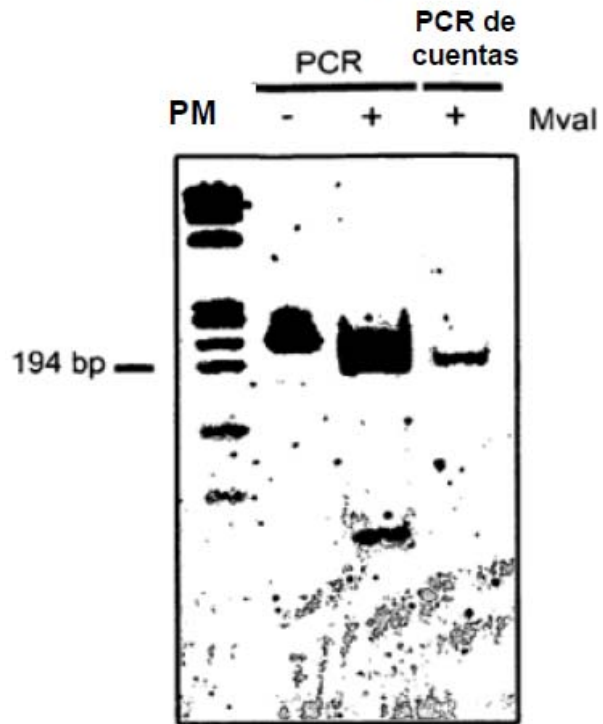


Fig.7

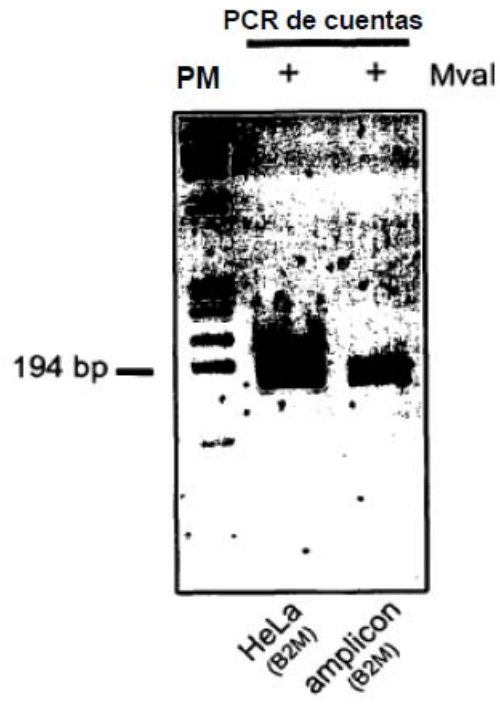


Fig. 8

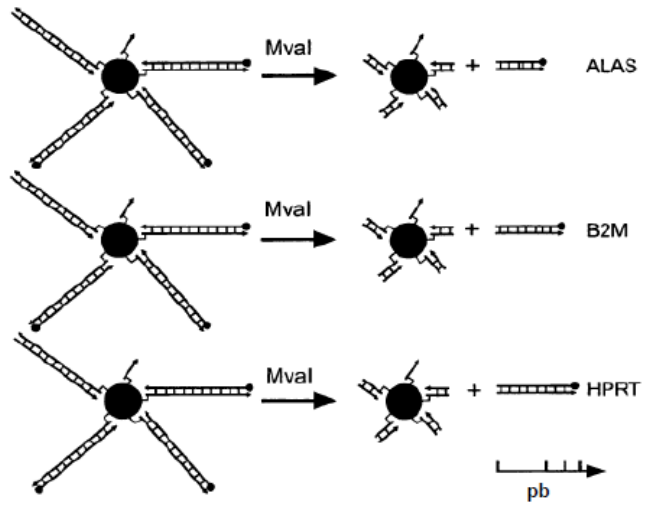


Fig. 9A

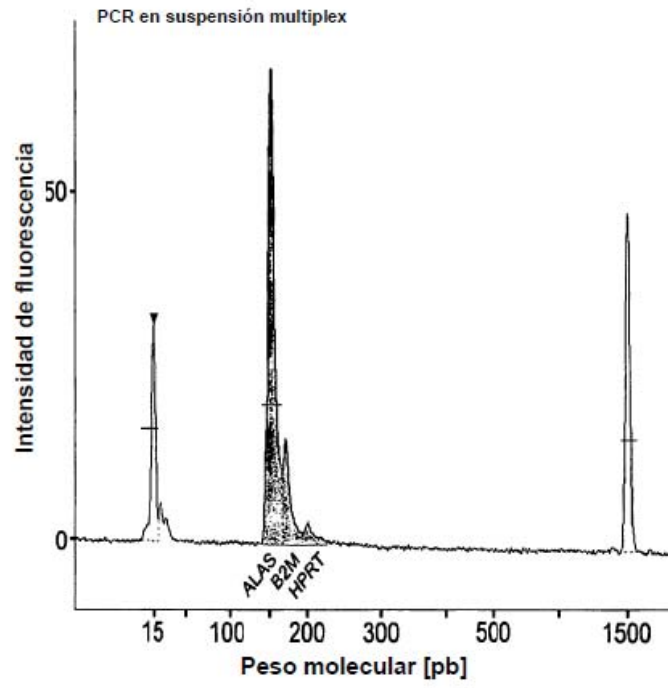


Fig. 9B

