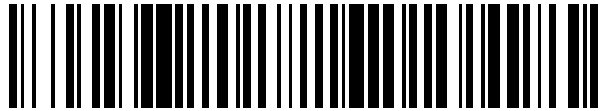


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 029**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2008 E 08859169 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 2227564**

54 Título: **Ensayos de ganancia y pérdida genómica multiplexados**

30 Prioridad:

**05.12.2007 US 992489 P**  
**26.03.2008 US 55919**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.10.2014**

73 Titular/es:

**PERKINELMER LAS, INC. (100.0%)**  
**940 WINTER STREET**  
**WALTHAM, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**ADLER, KARL EDWIN y**  
**SCHERMER, MACK J.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 511 029 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

Ensayos de ganancia y pérdida genómica multiplexados

**Referencia a solicitud relacionada**

5 La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente de EE. UU. n.º de serie 12/055.919, presentada el 26 de marzo de 2008, que reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º de serie 60/992.489, presentada el 5 de diciembre de 2007.

**Campo de la invención**

10 La tecnología descrita en el presente documento se refiere generalmente a procedimientos y composiciones para la detección de ácidos nucleicos. Más específicamente, se describen procedimientos y composiciones para ensayos de múltiplex de ADN genómico.

**Antecedentes de la invención**

15 Los ensayos para la detección de ganancia y pérdida genómica permiten la detección y diagnóstico de anomalías genéticas que pueden subyacer a enfermedad, afecciones conductuales y cognitivas, y otras patologías basadas en la genética. El documento WO2007/075894 A2 (Perkinelmer LAS, Inc.) 5/7/2007 desvela hibridación genómica comparativa usando partículas codificadas que contienen ADN de BAC sonicado como sonda de hibridación. Se requiere un ensayo de múltiplex de perlas codificadas para ganancias y pérdidas cromosómicas que proporcione los beneficios del ADN de BAC como material de sonda sin interconexión de perlas u otros problemas de rendimiento del ensayo.

**Resumen de la invención**

20 Un procedimiento de ensayo de una muestra de ADN que incluye proporcionar un primer conjunto de partículas codificadas que en sí mismo incluye partículas codificadas que tienen amplicones unidos. Los amplicones comprenden cada uno un segmento de ADN derivado de cebador y contienen secuencias de ácidos nucleicos aleatorias que juntos representan sustancialmente una primera secuencia de ADN de molde entero. Los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas se hibridan con ADN de muestra detectablemente marcado y con ADN de referencia detectablemente marcado. Se detecta una primera señal que es indicativa de la hibridación específica de los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra detectablemente marcado. Se detecta una segunda señal que es indicativa de la hibridación específica de los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de referencia detectablemente marcado. La primera y segunda señales se comparan para detectar diferencias entre la primera y segunda señales y diferencias entre la primera y segunda señales son indicativas de diferencias entre el ADN de muestra y el ADN de referencia.

30 Opcionalmente, los amplicones unidos tienen una longitud en el intervalo de aproximadamente 500 - 1200 nucleótidos, ambos incluidos.

El ADN de muestra detectablemente marcado puede ser ADN obtenido de un sujeto individual, tal como ADN genómico. El sujeto es un ser humano en realizaciones particulares de procedimientos descritos en el presente documento.

35 Realizaciones de procedimientos descritos en el presente documento incluyen adicionalmente proporcionar un segundo conjunto de partículas codificadas que incluye partículas codificadas que tienen amplicones unidos. Los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas comprenden cada uno un segmento de ADN derivado de cebador e incluyen secuencias de ADN que juntos representan sustancialmente una segunda secuencia de ADN de molde entero. Los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas se hibridan con ADN de muestra detectablemente marcado y con ADN de referencia detectablemente marcado. Se detecta una primera señal que es indicativa de la hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra detectablemente marcado. Se detecta una segunda señal que es indicativa de la hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de referencia detectablemente marcado. La primera y segunda señales se comparan para detectar diferencias entre la primera y segunda señales y diferencias entre la primera y segunda señales son indicativas de diferencias entre el ADN de muestra y el ADN de referencia.

45 En realizaciones particulares, el primer y segundo conjuntos de partículas codificadas se proporcionan en una mezcla. Realizaciones de procedimientos de uso de una mezcla de conjuntos de partículas codificadas incluyen adicionalmente asociar la codificación de los conjuntos de partículas individuales con las señales detectadas de manera que se asocian las señales referentes al ADN de molde particular con diferencias entre el ADN de muestra y el ADN de referencia.

50 Los amplicones unidos a cada conjunto de partículas codificadas comprenden cada uno un segmento de ADN derivado de cebador e incluyen secuencias de ácidos nucleicos aleatorias que juntos representan sustancialmente una secuencia de ADN de molde entero. En realizaciones particulares, la secuencia de ADN de molde entero es mayor que cada

amplición unido individual. En un ejemplo particular, la secuencia de ADN de molde entero tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 20 - 300 kilobases, ambos incluidos, y cada amplición unido individual incluye una secuencia de ácidos nucleicos idéntica a una porción de la secuencia de ADN de molde que tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 500 - 1200 nucleótidos, ambos incluidos.

5 Se describe un procedimiento de preparación de un conjunto de perlas codificadas para ensayar ADN que incluye a) realizar una primera reacción de amplificación usando un molde de ADN y cebadores de oligonucleótidos de la primera reacción. En esta reacción, cada uno de la pluralidad de los cebadores de la primera reacción incluye una secuencia de ADN degenerada no específica variable y una secuencia de ADN constante contigua. Un producto de reacción de esta primera reacción incluye primeros amplicones, en el que cada primer amplicón individual incluye una secuencia de ADN idéntica a una porción aleatoria del molde de ADN y una secuencia de ADN idéntica a la secuencia de ADN constante de los cebadores de la primera reacción. Adicionalmente se incluye en un procedimiento b) realizar una segunda reacción de amplificación usando al menos una porción de los primeros amplicones como molde de ADN y usar cebadores de oligonucleótidos de la segunda reacción. Los cebadores de oligonucleótidos de la segunda reacción incluyen la secuencia de ADN constante de los cebadores de la primera reacción y la segunda reacción de amplificación da un segundo producto de reacción que incluye segundos amplicones. Cada segundo amplicón individual incluye una secuencia de ADN idéntica a una porción aleatoria del molde de ADN y una secuencia de ADN idéntica a la secuencia de ADN constante de los cebadores de la primera reacción. Adicionalmente se incluye c) enlazar los segundos amplicones a una primera pluralidad de partículas codificadas produciendo así un conjunto de partículas codificadas para ensayar ADN.

10 Opcionalmente, los cebadores de oligonucleótidos de la segunda reacción incluyen adicionalmente un grupo funcional para la reacción con una partícula codificada. Por ejemplo, puede incluirse una amina del extremo 5'.

En otras realizaciones, a) - c) se repiten usando un segundo molde de ADN y enlazando segundos amplicones obtenidos así a una segunda pluralidad de partículas codificadas que son detectablemente diferentes de la primera pluralidad de partículas codificadas. Se genera un segundo conjunto de partículas codificadas para ensayar ADN por este procedimiento. En todavía otras realizaciones, a) - c) se repiten usando un tercer, cuarto, quinto o posterior molde de ADN genómico y enlazando el tercer, cuarto, quinto o posteriores amplicones así producidos a un tercera, cuarta, quinta o posterior pluralidad de partículas codificadas, cada una de la tercera, cuarta, quinta o posterior pluralidad de partículas codificadas detectablemente diferente de cada otra pluralidad de partículas codificadas, dando un tercer, cuarto, quinto o posterior conjunto de partículas codificadas para ensayar ADN. No pretende describirse límite al número de conjuntos de partículas codificadas que pueden generarse usando diferentes moldes de ADN. Puede generarse cualquier número de conjuntos de partículas codificadas. Además, puede mezclarse cualquier número adecuado de conjuntos de partículas codificadas para producir un reactivo de ensayo de ADN de múltiplex.

En el presente documento se describe un reactivo para ensayar ADN que incluye una pluralidad de partículas codificadas que tienen amplicones unidos amplificados de una secuencia de ADN de molde. Cada amplición unido individual comprende un segmento de ADN derivado de cebador e incluye una secuencia de ADN idéntica a una porción aleatoria de la secuencia de ADN de molde, en el que los amplicones juntos representan sustancialmente el molde de ADN entero y en el que la secuencia de ADN idéntica a una porción aleatoria de la secuencia de ADN de molde de cada amplición individual es más corta que el molde de ADN entero. Por ejemplo, en realizaciones específicas, la secuencia de ADN de molde entero puede tener una longitud en el intervalo de aproximadamente 20 - 300 kilobases, ambos incluidos, y cada amplición unido individual cada amplición unido individual comprende una secuencia de ADN idéntica a una porción aleatoria de la secuencia de ADN de molde que tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 500 - 1200 nucleótidos, ambos incluidos.

En el presente documento se describe un reactivo de múltiplex para ensayar ADN que incluye una mezcla de dos o más pluralidades de partículas codificadas de forma que las partículas de cada pluralidad de partículas sean detectablemente distinguibles de las partículas de cada otra pluralidad de partículas. Las partículas codificadas tienen amplicones unidos amplificados de una secuencia de ADN de molde, y cada pluralidad de partículas codificadas tiene amplicones unidos amplificados de una secuencia de ADN de molde diferente en comparación con cada otra pluralidad de partículas codificadas. Además, cada amplición unido individual incluye una secuencia de ADN idéntica a una porción aleatoria de la secuencia de ADN de molde y comprende un segmento de ADN derivado de cebador.

Se proporciona un kit para ensayar ADN que incluye un conjunto de partículas codificadas y/o una mezcla de dos o más conjuntos de partículas codificadas.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra una realización que incluye preparar amplicones a partir de molde de ADN usando dos reacciones de amplificación e inmovilizar los amplicones como sondas sobre un conjunto de perlas codificadas, en el que las perlas en el conjunto tienen todas el mismo código ID;

55 la figura 1A es un diagrama de flujo que ilustra una realización que incluye preparar amplicones de BAC de un único clon

de BAC e inmovilizar los amplicones como sondas sobre un conjunto de perlas codificadas, generando un conjunto de perlas en el que las perlas en el conjunto tienen todas el mismo código ID;

5 la figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra una realización que incluye mezclar  $m$  conjuntos de perlas codificadas diferentes, cada uno con su ADN de sonda de amplicón de BAC inmovilizado respectivo, juntos para hacer un conjunto de perlas codificadas multiplexadas;

la figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra una realización que incluye realizar un ensayo de ganancia y pérdida genómica multiplexado sobre  $n$  muestras usando un conjunto de perlas codificadas multiplexadas;

la figura 3A es un diagrama de flujo que ilustra una realización que incluye realizar un ensayo de ganancia y pérdida genómica multiplexado sobre  $n$  muestras usando un conjunto de perlas codificadas multiplexadas;

10 la figura 4 es un diagrama esquemático de una microplaca estándar de SBS de 96 pocillos, que muestra localizaciones de ejemplo de referencias duplicadas y muestras duplicadas para realizar un ensayo en 46 muestras en paralelo;

la figura 5 es un ejemplo de datos generados usando una muestra de ADN de Coriell que tiene una trisomía en el cromosoma 13, sexo masculino;

15 la figura 6 es un ejemplo de datos generados usando una muestra de ADN de Coriell que tiene una trisomía en el cromosoma 18, sexo masculino;

la figura 7 es un ejemplo de datos generados usando una muestra de ADN de Coriell que tiene una trisomía en el cromosoma 21, sexo femenino;

la figura 8 es un ejemplo de datos generados usando una muestra de ADN de Coriell que tiene una amplificación de 5 copias del cromosoma X; y

20 la figura 9 es una tabla que muestra los clones de BAC usados para generar amplicones inmovilizados sobre perlas codificadas en los ensayos de ejemplo, su cromosoma y localizaciones de citobandas, la secuencia del oligonucleótido de control negativo y la ID de perlas (región de perlas Luminex) para el conjunto de perlas al que se inmovilizada cada sonda de amplicón.

### Descripción detallada

25 En el presente documento se proporcionan procedimientos y composiciones referentes a ensayos de múltiplex de partículas codificadas para ganancias y pérdidas cromosómicas.

30 Los términos científicos y técnicos usados en el presente documento pretenden tener los significados comúnmente entendidos por aquellos expertos habituales en la materia. Tales términos se encuentran definidos y se usan en el contexto de diversas referencias estándar que incluyen ilustrativamente J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª ed., 2001; F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5ª ed., 2002; B. Alberts y col., *Molecular Biology of the Cell*, 4ª ed., Garland, 2002; D.L. Nelson y M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4ª ed., W.H. Freeman & Company, 2004; y Herdewijn, P. (Ed.), *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004.

35 El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de ARN o de ADN que tienen más de un nucleótido en cualquier forma que incluye monocatenaria, bicatenaria, oligonucleótido o polinucleótido.

#### Composiciones de reactivo

40 Se proporciona un reactivo para ensayar ADN genómico que incluye una pluralidad de partículas codificadas que tienen amplicones unidos como sondas. Los amplicones unidos a la pluralidad de partículas codificadas incluyen cada uno una secuencia de ácidos nucleicos idéntica o completamente complementaria a una porción de un ácido nucleico genómico de molde y juntos los amplicones representan sustancialmente el ácido nucleico genómico de molde entero.

La figura 1 ilustra una realización de un procedimiento de preparación de un reactivo para ensayar ADN genómico. Como se indica en la figura 1, se proporciona un ácido nucleico de molde, 1. El molde se amplifica, 2, en una primera reacción de amplificación usando cebadores de oligonucleótidos redundantes (COR) para producir un primer producto de amplificación.

45 El ácido nucleico de molde puede ser cualquier ácido nucleico que pueda ser copiado usando un procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos.

El molde de ADN para esta primera reacción de amplificación es opcionalmente ADN genómico, que normalmente tiene un tamaño en el intervalo de aproximadamente 20 - 300 kb, aunque el molde puede ser más pequeño o mayor. El término

“genómico” se refiere a ADN del genoma de una célula u organismo e incluye ADN aislado directamente de una célula u organismo, tal como ADN cromosómico microdisecionado, además de ADN copiado de ADN del genoma de una célula u organismo, tal como ADN clonado. El molde de ADN puede englobar todo o parte de un genoma de una célula u organismo. El molde de ADN puede englobar ADN que representa uno o más cromosomas, una porción de un cromosoma, un sitio genético, un gen o una porción de un gen. El molde de ADN puede estar en cualquier forma, tal como un inserto en un vector que incluye ilustrativamente un cromosoma artificial bacteriano, cromosoma artificial de levadura, cromosoma artificial humano, cósmido, plásmido, fagémido, ADN de fago o fósmdo. El molde de ADN puede estar en forma de ADN cromosómico microdisecionado. Así, aunque los ejemplos específicos descritos en el presente documento se refieren a BAC como fuentes de molde de ADN, pueden usarse otros tipos de clones tales como PAC, YAC, cósmidos, fósmdos, ADNc y similares.

El ADN genómico de molde se obtiene mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª ed., 2001 o F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5ª ed., 2002. También puede obtenerse molde de ADN comercialmente y/o usando kits comerciales para el aislamiento de ADN genómico.

La amplificación del molde de ADN se logra usando un procedimiento de amplificación *in vitro*. El término “procedimiento de amplificación” se refiere a un procedimiento o técnica para copiar un ácido nucleico de molde, produciendo así ácidos nucleicos que incluyen copias de toda o una porción del ácido nucleico de molde, los ácidos nucleicos producidos también llamados amplicones.

Los amplicones contienen secuencias de ácidos nucleicos presentes en los cebadores y no presentes en el molde de ADN original. Tales ácidos nucleicos derivados de cebador añaden funcionalidad, tal como sitios de enlace a cebador para reacciones de amplificación adicionales y/o un grupo funcional para la fijación química a un sustrato.

Los procedimientos de amplificación que incluyen ilustrativamente PCR, PCR mediada por ligación (LM-PCR), PCR de phi-29, y otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, como se describen en C.W. Dieffenbach y col., *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003; y V. Demidov y col., *DNA Amplification: Current Technologies and Applications*, Taylor & Francis, 2004.

Pueden usarse muchas combinaciones de fuentes de molde de ADN particulares y procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos.

El término “cebador de oligonucleótidos” se refiere a un ácido nucleico que puede actuar como sitio de iniciación de la síntesis de un producto de extensión de cebadores bajo condiciones de reacción apropiadas. Un cebador de oligonucleótidos tiene normalmente aproximadamente 10 - 30 nucleótidos contiguos de longitud. Un cebador de oligonucleótidos es completamente o sustancialmente complementario a una región de un ácido nucleico de molde de forma que, bajo condiciones de hibridación, el cebador de oligonucleótidos se hibrida con la región complementaria del ácido nucleico de molde. Condiciones de reacción apropiadas para la síntesis de un producto de extensión de cebadores incluyen la presencia de componentes de reacción adecuados que incluyen, pero no se limitan a, una polimerasa y trifosfatos de nucleótidos. El diseño de cebadores de oligonucleótidos adecuados para su uso en reacciones de amplificación es muy conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en A. Yucentenov y col., *PCR Primer Design*, Humana Press, 2007.

El término “cebador de oligonucleótidos redundante” se refiere a un cebador que incluye un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos aleatoria o semi-aleatoria. El diseño de cebadores de oligonucleótidos redundantes adecuados para reacciones de amplificación de ácidos nucleicos particulares es muy conocido en la técnica, por ejemplo, como se describen en A. Yucentenov y col., *PCR Primer Design*, Humana Press, 2007. Pueden usarse secuencias de nucleótidos aleatorias o semi-aleatorias que tienen aproximadamente 5-8 nucleótidos. En otras realizaciones, hexámeros de nucleótidos aleatorios o semi-aleatorios están incluidos en cebadores de oligonucleótidos redundantes usados en la primera amplificación.

Los cebadores de oligonucleótidos redundantes usados en realizaciones particulares incluyen cada uno un segmento de ADN constante de 5', un segmento de ADN aleatorio intermedio y un segmento de anclaje de 3', por ejemplo, como se describe en Fiegler y col., *Genes Chromosomes Cancer*, 36(4):361-74, 2003; y Telenius y col., *Genomics* 13:718-25, 1992. El segmento de ADN constante de 5' tiene opcionalmente la misma secuencia de nucleótidos en todos los COR. El segmento de anclaje de 3' tiene opcionalmente una secuencia de nucleótidos determinada que tiene una frecuencia deseada de aparición en el ácido nucleico de molde. El análisis de la frecuencia de aparición de una secuencia de ácidos nucleicos particular es muy conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en Milosavljevic, A. y Jurka, J., 1993, *Comput. Applic. Biosci.*, 9:407-411; Pesole, G. y col., 1992, *Nucleic Acids. Res.*, 20 :2871-2875; y Hutchinson, G. B., 1996, *Comput. Appl. Biosci.*, 12:391-398.

En realizaciones particulares, los COR incluyen aproximadamente 17-25 nucleótidos contiguos, de los cuales aproximadamente 7-12 nucleótidos contiguos están incluidos en el segmento de ADN constante de 5', aproximadamente

5-8 nucleótidos contiguos están incluidos en el segmento de ADN aleatorio y aproximadamente 5-8 nucleótidos contiguos están incluidos en el segmento de anclaje de 3'.

La primera reacción de amplificación da una primer producto de reacción que contiene una pluralidad de amplicones. Cada amplicón individual en el primer producto de reacción incluye una secuencia de ADN idéntica o completamente complementaria a una porción aleatoria del molde de ADN y una secuencia de ADN idéntica a la secuencia de ADN constante de 5' de los cebadores de la primera reacción.

El término "complementario" como se usa en el presente documento se refiere a apareamiento de bases de Watson-Crick entre nucleótidos, y específicamente se refiere a nucleótidos enlazados entre sí mediante hidrógeno con residuos de timina o uracilo ligados a residuos de adenina por dos enlaces de hidrógeno y residuos de citosina y guanina ligados por tres enlaces de hidrógeno. En general, un ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos descrita que tiene un "porcentaje de complementariedad" con una segunda secuencia de nucleótidos especificada. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos puede tener el 80 %, 90 % o el 100 % de complementariedad con una segunda secuencia de nucleótidos especificada, que indica que 8 de 10, 9 de 10 o 10 de 10 nucleótidos de una secuencia son complementarios a la segunda secuencia de nucleótidos especificada. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos 3'-TCGA-5' es el 100 % complementaria a la secuencia de nucleótidos 5'-AGCT-3'. Además, la secuencia de nucleótidos 3'-TCGA- es el 100 %, o completamente, complementaria a una región de la secuencia de nucleótidos 5'-TTAGCTGG-3'.

Con referencia a la figura 1, se realiza una segunda reacción de amplificación, 3, usando los amplicones del primer producto de reacción como molde de ADN. La segunda reacción de amplificación, 3, incluye un cebador de oligonucleótidos "universal", llamado así ya que el cebador universal es idéntico o completamente complementario al segmento de ADN constante de 5' del COR usado en la primera reacción de amplificación. Un cebador de oligonucleótidos universal incluye el segmento de ADN constante de 5' del COR usado en la primera reacción de amplificación posicionada en el extremo 3' del cebador universal. Un cebador de oligonucleótidos universal incluye opcionalmente nucleótidos contiguos adicionales en el extremo 5' del cebador.

En una opción particular, un cebador de oligonucleótidos universal incluye un grupo funcional en el extremo 5' del cebador para la unión de los amplicones resultantes de la segunda reacción de amplificación a un sustrato sólido o semi-sólido codificado tal como partículas codificadas. Por ejemplo, los cebadores de oligonucleótidos universales incluyen un grupo amina en el extremo 5' del cebador. En otra opción, amplicones resultantes de la segunda reacción de amplificación pueden modificarse para incluir un grupo funcional para la fijación a un sustrato sólido o semi-sólido. La modificación de un ácido nucleico para incluir un grupo funcional que puede fijarse a un sustrato sólido o semi-sólido es muy conocida en la técnica.

En realizaciones particulares, cada amplicón individual unido a una partícula incluye un segmento de ADN idéntico a una porción aleatoria de la secuencia de ADN de molde. Cada amplicón individual también contiene un segmento de ADN constante contiguo con el segmento de ADN idéntico a una porción aleatoria de la secuencia de ADN de molde. El segmento de ADN constante del amplicón incluye opcionalmente un grupo funcional terminal para la unión del amplicón a una partícula codificada. En una realización particular, el segmento de ADN constante del amplicón incluye un grupo amina del extremo 5' para la unión del amplicón a una partícula codificada.

Como se muestra en la figura 1, los amplicones del segundo producto de reacción se inmovilizan, 4, sobre una pluralidad de partículas codificadas. El enlace de los amplicones de la segunda reacción de amplificación a las partículas codificadas se logra por cualquiera de diversos procedimientos eficaces para enlazar un ácido nucleico a un sustrato sólido o semi-sólido, que incluyen ilustrativamente adsorción y enlace químico. Los amplicones pueden fijarse directamente al material de las partículas codificadas o fijarse indirectamente a las partículas codificadas, por ejemplo, mediante fijación a un recubrimiento o ligador dispuesto sobre las partículas. Pueden sintetizarse amplicones, y/o modificarse una vez sintetizados, para incluir un grupo funcional para su uso en la fijación de los amplicones a partículas. Por ejemplo, los amplicones pueden incluir grupos funcionales carboxilo, amina, amino, carboxilato, haluro, éster, alcohol, carbamida, aldehído, clorometilo, óxido de azufre, óxido de nitrógeno, epoxi y/o tosilo.

Las partículas a las que los amplicones se enlazan pueden ser cualquier partícula sólida o semi-sólida a la que puedan unirse los amplicones, que son adecuadas para un ensayo de múltiple y que son estables e insolubles bajo condiciones de hibridación y detección. Las partículas pueden ser de cualquier forma, tal como cilíndrica, esférica, etc. tamaño, composición o características fisicoquímicas. El tamaño de la partícula o composición puede elegirse de manera que la partícula pueda separarse del líquido, por ejemplo, sobre un filtro con un tamaño de poro particular o por alguna otra propiedad física, por ejemplo, una propiedad magnética.

Las micropartículas, tales como microperlas, usadas pueden tener un diámetro inferior a un milímetro, por ejemplo, un tamaño que oscila de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.000 micrómetros de diámetro, ambos incluidos, tal como aproximadamente 3-25 micrómetros de diámetro, ambos incluidos, o aproximadamente 5-10 micrómetros de diámetro, ambos incluidos. Las nanopartículas, tales como nanopérlas, usadas pueden tener un diámetro de

aproximadamente 1 nanómetro (nm) a aproximadamente 100.000 nm de diámetro, ambos incluidos, por ejemplo, un tamaño que oscila de aproximadamente 10-1.000 nm, ambos incluidos, o por ejemplo, un tamaño que oscila de 200-500 nm, ambos incluidos. En ciertas realizaciones, las partículas usadas son perlas, particularmente microperlas y nanoperlas.

- 5 Las partículas son partículas ilustrativamente orgánicas o inorgánicas, tales como vidrio o metal, y pueden ser partículas de un polímero sintético o que se produce naturalmente, tal como poliestireno, policarbonato, silicio, nailon, celulosa, agarosa, dextrano y poli(acrilamida). Las partículas son perlas de látex en realizaciones particulares.

Las partículas usadas incluyen grupos funcionales para enlazarse con amplicones en realizaciones particulares. Por ejemplo, las partículas pueden incluir grupos funcionales carboxilo, amina, amino, carboxilato, haluro, éster, alcohol, carbamida, aldehído, clorometilo, óxido de azufre, óxido de nitrógeno, epoxi y/o tosilo. Grupos funcionales de partículas, modificación de los mismos y fijación de un resto químico, tal como un ácido nucleico, a los mismos se conocen en la técnica, por ejemplo, como se describe en Fitch, R. M., Polymer Colloids: A Comprehensive Introduction, Academic Press, 1997. La patente de EE. UU. n.º 6.048.695 describe un procedimiento a modo de ejemplo para unir sondas de ácido nucleico, tal como amplicones, a un sustrato, tal como partículas. En otro ejemplo particular puede usarse química de clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida, EDC o EDAC para unir amplicones a partículas codificadas.

Partículas codificadas son partículas que son distinguibles de otras partículas basándose en una característica que incluye ilustrativamente una propiedad óptica, tal como color, índice de reflexión y/o un patrón serigrafiado o de otro modo ópticamente detectable. Por ejemplo, las partículas pueden codificarse usando marcas ópticas, químicas, físicas, o electrónicas. Las partículas codificadas pueden contener o unirse a uno o más fluoróforos que son distinguibles, por ejemplo, por longitud de onda de excitación y/o emisión, intensidad de emisión, duración del estado excitado o una combinación de estas u otras características ópticas. Pueden usarse códigos de barras ópticos para codificar partículas.

En realizaciones particulares, cada partícula de un conjunto de partículas se codifica con el mismo código de forma que cada partícula de un conjunto de partículas sea distinguible de cada partícula de otro conjunto de partículas. En otras realizaciones pueden usarse dos o más códigos para un único conjunto de partículas. Cada partícula puede incluir, por ejemplo, un único código. En ciertas realizaciones, la codificación de partículas incluye un código distinto o además asociación de una partícula y una sonda de ácido nucleico específica para ADN genómico.

En realizaciones particulares, el código está incorporado, por ejemplo, dentro del interior de la partícula, o unido de otro modo a la partícula de un modo que es estable mediante hibridación y análisis. El código puede proporcionarse por cualquier medio detectable, tal como por codificación holográfica, por una propiedad de fluorescencia, color, forma, tamaño, emisión de luz, emisión de puntos cuánticos y similares para identificar la partícula y así las sondas de captura inmovilizadas a la misma. En algunas realizaciones, el código es distinto de uno proporcionado por un ácido nucleico.

Una plataforma a modo de ejemplo utiliza mezclas de colorantes fluorescentes impregnados en partículas de polímero como medios para identificar cada miembro de un conjunto de partículas a los que se ha inmovilizado una sonda de captura específica. Otra plataforma a modo de ejemplo usa códigos de barras holográficos para identificar partículas de vidrio cilíndricas. Por ejemplo, Chandler y col. (patente de EE. UU. n.º 5.981.180) describen un sistema basado en partículas en el que diferentes tipos de partículas están codificadas por mezclas de diversas proporciones de dos o más colorantes fluorescentes impregnados en partículas de polímero. Soini (patente de EE. UU. n.º 5.028.545) describe un sistema de ensayo multiplexado basado en partículas que emplea fluorescencia resuelta en el tiempo para la identificación de partículas. Fulwyler (patente de EE. UU. n.º 4.499.052) describe un procedimiento a modo de ejemplo de uso de partículas diferenciadas por color y/o tamaño. Las publicaciones de solicitud de patente de EE. UU. 20040179267, 20040132205, 20040130786, 20040130761, 20040126875, 20040125424 y 20040075907 describen partículas a modo de ejemplo codificadas por códigos de barras holográficos. La patente de EE. UU. n.º 6.916.661 describe micropartículas poliméricas que están asociadas a nanopartículas que tienen colorantes que proporcionan un código para las partículas

Mientras que una realización descrita en detalle en el presente documento utiliza la plataforma de perlas codificadas Luminex, pueden usarse otros tipos de plataformas de ensayo de partículas codificadas, tales como las perlas VeraCode y el sistema BeadXpress (Illumina Inc., San Diego CA), xMAP 3D (Luminex) y similares. Pueden usarse perlas magnéticas Luminex que permiten realizar etapas de lavado con imanes de placa y pipetear en vez de con placas de filtro y un colector de vacío. Cada una de estas plataformas se proporciona normalmente como perlas de carboxilo, pero también pueden configurarse para incluir una química de acoplamiento diferente, tal como amino-silano.

En general, los amplicones que son el producto de la segunda reacción de amplificación son bicatenarios y los amplicones bicatenarios están unidos a las partículas. Así, ambas cadenas de los amplicones bicatenarios se representan sobre cada partícula. Los amplicones se desnaturalizan y se convierten en monocatenarios después de la inmovilización a las partículas para la preparación para su uso en realizaciones particulares de procedimientos de ensayo. Opcionalmente, los amplicones bicatenarios se desnaturalizan antes de la inmovilización y entonces los amplicones monocatenarios se unen a partículas.

5 Como se describe, cada amplicón individual de tanto la primera como la segunda reacciones de amplificación contiene una secuencia de ácidos nucleicos idéntica a una porción aleatoria de la secuencia de ADN de molde de forma que los amplicones producidos por la primera reacción de amplificación representan juntos sustancialmente la secuencia de ADN de molde entero y los amplicones producidos por la segunda reacción de amplificación representan juntos sustancialmente la secuencia de ADN de molde entero.

Las partículas codificadas que tienen amplicones enlazados que son el producto de una segunda reacción de amplificación y que juntos representan sustancialmente la secuencia de ADN genómico entero usada como molde en la primera reacción de amplificación son un primer conjunto de partículas y un primer reactivo para ensayar ADN genómico.

10 En realizaciones particulares, cada amplicón individual unido a una partícula tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 500 - 1200 nucleótidos, ambos incluidos. Así, un ácido nucleico de molde relativamente grande se representa sustancialmente enteramente en un conjunto de partículas codificadas por los amplicones relativamente más pequeños unidos amplificados del molde.

15 Como se observa anteriormente, cada conjunto de partículas incluye partículas codificadas que tienen amplicones enlazados que son el producto de una segunda reacción de amplificación y que juntos representan sustancialmente la secuencia de ADN genómico entero usada como molde en una primera reacción de amplificación. El número de partículas que incluyen amplicones que es suficiente para juntas representar sustancialmente la secuencia de ADN genómico entero usada como molde en la primera reacción de amplificación depende de varios factores tales como el tamaño del molde, el tamaño de los amplicones y el número de sitios de unión disponibles para enlazar un amplicón sobre una partícula. En general, el número de partículas suficiente para juntas representar sustancialmente la secuencia de ADN genómico entero usada como molde en la primera reacción de amplificación está en el intervalo de aproximadamente 1-10.000, ambos incluidos.

20 Se generan conjuntos de partículas adicionales por amplificación usando un segundo molde de ADN genómico y enlazando los amplicones que son el producto de reacción de una segunda reacción de amplificación como se ha descrito anteriormente a una segunda pluralidad de partículas codificadas. La segunda pluralidad de partículas codificadas es detectablemente diferente de la primera pluralidad de partículas codificadas, generando así un segundo conjunto de partículas codificadas y un segundo reactivo para ensayar ADN genómico.

30 Similarmente, se usa un tercer o posterior molde de ADN genómico para generar el producto de reacción de una reacción de amplificación y el producto de reacción se une a una tercera o posterior pluralidad de partículas codificadas. Cada una de la tercera o posterior pluralidad de partículas codificadas es detectablemente diferente de cada otra pluralidad de partículas codificadas, dando un tercer o posterior conjunto de partículas codificadas y un tercer o posterior reactivo para ensayar ADN genómico.

#### Reactivo de múltiplex

35 Se proporciona un reactivo de múltiplex para ensayar ADN genómico según ciertas realizaciones que incluyen una mezcla de dos o más conjuntos de partículas. Las partículas codificadas individuales de cada conjunto de partículas codificadas son detectablemente distinguibles de partículas codificadas individuales de cada otro conjunto de partículas codificadas en realizaciones particulares. Cada conjunto de partículas codificadas tiene amplicones unidos que son el producto de una segunda reacción de amplificación como se describe en el presente documento y que juntos representan sustancialmente la secuencia de ADN genómico entero usada como molde en una primera reacción de amplificación, en la que un molde genómico diferente se representa por amplicones unidos a cada otro conjunto de partículas codificadas.

40 Un reactivo de múltiplex según una realización específica incluye un primer conjunto de partículas codificadas que tiene amplicones unidos que juntos representan sustancialmente una secuencia de ADN de molde entero insertado en el primer cromosoma artificial bacteriano y un segundo conjunto de partículas codificadas que tiene amplicones unidos que juntos representan sustancialmente una secuencia de ADN de molde entero insertada en el segundo cromosoma artificial bacteriano.

45 Por ejemplo, un primer conjunto de partículas codificadas tiene amplicones unidos que incluyen secuencias de ácidos nucleicos idénticas a una porción del cromosoma humano 13 de ADN y un segundo conjunto de partículas codificadas tiene amplicones unidos que incluyen secuencias de ácidos nucleicos idénticas a una porción del cromosoma 18 de ADN humano. El tercer o posterior conjunto de partículas codificadas tiene amplicones unidos que incluyen secuencias de ácidos nucleicos idénticas a ADN humano de otro cromosoma u otra región no solapante de un cromosoma.

50 Un reactivo de múltiplex descrito en el presente documento permite el ensayo simultáneo de múltiples dianas, tales como sitios genómicos múltiples, en un único ensayo.

Se genera un reactivo de múltiplex para ensayar ADN genómico mezclando al menos un primer conjunto de partículas codificadas y un segundo conjunto de partículas codificadas.



La figura 2 ilustra una realización de un procedimiento de generación de un reactivo de múltiplex. Como se indica en la figura, cualquier número “m” de conjuntos de partículas codificadas puede incluirse en el reactivo de múltiplex. Así, por ejemplo, “m” puede ser al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o 200 conjuntos diferentes de partículas codificadas. Un conjunto de partículas codificadas que tiene amplicones enlazados se combina con uno o más conjuntos adicionales de partículas codificadas que tienen amplicones enlazados para generar un reactivo de múltiplex para ensayo de ganancia y pérdida genómica en una muestra.

#### Procedimientos de ensayo

Un procedimiento de ensayo de ADN genómico incluye proporcionar partículas codificadas que tienen amplicones unidos que juntos representan sustancialmente un ácido nucleico genómico de molde entero. En realizaciones particulares se proporcionan partículas codificadas que tienen amplicones unidos que juntos representan más de una copia de un ácido nucleico genómico de molde sustancialmente entero.

Una muestra de ADN genómico que va a ensayarse para ganancia y/o pérdida genómica se marca con una marca detectable. El ADN de referencia también se marca con una marca detectable para comparación con el ADN de muestra. El ADN de muestra y de referencia pueden marcarse con las mismas marcas detectables o diferentes dependiendo de la configuración de ensayo usada. Por ejemplo, el ADN de muestra y de referencia marcado con diferentes marcas detectables pueden usarse juntos en el mismo recipiente para la hibridación con amplicones unidos a partículas codificadas en realizaciones particulares. En otras realizaciones, el ADN de muestra y de referencia marcado con las mismas marcas detectables puede usarse en recipientes separados para la hibridación con amplicones unidos a partículas.

El término “marca detectable” se refiere a cualquier átomo o resto que pueda proporcionar una señal detectable y que pueda unirse a un ácido nucleico. Ejemplos de tales marcas detectables incluyen restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, restos bioluminiscentes, ligandos, partículas magnéticas, enzimas, sustratos enzimáticos, radioisótopos y cromóforos.

Puede usarse cualquiera de los diversos procedimientos de marcado de ADN de muestra y de referencia en el ensayo, tal como traducción en muescas o marcado químico del ADN. Por ejemplo, una marca detectable puede introducirse por polimerización usando nucleótidos que incluyen al menos algunos nucleótidos modificados, tales como nucleótidos modificados para incluir biotina, digoxigenina, fluoresceína o cianina. En algunas realizaciones, la marca detectable se introduce por cebado aleatorio y polimerización. Otros ejemplos incluyen traducción en muescas (Roche Applied Science, Indianapolis Ind.; Invitrogen, Carlsbad Calif.) y marcado químico (Kreatech ULS, Ámsterdam NL). El marcado detectable de ácidos nucleicos es muy conocido en la técnica y puede usarse cualquier procedimiento de marcado apropiado para marcar ADN genómico.

En otra realización más se evita el marcado covalente de ADN de muestra y de referencia individualmente con una marca detectable. Por ejemplo, las muestras de ADN genómico sin marcar se hibridan con los amplicones inmovilizados a las partículas codificadas. Las secuencias indicadoras premarcadas también se hibridan con los complejos de amplicón-ADN de muestra y complejos de amplicón-ADN de referencia en secuencias adyacentes a, pero que no solapan, las secuencias de las sondas de captura de los amplicones. Estas secuencias indicadoras marcadas pueden hibridarse en la misma reacción de hibridación o en una diferente. De este modo, las secuencias indicadoras marcadas pueden fabricarse al por mayor en un entorno a gran escala, reduciendo el coste por ensayo en comparación con marcar individualmente cada muestra en el momento del ensayo.

El ADN genómico de “muestra” y de “referencia” pueden obtenerse de cualquier fuente adecuada. Procedimientos particulares descritos en el presente documento implican usar ADN genómico de muestra de un sujeto individual. El ADN genómico de muestra y/o de referencia pueden extraerse de casi cualquier tejido que incluye, pero no se limita a, sangre, líquido amniótico, tumores sólidos, biopsias de órganos, muestras de la mejilla, vellosidades coriónicas, blastocistos y blastómeros, productos de concepción, saliva, orina y similares. Las muestras archivadas extraídas de muestras de patología incorporadas en parafina fijadas con formalina (FFPE) también son fuentes de ADN genómico de muestra ensayado por este procedimiento. También puede obtenerse ADN genómico de muestra y/o de referencia de fuentes *in vitro* tales como líneas celulares. Los procedimientos de obtención de ADN genómico de estas u otras fuentes son muy conocidos en la técnica.

En realizaciones particulares, el ADN de referencia se caracteriza con respecto a una característica particular del ADN de muestra que va a ensayarse. Por ejemplo, si el ADN de muestra va a ensayarse para detectar la duplicación de un gen particular o sitio cromosómico, el ADN de referencia se caracteriza de manera que se sabe cuántas copias del gen o sitio están contenidas en el ADN de referencia. En general se usan ADN de muestra y de referencia de las mismas especies.

Puede usarse un ensayo descrito en el presente documento para detectar o caracterizar trastornos asociados a ganancias o pérdidas cromosómicas. Los trastornos constitucionales, o innatos, incluyen trisomías de cromosomas enteros, amplificaciones o deleciones de sitios genómicos más pequeños (aproximadamente 200 kilobases a 20 megabases) y

amplificaciones o deleciones en las regiones sub-telómeras o centrómeras. Diversos cánceres también se caracterizan por ganancias y pérdidas cromosómicas que pueden correlacionarse con tipo, etapa, resistencia a fármacos o respuesta a terapia. Las líneas celulares de laboratorio, que incluyen líneas de células madre, pueden caracterizarse para estabilidad cromosómica usando el presente procedimiento.

5 Aunque los procedimientos y composiciones se describen en el presente documento principalmente con referencia a ácidos nucleicos derivados de seres humanos, se aprecia que los procedimientos y composiciones descritos en el presente documento pueden usarse para ensayar ADN genómico de muestra de cualquiera de los diversos organismos que incluyen, pero no se limitan a, primates no humano, roedores, conejos, perros, gatos, caballos, ganado vacuno, cerdos, cabras y ovejas. También pueden ensayarse fuentes de no mamífero de ADN de muestra, que incluyen  
10 ilustrativamente pescado y otros organismos acuáticos, aves, aves de corral, bacterias, virus, plantas, insectos, reptiles, anfibios, hongos y micobacterias.

Los amplicones unidos a las partículas codificadas se hibridan con ADN genómico de muestra detectablemente marcado de un sujeto individual de manera que se logre la hibridación específica del ADN de amplicón y el ADN genómico de muestra detectablemente marcado. Además, las secuencias de ADN unidas a las partículas codificadas se hibridan con  
15 ADN genómico de referencia detectablemente marcado de manera que se logre la hibridación específica del ADN de amplicón y el ADN genómico de referencia detectablemente marcado.

Los términos “hibridación” e “hibridado” se refieren a emparejar y enlazar ácidos nucleicos complementarios. La hibridación se produce a grados variables entre dos ácidos nucleicos dependiendo de factores tales como el grado de complementariedad de los ácidos nucleicos, la temperatura de fusión,  $T_m$ , de los ácidos nucleicos y la rigurosidad de  
20 condiciones de hibridación, como es muy conocido en la técnica. El término “rigurosidad de condiciones de hibridación” se refiere a condiciones de temperatura, fuerza iónica y composición de un medio de hibridación con respecto a aditivos comunes particulares tales como formamida y disolución de Denhardt. La determinación de condiciones de hibridación particulares referentes a un ácido nucleico especificado es rutinaria y es muy conocida en la técnica, por ejemplo, como se describe en J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª ed., 2001; y F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, *Current Protocols*; 5ª ed., 2002. Las condiciones de hibridación de alta rigurosidad son aquellas que solo permiten hibridación de ácidos nucleicos sustancialmente complementarios. Normalmente, los ácidos nucleicos que tienen aproximadamente el 85-100% de complementariedad se consideran altamente complementarios y se hibridan bajo condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad intermedia se ejemplifican por condiciones bajo las cuales se hibridan los ácidos nucleicos que  
30 tienen complementariedad intermedia, aproximadamente el 50-84 % de complementariedad, además de aquellos que tienen un alto grado de complementariedad. A diferencia, las condiciones de hibridación de baja rigurosidad son aquellas en las que se hibridan ácidos nucleicos que tienen un bajo grado de complementariedad. Los términos “hibridación específica” y “se hibrida específicamente” se refieren a hibridación de un ácido nucleico particular con un ácido nucleico diana sin hibridación sustancial con ácidos nucleicos distintos del ácido nucleico diana en una muestra.

35 Los ensayos descritos pueden realizarse en cualquier recipiente adecuado. En realizaciones particulares, por ejemplo, si van a ensayarse múltiples muestras, puede usarse un recipiente de múltiples cámaras. Los recipientes de múltiples cámaras incluyen ilustrativamente sustratos de múltiples depresiones tales como portaobjetos, chips de silicio o bandejas. En algunas realizaciones, cada muestra está dispuesta en un pocillo diferente de una placa de múltiples pocillos. Por ejemplo, una placa de múltiples pocillos puede ser una placa de ensayo de 96 pocillos, 384 pocillos o 1024 pocillos.

40 Adicionalmente se incluye la detección de una primera señal que indica la hibridación específica de las secuencias de ADN unidas con ADN genómico detectablemente marcado de un sujeto individual y la detección de una segunda señal que indica la hibridación específica de las secuencias de ADN unidas con ADN genómico de referencia detectablemente marcado.

Cualquier procedimiento apropiado, que incluye ilustrativamente espectroscópico, óptico, fotoquímico, bioquímico, enzimático, eléctrico y/o inmunoquímico se usa para detectar las marcas detectables del ADN de muestra y de referencia hibridado con amplicones enlazados a las partículas codificadas.  
45

Las señales que son indicativas del grado de hibridación pueden detectarse, para cada partícula, evaluando la señal de una o más marcas detectables. Las partículas se evalúan normalmente individualmente. Por ejemplo, las partículas pueden pasarse a través de un citómetro de flujo. Citómetros de flujo a modo de ejemplo incluyen el citómetro de flujo Coulter Elite-ESP o el citómetro de flujo FACScan.TM. disponible de Beckman Coulter, Inc. (Fullerton Calif.) y el citómetro de flujo MOFLO.TM. disponible de Cytomation, Inc., Fort Collins, Colo. Además de citometría de flujo, puede usarse una centrífuga como instrumento para separar y clasificar las partículas. Un sistema adecuado es el descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.926.387. Además de citometría de flujo y centrifugación puede usarse un aparato de electroforesis de flujo libre como instrumento para separar y clasificar las partículas. Un sistema adecuado es el descrito en la patente de EE.  
50 UU. n.º 4.310.408. Las partículas también pueden disponerse sobre una superficie y escanearse u obtenerse imágenes.

Se detecta una primera señal que indica hibridación específica de las secuencias de ADN unidas de partículas codificadas con ADN genómico detectablemente marcado de un sujeto individual. También se detecta una segunda señal que indica hibridación específica de las secuencias de ADN unidas de partículas codificadas con ADN genómico de referencia detectablemente marcado.

- 5 Se comparan la primera señal y la segunda señal, dando información sobre el ADN genómico del sujeto individual en comparación con el ADN genómico de referencia.

En realizaciones particulares, una relación de las señales de las marcas detectables del ADN de referencia y el ADN de muestra hibridado con los amplicones de uno o más conjuntos de partículas se usa para evaluar diferencias entre el ADN de muestra y de referencia, indicativo, por ejemplo, de ganancia y/o pérdida genómica. En ciertas realizaciones, el ADN de referencia y el ADN de muestra se hibridan con los amplicones de uno o más conjuntos de partículas en el mismo recipiente, tal como un pocillo de una placa de múltiples pocillos. Después de la hibridación, las dos marcas se analizan juntas, es decir, ambas marcas detectables se detectan en el material hibridado o el material hibridado se divide en dos (o más) porciones y cada porción se evalúa por separado para detectar las marcas detectables. Los resultados de la evaluación pueden usarse para proporcionar la relación de señales de las dos marcas detectables. Este enfoque permite el uso de hibridación competitiva para normalizar cualquier variación entre ensayos: tanto las muestras de referencia como experimentales se ensayan simultáneamente en el mismo recipiente mezcladas con las mismas partículas.

Opcionalmente, el ADN de referencia detectablemente marcado y el ADN de muestra detectablemente marcado se hibridan con uno o más conjuntos de partículas en los diferentes recipientes, tales como diferentes pocillos de una placa de múltiples pocillos. Puede obtenerse una relación de señales de las dos marcas detectables para evaluar diferencias entre el ADN de muestra y el ADN de referencia. Si se utiliza este enfoque, una única muestra de referencia puede compartirse entre varias o muchas muestras experimentales. Para experimentos que implican múltiples muestras por día puede haber un ahorro en el coste de reactivos y trabajo, evitando el marcado de múltiples muestras duplicadas normales. También es innecesario manipular la muestra para obtener diferentes porciones para análisis separados. Cada muestra puede evaluarse solo una vez.

Las partículas codificadas se identifican por su información codificada de manera que se asocia codificación de partículas con la primera señal y con la segunda señal en realizaciones particulares. Así, por ejemplo, la primera y segunda señales están asociadas a partículas codificadas de un primer conjunto de partículas codificadas que contiene ADN humano del cromosoma 13. Se comparan la primera señal y la segunda señal asociada al primer conjunto de partículas codificadas, dando información sobre el cromosoma 13 del ADN del sujeto individual en comparación con el cromosoma 13 del ADN de referencia. Similarmente, la primera y segunda señales están asociadas con un segundo conjunto de partículas codificadas que contiene ADN humano del cromosoma 18. Se comparan la primera señal y la segunda señal asociadas al segundo conjunto de partículas codificadas, dando información sobre el cromosoma 18 del ADN del sujeto individual en comparación con el cromosoma 18 del ADN de referencia.

Las figuras y descripciones en el presente documento ilustran el mejor modo, pero pueden sustituirse muchos materiales y procedimientos alternativos. Un experto en la materia reconocerá materiales y procedimientos alternativos apropiados y será capaz de preparar y usar las composiciones y procedimientos descritos sin excesiva experimentación.

Pueden sustituirse las composiciones de los diversos tampones y otros componentes de ensayo.

Las condiciones de cultivo, purificación, amplificación, desnaturalización, acoplamiento, hibridación, enlace de indicador, lavado y manipulación de perlas pueden todas variarse por el usuario para adecuarse a tipos particulares de células, ADN genómico de molde, muestras, indicadores seleccionados y similares.

El ensayo en los ejemplos en el presente documento se realiza bien con tan solo 30 ng de ADN de muestra. En situaciones en las que la fuente biológica da ADN insuficiente para el ensayo descrito, la muestra puede amplificarse mediante una variedad de procedimientos de amplificación total del genoma (WGA), tales como PCR de COR o PCR de phi-29. Si se utilizan muestras procesadas por WGA, el ADN de referencia puede procesarse por el mismo procedimiento de manera que cualquier sesgo de amplificación específico de secuencia se corregirá en gran parte por la relación de muestra/referencia de las señales.

Se proporcionan kits para ensayar ADN. En realizaciones particulares se proporciona un kit que incluye un conjunto de partículas codificadas y/o una mezcla de dos o más conjuntos de partículas codificadas. El material de enseñanza para el uso del conjunto de partículas codificadas y/o reactivo de múltiplex que incluye dos o más conjuntos de partículas codificadas se incluye opcionalmente en un kit. También se incluye opcionalmente un reactivo secundario tal como tampones, enzimas, disoluciones de lavado, disoluciones de hibridación, marcas detectables, reactivos de detección y similares.

Las realizaciones de las composiciones y procedimientos de ensayo se ilustran en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan para fines ilustrativos y no se consideran limitaciones del alcance de composiciones y

procedimientos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Preparación de un reactivo del conjunto de perlas para ensayo de ADN genómico

- 5 La fig. 1A muestra un diagrama de flujo que ilustra la preparación de amplicones de BAC de un único clon de BAC e inmovilización de los amplicones como sondas sobre un conjunto de perlas codificadas. En este ejemplo, las perlas en el conjunto tienen todas el mismo código ID.

10 El material de partida es material de clon de BAC vivo, 10, una secuencia de ADN humana larga (normalmente 100-200 kilobases) insertada en el genoma de una célula bacteriana de *E. coli*. Se coge un pequeño chip de material de disolución madre de glicerol de BAC y se usa como material de partida para un procedimiento de cultivo de células bacterianas convencional, 11. Las células se cultivan en 35 ml de medio en tubos de 50 ml durante la noche a 37° C con un antibiótico selectivo según un protocolo de cultivo de BAC estándar. Entonces, las células cultivadas se centrifugan al fondo del tubo a 4° C durante 20 minutos y el sobrenadante se saca y se desecha. El sedimento de células se resuspende en un tampón que contiene RNasa, y luego se lisa usando LyseBlue (Qiagen, Valencia CA) y SDS. El lisado, 12, se centrifuga, 13, a aproximadamente 20.000 g durante 30 minutos, y el sobrenadante, que contiene el ADN en disolución, se recoge y el sedimento se desecha. La centrifugación se repite durante 15 minutos sobre el sobrenadante. El sobrenadante claro que contiene el ADN de BAC disuelto se recoge, mientras que los residuos celulares, proteínas y otras impurezas se conducen al fondo del tubo y se desechan. Se extrae el ADN de BAC y se purifica, 17, del sobrenadante usando un kit de purificación en columna Qiagen Genomic-Tip 20/G. Este kit comprende columnas de purificación, 15, y tampones de lavado y de elución, 16. Después de la elución, el ADN de BAC ahora altamente purificado se precipita y precipitación en pellas por isopropanol, 19. El rendimiento es normalmente 20 a 200 ng de ADN de BAC purificado, 18. Este ADN de BAC puede almacenarse como sedimento seco o resuspenderse en agua para su uso inmediatamente en las siguientes etapas.

25 Una cantidad de amplicones de PCR que representan sustancialmente el contenido de la secuencia entera de cada ADN de BAC se produce entonces usando dos rondas de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La primera ronda de PCR, 20, es PCR por cebadores de oligonucleótidos redundantes (COR) no específicos usando una mezcla de cebadores COR, 21, una polimerasa de PCR de COR, 22, y tampón de PCR de COR, 23, con el ADN de BAC anteriormente preparado, 18, usado como molde. La segunda ronda de amplificación por PCR, 25, utilizó un único cebador dirigido a los motivos de secuencia conocidos de los cebadores COR. Se usan dos rondas de PCR para generar 30 rendimientos de aproximadamente 20 µg de producto de amplificación final, 29, para acoplar posteriormente, 32, los amplicones, 29, a las perlas codificadas, 30.

Los amplicones se preparan del siguiente modo.

Se prepara una primera mezcla de PCR de COR de 50 µl para cada ADN de BAC que comprende:

10X tampón de PCR de COR	5,0 µl
dNTP 10 mM (cada uno)	1,0 µl
MgCl 50 mM	5,0 µl
Mezcla de cebadores COR 10 uM (cada uno)	10,0 µl
20 a 50 ng de molde de ADN de BAC	2,0 µl
Taq polimerasa Platinum	0,5 µl
Agua	21,5 µl
Volumen total	50,0 µl

35 El tampón de PCR de COR, 23, incluyó Tris HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM y MgCl 5 mM. Los dNTP (Amersham Biosciences, Piscataway NJ) están a una concentración de 200 µM. La Taq polimerasa Platinum (Applied Biosystems) está a una concentración de 5 unidades/µl. La mezcla de cebadores COR, 21, véase Fiegler y col. 2003, Genes Chromosomes Cancer, 36(4):361-74, incluyó tres conjuntos de oligonucleótidos redundantes de las siguientes secuencias 22-meras (Operon Biotechnologies, Huntsville AL), en las que N representan nucleótidos aleatorizados:

5' CCGACTCGAGNNNNNNCTAGAA 3' SEC ID N.º 1

## ES 2 511 029 T3

5' CCGACTCGAGNNNNNNTAGGAG 3' SEC ID N.º 2

5' CCGACTCGAGNNNNNNTTCTAG 3' SEC ID N.º 3

en las que N indica nucleótidos aleatorios.

- 5 El molde de ADN de BAC, 18, disuelto en agua, se purifica por purificación en columna, 17, usando el kit de purificación en columna Qiagen Genomic-Tip 20/G. La Taq polimerasa Platinum, 22 (Invitrogen, Carlsbad CA) está a una concentración de 5 unidades/µl.

La amplificación de primera ronda, 20, se realiza en un ciclador térmico GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City CA) según el siguiente perfil de temperatura/tiempo:

3,0 min	94° C	
1,5 min	94° C	
2,5 min	30° C	9 Ciclos
0,10C/s	72° C (rampa)	
3,0 min	72° C	
1,0 min	94° C	
1,5 min	62° C	30 Ciclos
2,0 min	72° C	
8,0 min	72° C	
4,0° C		(estado estacionario)

- 10 Los productos de amplicón, 24, de esta primera ronda de PCR de COR, 20, se usan entonces como moldes para una segunda ronda de PCR, 25. El cebador individual, 26, en la segunda ronda es específico para las porciones de secuencia comunes de los cebadores de COR, 21 usados en la primera ronda, 20. Este cebador, 26, se modifica con amina de manera que los amplicones resultantes, 29, también tendrían un grupo amina en un extremo para facilitar el simple acoplamiento a las perlas codificadas en una etapa posterior, 32.

La PCR de segunda ronda se realiza del siguiente modo.

- 15 Se prepara una segunda mezcla de PCR de 100 µl para cada molde de amplicón de BAC que incluye:

10X tampón de PCR	10,0 µl
dNTP 10 mM (cada uno)	2,0 µl
MgCl 50 mM	10,0 µl
Cebador de amina 10 uM	15,0 µl
Molde (de PCR n.º 1)	2,0 µl
Taq Platinum	0,5 µl
Agua	58,5 µl
Volumen total	100,0 µl

El tampón de PCR 2, 28, incluyó Tris HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM y MgCl 5 mM. Los dNTP (Amersham Biosciences, Piscataway NJ) están a una concentración de 200 µM. La Taq polimerasa Platinum (Applied Biosystems) está a una concentración de 5 unidades/µl.

El cebador ligado a amina (operón) tuvo la siguiente secuencia.

- 20 5'-GGAAACAGCCCCGACTCGAG-3' SEC ID N.º 4

Los moldes en la reacción, 25, son los amplicones de COR, 24, de la ronda de PCR de COR previa, 20. La amplificación

## ES 2 511 029 T3

de segunda ronda, 25, se realiza en un ciclador térmico GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) según el siguiente perfil de temperatura/tiempo:

10 min	95° C	
1,0 min	95° C	
1,5 min	60° C	35 Ciclos
7,0 min	72° C	
10 min	72° C	
4,0° C		(estado estacionario)

5 Este segundo producto de PCR, 29, se purifica entonces usando un kit basado en perlas magnéticas, 9, (PCR Clean Beads, Agencourt Bioscience Corp., Beverly MA) según el protocolo del fabricante. Entonces, los amplicones purificados, 29, se resuspenden en 40 µl de agua y se guardan a -20° C hasta que se usan en la etapa de acoplamiento de perlas como se describe a continuación.

10 El procedimiento de acoplamiento de perlas codificadas, 32, para inmovilizar el producto de amplicón, 29, como ADN de sonda sobre la superficie de perlas codificadas se realiza sobre perlas carboxi Luminex, 30 (Luminex, Austin TX) a una escala de 50 µl de la concentración de perlas estándar, dando aproximadamente 650.000 perlas. Las perlas están hechas de poliestireno, aproximadamente 5,6 µm de diámetro, y codificadas con cantidades controladas de dos o tres colorantes fluorescentes para facilitar que su ID de perlas se detecte en un instrumento de lectura del citómetro de flujo especialmente construido. 50 µl de perlas en suspensión, 30, todas de una ID de perlas o región, se transfieren del tubo Luminex en el que se liberan a un tubo Eppendorf de 1,5 ml para el acoplamiento, 32, usándose agitación con vórtex y sonicación para garantizar la suspensión. Entonces, las perlas se centrifugan a 12.000 rpm durante 3 minutos y el sobrenadante del tampón de perlas se elimina sin alterar el sedimento de perlas. Se añaden 25 µl de tampón MES a cada tubo de perlas, seguido de agitación con vórtex y sonicación. Por separado, 10 µg de amplicones de PCR 2, 29, de cada BAC se añaden entonces a un segundo conjunto de tubos de centrifuga de 1,5 ml, y el ADN en cada tubo se seca entonces completamente en un SpeedVac (ThermoFisher Scientific, Waltham MA). Entonces, una suspensión de perlas se transfiere a cada tubo de ADN, se agita con vórtex y se sónica durante 5 segundos cada uno para mezclar, manteniendo el seguimiento cuidadoso de la ID de perlas (región) asociada a cada BAC.

25 A continuación, 1,5 µl de EDC disuelto recientemente, 31, (clorhidrato de 1-etil-3-[dimetilaminopropil]-carbodiimida, Pierce, Rockford IL) a 10 mg/ml se añaden a cada tubo, se agitan con vórtex inmediatamente y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad (para preservar la codificación fluorescente de las perlas Luminex). Se realiza remezcla en el momento de tiempo de 15 minutos. La adición, incubación y remezcla de EDC se repite entonces durante una segunda vez.

30 Entonces se añaden 500 µl de tampón TNT (Tris 0,1 M a pH 7,5, NaCl 0,15 M, 0,02 % de Tween 20) a cada tubo y se agitan con vórtex. Entonces, los tubos se centrifugan en una microcentrifuga durante 4 minutos a 12.000 rpm para conducir las perlas al fondo y el sobrenadante se elimina cuidadosamente. A continuación se añaden 500 µl de 0,1 % de SDS y las perlas se centrifugan de nuevo durante 4 minutos a 12.000 rpm y el sobrenadante se elimina cuidadosamente. Finalmente, 50 µl de 1x tampón TE (Tris 10 mM a pH 7,5, EDTA 1 mM) a cada tubo y se agita con vórtex.

El conjunto de perlas, 33, con sondas de amplicón inmovilizadas, 29, puede incluirse como componente de un conjunto de perlas múltiplex para su uso en los ensayos de ADN genómico.

## Ejemplo 2

## Preparación de un reactivo del conjunto de perlas codificadas para múltiplex para ensayo de ADN

La fig. 2 es un diagrama de flujo que ilustra la mezcla de  $m$  conjuntos de perlas codificadas diferentes, cada uno con su ADN de sonda de amplicón de BAC inmovilizado respectivo, juntos para preparar un conjunto de perlas codificadas multiplexadas.

Los conjuntos de perlas codificadas 34, 35, 36 y 37 son obligadas a estar en suspensión por sonicación, rotación de un recipiente de tubo, agitación con vórtex o un procedimiento similar. Entonces se usa una pipeta para transferir alícuotas de cada conjunto de perlas a otro recipiente en el que los conjuntos de perlas individuales se combinan y se mezclan, seguido de desnaturalización, 38, para facilitar la posterior hibridación con el ADN de sonda inmovilizado sobre las perlas en un ensayo.

En un ejemplo detallado, los contenidos de 50  $\mu$ l de 2 o más conjuntos de perlas, cada uno en un tubo individual, cada conjunto de perlas codificadas con ADN de sonda inmovilizado, 33, se combinan en lotes en un tubo de centrifuga de 1,5 ml. Después de combinar aproximadamente 10 conjuntos de perlas, el tubo se centrifuga y el sobrenadante se elimina cuidadosamente, con el fin de mantener el volumen bajo. Esto se repite hasta que todos los conjuntos de perlas se combinan (hasta 100 ID de perlas codificadas o regiones son soportadas, por ejemplo, por el sistema Luminex 200).

Después de combinarse todos los conjuntos de perlas en un conjunto de perlas para múltiplex, el ADN de sonda inmovilizado se desnaturaliza. Después de centrifugarse las perlas y eliminarse el sobrenadante, se añaden 500  $\mu$ l de NaOH 0,1 N y se deja incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Entonces, las perlas se centrifugan y el sobrenadante se elimina cuidadosamente. Se añaden 500  $\mu$ l de Tris 10 mM, NaCl 15 mM, 0,2% de Tween 20, el tubo se agita con vórtex, luego se centrifugan las perlas y el sobrenadante se elimina. Entonces se repite esta etapa de lavado. Finalmente, el volumen se lleva a 500  $\mu$ l con 1X tampón TE, y el conjunto de perlas para múltiplex, 39, se guarda en la oscuridad a 4° C hasta que se usa para un ensayo.

## Ejemplo 3

## Ensayo de ganancia y pérdida genómica multiplexado

La figura 3A es un diagrama de flujo que ilustra una realización que incluye realizar un ensayo de ganancia y pérdida genómica multiplexado sobre  $n$  muestras usando un conjunto de perlas codificadas multiplexadas.

En este ejemplo, dos muestras de ADN y dos referencias se ensayan en paralelo. En la práctica, varias docenas de muestras pueden ejecutarse simultáneamente en paralelo en un formato de microplaca. Pueden ensayarse más o menos muestras y referencias de este número en paralelo.

En este ejemplo, las cuatro muestras de ADN, 40 y 41, que representan dos referencias y 42 y 43 que representan dos muestras de ensayo, se marcan enzimáticamente con biotina y se purifican. Las muestras de referencia son normalmente muestras reunidas masculinas y femeninas normales, tales como ADN genómico femenino humano y ADN genómico masculino humano (Promega, Madison WI). Cada muestra y referencia de ADN se combinan con nucleótidos marcados con biotina, 45, (PerkinElmer, Boston MA), nucleótidos sin marcar 49, (PerkinElmer), cebadores aleatorios, 47, (Operon, Biotechnologies, Huntsville AL) y una enzima polimerasa de fragmento de Klenow, 46 (Epicentre Biotechnologies, Madison WI). Después de la incubación, 44, el producto de reacción se purifica, 50, usando un kit de purificación en columna de ADN, 49, tal como un kit Purelink DNA Mini (Invitrogen). Se usan aproximadamente 5  $\mu$ l a aproximadamente 200 ng/ $\mu$ l de muestra marcada para la posterior hibridación en el ensayo.

Entonces, cada muestra o referencia marcada con biotina, 51 - 54, se hibrida, 55, con las sondas inmovilizadas sobre las perlas de un conjunto de perlas codificadas multiplexadas, 56. Se usan aproximadamente 500 perlas de cada conjunto de perlas (cada tipo de sonda); en este ejemplo de 55-plex se usa un total de aproximadamente  $55 \times 500 = 27.500$  perlas por hibridación.

Las perlas de cada conjunto de perlas codificadas son distinguibles de perlas de cada uno de los otros conjuntos de perlas codificadas debido a la codificación. Cada uno de los 55 conjuntos de perlas incluye una pluralidad de perlas codificadas que tienen amplicones unidos que representan sustancialmente un fragmento de ADN genómico de molde entero. El molde de ADN para cada conjunto de perlas representa un sitio genómico enumerado en la figura 9.

Un tampón de hibridación que contiene ADN de Cot-1, formamida, sulfato de dextrano y 1,9 x SSC se incluye en la reacción de hibridación. El volumen total es aproximadamente 15  $\mu$ l y las reacciones se llevan a cabo en los pocillos de una microplaca tipo PCR rígida, tal como Bio-Rad HSP 9631 (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA). La placa se sella herméticamente para minimizar la evaporación usando un sellante de lámina de aluminio (MSF 1001, Bio-Rad). La incubación por hibridación, 55, se realiza durante la noche a 50° C en una estufa de incubación con agitación de microplacas a 1150 rpm (estufa de incubación Wallac NCS, PerkinElmer).

Después de la incubación por hibridación, 55, los cuatro conjuntos de perlas para múltiplex hibridados con las cuatro muestras, 58-61, están listos para un lavado de hibridación, 53, seguido de incubación con un indicador fluorescente, 65, y un lavado del indicador, 67. Primero, 100 µl de tampón de lavado a (2X SSC, 50 % de formamida) se añaden a cada pocillo, la placa se vuelve a sellar y se incuba en la estufa de incubación con agitación con 1150 rpm de agitación a 50° C durante 20 minutos. Entonces, el contenido de cada pocillo se transfiere a una placa de filtración HT de 0,46 µm de Millipore (Millipore, Billerica MA). Entonces, el líquido se elimina de cada pocillo por vacío usando un colector de vacío MSVMHTS00 de Millipore. A continuación se añaden 100 µl de tampón de lavado b (2X SSC, 0,1 % de detergente Igepal) a cada pocillo, seguido de otra incubación con agitación a 50° C de 20 minutos y aspiración a vacío. Entonces se añaden 100 µl de tampón de lavado c (0,2X SSC) a cada pocillo y se repite la incubación con agitación a 50° C de 20 minutos, seguido de aspiración a vacío.

Entonces se añaden 100 µl de 1X disolución Phycolink SA, el indicador de estreptavidina-ficoeritrina, 64, a cada pocillo. Esta disolución indicadora se prepara a partir de 2 µl de 500X Phycolink SA PJ 13S (Prozyme, San Leandro CA) mezclada en 1 ml de diluyente indicador, siendo el diluyente 1X PBS, 0,1 % de BSA y 0,05 % de Tween 20. Esta disolución indicadora se incuba con los conjuntos de perlas para múltiplex durante 30 minutos a 25° C y 1050 rpm en la estufa de incubación con agitación. Después de la incubación, la disolución se aspira de los pocillos de la placa de filtración usando el colector de vacío como en las etapas de lavado previas.

Entonces, las perlas se lavan dos veces, 67, con tampón de lavado d, 66, que es 1X SBF con 0,01 % de Tween 20. Se añaden 100 µl a cada pocillo de la placa de filtración, entonces el líquido se aspira a vacío a través de los filtros en los fondos de los pocillos de las placas. Se añaden 100 µl una segunda vez y se incuban en la estufa de incubación con agitación durante 2 minutos a 25° C a 1050 rpm. Este segundo lavado no se aspira, pero se usa para suspender las perlas para la lectura.

Entonces, los cuatro conjuntos de perlas en el ejemplo, 68 - 71, están listos para ser leídos, 72, en un sistema Luminex 200 (Luminex Corporation, Austin TX). Las señales e ID de perlas de las perlas en cada pocillo se leen en secuencia, y se registra la mediana de la intensidad de fluorescencia de las 50 primeras perlas de cada ID de perlas (región de perla) para cada pocillo o muestra, y salida en un archivo de datos, 73. No hay pruebas de conexión de perlas; el lector Luminex se fija para analizar 50 perlas de cada región y no se registran fallos.

La figura 4 es un diagrama esquemático de una microplaca estándar de SBS de 96 pocillos, 80, que muestra localizaciones de ejemplo de referencias duplicadas y muestras duplicadas para realizar el ensayo en 46 muestras en paralelo. Las hibridaciones duplicadas de cada muestra marcada pueden usarse para asegurar la generación de datos en caso de un fallo de buen sellado que produzca la evaporación de los reactivos de un único pocillo. Si el duplicado no está afectado, todavía se generan datos de esa muestra. Usando esta microplaca y enfoque de perlas codificadas, un único técnico de laboratorio puede ensayar, por ejemplo, 46 muestras y 2 referencias de una vez, todas por duplicado, marcando en un primer día; hibridando durante la noche, y lavando y leyendo el segundo día. El ensayo puede realizarse alternativamente sin duplicados o con más de dos duplicados. Se muestran duplicados de dos referencias, 81 y 82, y duplicados de muestras, y un ejemplo del cual se indica en 83.

La figura 5 es un ejemplo de datos generados usando una muestra de ADN de Coriell que tiene una trisomía en el cromosoma 13, sexo masculino. Los números 1 a 55 mostrados en la parte inferior de la figura 5 se enumeran en la figura 9.

Estos datos se calculan a partir de la mediana de los valores de fluorescencia para cada región de perlas producida por el lector Luminex. Los valores promedio de las perlas de control negativo 29, 54 y 56 se restan de todas las otras señales (véase la fig. 9). Entonces, las señales de los nueve clones autosómicos se prorratan con las señales de clones correspondientes de los ADN de referencia masculino y femenino. Se calcula un factor de normalización de forma que cuando el factor se aplique a todas las señales de clones autosómicos conduzca la relación autosómica a un valor de uno. Este factor de normalización se aplica entonces a todas las señales para la muestra.

Las relaciones resultantes se representan y se muestran en la figura 5. Obsérvese que las relaciones para los clones del cromosoma 13 están todas en el intervalo de 1,3 a 1,6, mientras que los clones para los cromosomas 18 y 21, además de los otros clones autosómicos, están, excepto uno, todos por debajo de 1,2. La trisomía en el cromosoma 13 es fácilmente evidente. Por tanto, la representación de la relación de la muestra en comparación con la referencia masculina (puntos de datos en cuadrado) es eficazmente plana a través del cromosoma sexual X e Y. Esto es la respuesta esperada de una muestra masculina. La representación de la muestra en comparación con la referencia femenina (puntos de datos en diamante) se desplaza hacia abajo para X y hacia arriba para Y, también como se espera para una muestra masculina.

La figura 6 es un ejemplo de datos generados usando una muestra de ADN de Coriell que tiene una trisomía en el cromosoma 18, sexo masculino. Los datos se generan y se representan como se describe para la figura 5.

La figura 7 es un ejemplo de datos generados usando una muestra de ADN de Coriell que tiene una trisomía en el cromosoma 21, sexo femenino. Los datos se generan y se representan como se describe para la figura 5.



La figura 8 es un ejemplo de datos generados usando una muestra de ADN de Coriell que tiene una amplificación de 5 copias del cromosoma X. Los datos se generan y se representan como se describe para la figura 5.

La figura 9 es una tabla que muestra los clones de BAC que tienen insertos de ADN genómico humano usados para generar amplicones en los ensayos de ejemplo, su cromosoma y localizaciones de citobanda, la secuencia de los oligonucleótidos de control negativo y la ID de perlas (región de perlas Luminex) para el conjunto de perlas al que se inmoviliza cada sonda de amplicón. Los puntos representados secuencialmente numerados sobre el eje x en las figuras 5-8 están asociados con BAC enumerados de arriba abajo en la figura 9. Los puntos representados secuencialmente numerados en el eje x en las figuras 5-8 están asociados con BAC enumerados de arriba abajo en la figura 9. BAC RP11-186J16 se inmoviliza a dos regiones de perlas diferentes (42 y 86).

10 Para un control negativo se selecciona un oligonucleótido que no tiene homología de secuencias con el genoma humano. Oligonucleótidos de control negativo específicos usados son

5' GTCACATGCGATGGATCGAGCTC 3' SEC ID N.º 5

5'CTTTATCATCGTTCACCTTAA 3' SEC ID N.º 6

5'GCACGGACGAGGCCGGTATGTT 3' SEC ID N.º 7

15 Las señales generadas por las tres regiones de perlas 29, 54 y 56 que tienen unidas oligonucleótidos de control negativo se promedian y se restan de todas las otras señales de perlas antes de calcular las relaciones.

20 Se hace referencia a las solicitudes de patente de EE. UU. n.º de serie 11/615.739, presentada el 22 de diciembre de 2006, y 12/055.919, presentada el 26 de marzo de 2008; y las solicitudes provisionales de EE. UU. n.º de serie 60/992.489, presentada el 5 de diciembre de 2007, 60/753.584, presentada el 23 de diciembre de 2005, 60/753.822, presentada el 23 de diciembre de 2005, 60/765.311, presentada el 2 de febrero de 2006, y 60/765.355, presentada el 3 de febrero de 2006. La invención se define por las reivindicaciones.

**Listado de secuencias**

<110> PerkinElmer LAS, Inc.

<120> ENSAYOS DE GANANCIA Y PÉRDIDA GENÓMICA MULTIPLEXADA

5

<130> NEN-23602/16

<140> 12/055.919

<141> 26-03-2008

10

<150> 60/992.489

<151> 05-12-2007

<160> 7

15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 22

20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido redundante

25

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11) .. (16)

<223> n es a, c, g, o t

30

<400> 1

ccgactcgag nnnnnctag aa            22

<210> 2

35

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> oligonucleótido redundante

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11) .. (16)

10 <223> n es a, c, g, o t

<400> 2

ccgactcgag nnnnntagg ag 22

15 <210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> oligonucleótido redundante

<220>

<221> misc\_feature

25 <222> (11) .. (16)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 3

ccgactcgag nnnnnttct ag 22

30

<210> 4

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

# ES 2 511 029 T3

<220>  
<223> cebador

<400> 4  
5 ggaaacagcc cgactcgag 19

<210> 5  
<211> 23  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> oligonucleótido de control

15 <400> 5  
gtcacatgcg atggatcgag ctc 23

<210> 6  
<211> 24  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> oligonucleótido de control

25 <400> 6  
ctttatcatc gttccacct taat 24

<210> 7  
30 <211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
35 <223> oligonucleótido de control

<400> 7

gcacggacga gcccggtatg tt 22

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de preparación de un conjunto de partículas codificadas para ensayar ADN, que comprende:
  - a) realizar una primera reacción de amplificación usando un molde de ADN y cebadores de oligonucleótidos de la primera reacción, comprendiendo cada uno de la pluralidad de los cebadores de la primera reacción una secuencia de ADN degenerada no específica variable y una secuencia de ADN constante contigua, para dar un primer producto de reacción que comprende primeros amplicones, en el que cada primer amplicón individual comprende una secuencia de ADN idéntica a una porción aleatoria del molde de ADN y una secuencia de ADN idéntica a la secuencia de ADN constante de los cebadores de la primera reacción;
  - b) realizar una segunda reacción de amplificación usando al menos una porción de los primeros amplicones como molde de ADN y cebadores de oligonucleótidos de la segunda reacción, comprendiendo los cebadores de oligonucleótidos de la segunda reacción la secuencia de ADN constante de los cebadores de la primera reacción, para dar un segundo producto de reacción que comprende segundos amplicones, en el que cada segundo amplicón individual comprende una secuencia de ADN idéntica a una porción aleatoria del molde de ADN y una secuencia de ADN idéntica a la secuencia de ADN constante de los cebadores de la primera reacción;
  - c) unir los segundos amplicones a una primera pluralidad de partículas codificadas, dando un conjunto de partículas codificadas para ensayar ADN.
2. El procedimiento de preparación de un reactivo para ensayar ADN de la reivindicación 1, en el que los cebadores de oligonucleótidos de la segunda reacción comprenden además un grupo funcional para la reacción con una partícula codificada.
3. El procedimiento de preparación de un reactivo para ensayar ADN de la reivindicación 1, que comprende además repetir a) - c) usando un segundo molde de ADN y unir los segundos amplicones así obtenidos a una segunda pluralidad de partículas codificadas detectablemente diferentes de la primera pluralidad de partículas codificadas, dando un segundo conjunto de partículas codificadas para ensayar ADN.
4. El procedimiento de preparación de un reactivo para ensayar ADN de la reivindicación 3, que comprende además mezclar el primer conjunto de partículas codificadas y el segundo conjunto de partículas codificadas.
5. El procedimiento de preparación de un reactivo para ensayar ADN de la reivindicación 3, que comprende además repetir a) - c) usando un tercer o posterior molde de ADN y unir los terceros o posteriores amplicones así producidos a una tercera o posterior pluralidad de partículas codificadas, cada una de la tercera o posterior pluralidad de partículas codificadas detectablemente diferente de cada otra pluralidad de partículas codificadas, dando un tercer o posterior conjunto de partículas codificadas para ensayar ADN.
6. El procedimiento de preparación de un reactivo para ensayar ADN de la reivindicación 5, que comprende además mezclar el primer conjunto de partículas codificadas, el segundo conjunto de partículas codificadas, el tercer conjunto de partículas codificadas y/o posterior conjunto de partículas codificadas.
7. Un procedimiento de ensayo de una muestra de ADN, que comprende:
  - proporcionar un primer conjunto de partículas codificadas preparado según el procedimiento de la reivindicación 1 que comprende partículas codificadas que tienen amplicones unidos, comprendido cada amplicón un segmento de ADN derivado de cebador y secuencias de ácidos nucleicos aleatorias representando juntas sustancialmente una primera secuencia de ADN de molde entero;
  - hibridar los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra detectablemente marcado;
  - hibridar los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de referencia detectablemente marcado;
  - detectar una primera señal que indica hibridación específica de los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra detectablemente marcado y una segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de referencia detectablemente marcado; y
  - comparar la primera señal y la segunda señal para detectar diferencias entre la primera y segunda señales, las diferencias de la primera y segunda señales indicativas de diferencias entre el ADN de muestra y el ADN de referencia, ensayando así la muestra de ADN.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, que comprende además:
  - proporcionar un segundo conjunto de partículas codificadas preparadas según el procedimiento de la reivindicación 1 que comprende partículas codificadas que tienen amplicones unidos, comprendido cada amplicón un segmento de ADN

derivado de cebador y secuencias de ácidos nucleicos aleatorias representando juntas sustancialmente una segunda secuencia de ADN de molde entero;

hibridar los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra detectablemente marcado;

hibridar los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de referencia detectablemente marcado;

- 5 detectar una primera señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra detectablemente marcado y una segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de referencia detectablemente marcado; y

10 comparar la primera señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas y la segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas para detectar diferencias entre la primera y segunda señales, las diferencias de la primera y segunda señales indicativas de diferencias entre el ADN de muestra y el ADN de referencia.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el primer y segundo conjuntos de partículas codificadas se proporcionan en una mezcla y que comprende además:

- 15 asociar la codificación del primer conjunto de partículas codificadas con la primera señal que indica hibridación específica de los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra detectablemente marcado y una segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas; y

20 asociar la codificación del segundo conjunto de partículas codificadas con la primera señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra detectablemente marcado y la segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas.

10. Un procedimiento de ensayo de ADN de muestra, que comprende:

25 proporcionar un reactivo de múltiplex que comprende una mezcla de dos o más conjuntos de partículas codificadas preparados según el procedimiento de la reivindicación 1 codificados de forma que cada partícula de cada conjunto de partículas codificadas sea detectablemente distinguible de cada partícula de cada otro conjunto de partículas codificadas, teniendo las partículas codificadas amplicones unidos amplificados de una secuencia de ADN de molde, comprendiendo cada amplicón una secuencia de ADN derivada de cebador y una secuencia de ácidos nucleicos aleatoria que es idéntica a un segmento de la secuencia de ADN de molde, teniendo cada conjunto de partículas codificadas amplicones unidos amplificados de una secuencia de ADN de molde diferente en comparación con cada otro conjunto de partículas codificadas,

30 hibridar los amplicones unidos con ADN detectablemente marcado;

hibridar los amplicones unidos con ADN de referencia detectablemente marcado;

detectar una primera señal que indica hibridación específica de los amplicones con ADN detectablemente marcado;

detectar una segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones con ADN de referencia detectablemente marcado;

- 35 identificar las partículas codificadas de manera que se asocie la codificación de partículas con la primera señal;

identificar las partículas codificadas de manera que se asocie la codificación de partículas con la segunda señal; y

comparar la primera señal y la segunda señal para cada conjunto de partículas codificadas, en el que diferencias en la primera y segunda señales son indicativas de diferencias entre el ADN de muestra y de referencia, ensayando así el ADN.

40 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que los amplicones unidos a cada conjunto de partículas codificadas comprenden cada uno un segmento de ADN derivado de cebador y secuencias de ácidos nucleicos aleatorias que juntos representan sustancialmente una secuencia de ADN de molde entero, en el que la secuencia de ADN de molde entero es mayor que cada amplicón unido individual.

12. El procedimiento de la reivindicación 7 o 10, en el que el ADN de muestra detectablemente marcado es ADN detectablemente marcado obtenido de un sujeto individual.

45 13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el ADN de muestra detectablemente marcado es ADN genómico detectablemente marcado obtenido de un sujeto individual.

14. El procedimiento de la reivindicación 7 o 10, en el que el ADN de muestra detectablemente marcado es ADN humano.

15. Un reactivo para ensayar ADN, que comprende:

5 una pluralidad de partículas codificadas preparadas según el procedimiento de la reivindicación 1 que tienen amplicones unidos amplificados de una secuencia de ADN de molde, cada amplicón unido individual comprende un segmento de ADN derivado de cebador y una secuencia de ADN idéntica a una porción aleatoria de la secuencia de ADN de molde, en el que los amplicones juntos representan sustancialmente el molde de ADN entero y en el que la secuencia de ácidos nucleicos idéntica a una porción aleatoria de la secuencia de ADN de molde de cada amplicón individual es más corta que el molde de ADN entero.

16. Un reactivo de múltiplex para ensayar ADN, que comprende:

10 una mezcla de dos o más pluralidades de partículas preparadas según el procedimiento de la reivindicación 1, las partículas codificadas de forma que partículas de cada pluralidad de partículas sean detectablemente distinguibles de partículas de cada otra pluralidad de partículas, teniendo las partículas codificadas amplicones unidos amplificados de una secuencia de ADN de molde, teniendo cada pluralidad de partículas codificadas amplicones unidos amplificados de una secuencia de ADN de molde diferente en comparación con cada otra pluralidad de partículas codificadas,  
15 comprendiendo cada amplicón unido individual un segmento de ADN derivado de cebador y una secuencia de ADN idéntica a una porción aleatoria de la secuencia de ADN de molde.

17. Un kit para ensayar ADN, que comprende:

20 una mezcla de dos o más pluralidades de partículas preparadas según el procedimiento de la reivindicación 1, las partículas codificadas de forma que partículas de cada pluralidad de partículas sean detectablemente distinguibles de partículas de cada otra pluralidad de partículas, teniendo las partículas codificadas amplicones unidos amplificados de una secuencia de ADN de molde, teniendo cada pluralidad de partículas codificadas amplicones unidos amplificados de una secuencia de ADN de molde diferente en comparación con cada otra pluralidad de partículas codificadas, comprendiendo cada amplicón unido individual un segmento de ADN derivado de cebador y una secuencia de ADN idéntica a una porción aleatoria de la secuencia de ADN de molde.

25



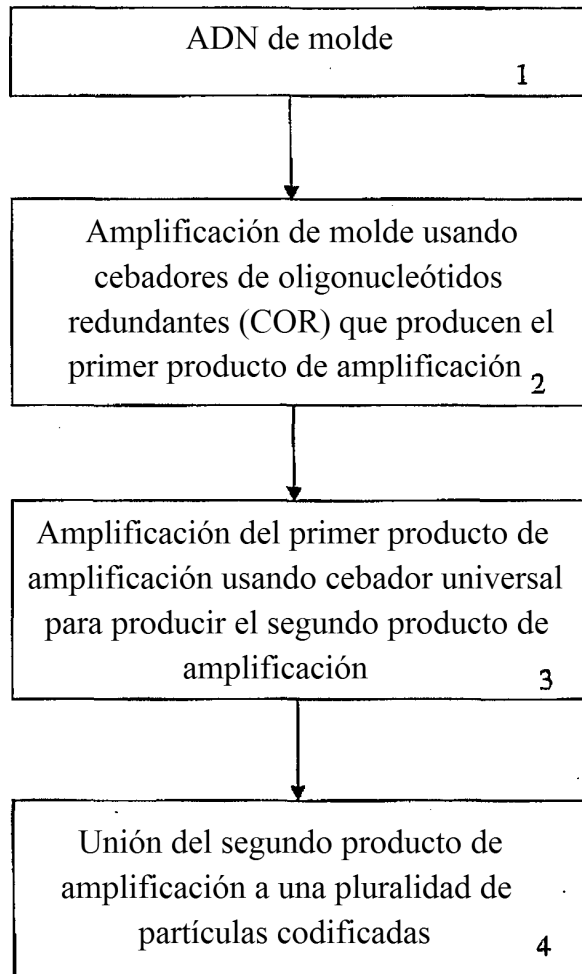


Figura 1

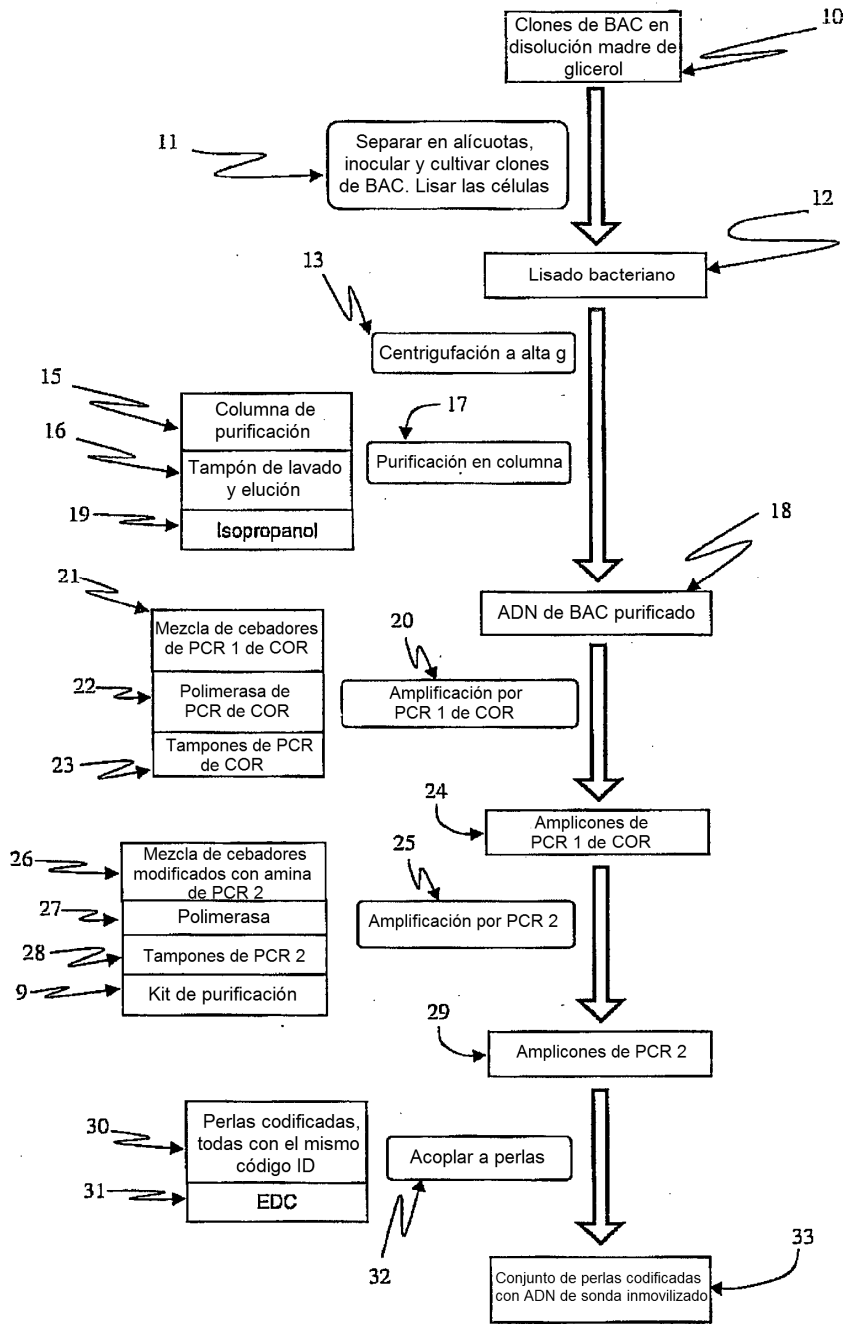


Figura 1A

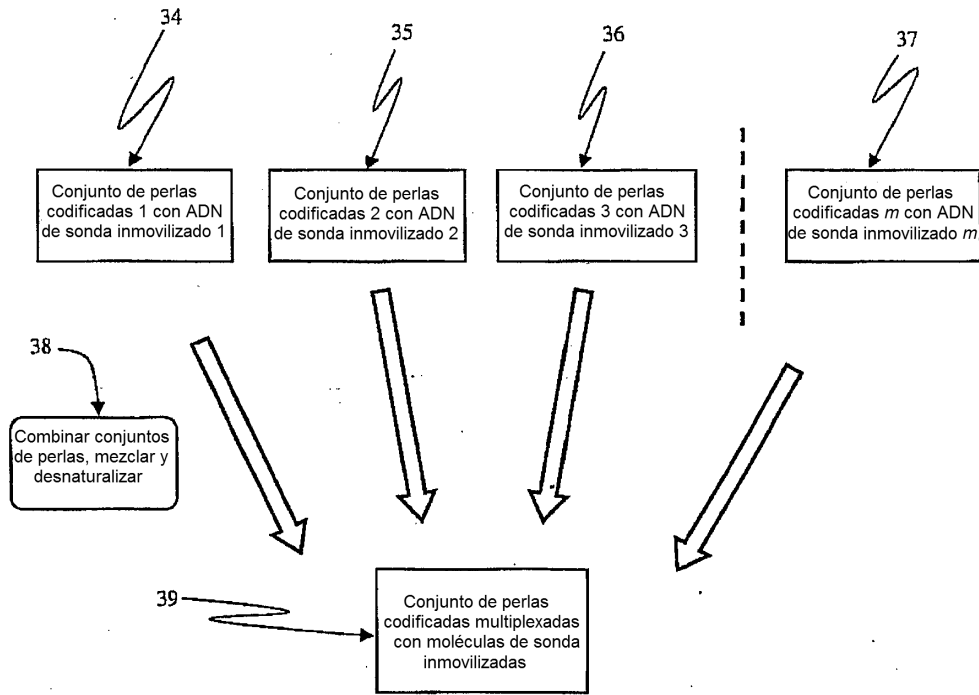


Figura 2

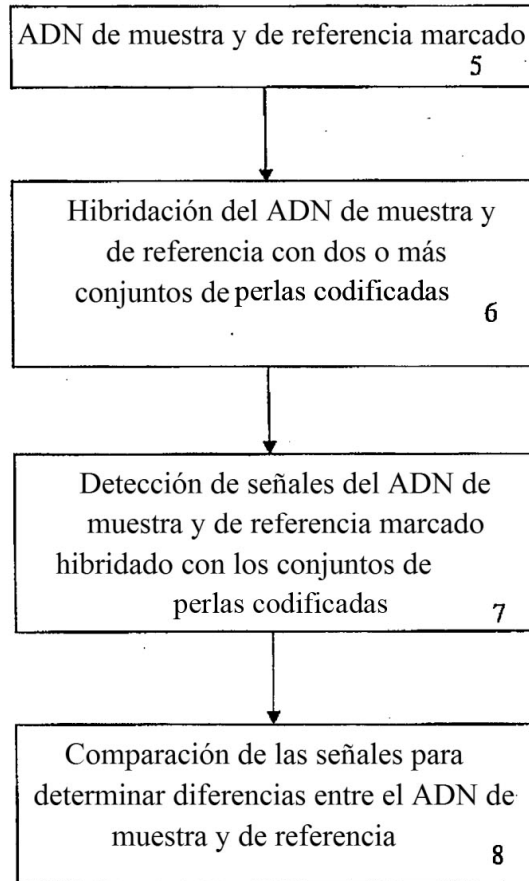


Figura 3

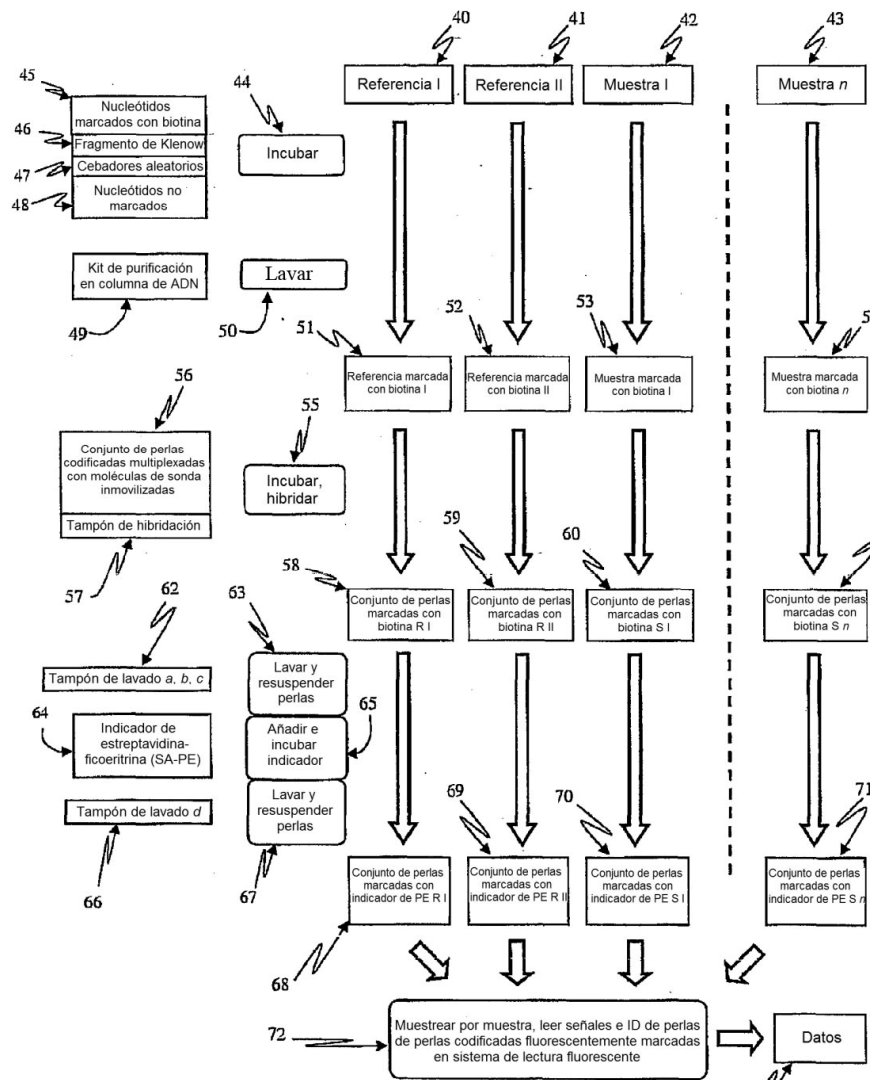


Figura 3A

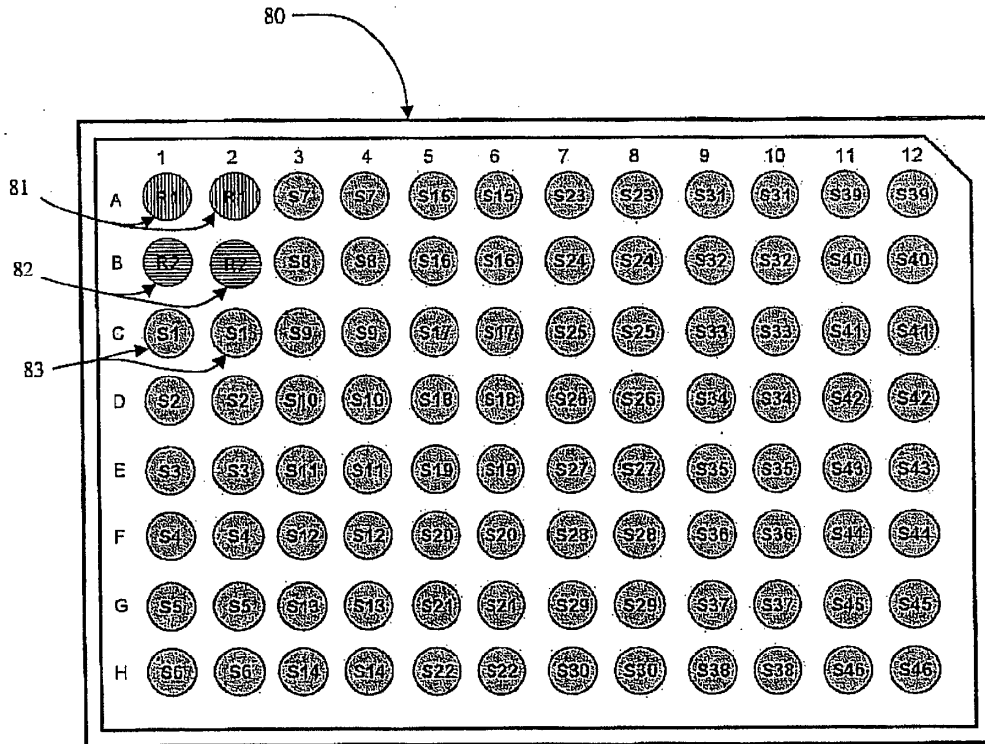


Figura 4

FIG - 5

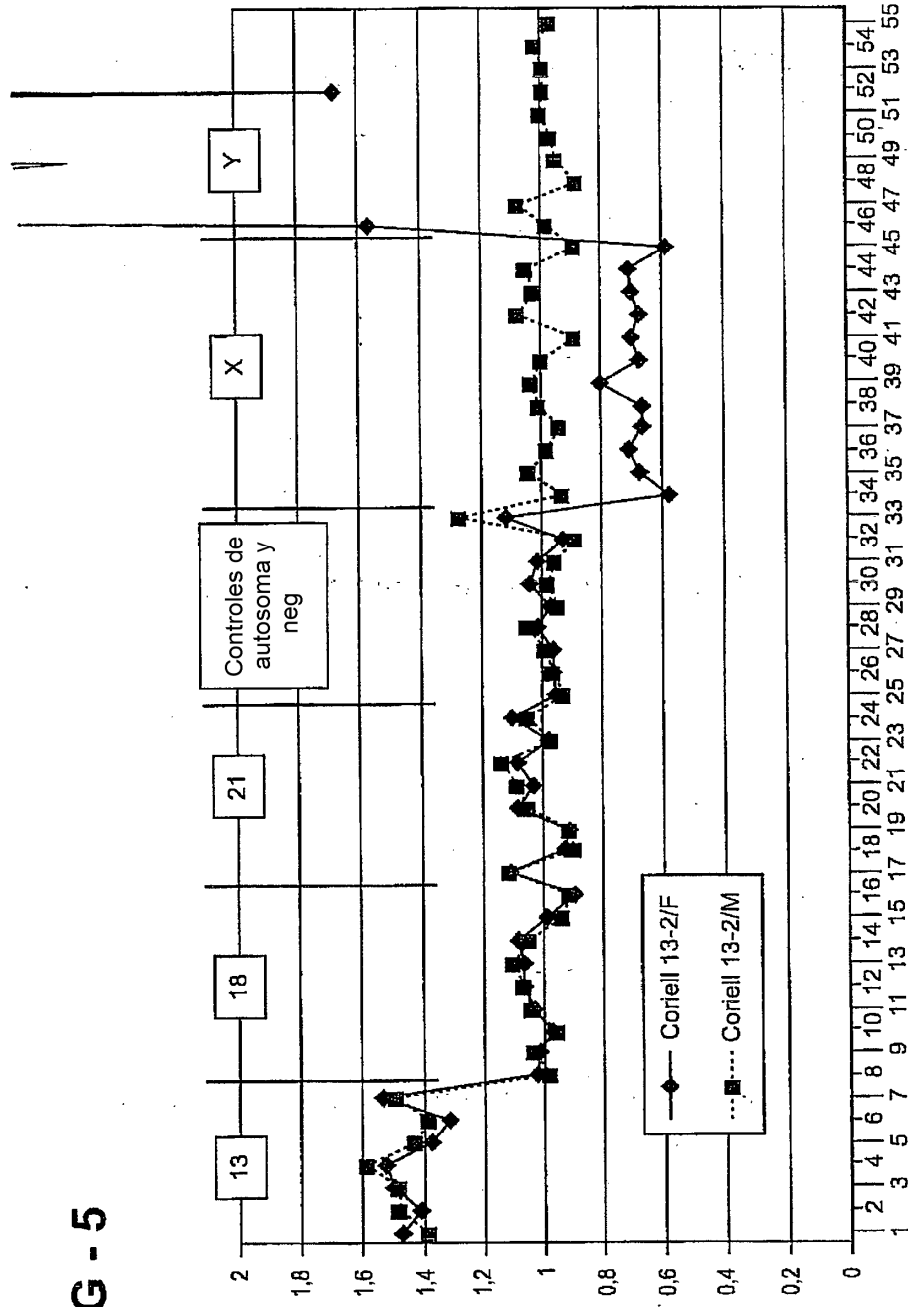
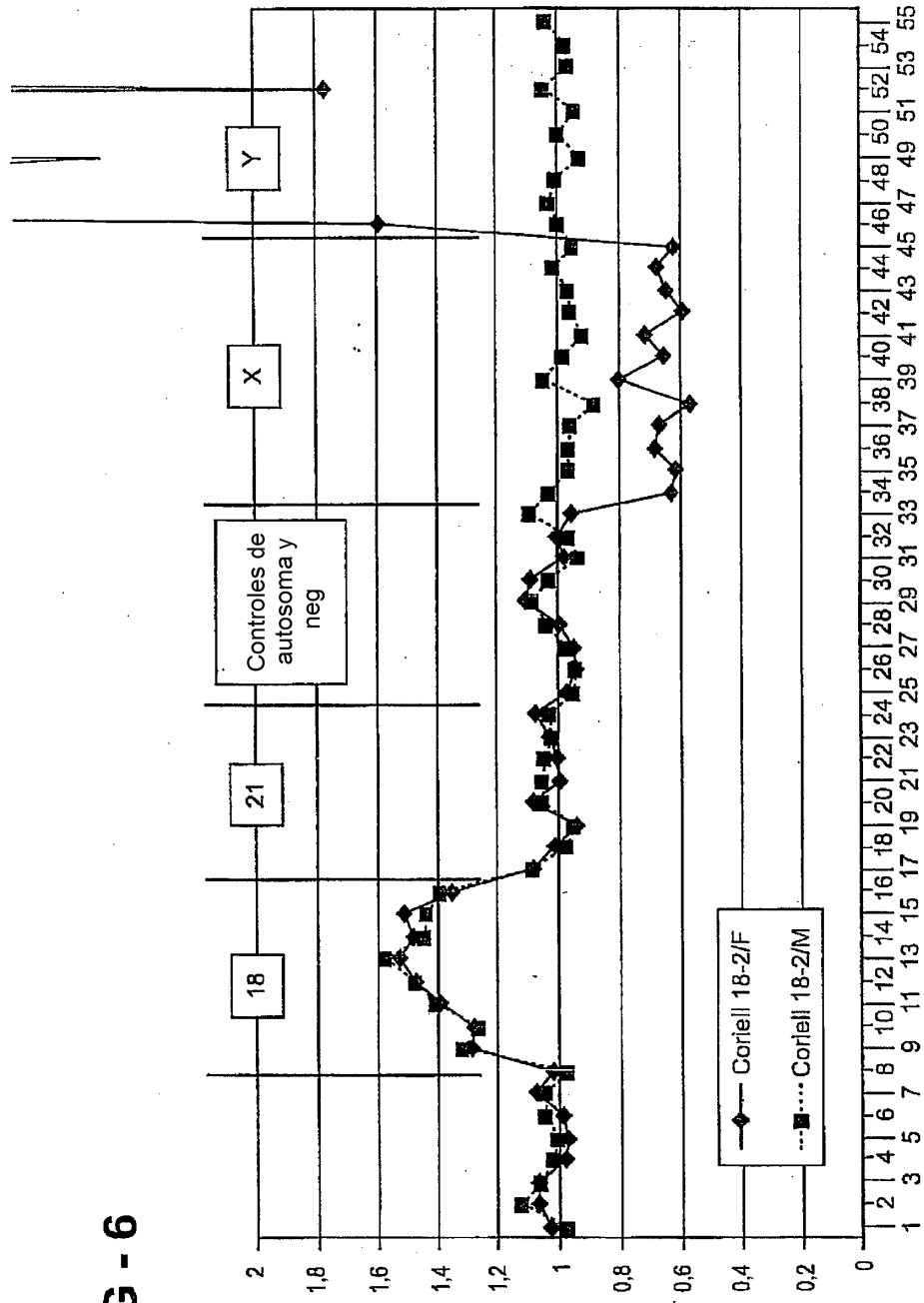


FIG - 6





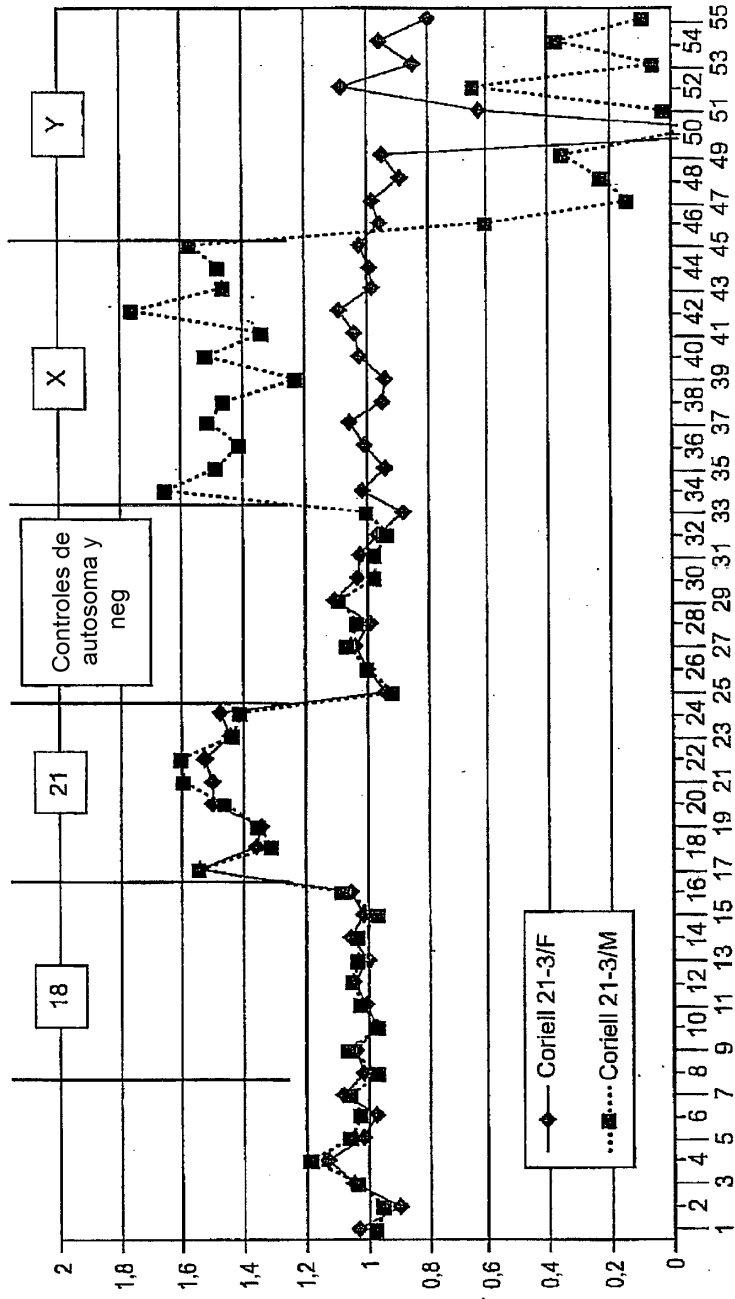


FIG - 7

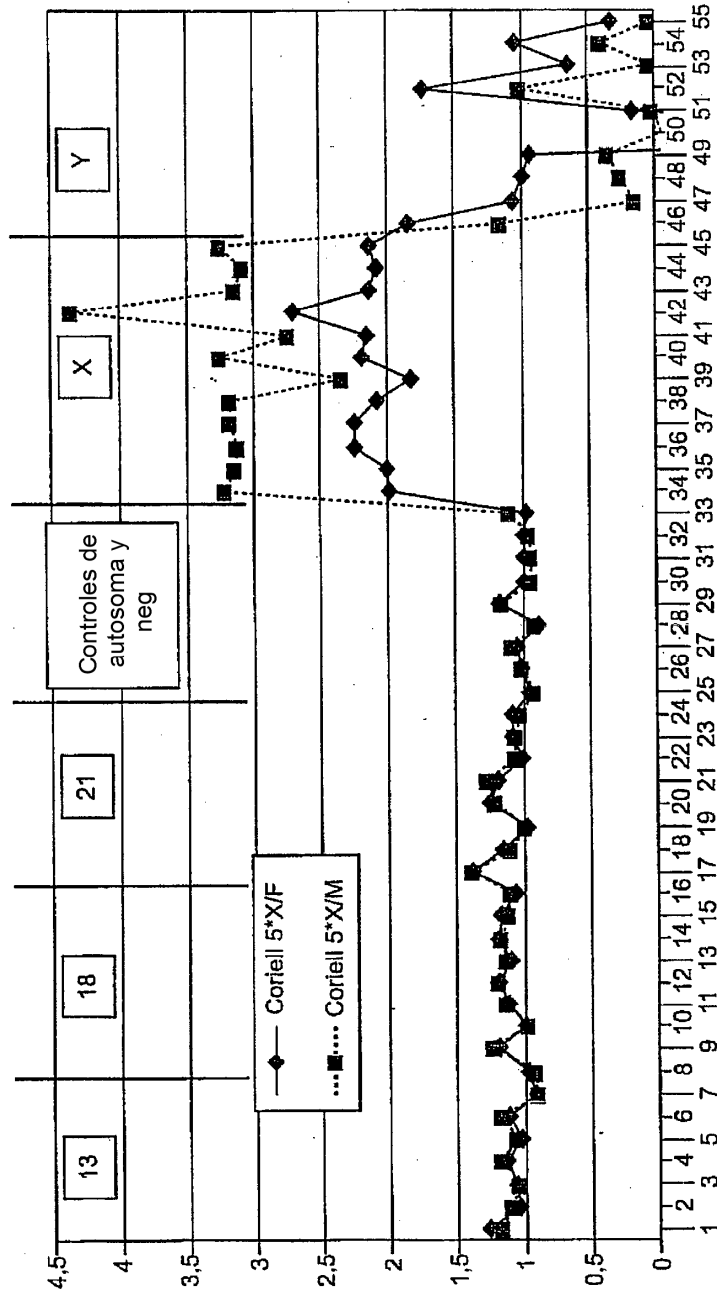


FIG - 8

BAC*	Cromosoma	Localización de citobandas de BAC	ID de perlas
RP11-186J15	13	13q12.3	42
RP11-186J18		13q12.3	86
RP11-117I13		13q12.3	87
RP11-480G1		13q13.1	85
RP11-189B4		13q14.11	83
RP11-174I10		13q14.2	37
RP11-142D16		13q14.3	84
RP11-136D23		13q21.1	34
RP11-411B10		18p11.21	88
RP11-55N14		18p11.31	57
RP11-78H1	18p11.32	90	
RP11-63N12	18	18q12.1	45
RP11-63N12		18q12.1	89
RP11-160B24		18q21.2	36
RP11-88B2		18q22	51
RP11-89N1		18q23	48
RP11-108H5	21	21q21.3	35
RP11-147H1		21q21.3	67
RP11-17020		21q21.3	69
RP11-17020		21q22.1	47
RP11-79A12		21q22.12	38
RP11-190A24		21q22.12	68
RP11-88N2		21q22.3	58
GS-63-1124		21q22.3	78
RP11-46A10	Controles autosómicos y negativos	10q26.3	12
RP11-36P20		11p13	13
RP11-122N11		12p13.33	14
RP11-462G8		16p13.3	6
RP11-698N11		17p11.2	7
RP11-598F7		1q25.2	32
RP11-568F1		22q11.21	8
RP11-416I2		7q11.22	41
RP11-319F4		8p23.1	11
GTCACATGCGATGGATCGAGCTC CTTTATCATCGTTCCACCTTAAT GCACGGACGAGGCCGGTATGTT		Oligo de control negativo	29
		Oligo de control negativo	54
		Oligo de control negativo	56
RP11-38023	X	Xp11.23	72
RP11-495K15		Xp21.1-Xp21.1	73
RP11-79B3		Xp22.11	74
RP11-483M24		Xp22.31	75
RP11-589J20		Xp22.31	76
RP11-465E19		Xp11.1-Xp11.23	44
RP11-262J24		Xp11.21	43
RP11-258I23		Xp11.3-Xp11.4	63
RP1-185L21		Xp22.22	66
RP11-963J21		Xq27.3	65
RP11-90N17		Xq11-Xq11	52
RP3-368A4		Xq12-Xq12	53
RP11-400C10		Y	Yp11.31
RP11-336F2	Yq11.223		77
RP11-26D12	Yq11.23		17
RP11-392F24	Yq11.222		18
RP11-79J10	Yq11.23		19
RP11-375P13	Yp11.2		64
RP11-112L19	Yp11.31		33
RP11-20H21	Yq11.22		61
RP11-71M14	Yq11.221		46
RP11-214M24	Yq11.23		62

\* u oligo de control negativo

Figura 9