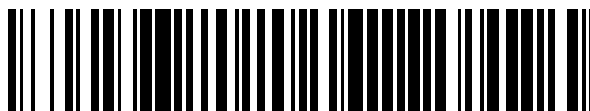


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 518 317**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2004** **E 04725230 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014** **EP 1616178**

54 Título: **Hibridación genómica comparativa**

30 Prioridad:

02.04.2003 AU 2003901671

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

05.11.2014

73 Titular/es:

**ADELAIDE RESEARCH & INNOVATION PTY LTD.
(100.0%)**

**Level 14, 115 Grenfell Street
Adelaide, SA 5000, AU**

72 Inventor/es:

**HUSSEY, NICOLE DOMINIQUE y
HU, DONG GUI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 518 317 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

Hibridación genómica comparativa

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos de hibridación genómica comparativa. También se describen ácidos nucleicos unidos con un sustrato sólido adecuado para hibridación genómica comparativa.

10 Antecedentes de la invención

Las anomalías cromosómicas se asocian con frecuencia con trastornos genéticos, enfermedades degenerativas y cáncer. Las anomalías cromosómicas pueden ser de varios tipos, incluyendo cromosomas individuales extras o ausentes, partes extras o ausentes de un cromosoma, roturas y reordenamientos cromosómicos. Los reordenamientos cromosómicos incluyen translocaciones (transferencia de un trozo de un cromosoma a otro cromosoma), dicéntricos (cromosomas con dos centrómeros), inversiones (reversión de la polaridad de un segmento cromosómico), inserciones, amplificaciones y deleciones.

La detección de anomalías cromosómicas en células es importante por muchas razones, sin ser la menor la detección de anomalías cromosómicas para el diagnóstico genético prenatal y preimplantación, y la determinación del cariotipo de algunos cánceres.

El diagnóstico prenatal implica el ensayo genético de material fetal. Típicamente, esto implica la retirada de líquido amniótico que rodea al feto y el análisis de células en el líquido con respecto a anomalías cromosómicas. El diagnóstico prenatal es importante para la detección de fetos que tienen errores cromosómicos significativos. Se producen anomalías cromosómicas detectables con una frecuencia de aproximadamente uno de cada 250 nacimientos humanos, y las anomalías que implican deleciones o adiciones de material cromosómico con frecuencia conducen a muerte fetal o a graves defectos mentales y físicos. Por ejemplo, el Síndrome de Down puede estar provocado por tener tres copias del cromosoma 21 en lugar de las dos copias normales, o por una duplicación segmental de una subregión en el cromosoma 21.

El diagnóstico genético preimplantación (PGD) implica el ensayo de material genético de un embrión o un óvulo (oocito) antes de la implantación. Típicamente, este proceso implica la retirada y análisis de una o más células de un embrión fertilizado *in vitro*, para determinar si el embrión es adecuado para implantación. En el caso de anomalías cromosómicas derivadas por línea materna, el cuerpo polar de un oocito también puede retirarse y detectarse la presencia de una anomalía cromosómica.

El diagnóstico genético preimplantación con respecto a anomalías cromosómicas es importante para detectar embriones y oocitos que son adecuados para su implantación. Los embriones humanos tempranos tienen una frecuencia muy alta de errores cromosómicos incluyendo aneuploidía, poliploidía y mosaicismo, y es probable que estos errores cromosómicos sean responsables de la tasa significativa de fracaso de implantación de embriones fertilizados *in vitro*. Además, cuando existe la posibilidad de que un embrión u oocito pueda contener una anomalía cromosómica conocida heredada de uno de los padres, también puede realizarse diagnóstico preimplantación para seleccionar embriones u oocitos que no tengan la anomalía cromosómica conocida.

La deleción o multiplicación de copias de cromosomas completos o segmentos cromosómicos también se produce con frecuencia en células cancerosas y en muchos casos estas anomalías cromosómicas contribuyen a que las células adquieran un fenotipo canceroso. La detección de dichas anomalías cromosómicas no es solamente importante para entender la base genética de cómo algunas células progresan desde un estado no canceroso a un estado canceroso, sino que en algunos casos pueden proporcionar información útil con respecto al diagnóstico y tratamiento de un cáncer específico.

Tradicionalmente, se han usado técnicas citogenéticas o de hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) para detectar anomalías cromosómicas. Sin embargo, la hibridación genómica comparativa (CGH) proporciona ahora un método potente para superar muchas de las limitaciones de los enfoques citogenéticos y de FISH tradicionales. La CGH implica la hibridación comparativa, multicolor de una población de ácidos nucleicos de referencia marcada en un color fluorescente y una población de ácidos nucleicos de muestra marcada en un segundo color fluorescente para todo o parte de un genoma de referencia, tal como una extensión cromosómica de metafase humana. La comparación de la intensidad de fluorescencia resultante en localizaciones en el genoma de referencia permite la determinación del número de copias de secuencias cromosómicas en la población de muestras.

Aunque la CGH ha proporcionado una mejora sobre las tecnologías citogenéticas y FISH tradicionales, aún hay muchas deficiencias asociadas con la CGH, incluyendo el periodo de tiempo requerido para realizar el análisis. Por ejemplo, la CGH convencional con extensiones de metafase tarda al menos 72 horas en completarse, y si se realiza PGD en una única célula tomada de un embrión, entonces debe realizarse crioconservación del embrión antes de la implantación para permitir el tiempo suficiente para completar el procedimiento.

La presente invención se refiere a la identificación de un método mejorado para realizar hibridación genómica comparativa. También se describen en el presente documento matrices de ácidos nucleicos adecuadas para hibridación genómica comparativa.

5 A lo largo de la presente memoria descriptiva se puede hacer referencia a documentos con el fin de describir diversos aspectos de la invención. Sin embargo, no se realiza ninguna admisión de que ninguna referencia citada en la presente memoria descriptiva constituya técnica anterior. En particular, se entenderá que la referencia a cualquier documento en el presente documento no constituye una admisión de que ninguno de estos documentos forma parte del conocimiento general habitual en la técnica en Australia o en ningún otro país. El análisis de las referencias indica lo que afirman sus autores, y el solicitante se reserva el derecho a poner en duda la precisión y pertinencia de cualquiera de los documentos citados en el presente documento.

15 Fiegler *et al* (Genes Chromosomes Cancer. Abr. 2003; 36(4): 361-74) describe el uso de DOP-PCR en la amplificación de clones de inserto grandes durante la construcción de matrices de CGH. Sin embargo, D2 no aborda el agotamiento de secuencias repetitivas y/o secuencias que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación en la construcción de dichas matrices.

Sumario de la invención

20 La presente invención proporciona un método para comparar al menos un cromosoma o parte del mismo de una célula con un primer cariotipo con el cromosoma correspondiente o parte del mismo de una célula con un segundo cariotipo, incluyendo el método las etapas de:

- (a) amplificar aleatoriamente ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- 25 (b) agotar las secuencias repetitivas y/o agotar secuencias del ADN amplificado que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación aleatoria, produciéndose el agotamiento antes y/o después de la amplificación;
- (c) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
- (d) amplificar el ADN de una o más células con un primer cariotipo y amplificar el ADN de una o más células con un segundo cariotipo;
- 30 (e) marcar el ADN amplificado de la o las células con un primer cariotipo con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de la o las células con un segundo cariotipo con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
- (f) hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un primer cariotipo con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un segundo cariotipo con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- 35 (g) comparar la cantidad relativa de primer y segundo marcadores hibridados con el ADN amplificado unido al sustrato sólido;

40 donde la o las células con un primer cariotipo y la o las células con un segundo cariotipo no son una o más células embrionarias humanas, una o más células germinales humanas, uno o más oocitos humanos o uno o más cuerpos polares humanos.

45 Preferentemente, el método se usa para detectar una anomalía cromosómica en la célula con un primer cariotipo para el diagnóstico prenatal de un feto en el que la célula con un primer cariotipo es una célula fetal, o para la determinación del cariotipo de una célula cancerosa donde la célula con el primer cariotipo es una célula cancerosa aislada de un sujeto por biopsia o aislada de la sangre.

50 Preferentemente, la amplificación del ADN de una o más células con un primer cariotipo y la amplificación del ADN de una o más células con un segundo cariotipo es amplificación con cebadores aleatorios.

55 Preferentemente, el ADN amplificado de una o más células con un primer cariotipo es ADN amplificado de 100 o menos células. Más preferentemente, donde el ADN amplificado de una o más células con un primer cariotipo es ADN amplificado de 1 a 20 células. Aún más preferentemente, el ADN amplificado de una o más células con un primer cariotipo es ADN amplificado de una única célula.

60 Preferentemente, el marcaje del ADN amplificado de la o las células con un primer cariotipo se realiza durante o como parte de la amplificación del ADN a partir de la o las células con un primer cariotipo.

65 Preferentemente, la amplificación aleatoria del ADN de la o las células con un primer cariotipo es amplificación directa de ADN extraído de las células.

Preferentemente, se produce lisis de las células con un primer cariotipo y la amplificación aleatoria de ADN resultante de la lisis en el mismo tubo.

Preferentemente, el método incluye la etapa de realizar un ciclo adicional de amplificación aleatoria del ADN amplificado aleatoriamente a partir de las células con un primer cariotipo y el marcaje del ADN con un primer

marcador se produce simultáneamente con y/o después del ciclo adicional de amplificación aleatoria.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para diagnóstico genético preimplantación de un embrión o un oocito, incluyendo el método las etapas de:

- 5 (a) amplificar aleatoriamente ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- (b) agotar las secuencias repetitivas y/o agotar las secuencias del ADN amplificado que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación aleatoria, produciéndose el agotamiento antes y/o después de la amplificación;
- 10 (c) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
- (d) amplificar aleatoriamente ADN de una célula de una o más células embrionarias obtenidas de un embrión en el estadio de 6-8 células o posterior, o un cuerpo polar de un oocito con un cariotipo desconocido y amplificar el ADN de una o más células con un cariotipo de referencia;
- 15 (e) marcar el ADN amplificado de la o las células embrionarias, o un cuerpo polar de un oocito con un cariotipo desconocido con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de una o más células con un cariotipo de referencia con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
- (f) hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo desconocido con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo de referencia con el ADN amplificado unido al sustrato sólido;
- 20 (g) detectar la presencia de una anomalía cromosómica en la o las células con el cariotipo desconocido comparando la cantidad relativa del primer marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido con la cantidad de un segundo marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- (h) determinar la idoneidad del embrión o el oocito para implantación por la ausencia de una anomalía cromosómica.

25 Preferentemente, la anomalía cromosómica se selecciona del grupo que consiste en un cromosoma individual extra o ausente, una parte extra o ausente de un cromosoma, una rotura cromosómica, un reordenamiento cromosómico, una traslocación, un cromosoma dicéntrico, una inversión, una amplificación de una región cromosómica, una delección y una mutación puntual.

30 Preferentemente, la parte de un cromosoma aislado es un fragmento clonado de un cromosoma.

Preferentemente, las secuencias repetitivas incluyen secuencias Cot-1, ADN repetido sencillo, repeticiones satélite, repeticiones minisatélite, repeticiones específicas de cromosoma, repeticiones microsatélite, genes repetidos, secuencias derivadas de elementos transponibles, elementos derivados de múltiples copias de virus tales como retrovirus, repeticiones asociadas con centrómeros o telómeros y repeticiones asociadas con heterocromatina.

También se describe en el presente documento un método para comparar al menos un cromosoma o parte del mismo de una célula con un primer cariotipo con el cromosoma correspondiente o parte del mismo de una célula con un segundo cariotipo, incluyendo el método las etapas de:

- (a) amplificar ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- (b) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
- 45 (c) amplificar DNP, de una o más células con un primer cariotipo y amplificar ADN de una o más células con un segundo cariotipo;
- (d) marcar el ADN amplificado de la o las células con un primer cariotipo con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de la o las células con un segundo cariotipo con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
- 50 (e) hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un segundo cariotipo con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- (f) comparar la cantidad relativa de primer y segundo marcadores hibridados con el ADN amplificado unido al sustrato sólido.

55 También se describe en el presente documento un método para detectar una anomalía cromosómica en una célula con un cariotipo desconocido, incluyendo el método las etapas de:

- (a) amplificar ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- (b) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
- 60 (c) amplificar ADN de una o más células con un cariotipo desconocido y amplificar ADN de una o más células con un cariotipo de referencia;
- (d) marcar el ADN amplificado de la o las células con un cariotipo desconocido con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de la o las células con un cariotipo de referencia con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
- 65 (e) hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo desconocido con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo

de referencia con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y

(f) detectar la presencia de una anomalía cromosómica en la célula con el cariotipo desconocido comparando la cantidad relativa del primer marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido con la cantidad de un segundo marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido.

5 También se describe en el presente documento un ácido nucleico unido a un sustrato sólido, donde el ácido nucleico deriva de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado y el ácido nucleico está desprovisto de secuencias repetitivas.

10 También se describe en el presente documento una matriz de ácidos nucleicos unidos a un sustrato sólido, donde cada ácido nucleico en la matriz deriva de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado y cada ácido nucleico está desprovisto de secuencias repetitivas.

15 También se describe en el presente documento un ácido nucleico unido a un sustrato sólido, donde el ácido nucleico deriva de la amplificación con cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado y el ácido nucleico está desprovisto de una o más de secuencias repetitivas, secuencias no cromosómicas o secuencias que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación.

20 También se describe en el presente documento una matriz de ácidos nucleicos unidos a un sustrato sólido, donde cada ácido nucleico en la matriz deriva de la amplificación con cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado y cada ácido nucleico está desprovisto de una o más de secuencias repetitivas, secuencias no cromosómicas o secuencias que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación del cromosoma o parte del mismo.

25 También se describe en el presente documento un ácido nucleico derivado de la amplificación con cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado, donde el ácido nucleico está desprovisto de secuencias repetitivas.

30 La presente invención surge de estudios sobre la detección de trisomías 13 y 18 en células individuales de amniocitos y linfocitos. En particular, se ha descubierto sorprendentemente que la detección de dichas trisomías en una única célula por hibridación genómica comparativa puede mejorarse notablemente reemplazando las extensiones en metafase empleadas normalmente con los productos de amplificación con cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte del mismo unido a un sustrato sólido. La hibridación genómica comparativa realizada de esta manera requiere menos tiempo (aproximadamente 30 horas en total) para realizarse que los métodos
35 tradicionales usando extensiones de metafase.

Diversos términos que se usarán a lo largo de la memoria descriptiva tienen significados que se entenderán bien por un destinatario experto. Sin embargo, para facilidad de referencia, se definirán ahora algunos de estos términos.

40 Debe entenderse que el término "célula" como se usa a lo largo de la memoria descriptiva significa una célula somática, una célula germinal, una célula de cualquier ploidía, cualquier cuerpo derivado de célula que tenga uno o más cromosomas (o una parte de uno o más cromosomas) en el mismo. Los ejemplos de cuerpos derivados de células incluyen el cuerpo polar asociado con un oocito no fertilizado, un cuerpo polar extruido por un oocito en el momento de la fertilización del oocito por un espermatozoide, un núcleo aislado de una célula o parte de un núcleo,
45 una mitocondria o un cloroplasto.

Debe entenderse que el término "cariotipo" como se usa a lo largo de la memoria descriptiva significa la constitución cromosómica de una célula, que puede variar entre individuos de una única especie.

50 A este respecto, debe entenderse que la expresión "cariotipo desconocido" significa que el cariotipo de uno o más cromosomas en una célula se desconoce. Debe entenderse que la expresión "cariotipo de referencia" significa el cariotipo de una célula que se usa como el cariotipo frente al que se ensaya el cariotipo de otra célula. La célula con el cariotipo de referencia puede tener un cariotipo conocido, tal como un cariotipo normal o una delección o multiplicación conocida de un cromosoma específico o, como alternativa, puede tener un cariotipo desconocido de
55 uno o más cromosomas. Típicamente, la célula con un cariotipo desconocido será una célula de un feto, un embrión, un oocito o una célula cancerosa, y la célula con el cariotipo de referencia será el mismo tipo de célula o una célula similar con un cariotipo normal.

60 Debe entenderse que la expresión "cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado" como se usa a lo largo de la memoria descriptiva significa un cromosoma aislado o cualquier parte de un cromosoma aislado. A este respecto, debe entenderse que parte de un cromosoma incluirá una parte de un cromosoma, aislado por ejemplo por microdissección o por citometría de flujo, o cualquier clon que contenga ADN cromosómico (genómico). Los ejemplos de dichos clones incluyen clones de BAC, YAC y P1 que contienen ADN genómico, o cualquier otro clon que tenga ADN genómico clonado en un vector adecuado.

65

A este respecto, también debe entenderse que el término “cromosoma” significa cualquier cromosoma presente en una célula de cualquier ploidía (haploide, diploide o poliploide), incluyendo un cromosoma sexual, un autosoma, un cromosoma mitocondrial, un cromosoma de cloroplasto o un episoma.

- 5 Debe entenderse que el término “amplificar” o variantes del mismo como se usa a lo largo de la memoria descriptiva significa la producción de copias adicionales de una secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, puede conseguirse amplificación usando tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (esencialmente como se describe en Dieffenbach, C. W. y G. S. Dveksler (1995) PCR Primer, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.) o por otros métodos de amplificación, tales como amplificación en círculo rodante en moldes
10 circulares, tal como se describe en Fire, A. y Xu, S-Q. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci 92: 4641-4645.

- A este respecto, se entenderá que la expresión “amplificación con cebadores aleatorios” significa amplificación utilizando uno o más cebadores que da como resultado la amplificación de sustancialmente la diana completa. Por ejemplo, puede conseguirse amplificación aleatoria con el uso de uno o más cebadores incluyendo una secuencia
15 de uno o más nucleótidos aleatorios, siendo la secuencia de nucleótidos aleatorios suficientemente larga para permitir que el cebador hibride con el ácido nucleico diana en condiciones seleccionadas en posiciones aleatorias y actúe como un cebador para extensión por una polimerasa. Por ejemplo, el cebador puede ser un cebador que incluye un tramo de seis o más nucleótidos contiguos de secuencia aleatoria.

- 20 Como alternativa, puede conseguirse amplificación aleatoria con uno o más cebadores de secuencia fija, pero con la rigurosidad de la reacción de amplificación suficientemente baja para permitir la amplificación aleatoria de la diana, particularmente en los ciclos tempranos del proceso de amplificación.

- Además, se apreciará que la amplificación de ADN de una o más células no incluye solamente la amplificación del contenido cromosómico completo de una o más células, sino que también incluye amplificación de un cromosoma
25 aislado, o cualquier parte del mismo, derivado de una o más células. Por ejemplo, el ADN amplificado para análisis podría ser un único cromosoma aislado por microdissección o citometría de flujo, una parte de un cromosoma aislado por microdissección, o parte de un cromosoma que es un fragmento clonado de ADN genómico.

- 30 Debe entenderse que el término “unir” o variantes del mismo como se usan a lo largo de la memoria descriptiva en relación con ADN amplificado significa cualquier forma de inmovilización de ADN amplificado en un sustrato sólido, incluyendo adsorción pasiva en el sustrato sólido, enlace covalente del ADN con el sustrato sólido mediante grupos químicos apropiados, o el uso de grupos químicos específicos con alta afinidad entre sí que permiten que el ADN se inmovilice en el sustrato sólido (por ejemplo biotina y estreptavidina).

- 35 Debe entenderse que la expresión “sustrato sólido” como se usa a lo largo de la memoria descriptiva significa cualquier soporte sólido que permite que un ácido nucleico se fije espacialmente al soporte y que permite que el ácido nucleico permanezca fijado al soporte durante la hibridación. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen vidrio, nylon u otro tipo de membranas, filtros y microplacas.

- 40 A este respecto, se entenderá que no es necesario que el ácido nucleico esté permanentemente fijado al soporte, y que el ácido nucleico puede, si se desea, fijarse al soporte sólido para permitir la retira del ácido nucleico del soporte en condiciones seleccionadas.

- 45 Debe entenderse que la expresión “anomalía cromosómica” como se usa a lo largo de la memoria descriptiva significa cualquier cambio o alteración en una parte de un cromosoma que puede detectarse por hibridación usando hibridación genómica comparativa.

- Debe entenderse que la expresión “célula germinal” como se usa a lo largo de la memoria descriptiva significa una
50 célula reproductiva, un gameto o una célula que se desarrollará a una célula reproductiva. Por ejemplo, una célula germinal incluye un espermatozoido o un oocito.

- Debe entenderse que la expresión “secuencias repetitivas” como se usa a lo largo de la memoria descriptiva significa cualquier secuencia presente en un ácido nucleico que está presente en más de una copia en el genoma.
55 No es necesario que cada copia de una secuencia repetitiva sea idéntica a todas las demás, siempre que las secuencias sean suficientemente similares de modo que en las condiciones de hibridación que se usan el mismo fragmento de ácido nucleico sonda es capaz de formar híbridos estables con cada copia. Los ejemplos de secuencias repetitivas incluyen ADN repetido sencillo (por ejemplo elementos Alu o Kpn), repeticiones satélites, repeticiones mini satélite, repeticiones específicas de cromosoma, repeticiones micro satélite, genes repetidos (por ejemplo genes ARNr), secuencias derivadas de elementos transponibles (por ejemplo transposones con intermedios de ADN o ARN), elementos derivados de múltiples copias de virus tales como retrovirus, repeticiones asociadas con centrómero o telómeros, o repeticiones asociadas con heterocromatina.

- Debe entenderse que la expresión “ácido nucleico” como se usa a lo largo de la memoria descriptiva significa un
65 polinucleótido, que está compuesto de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma monocatenaria o bicatenaria.

Debe entenderse que el término “aislado” como se usa a lo largo de la memoria descriptiva en relación con un ácido nucleico significa un ácido nucleico separado de al menos otro componente (por ejemplo, ácido nucleico o polipéptido) presente con el ácido nucleico en su fuente natural.

- 5 Debe entenderse que la expresión “secuencias no cromosómicas” como se usa a lo largo de la memoria descriptiva significa cualquier secuencia en una muestra de ácido nucleico que no está normalmente presente en la secuencia de nucleótidos del genoma de la muestra de ácido nucleico, o la secuencia de nucleótidos de uno o más cromosomas o parte de los mismos. Los ejemplos de dichas secuencias no cromosómicas incluyen secuencias derivadas de un vector o plásmido, o secuencias contaminantes que pueden estar presentes en una muestra de
10 ácido nucleico debido a su preparación, tales como secuencias bacterianas (por ejemplo *E. coli*).

- Debe entenderse que la frase “secuencias que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación” o la expresión “secuencias sobrerrepresentadas” como se usan a lo largo de la memoria descriptiva significan las secuencias presentes después de la amplificación de la diana que se han amplificado desproporcionadamente en comparación
15 con otras secuencias normalmente presentes en la diana.

Breve descripción de las figuras

- 20 La Figura 1 muestra la electroforesis de bibliotecas de ADN reamplificado de cromosomas humanos (autosomas 1-22; cromosomas sexuales X, Y) como se describe en el Ejemplo 2. También se muestran marcadores de tamaño (λ HindIII, Puc19 HpaII).

- 25 La Figura 2 muestra los resultados de FISH de bibliotecas de ADN reamplificado de cromosomas humanos, como se describe en el Ejemplo 3. Se llevó a cabo FISH usando extensiones de cromosomas en metafase de linfocitos de sangre periférica masculina normal. Se usó bien SpectrumGreen-dUTP o bien SpectrumRed-dUTP para marcar sondas de ADN por amplificación por DOP-PCR. Excepto por señales muy débiles para la biblioteca de ADN del cromosoma 21, todas las demás marcaron uniformemente sus cromosomas diana completos o ramas q.

- 30 La Figura 3 muestra una representación del formato de matriz de ADN esperado usando carga de una placa de 384 pocillos, como se describe en el Ejemplo 4.

- 35 La Figura 4 muestra los resultados de electroforesis de bibliotecas de ADN reamplificado antes, durante y después de la selección por tamaño, como se describe en el Ejemplo 4 (ii) para la preparación de matrices de segunda generación.

- La Figura 5 muestra la imagen y representación gráfica de los datos para el análisis de una célula 47, XX, +13 (Verde) frente a una célula 46, XY (Roja) como se describe en el Ejemplo 10.

- 40 La Figura 6 muestra la imagen y representación gráfica de los datos para el análisis de una célula 47, XY, +18 frente a una célula 46, XX como se describe en el Ejemplo 10.

- La Figura 7 muestra una de las imágenes que es representativa de los experimentos descritos en el Ejemplo 11.

- 45 La Figura 8 muestra la imagen para el experimento del análisis de una única célula con el cariotipo 47, XY, +18 frente a una célula individual 46, XX como se describe en el Ejemplo 12.

- 50 La Figura 9 muestra los procedimientos de aislamientos de células de fibroblastos. Una suspensión de células de fibroblastos se diluye en cuatro charcos creados en un portaobjetos de microscopio hasta el punto en que solo haya aproximadamente 100 células en el charco de tampón de PCR 1X N° 3. Estas 100 células se lavaron varias veces en este charco y después se transfirieron a un tubo de PCR esterilizado de 0,5 ml. Se aspiró el tampón de PCR 1X (< 3 μ l) del charco N° 3 y se usó para un control negativo.

- 55 La Figura 10 en el panel superior muestra los resultados de un experimento de CGH de matrices de 100 células de fibroblastos (47, XY, +18, Cy3) frente a un ADN genómico masculino normal (46, XY, Cy5). La Figura 10 en el panel inferior muestra los resultados de un experimento de CGH de matrices de 100 células de fibroblastos (47, XY, +18, Cy3) frente a una mezcla agrupada (46, XY, Cy5) de 5 hasta 10 células masculinas normales individuales.

- 60 La Figura 11 en el panel superior muestra la electroforesis en agarosa de ADN de Cot-1 amplificado por DOP-PCR. La Figura 11 en el panel inferior muestra los resultados de un experimento de CGH de matrices de una única célula femenina marcada con Cy3-dUTP frente a una mezcla agrupada de más de 5 células masculinas individuales marcadas con Cy5-dUTP usando 140 μ l de ADN de Cot-1 amplificado por DOP-PCR en lugar de 70 μ g de ADN de Cot-1 comercializado (Invitrogen).
65

La Figura 12 muestra electroforesis en gel de agarosa de productos de DOP-PCR marcados con Cy3 generados a partir de blastómeros individuales de embriones en estadio de escisión creados por IVF. Estaban presentes cuatro blastómeros en cada uno de tres embriones congelados donados a la investigación y los cuatro blastómeros se disociaron dando como resultado un total de 12 blastómeros individuales separados. El ADN de cada célula se preamplificó y después se marcó con Cy3 por DOP-PCR. El origen de cada muestra se indica encima de cada carril. Los marcadores de ADN fueron *SPP-1/EcoRI* (M_1) y *pUC19/HpaII* (M_2). Obsérvese que cada producto marcado proporciona una mancha en un gel de agarosa al 1 % que varía de 300 pb a 2.500 pb y que contiene dos bandas específicas aproximadamente a 450 pb y 600 pb.

La Figura 13 panel superior muestra electroforesis de agarosa de ADN de BAC amplificado por DOP-PCR. Los orígenes de las muestras se indican encima de cada carril: 1 (RP-11-265k23), 2 (RP-11-849), 3 (RP-11-354m20), 4 (RP-11-280F22), 5 (RP-11-113m14), 6 (RP-11-70E19), 7 (RP-11-10P15) y 8 (RP-11-506P9). Los marcadores de ADN fueron *SPP-1/EcoRI* (M_1) y *pUC19/HpaII* (M_2). La Figura 13 panel inferior muestra electroforesis en agarosa de ADN de BAC desprovisto de repeticiones amplificado por DOP-PCR. Los orígenes de las muestras se indican encima de cada carril: 1 (RP-11-265k23) y 2 (una mezcla de RP-11-354m20m, RP-11-280F22, RP-11-113m14, RP-11-70E19, RP-11-10P15 y RP-11-506P9). Los marcadores de ADN fueron *SPP-1/EcoRI* (M_1) y *pUC19/HpaII* (M_2).

La Figura 14 panel superior muestra electroforesis en agarosa de productos amplificados por PCR de Molde Largo Expandido. Los orígenes de las muestras se indican encima de cada carril. Los marcadores de ADN fueron *SPP-1/EcoRI* (M_1). La Figura 14 panel inferior muestra electroforesis en agarosa de productos de DOP-PCR usando productos amplificados por PCR de Molde Largo Expandido como moldes. Los orígenes de los loci *DYS* se indican encima de cada carril. Los marcadores de ADN fueron *SPP-1/EcoRI* (M_1) y *pUC19/HpaII* (M_2).

La Figura 15 en el panel superior muestra electroforesis en gel de agarosa de productos de SEP-PCR de células individuales femeninas marcadas con Cy3. Se realizó amplificación por PCR usando cuatro condiciones diferentes y se amplificaron por separado cuatro células individuales en cada una de estas condiciones. El origen de cada muestra se indica encima de cada carril. Los marcadores de ADN fueron *SPP-1/EcoRI* (M_1) y *pUC19/HpaII* (M_2). Obsérvese que cada producto marcado proporciona una mancha en un gel de agarosa al 1 % que varía de 300 pb a 2.500 pb y que contiene dos bandas específicas aproximadamente a 450 pb y 600 pb. La Figura 15 en el panel inferior muestra electroforesis en gel de agarosa de productos de SEP-PCR de célula individual masculina marcados con Cy5. Se realizó amplificación por PCR usando cuatro condiciones diferentes (para detalles véase el contexto anterior) y se amplificaron por separado cuatro células individuales en cada una de estas condiciones. El origen de cada muestra se indica encima de cada carril. Los marcadores de ADN fueron *SPP-1/EcoRI* (M_1) y *pUC19/HpaII* (M_2). Obsérvese que cada producto marcador proporciona una mancha en un gel de Agarosa al 1 % que varía de 300 pb a 2.500 pb.

Descripción general de la invención

Como se ha mencionado anteriormente, en una forma la presente invención proporciona un método para comparar al menos un cromosoma o parte del mismo de una célula con un primer cariotipo con el cromosoma correspondiente o parte del mismo de una célula con un segundo cariotipo, incluyendo el método las etapas de:

- (a) amplificar aleatoriamente ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- (b) agotar las secuencias repetitivas y/o agotar las secuencias del ADN amplificado que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación aleatoria, produciéndose el agotamiento antes y/o después de la amplificación;
- (c) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
- (d) amplificar ADN de una o más células con un primer cariotipo y amplificar ADN de una o más células con un segundo cariotipo;
- (e) marcar el ADN amplificado de la o las células con un primer cariotipo con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de la o las células con un segundo cariotipo con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
- (f) hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un primer cariotipo con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un segundo cariotipo con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- (g) comparar la cantidad relativa de primer y segundo marcadores hibridados con el ADN amplificado unido al sustrato sólido;

donde la o las células con un primer cariotipo y la o las células con un segundo cariotipo no son una o más células embrionarias humanas, una o más células germinales humanas, uno o más oocitos humanos o uno o más cuerpos polares humanos.

Preferentemente, el método se usa para detectar una anomalía cromosómica en la célula con un primer cariotipo para el diagnóstico prenatal de un feto donde la célula con un primer cariotipo es una célula fetal, o para determinación del cariotipo de una célula cancerosa donde la célula con el primer cariotipo es una célula cancerosa

aislada de un sujeto por biopsia o aislada de la sangre.

Preferentemente, la amplificación de ADN de una o más células con un primer cariotipo y la amplificación de ADN de una o más células con un segundo cariotipo es amplificación con cebadores aleatorios.

Preferentemente, el ADN amplificado de una o más células con un primer cariotipo es ADN amplificado de 100 o menos células. Más preferentemente, el ADN amplificado de una o más células con un primer cariotipo es ADN amplificado de 1 a 20 células. Aún más preferentemente, el ADN amplificado de una o más células con un primer cariotipo es ADN amplificado de una única célula.

Preferentemente, el marcaje del ADN amplificado de la o las células con un primer cariotipo se realiza durante o como parte de la amplificación del ADN a partir de la o las células con un primer cariotipo.

Preferentemente, la amplificación aleatoria de ADN de la o las células con un primer cariotipo es amplificación directa de ADN extraído de las células.

Preferentemente, la lisis de las células con un primer cariotipo y la amplificación aleatoria de ADN resultante de la lisis se producen en el mismo tubo.

Preferentemente, el método incluye la etapa de realizar un ciclo adicional de amplificación aleatoria del ADN amplificado aleatoriamente a partir de las células con un primer cariotipo y el marcaje del ADN con un primer marcador se produce simultáneamente con y/o después del ciclo adicional de amplificación aleatoria.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para diagnóstico genético preimplantación de un embrión o un oocito, incluyendo el método las etapas de:

- (a) amplificar aleatoriamente ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- (b) agotar las secuencias repetitivas y/o agotar las secuencias del ADN amplificado que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación aleatoria, produciéndose el agotamiento antes y/o después de la amplificación;
- (c) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
- (d) amplificar aleatoriamente ADN de una o más células embrionarias o un cuerpo polar de un oocito con un cariotipo desconocido y amplificar ADN de una o más células con un cariotipo de referencia;
- (e) marcar y amplificar ADN de la o las células embrionarias, o un cuerpo polar de un oocito con un cariotipo desconocido con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de una o más células con un cariotipo de referencia con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
- (f) hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo desconocido con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo de referencia con el ADN amplificado unido al sustrato sólido;
- (g) detectar la presencia de una anomalía cromosómica en la o las células con el cariotipo desconocido comparando la cantidad relativa del primer marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido con la cantidad de un segundo marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- (h) determinar la idoneidad del embrión o el oocito para implantación por la ausencia de una anomalía cromosómica.

Preferentemente, la anomalía cromosómica se selecciona del grupo que consiste en un cromosoma individual extra o ausente, una parte extra o ausente de un cromosoma, una rotura cromosómica, una reordenación cromosómica, una translocación, un cromosoma dicéntrico, una inversión, una amplificación de una región cromosómica, una delección y una mutación puntual.

Preferentemente, la parte de un cromosoma aislado es un fragmento clonado de un cromosoma.

Preferentemente, las secuencias repetitivas incluyen secuencias de Cot-1, ADN repetido sencillo, repeticiones satélite, repeticiones minisatélite, repeticiones específicas de cromosoma, repeticiones microsatélite, genes repetidos, secuencias derivadas de elementos transponibles, elementos derivados de múltiples copias de virus tales como retrovirus, repeticiones asociadas con centrómeros o telómeros y repeticiones asociadas con heterocromatina.

También se describe en el presente documento un método para comparar al menos un cromosoma o parte del mismo de una célula con un primer cariotipo con el cromosoma correspondiente o parte del mismo de una célula con un segundo cariotipo, incluyendo el método las etapas de:

- (a) amplificar ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- (b) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
- (c) amplificar ADN de una o más células con un primer cariotipo y amplificar ADN de una o más células con un segundo cariotipo;
- (d) marcar el ADN amplificado de la o las células con un primer cariotipo con un primer marcador, y marcar el

ADN amplificado de la o las células con un segundo cariotipo con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;

(e) hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un primer cariotipo con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un segundo cariotipo con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y

(f) comparar la cantidad relativa de primer y segundo marcadores hibridados con el ADN amplificado unido al sustrato sólido.

Esto permite comparar el número de copias de uno o más cromosomas, o una región de uno o más cromosomas, en una célula que con un primer cariotipo con un cromosoma o región correspondiente en una célula con un segundo cariotipo. Como tal, este método puede usarse, por ejemplo, en diagnóstico genético prenatal, diagnóstico genético preimplantación, determinación del sexo o selección, o la determinación del cariotipo de células cancerosas u otras somáticas.

Preferentemente, el método se usa para diagnóstico preimplantación de un embrión o un oocito, o para el diagnóstico prenatal de un feto con respecto a una anomalía cromosómica.

Preferentemente, la célula con el primer cariotipo es de cariotipo desconocido, y la célula con el segundo cariotipo es de cariotipo conocido. Por ejemplo, la célula con el primer cariotipo puede tener una anomalía cromosómica desconocida en una localización cromosómica particular, y la célula con el segundo cariotipo puede tener un cromosoma normal conocido en la localización cromosómica correspondiente.

A este respecto, este método es útil para la detección de diferencias cromosómicas globales en una célula, tales como deleciones, duplicaciones o amplificaciones. Los ejemplos de afecciones que pueden ser susceptibles de detección por este método incluyen Trisomía del 21, 13 y 18 y la detección de cromosomas ausentes, tal como sucede en el síndrome de Turner (45, XO).

Se apreciará que el método puede usarse para comparar todos los cromosomas en una célula con un primer cariotipo con una célula con un segundo cariotipo. Sin embargo, dependiendo del ADN amplificado que se une con el sustrato sólido, el método también puede usarse para comparar partes de uno o más cromosomas específicos entre células.

El cromosoma para comparar puede ser cualquier cromosoma presente en una célula de cualquier ploidía (haploide, diploide o poliploide), incluyendo un cromosoma sexual, un autosoma, un cromosoma mitocondrial, un cromosoma de cloroplasto o un episoma. Preferentemente, el cromosoma es un cromosoma sexual o un autosoma. Más preferentemente, el cromosoma es un autosoma.

De forma similar, la parte del cromosoma aislado para comparar puede ser parte de cualquier cromosoma presente en una célula de cualquier ploidía (haploide, diploide o poliploide) incluyendo un cromosoma sexual, un autosoma, un cromosoma mitocondrial, un cromosoma de cloroplasto o un episoma. Preferentemente, la parte del cromosoma es parte de un cromosoma sexual o un autosoma. Más preferentemente, la parte del cromosoma es parte de un autosoma.

La célula con el primer cariotipo puede ser cualquier célula para la que el cariotipo (primer cariotipo) va a compararse con el cariotipo (segundo cariotipo) de otra célula. La célula con el primer cariotipo puede ser una célula eucariota o una procariota. Preferentemente, la célula es una célula eucariota. Más preferentemente, la célula es una célula animal o humana. Más preferentemente, la célula es una célula humana.

Preferentemente, la célula con el primer cariotipo es una célula fetal, una célula derivada de un embrión, una célula germinal, una célula cancerosa o cualquier otro tipo de célula somática con un cariotipo para comparar con el cariotipo de otra célula. Más preferentemente la célula con el primer cariotipo es una célula fetal, una célula embrionaria (incluyendo un blastómero) o una célula germinal. Más preferentemente, la célula es una célula embrionaria o un oocito.

Los ejemplos de una célula fetal incluyen una célula fetal tomada del líquido amniótico que rodea al feto, una célula sanguínea fetal tomada de la circulación materna, o una célula fetal tomada del tracto reproductor de la madre (por ejemplo lavado del cuello uterino o vaginal). A este respecto, las células sanguíneas fetales, a diferencia de las células sanguíneas maduras, están nucleadas y pueden aislarse de la circulación materna.

En el caso de una célula embrionaria, puede retirarse un número pequeño de células (habitualmente una o dos células) de un embrión. En este procedimiento, pueden retirarse una o más células en un embrión por biopsia del embrión en estadio de escisión. Este procedimiento se realiza habitualmente el día 3 del desarrollo, cuando el embrión está en el estadio de 6-8 células. La biopsia consiste en dos estadios. El primero es realizar un orificio en la zona pelúcida que rodea al embrión en este momento, habitualmente usando solución de Tyrodes ácida o un láser sin contacto. Una vez que se realiza el orificio, la célula puede después retirarse del embrión.

En el caso de una célula germinal, por ejemplo un oocito o célula espermática, la célula germinal puede analizarse directamente. Como alternativa, en el caso de exploración con respecto a anomalías maternas, puede aislarse un cuerpo polar del oocito.

- 5 En el caso de una célula cancerosa o cualquier otra célula somática, pueden obtenerse una o más células de un sujeto por un método adecuado conocido en la técnica, tal como biopsia directa de células o aislamiento de sangre.

10 A este respecto, un gran número de células puede no estar asociado necesariamente con una determinación más precisa del cariotipo, y en algunos casos puede ser preferible que se aisle un número relativamente pequeño de células (por ejemplo de 1 a 20 células).

15 La célula con el segundo cariotipo puede ser cualquier célula para la que vaya a compararse el cariotipo de la célula con el primer cariotipo. Preferentemente, la célula con el segundo cariotipo es del mismo tipo o un tipo similar que la célula con el primer cariotipo.

20 El cromosoma aislado en las diversas formas de la presente invención puede ser cualquier cromosoma que se ha purificado sustancialmente de otros cromosomas por un método conocido en la técnica. Por ejemplo, el cromosoma puede aislarse por microdissección como se describe en Meltzer *et al.* (1992) *Nature Genetics* 1: 24-28. Como alternativa, el cromosoma puede aislarse por citometría de flujo como se describe en Telenius *et al.* (1992) *Genes, Chromosomes & Cancer* 4: 257-263.

25 En el caso de la microdissección, las células se tratan en primer lugar para obligarlas a entrar en metafase y se puede aislar un cromosoma entero con el uso de una aguja muy fina. En el caso de la citometría de flujo, los cromosomas pueden teñirse con reactivos de tinción cromosómica específicos y los cromosomas aislarse por el grado de fluorescencia asociado con cada uno de los cromosomas mediante clasificación.

30 Una parte de un cromosoma aislado en las diversas formas de la presente invención puede ser cualquier parte de un cromosoma aislado para la que va a compararse el cariotipo con la parte correspondiente del mismo cromosoma en otra célula.

Una parte de un cromosoma puede aislarse por un método adecuado conocido en la técnica, incluyendo la microdissección de bandas cromosómicas específicas de cromosomas en metafase como se ha analizado anteriormente.

35 Como alternativa, una parte de un cromosoma puede ser un fragmento clonado de un cromosoma, aislado por clonación de un fragmento de ADN genómico en un vector adecuado. Los métodos para el aislamiento de fragmentos genómicos grandes y pequeños y su clonación en vectores son esencialmente como se describe en Sambrook, J, Fritsch, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York. (1989). Por ejemplo, para producir fragmentos genómicos grandes para clonar en un vector tal como un YAC, puede realizarse digestión parcial de ADN genómico con una endonucleasa de restricción y los fragmentos resultantes clonarse en el vector. El vector aislado con ADN de inserto clonado puede después purificarse por un método adecuado conocido en la técnica. Son ejemplos de vectores adecuados para clonar fragmentos genómicos grandes los vectores YAC, vectores BAC, vectores P1 o cósmidos.

45 La amplificación del ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado en las diversas formas de la presente invención puede conseguirse por un método adecuado conocido en la técnica que permite la producción de copias adicionales del ADN. Por ejemplo, en el caso de un cromosoma completo aislado por microdissección o citometría de flujo, o una parte del mismo aislada por microdissección, el ADN puede amplificarse usando tecnología de PCR, esencialmente como se describe en Dieffenbach, C. W. y G. S. Dveksler (1995) *PCR Primer*, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N. Y.

50 A este respecto, un ácido nucleico derivará de un producto de amplificación si el ácido nucleico se ha producido por un proceso de amplificación, e incluye un ácido nucleico derivado de un proceso de amplificación que se ha sometido posteriormente a uno o más tratamientos después de la amplificación.

55 En el caso de parte de un cromosoma clonado en un vector circular, puede conseguirse amplificación por ejemplo por amplificación por PCR o mediante el uso de amplificación de círculo rodante como se describe en Fire, A. y Xu, S-Q. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci* 92: 4641-4645.

60 Preferentemente la amplificación del ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado dará como resultado la amplificación sustancialmente de la diana completa.

65 En consecuencia, se prefiere que la amplificación del cromosoma aislado o una parte de un cromosoma aislado en las diversas formas de la presente invención sea amplificación con cebadores aleatorios para conseguir amplificación sustancialmente de la diana completa.

La amplificación del ADN de un cromosoma aislado o parte del mismo se realizará con uno o más cebadores apropiados. Como se analizado anteriormente, preferentemente el o los cebadores usados darán como resultado la amplificación aleatoria del cromosoma aislado o parte del cromosoma aislado.

Preferentemente, el o los cebadores usados son un oligonucleótido que incluye uno o más nucleótidos de secuencia aleatoria. Más preferentemente, el o los cebadores son un oligonucleótido que incluye uno o más nucleótidos contiguos de secuencia aleatoria. Más preferentemente, el o los cebadores son un oligonucleótido que incluye seis o más nucleótidos contiguos de secuencia aleatoria, tal como un cebador DOP (cebador oligonucleotídico degradado). Más preferentemente, el o los cebadores son un cebador con la siguiente secuencia de nucleótidos:

5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3';

donde NNNNNN representa la secuencia degradada. "N" es cualquier nucleótido es decir N representa los cuatro nucleótidos posibles en la secuencia de ADN: "A", "T", "C" y "G" para Adenina, Timina, Citosina y Guanina, respectivamente. Como tal, la secuencia degradada contiene mezclas de diversas secuencias de nucleótidos incluyendo todas las posibles combinaciones de A, T, C y G en las posiciones "N".

Si se desea, la secuencia de nucleótidos de la secuencia degradada también puede desviarse hacia una composición de nucleótidos particular, por ejemplo riqueza en GC o AT.

En el caso de amplificación usando cebadores DOP en un cromosoma aislado, o una parte de un cromosoma aislado por microdissección o clonando en un vector, la amplificación puede realizarse esencialmente como se describe en Telenius *et al.* (1992) *Genomics* 18: 718-725 (1992). Brevemente, la amplificación se realiza en condiciones de baja rigurosidad durante un número bajo de ciclos (por ejemplo cinco ciclos) y se realiza una amplificación de segundo estadio en condiciones más rigurosas durante un número mayor de ciclos (por ejemplo 35 ciclos).

Como alternativa, puede conseguirse amplificación de cebadores aleatorios usando uno o más cebadores de secuencia fija y realizando un número bajo de ciclos de amplificación en condiciones de baja rigurosidad que permitan que el o los cebadores inicien la síntesis aleatoriamente por toda la diana, seguido de una amplificación de segundo estadio realizada en condiciones más rigurosas durante generalmente un número mayor de ciclos.

Además, para compensar regiones de cromosomas pequeños que puedan presentar una dificultad en la consecución de amplificación de cebadores aleatorios sustancialmente de la diana completa, también pueden usarse cebadores específicos de región junto con otros cebadores que permitan la amplificación aleatoria. Por ejemplo, pueden usarse cebadores para regiones específicas de los cromosomas 21 y 22 junto con cebadores DOP.

En consecuencia, en una realización preferida de la presente invención la amplificación de ADN del cromosoma aislado o parte del cromosoma aislado incluye además la amplificación de una región cromosómica específica.

Otras técnicas adecuadas para amplificación del cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado incluyen PCR preamplificación de extensión de cebadores (PEP-PCR) que puede realizarse esencialmente como se describe en Zhang *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 5847-5851; ligamiento mediante PCR, que puede realizarse esencialmente como se describe en Klein *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 4494-4499; o alu-PCR, que puede realizarse esencialmente como en Nelson *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6686-6690.

En el caso del uso de amplificación por círculo rodante en un inserto genómico clonado en un vector circular, puede realizarse amplificación de círculo rodante usando condiciones adecuadas conocidas en la técnica, por ejemplo como se describe en Fire, A y Xu, S-Q. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 4641-4645.

Preferentemente, el ADN amplificado del cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado en las diversas formas de la presente invención se somete adicionalmente a selección por tamaño antes de la unión con el sustrato sólido. Preferentemente, el ADN amplificado unido al sustrato sólido es menor de 10 kb de tamaño. Más preferentemente, el ADN amplificado unido al sustrato sólido es menor de 3 kb de tamaño.

La selección por tamaño puede realizarse por un método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, el ADN amplificado puede someterse a electroforesis en un gel de agarosa, y pueden aislarse ADN con un tamaño en el intervalo de 150 a 3000 pb.

En una forma preferida de la presente invención, el ácido nucleico unido al sustrato sólido es el producto de amplificación con cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado, donde el ácido nucleico se ha seleccionado por tamaño.

En este caso, el ADN amplificado aleatoriamente unido al sustrato sólido es preferentemente de menos de 10 kb de tamaño. Más preferentemente, el ADN amplificado aleatoriamente unido al sustrato sólido es menor de 3 kb de tamaño. Por ejemplo, el ADN amplificado aleatoriamente puede someterse a electroforesis en un gel de agarosa, y

pueden aislarse ADN con un tamaño en el intervalo de 150 a 3000 pb.

En una realización preferida adicional, el ADN amplificado del cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado en las diversas formas de la presente invención se desprovee de una o más secuencias repetitivas, secuencias no cromosómicas, o secuencias que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación. Pueden usarse varios métodos conocidos en la técnica para agotar el ADN amplificado de dichas secuencias.

Las secuencias repetitivas son secuencias presentes en más de una copia en la secuencia diana para amplificar. Las secuencias no cromosómicas son secuencias que normalmente no están presentes en la secuencia de nucleótidos de un cromosoma o parte del mismo, tales como secuencias derivadas de un vector o plásmido, o secuencias contaminantes que pueden estar presentes en la muestra diana original para amplificar, tales como secuencias bacterianas (por ejemplo secuencias derivadas de *E. coli*). Las secuencias que están sobrerrepresentadas debido a amplificación del cromosoma son las secuencias presentes después de la amplificación de la diana que se han amplificado desproporcionadamente en comparación con otras secuencias normalmente presentes en la diana.

Las secuencias repetitivas y/o secuencias no cromosómicas pueden retirarse antes de la amplificación o después de la amplificación. Por ejemplo, puede aislarse ADN cromosómico y retirarse secuencias repetitivas y/o secuencias no cromosómicas. Como alternativa, el ADN puede amplificarse en primer lugar con cebadores apropiados y retirarse las secuencias de ADN repetitivas y/o secuencias no cromosómicas del grupo amplificado de ácidos nucleicos.

Los ejemplos de secuencias repetitivas incluyen ADN repetido sencillo (por ejemplo elementos Alu o Kpn), repeticiones satélites, repeticiones mini satélite, repeticiones específicas de cromosoma, repeticiones micro satélite, genes repetidos (por ejemplo, genes de ARNr), secuencias derivadas de elementos transponibles (por ejemplo transposones con intermedios de ADN o ARN), elementos derivados de múltiples copias o virus tales como retrovirus, repeticiones asociadas con centrómeros o telómeros, o repeticiones asociadas con heterocromatina.

Pueden usarse varios métodos conocidos en la técnica para retirar secuencias repetitivas. Por ejemplo, en muchos genomas, tales como el genoma humano, una parte importante del ADN repetitivo está contenido en algunas familias de secuencias altamente repetidas tales como Alu. Para retirar dichas secuencias repetitivas, puede usarse un procedimiento de bloqueo. Estos métodos aprovechan principalmente el hecho de que la tasa de hibridación de cadenas de ácido nucleico complementarias aumenta a medida que aumenta su concentración. Por lo tanto, si una mezcla de fragmentos de ácido nucleico se desnaturaliza y se incuba en condiciones que permitan la hibridación, las secuencias presentes a alta concentración se harán bicatenarias más rápidamente que las otras. El ácido nucleico bicatenario puede después retirarse por la retirada directa de estas secuencias por un método conocido en la técnica.

Por ejemplo, los ácidos nucleicos mono y bicatenarios tienen diferentes características de unión con hidroxipatita. Dichas características proporcionan una base habitualmente usada para fraccionar ácidos nucleicos. La fracción de ADN genómico que contiene secuencias con un grado particular de repetición pueden obtenerse desnaturalizando ADN genómico, permitiendo que se reasocie en condiciones apropiadas, seguido de separación usando hidroxipatita. Dichas técnicas son como se describe en Britten *et al.*, "Analysis of Repeating DNA Sequences by Reassociation" *Methods in Enzymology* 22: 363-418 (1974).

Los ejemplos de dichas secuencias que pueden usarse para desproveer el ADN amplificado de secuencias repetitivas incluyen ADN de Cot-1 humano y ADN que contienen repeticiones de Alu.

Como alternativa, pueden realizarse reacciones con ácido nucleico inmovilizado. Por ejemplo, se une ADN genómico humano mínimamente cortado con celulosa de diazonio o un soporte similar. El ADN amplificado, cortado apropiadamente en fragmentos, se hibrida frente al ADN inmovilizado a valores de Cot en el intervalo de aproximadamente 1 a 100. El material que no se une con el ácido nucleico inmovilizado puede después unirse al sustrato sólido.

En el caso de secuencias repetitivas agotadas de un clon genómico, las secuencias repetitivas también pueden agotarse de un clon de ADN genómico (por ejemplo, retirarse durante el proceso de clonación) y el clon resultante desproveerse de secuencias repetitivas usadas para amplificación. Como alternativa, las secuencias repetitivas pueden agotarse como anteriormente después de la amplificación del clon.

De forma similar, las secuencias no cromosómicas pueden agotarse antes o después de la amplificación de la secuencia diana. De manera similar a la descrita anteriormente para el agotamiento de secuencias repetitivas, las secuencias no cromosómicas pueden agotarse usando secuencias no cromosómicas en exceso en una reacción de hibridación con la diana o el ADN amplificado o uniendo las secuencias no cromosómicas con un soporte sólido y usando estas secuencias para agotar el ADN de estas secuencias.

En el caso del agotamiento de secuencias sobrerrepresentadas debido a amplificación, estas secuencias pueden agotarse de la diana por métodos similares descritos anteriormente, o las secuencias sobrerrepresentadas pueden

agotarse después de la amplificación. Como se apreciará, es necesario un entendimiento de la secuencia real que está sobrerrepresentada, y dependerá de los cebadores que se usen y la naturaleza de la diana que se amplifique.

Pueden agotarse secuencias sobrerrepresentadas y secuencias repetitivas juntas amplificando una fuente de secuencias repetitivas con los mismos cebadores usados para amplificar el ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado. El ácido nucleico repetitivo amplificado puede usarse después para agotar el ADN amplificado de secuencias sobrerrepresentadas y repetitivas. Por ejemplo, puede realizarse DOP-PCR en ADN de Cot-1, y los productos de amplificación resultantes usarse para agotar el ADN amplificado de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado.

El sustrato sólido en las diversas formas de la presente invención es cualquier soporte sólido que permita que se fije espacialmente un ácido nucleico en el soporte y que permita que el ácido nucleico permanezca fijado al soporte durante y después de la hibridación. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen vidrio, nylon u otro tipo de membranas, filtros y microplacas.

El ADN amplificado puede unirse con un sustrato sólido en las diversas formas de la presente invención por un método adecuado conocido en la técnica, incluyendo adsorción pasiva o enlace covalente. Por ejemplo, el ADN amplificado puede unirse con un sustrato de vidrio mediante adsorción pasiva aplicando muestras puntuales en un portaobjetos de vidrio de microscopio Polysine™ (Menzel-Glaser, Alemania) y procesando el portaobjetos por deshidratación, secado instantáneo, fijación mediante reticulación de UV, y bloqueo químico usando anhídrido succínico. En el caso del enlace covalente, el ADN amplificado puede unirse con un sustrato sólido por un método adecuado conocido en la técnica.

Se prefiere que se una más de un ADN amplificado al sustrato sólido, para producir una matriz de ADN depositados. Dicha matriz puede fabricarse de cualquier manera deseada conocida en la técnica, incluyendo deposición robótica de los ADN amplificados. Los ejemplos de métodos para producir matrices son esencialmente como se describen en las Patentes de Estados Unidos 5.486.452, 5.830.645, 5.807.552, 5.800.992 y 5.445.934.

Puede depositarse cualquier cantidad adecuada de ADN en el sustrato sólido. La cantidad de ácido nucleico depositado puede ser de aproximadamente 0,05 nl a aproximadamente 5,0 nl de una solución de ácido nucleico de una concentración de ácido nucleico de 0,15 - 1 µg/µl. Por ejemplo, para una densidad de 1.000 ADN depositados/cm, la cantidad individual depositada es de aproximadamente 0,2 nl a aproximadamente 2,0 nl de una solución 1 µg/µl. El ADN se proporciona en cualquier disolvente que permita la deposición del ácido nucleico.

La matriz que tiene ADN depositados puede producirse en cualquier disposición. Por ejemplo, el ADN puede localizarse en una parte de la matriz o puede intercalarse entre otros ácidos nucleicos depositados. Se prefiere la regularidad de una matriz bidimensional.

También se prefiere que la matriz incluya diversos ácidos nucleicos de control, tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos aplicados puntualmente de un número de copias conocido para una secuencia genómica o gen expresado particular. Por ejemplo, puede usarse ADN genómico extraído de las líneas celulares con una o más copias de un cromosoma particular, o pueden usarse también los productos de DOP-PCR completos de amplificación de ADN de una única célula.

El número de células para analizar no está particularmente limitado, y puede variar de una única célula (por ejemplo aislada de un embrión) a un gran número de células (por ejemplo aisladas de una biopsia tisular o sangre). Por ejemplo, el método de la presente invención pueden aplicarse a PGD en una única célula aislada de un embrión o un cuerpo polar de un oocito, diagnóstico prenatal de células fetales, o la determinación del cariotipo de células cancerosas u otras células somáticas aisladas de un sujeto por biopsia o aisladas de la sangre.

En el caso del diagnóstico prenatal, por ejemplo, el número de células para analizar tampoco está particularmente limitado, y es preferentemente menor de 500 células, más preferentemente menor de 400 células y más preferentemente menor de 100 células. Un intervalo adecuado es de 50-400 células.

Preferentemente, el ADN amplificado de una o más células con un primer cariotipo es ADN amplificado de 1 a 20 células.

En una forma preferida de la invención, la célula para analizar es una célula individual o un número pequeño de células, que está en el intervalo de 2 a 20 células.

Preferentemente, el número de células de las que va a extraerse y amplificarse ADN es el mismo o similar entre la célula o células con el primer cariotipo y la célula o células con el segundo cariotipo. Por ejemplo, en el caso de PGD en una única célula de un embrión o el cuerpo polar de un oocito, se usará preferentemente una única célula de otra fuente para la comparación.

Para obtener ADN de la célula para amplificación en las diversas formas de la presente invención, puede usarse un método adecuado conocido en la técnica para lisar la célula y obtener el ADN. Por ejemplo, el tratamiento de una célula con una solución de hidróxido y posterior neutralización lisa la célula y permite que se amplifique directamente el ADN extraído.

Preferentemente la amplificación dará como resultado la amplificación de sustancialmente el ADN extraído completo. En consecuencia, se prefiere que la amplificación del ADN sea amplificación de cebadores aleatorios.

En consecuencia, la amplificación de ADN de una o más células con un primer cariotipo y la amplificación de ADN de una o más células con un segundo cariotipo es preferentemente amplificación con cebadores aleatorios.

La amplificación del ADN de la célula en las diversas formas de la presente invención se realizará con uno o más cebadores apropiados. Como se ha analizado anteriormente, preferentemente el o los cebadores usados darán como resultado la amplificación aleatoria del ADN.

Para amplificar ADN a partir de una o más células, puede después realizarse la amplificación del ADN extraído con uno o más cebadores apropiados por un método adecuado conocido en la técnica, tal como PCR.

Preferentemente, el o los cebadores usados para amplificación son un oligonucleótido que incluye uno o más nucleótidos de secuencia aleatoria. Más preferentemente, el o los cebadores son un oligonucleótido que incluye uno o más nucleótidos contiguos de secuencia aleatoria. Más preferentemente, el o los cebadores son un oligonucleótido que incluye seis o más nucleótidos contiguos de secuencia aleatoria, tales como un cebador DOP (cebador oligonucleotídico degradado). Más preferentemente, el o los cebadores son un cebador con la siguiente secuencia de nucleótidos:

5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3';

donde NNNNNN representa la secuencia degradada. "N" es cualquier nucleótido es decir N representa los cuatro posibles nucleótidos en la secuencia de ADN: "A", "T", "C" y "G" para Adenina, Timina, Citosina y Guanina, respectivamente. Como tales, las secuencias de sondas degradadas contienen mezclas de diversas sondas incluyendo todas las posibles combinaciones de A, T, C y G en las posiciones "N".

Si se desea, la secuencia de nucleótidos de la secuencia degradada también puede desviarse hacia una composición de nucleótidos particular, por ejemplo riqueza en GC o AT.

En el caso de amplificación usando cebadores DOP, la amplificación puede realizarse esencialmente como se describe en Telenius *et al.* (1992) Genomics 18: 718-725 (1982). Brevemente, la amplificación se realiza en condiciones de baja rigurosidad durante un número bajo de ciclos (por ejemplo cinco ciclos) y se realiza una amplificación de segundo estudio en condiciones más rigurosas durante un número mayor de ciclos (por ejemplo 35 ciclos).

Como alternativa, puede conseguirse amplificación con cebadores aleatorios usando uno o más cebadores de secuencia fija y realizando un número bajo de ciclos de amplificación en condiciones de baja rigurosidad que permitan que el o los cebadores inicien la síntesis aleatoriamente a lo largo de la diana, seguido de una amplificación de segundo estadio realizada en condiciones más rigurosas durante un mayor número de ciclos.

Otras técnicas adecuadas para amplificación del ADN extraído incluyen PCR de preamplificación de extensión de cebadores (PEP-PCR) que puede realizarse esencialmente como se describe en Zhang *et al.* (1992) Proc Natl. Acad. Sci 89: 5847-5851; PCR mediada por ligamiento, que puede realizarse esencialmente como se describe en Klein *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 4494-4499; o alu-PCR, que puede realizarse esencialmente como en Nelson *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 6686-6690).

La amplificación puede realizarse en condiciones adecuadas conocidas en la técnica. Por ejemplo, para amplificación por PCR de ADN genómico aislado de una única célula linfocítica aislada de sangre, puede conseguirse lisis de la célula individual por tratamiento con un tampón de lisis (KOH 200 mM, ditiotritol 50 mM) durante 10 minutos a 65 °C seguido de neutralización con KCl 300 mM, Tris-HCl 900 mM, pH 8,3, HCl 200 mM. A la solución lisada y neutralizada puede añadirse un tampón de PCR apropiado, Taq polimerasa y realizarse amplificación usando una etapa de desnaturalización inicial de 95 °C durante 5 minutos y posteriormente condiciones de ciclo de 8 ciclos de amplificación de baja rigurosidad de 94 °C durante 1 minuto, 30 °C durante 1,5 minutos, 72 °C durante 3 minutos con un desnivel de 1 °C por cada 4 segundos para temperatura creciente de 30 °C a 72 °C, seguido de 26 ciclos de amplificación de alta rigurosidad de 94 °C durante 1 minuto, 62 °C durante 1 minuto, 72 °C durante 3 minutos con una adición de 14 segundos por ciclo a la etapa de extensión. Puede realizarse después una etapa de extensión de 72 °C durante 10 minutos para completar la amplificación.

Preferentemente, el ADN extraído de la o las células con el primer cariotipo y el ADN extraído de la o las células con el segundo cariotipo se amplifican con los mismos cebadores, y preferentemente también en las mismas

condiciones. De esta manera, la calidad y cantidad de los productos de extensión resultantes de la reacción de amplificación son comparables.

Preferentemente, el ADN amplificado de una o más células con un primer cariotipo y el ADN amplificado de una o más células con un segundo cariotipo están ambos desprovistos de secuencias repetitivas. Los métodos para agotar el ADN amplificado de células son como se ha descrito previamente en relación con el agotamiento de secuencias repetitivas de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado.

Preferentemente las secuencias repetitivas son secuencias de Cot-1.

También puede desearse comparar una región cromosómica o gen específico en la célula con un primer cariotipo con la misma región o gen en la célula con un segundo cariotipo.

Por lo tanto, puede añadirse un cebador específico o el conjunto de cebadores específicos a los otros cebadores que están presentes en la mezcla de reacción. Como alternativa, el cebador específico o el conjunto de cebadores específicos pueden usarse como los únicos cebadores para amplificar el ADN extraído.

Son ejemplos de cebadores que pueden usarse cebadores que amplifican una región específica de un cromosoma, cebadores para cromosomas pequeños (por ejemplo cromosomas 21 y 22). En dicho caso, puede ser preferible añadir dichos cebadores a un conjunto de cebadores que amplifican aleatoriamente el ADN genómico, por ejemplo cebadores DOP.

En la situación donde se desee amplificar una región cromosómica específica, un locus específico o uno o más genes específicos, pueden usarse cebadores para la región particular solos o en combinación con otros cebadores, tales como cebadores DOP para amplificar aleatoriamente ADN genómico. Por ejemplo, pueden amplificarse regiones cromosómicas incluyendo las regiones implicadas en enfermedades tales como talasemia, distrofia muscular de Duchenne, trastornos ligados a X y Hemofilia para análisis de anomalías cromosómicas. Se apreciará a este respecto que el método de la presente invención es útil para la detección de anomalías cromosómicas importantes tales como deleciones y multiplicaciones, y es necesario que los loci específicos que se amplifican porten dichas anomalías para permitir su detección por el método de la presente invención.

Los cebadores apropiados adecuados para amplificación de regiones cromosómicas específicas pueden identificarse de la secuencia de nucleótidos conocida. En el caso de la amplificación de regiones cromosómicas específicas en seres humanos, los cebadores apropiados pueden seleccionarse por consideración de la base de datos de secuencias de nucleótidos Celera comercial o la base de datos de secuencias de nucleótidos públicamente accesible disponible del NCBI.

Por ejemplo, el exón 11 del gen de la fibrosis quística (CFTR) puede amplificarse usando un enfoque de PCR anidada. Para el primer ciclo, pueden usarse los siguientes cebadores:

5'-TGAAATAATGGAGATGCAATGTTC-3'; y
5' GCACAGATTCTGAGTAACCATAAT3'

Para el segundo ciclo, pueden usarse los siguientes cebadores:

5'-CAACTGTGGTAAAGCAATAGTGT-3'; y
5'-TACCAAATCTGGATACTATACCAT-3'

Las condiciones de amplificación adecuadas para el primer ciclo incluyen 1/10 de la mezcla de DOP-PCR de la amplificación del ADN de una única célula, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, 100 µM de cada dNTP, MgCl₂ 2,5 mM y 1U de Taq polimerasa, usando las siguientes condiciones en una máquina de PCR MJ Researcher PTC-100 con capota caliente: colocar los tubos de reacción en un bloque a 96 °C y realizar la etapa de desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 minutos, condiciones de ciclo de 94 °C durante 30 segundos, 62 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 45 segundos, durante 30 ciclos. La PCR del segundo ciclo consiste en 3 µl de los productos de amplificación de la PCR de primer ciclo, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, 100 µM de cada dNTP, MgCl₂ 2,5 mM y 1U de Taq polimerasa. Las condiciones de ciclo usan una máquina de PCR MJ Researcher PTC-100 con capota caliente: y las condiciones de ciclo de 94 °C durante 30 segundos, 52 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 45 segundos, durante 30 ciclos. Después de la amplificación, los productos pueden secuenciarse esencialmente como se describe en Hussey *et al.* (2002) Mol. Hum. Reprod. 8: 1136-1143.

El marcaje del ADN genómico amplificado en las diversas formas de la presente invención con un marcador adecuado puede realizarse por un método adecuado conocido en la técnica. El marcaje puede producirse después de la amplificación o, como alternativa, puede producirse durante o como parte de la amplificación inicial.

Por ejemplo, el marcaje directo del ADN genómico amplificado descrito anteriormente puede realizarse por ciclos adicionales de PCR que incorporan un resto fluorescente unido con un nucleótido para incorporar. También se

conocen en la técnica otros métodos de marcaje indirecto. Como alternativa, el ADN amplificado puede marcarse sometiéndolo al ADN a traslación de muesca con un nucleótido marcado, esencialmente como se describe en Kirchhoff *et al.* (1998). Cytometry 31: 163-173.

El ADN amplificado de una o más células con un primer cariotipo se marcará con un primer marcador, y el ADN amplificado de una o más células con un segundo cariotipo se marcará con un segundo marcador que es detectablemente diferente del primer marcador. Los ejemplos de marcadores detectablemente diferentes para incorporación en ADN incluyen SpectrumGreen-dUTP y SpectrumRed-dUTP (ambos de Vysis), o Cy3-dUTP y Cy5-dUTP.

Para la hibridación de los ADN genómicos amplificados y marcados con el ADN unido al sustrato sólido en las diversas formas de la presente invención, es preferible que las secuencias repetitivas, secuencias no cromosómicas o secuencias sobrerrepresentadas debido a la amplificación, no dominen de la señal, y que puedan agotarse del grupo o que su capacidad para hibridar se suprima según sea necesario.

Dichas secuencias pueden agotarse bien antes de la amplificación o bien después de la amplificación. Por ejemplo, puede extraerse ADN genómico y agotarse secuencias repetitivas, secuencias no cromosómicas o secuencias sobrerrepresentadas debido a la amplificación. Como alternativa, el ADN genómico puede amplificarse en primer lugar con cebadores apropiados y después agotarse estas secuencias del grupo amplificado de ácidos nucleicos.

Pueden usarse varios métodos conocidos en la técnica para retirar dichas secuencias y/o desactivar la capacidad de hibridación de dichas secuencias.

Por ejemplo, en muchos genomas, tales como el genoma humano, una parte importante del ADN repetitivo está contenido en algunas familias de secuencias altamente repetidas tales como Alu. Para retirar dichas secuencias repetitivas, puede usarse un procedimiento de bloqueo. Estos métodos aprovechan principalmente el hecho de que la tasa de hibridación de cadenas de ácido nucleico complementarias aumenta a medida que aumenta su concentración. Por lo tanto, si una mezcla de fragmentos de ácido nucleico se desnaturaliza e incuba en condiciones que permitan la hibridación, las secuencias presentes a alta concentración se harán bicatenarias más rápidamente que las otras. El ácido nucleico bicatenario puede después retirarse y usarse el resto en la hibridación. Se describe un método de bloqueo en general en el contexto del análisis de Southern por Sealy *et al.*, "Removal of Repeat Sequences from Hybridization Probes", Nucleic Acid Research 13: 1905 (1985).

Los ejemplos de dichas secuencias que pueden usarse para agotar el ADN amplificado de secuencias repetitivas incluyen ADN de Cot-1 humano y ADN que contiene repeticiones de Alu.

Pueden agotarse secuencias repetitivas por la retirada directa de estas secuencias por un método conocido en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos mono y bicatenarios tienen diferentes características de unión con hidroxipatita. Dichas características proporcionan una base usada habitualmente para fraccionar ácidos nucleicos. La fracción de ADN genómico que contiene secuencias con un grado particular de repetición puede obtenerse desnaturalizando ADN genómico, permitiendo que se reasocie en condiciones apropiadas, seguido de separación usando hidroxipatita. Dichas técnicas son como se describe en Britten *et al.*, "Analysis of Repeating DNA Sequences by Reassociation" Methods in Enzymology 22: 363-418 (1974).

Como alternativa, puede realizarse la reacción con ácido nucleico inmovilizado. Por ejemplo, se une ADN genómico humano mínimamente cortado con celulosa de diazonio o un soporte similar. El ADN genómico amplificado, cortado apropiadamente en fragmentos, se hibrida frente al ADN inmovilizado hasta valores de Cot en un intervalo de aproximadamente 1 a 100.

Pueden retirarse secuencias no cromosómicas o secuencias sobrerrepresentadas por métodos similares a los descritos anteriormente. Se usan secuencias de vector y/o contaminantes para agotar el ADN de las secuencias en el caso de secuencias no cromosómicas, y se usan secuencias sobrerrepresentadas para agotar el ADN en el segundo caso.

Las secuencias sobrerrepresentadas y repetitivas pueden agotarse juntas amplificando ADN de la o las células y usando una fuente de secuencias repetitivas amplificadas con los mismos cebadores usados para amplificar el ADN de la o las células. El ácido nucleico repetitivo amplificado puede usarse después en la reacción de hibridación. Por ejemplo, puede realizarse DOP-PCR en ADN de Cot-1, y los productos de amplificación resultantes usarse para agotar el ADN amplificado de la o las células de secuencias sobrerrepresentadas y secuencias repetitivas.

Puede realizarse hibridación del ADN amplificado y marcado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido en las diversas formas de la presente invención por un método adecuado conocido en la técnica. La hibridación del ADN amplificado de la o las células con el primer cariotipo con el ADN unido al sustrato sólido, y la hibridación de ADN amplificado de la o las células con el segundo cariotipo con el ADN unido al sustrato sólido, pueden realizarse simultánea o secuencialmente.

El ADN se hibrida con ADN unido al sustrato sólido en condiciones apropiadas. Las condiciones de hibridación incluyen elección del tampón, desnaturalizante, tal como formamida, aditivos salinos y acelerante. El tampón tendrá preferentemente un pH de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,2, un contenido salino de aproximadamente 1,5X de SSC a aproximadamente 2,5X de SSC, y un contenido de formamida de aproximadamente 40-50 %. Las condiciones adecuadas pueden incluir una temperatura de aproximadamente 40 a aproximadamente 80 grados centígrados durante un tiempo suficiente para detectar la señal sobre el fondo tanto para genómica como expresión de aproximadamente 1 a aproximadamente 72 horas, preferentemente 12-24 horas. Pueden usarse si se desea aceleradores de hibridación, tales como dextran sulfato. El lavado posthibridación es preferentemente a una rigurosidad mayor que la de la hibridación.

Se prefiere que durante la hibridación se añada también un exceso de ADN de secuencia repetida humano no marcado, tal como ADN de Cot-1. El uso de ADN de secuencia repetida no marcado en la mezcla de hibridación es generalmente en cantidades de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5,0 µg por ng de ADN genómico marcado total.

La hibridación puede realizarse en cualquier aparato adecuado que mantenga el ADN amplificado y marcado en contacto con el ADN unido al soporte sólido.

Después de la hibridación, se detecta la intensidad de fluorescencia para cada marcador y se determina por cualquier aparato detector o lector y método adecuados. Se conocen en la técnica detectores de exploración de barrido basados en láser.

El aparato de captura de imágenes y el método en las diversas formas de la presente invención pueden emplear algoritmos de procesamiento de imágenes digitales usados en un ordenador programado para análisis de datos, almacenamiento y presentación de datos de imágenes digitales del aparato de captura de imágenes. Puede usarse cualquier software de procesamiento de imágenes digitales, almacenamiento de datos y presentación adecuado para el análisis de los resultados de hibridación.

Los datos fluorescentes en cada elemento diana pueden compararse automáticamente para producir la relación entre los marcadores detectablemente diferentes usados.

La comparación de la cantidad relativa del primer y segundo marcadores hibridados con el ADN amplificado unido al sustrato sólido puede usarse para detectar si la célula con el primer cariotipo tiene el mismo cariotipo en una posición cromosómica particular que la célula con el segundo cariotipo o, como alternativa, si la célula con el primer cariotipo tiene un cariotipo diferente en una posición cromosómica particular que la célula con el segundo cariotipo.

Para que la célula con el primer cariotipo tenga el mismo cariotipo que una célula con el segundo cariotipo en una localización cromosómica particular preferentemente la relación del primer (por ejemplo verde) y segundo (por ejemplo rojo) marcadores hibridados con el ADN amplificado estará en el intervalo de 0,80 (es decir relación de rojo/verde) para un autosoma o 0,75 (es decir relación de rojo/verde) para un cromosoma sexual hasta 1,20 (es decir relación de rojo/verde) para un autosoma o 1,25 (es decir relación de rojo/verde) para un cromosoma sexual.

Como alternativa, para que la célula con el primer cariotipo sea deficiente en una copia de una región de un cromosoma en comparación con la célula con el segundo cariotipo en una localización cromosómica particular, preferentemente la relación del primer (por ejemplo verde) y segundo (por ejemplo rojo) marcadores hibridados con el ADN amplificado será de 1,20 (es decir relación de rojo/verde) para un autosoma o mayor de 1,25 (es decir relación de rojo/verde) para un cromosoma sexual. Por el contrario, para que la célula con el primer cariotipo tenga una copia adicional de una región de un cromosoma en comparación con la célula con el segundo cariotipo en una localización cromosómica particular, preferentemente la relación del primer (por ejemplo verde) y segundo (por ejemplo rojo) marcadores hibridados con el ADN amplificado será menor de 0,80 (es decir relación de rojo/verde) para un autosoma o menor de 0,75 (es decir relación de rojo/verde) para un cromosoma sexual.

También se describe en el presente documento un método para detectar una anomalía cromosómica en una célula con un cariotipo desconocido, incluyendo el método las etapas de:

- (a) amplificar ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- (b) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
- (c) amplificar el ADN de una o más células con un cariotipo desconocido y amplificar ADN de una o más células con un cariotipo de referencia;
- (d) marcar el ADN amplificado de la o las células con un cariotipo desconocido con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de la o las células con un cariotipo de referencia con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
- (e) hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo desconocido con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo de referencia con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- (f) detectar la presencia de una anomalía cromosómica en la célula con el cariotipo desconocido comparando la

cantidad relativa del primer marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido con la cantidad de segundo marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido.

5 La anomalía cromosómica puede ser cualquier cambio o alteración en un cromosoma que pueda detectarse por un método utilizando hibridación genómica comparativa. Los ejemplos de anomalías cromosómicas que pueden detectarse por esta forma de la presente invención incluyen cromosomas individuales extra o ausentes, partes extra o ausentes de un cromosoma, roturas y reordenaciones cromosómicas tales como translocaciones, dicéntricos, inversiones, inserciones, amplificaciones y deleciones.

10 Preferentemente, el método se usa para diagnóstico preimplantación de un embrión o un oocito, o para el diagnóstico prenatal de un feto con respecto a una anomalía cromosómica.

15 En el caso de un cromosoma aislado, preferentemente el cromosoma se aísla por microdissección o citometría de flujo. En el caso de parte de un cromosoma aislado, preferentemente la parte de un cromosoma aislado es un fragmento clonado de un cromosoma. Preferentemente, el ADN de una parte de un cromosoma aislado, o el ADN amplificado de parte de un cromosoma aislado, se desprovee de secuencias no cromosómicas.

20 Preferentemente, la amplificación de ADN de un cromosoma aislado o una parte de un cromosoma aislado es amplificación con cebadores aleatorios. Más preferentemente, la amplificación con cebadores aleatorios incluye el uso de un cebador oligonucleotídico degradado. Más preferentemente, el cebador oligonucleotídico degradado consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3', en la que N es cualquier nucleótido.

25 Preferentemente, el ADN amplificado de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado se desprovee de secuencias repetitivas y/o secuencias que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación del ADN.

Preferentemente, las secuencias repetitivas son secuencias de Cot-1.

30 Preferentemente, el ADN amplificado de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado se selecciona por tamaño antes de unirse al sustrato sólido. Más preferentemente, el ADN amplificado de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado se selecciona por tamaño para ADN de un tamaño de menos de 10 kb. Más preferentemente, el ADN amplificado del cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado se selecciona por tamaño para ADN de un tamaño de menos de 3 kb.

35 Preferentemente, la amplificación de ADN de una o más células con un cariotipo desconocido y la amplificación de ADN de una o más células con un cariotipo de referencia es amplificación de ADN con cebadores aleatorios. Más preferentemente, la amplificación incluye el uso de un cebador oligonucleotídico degradado. Más preferentemente, el cebador oligonucleotídico degradado consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3', donde N es cualquier nucleótido.

40 Preferentemente, el ADN amplificado de una o más células con un cariotipo desconocido y el ADN amplificado de una o más células con un cariotipo de referencia están ambos desprovistos de secuencias repetitivas.

Preferentemente, las secuencias repetitivas son secuencias de Cot-1.

45 La célula con el cariotipo desconocido puede ser cualquier célula para la que se vaya a explorar la presencia de una anomalía cromosómica. Los ejemplos de anomalías cromosómicas que pueden ser susceptibles de detección por la presente invención incluyen Trisomía del 21, 13 y 18 y la detección de cromosomas ausentes, tal como sucede en el síndrome de Turner (45, XO).

50 La anomalía cromosómica puede asociarse con cualquier cromosoma presente en una célula de cualquier ploidía (haploide, diploide o poliploide), incluyendo un cromosoma sexual, un autosoma, un cromosoma mitocondrial, un cromosoma de cloroplasto o un episoma. Preferentemente, la anomalía cromosómica está presente en un cromosoma sexual o un autosoma. Más preferentemente, la anomalía cromosómica está presente en un autosoma.

55 La célula con el cariotipo desconocido puede ser una célula eucariota o una procariota. Preferentemente, la célula es una célula eucariota. Más preferentemente, la célula es una célula animal o humana. Más preferentemente, la célula es una célula humana.

60 Preferentemente, la célula con el cariotipo desconocido es una célula fetal, una célula derivada de un embrión (incluyendo un blastómero), una célula germinal, una célula cancerosa o cualquier otro tipo de célula somática con una anomalía cromosómica para explorar. Más preferentemente la célula con el cariotipo desconocido es una célula fetal, una célula embrionaria o célula germinal. Más preferentemente, la célula con el cariotipo desconocido es una célula embrionaria o una célula germinal.

65

También se describe en el presente documento un método para detectar una anomalía cromosómica en un embrión o una célula germinal, incluyendo el método las etapas de:

- 5 (a) amplificar ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- (b) unir ADN amplificado con un sustrato sólido;
- (c) aislar una célula de un embrión o una célula germinal;
- (d) amplificar el ADN de la célula aislada de un embrión o célula germinal;
- (e) amplificar ADN de una o más células con un cariotipo de referencia;
- 10 (f) marcar el ADN amplificado de la célula aislada de un embrión o célula germinal con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de la o las células con un cariotipo de referencia con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
- (g) hibridar el ADN amplificado y marcado de la célula aislada de un embrión o célula germinal con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo de referencia con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- 15 (h) detectar la presencia de una anomalía cromosómica en el embrión o la célula germinal comparando la cantidad relativa del primer marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido con la cantidad del segundo marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido.

20 Al detectar una anomalía cromosómica, un gran número de células pueden no estar necesariamente asociadas con una determinación más precisa de la presencia de una anomalía cromosómica particular, y en algunos casos puede ser preferible que se aisle una única célula o una cantidad relativamente pequeña de células.

También se describe en el presente documento un método para detectar una anomalía cromosómica en una única célula con un cariotipo desconocido, incluyendo el método las etapas de:

- 25 (a) amplificar aleatoriamente ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- (b) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
- (c) amplificar aleatoriamente ADN de una única célula con un cariotipo desconocido y amplificar ADN de una o más células con un cariotipo de referencia;
- 30 (d) marcar el ADN amplificado de la célula individual con un cariotipo desconocido con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de una o más células con un cariotipo de referencia con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
- (e) hibridar el ADN amplificado y marcado de la célula individual con un cariotipo desconocido con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo de referencia con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- 35 (f) detectar la presencia de una anomalía cromosómica en la célula individual con el cariotipo desconocido comparando la cantidad relativa del primer marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido con la cantidad de un segundo marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido.

40 La célula con el cariotipo de referencia puede ser cualquier célula para la que vaya a compararse el cariotipo de la célula con el cariotipo desconocido. Preferentemente, la célula con el cariotipo de referencia es de la misma especie que la célula con el cariotipo desconocido y también del mismo tipo o un tipo similar que la célula con el cariotipo desconocido.

45 Preferentemente, la o las células con un cariotipo de referencia es una célula del mismo tipo que la o las células con un cariotipo desconocido.

El número de células para analizar no está particularmente limitado, y puede variar de una única célula (por ejemplo aislada de un embrión) a un gran número de células (por ejemplo aisladas de una biopsia tisular o sangre). Por ejemplo, el método puede aplicarse a PGD en una única célula aislada de un embrión o un cuerpo polar de un oocito, diagnóstico prenatal de células fetales, o la determinación de la presencia de una anomalía cromosómica en células cancerosas u otras células somáticas aisladas de un sujeto por biopsia o aisladas de la sangre.

55 En el caso del diagnóstico prenatal, por ejemplo, el número de células para analizar tampoco está particularmente limitado, y es preferentemente menor de 500 células, más preferentemente menor de 400 células y más preferentemente menor de 100 células. Un intervalo adecuado es de 50-400 células.

60 Preferentemente, el ADN amplificado de una o más células con un cariotipo desconocido es ADN amplificado de una a 20 células. En una forma preferida de la invención, la célula para analizar es una célula individual o un número pequeño de células, que están en el intervalo de 2 a 20 células.

65 Preferentemente, el número de células del que se extrae y se amplifica ADN es el mismo o similar entre la célula o células con el cariotipo desconocido y la célula o células con el cariotipo de referencia. Por ejemplo, en el caso de PGD en una única célula de un embrión o el cuerpo polar de un oocito, se usará preferentemente una única célula de otra fuente para la comparación.

En una realización, también se puede desear detectar una anomalía cromosómica específica en la célula con un cariotipo desconocido con la misma región en una célula con un cariotipo de referencia. De esta forma, puede añadirse un cebador específico o un conjunto de cebadores específicos con los ADN extraídos tanto de la célula con el cariotipo desconocido como de la célula con la región de referencia.

El cebador específico o el conjunto de cebadores específicos puede añadirse a otros cebadores que están presentes en la mezcla de reacción para los fines de, por ejemplo, amplificar aleatoriamente el ADN genómico extraído. Como alternativa, el cebador específico o el conjunto de cebadores específicos pueden usarse como los únicos cebadores para amplificar el ADN extraído.

Son ejemplos de cebadores que pueden usarse para detectar una anomalía cromosómica en una región específica cebadores que amplifican una región específica de un cromosoma pequeño (por ejemplo cromosomas 21 y 22). En dicho caso, puede ser preferible añadir dichos cebadores a un conjunto de cebadores que amplifican aleatoriamente el ADN genómico, tales como cebadores DOP.

En la situación en la que se desea amplificar una región cromosómica específica, un locus específico, o uno o más genes específicos asociados con una anomalía cromosómica, pueden usarse cebadores para la región particular solamente o en combinación con otros cebadores, tales como cebadores DOP para amplificar aleatoriamente ADN genómico. Por ejemplo, pueden amplificarse regiones cromosómicas incluyendo las regiones implicadas en enfermedades tales como talasemia, distrofia muscular de Duchenne, trastornos ligados a X y Hemofilia para análisis de anomalías cromosómicas. Se apreciará a este respecto que el método de la presente invención es útil para la detección de anomalías cromosómicas importantes tales como deleciones y duplicaciones, y será necesario que los loci específicos que se amplifican porten dichas anomalías para permitir su detección por el método descrito en el presente documento.

Por lo tanto, la amplificación de ADN de una o más células con un cariotipo desconocido y la amplificación de ADN de una o más células con un cariotipo de referencia también puede incluir la amplificación de la misma región cromosómica específica.

El ADN amplificado de la o las células con el cariotipo desconocido se marcará con un primer marcador, y el ADN amplificado de la o las células con el cariotipo de referencia se marcará con un segundo marcador que es detectablemente diferente del primer marcador. Los ejemplos de marcadores detectablemente diferentes para incorporación en ADN incluyen SpectrumGreen-dUTP y SpectrumRed-dUTP (ambos de Vysis), o Cy3-dUTP y Cy5-dUTP.

La comparación de la cantidad relativa del primer y segundo marcadores hibridados con el ADN amplificado unidos al sustrato sólido puede usarse para detectar si la célula con el cariotipo desconocido tiene una anomalía cromosómica en una posición cromosómica particular como la célula con el cariotipo de referencia.

Para la detección de una deficiencia en una copia de una región de un cromosoma, preferentemente la relación del primer (por ejemplo verde) y segundo (por ejemplo rojo) marcadores hibridados con el ADN amplificado será mayor de 1,20 (es decir relación de rojo/verde) para un autosoma o mayor de 1,25 (es decir relación de rojo/verde) para un cromosoma sexual. Por el contrario, para la detección de una copia adicional de una región de un cromosoma, preferentemente la relación del primer (por ejemplo verde) y segundo (por ejemplo rojo) marcadores hibridados con el ADN amplificado será menor de 0,80 (es decir relación de rojo/verde) para un autosoma o menor de 0,75 (es decir relación de rojo/verde) para un cromosoma sexual.

También se describe en el presente documento un método de diagnóstico genético preimplantación de un embrión, incluyendo el método las etapas de:

- (a) amplificar aleatoriamente ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- (b) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
- (c) amplificar aleatoriamente ADN de una célula de una o más células embrionarias con un cariotipo desconocido y amplificar ADN de una o más células con un cariotipo de referencia;
- (d) marcar el ADN amplificado de la o las células embrionarias con un cariotipo desconocido con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de una o más células con un cariotipo de referencia con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
- (e) hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo desconocido con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo de referencia con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- (f) detectar la presencia de una anomalía cromosómica en el embrión con el cariotipo desconocido comparando la cantidad relativa del primer marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido con la cantidad de un segundo marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- (g) determinar la idoneidad del embrión o el oocito para implantación por la ausencia de una anomalía cromosómica en la o las células embrionarias.

También se describe en el presente documento un método de diagnóstico genético preimplantación de un oocito, incluyendo el método las etapas de:

- 5 (a) amplificar aleatoriamente ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- (b) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
- (c) amplificar aleatoriamente ADN de un cuerpo polar de un oocito con un cariotipo desconocido y amplificar ADN de una o más células con un cariotipo de referencia;
- (d) marcar el ADN amplificado del cuerpo polar de un oocito con un cariotipo desconocido con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de una o más células con un cariotipo de referencia con un segundo
- 10 marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
- (e) hibridar el ADN amplificado y marcado del cuerpo polar de un oocito con un cariotipo desconocido con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo de referencia con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- (f) detectar la presencia de una anomalía cromosómica en el cuerpo polar de un oocito con el cariotipo
- 15 desconocido comparando la cantidad relativa del primer marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido con la cantidad de un segundo marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- (g) determinar la idoneidad del oocito para implantación por la ausencia de una anomalía cromosómica en el cuerpo polar del oocito.

20 También se describe en el presente documento un método de diagnóstico prenatal de un feto para una anomalía cromosómica, incluyendo el método las etapas de:

- (a) amplificar aleatoriamente ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
- 25 (b) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
- (c) amplificar aleatoriamente ADN de una o más células fetales con un cariotipo desconocido y amplificar ADN de una o más células con un cariotipo de referencia;
- (d) marcar el ADN amplificado de la o las células fetales con un cariotipo desconocido con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de una o más células con un cariotipo de referencia con un segundo marcador, donde
- 30 el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
- (e) hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células fetales con un cariotipo desconocido con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo de referencia con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
- (f) determinar la presencia de una anomalía cromosómica en el feto comparando la cantidad relativa del primer
- 35 marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido con la cantidad de un segundo marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido.

También se describe en el presente documento un ácido nucleico unido a un sustrato sólido, donde el ácido nucleico deriva de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado y el ácido nucleico está desprovisto de

40 secuencias repetitivas.

El ácido nucleico unido a un sustrato sólido es útil no solamente para hibridación genómica comparativa sino que también es útil como una diana para detectar ácidos nucleicos en cualquier sistema basado en hibridación.

45 En el caso de un cromosoma aislado, preferentemente el cromosoma se aísla por microdissección o citometría de flujo.

En el caso de parte de un cromosoma aislado, preferentemente la parte de un cromosoma se aísla por microdissección o citometría de flujo, o es un fragmento clonado de un cromosoma.

50 El ácido nucleico unido al sustrato sólido puede ser cualquier ácido nucleico que derive de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado. El ácido nucleico puede derivar directamente del cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado. Por ejemplo, el ADN de uno o más cromosomas aislados puede estar desprovisto de secuencias repetitivas y directamente unido a un sustrato sólido, o el ADN de uno o más clones que contienen ADN

55 genómico puede estar desprovisto de secuencias repetitivas y directamente unido al sustrato sólido.

Como alternativa, el ácido nucleico unido al sustrato sólido puede ser el producto de la amplificación de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado.

60 Preferentemente, el ácido nucleico unido al sustrato sólido es el producto de amplificación del ADN de un cromosoma aislado o parte del mismo. Una vez más, las secuencias repetitivas pueden agotarse del ADN antes de la amplificación o, como alternativa, después de la amplificación.

65 En el caso de la amplificación del ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado, preferentemente la amplificación dará como resultado la amplificación de sustancialmente la diana completa. En consecuencia, se prefiere que la amplificación del cromosoma aislado o una parte del cromosoma aislado sea amplificación por

cebadores aleatorios.

También se describe en el presente documento un ácido nucleico unido a un sustrato sólido, derivando el ácido nucleico de la amplificación por cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado, donde el ácido nucleico está desprovisto de secuencias repetitivas.

La amplificación del ADN de un cromosoma aislado o parte del cromosoma aislado se realizará con uno o más cebadores apropiados. Como se ha analizado anteriormente, preferentemente el o los cebadores usados darán como resultado la amplificación aleatoria del ADN del cromosoma aislado o parte del cromosoma aislado.

Preferentemente, el o los cebadores usados son un oligonucleótido que incluye uno o más nucleótidos de secuencia aleatoria. Más preferentemente, el o los cebadores son un oligonucleótido que incluye uno o más nucleótidos contiguos de secuencia aleatoria. Más preferentemente, el o los cebadores son un oligonucleótido que incluye seis o más nucleótidos contiguos de secuencia aleatoria, tal como un cebador DOP (cebador oligonucleotídico degradado). Más preferentemente, el o los cebadores son un cebador con la siguiente secuencia de nucleótidos:

5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3';

donde NNNNNN representa la secuencia degradada. "N" es cualquier nucleótido, es decir N representa los cuatro nucleótidos posibles en la secuencia de ADN: "A", "T", "C" y "G" para Adenina, Timina, Citosina y Guanina, respectivamente. Como tal, la secuencia degradada contiene mezclas de diversas secuencias de nucleótidos incluyendo todas las posibles combinaciones de A, T, C y G en las posiciones "N".

Si se desea, la secuencia de nucleótidos de la secuencia degradada también puede desviarse hacia una composición de nucleótidos particular, por ejemplo riqueza en GC o AT.

En el caso de la amplificación usando cebadores DOP en un cromosoma aislado, o una parte de un cromosoma aislado por microdissección, la amplificación puede realizarse esencialmente como se describe en Telenius *et al.* (1992) Genomics 18: 718-725. Brevemente, la amplificación se realiza en condiciones de baja rigurosidad durante un número bajo de ciclos (por ejemplo, cinco ciclos) y se realiza una amplificación de segundo estadio en condiciones más rigurosas durante un número mayor de ciclos (por ejemplo 35 ciclos).

Como alternativa, puede conseguirse amplificación con cebadores aleatorios usando uno o más cebadores de secuencia fija y realizando un número bajo de ciclos de amplificación en condiciones de baja rigurosidad que permiten que el o los cebadores inicien la síntesis aleatoriamente a lo largo de la diana, seguido de una amplificación de segundo estadio realizada en condiciones más rigurosas durante un mayor número de ciclos.

Además, para compensar las regiones de cromosomas pequeños que pueden presentar una dificultad en la consecución de la amplificación con cebadores aleatorios, pueden usarse cebadores específicos de región junto con otros cebadores que permitan la amplificación aleatoria. Por ejemplo, pueden usarse cebadores para regiones específicas de los cromosomas 21 y 22 junto con cebadores DOP.

Otras técnicas adecuadas para amplificación del cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado incluyen PCR preamplificación de extensión de cebadores (PEP-PCR) que puede realizarse esencialmente como se describe en Zhang *et al.* (1992) Proc Natl. Acad. Sci 89: 5847-5851; PCR mediada por ligamiento, que puede realizarse esencialmente como se describe en Klein *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 4494-4499; o alu-PCR, que puede realizarse esencialmente como en Nelson *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 6686-6690.

En el caso del uso de amplificación por círculo rodante en un inserto genómico clonado en un vector circular, puede realizarse amplificación de círculo rodante usando condiciones adecuadas conocidas en la técnica, tales como las descritas en Fire, A. y Xu, S-Q. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci 92: 4641-4645.

Pueden usarse varios métodos conocidos en la técnica para desproveer al ADN amplificado de secuencias repetitivas.

Como se ha analizado previamente, las secuencias repetitivas pueden retirarse antes de la amplificación o después de la amplificación. Por ejemplo, puede aislarse ADN cromosómico y retirarse secuencias repetitivas. Como alternativa, el ADN puede amplificarse en primer lugar con cebadores apropiados y las secuencias de ADN repetitivas retirarse del grupo amplificado de ácidos nucleicos.

Los ejemplos de secuencias repetitivas incluyen ADN repetido sencillo (por ejemplo elementos Alu o Kpn), repeticiones satélite, repeticiones mini satélite, repeticiones específicas de cromosoma, repeticiones micro satélite, genes repetidos (por ejemplo, genes de ARNr), secuencias derivadas de elementos transponibles (por ejemplo transposones con intermedios de ADN o ARN), elementos derivados de copias múltiples de virus tales como retrovirus, repeticiones asociadas con centrómeros o telómeros o repeticiones asociadas con heterocromatina.

Pueden usarse varios métodos conocidos en la técnica para retirar secuencias repetitivas. Por ejemplo, en muchos genomas, tales como el genoma humano, una parte importante del ADN repetitivo está contenida en algunas familias de secuencias altamente repetidas tales como Alu. Para retirar dichas secuencias repetitivas, puede usarse un procedimiento de bloqueo. Estos métodos aprovechan principalmente el hecho de que la tasa de hibridación de cadenas de ácido nucleico complementarias aumenta a medida que aumenta su concentración. Por lo tanto, si se desnaturaliza una mezcla de fragmentos de ácido nucleico y se incuba en condiciones que permitan la hibridación, las secuencias presentes en alta concentración se harán bicatenarias más rápidamente que las otras. El ácido nucleico bicatenario puede retirarse después mediante la retirada directa de estas secuencias por un método conocido en la técnica.

Por ejemplo, los ácidos nucleicos mono y bicatenarios tienen diferentes características de unión con hidroxapatita. Dichas características proporcionan una base usada habitualmente para fraccionar ácidos nucleicos. La fracción de ADN genómico que contiene secuencias con un grado particular de repetición puede obtenerse desnaturalizando ADN genómico, permitiendo que se reasocie en condiciones apropiadas, seguido de separación usando hidroxapatita. Dichas técnicas son como se describe en Britten *et al.*, "Analysis of Repeating DNA Sequences by Reassociation" Methods in Enzymology 22: 363-418 (1974).

Los ejemplos de dichas secuencias que pueden usarse para desproveer al ADN amplificado de secuencias repetitivas incluyen ADN de Cot-1 y ADN que contienen repeticiones de Alu.

Como alternativa, puede realizarse una reacción con ácido nucleico inmovilizado. Por ejemplo, se une ADN genómico humano mínimamente cortado con celulosa de diazonio o un soporte similar. El ADN amplificado, cortado apropiadamente en fragmentos, se hibrida frente al ADN inmovilizado hasta valores de Cot en el intervalo de aproximadamente 1 a 100. El material que no se une con el ácido nucleico inmovilizado puede después unirse al sustrato sólido.

En una realización preferida, el ácido nucleico derivado del cromosoma aislado o parte del mismo para unirse con el sustrato sólido se desprovee adicionalmente de secuencias no cromosómicas.

Las secuencias no cromosómicas son secuencias que no están normalmente presentes en la secuencia de nucleótidos del cromosoma o parte del mismo, tales como secuencias derivadas de un vector o plásmido, o secuencias contaminantes que pueden estar presentes en la muestra originalmente diana para amplificar, tales como secuencias bacterianas (por ejemplo secuencias derivadas de *E. coli*). Las secuencias que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación del cromosoma son secuencias presentes después de la amplificación de la diana que se han amplificado desproporcionadamente en comparación con otras secuencias normalmente presentes en la diana.

Las secuencias no cromosómicas pueden agotarse como se ha descrito previamente. En el caso del agotamiento de secuencias no cromosómicas de ácido nucleico amplificado, pueden agotarse secuencias no cromosómicas usando secuencias no cromosómicas en exceso en una relación de hibridación con la diana o el ADN amplificado, o uniendo las secuencias no cromosómicas con un soporte sólido y usando estas secuencias para desproveer al ADN de estas secuencias.

En otra realización preferida, el ácido nucleico amplificado aleatoriamente derivado del cromosoma aislado o parte del mismo que va a unirse con el sustrato sólido puede desproveerse adicionalmente de secuencias que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación.

En el caso de agotar secuencias sobrerrepresentadas debido a la amplificación, las secuencias diana pueden agotarse de la diana antes de la amplificación por métodos similares descritos anteriormente, o las secuencias amplificadas sobrerrepresentadas pueden agotarse después de la amplificación. Como se apreciará, la identificación de la secuencia real que está sobrerrepresentada es necesaria, y dependerá de los cebadores que se usen y la naturaleza de la diana para amplificar.

Las secuencias sobrerrepresentadas y secuencias repetitivas pueden agotarse juntas amplificando una fuente de secuencias repetitivas con los mismos cebadores usados para amplificar el ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado. El ácido nucleico repetitivo amplificado puede usarse después para desproveer al ADN amplificado de secuencias sobrerrepresentadas y repetitivas. Por ejemplo, puede realizarse DOP-PCR en ADN de Cot-1, y los productos de amplificación resultantes usarse para desproveer al ADN amplificado de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado.

También se describe en el presente documento un ácido nucleico unido a un sustrato sólido, donde el ácido nucleico deriva de amplificación con cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado y el ácido nucleico se desprovee de una o más secuencias repetitivas, secuencias no cromosómicas o secuencias que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación del cromosoma o parte del cromosoma aislado.

El ácido nucleico del cromosoma aislado o parte del cromosoma aislado también puede someterse a selección por tamaño antes de su unión con el sustrato sólido. Preferentemente, el ácido nucleico amplificado unido al sustrato sólido es de menos de 10 kb de tamaño. Más preferentemente, el ácido nucleico amplificado unido al sustrato sólido es de menos de 3 kb de tamaño.

5 La selección por tamaño puede realizarse por un método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico amplificado puede someterse a electroforesis en un gel de agarosa, y pueden aislarse ADN con un tamaño en el intervalo de 150 a 3000 pb.

10 En una forma preferida, el ácido nucleico unido al sustrato sólido es el producto de amplificación con cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado, donde el ácido nucleico se ha seleccionado por tamaño.

15 En este caso, el ácido nucleico amplificado aleatoriamente unido al sustrato sólido es preferentemente menor de 10 kb de tamaño. Más preferentemente, el ácido nucleico amplificado aleatoriamente unido al sustrato sólido es menor de 3 kb de tamaño. Por ejemplo, el ADN amplificado aleatoriamente puede someterse a electroforesis en un gel de agarosa, y puede aislarse ADN con un tamaño en el intervalo de 150 a 3000 pb.

20 El ácido nucleico puede unirse con un sustrato sólido por un método adecuado conocido en la técnica, incluyendo adsorción pasiva o enlace covalente. Por ejemplo, el ADN amplificado puede unirse con un sustrato de vidrio por adsorción pasiva aplicando puntualmente muestras en un portaobjetos de vidrio de microscopio Polysine™ (Menzel-Glaser, Alemania) y procesando el portaobjetos por deshidratación, secado instantáneo, fijación mediante reticulación por UV, y bloqueo químico usando anhídrido succínico. En el caso del enlace covalente, el ácido nucleico puede unirse con el sustrato sólido por un método adecuado conocido en la técnica.

25 Se prefiere que más de un ácido nucleico esté unido al sustrato sólido, para producir una matriz de ácidos nucleicos depositados. Dicha matriz puede fabricarse de cualquier manera deseada conocida en la técnica, incluyendo deposición robótica de los ácidos nucleicos. Los ejemplos de métodos para producir matrices son esencialmente como se describen en las Patentes de Estados Unidos 5.486.452, 5.830.645, 5.807.552, 5.800.992 y 5.445.934.

30 También se describe en el presente documento una matriz de ácidos nucleicos unidos a un sustrato sólido, donde cada ácido nucleico en la matriz deriva de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado y cada ácido nucleico está desprovisto de secuencias repetitivas.

35 También se describe en el presente documento una matriz de ácidos nucleicos unidos a un sustrato sólido, donde cada ácido nucleico en la matriz es el producto de amplificación con cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado y cada ácido nucleico está desprovisto de una o más de secuencias repetitivas, secuencias no cromosómicas o secuencias que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación del cromosoma o parte del mismo.

40 Se apreciará también que la matriz puede no estar compuesta necesariamente de ácidos nucleicos como se describe en el presente documento, sino que además del o los ácidos nucleicos unidos al sustrato sólido de acuerdo con la presente invención, puede incluir también otros ácidos nucleicos diana.

45 Puede depositarse cualquier cantidad adecuada de ácido nucleico en el sustrato sólido. La cantidad de ácido nucleico depositado puede ser de aproximadamente 0,05 nl a aproximadamente 5,0 nl de una solución de ácido nucleico de una concentración de ácidos nucleicos de 0,15 - 1 µg/µl. Por ejemplo, para una densidad de 1.000 ADN depositados/cm, la cantidad individual depositada es de aproximadamente 0,2 nl a aproximadamente 2,0 nl de solución 1 µg/µl. El ADN se proporciona en cualquier disolvente que permita la deposición del ácido nucleico.

50 La matriz que tiene ácidos nucleicos depositados puede producirse en cualquier disposición. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden localizarse en una parte de la matriz o pueden intercalarse entre otros ácidos nucleicos depositados. Se prefiere la regularidad de una matriz bidimensional.

55 También se prefiere que la matriz incluya diversos ácidos nucleicos de control, tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos aplicados puntualmente de un número de copias conocido para un gen o secuencia genómica expresado particular. Por ejemplo, puede usarse ADN genómico extraído de líneas celulares con 1 o más copias de un cromosoma particular, o también pueden usarse los productos de amplificación de DOP-PCR completos de ADN de una única célula.

60 También se describe en el presente documento un kit para comparar al menos un cromosoma o parte del mismo de una célula con un primer cariotipo con el cromosoma correspondiente o parte del mismo de una célula con un segundo cariotipo, incluyendo el kit un ácido nucleico unido a un sustrato sólido, donde el ácido nucleico deriva de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado y el ácido nucleico está desprovisto de secuencias repetitivas.

65

También se describe en el presente documento un kit para comparar al menos un cromosoma o parte del mismo de una célula con un primer cariotipo con el cromosoma correspondiente o parte del mismo de una célula con un segundo cariotipo, incluyendo el kit un ácido nucleico unido a un sustrato sólido, donde el ácido nucleico es el producto de amplificación con cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado y el ácido nucleico está desprovisto de una o más secuencias repetitivas, secuencias no cromosómicas o secuencias que están sobrerrepresentadas debido a amplificación.

Los diversos kits descritos en el presente documento también son adecuados para detectar una anomalía cromosómica en una célula.

También se describe en el presente documento un kit para detectar una anomalía cromosómica en una célula con un cariotipo desconocido, incluyendo el kit un ácido nucleico unido a un sustrato sólido, donde el ácido nucleico deriva de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado y el ácido nucleico está desprovisto de secuencias repetitivas.

También se describe en el presente documento un kit para detectar una anomalía cromosómica en una célula con un cariotipo desconocido, incluyendo el kit un ácido nucleico unido a un sustrato sólido, donde el ácido nucleico es el producto de amplificación con cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado y el ácido nucleico está desprovisto de una o más secuencias repetitivas, secuencias no cromosómicas o secuencias que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación del cromosoma o parte del mismo.

También se describe en el presente documento un ácido nucleico derivado de amplificación con cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado, donde el ácido nucleico está desprovisto de secuencias repetitivas.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden usarse como ácidos nucleicos diana para hibridación y, en particular, como ácidos nucleicos diana para hibridación genómica comparativa.

Preferentemente, los ácidos nucleicos derivan de amplificación con cebadores aleatorios que incluye el uso de un cebador oligonucleotídico degradado. Más preferentemente, los ácidos nucleicos derivan de amplificación con cebadores aleatorios que incluye el uso de un cebador oligonucleotídico degradado que consiste en la secuencia de nucleótidos 5'-CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3', donde N es cualquier nucleótido.

En el caso de un ácido nucleico derivado de amplificación de un cromosoma aislado, el cromosoma aislado se aísla preferentemente por microdissección o citometría de flujo.

En el caso de un ácido nucleico derivado de la amplificación de parte de un cromosoma aislado, la parte del cromosoma puede aislarse por microdissección o citometría de flujo. Como alternativa, la parte del cromosoma aislado puede ser un fragmento clonado de un cromosoma. En este caso, preferentemente el ácido nucleico amplificado con cebadores aleatorios del fragmento genómico clonado estará desprovisto de secuencias no cromosómicas.

Preferentemente, el ácido nucleico se desprovee adicionalmente de secuencias que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación.

Preferentemente, las secuencias repetitivas son secuencias de Cot-1.

El ácido nucleico también puede seleccionarse por tamaño. Preferentemente, el ácido nucleico se selecciona por tamaño para un tamaño de menos de 10 kb. Más preferentemente, el ácido nucleico se selecciona por tamaño para un tamaño de menos de 3 kb.

También se describe en el presente documento un ácido nucleico derivado de amplificación por cebadores aleatorios de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado, donde el ácido nucleico está desprovisto de secuencias repetitivas y el ácido nucleico se selecciona por tamaño.

Descripción de las realizaciones referidas

Se hará ahora referencia a experimentos que incorpora los principios generales anteriores de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que la siguiente descripción no limita la generalidad de la descripción anterior.

Ejemplo 1

Bibliotecas de ADN específicas de cromosomas humanos

Los doctores A. Bolzer y M.R. Speicher (Institut für Anthropologie und Humangenetik, LMU Múnich, Alemania) proporcionaron amablemente un conjunto completo de sondas de marcaje específico de cromosomas humanos,

amplificables por PCR, desprovistas de repeticiones.

Debido a su capacidad para marcar uniformemente el cromosoma diana completo (ramas), estas sondas se seleccionaron en el presente proyecto como bibliotecas de ADN de cromosomas humanos. Las bibliotecas de ADN se generaron por microdissección para 15 cromosomas de N° 1, 3, 6, 7, 9, 12, 13, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22 y X o clasificación de flujo para 9 cromosomas de N° 2, 4, 5, 8, 10, 11, 16, 18 e Y. Para evitar la hibridación cruzada entre las ramas p de cinco cromosomas acrocéntricos (13-15, 21 y 22), se microdisseccionaron solamente las ramas q de estos cromosomas en sus bibliotecas de ADN correspondientes (Guan *et al.* (1994) Genomics 22: 101-107).

Usando sustractores incluyendo ADN de Cot-1 humano, sondas específicas de centrómero de cromosoma y sondas específicas de región afoide, se realizó con éxito el agotamiento adicional de secuencias repetitivas de estas sondas por cromatografía de afinidad. Brevemente, las secuencias repetidas se marcaron con biotina y se permitió que hibridaran con la biblioteca que contenía secuencias repetidas. Después de la hibridación se usó cromatografía de afinidad con perlas magnéticas de estreptavidina para retirar las secuencias repetidas unidas a las secuencias repetidas marcadas con biotina. Sin la adición de ADN de Cot-1 humano para suprimir secuencias repetitivas, estas bibliotecas de ADN desprovisto de repeticiones consiguen señales de FISH específicas altas en sus cromosomas diana correspondientes (ramas q) como se describe en Craig *et al.* (1997) Hum. Genet. 100: 472-474 y Bolzer *et al.* (1999) Cytogenet. Cell Genet. 84: 233-240.

Ejemplo 2

Preparación de bibliotecas de ADN específico de cromosomas humanos

Se consiguió reamplificación exitosa de la biblioteca de ADN humano descrita en el Ejemplo 1 por un único ciclo de PCR con cebadores oligonucleotídicos degradados (DOP-PCR) durante 30-35 ciclos de condiciones de ciclo altamente rigurosas, esencialmente como se describe en Telenius *et al.* (1992) Genomics 13: 718-725.

Brevemente, se llevó a cabo amplificación en un Minicycler (MJ Research, Estados Unidos) en un volumen de 50 µl, que contenía aproximadamente 50 ~ 100 ng de sondas fuente, tampón de ADN polimerasa Taq (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM [pH 8,3], Perkin Elmer, Estados Unidos), cebador 6 MW (5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3'), 2,0 mM, MgCl₂ 2,5 mM, 0,25 mM de cada dNTP, y 5 U de ADN polimerasa Taq (Perkin Elmer, Estados Unidos). Después de una etapa de desnaturalización inicial de 95 °C durante 4 min, se siguieron 30-35 ciclos usando condiciones de ciclo de 94 °C durante 1 min, 62 °C durante 1 min y 72 °C durante 3 min con una adición de 10 segundos por ciclo al tiempo de extensión. Finalmente se añadió una etapa de extensión de 72 °C durante 10 min al final de la amplificación del ciclo.

Se sometieron a electroforesis 5 µl de productos de PCR en geles de agarosa al 1 % en TBE 0,5 X (Tris, borato, EDTA) preteñido con bromuro de etidio y se fotografiaron. Los resultados se muestran en la Figura 1.

Como puede verse, se consiguió amplificación exitosa del conjunto completo de bibliotecas de ADN específicas de cromosoma humano desprovistas de repeticiones por un ciclo de amplificación por DOP-PCR de 30-35 ciclos usando las condiciones de ciclo de alta rigurosidad de la DOP-PCR tradicional. Todos los productos de PCR de bibliotecas de ADN reamplificadas fueron manchas, con la mayoría de menos de 1 kb después de un ciclo de 30 min en geles de Agarosa al 1 %. Sin embargo, las diferencias de las manchas fueron obvias. Se vieron manchas más amplias que se extendían hasta más de 3 kb para productos de 11 cromosomas diferentes (N° 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 16, 21 e Y), solamente tres de las cuales eran sondas derivadas por microdissección (N° 1, 9 y 21).

La optimización exhaustiva de las condiciones de ciclo de DOP-PCR, que incluían tanto la temperatura como la duración para más etapas de hibridación y elongación, los números de ciclos de amplificación, las cantidades de ADN iniciales de los moldes y las concentraciones salinas de MgCl₂, no consiguieron eliminar las diferencias de los tamaños de los productos de PCR.

Después se realizó purificación de los productos de PCR por los kits de purificación de PCR Ultrapure (N° 12500-250, Mo Bio Laboratories, Inc., CA, Estados Unidos). Los productos purificados se usaron inmediatamente o se almacenaron a -20 °C durante un año sin ninguna pérdida visible de sus especificidades, como se determina por señales de FISH.

Ejemplo 3

Hibridación de fluorescencia in situ usando bibliotecas de ADN reamplificadas.

Se llevaron a cabo experimentos de FISH para confirmar las especificidades para las bibliotecas de ADN de cromosomas humanos reamplificadas usando cromosomas en metafase de linfocitos periféricos de un hombre humano normal.

La hibridación de fluorescencia *in situ* se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Se usó SpectrumGreen-dUTP o SpectrumRed-dUTP (Vysis, Estados Unidos) para marcar las bibliotecas de ADN amplificado. La reacción de marcaje se llevó a cabo en un Minicycler (MJ Research, Estados Unidos) con un volumen de 50 μ l usando condiciones de ciclo de DOP-PCR similares usadas anteriormente para reamplificar sondas fuente de bibliotecas de ADN (Ejemplo 2). La concentración baja de dNTP fue la única excepción empleada aquí con 0,16 mM para cada uno de dGTP, dCTP y dATP, y 0,12 mM para dTTP con la adición de 0,04 mM para SpectrumGreen-dUTP o SpectrumRed-dUTP. La purificación de productos de PCR se realizó por kits de purificación de PCR Ultrapure (N° 12500-250, Mo Bio Laboratories, Inc., CA, Estados Unidos). Para experimentos FISH, se mezcló 1 μ g de productos marcados purificados con 20 μ g de ADN de Cot-1 humano (GIBICO, BRL) y 50 μ g de ADN de esperma de salmón (GIBICO, BRL). La mezcla de sondas se precipitó con etanol y se resuspendió en 10 μ l de solución de hibridación, que consistía en formamida desionizada al 50 %, SSC 3 X, SDS 0,1 %, dextran sulfato 10 % y solución de Denhardt 5 X.
- Después de desnaturalización a 80 °C durante 10 min y prehibridación a 37 °C durante 30 min, las sondas se hibridaron con extensiones de cromosomas en metafase desnaturalizados a 37 °C durante una noche. Después de la hibridación, los portaobjetos se lavaron dos veces con SCC 2 X a 60 °C durante 10 min y después dos veces con SSC 0,1 X a 60 °C durante 5 min. Después de esto, los portaobjetos se lavaron adicionalmente una vez en SSC 0,1 X a temperatura ambiente durante 5 min y después se aclararon brevemente en H₂O durante algunos segundos.
- Después de secarse al aire en oscuridad, los portaobjetos se contratiñeron con 40 μ l de solución de DAPI que contenía medio antidescolorante y se cubrieron con cubreobjetos sellados por nailsticks. Se obtuvieron señales de FISH y se fotografiaron por microscopio de AHT3 (Olympus, Tokio, Japón) usando (1) excitación con azul para señales Verdes y (2) excitación triple para señales Rojas.
- Como se muestra en la Figura 2, excepto por señales muy débiles para la biblioteca de ADN del cromosoma 21, todas las otras marcaron uniformemente sus cromosomas diana completos o ramas q.

Ejemplo 4

30 *Fabricación de matrices de ADN*

(i) Matrices de ADN de bibliotecas amplificadas por PCR de ADN cromosómico humano (Matriz de Primera Generación)

- 35 Se realizaron matrices de ADN usando las instalaciones de Micromatrices de la Universidad de Adelaida, Australia meridional.

Brevemente, todas las bibliotecas de ADN reamplificadas de cromosomas humanos se resuspendieron en tampón de aplicación puntual de SSC 3 X con una concentración de ADN final de aproximadamente 100 ng/ μ l, y después se cargaron 8 μ l de cada solución de suspensión en los pocillos de una placa de 384 pocillos. Posteriormente, un aparato de micromatrices tomó muestras de pocillos de esta placa y aplicó puntualmente 8 repeticiones para cada muestra de ADN en portaobjetos de vidrio de microscopio de Polysine[™] (Menzel-Glaser, Alemania). El post-procesamiento de los portaobjetos con matrices impresas incluyó deshidratación, secado instantáneo, fijación mediante recirculación por UV y bloqueo químico usando anhídrido succínico. Finalmente, después de secarse por centrifugación a 500 rpm durante 5 min, los portaobjetos de matrices pudieron usarse inmediatamente o almacenarse en una caja de portaobjetos durante un periodo de tiempo corto en oscuridad.

Se fabricaron treinta portaobjetos de matrices. Como se muestra en la Figura 3, se aplicaron puntualmente dos matrices repetidas en cada portaobjetos. Cada matriz tenía 4 bloques. Dentro de cada matriz se denominaron los cuatro bloques de izquierda a derecha como el 1°, 2°, 3° y 4° bloque, que tenían 7, 7, 6 y 6 columnas, respectivamente. Cada columna consistió en 4 repeticiones de una biblioteca de ADN de un único cromosoma humano. De izquierda a derecha, los órdenes de sus columnas correspondientes a bibliotecas de ADN de cromosomas humanos fueron N° 1-5-9-3-17-21-negativo, N° 2-6-10-14-18-22-positivo, N° 3-7-11-15-19-X-blanco y N° 4-8-12-16-20-Y-blanco para el 1°, 2°, 3° y 4° bloque, respectivamente.

55 (ii) Matrices de ADN de bibliotecas amplificadas por PCR de ADN cromosómico humano después de selección por tamaño (Matriz de Segunda Generación)

- 60 Se produjo una matriz de ADN con productos seleccionados por tamaño por electroforesis de las bibliotecas de ADN reamplificado descritas en el Ejemplo 2 en un gel de Agarosa al 1%. Después de teñir, se escindieron ADN en el intervalo de tamaño de 150-3000 pb del gel y se aislaron como se muestra en la Figura 4.

65 Los ADN seleccionados por tamaño resultantes se aplicaron después puntualmente en una matriz junto con las bibliotecas de ADN originales antes de la selección por tamaño como se ha descrito previamente, con los siguientes cambios: se resuspendió ADN en fosfato sódico 150 mM, pH 8,0 a una concentración aproximada de 170 ng/ μ l. Se

aplicó puntualmente una cantidad de aproximadamente 0,6 nl para cada punto usando Micropuntas de Aplicación Puntual Sigilosas (Catálogo SMP3) de TeleChem. Los portaobjetos usados fueron portaobjetos SuperAmine de TeleChem (Sunnyvale, CA) que se usaron directamente. La instalación de generación de matrices que realizó la disposición de las micromatrices fue la instalación de micromatrices del centro Clive y Vera Ramaciotti para el

- 5 Análisis de la Función Génica localizado en la Universidad de Nueva Gales del Sur que usa un aparato de micromatrices ChipWriter Pro (BioRad).

Ejemplo 5

10 *Aislamiento y preparación de células individuales*

Se usaron linfocitos individuales aislados de sangre periférica masculina normal o femenina normal como células de referencia, y se usaron amniocitos individuales de cultivos de células amnióticas de embarazos de trisomías del 13 y del 18 como células de ensayo. Se usó el análisis citogenético para confirmar los cariotipos normales de las

- 15 muestras de referencia 46, XX y 46, XY. Usando un microscopio de luz invertida y pipetas de vidrio finamente soplado, se seleccionaron células individuales y se transfirieron a tubos de PCR de 0,5 ml esencialmente como se describe en Hussey *et al.* (1999) Mol. Hum. Reprod. 5: 1089-1094, que podrían usarse inmediatamente o congelarse durante un periodo de tiempo.

20 Ejemplo 6

DOP-PCR de primer ciclo para amplificación aleatoria

Se consiguió lisis de células individuales por 5 µl de tampón de lisis (KOH 200 mM, ditiotritol 50 mM) durante 10 min a 65 °C seguido de neutralización con 5 µl de tampón de neutralización (KCl 300 mM, Tris-HCl 900 mM, pH 8,3, HCl 200 mM). A los 10 µl de solución lisada y neutralizada de células individuales se añadió: 5 µl de tampón de PCR sin K⁺ (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, gelatina 1 mg/ml), 5 µl de MgCl₂ 25 mM, 4 µl de 2,5 mM de cada dNTP, 5 µl de DOP-PCR 6 MW 20 µM, 5 U de Taq polimerasa (Perkin Elmer, Norwalk, CT, Estados Unidos) y agua ultrapura (Biotech International, Perth, WA, Australia) a un volumen de 50 µl. Estos tubos de PCR se colocaron en un Minicycler MJ Research (Boston, MA, Estados Unidos) para una etapa de desnaturalización inicial de 95 °C durante 5 min. Las condiciones de ciclos posteriores contenían 8 ciclos de amplificación de baja rigurosidad de 94 °C durante 1 min, 30 °C durante 1,5 min, 72 °C durante 3 min con un desnivel de 1 °C por cada 4 segundos para temperatura creciente de 30 °C a 72 °C y 26 ciclos de amplificación de alta rigurosidad de 94 °C durante 1 min, 62 °C durante 1 min, 72 °C durante 3 min con una adición de 14 segundos por ciclo a la etapa de extensión. Finalmente, se añadió una etapa de extensión de 72 °C durante 10 min al final de la amplificación en ciclo. Los productos de PCR estaban listos para iniciar la DOP-PCR de segundo ciclo para marcaje.

- 35 una etapa de extensión de 72 °C durante 10 min al final de la amplificación en ciclo. Los productos de PCR estaban listos para iniciar la DOP-PCR de segundo ciclo para marcaje.

Ejemplo 7

40 *DOP-PCR de segundo ciclo para marcaje de Cy3/Cy5*

Se transfirieron 5 µl de productos de DOP-PCR de primer ciclo (1/10 vol) a tubos de PCR de 0,5 ml nuevos y se sometieron a una amplificación por DOP-PCR de segundo ciclo para marcaje de Cy3-dUTP/Cy5-dUTP (PA 53022/PA 55022, Amersham Pharmacia Biotech, Estados Unidos). Se llevó a cabo la amplificación en un volumen de 50 µl durante 25 ciclos usando un Minicycler MJ Research (Boston, WA, Estados Unidos) y se aplicaron las condiciones de ciclos similares a las del marcaje de bibliotecas de ADN para FISH (descrito anteriormente) con la excepción de reemplazar SpectrumRed o SpectrumGreen con Cy3-dUTP o Cy5-dUTP. Se usó bien Cy3-dUTP o bien Cy5-dUTP a una concentración de 0,04 mM. Después se purificaron los productos de PCR por kits de limpieza de PCR Ultraclean™ (Nº 12500-250, Mo Bio Laboratories, Inc., CA, Estados Unidos) y se eluyeron en 50 µl de Tris-HCl 10 mM o H₂O. Se sometieron a electroforesis 5 µl de productos de PCR purificados en geles de agarosa al 1 % en TBE 0,5 X (Tris, borato, EDTA) preteñidos con bromuro de etidio y se fotografiaron. Los restantes pudieron usarse inmediatamente en experimentos de CGH/micromatrices o almacenarse a -20 °C durante un periodo corto de algunas semanas.

- 50 HCl 10 mM o H₂O. Se sometieron a electroforesis 5 µl de productos de PCR purificados en geles de agarosa al 1 % en TBE 0,5 X (Tris, borato, EDTA) preteñidos con bromuro de etidio y se fotografiaron. Los restantes pudieron usarse inmediatamente en experimentos de CGH/micromatrices o almacenarse a -20 °C durante un periodo corto de algunas semanas.

55 Ejemplo 8

Análisis de micromatrices/CGH

Se mezclaron cantidades iguales (5 ~ 10 µl) de productos de DOP-PCR de células individuales de referencia marcados con Cy5 y de ensayo marcados con Cy4 con 70 µg de ADN de Cot-1 humano (GIBICO, BRL) y 20 µg de ADN de esperma de salmón (GIBICO, BRL). La mezcla de ADN resultante se precipitó con etanol y se resuspendió en 10 µl de solución de hibridación que contenía formamida desionizada al 50 %, SSC 2 X, SDS 0,1 %, dextran sulfato 10 % y solución de Denhardt 5 X. La mezcla de hibridación se calentó a 80 °C durante 10 min para desnaturalizar las sondas de ADN seguido de prehibridación de secuencias repetitivas a 37 °C durante 180 min. Se llevó a cabo hibridación a 37 °C durante 17~20 horas. El lavado post-hibridación incluyó tres veces de formamida al

- 60 Se mezclaron cantidades iguales (5 ~ 10 µl) de productos de DOP-PCR de células individuales de referencia marcados con Cy5 y de ensayo marcados con Cy4 con 70 µg de ADN de Cot-1 humano (GIBICO, BRL) y 20 µg de ADN de esperma de salmón (GIBICO, BRL). La mezcla de ADN resultante se precipitó con etanol y se resuspendió en 10 µl de solución de hibridación que contenía formamida desionizada al 50 %, SSC 2 X, SDS 0,1 %, dextran sulfato 10 % y solución de Denhardt 5 X. La mezcla de hibridación se calentó a 80 °C durante 10 min para desnaturalizar las sondas de ADN seguido de prehibridación de secuencias repetitivas a 37 °C durante 180 min. Se llevó a cabo hibridación a 37 °C durante 17~20 horas. El lavado post-hibridación incluyó tres veces de formamida al

50 %/SSC 2 X, pH 7,0 a 45 °C durante 10 min, dos veces de SSC 2 X a 45 °C durante 5 min, y una vez de SSC 1 X a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, los portaobjetos se aclararon brevemente en H₂O durante algunos segundos y se secaron al aire en la oscuridad, y después se exploraron tan pronto como fue posible.

5 Ejemplo 9

Exploración de portaobjetos y análisis de datos

Los portaobjetos de micromatrices se exploraron por un explorador de láser doble denominado GenePix 4000B (Axon Instruments, Inc., CA, Estados Unidos), que es capaz de explorar Cy3 (a 532 nm) y Cy5 (a 635 nm) simultáneamente y produce una imagen de relación en tiempo real. Estas imágenes se analizaron adicionalmente por un software de GenePix Pro 3.0.6.66 (Axon Instruments, Inc., CA, Estados Unidos). Este software calculó las intensidades de fondo tanto de señal como locales a ambas longitudes de onda (Cy3/Cy5) para todos los puntos de ADN y produjo numerosos datos en bruto entre los que cinco relaciones diferentes de la Relación de Medianas, Relación de Medias, Mediana de Relaciones, Media de Relación y Relación de Regresión fueron las más importantes. Este software también presentó un factor de normalización para cada una de las cinco relaciones usando normalización global basándose en la suposición de que el valor medio de todas las características analizadas es 1,0. Las relaciones normalizadas podrían combinarse o compararse entre diferentes experimentos de matrices. Se seleccionaron Relaciones de Medianas en este estudio, y se usaron finalmente los promedios de relaciones normalizadas (Cy5/Cy3) de todos los puntos disponibles de las mismas sondas para los análisis finales. Se consideró que un valor de relación normalizado de 1,0 indicaba que no había diferencia en el número de copias entre el ensayo y la referencia. Cambios grandes en las relaciones indicaron diferencias significativas de los números de copias. Se usó en este estudio un umbral de punto de corte de menos de 0,80 (autosómico) o 0,75 (cromosoma sexual) para trisomías y mayor de 1,2 (autosómico) o 1,25 (cromosoma sexual) para monosomías para determinar aneuploidías de cambios de copias individuales. Estos criterios de puntos de corte umbrales se usan con frecuencia en la hibridación genómica comparativa para diagnosticar cambios de una única copia de secuencias genómicas.

La definición de la Relación de Medianas fue la relación de la mediana de las intensidades de cada elemento (punto de ADN) para cada Longitud de onda, con la mediana del fondo restada. Las etapas usadas para determinar el Factor de Normalización para la Relación de Medianas por el software fueron las siguientes:

- 1) Se determina el valor Logarítmico para el Valor de Relaciones de Medianas de cada característica
- 2) Se calcula el Promedio de todos los valores Logarítmicos ("Avglog")
- 3) Se calcula el promedio Verdadero ("TrueAvg"). $\text{TrueAvg} = 10^{\text{Avglog}}$
- 4) Se determina el Factor de Normalización (NF). $\text{NF} = 1/\text{TrueAvg}$
- 5) Se calculan las Relaciones de Medianas Normalizadas por $\text{NF} \times \text{Relaciones de Medianas}$

Ejemplo 10

Resultados de CGH/micromatriz de ADN de única célula

Se usaron amniocitos individuales de 47, XX, +13 y 47, XY, +18 como muestras de ensayo y se marcaron con Cy3-dUTP (verde), mientras que se usaron linfocitos individuales de un hombre normal 46, XY como una muestra de referencia y se marcaron por Cy5-dUTP (rojo). Después de lavado post-hibridación, los portaobjetos de vidrio se secaron y se exploraron inmediatamente por GenePix 4000B, que podrían producir imágenes tanto de longitud de onda individual como de longitud de onda doble. Estas imágenes pudieron guardarse en imágenes JPEG de 24 bits y por defecto como imágenes TIFF sin signo de 16 bits. El procedimiento de CGH completo tardó aproximadamente 30 horas.

La Figura 5 se obtuvo a partir de experimentos de CGH/micromatrices de células individuales de 47, XX, +13 frente a 46, XY. El análisis preliminar mostró varias regiones cromosómicas que parecían más verdes o más rojas en los puntos de ADN diana. Sin embargo, la interpretación final de los números de copias para cromosomas diana se obtuvo a partir de las relaciones de sus puntos de ADN correspondientes (véase gráficos).

De forma similar, la Figura 6 se obtuvo a partir de experimentos de CGH/micromatrices de células individuales de 47, XY, +18 frente a 46, XY. El gráfico proporciona la interpretación final de los números copias para cromosomas diana obtenidos de relaciones de sus puntos de ADN correspondientes.

Las imágenes de TIFF sin signo de 16 bits son formatos de archivos gráficos no comprimidos convencionales que pueden leerse por muchos programas gráficos y de imágenes. Estas imágenes se usaron para la extracción de datos. Las imágenes de TIFF se analizaron en este estudio por GenePix Pro 3.0.6.66, que produjo un informe de datos exhaustivo (en formato Excel) para cada experimento de CGH/micromatrices. Se seleccionaron Relaciones de Medianas en este estudio para interpretar los resultados finales, y en este estudio se usaron finalmente las relaciones promediadas de las medianas de todos los puntos de ADN adecuados de las mismas sondas de ADN. Se proporcionan las relaciones promediadas de medianas de todos los cromosomas humanos para las imágenes de las

Figuras 5 y 6 en la Tabla 1.

Tabla 1

Nombre del Cromosoma	Promedios de las Relaciones de 47, XX, +13 frente a 46, XY (Cy3/Cy5)	Promedios de las Relaciones 47, XY, +18 frente a 46, XY (Cy3/Cy5)
Nº 1	1,076990539	1,067886663
Nº 2	1,05202167	1,162437071
Nº 3	1,048407129	0,962005996
Nº 4	1,172823435	1,171398634
Nº 5	0,980301567	1,466064292
Nº 6	0,888891728	0,971954515
Nº 7	0,92265915	0,95221539
Nº 8	0,926083452	0,957544954
Nº 9	0,933597893	1,25382922
Nº 10	0,846801349	1,29962399
Nº 11	1,213487021	1,180399675
Nº 12	0,853697513	0,859994198
Nº 13	0,647050399	1,10381187
Nº 14	0,853412154	0,876101324
Nº 15	0,908581464	0,850519418
Nº 16	1,015400663	1,12276143
Nº 17	0,765236378	0,723399453
Nº 18	0,9321711	0,669077381
Nº 19	0,991382989	0,871995586
Nº 20	0,773321535	0,831411945
Nº 21	1,28601564	1,074005791
Nº 22	0,917237339	0,872627238
X	0,732895748	1,425362216
Y	1,568758354	0,66007634

5 Una representación gráfica de los resultados en la Tabla 1 está en la Figura 6.

Los datos de la Tabla 1 muestran que en los experimentos de CGH/micromatrices de células individuales las relaciones promedio de las medianas para los puntos de 13, 18, X e Y fueron 0,6470, 0,9321, 0,7328 y 1,568, respectivamente para 47, XX, +13 frente a 46, XY.

10 En el caso de 47, XY, +18 frente a 46, XX, estas relaciones se desplazaron a 1,1038, 0,6691, 1,4254 y 0,6601 para los cromosomas 13, 18, X e Y, respectivamente. Si se aplicara el umbral de punto de corte de 0,75-1,25 para determinar cambios de una única copia de cromosomas, podrían establecerse correctamente las trisomías del 13 y del 18 más las diferencias de números de copias de los cromosomas X e Y para todas las muestras de ensayo y de
15 de referencia usadas en estos dos experimentos de CGH/micromatrices de células individuales.

Las relaciones promedio esperadas de las medianas para los otros 20 cromosomas diferentes deberían estar dentro del umbral de punto de corte de 0,75-1,25, como si no hubiera ninguna diferencia de los números de copias para esos cromosomas entre las muestras de ensayo y de referencia. Los datos en la Tabla 1 demuestran que la mayoría
20 de los otros 20 cromosomas se ajustan bastante bien a este umbral. Se descubrió que las relaciones de medianas promedio eran 1,2860 para el cromosoma 21 para 47, XX, +13 frente a 46, XY y 1,47660, 1,2996 y 0,72339 para los cromosomas 5, 10 y 18 para 47, XY, +18 frente a 46, XX.

Ejemplo 11

25 *Reproducibilidad de CGH realizado con matriz de ADN con ADN amplificado por PCR seleccionado por tamaño (Matriz de Segunda Generación).*

Los protocolos experimentales fueron iguales que los descritos anteriormente con la excepción de que se usó la matriz de segunda generación con ADN seleccionados por tamaño. Esta matriz también contiene las bibliotecas de
30 ADN originales antes de la selección por tamaño. Se marcaron alícuotas de reacciones de DOP-PCR de células masculinas normales y femeninas normales con Cy3 o Cy5 y se hibridaron según las combinaciones descritas en la Tabla 2 posterior.

35

Tabla 2

Portaobjetos	Experimentos de Micromatrices/CGH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
NH1 rh	DH ₁ Cy ₃ /NH ₉ Cy ₅		#							#	#				
NH3 rh	DH ₂₉ Cy ₃ /NH ₄₄ Cy ₅				#										
NH6 lh	DH ₁ Cy ₃ /NH ₉ Cy ₅														
NH6 rh	DH ₇ Cy ₅ /NH ₁₅ Cy ₃								#						
NH7 lh	DH ₁ Cy ₅ /NH ₂₁ Cy ₃														
NH7 rh	DH ₁₃ Cy ₅ /NH ₂₇ Cy ₃														
NH8 lh	DH ₃₁ Cy ₅ /NH ₃₁ Cy ₃														
NH8 rh	DH ₄₅ Cy ₅ /NH ₃₇ Cy ₃											#			
NH9 lh	DH ₁ Cy ₅ /DH ₁ Cy ₃														
NH10 lh	DH ₁₇ Cy ₅ /NH ₃₂ Cy ₃														
NH10 rh	DH ₁₃ Cy ₅ /NH ₄₃ Cy ₃														
NH11 rh	DH ₂₃ Cy ₅ /NH ₃₆ Cy ₃														
NH12 lh	NH ₉ Cy ₅ /NH ₉ Cy ₃														
Nh12 rh	DH ₃₇ Cy ₅ /NH ₅₀ Cy ₃				#	#						#			
Relaciones esperadas totales	14 experimentos separados de micromatrices/CGH	14	13	14	12	13	14	14	13	13	13	12	14	14	14

(1) Linfocitos individuales totales usados en el presente documento incluyendo 10 células DH y 11 células NH

(2) Células usadas más de una vez incluyendo DH1, NH9, DH13

5

Tabla 2 (continuación)

Portaobjetos	Experimentos de Micromatrices/CGH	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y (37)	Y (26)
NH1 rh	DH ₁ Cy ₃ /NH ₉ Cy ₅										#	#
NH3 rh	DH ₂₉ Cy ₃ /NH ₄₄ Cy ₅										#	
NH6 lh	DH ₁ Cy ₃ /NH ₉ Cy ₅											
NH6 rh	DH ₇ Cy ₅ /NH ₁₅ Cy ₃								#			#
NH7 lh	DH ₁ Cy ₅ /NH ₂₁ Cy ₃											#
NH7 rh	DH ₁₃ Cy ₅ /NH ₂₇ Cy ₃											#
NH8 lh	DH ₃₁ Cy ₅ /NH ₃₁ Cy ₃			#			#		#			#
NH8 rh	DH ₄₅ Cy ₅ /NH ₃₇ Cy ₃											
NH9 lh	DH ₁ Cy ₅ /DH ₁ Cy ₃											#
NH10 lh	DH ₁₇ Cy ₅ /NH ₃₂ Cy ₃										#	#
NH10 rh	DH ₁₃ Cy ₅ /NH ₄₃ Cy ₃									#	#	#
NH11 rh	DH ₂₃ Cy ₅ /NH ₃₆ Cy ₃											
NH12 lh	NH ₉ Cy ₅ /NH ₉ Cy ₃											
Nh12 rh	DH ₃₇ Cy ₅ /NH ₅₀ Cy ₃										#	#
Relaciones esperadas totales	14 experimentos separados de micromatrices/CGH	14	14	13	14	14	13	14	12	13	9	5

(1) Linfocitos individuales totales usados en el presente documento incluyendo 10 células DH y 11 células NH

(2) Células usadas más de una vez incluyendo DH1, NH9, DH13

10

La Tabla 2 muestra que los experimentos de hibridación genómica comparativos de células individuales usando la matriz de los inventores son extremadamente reproducibles produciendo todos los cromosomas (excepto el cromosoma Y) resultados perfectos en al menos 13 de los 14 experimentos. Los puntos de cromosomas Y seleccionados por tamaño fueron más precisos que los no seleccionados por tamaño. Los datos correspondientes a uno de los experimentos anteriores (NH7 lh) se muestran en la Figura 7. La Tabla 3 muestra las relaciones calculadas por el ordenador:

15

Tabla 3

NH7 lh – Normalización de la Mediana de las relaciones					
	Mediana de las relaciones en bruto	Valor Logarítmico	NF	Mediana de las Relaciones Normalizada	Valor logarítmico en base 2 de la mediana de las relaciones normalizada
1	0,575125	-0,240238	1,826851	1,050667624	0,071306348
2	0,463125	-0,334302	1,826851	0,846060323	-0,241167565
3	0,619875	-0,207696	1,826851	1,132419202	0,179408117
4	0,53225	-0,273884	1,826851	0,972341392	-0,040465158
5	0,49625	-0,304299	1,826851	0,906574759	-0,141502101
6	0,592625	-0,22722	1,826851	1,082637515	0,114550285

NH7 lh – Normalización de la Mediana de las relaciones					
	Mediana de las relaciones en bruto	Valor Logarítmico	NF	Mediana de las Relaciones Normalizada	Valor logarítmico en base 2 de la mediana de las relaciones normalizada
7	0,60325	-0,219503	1,826851	1,102047805	0,140186808
8	0,502125	-0,299188	1,826851	0,917307508	-0,124522647
9	0,459125	-0,338069	1,826851	0,838752919	-0,253682212
10	0,501375	-0,299837	1,826851	0,91593737	-0,126679142
11	0,642125	-0,19238	1,826851	1,173066634	0,230284966
12	0,55375	-0,256686	1,826851	1,011618686	0,016665591
13	0,548875	-0,260527	1,826851	1,002712788	0,003908426
14	0,558875	-0,252685	1,826851	1,020981297	0,029956438
15	0,543875	-0,264501	1,826851	0,993578533	-0,009294091
16	0,619625	-0,207871	1,826851	1,131962489	0,178826151
17	0,58675	-0,231547	1,826851	1,071904766	0,100176734
18	0,543125	-0,2651	1,826851	0,992208395	-0,011284931
19	0,5925	-0,227312	1,826851	1,082409158	0,114245951
20	0,5265	-0,278602	1,826851	0,961836999	-0,056135672
21	0,46775	-0,329986	1,826851	0,854509508	-0,226831549
22	0,5675	-0,246034	1,826851	1,036737886	0,052051189
X	0,412375		1,826851	0,75334764	-0,40861233
Y	0,49825		1,826851	0,910228461	-0,135699398

Ejemplo 12

- 5 CGH de células individuales usando matriz de ADN con bibliotecas de ADN amplificado por PCR seleccionado por tamaño (Matriz de Segunda Generación) para la detección de la trisomía del 18 y el sexo.

Se usaron amniocitos individuales de 47, XY, +18 como la muestra de ensayo frente a un linfocito individual 46, XX usando la matriz de segunda generación como se ha descrito previamente. La Figura 8 muestra los resultados de la hibridación con la matriz. Los datos en bruto y las relaciones normalizadas se muestran en la Tabla 4. Como puede verse, la presencia de la trisomía del 18 se detectó con éxito.

10

Tabla 4

NH25 – Normalización de la Mediana de las relaciones					
	Mediana de las relaciones en bruto	Valor Logarítmico	NF	Mediana de las relaciones Normalizada	Valor logarítmico en base 2 de la mediana de las relaciones normalizada
1	0,646375	-0,189515449	1,6053857	1,037681182	0,053363257
2	0,592875	-0,227036862	1,6053857	0,951793047	-0,07128018
3	0,6595	-0,1807852	1,6053857	1,058751869	0,082364517
4	0,603879	-0,219050073	1,6053857	0,969458711	-0,044748639
5	0,592625	-0,227220032	1,6053857	0,9513917	-0,071888655
6	0,6905	-0,160836317	1,6053857	1,108518826	0,148633272
7	0,7086667	-0,149557974	1,6053857	1,137683386	0,186099116
8	0,629	-0,201349355	1,6053857	1,009787605	0,014051874
9	0,58425	-0,233401279	1,6053857	0,937946595	-0,092422314
10	0,646625	-0,189347509	1,6053857	1,038082528	0,053921143
11	0,62125	-0,206733598	1,6053857	0,997345866	-0,003834196
12	0,62325	-0,205337713	1,6053857	1,000556638	0,000802835
13	0,62875	-0,201522002	1,6053857	1,009386259	0,013478352
14	0,63014286	-0,20056098	1,6053857	1,011622336	0,016670797
15	0,59485714	-0,225587321	1,6053857	0,954975146	-0,066464908
16	0,656	-0,183096161	1,6053857	1,053133019	0,074687672
17	0,67825	-0,168610198	1,6053857	1,088852851	0,122809
18	0,48228571	-0,316695606	1,6053857	0,774254582	-0,369120079
19	0,5755	-0,239954672	1,6053857	0,92389947	-0,114192215
20	0,663	-0,178486472	1,6053857	1,064370719	0,090000727
21	0,5695	-0,244506272	1,6053857	0,914267156	-0,129312301
22	0,67057143	-0,173554954	1,6053857	1,076525785	0,106382875
X	0,69885714		1,6053857	1,121935259	0,165989428
Y	0,69525		1,6053857	1,116144408	0,158523697

Ejemplo 13*CGH de matrices usando una muestra de aproximadamente 100 células*

5 (i) Preparación de muestras

Se descongelaron dos tubos que contenían una línea celular de fibroblastos (47, XY, +18) del nitrógeno líquido y se incubaron inmediatamente a 37 °C durante 10 min, se lavaron usando PBS 1 x dos veces, y después se resuspendieron en 500 µl de PBS 1 x.

10 Se realizó clasificación celular como se muestra en la Figura 10 en un portaobjetos de vidrio de microscopio superfrost (Menzel-Glaser, Alemania) usando un microscopio de luz invertida con un aumento de 20 x 10 (CK2, Olympus, Japón). Brevemente, los portaobjetos se lavaron exhaustivamente con etanol al 70 % esterilizado (Delta West Pty Ltd., Australia) y se montaron en el microscopio. Se pipetearon 100 µl de medio RPMI (Sigma) en el lateral izquierdo del portaobjetos y se añadió 1 µl de la suspensión de células de fibroblastos. Se crearon otros tres charcos más pequeños (de aproximadamente 50 µl) de tampón de PCR 1X (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,3) a la derecha del charco de RPMI en secuencia y se designaron (de izquierda a derecha) charco de tampón de PCR 1X N° 1, charco N° 2 y charco N° 3, respectivamente (Figura 10). Usando una pipeta Pasteur de vidrio taponada con algodón, extruida, de 22,86 cm, se aspiraron células de fibroblastos del charco de RPMI y se transfirieron después aproximadamente quinientas células al charco de tampón de PCR 1X N° 1. Usando una nueva pipeta, se transfirieron menos de doscientas células al charco de tampón de PCR 1X N° 2. Se aspiraron aproximadamente cien células con una pipeta nueva del charco N° 2 y se transfirieron al charco de tampón de PCR 1X N° 3. Estas células se aspiraron y se bombearon suavemente hacia dentro y hacia fuera del extremo de la pipeta en una nueva localización con una pipeta nueva. Después de lavar, estas células se aspiraron en el extremo de la pipeta con una cantidad mínima de tampón de PCR y después se transfirieron a un tubo de PCR esterilizado de 0,5 ml. Las células aisladas se usaron inmediatamente.

(ii) CGH de matrices usando una muestra de aproximadamente 100 células.

30 Se marcaron muestras de aproximadamente 100 células con Cy3-dUTP como se ha descrito en los Ejemplos 6 y 7.

Se llevaron a cabo dos experimentos de CGH de matrices separados (Experimento A y Experimento B), de la siguiente manera:

35 Experimento A

En este experimento se llevó a cabo CGH de matrices usando 100 células de fibroblastos (48, XY, +18, Cy3) frente a un ADN genómico masculino normal (46, XY, Cy5): los resultados de este experimento se muestran en la Figura 10 (panel superior). Como se esperaba, se obtuvo una relación esperada de >1,25 para el cromosoma 18 junto con una relación esperada dentro del intervalo de 0,75-1,25 para los otros 21 autosomas. La relación del cromosoma X obtenida también estuvo en el intervalo de 0,75-1,25, lo que indica la determinación correcta del sexo masculino para la línea celular de fibroblastos de ensayo.

45 Experimento B

En este experimento se realizó CHG de matrices usando 100 células de fibroblastos (48, XY, +18, Cy3) frente a una mezcla agrupada (46, XY, Cy5) de 5 hasta 10 células masculinas normales individuales. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 10 (panel inferior). Se obtuvo una relación esperada de >1,25 para el cromosoma 18 y las relaciones de los otros 21 autosomas estuvieron en el intervalo 0,75-1,25. También se obtuvo una relación en el intervalo de 0,75-1,25 para el cromosoma X, lo que indica el diagnóstico correcto del sexo masculino para la línea celular de fibroblastos de ensayo.

Ejemplo 1455 *CGH de matrices usando ADN de Cot-1 amplificado por DOP-PCR*

(i) Amplificación de ADN de Cot-1

Se amplificaron 100 ng de ADN de Cot-1 (Cat. N° 15279-011, Invitrogen) usando DOP-PCR en un Minicycler (MJ, Research, Estados Unidos) en un volumen de 50 µl que contenía 5 U de Taq polimerasa (Applied Biosystems), y una concentración final de KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, gelatina 0,1 mg/ml, MgCl₂ 2,5 mM, 200 µM de cada dNTP, cebador de DOP-PCR 6MW (5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3') 2 µM (Telenius *et al.* 1992). La muestra se centrifugó brevemente, se desnaturizó a 95 °C durante 5 min, y se sometió a 8 ciclos de: 94 °C durante 1 min, 30 °C durante 1,5 min, 72 °C durante 3 min con un desnivel de 1 °C por cada 4 segundos entre las etapas de hibridación y de extensión, seguido de 29 ciclos de 94 °C durante 1 min, 62 °C durante 1 min, 72 °C durante 3 min

inicialmente, pero aumentado en 14 segundos para cada ciclo, y una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 min. Se procesaron 5 µl de productos amplificados en un gel de Agarosa al 1 % (Figura 11 panel superior) y el resto se purificó.

- 5 Como se muestra en el carril 1, el ADN de Cot-1 amplificado fue una mancha, variando la mayoría de 250 pb a 2 kb. Los marcadores de ADN fueron SPP-1/EcoRI (M₁) and pUC19/HpaII (M₂).

(ii) Resultados de CGH de matrices usando ADN de Cot-1 amplificado por DOP-PCR

- 10 Se llevó a cabo un experimento de CGH de matrices de una única célula femenina marcada con Cy3-dUTP frente a una mezcla agrupada de 5 células masculinas individuales marcadas con Cy5-dUTP exactamente como se ha descrito previamente, excepto que se usaron 140 µl de ADN de Cot-1 amplificado por DOP-PCR en lugar de 70 µg de ADN de Cot-1 (Cat. N° 15279-011, Invitrogen). Se muestran las relaciones de los 24 cromosomas obtenidas de este experimento en la Figura 11, panel inferior, que indica que las relaciones de los 22 autosomas están dentro del intervalo de 0,75-1,25 y se obtuvo una relación esperada de >1,25 para el cromosoma X. Sin embargo, el resultado para el cromosoma Y fue inadmisible.

Como se esperaba, todas las relaciones de 2 autosomas están dentro del intervalo de 0,75-1,25, y el cromosoma X proporciona una relación de >1,25, lo que indica correctamente el sexo femenino para la célula individual de ensayo.

20

Ejemplo 15

Análisis de CGH de matrices de blastómeros

25 1. Material y Métodos

(i) Preparación de blastómeros individuales

- 30 Se obtuvieron tres embriones de IVF humanos congelados de IVF Australia, Westmead, NSW, Australia, donde los embriones se descongelaron, se incubaron brevemente, se disgregaron y cada célula se aspiró en un tubo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos tubos de PCR se colocaron en hielo seco y se enviaron al laboratorio de los inventores por correo urgente. Se obtuvieron un total de 12 blastómeros individuales de los tres embriones congelados.

35 (ii) Lisis de blastómeros individuales

Se llevó a cabo la lisis de blastómeros individuales usando 5 µl de tampón de lisis (KOH 200 mM, ditiotreititol 50 mM) a 65 °C durante 10 min seguido de neutralización usando 5 µl de solución de neutralización (KCl 300 mM, Tris-HCl 900 mM, HCl 200 mM, pH 8,3).

40

(iii) Primer ciclo de DOP-PCR para amplificación aleatoria de células individuales

- Se realizó el primer ciclo de DOP-PCR en un Minicycler (MJ, Research, Estados Unidos) en un volumen de 50 µl que contenía solución neutralizada y lisada de células individuales (10 µl), 5 U de Taq polimerasa (Applied Biosystems), y una concentración final de KCl 50 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8,3, gelatina 0,1 mg/ml, MgCl₂ 2,5 mM, 200 mM de cada dNTP, cebador de DOP-PCR 6MW (5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3') 2 µM (Telenius *et al.* 1992). La muestra se centrifugó brevemente, se desnaturalizó a 95 °C durante 5 min, y se sometió a 8 ciclos de: 94 °C durante 1 min, 30 °C durante 1,5 min, 72 °C durante 3 min con un desnivel de 1 °C por cada 4 segundos entre las etapas de hibridación y de extensión, seguido de 26 ciclos de 94 °C durante 1 min, 62 °C durante 1 min, 72 °C durante 3 min inicialmente, pero aumentado en 14 segundos para cada ciclo y una etapa de extensión final a 72 °C durante 10 min.

50

(iv) Segundo ciclo de DOP-PCR para marcaje de Cy3/Cy5

- 55 Se marcaron productos de primer ciclo de DOP-PCR (5 µl) en un volumen de 50 µl, que contenía 5 U de Taq polimerasa (Applied Biosystems), y una concentración final de KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, MgCl₂ 2,5 mM, 160 µM para cada uno de dGTP, dCTP y dATP, dTTP 120 µM, 40 µM de Cy3-dUTP o Cy5-dUTP (Amersham Pharmacia Biotech, Estados Unidos) y cebador de DOP-PCR 6 MW 2 µM. La muestra se centrifugó brevemente, se desnaturalizó a 95 °C durante 4 min, y se sometió a 25 ciclos de: 94 °C durante 1 min, 62 °C durante 1 min, 72 °C durante 3 min inicialmente pero aumentado en 10 segundos por cada ciclo. Se añadió una etapa de extensión a 72 °C durante 10 min al final. Normalmente, se procesaron 5 µl de cada producto de DOP-PCR en geles de agarosa al 1 % en TBE 0,5 X para comprobar la calidad de amplificación y se purificaron los productos restantes.

60

(v) Purificación de productos marcados con Cy3 y Cy5

Se purificaron productos de DOP-PCR marcados con Cy3 o Cy5 por el kit de Limpieza de PCR UltraClean™ (*Mo Bio Laboratories*, Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se añadieron 5 volúmenes de SpinBind (Guanidina HCl/isopropanol) a los productos de PCR (45 µl) y después se mezclaron exhaustivamente por pipeteo. La mezcla de PCR/SpinBind se transfirió a una unidad de filtrado por centrifugación y se centrifugó a 14.000 rpm en una microcentrífuga durante 10-30 segundos. El flujo líquido en el tubo de recogida se descartó y se añadieron después 300 µl de tampón de SpinClean (solución de etanol) a la misma unidad de filtrado por centrifugación seguido de centrifugación a 14.000 rpm durante 30-60 segundos. El tubo de recogida que contenía el flujo del líquido se reemplazó con un tubo de recogida nuevo y se añadieron directamente 50 µl de tampón de Elución (Tris 10 mM, pH 8,0, sin DNasa) a la membrana de filtro de la misma unidad de filtrado por centrifugación seguido de centrifugación 30-60 segundos a 14.000 rpm. Se descartó la cesta de filtrado por centrifugación y el tubo de recogida contenía las sondas marcadas con Cy3 o Cy5 purificadas. Estas sondas purificadas estaban sin todos los componentes de reacción de PCR tales como cebador de DOP-PCR 6MW, sal, *Taq* polimerasa y Cy3- y Cy5-dUTP y se usaron inmediatamente en CGH de matrices o se almacenaron a -20 °C al menos durante dos meses antes del análisis de CGH de matrices. Se procesaron siempre 5 µl de cada producto purificado en un gel de agarosa al 1 % para comprobar la eficacia tanto del marcaje como de la purificación.

(vi) CGH de matrices

Se mezclaron volúmenes iguales (5 ~ 10 µl) de cada producto de DOP-PCR marcado con Cy3 (ensayo) y marcado con Cy5 (referencia) con 70 µg de ADN de Cot-1 humano (GIBCO, BRL), 20 µg de ADN de esperma de salmón cortado (GIBCO, BRL) y se precipitó con dos volúmenes de etanol al 100 %, y 1/10 del volumen de NaAC 3 M (pH 5,2). La mezcla resultante se colocó a -20 °C durante 2 horas y después se centrifugó a 14.000 rpm durante 25 min a 4 °C. Los sedimentos de ADN resultantes se lavaron una vez con etanol al 70 % seguido de centrifugación a 14.000 rpm durante 10 min a 4 °C, se secaron al aire en oscuridad o a 60 °C en un horno, y finalmente se disolvieron en 10 µl de solución de hibridación (formamida desionizada al 50 %, SSC 3X, SDS 0,1 %, dextran sulfato 10 % y solución de Denhardt 5X). Después de desnaturalización a 80 °C durante 10 min y prehibridación a 37 °C durante 80 min, la mezcla de sondas se aplicó al área de la matriz y se cubrió con un cubreobjetos. La hibridación se llevó a cabo a 37 °C durante 15-20 horas en un incubador húmedo. Después de la hibridación, los portaobjetos se sumergieron en formamida al 50 %/SSC 2 X hasta que los cubreobjetos se cayeron por sí solos (lo que tarda normalmente 10 minutos). El lavado post-hibridación incluyó dos veces en formamida al 50 %/SSC 2X a 45 °C durante 10 min, dos veces en SSC 2X a 45 °C durante 5 min, una vez en SSC 1X a temperatura ambiente durante 10 min, y tres veces de un aclarado breve en H₂O MilliQ. Todas las soluciones anteriores usadas en el lavado se filtraron a través de un filtro de 0,22 µm (MILLIPORE, Estados Unidos) antes de lavar. Después del lavado, los portaobjetos se secaron en oscuridad y después se exploraron inmediatamente, o se pudieron almacenar en oscuridad a temperatura ambiente durante al menos 73 días.

(vii) Exploración de matrices y análisis de Datos

El GenePix 4000B es un instrumento científico integrado con un explorador GenePix 4000B para explorar portaobjetos y el software GenePix Pro para análisis de datos (Axon Instruments, Union City, CA, Estados Unidos). Los láseres de GenePix 4000B excitan a 532 nm (verde) y 635 nm (rojo). Los filtros de emisión son 575DF35 (verde; ~557-592 nm) y 670DF40 (rojo; ~650-690 nm). Estos láseres y filtros se optimizan para Cy3 y Cy5. El explorador GenePix 4000B explora Cy3 y Cy5 simultáneamente y tarda aproximadamente 5 minutos para una exploración completa de un portaobjetos de microscopio convencional (25 mm x 75 mm) a una resolución de 10 micrómetros (y menos de 12 minutos para una exploración completa a una resolución de 5 micrómetros), y mucho menos tiempo para sub-exploraciones definidas por el usuario.

Exploración de matrices:

Brevemente, se usó una Exploración Preliminar (resolución de 40 micrómetros) para localizar la matriz en el portaobjetos y establecer los parámetros de exploración incluyendo tensiones del tubo Fotomultiplicador (PMT), área de exploración y potencia del láser. Se usó después una Exploración de Datos de alta resolución (10 micrómetros) para adquirir las imágenes para análisis de CGH. Los aumentos (tensiones) del tubo Fotomultiplicador (PMT) de ambos canales usados en este estudio variaron de 400 a 900 mientras que la potencia del láser de ambos canales estuvo siempre al nivel del 100 %. Los datos primarios adquiridos por GenePix 4000B son las imágenes de longitud de onda individual, y por defecto estas se guardaron como TIFF (Formato de Archivo de Imágenes Etiquetado) de escala de grises de 16 bits en una imagen múltiple individual, que incluyó la imagen de relación Cy5/Cy3 guardada en formato tanto TIFF como JPEG (Joint Photographic Experts Group). Los archivos de TIFF se usaron para análisis y los archivos de JPEG solamente para presentaciones.

Análisis de datos.

Se usó el software de GenePix Pro 4.0.1.12 para el análisis de las imágenes de TIFF. Brevemente, GenePix Pro usó archivos de una Lista de Matrices de GenePix (archivo GAL) para localizar el tamaño y posición de todos los elementos. Después del análisis, los resultados se guardaron como archivos GPR (formato de Resultados de GenePix), que incluían un encabezamiento consistente en información general acerca de la adquisición de imágenes y análisis así como los datos extraídos de cada elemento incluyendo más de 40 parámetros diferentes. En este estudio, se seleccionó la mediana de relaciones píxel a píxel (Cy3/Cy5) de intensidades de píxeles con la mediana de fondo restada para interpretación.

Exclusión de puntos para análisis:

Se usaron siete parámetros diferentes de los archivos GPR en el presente estudio para filtrado de datos, incluyendo:

1. Dia.: el diámetro en μm del indicador de característica
2. $> \% B635 + 2 \text{ DT}$: el porcentaje de píxeles del elemento con intensidades mayores de dos desviaciones típicas por encima de la intensidad de píxeles de fondo, a la longitud de onda N° 1 (635 nm, para Cy5)
3. $> \% B532 + 2 \text{ DT}$: el porcentaje de píxeles del elemento con intensidades de más de dos desviaciones típicas por encima de la intensidad de píxeles de fondo, a la longitud de onda N° 2 (523 nm, para Cy3)
4. SNR635: la relación de señal y ruido a la longitud de onda N° 1 (635 nm, para Cy5), definida por (Media del Primer Plano 1 – Media de Fondo 1)/(Desviación típica de Fondo 1)
5. SNR532: la relación de señal y ruido a la longitud de onda N° 2 (532 nm, para Cy3), definida por (Media del Primer Plano 1 – Media de Fondo 1)/(Desviación típica de Fondo 1)
6. F635 % Sat.: el porcentaje de píxeles del elemento a la longitud de onda N° 1 (para Cy5) que están saturados
7. F532 % Sat.: el porcentaje de píxeles del elemento a la longitud de onda N° 2 (para Cy3) que están saturados

Los puntos se excluyeron del análisis si no pasaban ninguno de los siguientes parámetros de: (1) Dia. $> 50 \mu\text{m}$, (2) $> \% B635 + 2 \text{ DT} > 70$, (3) $> \% B532 + 2 \text{ DT} > 70$, (4) $\text{SNR635} > 3,0$, (5) $\text{SNR532} > 3,0$, (6) $\text{F635 \% Sat.} = 0$, y (7) $\text{F532 \% Sat.} = 0$. Las definiciones de estos parámetros son como se proporcionan por Axon Instruments.

Normalización de las Relaciones

La media de las relaciones para cada cromosoma se calculó desde hasta 8 repeticiones clasificadas. La normalización se llevó a cabo después usando las 22 medias de relaciones de todos los autosomas asumiendo que el valor de relación medio de todos los autosomas en cada hibridación CGH de matrices era 1,0. Este método de normalización se realizó como se describe por el fabricante (Axon Instruments) y puede describirse brevemente de la siguiente manera:

La mediana de las relaciones para todos los puntos incluidos se promedió para cada cromosoma para proporcionar la media en bruto
 Se determina el valor Logarítmico para cada Valor de Media de Medianas de Relaciones en bruto
 Se calculó el promedio de todos los valores Logarítmicos ("Avglog")
 Se calculó el promedio Verdadero ("TrueAvg"), ($\text{TrueAvg} = 10^{\text{Avglog}}$)
 Se determinó el Factor de Normalización (NF) ($\text{NF} = 1/\text{TrueAvg}$)
 Se aplicó el factor de Normalización para cambiar de escala todas las medias de la mediana de relaciones en bruto (media Normalizada de mediana de relaciones = NF por la media de la mediana de relaciones en bruto) para proporcionar las relaciones normalizadas.

2. Resultados de CGH de matrices de blastómeros

(i) Amplificación aleatoria y marcaje de blastómeros individuales por DOP-PCR

Después de la preamplificación por DOP-PCR y marcaje con Cy3 como se muestra en la Figura 12, los 12 blastómeros, que se obtuvieron a partir de los tres embriones de estadio de escisión creados por IVF congelados donados a la investigación, produjeron un producto marcado con Cy3 satisfactorio que variaba de 300 pb a 2500 pb que contenía dos bandas específicas, de aproximadamente 450 pb y 600 pb, después de fraccionarse por tamaño en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

(ii) Análisis cromosómicos de blastómeros individuales usando CGH de matrices

Se realizó análisis de CGH de matrices usando una mezcla agrupada de 5 a 10 productos de DOP-PCR de células individuales masculinas normales marcados con Cy5 como el material de referencia. Solamente 10 de los 12 blastómeros disponibles pudieron analizarse debido a la disponibilidad limitada de las matrices. De las 10 células analizadas usando el CGH de matrices, 2 no consiguieron producir resultados analizables debido a un fondo de alta fluorescencia, probablemente el resultado de la humedad relativa adoptado para la etapa de hibridación que es accidentalmente mucho menor que el 95 % convencional.

De los 8 blastómeros que producían resultados de CGH de matrices analizables, se descubrió que tres eran normales con un cariotipo aparentemente femenino (46, XX) (blastómeros del embrión A 1 y 4, blastómero del embrión C 2). Cuatro células eran aneuploides, dos de las cuales tenían trisomía del 21 y aparentemente de cariotipos femeninos (blastómero del embrión A 2, blastómero del embrión B 1). Otras dos células eran aneuploides para el cromosoma 21 (blastómero del embrión B 2) y 18 (blastómero del embrión C 3) con posibles monosomías para los cromosomas 1 y 12 respectivamente. Finalmente, un blastómero (blastómero del embrión A 3) proporcionó un cariotipo aparentemente caótico con una relación de <0,75 para seis CSL diferentes incluyendo CSL₁, 7, 8, 14, 17 y 20, y una relación de >1,25 para otros siete CSL que contenían CSL₂, 5, 10, 12, 13, 18 y 21. Este resultado sugiere que este blastómero tenía monosomía para seis cromosomas, 1, 7, 8, 14, 17 y 20, y trisomía para otros siete cromosomas, 2, 5, 10, 12, 13, 18 y 21.

Se observó que los tres embriones analizados eran mosaicos. De las cuatro células analizadas para el embrión A, dos eran normales, una tenía trisomía del 21, y la otra tenía aneuploidía extensiva (caótica). Ambas células analizadas para el embrión B tenían trisomía del 21, y una de ellas tenía una posible monosomía del 1. De las dos células analizadas para el embrión C, una era normal y la otra tenía trisomía del 18 con una posible monosomía del 12. La determinación del sexo reveló que hasta tres embriones tenían un cariotipo aparentemente femenino y este era uniforme para todas las células de cada embrión excepto el blastómero caótico (blastómero del embrión A 3) para el que no pudo darse peso a la relación observada de 0,90 para CSL_x para los fines de la asignación del sexo.

Ejemplo 16

Preparación de sondas de ADN de BAC para impresión de matrices

Fuente de sondas de ADN de BAC (del Hospital Infantil de Mujeres, Adelaida)

RP-11-265k23 (5q35)	RP-11-849 (17p11.2)
RP-11-354m20 (10q25.2-26.11)	RP-11-280F22 (10q25.3)
RP-11-113m14 (10q26.13)	RP-11-70E19 (10q26.12)
RP-11-10P15 (10126.13)	RP-11-506P9 (10q25.3)

Dilución de ADN de BAC fuente y amplificación por DOP-PCR

Se amplificaron 100 ng del ADN de cada BAC diluido usando un ciclo de DOP-PCR convencional (Telenius, 1992) y se procesaron 5 µl de cada producto amplificado en un gel de Agarosa al 1 % y el resto de productos se purificaron y se eluyeron en 50 µl de Agua Ultrapura mediante el uso de un kit de purificación de PCR. Como se muestra en la Figura 13, excepto para RP-11-849 (1711.2), las otras 7 sondas de ADN de BAC se amplificaron con éxito por DOP-PCR.

Preparación de ADN de BAC agotado para impresión de matrices:

Se marcaron 25 µg de ADN de Cot-1 Humano (Cat. Nº 15279-011, Invitrogen) por biotina-16-dUTP (Cat. Nº 1 093 070, Roche) mediante un kit de translación de muesca (Cat. Nº 976 776) y se purificaron usando kits de purificación de PCR Ultrapure (Cat. Nº, 12500-250, Mo Bio Laboratories Inc. Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, seguido de precipitación usando 0,1 volúmenes de NaAc 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de Etanol frío al 100 %, se secaron en un Horno a 60 °C, y se resuspendieron en 100 µl de tampón de TE.

Se prepararon partículas magnéticas de estreptavidina de 4,4 mg (440 µl) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se resuspendieron en 125 µl de TRIS-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, pH 8,0, NaCl 2 M (tampón de unión y lavado 2 X).

Se mezclaron 125 µl de partículas magnéticas de estreptavidina preparadas con 100 µl de ADN de Cot-1 biotinilado y se incubaron a temperatura ambiente durante 40 min con rotación axial. Los tubos se aplicaron después a un separador de partículas magnéticas durante 10 min.

Se retiró el ADN de Cot-1 no unido lavando las perlas 3 veces en SSC 0,1 x, SDS 0,1 % a temperatura ambiente, seguido de tres lavados en SSC 0,1 x, SDS 0,1 % a 65 °C. Las perlas se resuspendieron en 100 µl de SSC 6 x, SDS 0,1 %.

Se precipitó 1 µg de cada uno del ADN de BAC 5q25 y ADN de BAC 10q25-26 mezclado 6 usando 1/10 del volumen de NaAc 3 M (pH 5,2) y 2 volúmenes de etanol al 100 % frío, se secó en un Horno a 65 °C y se resuspendió en 100 µl de SSC 6 x, SDS 0,1 %.

Se mezclaron entre sí 100 µl de perlas preparadas y 100 µl de cada uno de los ADN de BAC fuente, se desnaturalizaron hirviendo durante 10 min y se hibridaron a 65 °C durante una noche.

Los tubos se aplicaron después a un separador de partículas magnéticas durante 3 min, y el sobrenadante se retiró suavemente y se purificó usando un kit de purificación de PCR Ultrapure de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se resuspendieron en 50 µl de tampón TE (TRIS-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

- 5 Se sometieron 5 µl de productos eluidos a amplificación por CAT₄DOP-PCR (Craig, 1997). Se comprobaron 5 µl de cada producto en un gel de Agarosa al 1 % (Figura 13 panel inferior) y el resto se purificó, se eluyó en 50 µl de agua Ultrapura y se aplicó puntualmente a una microplaca como se ha descrito previamente.

Ejemplo 17

- 10 *Preparación de sondas de SEP-PCR para impresión de matrices*

(i) Secuencias específicas del cromosoma Y

- 15 Se seleccionaron 10 loci DYS diferentes:

DYS19 (3682 pb)	DYS385 (4676 pb)
DYS389 (4244 pb)	DYS390 (3872 pb)
DYS391 (4039 pb)	DYS392 (3252 pb)
DYS393 (3454 pb)	DYS437 (3043 pb)
DYS438 (3010 pb)	DYS439 (2054 pb)

(ii) Fuente de una muestra de ADN genómica masculina

- 20 Se agrupó ADN principalmente de preparaciones de linfocitos usando protocolos convencionales con kit Qiagen de más de 10 muestras diferentes de hombres normales, incluyendo diferentes nacionalidades tales como asiático, caucásico y griego, y así sucesivamente. Para hacer el ADN masculino agrupado, se mezclaron entre sí 10 µl de cada muestra.

- 25 (ii) Amplificación por PCR de Molde Largo Expandido (ELT-PCR)

Se llevó a cabo la PCR usando el sistema de PCR de Molde Largo Expandido (Cat. N° 1681 842, Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un volumen total de 50 µl para cada locus. Solamente siete de los 10 loci de DYS se amplificaron con éxito y se procesaron 10 µl de cada producto amplificado en un gel de Agarosa al 1 % como se muestra en la Figura 14 panel superior. Estos productos amplificados se denominaron S1-S7, incluyendo S1 (DYS19), S2 (DYS385), S3 (DYS 389), S4 (DYS 390), S5 (DYS 437), S6 (DYS 439) y S7 (DYS 393). Se agruparon entre sí muestras de S1, S2, S3 y S4 y se denominaron SP1. Las secuencias de cebadores usadas para amplificar estos 10 loci DYS se enumeran en la Tabla 5.

- 35 (iii) DOP-PCR usando productos amplificados por ELT-PCR

Se sometió adicionalmente a 1 µl de cada uno de cuatro productos amplificados por ELT-PCR específicos de loci DYS (DYS17, DYS385, DYS389 y DYS390) a otro ciclo de amplificación por DOP-PCR. Se procesaron 5 µl de cada producto amplificado en gel de Agarosa al 1 % como se muestra en la Figura 14 panel inferior, y el resto se purificó usando un kit de purificación Ultrapure y se almacenaron a -20 °C. Estos productos amplificados se denominaron SD1-SD4, incluyendo SD1 (DYS19), SD2 (DYS385), SD3 (DYS 389) y SD4 (DYS 390). Se agruparon entre sí muestras de SD1, SD2, SD3 y SD4 y se denominaron SPD1.

Tabla 5

- 45 Cebadores usados para amplificación de 10 loci DYS diferentes tanto para la preparación de sondas para impresión de matrices como para la preparación de dianas de células individuales para análisis de CGH usando preamplificación por extensión de Cebadores Potenciada Selectivamente (SEP).

Locus	Orientación	Secuencias de cebadores (5'→3')	Productos (pb)
DYS19	F	ATGTGGGCGATCCTATT	3682
	R	TTGACAAGCCCAAAGTT	
DYS385	F	TGAGTCGTTTAGAGGGCTTCC	4676
	R	AATCTACGGGCCACGCAT	
DYS389	F	TCCTAGGGATTAGGCCTTCAGTA	4244
	R	TGCATTAGCATGAGAGATCCTG	
DYS390	F	TGGTTCTAAATGAGGCCGAGG	3872
	R	TCGCTATGTGGGCCAGTCT	
DYS391	F	TTTTTGACAATAGCCATTCCAG	4039
	R	ACCAACATTTTCATACTAAGATAGGG	
DYS392	F	TTACAATTGAGAAACGGCTCCTG	3252
	R	TGGAGGCATCACACTACCTGAC	

Locus	Orientación	Secuencias de cebadores (5'→3')	Productos (pb)
DYS393	F	CATCTCCCAGGTTCAAGTGATTC	3454
	R	TTCGCACCAACATTCTCCATTCTG	
DYS437	F	AATGCACTCAGAGGACTGGACC	3043
	R	TGGAACCTATCTCCTGTTTCATGTG	
DYS438	F	CTCGGACTCCTGACATCAAGTG	3153
	R	GAAACCGTGCATCTAACACCAG	
DYS439	F	GCTCAGAGTCATGGTTTCCAGC	2054
	R	GCTGCATAAAGTGTCACAGAGCC	

Ejemplo 18

Preparación de dianas marcadas con Cy3- y Cy5-dUTP para análisis de CGH de matrices usando tecnología de SEP-PCR

(I) Secuencias específicas de cromosoma Y para amplificación por SEP

Se seleccionaron 7 loci DYS diferentes:

DYS19 (3682 pb) DYS385 (4676 pb)
DYS389 (4244 pb) DYS390 (3872 pb)
DYS393 (3454 pb) DYS437 (3043 pb)
DYS439 (2054 pb)

(ii) Estrategias de amplificación por SEP

Se llevó a cabo DOP-PCR de células individuales como se ha descrito previamente, excepto que se añadieron diferentes combinaciones de cebadores DYS al 1º y 2º ciclos de DOP-PCR, incluyendo

1ª combinación: 1 µl de cebadores agrupados (0,1 pmol, solamente cebador F) tanto en el 1º como el 2º ciclos de DOP-PCR

2ª combinación: 1 µl de cebadores agrupados (0,1 pmol, cebadores F y R) tanto en el 1º como el 2º ciclos de DOP-PCR

3ª combinación: 1 µl de cebadores agrupados (0,01 pmol, cebador F) tanto en el 1º como el 2º ciclos de DOP-PCR

4ª combinación: 1 µl de cebadores agrupados (0,01 pmol, cebadores F y R) tanto en el 1º como el 2º ciclos de DOP-PCR

Se amplificaron por separado 4 células femeninas individuales (Figura 15 panel superior) y cuatro células masculinas individuales (Figura 15 panel inferior) usando cada una de las cuatro condiciones anteriores. Se procesaron 5 µl de cada producto amplificado en un gel de Agarosa al 1 % como se muestra en la Figura 15, y el resto se purificó usando un kit de purificación de PCR Ultrapure.

REIVINDICACIONES

1. Un método para comparar al menos un cromosoma o parte del mismo de una célula con un primer cariotipo con el cromosoma correspondiente o parte del mismo de una célula con un segundo cariotipo, incluyendo el método las etapas de:
 - (a) amplificar aleatoriamente ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
 - (b) agotar secuencias repetitivas y/o agotar secuencias del ADN amplificado que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación aleatoria, produciéndose el agotamiento antes y/o después de la amplificación;
 - (c) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
 - (d) amplificar ADN de una o más células con un primer cariotipo y amplificar ADN de una o más células con un segundo cariotipo;
 - (e) marcar el ADN amplificado de la o las células con un primer cariotipo con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de la o las células con un segundo cariotipo con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;
 - (f) hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un primer cariotipo con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un segundo cariotipo con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y
 - (g) comparar la cantidad relativa de los primer y segundo marcadores hibridados con el ADN amplificado unidos al sustrato sólido; donde la o las células con un primer cariotipo y la o las células con un segundo cariotipo no son una o más células embrionarias humanas, una o más células germinales humanas, uno o más oocitos humanos o uno o más cuerpos polares humanos.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el método se usa para detectar una anomalía cromosómica en la célula con un primer cariotipo, para el diagnóstico prenatal de un feto donde la célula con un primer cariotipo es una célula fetal, o para la determinación del cariotipo de una célula cancerosa donde la célula con el primer cariotipo es una célula cancerosa aislada de un sujeto por biopsia o aislada de la sangre.
3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde la amplificación de ADN de una o más células con un primer cariotipo y la amplificación de ADN de una o más células con un segundo cariotipo es amplificación con cebadores aleatorios.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el ADN amplificado de una o más células con un primer cariotipo es ADN amplificado de 100 o menos células.
5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el ADN amplificado de una o más células con un primer cariotipo es ADN amplificado de 1 a 20 células.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el ADN amplificado de una o más células con un primer cariotipo es ADN amplificado de una única célula.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el marcaje del ADN amplificado de la o las células con un primer cariotipo se realiza durante o como parte de la amplificación del ADN de la o las células con un primer cariotipo.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, donde la amplificación aleatoria de ADN de la o las células con un primer cariotipo es amplificación directa de ADN extraído de las células.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, donde la lisis de las células con un primer cariotipo y la amplificación aleatoria de ADN resultante de la lisis se producen en el mismo tubo.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, donde el método incluye la etapa de realizar un ciclo adicional de amplificación aleatoria de ADN amplificado aleatoriamente de las células con un primer cariotipo y el marcaje del ADN con un primer marcador se produce simultáneamente con y/o después del ciclo adicional de amplificación aleatoria.
11. Un método de diagnóstico genético pre-implantación de un embrión o un oocito, incluyendo el método las etapas de:
 - (a) amplificar aleatoriamente ADN de un cromosoma aislado o parte de un cromosoma aislado;
 - (b) agotar secuencias repetitivas y/o agotar secuencias del ADN amplificado que están sobrerrepresentadas debido a la amplificación aleatoria, produciéndose el agotamiento antes y/o después de la amplificación;
 - (c) unir el ADN amplificado con un sustrato sólido;
 - (d) amplificar aleatoriamente ADN de una o más células embrionarias obtenidas de un embrión en el estadio de 6-8 células o después, o un cuerpo polar de oocito con un cariotipo desconocido y amplificar ADN de una o más

células con un cariotipo de referencia;

(e) marcar el ADN amplificado de la o las células embrionarias, o un cuerpo polar de un oocito con un cariotipo desconocido con un primer marcador, y marcar el ADN amplificado de una o más células con un cariotipo de referencia con un segundo marcador, donde el primer y segundo marcadores son detectablemente diferentes;

5 (f) hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo desconocido con el ADN amplificado unido al sustrato sólido, e hibridar el ADN amplificado y marcado de la o las células con un cariotipo de referencia con el ADN amplificado unido al sustrato sólido;

10 (g) detectar la presencia de una anomalía cromosómica en la o las células con el cariotipo desconocido comparando la cantidad relativa del primer marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido con la cantidad de un segundo marcador hibridado con el ADN amplificado unido al sustrato sólido; y

(h) determinar la idoneidad del embrión o el oocito para implantación por ausencia de una anomalía cromosómica.

15 12. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 2 u 11, donde la anomalía cromosómica se selecciona del grupo que consiste en un cromosoma individual extra o ausente, una parte de un cromosoma extra o ausente, una rotura cromosómica, una reordenación cromosómica, una translocación, un cromosoma dicéntrico, una inversión, una amplificación de una región cromosómica, una delección y una mutación puntual.

20 13. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la parte de un cromosoma aislado es un fragmento clonado de un cromosoma.

25 14. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde las secuencias repetitivas incluyen secuencias de Cot-1, ADN repetido sencillo, repeticiones satélite, repeticiones mini-satélite, repeticiones específicas de cromosoma, repeticiones micro-satélite, genes repetidos, secuencias derivadas de elementos transponibles, elementos derivados de múltiples copias de virus tales como retrovirus, repeticiones asociadas con centrómeros o telómeros y repeticiones asociadas con heterocromatina.

Figura 1



Figura 2

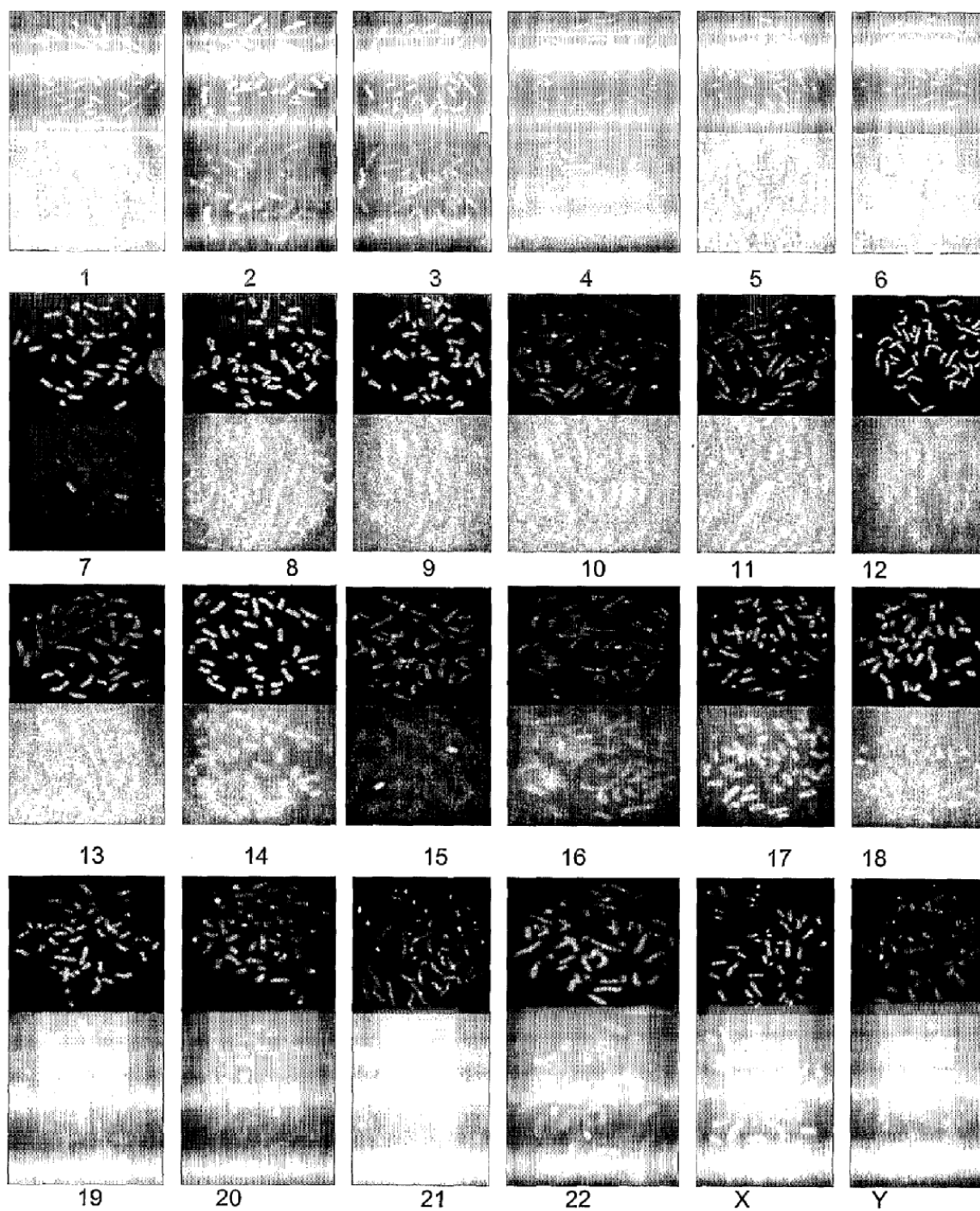


Figura 3

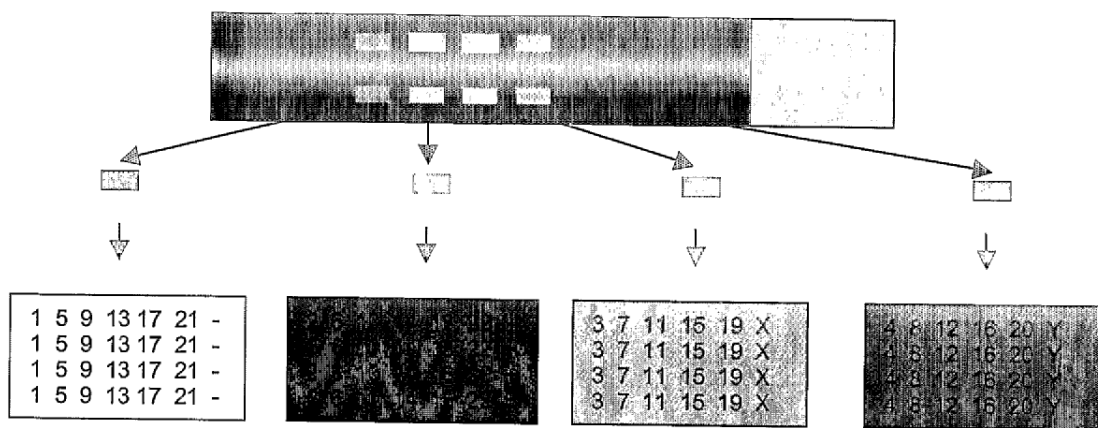


Figura 4

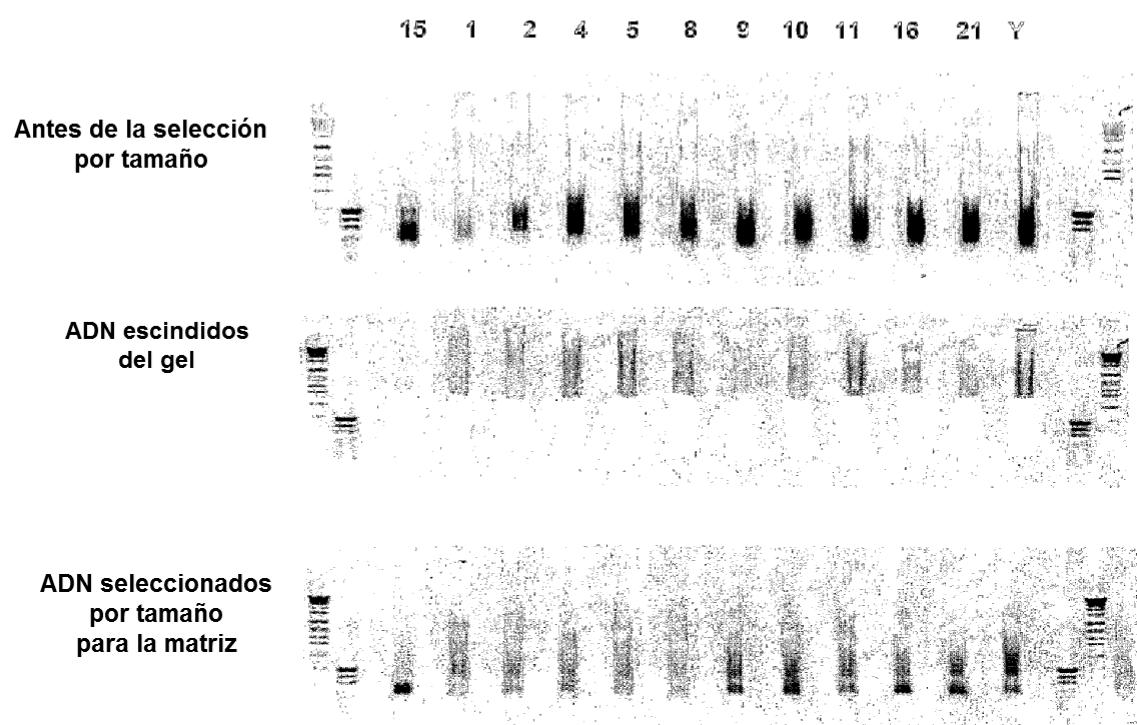


Figura 5

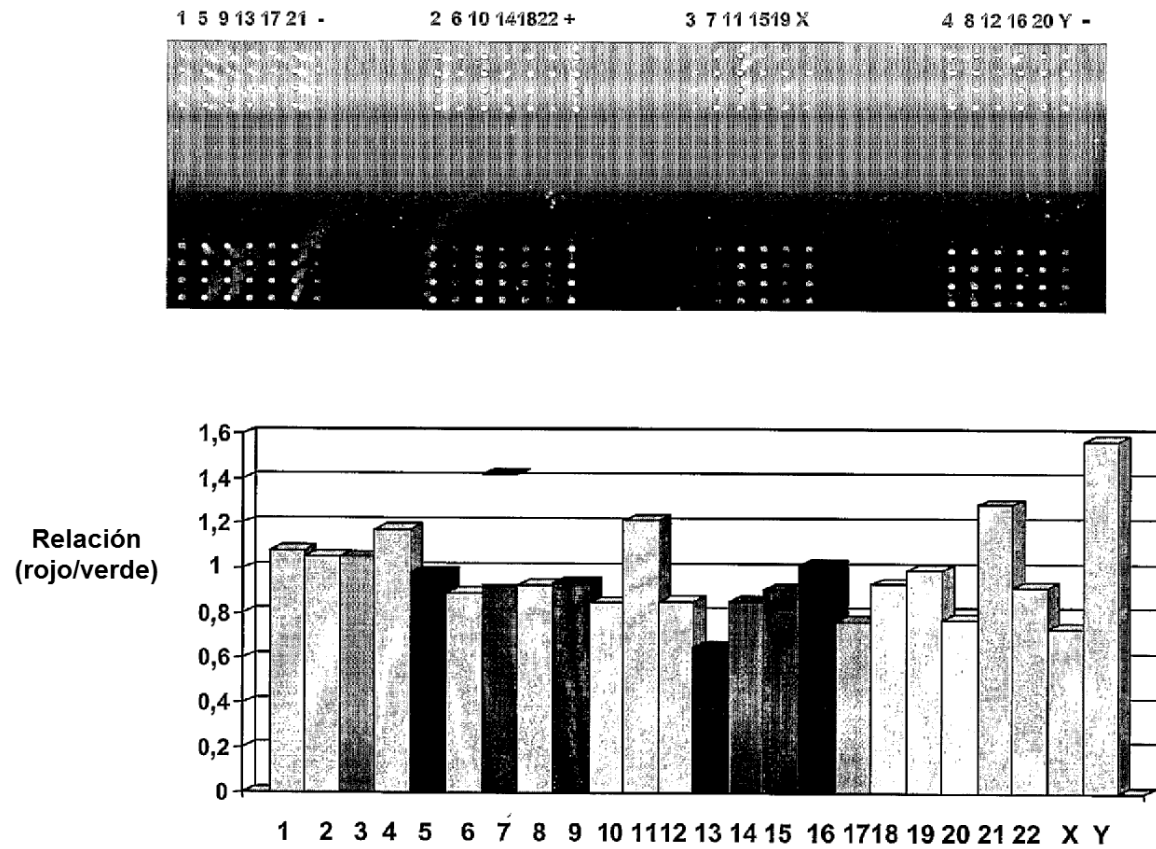


Figura 6

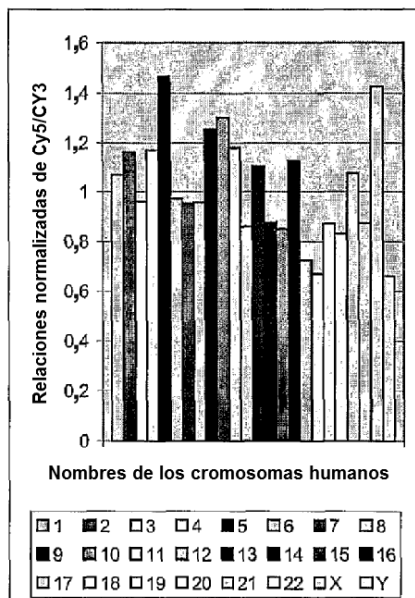
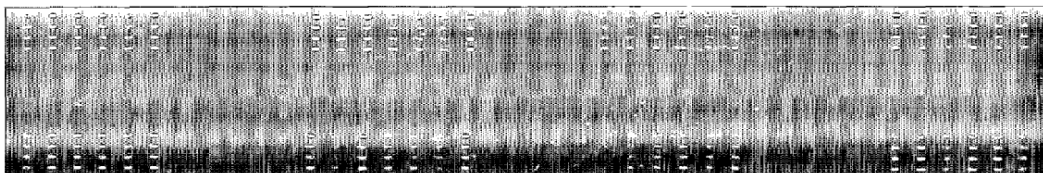


Figura 7

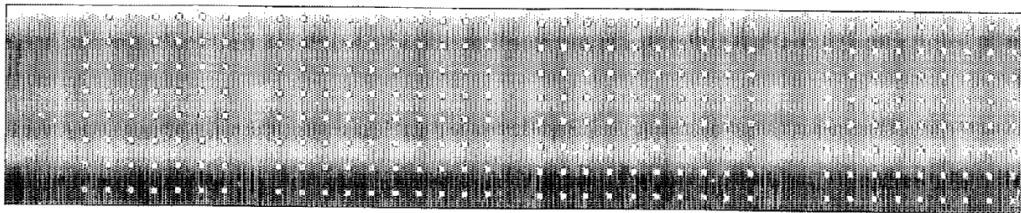


Figura 8

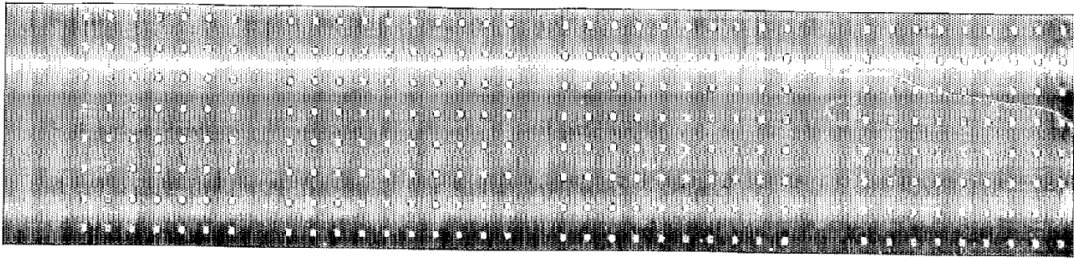


Figura 9

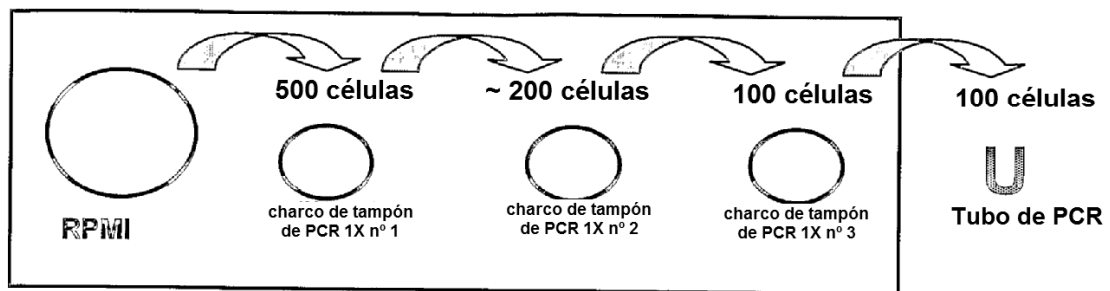


Figura 10

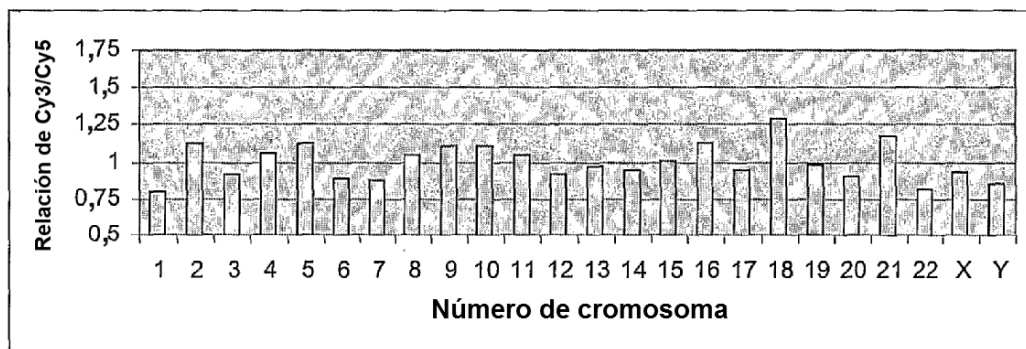
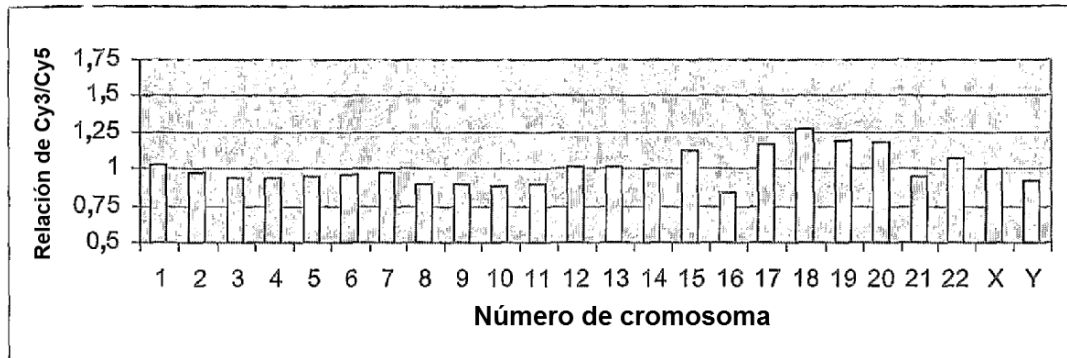


Figura 11

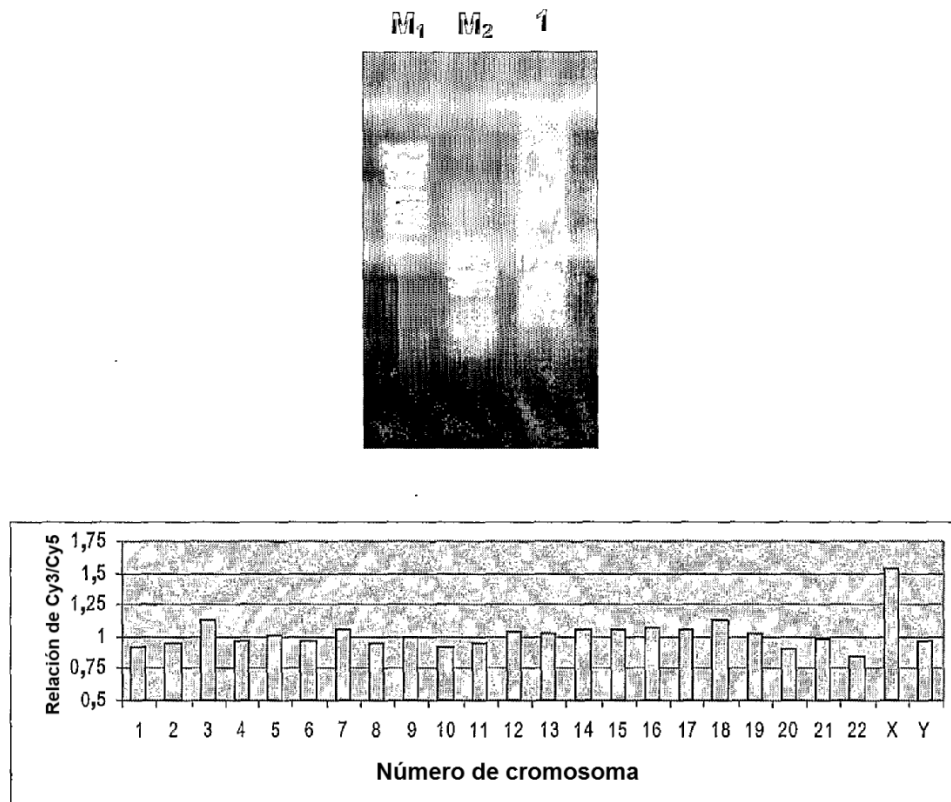


Figura 12

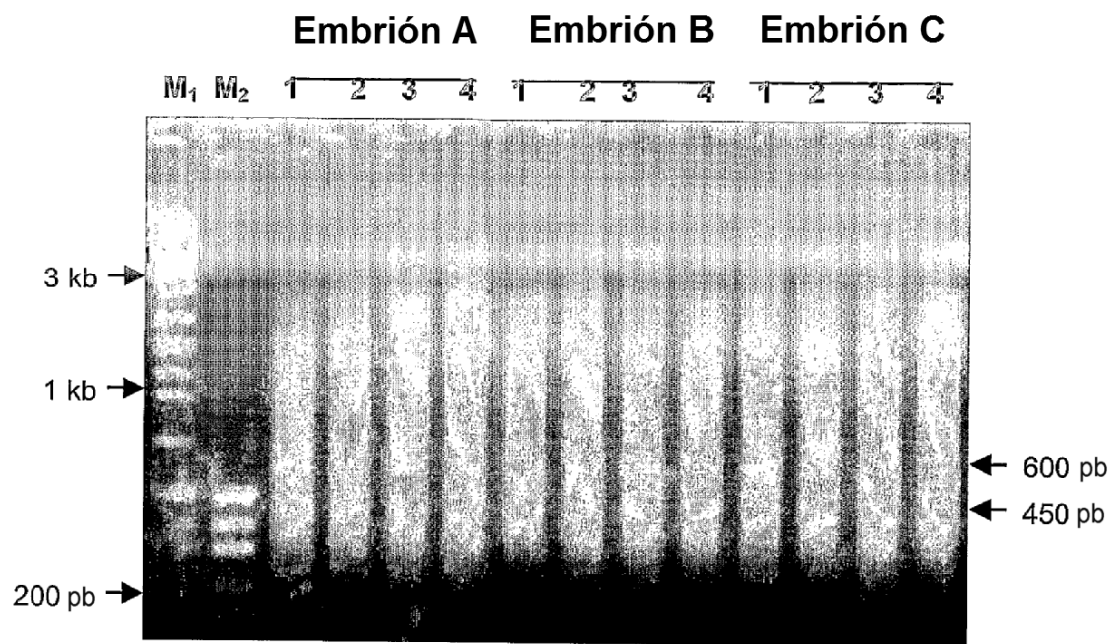


Figura 13

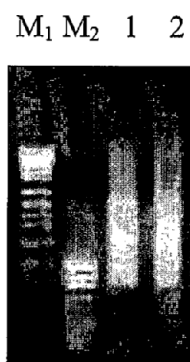
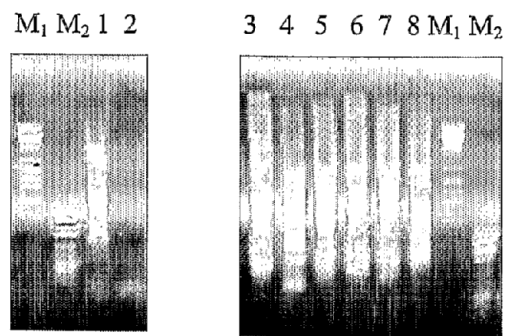
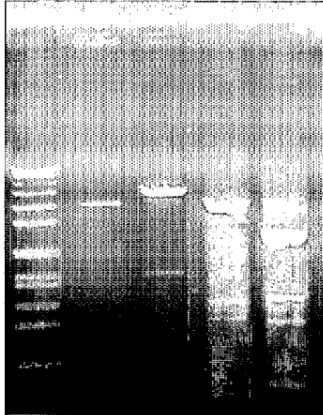


Figura 14

DYS: 19 385 437 439



389 390 393



M₁ M₂ 19 385 389 390 -

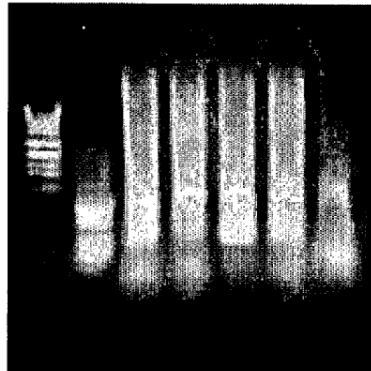


Figura 15

