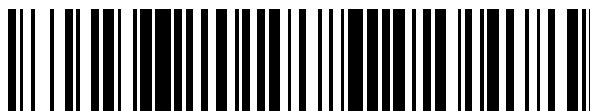


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 115**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2005 E 05802610 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 1794319**

54 Título: **Método para proveer fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada**

30 Prioridad:

30.09.2004 US 614697 P

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

12.11.2014

73 Titular/es:

**EPIGENOMICS AG (100.0%)
IP DEPARTMENT KLEINE PRÄSIDENTSTRASSE 1
10178 BERLIN, DE**

72 Inventor/es:

**BALLHAUSE, MATTHIAS;
BERLIN, KURT;
DIETRICH, DIMO;
KLUTH, ANTJE;
SCHUSTER, MATTHIAS;
WAGNER, UTE;
WASSERKORT, REINHOLD y
ZIEBARTH, HEIKE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 521 115 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

Método para proveer fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada

Campo de la invención

5 La invención se relaciona en general con un método para proveer fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada que comprende parafina, y para los análisis de la misma.

Adicionalmente, la divulgación se relaciona en general con composiciones y métodos para proveer fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada (por ejemplo, biopsias de tejido embebidas en parafina y/o fijadas, etc.), y para análisis de la misma.

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

10 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Serie No. 60/614, 697, presentada el 30 de septiembre de 2004, y titulada "Flujo de trabajo".

Antecedentes

15 Las muestras o biopsias son archivadas muchas veces de forma predeterminada en rutinas de diagnóstico. Esto se hace con el fin de conservar el tejido y para prepararlo para exámenes histológicos subsecuentes. Tal conservación es necesaria para asegurar que la biopsia no haya cambiado después de su remoción, y que los hallazgos observados correspondan con la situación del paciente, y para evitar la degradación de las estructuras celulares. De acuerdo con lo anterior, la muestra de tejido es colocada inmediatamente en un fijador por ejemplo formalina después de la remoción. Después de la fijación la muestra es embebida en parafina, lo cual permite un seccionamiento del tejido y un subsecuente examen histológico adicional.

20 Usando estos procedimientos, las biopsias son tomadas rutinariamente de pacientes para diagnóstico de enfermedades y/o para estudiar el patrón de marcadores asociados con las enfermedades. Durante las últimas décadas millones de biopsias fueron recolectadas, archivadas y almacenadas de esta manera. Estas muestras representan un recurso principal para la detección o análisis de alteraciones asociadas con trastornos o enfermedades. Por lo tanto estas muestras son invaluable, puesto que permiten la evaluación de indicadores de diagnóstico y/o prognosis en recolecciones retrospectivas.

25 Pero desafortunadamente, este recurso es accesible solamente de manera mínima por los medios biológicos moleculares, en particular por los métodos más prometedores y modernos tales como aquellos para el análisis del patrón de metilación. Esto se debe a las dificultades en obtener cantidades suficientemente grandes de ADN genómico de alta calidad y bajo coste y con mínimo esfuerzo de manipulación.

30 Estas dificultades se basan en la degradación del ADN y del ARN debido a las condiciones de fijación y almacenamiento de la muestra o biopsia, y en los métodos insuficientes para la preparación del ADN. Para preservar las estructuras morfológicas en la muestra tanto como sea posible, las biopsias se fijan usualmente muy bien. Esto tiene la desventaja de que una alta cantidad de proteínas están enlazadas covalentemente al ADN genómico y también el ADN genómico se entrecruza. Consecuentemente, el ADN genómico tiende a ser de tamaño de fragmento pequeño, tiene una baja integridad, y es contaminado por proteínas, péptidos y/o aminoácidos los cuales están entrecruzados con el ADN e interfieren con el análisis posterior.

35 La mayor parte de los métodos del arte anterior para el aislamiento del ADN de los tejidos embebidos en parafina fijados con formalina se basan en los métodos de aislamiento de ADN a partir de tejido fresco. Se llevan a cabo de la misma forma en que una persona experimentada en la técnica trataría las muestras frescas quizás con una etapa adicional de remoción de parafina. Como es bien sabido, tal procedimiento lleva solamente a rendimientos comparativamente bajos de ADN genómico, teniendo el ADN sólo una pequeña longitud de fragmento. Adicionalmente, el ADN tampoco es adecuado para métodos de análisis más sofisticados, porque todavía hay una cantidad de proteínas, péptidos y/o aminoácidos interferentes enlazados al ADN.

40 Se conocen métodos particulares "mejorados" en el arte. Por ejemplo la US 6,248,535 enseña un método para el aislamiento de ácidos nucleicos a partir de tejidos embebidos en parafina fijados con formalina. De acuerdo con este método, la muestra se desparafiniza, homogenizada antes de ser calentada en una solución caotrópica. Después de mezclar con cloroformo, después de la centrifugación, la solución tiene tres fases. La interfase contiene el ADN genómico.

Se describe un método diferente en GB 2369822. De acuerdo con esta, se colocan secciones de una muestra embebida en parafina fijada con formalina en un tubo. Se agrega un detergente, una cera y una enzima digestora de tejido, antes de que el tubo sea calentado hasta aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 minutos. Después de esto la enzima es inactivada por un incremento de temperatura hasta 96°C. Una etapa de centrifugación subsecuente lleva a una formación de capas dentro del tubo, conteniendo la capa media el ADN genómico así como el ARN.

Tales métodos llevan usualmente a grandes cantidades de ADN genómico con una cantidad importante de ARN y proteína de contaminantes. Además, los contaminantes no pueden ser removidos fácilmente porque están entrecruzados con el ADN genómico por el fijador. Además, en principio, puede ser posible también aislar fragmentos de ácido nucleico más largos con esta clase de métodos, pero la porción de fragmentos largos es muy pequeña.

Se han hecho varias propuestas para obtener fragmentos más largos: Bonin et al. enseña una exposición de una escisión de cadena sencilla después del aislamiento del ADN y una etapa de desnaturalización antes de la amplificación por PCR (Bonin S., Petrera, F., Niccolini, B., Stanta, G. (2003) J. Clin Pathol.: Mol. Pathol. 56, 184-186). De acuerdo con este método son amplificables fragmentos de hasta 300 bp.

Inadome et al. sugiere el aislamiento de la porción de fragmentos de ADN más largos por HPLC (Inadome, Y., Noguchi, M. (2003) Diagn. Mol. Pathol 12, 231-236). Este procedimiento lleva sólo a rendimientos muy bajos de ADN.

Para agrandar la cantidad de fragmentos de ADN largos aislada a partir de tejidos embebidos en parafina, fijados con formalina, Tie et al. y Siwoski et al. sugirieron una amplificación de genoma completo, (Tie, J., Serizawa, Y., Oshida, S., Usami, R., Yoshida Y. (2005) Pathol. Int. 55, 343-347; Siwoski, A., Ishkanian, A., Garnis, C., Zhang, L., Rosin, M., Lam, W.L. (2002) Mod. Pathol. 15, 889-892.). Esta solución tiene la desventaja de una baja reproducibilidad y no es aplicable cuando el ADN va a ser analizado para metilación puesto que la amplificación borra las señales de metilación.

Consecuentemente, el ADN genómico aislado de acuerdo con métodos de la técnica anterior no es adecuado para el análisis del patrón de metilación como se explica en detalle a continuación.

La importancia del análisis del patrón de metilación de ADN ha sido revelada en años recientes. Muchas enfermedades, en particular enfermedades cancerosas, están acompañadas por expresión genética modificada. Esta puede ser una mutación de los genes en sí mismos, la cual lleva a una expresión de proteínas modificadas o a una inhibición o sobreexpresión de las proteínas o enzimas. Una modulación de la expresión sin embargo puede presentarse por modificaciones epigenéticas, en particular, por cambios en el patrón de metilación de ADN. Tales modificaciones epigenéticas no afectan la secuencia de codificación real del ADN. Se ha encontrado que los procesos de metilación de ADN tienen implicaciones sustanciales para la salud, y parece ser claro que el conocimiento acerca de los procesos de metilación y modificaciones del metabolismo de metilo y metilación de ADN son esenciales para el entendimiento de las enfermedades, para la profilaxis, diagnóstico y terapia de las enfermedades.

El control preciso de los genes, el cual representa una pequeña parte solamente del genoma completo de los mamíferos, involucra la regulación en consideración del hecho de que la parte principal del ADN en el genoma no es codificante. La presencia de tales intrones que contienen ADN "troncal", elementos repetitivos y potencialmente elementos activamente transponibles, requiere mecanismos efectivos para su supresión durable (silenciamiento). Aparentemente, la metilación de citosina por ADN metil transferasas dependientes de S-adenosilmetionina (SAM), las cuales forman 5-metilcitosina, representa un mecanismo tal para la modificación de interacciones ADN-proteína. Los genes pueden ser transcritos por promotores libres de metilación, incluso cuando regiones adyacentes transcritas o no transcritas son ampliamente metiladas. Esto permite el uso y regulación de promotores de genes funcionales, mientras que se ha suprimido el ADN troncal incluyendo los elementos transponibles. La metilación también tiene lugar cabo para la supresión a largo plazo de genes enlazados X y puede llevar bien sea a una reducción o a un incremento del grado de transcripción dependiendo de donde ocurra la metilación en las unidades de transcripción.

Casi la metilación de ADN natural completa en mamíferos está restringida a las secuencias palindrómicas de nucleótido citosina-guanosina (CpG), las cuales son controladas por ADN metil transferasas. Los dinucleótidos CpG son aproximadamente 1 a 2% de todos los dinucleótidos y están concentrados en islas CpG. De acuerdo con una definición reconocida en el arte, una región se considera como una isla CpG cuando el contenido de C+G por encima de 200 bp es al menos 50% y el porcentaje de los dinucleótidos CG observados en comparación con los dinucleótidos CG esperados es mayor de 0.6 (Gardiner-Garden, M., Frommer, M. (1987) J. Mol. Biol. 196, 261-282). Típicamente, las islas CpG tienen al menos 4 dinucleótidos CpG en una secuencia de una longitud de 100 bp.

Las islas CpG localizadas en las regiones promotoras tiene frecuentemente una función reguladora para la expresión del gen correspondiente. Por ejemplo, en el caso de que la isla CpG sea hipometilada, el gen puede ser expresado. Por otro lado, la hipermetilación frecuentemente lleva a una supresión de la expresión. Normalmente los genes supresores de

tumores son hipometilados. Pero si se hacen hipermetilados, su expresión se suprime. Esto se observa muchas veces en tejidos tumorales. En contraste, los oncogenes son hipermetilados en tejidos saludables, mientras que son hipometilados muchas veces en tejidos tumorales.

La metilación de la citosina tiene el efecto de que el enlazamiento de la proteína es prohibido normalmente lo cual regula la transcripción de los genes. Esto lleva a una alteración de la expresión del gen. Con respecto al cáncer, la expresión de los genes que regulan la división celular son alteradas por lo tanto, por ejemplo, la expresión de un gen apoptótico es subregulada, mientras que la expresión de un oncógeno es sobreexpresada. Adicionalmente, la hipermetilación puede tener una influencia a largo plazo en la regulación. Las proteínas, las cuales desacetilan las histonas, son capaces de enlazarse a través de su dominio de enlace 5-metilcitosina al ADN cuando las citosinas se metilan. Esto da como resultado una desacetilación de las histonas, lo cual lleva pos sí mismo a un empaquetamiento más apretado del ADN. Debido a esto, las proteínas reguladoras no son precluidas del enlazamiento al ADN.

Necesidad pronunciada en la técnica. La detección eficiente de patrones de metilación de ADN consecuentemente es una herramienta importante para desarrollar nuevas metodologías para entender las enfermedades, para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades y para la selección de los objetivos asociados con las enfermedades. Pero por otro lado, los métodos para una detección eficiente de la metilación del ADN requieren estándares de alta calidad con respecto al material de partida del ADN genómico. Preferiblemente, los estándares son: i) el rango de fragmento de ADN está entre 150 a 1200 bp; y ii) el ADN está libre de proteínas, péptidos, aminoácidos, ARN, así como nucleótidos o bases asociados o entrecruzados, que no son parte del esqueleto del ADN.

Adicionalmente, también hay requerimientos con respecto a los métodos de acuerdo con los cuales se aísla el ADN. La razón para esto es que una buena cantidad de muestras son analizadas típicamente para el desarrollo de nuevas metodologías para la prevención, diagnóstico y tratamiento de una enfermedad y para la selección de objetivos asociados con la enfermedad. Preferiblemente, los requerimientos son: i) aislamiento de ADN de alta calidad (como se especificó anteriormente); ii) alta reproducibilidad; iii) alta confiabilidad; iv) facilidad de manipulación; v) bajo esfuerzo de manipulación; y vi) bajos costes.

Adicionalmente, puesto que en general la cantidad de muestra de tejido o biopsia es muy pequeña, es necesario que los métodos de preparación de ADN den como resultado altos rendimientos de ADN.

Debido a todos estos requerimientos, y debido a los métodos de la técnica anterior, las muestras archivadas, a pesar de ser un recurso principal en la ciencia médica, pueden ser usadas solo mínimamente para el análisis eficiente de la metilación de ADN. Así existe una necesidad técnica principal para hacer que las muestras archivadas (por ejemplo, tejidos embebidos en parafina fijados con formalina) sean eficientemente disponibles para el análisis de, por ejemplo, los patrones de metilación de ADN.

Hasta ahora, los solicitantes están al tanto de solamente un intento de resolver este problema. La WO03/083107 enseña un método para el aislamiento de ADN genómico a partir de embebidos en parafina adecuado para análisis subsecuente de metilación de ADN por PCR específico para metilación (MSP). En principio la muestra desparafinada fijada en formalina es sometida a ebullición en un regulador de citrato pH 6.0, el cual recupera parte de las citosinas que lo hacen más accesible para el tratamiento y análisis subsecuentes. Sin embargo este método es conflictivo con respecto al objetivo de proveer tantos fragmentos de ADN como sea posible. De acuerdo con este método el ADN es puesto en contacto con un regulador de pH ácido. Tal como es bien conocido en la técnica relevante, tal tratamiento reduce la integridad del ADN resultante en una ruptura aleatoria de la cadena de ADN y por lo tanto en la longitud de los fragmentos de ADN.

LEHMANN U. et al. ("Real-Time PCR Analysis of DNA and RNA Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Biopsies" METHODS vol. 25, no. 4, 2001, pages 409-418) describe un método para proveer fragmentos de ADN a partir de una muestra archivada que comprende ADN y parafina que consiste de (i) llevar a cabo una etapa de lisis con una proteasa sobre las muestras obtenidas por microdissección por captura por láser de secciones fijadas con formalina rehidratadas antes de la marcación inmunohistoquímica y la microdissección, proveyendo por lo tanto una cantidad de ADN accesible tratado con proteasa; (ii) inactivar la proteasa mediante calor; (iii) tratar el ADN con un reactivo de bisulfito sin una etapa anterior de extracción de ADN. QUACH N. et al. ("In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR", BMC CLINICAL PATHOLOGY, vol. 4, no. 1, 12 February 2004, page 1) describe obtener una muestra archivada que comprende ADN y parafina, someter la muestra directamente a una etapa de lisis con una proteasa, en donde la parafina es licuada por calentamiento, inactivar la proteasa por calor, centrifugar para eliminar residuos y extraer el ADN con fenol-cloroformo antes del tratamiento con bisulfito.

Resumen

Aspectos de la presente divulgación se relaciona con composiciones y métodos para proveer fragmentos de ADN a partir de una muestra archivada. Aspectos particulares proveen composiciones y métodos para proveer fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada, en donde el rendimiento de ADN antes, por ejemplo, de una etapa de amplificación es al menos 20%, y son aplicables aplicones hasta una longitud de aproximadamente 1000 pares de bases.

- 5 Aspectos adicionales proveen un método para la preparación de ADN genómico a partir de muestras de tejido embebidas en parafina fijadas con formalina, en donde se aíslan altos rendimientos de ADN así como una porción sustancial del ADN consiste de fragmentos de ADN largos. En aspectos particulares, el ADN genómico aislado está libre de proteínas, péptidos, aminoácidos o ARN asociados o entrecruzados contaminantes. En aspectos particulares, los métodos son caracterizados por alta reproducibilidad y alta confiabilidad. En aspectos particulares, los métodos son fáciles de manejar, tienen un bajo
10 esfuerzo de manipulación y son efectivos en costes.

Realizaciones particularmente preferidas que proveen composiciones y métodos que se caracterizan adicionalmente porque

i) el ADN extraído de una muestra archivada es sometido a un tratamiento con bisulfito;

ii) el rendimiento de ADN después de una etapa de tratamiento con bisulfito y una etapa de purificación subsecuente y antes de una etapa de amplificación es 30-50%;

- 15 iii) los amplicones de hasta una longitud de 600 pares de bases son amplificables después del tratamiento con bisulfito y purificación subsecuente;

y iv) en promedio al menos 10% de los fragmentos de ADN son amplificables después del tratamiento con bisulfito y purificación subsecuente

en una reacción de PCR que da como resultado fragmentos de al menos 110 bp de longitud.

- 20 Aspectos adicionales proveen un kit de prueba para llevar a cabo el método divulgado o una realización del método divulgado. En aspectos particulares, los kits de prueba comprenden uno o más de los siguientes: un contenedor, solventes orgánicos para la remoción de parafina, proteinasa K, regulador para la lisis de tejido, soluciones y/o dispositivos para extracción de ADN, soluciones y/o dispositivos para el tratamiento con bisulfito, soluciones y/o dispositivos para la purificación de ADN, soluciones y/o sustancias para la amplificación de ADN, un manual y/o descripción para llevar a cabo el
25 método divulgado.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, las posiciones de muestras de ADN y placas de PCR sobre una estación de trabajo TECAN.

- 30 La figura 2 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, resultados de una cuantificación por PCR en tiempo real de ADN bisulfito reunido derivado de diferentes especímenes embebidos en parafina fijados con formalina - Influencia de la concentración de dNTP sobre el rendimiento de PCR (Ejemplo 11).

La figura 3 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, resultados de la cuantificación de PCR en tiempo real de ADN bisulfito reunido derivado de diferentes especímenes embebidos en parafina fijados con formalina - Influencia del tiempo de extensión sobre el rendimiento de PCR (Ejemplo 11).

- 35 La figura 4 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, resultados de cuantificación por PCR en tiempo real de ADN bisulfito reunido derivado de diferentes especímenes embebidos en parafina fijados con formalina - Influencia de la cantidad de polimerasa sobre el rendimiento de PCR (Ejemplo 11).

La figura 5 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, rendimiento de ADN tratado con bisulfito después de la purificación derivado de biopsias de próstata embebidas en parafina fijadas con formalina (Ejemplo 12).

- 40 La figura 6 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el contenido de ADN amplificable después del tratamiento con bisulfito y subsecuente purificación (El contenido está definido por la relación de ADN amplificable determinada de acuerdo con el ejemplo 10c y el valor UV determinado de acuerdo con el ejemplo 10a el cual refleja la cantidad total de ADN presente en la muestra; Ejemplo 12).

- 45 La figura 7 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, la amplificación por PCR de amplicones específicos de bisulfito que varían de 185 bp hasta 711 bp. A: ADN de plantilla HMW (control positivo). B: ADN de plantilla tratada con bisulfito y

purificada subsecuentemente derivada de tejido embebido en parafina tratado con formalina. Se usaron 30 ng de ADN de plantilla y 1 U de Taq polimerasa en un volumen total de 25 µl. C: ADN de plantilla tratado con bisulfito y purificado subsecuentemente derivado de tejido embebido en parafina y fijado con formalina. Se usaron 30 ng de ADN de plantilla y 3 U de Taq polimerasa en un volumen total de 25 µl (Ejemplo 13).

5 La Figura 8 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el ADN total en lisados cuantificado de acuerdo con el ejemplo 10d (ensayo CFF1; datos escalados logarítmicamente). Todos los datos son medias de cuatro muestras procesadas independientemente por espécimen incluyendo la desviación estándar (Ejemplo 14).

10 La figura 9 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el ADN total en extractos cuantificado de acuerdo con el ejemplo 10d (ensayo CFF1; datos escalados logarítmicamente). Todos los datos son medias de cuatro muestras procesadas independientemente por espécimen incluyendo la desviación estándar (Ejemplo 14).

La figura 10 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el rendimiento de ADN después de la extracción (relación de ADN en extracto y ADN en lisado). Todos los datos son medias de cuatro muestras procesadas independientemente por espécimen incluyendo la desviación estándar (Ejemplo 14).

15 La figura 11 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, la cantidad total de ADN físicamente presente según se determina mediante espectrofotometría UV (Este ADN contiene ADN tanto amplificable como no amplificable).

Todos los datos son medias de cuatro muestras procesadas independientemente por espécimen incluyendo la desviación estándar (Ejemplo 14).

20 La figura 12 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el contenido de ADN amplificable en extractos. El contenido es determinado por la relación de ADN cuantificable de acuerdo con el ejemplo 10d (ensayo CFF1) y de ADN cuantificado de acuerdo con el Ejemplo 10a (valor UV a partir del cual se calcula la cantidad total de ADN físicamente presente)]. Todos los datos son medias de cuatro muestras procesadas independientemente por espécimen incluyendo la desviación estándar (Ejemplo 14).

La figura 13 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el ADN total en lisados cuantificado de acuerdo con el Ejemplo 10d (ensayo CFF1; datos escalados logarítmicamente) (Ejemplo 15).

25 La figura 14 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el ADN total en extracto cuantificado de acuerdo con el Ejemplo 10d (ensayo CFF1; datos escalados logarítmicamente) (Ejemplo 15).

La figura 15 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el rendimiento de ADN después de la extracción (relación de ADN en extracto y ADN en lisado) (Ejemplo 15).

30 La figura 16 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, la cantidad total de ADN presente físicamente como se determina por espectrofotometría UV (Este ADN contiene tanto ADN amplificable como no amplificable) (Ejemplo 15).

La figura 17 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el contenido de ADN amplificable en extractos. El contenido es determinado por la relación de ADN cuantificado de acuerdo con el Ejemplo 10d (ensayo CFF1) y el ADN cuantificado de acuerdo con el Ejemplo 10a (valor UV a partir del cual se calcula la cantidad total de ADN presente físicamente) (Ejemplo 15).

35 La figura 18 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el rendimiento total de ADN después del tratamiento con bisulfito y subsecuente purificación. La cuantificación fue llevada a cabo de acuerdo con el Ejemplo 10d (ensayo CFF1; datos escalados logarítmicamente). Todos los datos son medias de dos muestras procesadas independientemente por espécimen.

40 La figura 19 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el rendimiento total de ADN después del tratamiento con bisulfito y purificación subsecuente. La cuantificación fue llevada a cabo de acuerdo con el Ejemplo 10c (ensayo C3; datos escalados logarítmicamente). Todos los datos son medias de dos muestras procesadas de independientemente por espécimen (Ejemplo 16).

45 La figura 20 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el rendimiento total de ADN después del tratamiento con bisulfito y purificación subsecuente. La cuantificación fue llevada a cabo de acuerdo con el Ejemplo 10d (ensayo CFF1; datos a escala logarítmica). Todos los datos son medias de cuatro muestras procesadas independientemente por espécimen (Ejemplo 17).

La figura 21 muestra, de acuerdo con aspectos particulares, el rendimiento total de ADN después del tratamiento con bisulfito y purificación subsecuente. La cuantificación fue llevada a cabo de acuerdo con el ejemplo 10c (ensayo C3; datos escalados logarítmicamente). Todos los datos son la media de cuatro muestras procesadas independientemente por espécimen (Ejemplo 17).

5 Descripción detallada

Para alcanzar diversos objetivos técnicos, aspectos de la divulgación enseñan composiciones y métodos para proveer fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada, caracterizados porque el rendimiento de ADN antes de una etapa de amplificación es al menos 20%, y los amplicones hasta una longitud de 1000 pares de bases son amplificables. Aspectos particulares proveen métodos para encontrar entre una enorme pluralidad de métodos conocidos para la remoción de parafina, lisis de tejido, extracción de ADN, tratamiento con bisulfito, purificación de ADN y amplificación de ADN aquellos métodos que en principio puedan ser utilizados para resolver el objetivo técnico de la divulgación. Aspectos particulares proveen combinaciones y ajustes adecuados de estos métodos uno con otro de forma que permiten satisfacer los objetivos técnicos.

Ventajas de aspectos de la divulgación

- 15 En aspectos particulares, el método inventivo de ejemplo tiene las siguientes ventajas: Tiene un bajo esfuerzo de manipulación, porque incluye sólo una cantidad muy limitada de etapas las cuales tienen que llevarse a cabo. Adicionalmente, es posible llevar a cabo el método de la divulgación en una escala de placa. Además las diferentes etapas también pueden automatizarse y por lo tanto puede utilizarse la robótica. La ejecución en escala de placa y la adecuabilidad del método para automatización también lleva a una reducción en costes. Además los costes son reducidos adicionalmente por el uso de dispositivos y soluciones que son disponibles a bajos desembolsos.

Otra ventaja del método de la divulgación es que cada etapa puede ser ejecutada fácilmente porque solamente se requiere equipo de laboratorio estándar para su ejecución.

Debido a su simplicidad, su adecuabilidad para automatización, su bajo esfuerzo de manipulación así como su fácil manipulación, el método de la divulgación tiene una alta confiabilidad y reproducibilidad.

- 25 Además, el ADN provisto por este método es caracterizado por su alta calidad, incluso donde se ha usado una embebida en parafina fijada con formalina archivada como material de partida. Adicionalmente, el ADN provisto de acuerdo con este método comprende una fracción notable de fragmentos largos (en promedio el 10% de los fragmentos tiene al menos una longitud de 110 bp) y sorprendentemente los fragmentos largos son amplificables (hasta 600 bp). El ADN es caracterizado además porque solamente proteínas y péptidos menores contaminantes están enlazados a él. Estas contaminaciones son tan ligeras que el tratamiento con bisulfito es apenas ligeramente perturbado si lo es.

Por otro lado, pueden obtenerse rendimientos relativamente altos de ADN de manera confiable a partir de la muestra archivada con una alta reproducibilidad adicional. Por lo tanto es posible obtener a partir sólo de muestras muy pequeñas suficiente ADN para el análisis de metilación.

Aspectos del método de la divulgación

- 35 El método de la divulgación es un método para proveer fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada. De acuerdo con el método de la divulgación, el rendimiento de ADN antes de cualquier amplificación es al menos 20%. Para la determinación del rendimiento de ADN, se determina el rendimiento de ADN de cada etapa del método de acuerdo con la divulgación. El rendimiento global se calcula entonces por multiplicación de los rendimientos de las etapas individuales según es conocido por los expertos en la técnica. El rendimiento de ADN para cada etapa individual puede ser llevado a cabo (determinado) como se describe en detalle en los EJEMPLOS presente 10, 12, y 14-18, o por cualquier otro método adecuado conocido para los experimentados en la técnica, por ejemplo, UV 260/280 nm o electroforesis en gel especialmente en combinación con un sistema de detección como un sistema de formación de imágenes fosforescentes.

Adicionalmente, aspectos particulares del invento de ejemplo son caracterizados porque los amplicones hasta de una longitud de 1000 bp son amplificables, si se lleva a cabo o no un tratamiento con bisulfito.

- 45 Una etapa de tratamiento con bisulfito llevada a cabo de acuerdo con el estado de la técnica reduce la capacidad de amplificación de los amplicones si el ADN tratado con bisulfito se utiliza como plantilla. Sin embargo, las etapas individuales de los métodos inventivos de ejemplo están armonizadas de tal manera y la etapa de tratamiento con bisulfito se lleva a cabo de tal forma que la aplicación del tratamiento con bisulfito tiene casi ninguna influencia sobre la capacidad/eficiencia de la amplificación.

En resumen, el método de la divulgación es un método para proveer fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada, que se caracteriza porque

- el rendimiento de ADN antes de la etapa de amplificación es al menos 20%, y
- los amplicones hasta una longitud de 1000 pares de bases son amplificables.

- 5 Aquí, amplificable significa que cualquier amplicón de una longitud deseada puede ser amplificado por los correspondientes cebadores durante una amplificación por PCR. La amplificación por PCR puede ser PCR estándar o PCR en tiempo real o cualquier amplificación por PCR conocida para los experimentados en la técnica. Desde luego, también pueden ser usados métodos que llevan a resultados similares como la reacción en cadena ligada por ligasa (LCR) o la técnica NASBA/TMA. El amplicón se detecta entonces por medio de fluorescencia por técnicas estándar, por ejemplo por medio de colorantes intercalantes como bromuro de etidio o verde SYBR o marcadores unidos a los cebadores o nucleótidos usados. Métodos adecuados para la detección son conocidos por los experimentados en la técnica.
- 10

En una realización adicional, el método de la divulgación está caracterizado porque

- el rendimiento de ADN antes de una etapa de amplificación es 20-60%, y
- los amplicones hasta una longitud de 600 pares de bases son amplificables.

- 15 En una realización particular preferida, el método de la divulgación comprende una etapa de tratamiento con bisulfito. Después de la necesaria etapa de purificación de ADN, el rendimiento global de ADN es al menos 20%, preferible en el rango de 30-50%. Adicionalmente, ADN después del tratamiento con bisulfito y la etapa de purificación es caracterizado adicionalmente porque al menos 5 de los fragmentos de ADN son amplificables en una reacción de PCR dando como resultado fragmentos de al menos 110 bp de longitud. En una realización particularmente preferida, este ADN está
- 20 caracterizado porque 5-60% de los fragmentos de ADN son amplificables en una reacción de PCR dando como resultado fragmentos de al menos 110 bp de longitud. En una realización especialmente preferida, un promedio de 10% del ADN purificado es amplificable en una reacción de PCR dando como resultado fragmentos de al menos 110 bp de longitud. Estos valores pueden ser determinados como se ejemplifica en los ejemplos 10 y 14.

- 25 Por lo tanto, en una realización, el método de la divulgación es un método para proveer fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada, caracterizado porque

- a) se extrae el ADN,
- b) el ADN extraído es tratado con bisulfito
- c) el ADN tratado con bisulfito es purificado, con lo cual
- (i) el rendimiento del ADN purificado es al menos 20% del ADN contenido en la muestra archivada,

- 30 (ii) al menos 5% del ADN purificado es amplificable en una reacción de PCR que genera fragmentos de al menos 110 bp de longitud.

En una realización preferida, el método de la divulgación es caracterizado porque el rendimiento de ADN en la etapa c (i) está entre 30-50%

- 35 En una realización preferida, el método de la divulgación está caracterizado porque en la etapa c (ii) 5-60% del ADN purificado es amplificable en una reacción de PCR generando fragmentos de al menos 110 bp de longitud

En una realización preferida, el método de la divulgación es caracterizado porque en la etapa c (ii) un promedio de 10% del ADN purificado es amplificable en una reacción de PCR generando fragmentos de al menos 110 bp de longitud.

- 40 En una realización especialmente preferida, el método de la divulgación es caracterizado adicionalmente porque en promedio al menos 10% de los fragmentos de ADN son amplificables después del tratamiento con bisulfito y purificación subsecuente en una reacción de PCR dando como resultado fragmentos de al menos 110 bp longitud.

En otra realización especialmente preferida, el método de la divulgación es caracterizada adicionalmente porque entre 7-60% de los fragmentos de ADN son amplificables después del tratamiento con bisulfito y purificación subsecuente en una reacción de PCR dando como resultados fragmentos de al menos 70 bp de longitud. Más preferiblemente, en promedio 15%

son amplificables después del tratamiento con bisulfito y purificación subsecuente en una reacción de PCR dando como resultado fragmentos de al menos 70 bp de longitud.

Muestra archivada

De acuerdo con la divulgación la muestra archivada es una biopsia embebida en parafina y/ o fijada o una sección de tejido embebida en parafina y/o fijada o partes de la misma, por ejemplo muestras microdisseccionadas. Por lo tanto el término "biopsia" se refiere a cualquier clase de biopsia por aguja o cualquier clase de muestra de tejido recolectada durante una cirugía. Además, el término "sección de tejido" se refiere a cualquier parte de una biopsia por ejemplo derivada por seccionamiento por micrótopo de la biopsia. Como es bien sabido por los experimentados en la técnica, es difícil determinar el peso real de una sección de tejidos. Estas dificultades son causadas aquí porque las secciones usualmente frágil, delgada y pegajosa. Adicionalmente, es también importante tener en mente el porcentaje de parafina que rodea el tejido. De acuerdo con la divulgación, se prefieren las muestras que tienen un porcentaje de parafina de 50% o menos. Típicamente 1-6, en particular tres secciones de 10 µm de espesor con un área de tejido en el rango de 0.7 cm x 0.7 cm a 2.5 cm x 3.5 cm se utilizan como material de partida. Una persona con habilidades normales en la técnica sabrá cómo ajustar el método de acuerdo con la divulgación para utilizar muestras que tienen un porcentaje de parafina de más de 50% o en el caso de que las secciones usadas tengan un área menor o mayor de tejido. Para muestras obtenidas por biopsia, se escogen diferentes cantidades como material de partida. Típicamente 1-6, son usadas en particular tres secciones de 10 µm de espesor de una muestra de biopsia. La muestra de biopsia comprende 1-6, preferiblemente 3 biopsias embebidas en parafina. Biopsias típicas son cilíndricas teniendo un diámetro de aproximadamente 1 cm, no pudiendo ser estandarizada la longitud. Una persona con habilidades ordinarias en la técnica sabrá cómo seleccionar una cantidad suficiente de material de partida de una muestra de biopsia si la muestra contiene más biopsias. Además también sabrá cómo seleccionar una cantidad equivalente de biopsia no seccionada, la cual puede ser usada de acuerdo con la divulgación. De nuevo, una persona con habilidades normales en la técnica sabrá cómo seleccionar una cantidad apropiada de material de partida. Desde luego, el método de la divulgación también es aplicable para muestras fijadas con otros fijadores como glutaraldehído, fijador de Bouin, isopentano, o fijadores basados en alcohol como metanol o etanol.

En una realización de la divulgación, la muestra archivada es una muestra fijada con formalina, típicamente embebida en parafina. Pero también muestras tratadas con formalina que no están embebidas en parafina pueden ser utilizadas como material de partida. Desde luego las muestras frescas o congeladas frescas también pueden ser sujeto del método de acuerdo con la divulgación el cual puede entonces empezar directamente con la etapa de lisis.

En una realización de la divulgación la muestra archivada es una biopsia de tejido embebido en parafina y/o fijada o una sección de tejido embebida en parafina y/o fijada.

Etapas del método de acuerdo con la divulgación

Una realización de la divulgación comprende una etapa de remoción opcional de la parafina, una etapa de lisis, una etapa opcional de extracción de ADN, una etapa opcional de tratamiento con bisulfito, una etapa opcional de purificación y una etapa de amplificación. El método puede ser llevado a cabo a escala de placa o a escala de tubo. Puede ser llevado a cabo manualmente o mediante un robot. Así, es posible llevar a cabo el método de la invención manualmente en escala de tubo así como en escala de placa manualmente o mediante un robot. Esta última posibilidad tiene la ventaja de un esfuerzo de manipulación bajo y una reducción en costes.

Una realización de la divulgación comprende una etapa de remoción de parafina, una etapa de lisis, una etapa de extracción de ADN, una etapa de tratamiento con bisulfito, una etapa de purificación y una etapa de amplificación.

En otra realización, la muestra archivada es sometida directamente a la etapa de lisis, en donde la parafina es licuada por calentamiento. Esta etapa de lisis lleva típicamente a ADN libre de entrecruzamientos, haciendo posible también eliminar la etapa de extracción de ADN y continuar con la etapa de tratamiento con bisulfito si se desea, seguida por la etapa de amplificación.

Para las dos realizaciones antes mencionadas, se prefiere que la etapa de bisulfito pueda ser obviada así como la etapa de purificación subsecuente para aplicaciones adecuadas que puedan seguir. Por lo tanto en una realización particular se prefiere que la etapa de extracción de ADN se lleve a cabo por medio de columnas Minelute™ que son parte del QIAamp DNA Micro Kit. Muy sorprendentemente, tal procedimiento lleva la ventaja de que la porción de ADN amplificable es comparablemente grande si se usa el eluido de la primera etapa de elución de la columnas Minelute™ (véase más abajo)

Obviar la etapa de tratamiento con bisulfito y la subsecuente etapa de purificación de ADN también es particularmente preferido si no es necesario un tratamiento con bisulfito para el análisis de la metilación de ADN por ejemplo mediante el uso de enzimas de restricción. Un ejemplo de tal método es el método DMH tal como se describe más abajo o el ensayo de

restricción también conocido como método de evaluación de Mest como se describe en DE102004029700.2 o en PCT/DE205/001109.

5 En principio, para las realizaciones citadas anteriormente, también es posible obviar la etapa de amplificación si no es necesaria para el análisis subsiguiente como restricción sensible a la metilación y subsecuente análisis por transferencias Southern. Por otro lado, la etapa de amplificación puede ser ventajosa incluso si no es necesaria para la detección real del estado de metilación del ADN. Esto es por ejemplo el caso, si solamente se proveen pequeñas cantidades de fragmentos de ADN grandes. Una amplificación en este caso produciría una disminución de la sensibilidad de los métodos subsecuentes para el análisis de metilación de ADN.

El método de acuerdo con la divulgación comprende las siguientes etapas:

- 10 a) opcional, una etapa de remoción de parafina,
b) una etapa de lisis, c) opcional, una etapa de extracción de ADN
d) opcional, una etapa de tratamiento con bisulfito
e) opcional, una etapa de purificación
f) una etapa de amplificación

15 Etapa de remoción de parafina

De acuerdo con la divulgación la etapa de remoción de parafina comprende la disolución de la parafina mediante un solvente orgánico. En una realización preferida la muestra es lavada adicionalmente con otro solvente orgánico lo cual permite después una mejor rehidratación. Por lo tanto en una realización la etapa de remoción de parafina comprende la disolución de la parafina mediante un solvente orgánico o la disolución de la parafina mediante un solvente orgánico y lavado con otro solvente orgánico.

25 En una realización preferida, el solvente orgánico que disuelve la parafina es un solvente del grupo "limoneno, xileno o cualquier mezcla de estos solventes". En particular, se prefiere que el solvente orgánico sea limoneno. Esto es especialmente favorable porque el limoneno es menos peligroso, menos nocivo para la salud y el ambiente que otros solventes adecuados. Adicionalmente, también es posible utilizar solventes orgánicos como benceno, etilbenceno, tolueno, isoparafina (también conocida como x-tra-solve (medite medizintechnik)) o cualquier solvente con propiedades químicas similares o cualquier mezcla de dichos solventes.

30 Un solvente orgánico que es adecuado para lavar la muestra y prepararla para una mejor rehidratación después de la disolución de la parafina es un solvente del grupo de "etanol, metanol, isopropanol o cualquier mezcla de estos solventes uno con otro o con agua". Se prefiere particularmente usar etanol como solvente de lavado después de la disolución de la parafina. Desde luego también pueden usarse solventes adicionales con propiedades químicas comparables.

En la realización de la divulgación el solvente orgánico para disolver la parafina es un solvente del grupo "limoneno, xileno o cualquier mezcla de estos solventes ", y en donde el solvente de lavado es un solvente del grupo de "etanol, metanol, isopropanol o cualquier mezcla de estos solventes uno con otro o con agua".

35 En una realización preferida de la divulgación la etapa de remoción de parafina comprende la adición de un volumen adecuado de limoneno a la muestra archivada. El volumen de limoneno por lo tanto es dependiente de la cantidad de muestra. Para 1-6 secciones de 10 µm que son usadas típicamente como material de partida (véase más arriba) se usa 0.1-3 ml de limoneno. Una persona con habilidades normales en la técnica sabrá cómo ajustar el volumen de limoneno para muestras menores o mayores. Después de la incubación, preferiblemente durante al menos 5 minutos a 10-70°C, y centrifugación se remueve el limoneno con la parafina disuelta.

40 En una realización de la divulgación, la etapa de remoción de parafina comprende

- adición de 0.1-3 ml de limoneno a la muestra archivada,
- incubación durante al menos 5 minutos a 10-70°C,
- centrifugación, y

- remoción del limoneno.

En una realización particularmente preferida se agregan 0.5-1.5 ml, preferiblemente 1 ml de limoneno a la muestra archivada con el fin de remover la parafina. Subsecuentemente la muestra es incubada con agitación durante 5-120 minutos a 15-30°C, preferible durante 10-60 minutos a temperatura ambiente. La agitación puede ser continua o puede ser repetida brevemente varias veces. Después de la centrifugación a al menos 5,000 x g durante 1-20 minutos, preferiblemente durante 5 minutos, el tejido se localiza en el fondo del tubo y se remueve la mezcla de limoneno y parafina.

En una realización de la divulgación, la etapa de remoción de parafina comprende

- adición de 1 ml de limoneno a la muestra archivada,
- incubación durante 10 minutos-1 hora a temperatura ambiente mezclando la muestra,
- centrifugación a al menos 5,000 x g durante 5 minutos, y
- remoción del limoneno.

En una realización preferida de la divulgación la muestra de tejido después de la remoción de la parafina se lava con etanol. Si se usa la cantidad típica de muestra (1-6 secciones de 10 µm de espesor), un volumen adecuado de etanol para esta etapa de lavado es 0.1-3 ml. Una persona con habilidades normales en la técnica sabrá cómo ajustar este volumen si se usan muestras más pequeñas o más grandes. Después de la adición de etanol, la muestra se incuba a 15-30°C por hasta 10 minutos. Pero son posibles incubaciones más largas puesto que no son desfavorables. Después de la centrifugación, se remueve el etanol y la muestra de tejido se seca a 15-65°C.

En una realización de la divulgación, el solvente de lavado es etanol, y la realización comprende

- adición de 0.1-3 ml de etanol,
- opcional, incubación por hasta 10 minutos a 15-30°C,
- centrifugación,
- remoción del etanol, y
- secado.

En una realización particularmente preferida, se agregan 0.5-1.5 ml preferiblemente 1.0 ml de etanol como solución de lavado. La incubación tiene lugar durante 1-10 minutos, preferible durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación. La agitación puede ser continua o se repite brevemente varias veces. Después de la centrifugación a al menos 5,000 x g durante 1-20 minutos, preferiblemente durante 5 minutos, el tejido se localiza en el fondo del tubo y se remueve el etanol. La muestra de tejido es secada a 45-65°C durante 5-60 minutos, preferiblemente a 50°C durante 10-30 minutos.

Una realización preferida de la divulgación comprende las siguientes etapas:

- adición de 1 ml de etanol,
- incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente mezclando la muestra,
- centrifugación a al menos 5,000 x g durante 5 minutos,
- remoción del etanol, y
- incubación durante 10-30 minutos a 50°C.

Etapa de lisis

En una realización de la divulgación la etapa de lisis se lleva a cabo mediante el uso de proteasa. Esta proteasa puede ser una serina proteasa, una tiol proteasa, una carboxi proteasa, una metaloproteasa, proteinasa K o cualquier mezcla de estas proteasas.

Dependiendo de la proteasa, el tiempo de digestión puede variar. La razón para esto son las diferentes actividades de las proteasas. De acuerdo con la divulgación se prefiere escoger una proteasa con una alta actividad enzimática. Pero de acuerdo con la divulgación también se prefiere escoger una proteasa que sea disponible a bajo coste. Por lo tanto es particularmente preferido escoger una proteasa con una alta relación actividad enzimática /coste. Debido a esto se prefiere particularmente utilizar proteinasa K para la lisis.

Además, el tiempo para la digestión varía también dependiendo de la textura y naturaleza de la muestra de tejido. Por ejemplo, tejidos como tejido de seno son digeridos más bien rápidamente, debido a la baja cohesión de las células. Por otro lado, los tejidos como tejido de colon o de hígado pueden necesitar digestiones más largas por la compactación del tejido.

Otro factor importante que tiene una influencia significativa sobre el tiempo de digestión es la forma geométrica de la muestra. En general, las muestras con un área superficial grande son más fácilmente digeribles que las muestras con un área superficial más pequeña si tienen la misma textura y naturaleza y si se usa la misma proteasa para la digestión. Por lo tanto se prefiere usar secciones de tejido o cortar muestras de tejido más grandes en piezas. Pero, de acuerdo con la divulgación, también se prefiere ajustar el tiempo de digestión de acuerdo con la forma geométrica de las muestras de tejido. Al hacer así, no es necesario cortar secciones de tejido más grandes en trozos. Puesto que esto también disminuye el esfuerzo de manipulación, se prefiere particularmente utilizar tiempos largos para la digestión.

Los tiempos de digestión más largos también son particularmente más preferidos, porque se supone que permiten una mejor remoción de las proteínas o péptidos entrecruzados del ADN. La importancia de una remoción completa de proteínas o péptidos contaminados ya ha sido explicada en detalle más arriba. De acuerdo con la divulgación, se prefiere someter a lisis las muestras de tejido con proteinasa K por no más de 60 horas, en particular no más de 48 horas debido a razones de eficiencia. Esto usualmente es suficiente para una digestión completa que remueve todas las proteínas y péptidos contaminados.

Teniendo lo anterior en cuenta, el tiempo mínimo de digestión es 2.5 horas, preferiblemente 3 horas. Esto es especialmente el caso para tejidos fáciles de digerir que tiene un área superficial grande y el uso de la proteinasa K.

Adicionalmente, para una mejor remoción de las proteínas o péptidos contaminantes, se prefiere particularmente agregar una cantidad adicional de proteasa después de las primeras 24 horas de digestión. Esto es recomendado porque la actividad enzimática disminuye con el tiempo debido a la autodigestión. Para algunos tejidos podría ser ventajoso agregar cantidades adicionales de proteasa varias veces. Por ejemplo, para tejido de colon o próstata es particularmente preferido agregar tres veces proteinasa K.

En una realización de la divulgación, la etapa de lisis se lleva a cabo mediante el uso de una proteasa seleccionada del grupo "una serina proteasa, una tiol proteasa, una carboxi proteasa, una metaloproteasa, proteinasa K o cualquier mezcla de estas proteasas".

En una realización preferida la etapa de lisis comprende la adición de 0.05-1 ml de un regulador de lisis a 1-10 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina de 10 µm de espesor o una cantidad igual de una biopsia de tejido desparafinado fijado con formalina. Este regulador de lisis comprende 50 mmol/l de Tris (tris-hidroximetil-amino-metano) pH 8.0, 1 mmol/l de EDTA, Tween 20 al 0.5% v/v. Desde luego, el uso de cualquier otro regulador de lisis según sea conocido por los experimentados en la técnica es posible. Subsecuentemente se agregan 0.1-3 mg de proteinasa K. La proteinasa K puede ser disuelta en un regulador adecuado, preferencialmente el regulador de lisis usado. Esto puede hacerse mediante la adición de 10-100 µl de una solución de proteinasa K que comprende 10-30 g/l de proteinasa K. Después de la adición de la proteasa, la mezcla se somete a agitación. La mezcla es incubada durante al menos 2.5 horas a 40-70°C. Después de esto, si se desea, la proteinasa K puede ser inactivada por calentamiento o mediante el uso de inhibidores. Una persona con habilidades normales en la técnica sabe cómo ajustar el volumen de dichas soluciones si el espesor de la sección varía o si se usa una cantidad menor o mayor de muestra.

En una realización preferida, la etapa de lisis comprende

- adición de 0.05-1 ml de regulador de lisis que comprende 50 mmol/l de Tris-hidroximetil-amino-metano pH 8.0, 1 mmol/l de EDTA, Tween al 0.5% v/v a 1-10 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina o una cantidad igual de una biopsia de tejido desparafinado fijada con morfina,

- adición de 10-100 µl de proteinasa K que comprende 10-30 g/l de proteinasa K, agitando subsecuentemente la muestra,

- Incubación durante al menos 2.5 horas a 40-70°C, y

- opcional, inactivación de la proteinasa K por calentamiento o mediante el uso de un inhibidor.

En una realización particularmente preferida la etapa de lisis comprende la adición de 100-300 µl, preferiblemente 190 µl de regulador de lisis a 1-10 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina de 10 µm de espesor o una cantidad igual de biopsia de tejido desparafinado fijada con formalina. Adicionalmente se agregan 0.45-1.5 mg, preferiblemente 0.6 mg de proteinasa K. En particular la proteinasa K se agrega como 15-50 µl, preferiblemente como 20 µl de una solución de proteinasa K que comprende 30 µg/µl de proteinasa K. La agitación subsecuente se lleva a cabo mediante sometimiento a vórtex riguroso. Después de esto, la mezcla se incuba durante 2.5-60 horas a 45-65°C, preferiblemente durante 3-48 horas a 50-60°C, en donde la mezcla es agitada continuamente o brevemente repetida varias veces. La inactivación de la proteinasa K puede ser lograda por incubación de la mezcla durante 5-20 minutos al menos a 90°C, preferiblemente durante 10 minutos a al menos a 95°C. En una variante especial se prefiere que se agreguen al menos 0.6 mg de proteinasa K, por ejemplo 20 µl de una solución de 30 µg/µl de proteinasa K después de las primeras 24 horas de la incubación. Una persona de habilidades normales en la técnica sabe cómo ajustar el volumen de dichas soluciones si el espesor de la sección varía o si se usa una cantidad menor o mayor de muestra.

En una realización preferida, la etapa de lisis comprende

- adición de 190 µl de regulador de lisis a 1-6 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina o una cantidad igual de una biopsia de tejido desparafinado fijada con formalina,
- adición de 20 µl de solución de proteinasa K que comprende 30 g/l de proteinasa K, sometiendo subsecuentemente a vórtex rigurosamente,
- incubación durante 3-48 horas a 50°C-60°C mezclando la muestra, y opcionalmente, adición de al menos 20 µl de solución de proteinasa K después de las primeras 24 horas de incubación a 50°C-60°C, y
- incubación durante 10 minutos al menos a 95°C.

En otra realización preferida, la muestra archivada es sometida directamente a la etapa de lisis que comprende la adición de 0.05-1 ml de un regulador de lisis a 1-10 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina de 10 µm de espesor o una cantidad igual de biopsia de tejido desparafinado fijada con formalina. El regulador de lisis comprende 50 mmol/l de Tris (tris-hidroximetil-amino-metano) pH 8.0, 1 mmol/l de EDTA, Tween 20 v/v al 0.5%. Preferiblemente también comprende 5 ng/µl de poli-dA ADN. Desde luego, también pueden usarse otros reguladores de lisis adecuados, como son conocidos por los experimentados en la técnica. Subsecuentemente la mezcla se incuba durante 5-20 minutos a 40-75°C. Después de esto, se agregan 0.15-1.2 mg de proteinasa K, por ejemplo 5-40 µl de una solución de proteinasa K de 30 µg/µl. La mezcla se incuba entonces durante al menos 2.5 horas a 40-70° C con agitación. Después de esto, si se desea, la proteinasa K puede ser inactivada por calentamiento o mediante el uso de inhibidores. Una persona con habilidades normales en la técnica sabe cómo ajustar el volumen de dichas soluciones si el espesor de la sección varía o si se usa una cantidad de muestra menor o mayor.

En una realización preferida, la muestra archivada se somete directamente a la etapa de lisis la cual comprende

- adición de 50-1,000 µl de regulador de lisis a 1-10 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina o una cantidad igual de una biopsia de tejido desparafinado fijada con formalina, comprendiendo el regulador de lisis de pH 8. 50 mmol/l de tris-hidroximetil-amino-metano, 1 mmol/l de EDTA, Tween al 0.5% v/v, y opcionalmente 5 ng/µl de poli-dA ADN,
- incubación durante 5-20 minutos a 40-75°C,
- adición de 5-40 µl de solución de proteinasa K, comprendiendo la solución de proteinasa K 30 mg/ml de proteinasa K,
- incubación durante al menos 2.5 horas a 40-70°C , y
- opcional, inactivación de la proteinasa K por calentamiento o mediante el uso de un inhibidor.

En una variante particularmente preferida se agregan 75-200 µl, preferiblemente 100 µl de regulador de lisis a 1-6 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina de 10 µm de espesor o una cantidad igual de biopsia de tejido desparafinado fijado con formalina. Después de la adición, la mezcla se incuba durante 7-15 minutos a 50-70°C en un termomezclador a 500-2,000 rpm, preferiblemente durante 10 minutos a 65°C en un termomezclador a 1,000 rpm. Subsecuentemente, se agrega 0.21-0.6 mg, preferiblemente 0.3 mg de proteinasa K, por ejemplo 7-20 µl, preferiblemente 10 µl de una solución de 30 µg/µl de proteinasa K. La mezcla se incuba entonces durante 2.5-60 horas a 50-65°C en un termomezclador a 1,000-2,000 rpm, preferiblemente durante 3-48 horas a 60°C en un termomezclador a 1400 rpm. La proteinasa K puede ser desactivada por incubación de la mezcla durante 5-20 minutos al menos a 90°C, preferiblemente durante 10 minutos al menos a 95°C. La inactivación de la proteinasa K también puede lograrse mediante la adición de inhibidores de proteinasa

K. Una persona con habilidades normales en la técnica sabe cómo ajustar el volumen de dichas soluciones si el espesor de la sección varía o si se usa una cantidad menor o mayor de muestra.

En una realización particularmente preferida, la etapa de lisis comprende

- 5 - adición de 100 µl de regulador de lisis a 1-6 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina o una cantidad igual de una biopsia de tejido desparafinado fijado con formalina,
- Incubación durante 10 minutos a 65°C en un termomezclador a 1,000 rpm,
- Incubación a 50°C en un termomezclador a 1,400 rpm
- adición 10 µl de solución de proteinasa K,
- Incubación durante 3-48 horas a 60°C en termomezclador a 1,000 rpm, y
- 10 - Incubación durante 10 minutos a > 95°C.

En caso de que la muestra archivada sea sometida directamente a la etapa de lisis, se prefiere que el ADN pueda ser directamente sometido a tratamiento de bisulfito obviando la etapa de extracción de ADN. Esto se prefiere en particular si la cantidad de muestra archivada es pequeña o si una persona con habilidades normales en la técnica esperaría solamente pequeños rendimientos de ADN.

15 Etapa de extracción de ADN

Se conoce un buen número de métodos por parte de los experimentados en la técnica para la extracción de ADN a partir de muestras de tejido (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- 20 Para reducir el esfuerzo de manipulación y también para asegurar una alta reproducibilidad así como confiabilidad, se prefiere usar un kit para la extracción de ADN. Para una persona con habilidades normales en la técnica es conocida una enorme cantidad de kits que pueden ser adecuados para la extracción de ADN.

- 25 Por lo tanto en una primera etapa se escogieron los kits más prometedores para las pruebas subsecuentes. Estos kits son: QIAamp DNA Mini Kit, kit ZR genomic DNA II, MagneSil Genomic, Fixed Tissue System, MagNA Pure LC DNA Isolation Kit II (Tissue), kit para tejidos Nexttec, ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit, y kit para purificación de ADN genómico Charge Switch.

- 30 En una segunda etapa estos kits fueron probados en relación con la extracción de ADN, en donde se usaron los siguientes criterios: i) un esfuerzo de manipulación mínimo; ii) una longitud mínima de tiempo; iii) rendimiento de ADN; iv) la capacidad de amplificación después de la etapa de extracción; y v) pureza del ADN por medio de luz UV (relación 260 nm/280 nm preferiblemente en el rango de 1.7 a 1.9). El QIAamp DNA Mini Kit fue utilizado como referencia. Los mejores resultados fueron obtenidos por el QIAamp DNA Mini Kit.

- 35 Por lo tanto, de acuerdo con la divulgación y para mejores resultados, se usa preferiblemente el QIAamp DNA Mini Kit. Además, también se utilizan preferiblemente kits que contienen las mismas soluciones y/o materiales equivalentes tales como columnas o reguladores. Tales clase de kits son por ejemplo el DNeasy 96 Tissue Kit, el QIAamp 96 DNA Blood Kit, el QIAamp DSP 96 Virus MDX Kit, el DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Micro Kit, kit QIAamp Viral RNA Mini o el QIAamp DSP Virus Kit (todos Qiagen).

Qiagen

En una realización de la divulgación la etapa de extracción de ADN es caracterizada porque el ADN que se va a extraer se enlaza a superficies de sílica, en particular a membranas de sílica.

- 40 En una realización, la etapa de extracción de ADN se caracteriza por enlazamiento del ADN a superficies de sílica, en particular a membranas de sílica.

Se prefiere particularmente que la etapa de extracción de ADN se lleve a cabo por medio del DNeasy 96 Tissue Kit, el QIAamp 96 DNA Blood Kit, el QIAamp DSP 96 Virus MDX Kit, el DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit, o el QIAamp DNA Micro Kit, el QIAamp Viral RNA Mini o el QIAamp DSP Virus Kit (todos Qiagen).

En principio también se pueden utilizar otros kits de acuerdo con la invención en tanto lleven a resultados similares. Estos kits son por ejemplo kits que se basan en la tecnología de "conmutación de carga" (Invitrogen) o la tecnología "nexttec" (nexttec GmbH). Estos pueden ser el kit de tejidos Nexttec, el ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit, y el kit de purificación de ADN genómico Charge Switch.

- 5 En una realización se usan uno o más de los siguientes kits en la etapa de extracción de ADN: DNeasy 96 Tissue Kit, QIAamp 96 DNA Blood Kit, QIAamp DSP 96 Virus MDX Kit, DNeasy Tissue Kit, QIAamp DNA Mini Kit, QIAamp DNA Micro Kit, QIAamp Viral RNA Mini o el QIAamp DSP Virus Kit.

10 En realizaciones de la divulgación el regulador de enlazamiento AL es reemplazado por los reguladores de enlazamiento ATL o AVL. Una persona con habilidades normales en la técnica sabe cómo ajustar el método de la invención concordantemente. Los reguladores ATL y AVL también pueden ser mezclados como regulador AL con etanol como es sabido por los experimentados en la técnica. Por lo tanto, en realizaciones de la invención, el regulador de enlazamiento AL/E es reemplazado por los reguladores en enlazamiento ATL/E o AVL/E. Una persona con habilidades normales en la técnica sabe cómo ajustar el método de la invención concordantemente.

15 En una realización especialmente preferida, la etapa de extracción de ADN se lleva a cabo de acuerdo con el DNeasy 96 Tissue Kit o el QIAamp 96 DNA Blood Kit. También el QIAamp DSP 96 Virus MDx Kit puede ser utilizado si solo se esperan cantidades pequeñas de ADN. De acuerdo con esta realización, se agregan 100-600 µl del regulador de enlazamiento AL/E, ATL/E o AVL/E (Qiagen) a la mezcla derivada de esta etapa de lisis. El lisado es derivado de 1-10 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina de 10 µm de espesor o una cantidad igual de una biopsia de tejido desparafinado o fijado con formalina. Después de la agitación, la mezcla se aplica sobre una columna de una placa del DNeasy 96 Tissue Kit, el
20 QIAamp 96 DNA Blood Kit o el QIAamp DSP 96 Virus MDX Kit (todos Qiagen). La columna se lava con los reguladores AW1 (Qiagen) y AW2 ((Qiagen), antes de eluir el ADN mediante 20-200 µl de regulador de elución. El regulador de elución puede ser AE, AVE o EB (all Qiagen) o agua. Típicamente, el regulador de elución se ajusta a 15-80°C. Después de la adición del regulador de elución precalentado, la columna es incubada durante al menos 30 segundos a 15-40°C, antes de ser centrifugada. El flujo a través de la columna contiene el ADN que se va a extraer. Una persona con habilidades normales en
25 la técnica sabe cómo ajustar el volumen de las soluciones si el espesor de la sección varía o si se usa una cantidad de muestra menor o mayor. En una realización, la etapa de extracción de ADN se lleva a cabo de acuerdo con el DNeasy 96 Tissue Kit, el QIAamp 96 DNA Blood Kit o el QIAamp DSP 96 Virus MDx Kit comprendiendo

- adición de 100-600 µl de regulador de enlazamiento AL/E, ATL/E o AVL/E a un lisado derivado de 1-10 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina o una cantidad igual de una biopsia de tejido desparafinado fijado con formalina,

30 - aplicación de la mezcla sobre una placa,

- lavado con regulador de lavado AW1 y AW2, y

- elución mediante la adición de 20-200 µl de regulador de elución AE, AVE, EB o agua ajustado a 15-80°C, incubación durante al menos 30 segundos a 15-40°C, y centrifugación.

35 De acuerdo con esta realización es particularmente más preferido, que se agreguen 300-500 µl de un regulador en enlazamiento AL/E, ATL/E o AVL/E a 100-300 µl de lisado derivado de 1-6 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina de 10 µm de espesor o una cantidad igual de una biopsia de tejido desparafinado fijado con formalina, preferiblemente se agregan 400 µl de regulador de enlazamiento AL/E a 200 µl de lisado. La agitación se lleva a cabo agitando con ambas manos durante 10-30 segundos, preferentemente durante 15 segundos. Después de la aplicación de la mezcla sobre una columna de una placa, la placa se centrifuga durante 5-20 minutos a 4,000-6,500 x g, preferiblemente
40 durante 10 minutos a 5,790 x g. El lavado con los reguladores AW1 y AW2, respectivamente, se lleva a cabo mediante la aplicación de 300-700 µl, preferiblemente de 500 µl de regulador de lavado seguidos por una centrifugación de 5-20 minutos a 4,000-6,00 x g, preferiblemente durante 10 minutos a 5,790 x g. Después de las etapas de lavado las columnas de una placa son secadas por centrifugación durante 10-30 minutos a 4,000-6,500 x g, preferiblemente durante 15 minutos a 5,790 x g. El ADN es eluido mediante la adición de 90-150 µl, preferiblemente de 120 µl de regulador de elución precalentado a
45 50-75°C, preferiblemente a 70°C, seguido por una incubación durante 1-20 minutos a 17-30°C, preferiblemente durante 5 minutos a temperatura ambiente, y centrifugación subsecuente durante 1-10 minutos a 4,000-6,500 x g, preferiblemente durante 2 minutos a 5,790 x g. El flujo a través de la columna que contiene el ADN puede ser almacenado a +4°C hasta -80°C. Una persona con habilidades normales en la técnica sabe cómo ajustar el volumen de las soluciones si el espesor de la sección varía o si se usa una cantidad de muestra menor o mayor.

50 En una realización, la etapa de extracción del ADN comprende

- adición de 400 µl de regulador de enlazamiento AL/E, ATL/E o AVL/E a 200 µl de lisado derivado de 1-6 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina o una cantidad igual de una biopsia de tejido desparafinado fijado con formalina

- agitar durante 15 segundos con ambas manos

- aplicación de la mezcla sobre una placa,

5 - centrifugación durante 10 minutos a 5,790 x g

- aplicación de 500 µl de regulador de lavado AW1 y centrifugación subsecuente a 5,790 x g durante 5 minutos,

- aplicación de 500 µl de regulador de lavado AW2 y centrifugación subsecuente a 5,790 x g durante 5 minutos,

- secado de la columna por centrifugación a 5,790 x g durante 15 minutos, y

10 - elución mediante la adición de 120 µl de regulador de elución AE, AVE o EB o agua precalentado a 70°C, incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugación durante 2 minutos a 5,790 x g.

15 En una realización especialmente preferida adicional, la etapa de extracción de ADN se lleva a cabo de acuerdo con el DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit o el QIAamp DNA Micro Kit. También pueden usarse el QIAamp Viral RNA Mini o el QIAamp DSP Virus Kit si solamente se esperan cantidades pequeñas de DNA. De acuerdo con esta realización, se agregan 150-300 µl del regulador de enlazamiento AL, ATL o AVL (Qiagen) al lisado derivado de 1-6 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina de 10 µm de espesor o una cantidad igual de una biopsia de tejido desparafinado fijado con formalina. La mezcla se incuba durante al menos 5 minutos a 45°C-80°C con agitación. Subsecuentemente, se agregan 150-300 µl de etanol, después de lo cual la muestra se agita, se centrifuga y se aplica sobre una columna del DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit, el QIAamp DNA Micro Kit, el QIAamp Viral RNA Mini, o el QIAamp DSP Virus Kit. Después de la centrifugación, la columna se lava con los reguladores de lavado AW1 y AW2. Para secar la columna es favorable centrifugar la columna, pero esto no es necesario. El ADN es eluido de la columna aplicando en una o dos etapas de elución hasta 180 µl de regulador de elución sobre la columna. El regulador de elución puede ser AE, AVE o EB (todos Qiagen) o agua ajustados a temperatura ambiente. Desde luego también son adecuados otros reguladores similares en tanto no interfieran con las etapas subsiguientes. Después de la adición del regulador de elución, la columna se incuba a temperatura ambiente, antes de ser centrifugada. El flujo a través de la columna contiene el ADN que se va a extraer. Una

20 persona con habilidades normales en la técnica sabe cómo ajustar el volumen de las soluciones si el espesor de la sección varía o si se usa una cantidad menor o mayor de muestra.

25

30 En una realización particular, la etapa de extracción de ADN se lleva a cabo por medio de una columna Minelute™. Estas columnas son por ejemplo parte del QIAamp DNA Micro Kit. Muy sorprendentemente, el ADN eluido en la primera etapa de la elución de ADN extraído de estas columnas da como resultado una mejor capacidad de amplificación. Como se mencionó ya anteriormente, el uso de una columna Minelute™ mejora la capacidad de amplificación si se llevan a cabo o no una etapa de tratamiento con bisulfito y subsecuente etapa de purificación de ADN.

En una realización, la etapa de extracción de ADN se lleva a cabo de acuerdo con el DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit, el QIAamp DNA Micro Kit, el QIAamp Viral RNA Mini, o el QIAamp DSP Virus Kit comprendiendo

35 - adición de 150-300 µl de regulador de enlazamiento AL, ATL o AVL al lisado derivado de 1-6 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina o una cantidad igual de una biopsia de tejido desparafinado fijado con formalina,

- Incubación durante al menos 5 minutos a 45°C-80°C agitando la muestra,

- adición de 150-300 µl de etanol, agitando subsecuentemente la muestra y centrifugando,

- aplicación de la mezcla sobre una columna,

- centrifugación,

40 - lavado con reguladores de lavado AW1 y AW2,

- opcionalmente, centrifugación, y

- elución en una o dos etapas por adición de hasta 180 µl de regulador de elución AE, AVE o EB o agua ajustado a temperatura ambiente, incubación a temperatura ambiente y centrifugación.

De acuerdo con esta realización es particularmente más preferido, que se agreguen 175-250 µl de regulador de enlazamiento AL a 175-250 µl de lisado, preferiblemente 200-210 µl de regulador de enlazamiento AL, ATL o AVL se agregan a 210 µl de lisado derivado de 1-6 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina de 10 µm de espesor o una cantidad igual de una biopsia de tejido desparafinado fijado con formalina. La mezcla se incuba durante 5-25 minutos a 50°C-75°C con agitación, preferiblemente durante 10 minutos a 56°C-70°C con agitación. Subsecuentemente, se agregan 175-250 µl, preferiblemente 200-210 ml de etanol, después de lo cual la muestra es agitada por sometimiento a vórtex por pulsos durante 15 segundos, y centrifugada durante 1-20 segundos a 1,000-14,000 x g, preferiblemente por 5 segundos a 5,000 x g. La mezcla se agrega entonces sobre una columna del DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit, el QIAamp DNA Micro Kit, el QIAamp Viral RNA Mini, o el QIAamp DSP Virus Kit. Subsecuentemente las columnas son centrifugadas durante 0.5-10 minutos a 4,000-8,000 x g, preferiblemente durante 1 minuto a 6,000 x g. El lavado con los reguladores AW1 se lleva a cabo mediante la aplicación de 300-700 µl, preferiblemente 500 µl de AW1 seguido por una centrifugación de 0.5-10 minutos a 4,000-8,000 x g, preferiblemente durante 1 minuto a 6,000 x g. Subsecuentemente, el lavado con los reguladores AW2 se lleva a cabo por la aplicación de 300-700 µl, preferiblemente de 500 µl de AW2 seguido por una centrifugación de 1-10 minutos a 15,000-25,000 x g, preferiblemente durante 3 minutos a 20,000 x g. Para secar la columna es favorable centrifugar la columna durante 0.5-5 minutos a 15,000-25,000 x g, preferiblemente durante 1 minuto a 20,000 x g, pero esto no es necesario. El ADN es eluido de la columna aplicando 20-150 µl, preferiblemente 35-120 µl de regulador de elución sobre la columna. El regulador de elución puede ser AE, AVE o EB (todos Qiagen) o agua ajustados a temperatura ambiente. Después de la adición del regulador de elución, la columna se incuba a temperatura ambiente durante 0.5-15 minutos, preferiblemente durante 1-5 minutos. La columna se centrifuga entonces durante 0.5-10 minutos a 4,000-8,000 x g, preferiblemente durante 1 minuto a 6,000 x g. El flujo a través de la columna contiene el ADN que se va a extraer. Aunque no es necesario, es favorable llevar a cabo una segunda etapa de elución, en donde se agregan 20-80 µl, preferiblemente 35-60 µl del regulador de elución sobre la columna. El regulador de elución puede ser AE, AVE o EB (todos Qiagen) o agua ajustada a temperatura ambiente. Después de la adición del regulador de elución, la columna se incuba a temperatura ambiente durante 0.5-15 minutos, preferiblemente durante 1-5 minutos. La columna es centrifugada entonces durante 0.5-10 minutos a 4,000-8,000 x g, preferiblemente durante 1 minuto a 6,000 x g. El flujo a través de la columna es combinado con el flujo a través de la primera etapa de elución y puede almacenarse a 0°C-10°C, preferiblemente a 4°C por no más de 2 días. Si se pretende un almacenamiento más largo, un fluido es almacenado a -20°C hasta -80°C. Una persona con habilidades normales en la técnica sabe cómo ajustar el volumen de las soluciones si el espesor de la sección varía o si se usa una cantidad de muestra menor o mayor.

En una realización, la etapa de extracción del ADN comprende

a) adición de 200-210 µl de regulador de enlazamiento AL, ATL o AVL a 210 µl de lisado derivado de 1-6 secciones de tejido desparafinado fijado con formalina o una cantidad igual de biopsia de tejido desparafinado fijado con formalina,

b) incubación durante 10 minutos a 56°C-70°C mezclando la muestra,

c) adición de 200-210 µl de etanol, con vórtex por pulsos durante 15 segundos y centrifugación durante 5 segundos a 5,000 x g,

d) aplicación de la mezcla sobre una columna,

e) centrifugación durante 1 minuto a 6,000 X g

f) la aplicación de 500 µl de regulador de lavado AW1 y centrifugación subsecuente a 6,000 x g por 1 minuto

g) aplicación de 500 µl de regulador de lavado AW2 y centrifugación subsecuente a 20,000 x g durante 3 minutos,

h) opcional, centrifugación a 20,000 x g durante 1 minuto utilizando tubos nuevos, y

i) elución mediante una primera adición de 35-120 µl de regulador de elución AE, AVE o EB o agua ajustados a temperatura ambiente, incubación durante 1-5 minutos a temperatura ambiente y centrifugación durante 1 minuto a 6,000 x g, y una segunda adición opcional de 35-60 µl de regulador de elución AE, AVE o EB o agua ajustados a temperatura ambiente, incubación durante 1-5 minutos a temperatura ambiente y centrifugación durante 1 minuto a 6,000 x g.

Una alternativa a la última realización es una variante, en donde es favorable secar la columna después de la etapa de lavado con regulador AW2 calentando la columna sobre un tejido de papel sobre el mesón con una centrifugación subsecuente durante 0.5-10 minutos a 4,000-8,000 x g, preferiblemente 1 minuto a 6,000 x g. Después de esto la elución se lleva a cabo aplicando 25-200 µl, preferiblemente 50-150 µl de regulador de elución sobre la columna. El regulador de elución puede ser AE, AVE o EB (todos Qiagen) o agua precalentados a 30-50°C, preferiblemente a 40°C. Después de la adición del regulador de elución, la columna se incuba a temperatura ambiente durante 0.5-15 minutos, preferiblemente por

1-5 minutos. La columna se centrifuga entonces durante 0.5-10 minutos a 4,000-8,000 x g, preferiblemente por 1 minuto a 6,000 x g. El flujo que contiene ADN se aplica de nuevo sobre la misma columna. Después de la adición, la columna es incubada a temperatura ambiente durante 0.5-5 minutos, preferiblemente durante 1 minuto. La columna es centrifugada entonces durante 0.5-10 minutos a 4,000-8,000 x g, preferiblemente durante 1 minuto a 6,000 x g. Este procedimiento tiene la ventaja de que puede eluirse una recuperación más alta de ADN de la columna sin extender el regulador de elución. Una persona con habilidades normales en la técnica sabe cómo ajustar el volumen de las soluciones si el espesor de la sección varía o si se usa una cantidad de muestra menor o mayor.

En una realización particular, las etapas h) e i) de la etapa de extracción de ADN son reemplazadas por las siguientes etapas k) y l), respectivamente:

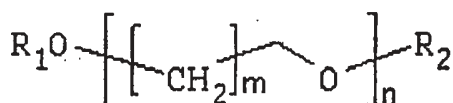
k) opcionalmente, golpear la columna sobre un tejido de papel sobre el mesón con una centrifugación subsecuente a 6,000 x g durante 1 minuto,

l) elución mediante la adición de 50-150 µl de regulador AE o agua precalentados a 40°C, incubación durante de 1-5 minutos a temperatura ambiente, centrifugación a 6,000 x g durante 1 minuto, aplicación repetida de este primer eluato sobre la columna, incubación durante 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugación a 6,000 x g durante 1 minuto.

Etapa de tratamiento con bisulfito

En una realización, la etapa de tratamiento con bisulfito se lleva a cabo esencialmente como se describió en WO05/038051. De acuerdo con esto, en una realización el ADN se hace reaccionar con un reactivo bisulfito, caracterizado porque dicha reacción se lleva a cabo en la presencia de un compuesto del grupo de dioxano, uno de sus derivados y un éter cíclico alifático similar.

En otra realización el ADN se hace reaccionar con un reactivo bisulfito, caracterizado porque dicha reacción se lleva a cabo en la presencia de un compuesto de la siguiente fórmula:



n = 1-3500

m = 1-3

R1 = H, Me, Et, Pr, Bu

R2 = H, Me, Et, Pr, Bu

Se prefieren entonces compuestos de n-alquilen glicol, particularmente sus éteres de dialquilo, y especialmente dietilen glicol dimetil éter (DME).

La conversión con bisulfito puede tener lugar tanto en solución así como en ADN enlazado a una fase sólida. Preferiblemente se usa disulfito de sodio (= bisulfito de sodio/metabisulfito de sodio), puesto que es más soluble en agua que el sulfito de sodio. La sal de disulfito proporciona en solución acuosa los aniones hidrógeno sulfito necesarios para la conversión de la citosina. Cuando la concentración de bisulfito se discute más adelante, esto se refiere a la concentración de hidrógeno sulfito y aniones sulfito en la solución de reacción. Para el método de acuerdo con la invención, son posibles rangos de concentración de 0.1 a 6 mol/l. Particularmente preferido es un rango de concentración de 1 a 6 mol/l, y lo más particularmente preferido, 2-4 mol/l. Sin embargo, cuando se usa dioxano, la concentración máxima de bisulfito que puede ser usada es más pequeña (véase más adelante). Al seleccionar la concentración de bisulfito, se debe considerar que una alta concentración de bisulfito lleva a una alta conversión, pero también lleva a una alta tasa de descomposición debido al pH más bajo.

El dioxano puede ser utilizado en diferentes concentraciones. Preferiblemente las cantidades de concentración de dioxano alcanza de 10 a 35% (vol/vol), preferida particularmente de 20 a 30%, y lo más particularmente preferida es de 22 a 28%, especialmente 25%. Una concentración de dioxano mayor de 35% es problemática puesto que da como resultado la formación de dos fases dentro de la solución de reacción. En las realizaciones particularmente preferidas con una concentración de dioxano de 22-28%, la concentración de bisulfito preferida final llega a 3.3 hasta 3.6 mol/l, y en la realización más particularmente preferida con una concentración de dioxano de 25%, llega a 3.5 mol/l (véanse Ejemplos).

Los compuestos de n-alquilen glicol de acuerdo con la divulgación pueden ser utilizados en un rango de concentración diferente. El DME es usado preferiblemente en concentraciones entre 1-35% (vol/vol). Se prefiere entre 5 y 25%, y más preferiblemente 10% de DME.

5 Los depuradores preferidos utilizados de acuerdo con la divulgación son derivados de cromano, por ejemplo, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8,-tetrametilcromano 2-carboxílico (también conocido como: Trolox-C™). Se listan depuradores adicionales en la solicitud de patente WO 01/98528 (= DE 100 29 915; = Solicitud de los Estados Unidos 10/311, 661).

10 La conversión de bisulfito puede ser llevada a cabo en un amplio rango de temperaturas de 0 a 95°C. Sin embargo, puesto que a temperaturas más altas las ratas tanto de la conversión como la descomposición del ADN se incrementan, en una realización preferida la temperatura de reacción cae entre 0-80°C, preferiblemente entre 30-80°C. Particularmente preferido es un rango entre 50-70°C; lo más particularmente preferido entre 57-65°C. El tiempo de reacción óptimo para el tratamiento con bisulfito depende de la temperatura de reacción. El tiempo de reacción normalmente se eleva hasta entre 1 y 18 horas (véase: Grunau et al. 2001, Nucleic Acids Res. 2001, 29(13) : E65-5)). El tiempo de reacción ordinariamente es de 4-6 horas para una temperatura de reacción de 60°C.

15 En una realización particularmente preferida del método de acuerdo con la divulgación, la conversión del bisulfito se lleva a cabo a temperaturas de reacción moderadas, en donde la temperatura de reacción es incrementada entonces claramente durante un tiempo corto al menos una vez durante el transcurso de la conversión. De esta manera, la efectividad de la conversión del bisulfito puede ser sorprendentemente incrementada de manera clara. Los incrementos de temperatura de corta duración se denominan "termomaximizaciones" más adelante. La temperatura de reacción "estándar" por fuera de las termomaximizaciones es denotada como la temperatura de reacción básica. La temperatura de reacción básica se eleva a entre 0 y 80°C, preferiblemente entre 30-80°C, más preferiblemente entre 50-70°C, lo más preferiblemente entre 57-65°C, como se describió anteriormente.

25 La temperatura de reacción durante una termomaximización se incrementa a por encima de 85°C en al menos una termomaximización. El número óptimo de termomaximizaciones es una función de la temperatura de reacción básica. Cuanto más alto sea el número óptimo de termomaximizaciones, más baja es la temperatura de reacción básica. Al menos una termomaximización es necesaria en cada caso. Y por otro lado, en principio, cualquier número de termomaximizaciones es concebible. Desde luego, debe considerarse que con un gran número de incrementos en temperatura, la rata de descomposición del ADN también se incrementa, y no se puede asegurar más una conversión óptima. El número preferido de termomaximizaciones está así entre 1 y 10 termomaximizaciones cada vez, dependiendo de la temperatura de reacción básica. Un número de dos a 5 termomaximizaciones es preferido entonces particularmente. Las termomaximizaciones incrementan la temperatura de reacción preferiblemente a 85 a 100°C, preferiblemente a 90-100°C, y lo más preferiblemente a 94°C-100°C.

35 La duración en tiempo de las termomaximizaciones también depende del volumen del lote de reacción. Debe asegurarse que la temperatura se incrementa uniformemente a través de la solución de reacción total. Para un lote de reacción de 20 µl cuando se utiliza un termociclador se prefiere una duración entre 15 segundos y 1.5 minutos, especialmente una duración entre 20 y 50 segundos. En una realización particularmente preferida, la duración es de 30 segundos. Operando en un volumen de 100 µl el rango preferido cae entre 30 segundos y 5 minutos, especialmente entre 1 y 3 minutos. Particularmente preferidos son 1.5-3 minutos. Para un volumen de 600 µl, se prefiere una duración de 1 a 6 minutos, especialmente entre 2 y 4 minutos. Se prefiere particularmente una duración de 3 minutos. Una persona experimentada en la técnica será capaz fácilmente de determinar duraciones adecuadas de las termomaximizaciones en relación con una variedad de volúmenes de reacción. El uso antes descrito de termomaximizaciones lleva a ratas de conversión significativamente mejores en la reacción de conversión con bisulfito, incluso cuando no se utilizan los solventes desnaturizantes antes descritos.

45 En una variante preferida 10-60 µl de la solución que contiene el ADN genómico extraído se mezclan con 50-120 µl de solución de bisulfito. La solución de bisulfito tiene un pH en el rango de 4.7 a 6.5, preferiblemente en el rango de 5.0 a 6.0, y particularmente preferido en el rango de 5.45 a 5.50. La solución de bisulfito comprende hidrogenosulfito en una concentración de 3.5-6.0, preferiblemente en una concentración de 4.4-5.3, y particularmente preferido en una concentración de 4.83 a 4.93 mol/l. Por ejemplo, tal clase de solución de bisulfito puede ser obtenida agregando 4.708 g de disulfito de sodio y 1.128 g de sulfito de sodio a 10 ml de agua. Después de disolver las sales, el volumen final es aproximadamente 12 ml. A la mezcla de solución de ADN genómico y la solución de bisulfito se agregan 8-45 µl de una solución depuradora de radicales orgánicos. La solución depuradora de radicales orgánicos comprende un solvente orgánico y 50-1,000 mmol/l, preferiblemente 100-750 mmol/l, y particularmente preferidos 158-500 mmol/l del depurador de radicales ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico o cualquier otro depurador de radicales adecuado. Después de la adición de la solución depuradora de radicales, se aplica un protocolo de temperatura durante 3-8 horas. El protocolo está caracterizado porque la reacción se lleva a cabo en un rango de temperatura de 0-80°C con 2-5 incrementos

de temperatura adicionales (termomaximizaciones) durante 1-10 minutos a 85-100°C, incluyendo un incremento inicial de temperatura (termomaximización) a 85-100°C

En una realización, la etapa de tratamiento con bisulfito comprende

- 5 - mezclar de 10-60 µl de la solución que contiene el ADN genómico con 50-120 µl de solución de bisulfito, teniendo la solución de bisulfito un pH en el rango de 5.45 a 5.50 comprendiendo 4.83-4.93 mol/l de hidrogenosulfito,
- adición de 8-45 µl de una solución depuradora de radicales orgánicos, comprendiendo la solución depuradora de radicales orgánicos un solvente orgánico y 158-500 mmol/l de del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico , y
- 10 - aplicar un protocolo de temperatura para 3-8 horas, caracterizado porque la reacción se lleva a cabo en un rango de temperatura de 0-80°C con 2-5 incrementos adicionales de temperatura durante 1-10 minutos a 85 a 100°C incluyendo un incremento inicial de temperatura a 85-100°C.

- 15 En una realización particularmente preferida, la etapa de bisulfito se lleva a cabo como se describe en lo que sigue: se mezclan 44-50 µl de una solución que contiene el ADN genómico extraído con 83-95 µl de una solución de bisulfito. La solución de bisulfito tiene un pH en el rango de 5.45 a 5.50 y comprende hidrogenosulfito en una concentración de 4.83-4.93 mol/l. Por ejemplo, tal clase de solución de bisulfito puede ser obtenida agregando 4.708 g de disulfito de sodio y 1.128 g de sulfito de sodio a 10 ml de agua. Después de disolver las sales, el volumen final es aproximadamente 12 ml. Después de la adición de la solución de bisulfito se agregan 13-15 µl de una solución de DME, comprendiendo la solución de DME 250-1,000 mmol/l, preferiblemente 350-750 mmol/l, y particularmente preferidos 500 mmol/l de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico disuelto en dietilenglicoldimetiléter (DME). Después se aplica un protocolo de temperatura durante 4-7 horas. El protocolo está caracterizado porque la reacción se lleva a cabo en un rango de temperatura de 57-65°C con 2-5 incrementos de temperatura adicionales (termomaximizaciones) durante 3-5 minutos a 94-100°C, incluyendo un incremento inicial de temperatura (termomaximización) a 94-100°C.
- 20

En una realización preferida, la etapa de tratamiento con bisulfito comprende

- mezclar 44-50 µl de la solución que contiene el ADN genómico con 83-95 µl de la solución de bisulfito
- 25 - adicionar 13-15 µl de solución de DME, comprendiendo la solución de DME 500 mmol/l del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico disuelto en dietilenglicoldimetiléter, y
- aplicar un protocolo de temperatura durante 4-7 horas, caracterizado porque la reacción se lleva a cabo en un rango de temperatura de 57-65°C con 2-5 incrementos de temperatura adicionales durante 3-5 minutos a 94-100°C, incluyendo un incremento inicial de temperatura a 94-100°C.

- 30 En otra realización particularmente preferida se mezclan 15-20 µl de solución que contiene el ADN genómico aislado con 60-85 µl de una solución de bisulfito. La solución de bisulfito tiene un pH en el rango de 5.45 a 5.50 y comprende hidrogenosulfito en una concentración de 4.83-4.93 mol/l. Después de la adición de la solución de bisulfito se agregan 25-35 µl de solución de dioxano. La solución de dioxano comprende 50-500 mmol/l, preferiblemente 75-300 mmol/l, y particularmente preferidos 158 mmol/l de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico disuelto en 1,4-dioxano. Después se aplica un protocolo de temperatura durante 4-7 horas. El protocolo se caracteriza porque la reacción es llevada a cabo lleva a cabo en un rango de temperatura de 57-65°C con 2-5 incrementos de temperatura adicionales (termomaximizaciones) durante 3-5 minutos a 94-100°C, incluyendo un incremento de la temperatura inicial (termomaximización) a 94-100°C.
- 35

En una realización preferida, la etapa de tratamiento con bisulfito comprende

- mezclar 15-20 µl de solución que contiene el ADN genómico con 60-85 µl de la solución de bisulfito,
- 40 - adicionar de 25-35 µl de solución de dioxano, comprendiendo la solución de dioxano 158 mmol/l del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico disuelto en 1,4-dioxano,
- aplicar un protocolo de temperatura por 4-7 horas, caracterizado porque la reacción se lleva a cabo en un rango de temperatura de 57-65°C con 2-5 incrementos adicionales de temperatura durante 3-5 minutos a 94-100°C, incluyendo un incremento inicial de temperatura hasta 94-100°C.

- 45 Etapa de purificación de ADN

Después de que se complete la conversión con bisulfito, el ADN es desulfonado y purificado. Se conocen diferentes métodos para este propósito (por ejemplo, véase: DE 101 54 317 A1 = US 10/416,624; Grunau et al. 2001, loc. cit.). Normalmente, la solución de reacción se trata primero con hidróxido de sodio. Subsecuentemente se llevan a cabo una neutralización y una precipitación del ADN con alcohol.

5 En una realización preferida de las realizaciones arriba descritas de acuerdo con la divulgación, la purificación se lleva a cabo por medio de una filtración por gel, por ejemplo, con columnas de Sephadex-G25 o con columnas de Sephadex-G50. La sal de bisulfito puede ser removida muy eficientemente de esta manera, sin la necesidad de etapas de lavado adicionales. En una segunda realización preferida, la purificación se lleva a cabo a través de superficies de enlazamiento de ADN, por ejemplo a través de la resina de purificación de ADN Wizard de Promega (véase: Kawakami et al., Journal of the
10 National Cancer Institute, Vol. 92, No. 22, 2000, pp. 1805-11). Una tercera realización preferida utiliza partículas magnéticas para purificación, por ejemplo, con la ayuda del proceso Magna-Pure. Estos métodos de purificación llevan a resultados particularmente buenos en combinación con los compuestos de n-alquien glicol de acuerdo con la invención, particularmente con DME. La purificación se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Es conocido para la persona experimentada en la técnica que un rendimiento incluso incrementado puede ser obtenible por variación de las
15 instrucciones del fabricante utilizando experimentos estándar. De manera correspondiente, los protocolos optimizados son también parte de esta invención. Se proveen instrucciones técnicas adicionales para purificar ácidos nucleicos a través de filtración por gel, superficies de enlazamiento de ADN y partículas magnéticas conocidos para la persona experimentada en la técnica, por ejemplo, a partir de las instrucciones del fabricante.

En una realización la más particularmente preferida, la purificación se lleva a cabo por medio de una ultrafiltración. Tal procedimiento tiene varias ventajas técnicas y da como resultado una purificación sorprendentemente exitosa del ADN convertido. La rata de recuperación del ADN convertido que inicialmente se derivaba de una muestra archivada es muy alta (> 25%). La ultrafiltración también tiene otras ventajas. Por ejemplo, la purificación es muy flexible con respecto al volumen de las muestras que se van a usar. Además, las sales de bisulfito pueden ser removidas casi completamente. Adicionalmente, una desulfonación puede ser ejecutada sobre la membrana del filtro, lo cual adicionalmente da como
20 resultado ahorro de tiempo.

Se conocen diferentes sistemas de ultrafiltración disponibles comercialmente por parte de la persona experimentada en la técnica, los cuales pueden ser utilizados para el método de acuerdo con la invención. En una realización preferida, se usan la columnas Microcon™ de Millipore.

Es conocido para la persona experimentada en la técnica que pueden estar indicados otros procedimientos con otros sistemas de ultrafiltración, y que puede obtenerse un buen rendimiento variando las condiciones antes indicadas. Las realizaciones correspondientes son también parte de esta divulgación.

Además del ADN tratado con bisulfito también puede ser purificado de acuerdo con la divulgación por medio de la capacidad del ADN para enlazarse a superficies de sílica, en particular a membranas de sílica. Debido a su alta confiabilidad y reproducibilidad y también para reducir el esfuerzo de manipulación se prefieren los kits basados en sílica. Para una
35 persona con habilidades normales en la técnica son conocidos una enorme cantidad de kits que podrían resultar adecuados para la purificación de ADN tratado con bisulfito.

Por lo tanto, en una primera etapa se escogieron los kits más prometedores. Estos kits son: QIAamp Viral RNA Mini, columnas Zymo Spin IC en combinación con regulador suministrado con el QIAamp Viral RNA Mini kit, purificación por PCR StrataPrep PCR, AutoSeq G50, MicroSpin G25, ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit, y el kit de purificación de ADN genómico Charge Switch. En una segunda etapa estos kits fueron probados de acuerdo con los siguientes criterios: i) un
40 esfuerzo de manipulación mínimo; ii) una longitud de tiempo mínima; iii) rendimiento de ADN; y iv) concentración de sulfito en la solución de ADN después de la purificación. Como referencia, se usó la purificación por medio de un dispositivo Microcon™ (ejemplo 2d). Resultados comparablemente buenos como aquellos obtenidos por medio de un dispositivo a Microcon™ fueron obtenidos solo con el kit QIAamp Viral RNA Mini.

Además, también se utilizan preferiblemente kits que contienen las mismas soluciones y/o materiales equivalentes tales como columnas o reguladores. Estos kits son el DNeasy 96 Tissue Kit, el QIAamp 96 DNA Blood Kit, el QIAamp DSP 96 Virus MDX Kit, el DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit, el QIAamp DNA Micro Kit, el QIAamp Viral RNA Mini o el QIAamp DSP Virus Kit (todos Qiagen). Estos kits están basados en el enlazamiento de ADN a superficies de sílica.

Para la purificación después del tratamiento con bisulfito, las instrucciones del fabricante son enmendadas cada una en realizaciones preferidas por la adición de una etapa hidrolítica alcalina. Esta etapa hidrolítica alcalina se lleva a cabo por incubación con una solución alcalina que comprende un alto contenido de un alcohol. De acuerdo con la divulgación, la solución alcalina comprende hidróxido de sodio o cualquier otro hidróxido con propiedades químicas similares como hidróxido de potasio o cualquier mezcla de estos así como etanol o cualquier otro alcohol con propiedades químicas

similares, tales como isopropanol o cualquier mezcla de estos. En particular, se prefiere que la solución alcalina comprenda hidróxido de sodio y etanol. Se prefiere especialmente que la concentración de hidróxido de sodio esté en el rango de 0.1-0.3 mol/l, preferiblemente 0.15-0.25 mol/l, y particularmente preferida es 0.2 mol/l, mientras que el contenido de etanol está en el rango de 60-95%, preferiblemente 75-93%, y particularmente preferido 90%. De acuerdo con la divulgación, la rata de recuperación del ADN convertido es tan buena como la rata de recuperación obtenida con los dispositivos Microcon™ (> 25%).

De acuerdo con la divulgación también pueden utilizarse otros kits, por ejemplo otros kits que están basados en el enlazamiento de ADN a superficies de sílica, en particular a membranas de sílica. En principio también otros kits son utilizables en tanto lleven a resultados similares. Aquellos kits son por ejemplo los kits que están basados en la tecnología "conmutación de carga" (Invitrogen). Estos pueden ser los ChargeSwitch® Forensic DNA Purification Kit, y el kit de purificación de ADN genómico Charge Switch.

De acuerdo con la divulgación, la etapa de purificación de ADN sigue a la etapa de tratamiento con bisulfito. En el caso de que la etapa de tratamiento con bisulfito no se lleve a cabo, esta etapa de purificación puede ser obvia y por lo tanto no necesaria de acuerdo con la divulgación para llevar a cabo esta etapa.

En una realización preferida de la divulgación la etapa de purificación se lleva a cabo por medio del DNeasy 96 Tissue Kit, el QIAamp 96 DNA Blood Kit, el DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit, y el QIAamp DNA Micro Kit. También el QIAamp DSP 96 Virus MDx Kit, QIAamp Viral RNA Mini o el QIAamp DSP Virus Kit pueden ser utilizados. Estos kits son favorables en caso de que se esperen solamente pequeñas cantidades de ADN. De acuerdo con la divulgación también pueden utilizarse dispositivos y soluciones de otros kits si llevan a resultados similares con respecto a la calidad y cantidad del ADN purificado. Por ejemplo, estos pueden ser dispositivos y soluciones de kits que están basados en la tecnología "conmutación de carga" (Invitrogen). De acuerdo con esta realización, la muestra tratada con bisulfito es mezclada con 500-620 µl de regulador de enlazamiento, comprendiendo el regulador de enlazamiento 1-50 ng/µl, preferiblemente 5-25 ng/µl, particularmente preferido 10 ng/µl de ARN o una cantidad comparable de cualquier ácido nucleico disuelto en el regulador AVL. Después de esto se agregan 500-620 µl de etanol. La mezcla se incuba entonces a 0-37°C durante 5-20 minutos, antes de aplicarla sobre una columna de una placa del DNeasy 96 Tissue Kit, el QIAamp 96 DNA Blood Kit, o el QIAamp DSP 96 Virus MDx Kit o sobre una columna del DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit, el QIAamp DNA Micro Kit, el QIAamp Viral RNA Mini, el QIAamp DSP Virus Kit. En cualquier caso el ADN se enlaza a una columna. Después de esto la columna se lava con 300-1,000 µl de regulador de lavado AW1. Esto es seguido por una hidrólisis alcalina, en donde se aplican 450-550 µl de una solución que contiene hidróxido de sodio 0.2 mol/l y 90% de etanol durante 10-25 minutos a 15-26°C a la columna y con ella al ADN. Después de esto la columna se lava con 300-1,000 µl de regulador de lavado AW2, antes de que el ADN sea eluido de la columna por adición de 50-150 µl de uno de los reguladores de elución AE, AVE, EB o de agua.

También es posible llevar a cabo la etapa de purificación con un regulador de enlazamiento que no comprende ningún ARN o ninguna cantidad comparable de ningún ácido nucleico. Realizaciones correspondientes también son parte de la divulgación.

En una realización de la divulgación, la etapa de purificación se lleva a cabo por medio del DNeasy 96 Tissue Kit, el QIAamp 96 DNA Blood Kit, el QIAamp DSP 96 Virus MDx Kit, el DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit, el QIAamp DNA Micro Kit, el QIAamp Viral RNA Mini, el QIAamp DSP Virus Kit, que comprende

- Mezclar la muestra tratada con bisulfito con 500 a 620 µl de regulador de enlazamiento, conteniendo opcionalmente el regulador de enlazamiento 10 ng/µl de ARN disuelto en el regulador AVL,

- adición de 500-620 µl de etanol,

- Incubación a 0-37°C durante 5-20 minutos,

- enlazamiento del ADN sobre una placa del DNeasy 96 Tissue Kit, el QIAamp 96 DNA Blood Kit, o el QIAamp DSP 96 Virus MDx Kit o sobre una columna del DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit, el QIAamp DNA Micro Kit, el QIAamp Viral RNA Mini, el QIAamp DSP Virus Kit,

- lavar con 300-1,000 µl de regulador de lavado AW1,

- tratamiento con 450-550 µl de una solución que contiene hidróxido de sodio 0.2 mol/l y 90% de etanol durante 10-25 minutos a 15-26°C,

- lavar con 300-1,000 µl de regulador de lavado AW2,

- elución con 50-150 µl de uno de los reguladores de elución AE, AVE, EB o agua.

En una realización particularmente preferida 100-200 µl de muestra tratada con bisulfito se mezclan con 520-600 µl de regulador de enlazamiento AVL que comprende opcionalmente 10 ng/µl de ARN, preferiblemente 140 µl de muestra tratada con bisulfito se mezcla con 560 µl de regulador de enlazamiento. Después de esto, se agregan 520-600 µl, preferiblemente 560 µl de etanol. La mezcla se centrifuga entonces a 750-2,000 x g al menos durante 1 segundo, preferiblemente a 1,450 x g durante 1 segundo. Después de esto, se incuba a 15-25°C durante 7-15 minutos, preferiblemente a temperatura ambiente durante 10 minutos. Subsecuentemente, se agrega sobre una columna de una placa del DNeasy 96 Tissue Kit, el QIAamp 96 DNA Blood Kit, o el QIAamp DSP 96 Virus MDx Kit o sobre una columna del DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit, el QIAamp DNA Micro Kit, el QIAamp Viral RNA Mini, o el QIAamp DSP Virus Kit. Después de la centrifugación de la placa a 4,000-6,000 x g durante 1-10 minutos, preferiblemente a 5,790 x g durante 4 minutos, o de la columna a > 15,000 x g durante 0.5-10 minutos, preferiblemente por 20,000 x g durante 1 minuto, el ADN se enlaza a una columna. Después de esto la columna es lavada con 300-750 µl, preferiblemente con 500 µl de regulador de lavado AW1. Subsecuentemente la placa se centrifuga a 4,000-6,500 x g durante 1-5 minutos, preferiblemente a 5,790 x g durante 2 minutos y la columna se centrifuga a > 15,000 x g durante 0.5-5 minutos, preferiblemente durante > 20,000 x g durante 1 minuto, respectivamente. Esto es seguido por una hidrólisis alcalina, en donde se agregan 470-530 µl, preferiblemente 500 µl de una solución que comprende hidróxido de sodio 0.2 mol/l y 90% de etanol durante 11-20 minutos a 17-24°C, preferiblemente durante 15 minutos a temperatura ambiente a la columna y con ella al ADN. Esta solución es extraída por centrifugación de la placa a 4,000-6,500 x g durante 1-5 minutos, preferiblemente a 5,790 x g durante 2 minutos y de la columna a > 15,000 x g durante 0.5-5 minutos, preferiblemente por > 20,000 x g durante 1 minuto, respectivamente. Aunque no es necesario, puede ser favorable repetir la etapa de lavado incluyendo la etapa subsecuente de centrifugación con el regulador de lavado AW1 tal como se describió anteriormente. Sin embargo la columna es lavada mediante la adición de 300-750 µl, preferiblemente 500 µl de regulador de lavado AW2. Esto es seguido por una centrifugación de la placa a 4,000-6,500 x g durante 5-30 minutos, preferiblemente a 5,790 x g durante 15 minutos y de la columna a > 15,000 x g durante 0.5-10 minutos, preferiblemente a 20,000 x g durante 3 minutos, respectivamente. Además, después de la remoción del flujo a través de la columna se centrifuga a > 15,000 x g durante 0.5-5 minutos, preferiblemente durante 20,000 x g durante 1 minuto. La elución del ADN de una columna de una placa se lleva a cabo mediante la adición de 75-170 µl, preferiblemente 120 µl del regulador de elución el cual puede ser AE, AVE o EB (todos Qiagen) o agua precalentado cada uno a 60-80°C, preferiblemente a 70°C. La placa es incubada durante 1-20 minutos a 15-30°C, preferiblemente durante 5 minutos a temperatura ambiente, antes de ser centrifugada a 4,000-6,500 x g durante 0.5-20 minutos, preferiblemente a 5,790 x g durante 2 minutos. La elución del ADN de una columna del DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit, el QIAamp DNA Micro Kit, el QIAamp Viral RNA Mini, o el QIAamp DSP Virus Kit se lleva a cabo como sigue: En una primera aplicación se agregan 25-150 µl, preferiblemente 35-120 µl de regulador de elución. El regulador de elución puede ser AE, AVE o EB (todos Qiagen) o agua ajustados cada uno a 15-30°C, preferiblemente a temperatura ambiente. Después de la incubación durante 0.5-20 minutos a 15-30°C, preferiblemente durante 1-5 minutos a temperatura ambiente, la columna es centrifugada durante 0.5-5 minutos a 4,000-8,000 x g, preferiblemente durante 1 minuto a 6,000 x g. Aunque no es necesario, puede ser favorable llevar a cabo una segunda etapa de elución. Al hacerlo así, se agregan 25-75 µl, preferiblemente 35-60 µl del regulador de elución especificado más arriba. De nuevo, la columna es incubada durante 0.5-20 minutos a 15-30°C, preferiblemente durante 1-5 minutos a temperatura ambiente, antes de ser centrifugada durante 0.5-5 minutos a 4,000-8,000 x g, preferiblemente durante 1 minuto a 6,000 x g. Se combinan el primero y segundo fluido a través de la etapa de elución que contienen el ADN.

En una realización preferida, la etapa de purificación de ADN comprendiendo

- mezclar 140 µl de muestra tratada con bisulfito con 560 µl de regulador de enlazamiento,

- adición de 560 µl de etanol,

- centrifugación a 1,450 x g durante 1 segundo,

- incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos,

- aplicación de la mezcla de reacción en una o dos etapas sobre una placa del DNeasy 96 Tissue Kit, el QIAamp 96 DNA Blood Kit, o el QIAamp DSP 96 Virus MDx Kit o sobre una columna del DNeasy Tissue Kit, el QIAamp DNA Mini Kit, el QIAamp DNA Micro Kit, el QIAamp Viral RNA Mini, el QIAamp DSP Virus Kit,

- centrifugación de la placa a 5,790 x g durante 4 minutos o de la columna a > 20,000 x g durante 1 minuto;

- aplicación de 500 µl del regulador AW1 y centrifugación subsecuente de la placa a 5,790 x g durante 2 minutos o de la columna a > 20,000 x g durante 1 minuto;

- aplicación de 500 µl de una solución que contiene hidróxido de sodio 0.2 mol/l y 90% de etanol, incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugación subsecuente de la placa a 5,790 x g durante 2 minutos o de la columna a > 20,000 x g durante 1 minuto,
- 5 - opcional, aplicación de 500 µl de regulador AW1 y centrifugación subsecuente de la placa a 5,790 x g durante 2 minutos o de la columna a > 20,000 x g durante 1 minuto;
- aplicación de 500 µl de regulador AW2 y centrifugación subsecuente de la placa a 5,790 x g durante 15 minutos o de la columna a 20,000 x g durante 3 minutos,
- centrifugación de la columna a 20,000 x g durante 1 minuto,
- 10 - elución del ADN de la placa para aplicación de 120 µl de regulador de elución AE, AVE o EB o agua precalentados a 70°C, incubación durante 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugación durante 2 minutos a 5,90 x g o elución del ADN desde una columna por una primera aplicación de 35-120 µl de regulador de elución AE, AVE o EB o agua ajustados a temperatura ambiente, incubación durante 1-5 minutos a temperatura ambiente y centrifugación durante 1 minuto a 6,000 x g, y una segunda aplicación opcional de 35-60 µl de regulador de elución AE, AVE o EB o agua ajustados a temperatura ambiente, incubación durante 1-5 minutos a temperatura ambiente y centrifugación durante 1 minuto a 6,000 x g.
- 15 En una realización preferida la etapa de purificación se lleva a cabo por medio de un dispositivo de filtro Microcon™ (Millipore). Esto se hace esencialmente como se describe en las instrucciones del fabricante con una etapa adicional de hidrólisis alcalina y algunas modificaciones. La muestra después del tratamiento con bisulfito se ajusta con agua hasta un volumen de 350-500 µl, antes de ser aplicada a un dispositivo de filtro Microcon™ el cual retiene el ADN. Después se aplican 25-1,000 µl de una solución que comprende 0.1-0.3 mol/l, preferiblemente 0.15-0.25 mol/l, y particularmente
- 20 preferido hidróxido de sodio 0.2 mol/l, en donde es favorable pero no necesario incubar la solución alcalina durante 3-25 minutos a 15-26°C. El dispositivo es lavado entonces con 200-1,000 µl de regulador TE. El regulador TE tiene un pH de 8.0 y comprenden 10 mmol/l de Tris (tris-hidroximetil-amino-metano) y 0.1 mmol/l de EDTA. El ADN se retira del dispositivo por medio de 30-100 µl de regulador TE precalentado a 40-65°C. El regulador sobre el dispositivo es incubado durante 5-25 minutos a 10-60°C y contendrá entonces el ADN.
- 25 En una realización, la etapa de purificación se lleva a cabo por medio de un dispositivo de filtro Microcon™, comprendiendo
 - ajuste de la muestra después de la reacción con bisulfito con agua hasta un volumen de 350-500 µl,
 - aplicación del ADN sobre un dispositivo de filtro Microcon™,
 - tratamiento con 25-1,000 µl de hidróxido de sodio 0.2 mol/l, incubación opcional durante 3-25 minutos a 15-26°C,
- 30 - lavado con 200-1,000 µl de regulador TE, conteniendo el regulador TE de pH 8.0 10 mmol/l de Tris-hidroximetil-amino-metano y 0.1 mmol/l de EDTA,
- remoción del ADN por medio de 30-100 µl de regulador TE precalentado a 40-65°C incubado durante 5-25 minutos a 10-60°C.
- 35 En una realización particularmente preferida la muestra después de la reacción con bisulfito es ajustada con agua hasta un volumen de 370-450 µl, preferiblemente de 400 µl para purificación. La mezcla se agrega entonces a un dispositivo de filtro Microcon™. Subsecuentemente el dispositivo es centrifugado a 10,000-18,000 x g durante 5-30 minutos, preferiblemente a 14,000 x g durante 15 minutos. Aunque no es necesario es favorable seguir con 1-2 repeticiones de una etapa de lavado. Para cada etapa de lavado se agregan 400 µl de regulador TE como se describió más arriba y subsecuentemente el dispositivo es centrifugado a 10,000-18,000 x g durante 5-30 minutos, preferiblemente a 14,000 x g durante 12 minutos. Después de esto se agregan 50-700 µl, preferiblemente 100-400 µl de hidróxido de sodio 0.2 mol/l al dispositivo. Aunque no
- 40 es necesario es favorable incubar la solución del dispositivo durante 5-20 minutos a 15-30°C, preferiblemente durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Subsecuentemente el dispositivo es centrifugado a 10,000-18,000 x g durante 5-30 minutos, preferiblemente a 14,000 x g durante 10-12 minutos. Después de esto el dispositivo es lavado por 1-4 veces como se describió anteriormente. El ADN es recuperado por elución en una o dos etapas. Por lo tanto se agregan 30-85 µl, preferiblemente 37.5-75 µl del regulador TE precalentado a 45-60°C, preferentemente a 50°C. El regulador en el dispositivo es incubado entonces durante 7-15 minutos a 12-55°C, preferiblemente durante 10 minutos a 15-50°C, antes de que el dispositivo sea invertido y centrifugado a 500-5,000 x g durante 0.5-20 minutos, preferiblemente a 1,000 x g durante 5 minutos. Esta realización se lleva a cabo esencialmente como se describe en WO05/038051
- 45

En una forma de realización preferida, la etapa de purificación comprende

- ajuste de la muestra después de la reacción con bisulfito con agua hasta un volumen de 400 µl,
- aplicación de la mezcla sobre un dispositivo de filtro Microcon™ y centrifugación subsecuente a 14,000 x g durante 15 minutos,

5 - opcional, 1-2 repeticiones de la etapa de lavado siguiente: aplicación de 400 µl de regulador TE, conteniendo el regulador TE de pH 8 10 mmol/l de Tris-hidroximetil-amino-metano y 0.1 mmol/l de EDTA, centrifugación subsecuente a 14,000 x g durante 12 minutos

- aplicación de 100-400 µl de hidróxido de sodio 0.2 mol/l, incubación opcional durante 10 minutos a temperatura ambiente, y centrifugación subsecuente a 14,000 x g durante 10-12 minutos

10 - 1-4 repeticiones de lo siguiente: aplicación de 400 µl de agua o regulador TE y centrifugación subsecuente a 14,000 x g durante 12 minutos

- elución en una o dos etapas por aplicación de 37.5 a 75 µl de regulador TE precalentado a 50°C, incubación durante 10 minutos a 15-50°C, y subsecuente inversión del dispositivo de filtro Microcon™ y centrifugación a 1000 x g durante 5 minutos .

15 Etapa de amplificación

En una realización de la divulgación la etapa de amplificación comprende una detección de posiciones que son metiladas en el ADN genómico de la muestra archivada. Alternativamente, también comprende una detección de posiciones que son no metiladas en el ADN genómico de la muestra archivada. Desde luego, también es posible detectar simultáneamente las posiciones que están metiladas y detectar posiciones que no están metiladas en el ADN genómico de la muestra archivada por la etapa de amplificación.

20

Se prefiere especialmente que el patrón de metilación sea analizado por medio de secuenciación con bisulfito, el método COBRA, el método Ms-SNuPE (Extensión de Cebador de Nucleótido Individual Sensible a Metilación), el método MSP (metilación Específico para Metilación), incluyendo el método MSP anidado, el método HeavyMetil™, el método MetiLight™, o el ensayo QM. Desde luego, si se desea, también es posible combinar dos o más de estos métodos.

25 En una realización de la divulgación, la etapa de amplificación se lleva a cabo por uno o más de los siguientes métodos y/o por una combinación de uno o más de los siguientes métodos de uno con otro: PCR, el método de secuenciación con bisulfito, el método COBRA, el método Ms-SNuPE (Extensión de Cebador de Nucleótido Individual Sensible a Metilación), el método MSP (metilación Específico para Metilación), el método MSP anidado, el método HeavyMetil™, el método MetiLight™, o el ensayo QM.

30 De acuerdo con la divulgación, se da una mejor capacidad de amplificación si se hace una o más de las siguientes enmiendas en comparación con las condiciones normales que una persona con habilidades normales en la técnica escogería probablemente con respecto a los métodos especificados anteriormente: i) incremento en la concentración de la actividad de polimerasa; ii) incremento en la concentración de cada nucleótido, con lo cual simultáneamente la concentración de cloruro de magnesio también tiene que ser ajustada como se explica más adelante; y iii) elongación del tiempo para la etapa de elongación y fusión como se explica más adelante. Este es el caso para el ADN tratado con bisulfito derivado de muestras archivadas así como para ADN genómico no tratado con bisulfito derivado de muestras archivadas.

35

En una realización preferida de la divulgación la etapa de amplificación se lleva a cabo con el uso de ADN polimerasa y comprende uno o más de los siguientes: A) La concentración de ADN polimerasa está en el rango de 0.05-0.3 U/µl de la mezcla de reacción. B) La concentración de cada nucleótido está en el rango de 200-800 µmol/l. Por lo tanto la concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂) en la mezcla de reacción se ajusta a la concentración de nucleótidos como es bien conocido por los experimentados en la técnica. C) El tiempo para elongar el ADN de plantilla está en el rango de 0.1-1.0 s/bp del ADN de plantilla. Este tiempo usualmente comprende para un PCR la etapa de elongación así como la etapa de fusión si el caso. Si la fusión se lleva a cabo a una temperatura por debajo de 53°C, este tiempo corresponde solamente a la etapa de elongación.

40

45 En una realización, el método de la divulgación incluye un método para amplificar ADN derivado de una muestra archivada, que comprende uno o más de los siguientes:

- la concentración de polimerasa está en el rango de 0.05-0.3 U/µl,

- la concentración de cada nucleótido está en el rango de 200-800 $\mu\text{mol/l}$;
- el tiempo de la etapa de elongación está en el rango de 0.1-1.0 s/bp.

5 En una realización particularmente preferida la etapa de amplificación comprende uno o más de los siguientes: A) Una concentración de polimerasa en el rango de 0.08-0.25 U/ μl , preferiblemente la concentración es 0.15 U/ μl en la mezcla de reacción. B) La concentración de cada nucleótido está en el rango de 350-650 $\mu\text{mol/l}$, preferiblemente la concentración de cada nucleótido es 400 $\mu\text{mol/l}$ en la mezcla de reacción. Como ya se explicó anteriormente la concentración de cloruro de magnesio (MgCl_2) en la mezcla de reacción se ajusta por lo tanto a la concentración de los nucleótidos como es bien conocido por los expertos en la técnica. C) El tiempo para elongar el ADN de plantilla está en el rango de 0.25-0.75 s/bp del ADN de plantilla, preferiblemente es 0.5 s/bp del ADN de plantilla. Como ya se describió, este tiempo comprende usualmente para un PCR en la etapa de elongación así como la etapa de fusión si el caso. Si la fusión se lleva a cabo a temperaturas por debajo de 53°C, este tiempo corresponde solamente a la etapa de elongación.

En una realización preferida, la etapa de amplificación comprende uno o más de los siguientes:

- la concentración de polimerasa es 0.15 U/ μl ,
- la concentración de cada nucleótido es 400 $\mu\text{mol/l}$,
- 15 - el tiempo de la etapa de elongación es 0.5 s/bp.

En una realización preferida de la divulgación, la etapa de amplificación se lleva a cabo con el fin de amplificar un fragmento definido, una subfracción de fragmentos o para amplificar el genoma completo. Para esto, puede usarse uno o más de los métodos tal como son conocidos para los experimentados en la técnica. Para esto, la etapa de amplificación puede ser llevada a cabo mediante reacciones de amplificación que no son métodos basados en PCR por ejemplo, por la técnica NASBA/TMA. Pero más preferiblemente, se usan los métodos de reacción en cadena mediada por ligasa (LCR), y en particular la reacción en cadena de polimerasa (PCR).

25 Preferiblemente, tal amplificación se utiliza para un enriquecimiento del ADN de interés que lleva la información epigenómica de la muestra archivada. Después de esto puede ejecutarse cualquier método para análisis por metilación, en particular, el método de secuenciación por bisulfito, el método COBRA, el método Ms-SNuPE (Extensión de Cebador de Nucleótido Individual Sensible a Metilación), el método MSP (metilación Específico para Metilación), el método MSP anidado, el método HeavyMetil™, el método MetiLight™, o el ensayo QM.

Adicionalmente, también se prefiere que después de una amplificación de un fragmento definido, una subfracción de fragmentos o el genoma completo el ADN amplificado es sometido a análisis adicionales, por ejemplo el análisis de mutaciones puntuales o SNP.

30 En principio, de acuerdo con la divulgación es posible que las mezclas de reacción de la amplificación comprendan más de dos cebadores. Por lo tanto la amplificación dará como resultado más de un amplicón. En caso de que la amplificación se lleve a cabo por PCR, tal procedimiento es conocido como PCR multiplex por los experimentados en la técnica. Tal procedimiento es en particular ventajoso si solamente hay disponibles pequeñas cantidades de ADN. Adicionalmente tiene también la ventaja de una reducción de costes, disminución del esfuerzo de manipulación y acortamiento del experimento,

35 Realizaciones para pequeñas cantidades de una muestra archivada como material de partida

En una realización de la divulgación, se utilizan pequeñas cantidades de la muestra archivada como material de partida. Tales cantidades pequeñas pueden ser cualquier parte de un tejido de una muestra archivada. La parte de tejido está en el siguiente rango de tamaño: El área está entre 0.025-50 mm^2 , preferiblemente entre 0.05-10 mm^2 , y lo más preferiblemente entre 0.1-3 mm^2 . Por lo tanto el espesor de la parte de tejido está en el rango de 5-20 μm , preferiblemente en el rango de 7-13 μm , y lo más preferiblemente la parte de tejido tiene un espesor de 10 μm . Desde luego, las partes de tejido con otras dimensiones también son aplicables. Si la parte de tejido es de un volumen diferente, una persona con habilidades normales en la técnica sabrá cómo ajustar las siguientes realizaciones para cantidades pequeñas de una muestra archivada como material de partida.

45 Microdissección

En una realización preferida, se microdissecciona una célula de una muestra archivada. Por lo tanto una sección de una muestra archivada en el rango de 5-20 μm , preferiblemente en el rango de 7-13 μm , y más lo preferiblemente 10 μm de

espesor es montada sobre una lámina como se especifica más adelante. La microdissección puede hacerse por ejemplo por medio de un procesamiento por captura por láser. Pero cualquier otro método conocido por los experimentados en la técnica también es adecuado.

5 Diversos métodos para microdissección por medio de procesamiento por captura de láser son conocidos para los experimentados en la técnica (por ejemplo Eltoum IA, Siegal GP and Frost AR. 2002. Microdissection of histologic sections: past, present, and future. *Adv Anat Pathol.* Sep;9(5):316-22). En una realización preferida, el método de captura por láser es el AutoPix™ LCM System (Arcturus, Estados Unidos de América). En resumen, una película es fusionada térmicamente al área de tejido respectivo por medio de un láser, en donde el área de tejido es diseccionada.

10 En otra realización preferida, la microdissección mediada por láser se lleva a cabo montando la sección de tejido sobre una lámina recubierta con membrana por ejemplo sobre MembraneSlides (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Alemania).

15 En una realización adicional preferida, la sección de tejido es montada sobre una lámina convencional microscópica. Después de esto la sección de tejido es sometida a una tinción antes de que las áreas deseadas sean microdisseccionadas. Desde luego, también procedimientos similares son aplicables en tanto permitan la identificación de las partes deseadas de la muestra, en particular, en tanto permitan la identificación de la célula o grupo de células deseadas en la muestra. Tal tinción puede ser por ejemplo una tinción con hematoxilina-eosina, una tinción con azul de metileno, una tinción con hemalum-eosina, una tinción con azan, una tinción de Schiff-ácido peryódico, una tinción con azul de Prusia, una tinción Masson-Goldner, una tinción Ladewig, una tinción elástica-van Gieson, una tinción Gomori, una tinción con verde de metilo, una tinción con rojo rápido nuclear, una tinción con azul de Evans, una tinción con SF verde brillante amarillento, una tinción de Wright, una tinción de May-Grunwald, una tinción con azul de toluidina O, una tinción con azure B, una tinción de Giemsa o cualquier otra tinción histológica o histopatológica. Pero también puede utilizarse cualquier tinción inmunohistológica, por ejemplo, cualquier clase de tinción que está basada en los anticuerpos o en hibridación de ADN o ARN. Estos métodos de tinción están bien descritos y son bien conocidos por los experimentados en la técnica. Las realizaciones correspondientes están incluidas aquí en el método de acuerdo con la divulgación. Desde luego, puede omitirse completamente cualquier tinción si no se desea o no es adecuada para la microdissección.

25 La microdissección se lleva a cabo por medio de un instrument Microbeam instrument (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Alemania). Pero también pueden utilizarse instrumentos similares que permitan una disección de las células individuales, o grupo de células o partes de tejido de acuerdo con la invención. Estas técnicas son bien conocidas para los experimentados en el arte y por lo tanto se incluyen aquí como realizaciones preferidas.

30 El material diseccionado es recolectado en tubos preferiblemente con tapas adhesivas para procesamiento posterior. Las tapas adhesivas pueden ser de cualquier clase de tapas adhesivas por ejemplo Adhesive Caps 200 (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Alemania). Debido a la microdissección no es necesaria la remoción de parafina.

En otra realización preferida, el material diseccionado es recolectado en la tapa de un tubo normal que contiene el volumen especificado más abajo de regulador de lisis.

Etapas de lisis

35 En una realización, el material de muestra microdisseccionado es sometido a una etapa de lisis. Por lo tanto, se agregaron cuidadosamente a la tapa 20 µl de regulador de lisis (Tris-HCl 50 mmol/l, pH 8.0, EDTA 1 mmol/l, Tween al 0.5% v/v, 10 ng/µl de poli-dA, 3 mg/ml de proteinasa K). Como ya describió anteriormente, son también aplicables otros reguladores de lisis tal como son conocidos para los experimentados en el arte. Los tubos fueron cerrados cuidadosamente evitando una pérdida de la gota de la tapa. Subsecuentemente los tubos fueron incubados durante 1-48 horas, preferiblemente durante 5-40 24 horas, y lo más preferiblemente durante 12 horas a 40-80°C, preferiblemente a 50-70°C y lo más preferiblemente a 60°C. Esto puede hacerse por ejemplo en un baño de agua, termomezclador o ciclizador de PCR. Si se utiliza un ciclizador de PCR, preferiblemente también la cubierta del ciclizador se fija a misma temperatura que el ciclizador, puesto que el material de muestra está localizado en las tapas.

Después de la incubación la muestra es centrifugada para transferir la muestra lisada al fondo del tubo.

45 En una realización preferida, la cantidad de regulador de lisis se ajusta a los tamaños del material diseccionado. Esto se caracteriza porque al menos el material diseccionado es cubierto completamente por el regulador de lisis. Después de la lisis del material, el regulador de lisis es concentrado a 20 µl por centrifugación al vacío, liofilización o cualquier otro método adecuado tal como son conocidos para los experimentados en la técnica.

Tratamiento con bisulfito

En una realización, la muestra lisada es sometida entonces directamente a tratamiento con bisulfito debido a la pequeña cantidad de material de partida y por lo tanto de ADN. Para el tratamiento con bisulfito, se agregan a la tapa 9-70 µl, preferiblemente 12-52 µl, y lo más preferiblemente 38 µl de solución de bisulfito. Se utiliza una solución de bisulfito tal como ya se describió anteriormente. Subsecuentemente la solución de bisulfito en la tapa es incubada durante 0.5-15 minutos, preferiblemente durante 2-10 minutos, y lo más preferiblemente durante 5 minutos a 0-80°C, preferiblemente a 10-40°C, en particular preferiblemente a 15-30°C, y lo más preferiblemente a temperatura ambiente. La adición e incubación de la solución de bisulfito en la tapa disuelve cualquier ADN remanente en la tapa. Después de la incubación, la muestra es centrifugada.

En una realización preferida, la adición de la solución de bisulfito se lleva a cabo en dos etapas que se parecen entre sí. Esto tiene la ventaja de que todo el ADN unido a la tapa es sujeto para procesamiento posterior. En la primera etapa, se agregan 9-35 µl, preferiblemente 12-26 µl, y lo más preferiblemente 19 µl de solución de bisulfito. Se utiliza una solución de bisulfito como ya se describió anteriormente. Subsecuentemente la solución de bisulfito en la tapa es incubada durante 0.5-15 minutos, preferiblemente durante 2-10 minutos y lo más preferiblemente durante 5 minutos a 0-80°C, preferiblemente a 10-40°C, en particular preferiblemente a 15 a 30°C, y lo más preferiblemente a temperatura ambiente. La adición e incubación de la solución de bisulfito en la tapa disuelve cualquier ADN remanente en la tapa. Después de la incubación, la muestra es centrifugada, antes de que se agregue de nuevo solución de bisulfito en una segunda etapa que es repetición de la primera etapa.

Después de esto, en una realización, se agregan 2-12 µl, preferiblemente 4-8 µl, y lo más preferiblemente 6 µl de la solución de DME como se describió anteriormente. La conversión con bisulfito en lo que sigue se lleva a cabo como se describió ya anteriormente. Las realizaciones correspondientes para cantidades pequeñas de material de partida están incluidas aquí. En una realización particular se aplica el siguiente protocolo de temperaturas: 5 minutos 99°C, 22 minutos 60°C, 3 minutos 99°C, 97 minutos 60°C, 3 minutos 99°C y 177 minutos 60°C. Por lo tanto se usan uno o más baño de agua, termomezcladores o ciclizadores de PCR.

Purificación de ADN

En una realización, se purifica el ADN después del tratamiento con bisulfito. Por lo tanto pueden ser usados los métodos para la purificación de pequeñas cantidades de ADN, tal como son conocidos para los experimentados en la técnica. En una realización preferida la purificación se lleva a cabo por medio de columnas Zymo-Spin IC (Zymo Research, Estados Unidos). Por lo tanto, se agregan 75-250 µl, preferiblemente de 125-210 µl, y lo más preferiblemente 166 µl de regulador AVL, AL o ATL (todos Qiagen, Alemania) a las columnas Zymo-Spin IC. Después de esto la mezcla de reacción con bisulfito se agrega a la columna. La punta de pipeta usada puede ser colocada en el tubo de reacción del bisulfito respectivo para uso posterior con el fin de evitar pérdida de ADN debido a gotas que se adhieran a la punta, pero esto no es estrictamente necesario de acuerdo con la invención. De acuerdo con la divulgación también puede utilizarse una punta de pipeta nueva. Además, se agregan 20-170, preferiblemente 60-120 µl y lo más preferiblemente 90 µl del regulador AVL, AL o ATL al tubo de reacción de bisulfito vacío y subsecuentemente es transferida a la correspondiente columna Zymo-Spin IC. La mezcla de reacción de bisulfito y el regulador transferido AVL, AL o ATL son mezclados en las columnas pipeteando hacia arriba y hacia abajo varias veces. Subsecuentemente, la mezcla es incubada en la columna durante 1-30 minutos, preferiblemente durante 3-15 minutos y lo más preferiblemente durante 10 minutos a 0-60°C, preferiblemente a 10-40°C, en particular preferiblemente a 15-30°C, y lo más preferiblemente a temperatura ambiente. Después de esta incubación, se agregan 175-400 µl, preferiblemente 225-275 µl, lo más preferiblemente 250 µl de etanol a las columnas y se mezcla. Subsecuentemente la columna es centrifugada durante 0.5-10 minutos, preferiblemente durante 1-5 minutos, lo más preferiblemente durante 1 minuto a 10,000-20,000 x g, preferiblemente a 14,000-18,000 x g, y lo más preferiblemente a 16,000 x g. La columna es transferida entonces a un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Después de esto, se agregan a la columna 250-750 µl, preferiblemente 350-650 µl, y lo más preferiblemente 500 µl de un regulador o solución que comprende 0.2 mol/l de NaOH y/o etanol al 90% v/v. También en vez de esto, pueden utilizarse reguladores o soluciones adecuados tal como ya han sido descritos anteriormente. A continuación la columna es centrifugada durante 0.5-10 minutos, preferiblemente durante 1-5 minutos, lo más preferiblemente durante 1 minuto a 10,000-20,000 x g, preferiblemente a 14,000-18,000 x g, y lo más preferiblemente a 16,000 x g. La columna se transfiere entonces a un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Después de esto, se agregan a cada columna 250-750 µl, preferiblemente 350-650 µl, y lo más preferiblemente 500 µl de regulador AW1 (Qiagen, Alemania). De nuevo, la columna es centrifugada durante 0.5-10 minutos, preferiblemente durante 1-5 minutos, lo más preferiblemente durante 1 minuto a 10,000-20,000 x g, preferiblemente a 14,000-18,000 x g, y lo más preferiblemente a 16,000 x g y se transfiere a un nuevo de recolección de 2 ml. Después de esto, se agregan 250-750 µl, preferiblemente 350-650 µl, y lo más preferiblemente 500 µl de regulador AW2 (Qiagen, Alemania). De nuevo, la columna es centrifugada durante 0.5-15 minutos, preferiblemente durante 1-8 minutos, lo más preferiblemente durante 3 minutos a 10,000-20,000 x g, preferiblemente a 14,000-18,000 x g, y lo más preferiblemente a 16,000 x g. Después de esto, la columna es colocada en un tubo de recolección para la elución del ADN el cual es adecuado para análisis posterior. La elución se lleva a cabo en una etapa. Por lo tanto, el ADN es eluido mediante la adición de 15-50 µl, preferiblemente de 20-30 µl, y lo más preferiblemente de 25 µl de agua o de regulador AE, AVE o EB (todos Qiagen) precalentados a 30-70°C, preferiblemente

40-60°C, y lo más preferiblemente a 50°C. Después la columna es incubada durante 0-10 minutos, preferiblemente durante 1-5 minutos, lo más preferiblemente durante 1 minuto, antes de ser centrifugada durante 0.5-10 minutos, preferiblemente durante 1-5 minutos, lo más preferiblemente durante 1 minuto a 1,000-10,000 x g, preferiblemente a 4,000-8,000 x g, y lo más preferiblemente a 6,000 x g.

- 5 En una realización preferida, la elución se lleva a cabo en dos etapas. En una primera etapa, el ADN es eluido mediante la adición de 7.5-25 µl, preferiblemente de 10-15 µl, y lo más preferiblemente de 12.5 µl de agua o de regulador AE, AVE o EB (todos Qiagen) precalentados a 30-70°C, preferiblemente 40-60°C, y lo más preferiblemente a 50°C. Después de esto la columna es incubada durante 0-10 minutos, preferiblemente durante 1-5 minutos, lo más preferiblemente durante 1 minuto, antes de ser centrifugada durante 0.5-10 minutos, preferiblemente durante 1-5 minutos, lo más preferiblemente durante 1 minuto a 1,000-10,000 x g, preferiblemente a 4,000-8,000 x g, y lo más preferiblemente a 6,000 x g. Después de esto la segunda etapa de elución se lleva a cabo como una repetición de la primera etapa de elución.

Análisis subsecuente

En una realización, el ADN se cuantifica directamente después de la lisis o después de tratamiento con bisulfito y subsecuente purificación por medio de un ensayo en tiempo real (véase ejemplo 10).

- 15 En una realización de la divulgación la muestra sometida a lisis es sujeto directamente de análisis subsecuente sin ningún tratamiento con bisulfito o purificación de ADN. Esto es preferido en particular si un tratamiento con bisulfito no es necesario para el análisis subsecuente. Por ejemplo para el análisis del patrón de metilación por medio de enzimas de restricción. Ejemplos de tales métodos son el ya mencionado método DMH o el ensayo de restricción también conocido como método MestVal (véase más arriba).
- 20 En una realización preferida, el ADN después del tratamiento con bisulfito y subsecuente purificación es sujeto de análisis o amplificación subsecuente. En una realización particular, se prefiere que el análisis subsecuente es un análisis del patrón de metilación del ADN original derivado de la muestra archivada.

Para el análisis o amplificación del ADN tratado con bisulfito y purificado derivado de pequeñas cantidades de una muestra archivada refiérase a lo anterior de acuerdo con la etapa de amplificación. Se incluyen aquí realizaciones correspondientes.

- 25 Kits de prueba

El sujeto de la presente divulgación es también un kit, que comprende uno o más de lo siguiente:

- Un contenedor.

- 30 - Uno o más solventes orgánicos para remoción de parafina. Este puede ser un solvente que disuelva la parafina y es un solvente del grupo "limoneno, xileno o cualquier mezcla de estos solventes". Desde luego, el kit puede comprender solventes orgánicos como benceno, etilbenceno, tolueno o solventes con propiedades químicas similares o cualquier mezcla de estos solventes. Adicionalmente el kit puede comprender uno o más solventes orgánicos que son adecuados para el lavado de la muestra después de disolver la parafina y que permiten una mejor rehidratación de la muestra, tal clase de solvente o solventes es un solvente del grupo "etanol, metanol, isopropanol o cualquier mezcla de estos solventes uno con otro o con agua". Desde luego, el kit también puede comprender solventes con propiedades químicas comparables.

- 35 - Proteasa en solución o como un polvo. Esta proteasa puede ser una serina proteasa, una tiol proteasa, una carboxi proteasa, una metaloproteasa, proteinasa K o cualquier mezcla de estas proteasas. En una variante preferida del kit la proteasa es proteinasa K en forma de un polvo o disuelta en una solución apropiada.

- 40 - Uno o más regulador de lisis, comprendiendo el regulador de lisis 50 mmol/l de Tris (tris-hidroximetil-amino-metano) pH 8.0, 1 mmol/l de EDTA, Tween 20 al 0.5% v/v. Desde luego, el kit también puede comprender cualquier otro regulador de lisis con propiedades similares. Tal regulador puede incluir detergentes y/o sales caotrópicas.

- 45 - Una o más soluciones para extracción de ADN. De acuerdo con la divulgación el kit puede comprender uno o más de los siguientes reguladores: a) un regulador de enlazamiento AL/E (Qiagen); b) regulador de enlazamiento AL (Qiagen); c) regulador de enlazamiento ATL (Qiagen); d) regulador de enlazamiento AVL (Qiagen); e) etanol, preferencialmente etanol puro de al menos 96%; f) reguladores de lavado AW1 (Qiagen); g) regulador de lavado AW2 (Qiagen); h) regulador de elución AE (Qiagen); i) regulador de elución AVE (Qiagen); j) regulador de elución EB (Qiagen); k) agua

- Uno o más dispositivos para extracción de ADN. De acuerdo con la divulgación el kit puede comprender una o más de las siguientes placas o columnas, en tanto son parte de los siguientes kits: DNeasy 96 Tissue Kit, QIAamp 96 DNA Blood Kit,

QIAamp DSP 96 Virus MDx Kit, DNeasy Tissue Kit, QIAamp DNA Mini Kit, QIAamp DNA Micro Kit, QIAamp Viral RNA Mini o QIAamp DSP Virus Kit (todos Qiagen). De acuerdo con la divulgación también dispositivos de otros kits pueden hacer parte de un kit de la divulgación. Por ejemplo, estos puede ser dispositivos que están basados en la tecnología "nexttec" (nexttec) o la tecnología "conmutación de carga" (Invitrogen). Si puede ser el caso, el kit comprende también soluciones adicionales adecuadas para extraer ADN.

- Una o más soluciones para tratamiento con bisulfito. Esta puede ser cualquier solución como se describe en WO05/038051. Preferiblemente, el kit puede comprender:

A) Una solución de bisulfito con un pH en el rango de 4.7 a 6.5, preferiblemente en el rango de 5.0 a 6.0, y particularmente de forma preferida en el rango de 5.45 a 5.50. La solución de bisulfito comprende hidrogenosulfito en una concentración de 3.5-6.0, preferiblemente en una concentración de 4.4-5.3, y particularmente preferido en una concentración de 4.83-4.93 mol/l. Por ejemplo, tal clase de solución de bisulfito puede ser obtenida agregando 4.708 g de disulfito de sodio y 1.128 g de sulfito de sodio a 10 ml de agua. Desde luego, como es sabido por los experimentados en la técnica, un kit puede comprender también soluciones con otras concentraciones. Como puede ser el caso, tienen que tomarse entonces volúmenes apropiados. Después disolver las sales, el volumen final de la solución es aproximadamente 12 ml. Por lo tanto el kit puede comprender disulfito de sodio y/o sulfito de sodio cada uno solo o combinado en la forma de sales o disueltos en solución.

B) Adicionalmente u kit puede comprender agua.

c) Una solución depuradora de radicales orgánicos que comprende un solvente orgánico y 50-1,000 mmol/l, preferiblemente 100-750 mmol/l, y particularmente preferido 158-500 mmol/l del depurador de radicales del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico o cualquier otro depurador de radicales adecuado como se describe en WO01/98528 o WO05/038051. Para variantes preferidas del kit, un kit puede comprender una solución de DME que comprende 250-1,000 mmol/l, preferiblemente 350-750 mmol/l, y particularmente preferida 500 mmol/l de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico disueltos en dietilenglicoldimetiléter (DME) o una solución en dioxano que comprende 50-500 mmol/l, preferiblemente 75-300 mmol/l, y particularmente preferido 158 mmol/l de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico disuelto en 1,4-dioxano.

- Uno o más dispositivos para tratamiento con bisulfito. Este puede ser cualquier dispositivo como se describe en WO01/98528 o WO05/038051.

- Una o más soluciones para purificación de ADN. Esta puede ser en parte las mismas soluciones descritas anteriormente para la extracción de ADN. De acuerdo con la divulgación el kit puede comprender uno o más de los siguientes reguladores:

A) regulador de enlazamiento AVL (Qiagen), el regulador AVL de enlazamiento puede comprender 1-50 ng/μl, preferiblemente 5-25 ng/μl, particularmente preferido 10 ng/μl de ARN o una cantidad comparable de cualquier ácido nucleico.

B) etanol, preferiblemente etanol puro al menos al 96%.

C) Regulador de lavado AW1 (Qiagen).

D) Regulador de lavado AW2 (Qiagen).

E) Una o más soluciones adecuadas para una hidrólisis alcalina. Preferiblemente tal clase de solución comprende 0.1-0.3 mol/l, preferiblemente 0.15-0.25 mol/l, y particularmente preferidas 0.2 mol/l de hidróxido de sodio y 60-90%, preferiblemente 75-90%, y particularmente preferida 90% de etanol. Es preferiblemente adicionalmente que tal clase de soluciones comprenda 0.1-0.3 mol/l, preferiblemente 0.15-0.25 mol/l, y particularmente preferido 0.2 mol/l de hidróxido de sodio.

F) Regulador de elución AE (Qiagen);

G) Regulador de elución AVE (Qiagen);

H) Regulador de elución EB (Qiagen);

I) agua.

- Uno o más dispositivos para purificación de ADN. De acuerdo con la divulgación este puede ser el mismo dispositivo que ya se describió para la extracción de ADN. Es preferible que el kit pueda comprender una o más de las siguientes placas o

columnas en tanto son parte de los siguientes kits: DNeasy 96 Tissue Kit, QIAamp 96 DNA Blood Kit, QIAamp DSP 96 Virus MDx Kit, DNeasy Tissue Kit, QIAamp DNA Mini Kit, QIAamp DNA Micro Kit, QIAamp Viral RNA Mini o QIAamp 5 DSP Virus Kit (todos Qiagen). También pueden estar comprendidas columnas Zymo Spin I, II y/o III. De acuerdo con la divulgación también pueden estar comprendidos en un kit de la invención dispositivos de otros kits. Por ejemplo, pueden ser dispositivos que están basados en la tecnología "conmutación de carga" (Invitrogen). Si puede ser el caso, el kit comprende también soluciones adicionales adecuados para extraer ADN. De acuerdo con la divulgación el kit puede comprender también columnas o dispositivos que están basados en la tecnología Microcon™.

- soluciones y/o sustancias para amplificación de ADN. De acuerdo con la divulgación estas pueden ser una o más de las siguientes:

10 A) Uno o más cebadores, los cuales son adecuados para amplificación de uno o más amplificados de ADN, entre otros el cebador o cebadores pueden ser modificados, por ejemplo con un marcador para detección como es bien conocido para una persona experimentada en la técnica como el colorante FAM, Cy 3, Cy 5, biotina, digoxigenina,

15 B) Una o más sondas, las cuales pueden ser usadas para registrar específicamente la amplificación de uno o más amplificados por ejemplo en un ensayo en tiempo real, entre otros la sonda o sondas pueden ser modificadas, por ejemplo, con un detenedor inhibidor y/o con un marcador para detección como es bien conocido por una persona experimentada en la técnica como el colorante FAM tinte o el detenedor de agujero negro BHQ o dabcyI,

C) Uno o más bloqueadores, los cuales son ácidos nucleicos y que pueden ser utilizados para bloquear el enlazamiento de un cebador específico o la replicación por de ADN polimerasa, entre otros el bloqueador o bloqueadores pueden ser modificados, por ejemplo, con 3'fosfato como es bien conocido por una persona experimentada en la técnica,

20 D) Uno o más reguladores de reacción, los son adecuados para una reacción de PCR,

E) Nucleótidos, los cuales puede ser dATP, dCTP, dTTP, dUTP y dGTP o cualquier derivado de estos nucleótidos,

F) $MgCl_2$ como una sustancia o en solución y/o cualquier otra sal de magnesio, la cual puede ser utilizada para llevar a cabo una replicación de ADN polimerasa,

G) ADN polimerasa, por ejemplo Taq ADN polimerasa o cualquier otra polimerasa con o sin actividad de lectura de prueba,

25 H) Colorante o detenedor, el cual puede ser utilizado para la detección de los amplificados como es conocido en la técnica, por ejemplo, un colorante de intercalación como Verde SYBR o un colorante para enlazamiento o un cebador o sonda o bloqueador como el colorante FAM o el detenedor de agujero negro BHQ o dabcyI,

- un manual y/o descripción para llevar a cabo el método de la divulgación o solamente para llevar a cabo una realización del método de acuerdo con la divulgación, y/o

30 - cualquier reactivo, solución, dispositivo y/o instrucción que sea útil para la realización de un ensayo de acuerdo con la invención.

Sujeto de la divulgación es un kit de prueba para llevar a cabo un método de acuerdo con una o más de las realizaciones de la divulgación, que comprende

- un contenedor

35 - solventes orgánicos para remoción de parafina,

- proteinasa K y/o regulador para lisis,

- soluciones y/o dispositivos para extracción de ADN,

- soluciones y/o dispositivos para tratamiento con bisulfito,

- soluciones y/o dispositivos para purificación de ADN,

40 - soluciones y/o sustancias para amplificación de ADN,

- un manual y/o descripción para llevar a cabo el método de la divulgación.

Uso de los métodos y kit de prueba

Los métodos y kits de prueba divulgados aquí se usan preferiblemente para la detección del estado de metilación del ADN de una muestra tomada de un tejido de una persona enferma o saludable o de una persona cuyo estado de salud no está determinado hasta el momento con respecto a una enfermedad definida. En una manera particularmente preferida los estados de metilación de ADN así determinados son comparados entonces uno con otro y/o con referencia a un estado de metilación de ADN de referencia.

Por lo tanto la divulgación también comprende el uso del método de acuerdo con una o más de las realizaciones o de un kit de prueba de acuerdo con la divulgación para la detección del estado de metilación del ADN.

En caso de que el estado de salud de una persona de quien se deriva la muestra no está o está solo insuficientemente determinado hasta el momento, los resultados del análisis de estado de metilación del ADN pueden ser utilizados para determinar el estado de salud de dicha persona con respecto a una enfermedad específica o cualquier predisposición para una enfermedad específica. Por lo tanto se prefiere particularmente que el estado de metilación de ADN se use para diagnóstico de una enfermedad o para diagnosticar una predisposición hacia una enfermedad. Adicionalmente, también se prefiere particularmente que el estado de metilación de ADN se utiliza para el diagnóstico de una progresión de una enfermedad, si el estado de salud de una persona con respecto a dicha enfermedad específica ha sido ya determinado.

De acuerdo con la divulgación, el uso de los métodos y kits descritos aquí se prefiere especialmente si la enfermedad es una enfermedad de tipo cáncer.

El uso de métodos y kits descritos aquí se prefiere en particular, si el uso está caracterizado porque el estado de metilación de ADN se utiliza para diagnosticar una enfermedad, para diagnosticar una predisposición para una enfermedad y/o para diagnosticar la progresión de una enfermedad, en donde en particular la enfermedad es una enfermedad tipo cáncer.

El uso de métodos y kits descritos aquí se prefiere en particular, si está caracterizado porque se predice si el estado de salud de una persona será influenciado positiva o negativamente por un fármaco o sustancia química o no. Esto es preferido particularmente si el uso de los métodos y kits descritos aquí está caracterizado porque el estado de metilación de ADN se utiliza para predecir si el estado de salud de una persona será influenciado positiva o negativamente por un fármaco o sustancia química o no. El uso es preferido especialmente si el estado de salud está caracterizado por una enfermedad, una predisposición para una enfermedad y/o por una progresión de una enfermedad. Esto es lo más especialmente preferido si la enfermedad es una enfermedad tipo cáncer.

El uso de los métodos y kits descritos aquí es especialmente preferido si el estado de metilación de ADN es caracterizado porque las posiciones son metiladas o no metiladas en comparación con condiciones normales y si existe una enfermedad definida individual o una predisposición para una enfermedad definida individual. Desde luego, el uso de los métodos y kits descritos aquí también es preferido si el estado de metilación de ADN puede ser también caracterizado en que las posiciones están metiladas o no metiladas en comparación con diversos niveles de condiciones de enfermedad y si existe una enfermedad gradualmente progresiva.

El uso de métodos y kits descritos aquí es preferido especialmente, si el estado de metilación de ADN está caracterizado en que las posiciones están metiladas o no metiladas en comparación con condiciones normales si existe una enfermedad definida individual.

Si el estado de salud de una persona de quien se deriva la muestra es determinado independientemente a partir del estado de metilación del ADN, los resultados del análisis del estado de metilación del ADN pueden ser utilizados para identificar un estado de metilación de ADN específico de una enfermedad. Tal estado de metilación de ADN específico de una enfermedad puede incluir uno o más sitios de una metilación potencial de ADN y/o el conocimiento de la presencia o ausencia de una metilación en dinucleótidos CG, en el caso de presencia o ausencia de una enfermedad particular. Por lo tanto se prefiere particularmente utilizar cualquier método o kit descrito en aquí para la identificación de un objetivo específico de indicación. De acuerdo con esto, a) se prepara el ADN de una muestra archivada originada de un tejido enfermo y se determina el estado de metilación del ADN; b) se prepara el ADN de una muestra originada de un tejido saludable y se determina el estado de metilación del ADN; c) se define un objetivo específico de indicación como la diferencia en el estado de metilación de ADN de un ADN derivado de un tejido enfermo en comparación con el ADN derivado de un tejido saludable. Por lo tanto la muestra de tejido enfermo y la muestra del tejido saludable pueden originarse de diferentes personas. Preferiblemente estas personas son parientes. Se prefiere particularmente que la muestra del tejido enfermo y la muestra del tejido saludable se originen de la misma persona, y se prefiere especialmente que las muestras se originen de tejidos adyacentes.

Desde luego, de la misma manera también pueden identificarse objetivos específicos de indicación que son específicos para una predisposición a una enfermedad o que son específicos para una progresión de una enfermedad.

El uso de acuerdo con una o más realizaciones o de un kit de prueba de acuerdo con una divulgación es preferido para identificar un objetivo específico de indicación, en donde

- 5 a) se prepara el ADN de una muestra archivada originada de un tejido enfermo y se determina el estado de metilación del ADN,
 - b) se prepara el ADN de una muestra originada de un tejido saludable y se determina el estado de metilación del ADN,
 - c) se define un objetivo específico de indicación como las diferencias en el estado de metilación de ADN de un ADN derivado de un tejido enfermo en comparación con el ADN derivado de un tejido saludable.
- 10 El uso de los métodos o kits descritos aquí es preferido si el objetivo específico de indicación es una proteína, péptido o ARN o cualquier otra sustancia bioactiva endógena como por ejemplo hormonas.

En particular, el uso es preferido si el objetivo específico de indicación es una proteína, péptido o ARN.

Dicho uso es preferido si un modulador conocido per se de la proteína, péptido, ARN u otra sustancia bioactiva endógena está asignado a la indicación específica del tejido enfermo.

- 15 En particular, se prefiere un uso en donde un modulador conocido per se de la proteína, péptido o ARN está asignado a la indicación específica del tejido enfermo.

Adicionalmente, el uso de tal modulador es particularmente preferido para preparar una composición farmacéutica en caso de una indicación específica. Esto se prefiere especialmente si la indicación específica es una indicación de cáncer específica.

- 20 En particular, el uso del modulador asignado a la indicación específica del tejido enfermo es preferido para una composición farmacéutica con una indicación específica, en particular una indicación de cáncer específica.

- 25 Los métodos y kits de prueba divulgados aquí son usados preferiblemente para el diagnóstico y/o pronóstico de eventos adversos para pacientes o individuos, con lo cual diagnóstico significa diagnosticar un evento adverso, una predisposición para un evento adverso y/o una progresión de eventos adversos. Estos eventos adversos pertenecen a al menos una de las siguientes categorías: interacciones indeseadas entre fármacos; enfermedades cancerosas; disfunción, daño o enfermedad del CNS; síntomas de agresión o perturbaciones de comportamiento; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de daño cerebral; perturbaciones sicóticas y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad, disfunción o daño cardiovasculares; disfunción, daño o enfermedad del tracto gastrointestinal; disfunción, daño o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; disfunción, daño o enfermedad del cuerpo tal como una anomalía en el proceso de desarrollo; disfunción, daño o enfermedad de la piel, de los músculos, del tejido conectivo o de los huesos; disfunción, daño o enfermedad endocrinos y metabólicos; dolores de cabeza o disfunción sexual.

- 30 Los métodos y kits de prueba divulgados aquí también son preferiblemente utilizados para distinguir tipos de células, tejidos o para investigar diferenciación celular. Sirven en particular de manera preferida para analizar la respuesta de un paciente a un tratamiento con un fármaco.

Métodos para el análisis de metilación de ADN

- 35 Los siguientes métodos para la detección de la metilación de ADN son todos realizaciones preferidas de la divulgación. Estos métodos permiten la determinación del estado de metilación de uno o de una pluralidad de dinucleótidos CpG (por ejemplo, islas CpG) dentro de una secuencia de ADN. Tales métodos que involucran, entre otras técnicas, el método DMH, secuenciación de ADN tratado con bisulfito, un cierto número de ensayos de metilación con base en PCR, algunos de ellos - conocidos como COBRA, MS-SNuPE, MSP, MSP anidado, HeavyMetilTM, MetiLightTM y ensayo QM - son descritos en mayor detalle ahora:

- 40 MÉTODO DMH. El método DMH se lleva a cabo de acuerdo con la divulgación tal como está escrito en principio en Huang et al. (Huang et al., Hum Mol Genet, 8:459-470,1999), en la US 09/497,855, en la DE 102005007185.6, en la DE102005025 240.0, en la DE102005036500.0, o en la US 60/710,556. De acuerdo con éstos, el ADN genómico es fragmentado por endonucleasas de restricción antes de ser sometido a un microarreglo de ADN de islas CpG clonadas.

Pero el método DMH también incluye varias mejoras: Después del aislamiento del ADN, tiene lugar por diferentes medios un enriquecimiento del ADN metilado o no metilado. Estos medios pueden ser uno o más de los siguientes: por ejemplo endonucleasas de restricción o proteínas, péptidos u oligómeros que se enlazan especialmente al dinucleótido CpG bien sea específico sobre dinucleótidos CpG metilados o no metilados. Se prefieren especialmente cuatro variantes de enriquecimiento por medio de endonucleasas de restricción:

El enriquecimiento mediante el uso de enzimas de restricción específicas de la metilación solamente sin una adición previa de enzimas de restricción específicas de no metilación pero con una amplificación selectiva subsecuente de fragmentos en el rango de 50-5,000 bp a través de un enlazante (también conocidos como adaptadores por los experimentados en la técnica). Enzimas de restricción preferidas son del grupo "*BisI*, *BstUI*, *BshI236I*, *AccII*, *BstFNI*, *McrBC*, *MvnI*, *HpaII* (*HapII*), (*HhaI*, *AccI*, *SmaI*, *HinP1I*, *HpyCH4IV* y mezclas de dos o más de las enzimas antes mencionadas".

Otro enriquecimiento se lleva a cabo mediante una primera restricción de ADN por una o más enzimas de restricción específicas de la no metilación; en segundo lugar, fragmentos más pequeños de 50 bp son descartados y subsecuentemente se ligan enlazadores a cada extremo de cada fragmento; en tercer lugar, los fragmentos provistos con el enlazante son sujetos a restricción por una o más enzimas de restricción específicas de la metilación; y en cuarto lugar, los fragmentos resultantes son sometidos a una amplificación, en donde solamente se amplifican fragmentos que no son restringidos en la etapa tres. De acuerdo con este procedimiento se enriquecen los fragmentos de 50-5,000 bp. Por lo tanto es preferible que se usen tres enzimas de restricción específicas de la metilación diferentes, una o más de las enzimas de restricción específicas de metilación tienen un sitio de restricción en la longitud de 4 bp en particular que no contengan ningún CG. Las enzimas de restricción específicas de no metilación son seleccionadas del grupo "*MseI*, *BfaI*, *Csp6I*, *TruII*, *TvuII*, *Tru9I*, *Tvu9I*, *MaeI*, *XspI* y mezclas de dos o más de las enzimas antes citadas". Preferiblemente se usa una mezcla de *MseI*, *BfaI* y *Csp6I*. Las enzimas de restricción específicas de la metilación pueden ser cualquier enzima que bien corte ADN no metilado o metilado específicamente por metilación. Preferiblemente la enzima específica de metilación es seleccionada del grupo de "*BisI*, *BstUI*, *BshI236I*, *AccII*, *BstFNI*, *McrBC*, *MvnI*, *HpaII* (*HapII*), *HhaI*, *AccI*, *SmaI*, *HinP1I*, *HpyCH4IV*, *EagI* y mezclas de dos o más de las enzimas antes citadas". En particular se prefiere el uso de *BstUI*, *HpaII*, *HpyCH4IV* y *HinP1I*.

Además de esto, un enriquecimiento también es posible de acuerdo con el método de "representación NotI" como se ejemplifica en WO02/086163. De acuerdo con esto, el ADN es restringido por enzimas adecuadas como *BamHI* de *BglII*. Después de la inactivación de las enzimas, el fragmento se hace circular por autoligación, antes de que sean sometidas a otra restricción por NotI la cual solamente corta su sitio de reconocimiento no metilado. A través de esto, solamente los fragmentos con sitios de reconocimiento de NotI no metilados son linealizados sobre los cuales se ligan los enlazantes específicos. Por lo tanto es posible amplificar aquellos fragmentos. En principio este método puede ser también ajustado a otras enzimas de restricción específicas de la metilación como las listadas anteriormente.

Como cuarto procedimiento de enriquecimiento por medio de endonucleasas de restricción, se prefiere la MS AP-PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa Cebada Arbitrariamente Sensible a la Metilación). Esta técnica es bien conocida en el arte y fue descrita por primera vez por Gonzalgo et al., Cancer Res., 57:594-599, 1997. En principio, el ADN genómico es sometido a una digestión de restricción, por ejemplo *HpaII*. Los fragmentos resultantes son sometidos entonces a una amplificación en donde se usan cebadores aleatorios los cuales son ricos en dinucleótidos CG. De acuerdo con esto, se amplifican regiones de ADN que son ricas en dinucleótidos CG.

Un enriquecimiento del ADN metilado o no metilado también puede suceder por medio de proteínas, péptidos u oligómeros que se enlazan específicamente a ADN metilado o no metilado. El enlazamiento puede ser específico o no específico de la secuencia. Sin embargo, se separa un ADN no enlazado por ADN enlazado a través del enlazamiento. Dependiendo de qué clase de ADN es de interés, el ADN metilado o no metilado, o cual clase de ADN está enlazado, la fracción enlazada o no enlazada de ADN es analizada adicionalmente. Esto significa que las proteínas pueden ser usadas con ADN no metilado específicamente enlazado, así como proteínas que se enlacen específicamente a ADN metilado. Adicionalmente, es posible enlazar ese ADN, el cual se analiza posteriormente. Por lo tanto el ADN no enlazado es retirado antes de que el ADN enlazado sea liberado de la proteína. Por otro lado también es posible dejar enlazar el ADN de fondo a las proteínas y por lo tanto ser retirado de la mezcla de reacción. Desde luego, también es posible llevar a cabo tal enriquecimiento en dos etapas subsecuentes mediante con lo cual el orden no es relevante. En una etapa, se usan las proteínas que se enlazan específicamente a ADN no metilado y en la otra etapa, las proteínas que se enlazan específicamente a ADN metilado. Tal procedimiento tiene la ventaja de que simultáneamente el ADN no metilado y el ADN metilado son enriquecidos mientras que el ADN sin o con solo unas pocas posiciones CpG es removido.

Puede lograrse un enriquecimiento por proteínas cuya metilación enlace específicamente a ADN y también mediante el uso de sus dominios o péptidos. Tales proteínas pueden ser, por ejemplo MeCP2, MBD1, MBD2, MBD4 y Kaiso. Esta última enlaza la secuencia específicamente a saber sobre posiciones CpGpCpG simétricas metiladas. A manera de ejemplo, el dominio de enlazamiento Metilo-CpG de la proteína MeCP2 o el dominio CXXC-3 de la proteína MBD1 se mencionan como

dominios adecuados para enriquecimiento (para una revisión: Shiraishi et al., *Anal Biochem.* 2004 Jun 1; 329 (1):1-10; Hendrich and Tweedie, *Trends Genet.* 2003 May, 19 (5): 269-77; Jørgensen et al., *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 3387-3395).

Típicamente, las proteínas, dominios o péptidos son enlazados a una superficie sólida por ejemplo sobre perlas que permiten una separación por medio de procedimientos por lotes o por una cromatografía de columna (Cross et al., *Nature Genetics*, 1994 (6) 236-244; Shiraishi et al., *Anal Biochem.* 2004 Jun 1; 329 (1):1-10). Los métodos bioquímicos que tienen que ser aplicados son conocidos por los experimentados en la técnica. Estos puede incluir por ejemplo el uso de marcadores de biotina o histidina (por ejemplo, Gretch et al., *Anal Biochem.*, 1987, (163) 270-7; Janknecht et al., *Proc Natl. Acad Sci*, 1991, (88) 8972-6).

Además, un enriquecimiento también puede ser logrado por anticuerpos específicos de la metilación por ejemplo por medio del anticuerpo 5-metilcitosina disponible de Abcam Inc. De nuevo el enriquecimiento puede ser llevado a cabo en un procedimiento por lotes o por cromatografía de columna. Los detalles son conocidos por las personas experimentadas en el arte (por ejemplo: Fisher et al., *Nucleic Acids Res.* 2004, 32(1), 287-97). Por otro lado, un enriquecimiento también puede ser logrado por inmunoprecipitación con anticuerpos específicos de la metilación y anticuerpos secundarios adecuados, seguido por un tratamiento con proteinasa K.

Otra variante de enriquecimiento es la inmunoprecipitación por cromatina (CHIP). Los detalles son conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo: Matarazzo et al., *Biotechniques*, 2004, 37(4), 666-8, 670, 672-3.) De acuerdo con esto, un inmunoprecipitación se lleva a cabo con anticuerpos que son específicos para proteínas que enlazan 5-metilcitosina como MeCP2, MBD1, MBD2, MBD4 o Kaiso. Por lo tanto las proteínas se fijan sobre el ADN antes de que se agreguen los anticuerpos. En particular se prefiere purificar el ADN primero y luego agregar las proteínas enlazantes al ADN. También se prefiere particularmente aplicar un método físico adecuado tal como ultracentrifugación antes de la segunda etapa de precipitación. Un kit adecuado está disponible de Panomics, Inc.

Adicionalmente, puede lograrse un enriquecimiento mediante oligómeros de enlazamiento triple, los cuales pueden ser oligómeros APN o ADN. Este método está descrito en detalle en WO04/113564. En principio, un oligómero de enlazamiento triple se pone en contacto con ADN. Después de esto forma preferencialmente una hélice triple con ADN no metilado en comparación con el ADN metilado. De esto se toma ventaja para el enriquecimiento.

En principio, un ADN puede ser fragmentado aleatoriamente o no aleatoriamente antes de ser sometido a enriquecimiento por cualquier método usando proteínas, péptidos u oligómeros. Esto se hace como es conocido por los experimentados en la técnica. La fragmentación puede ser llevada a cabo aleatoriamente por ejemplo con sonicación o desgarramiento. Pero también puede ser llevada a cabo no aleatoriamente, preferiblemente mediante el uso de endonucleasas de restricción específicas de la metilación, en particular del grupo de "BisI, BstUI, BshI236I, AccII, BstFNI, McrBC, MvnI, HpaII (HapII), HhaI, AclI, SmaI, HinP1I, HpyCH4IV y cualquier mezcla de dos o más de las enzimas antes mencionadas".

Una reducción adicional de la complejidad puede lograrse por métodos físicos los cuales se aplican antes o después de una amplificación. Tales métodos físicos pueden ser por ejemplo electroforesis en gel, cromatografía de exclusión por tamaño o filtración.

Después del enriquecimiento del ADN, los fragmentos son marcados preferencialmente con un colorante fluorescente adecuado. Tal colorante permite un barrido selectivo mono o bidimensional. Típicamente se usan Cy3 y/o Cy5 como colorantes. Pero también son conocidos otros colorantes adecuados por los experimentados en la técnica. Adicionalmente, se prefiere que los fragmentos sean marcados con biotina, la cual interactúa con otra sustancia en el proceso de detección realmente. Por lo tanto es necesario llevar a cabo dos disposiciones las cuales se comparan una con otra.

La marcación es llevada a cabo preferencialmente por medio de una amplificación, en particular amplificaciones del genoma completo. Varios métodos adecuados son conocidos por los experimentados en la técnica.

Los fragmentos marcados son sometidos entonces a una disposición de ADN la cual puede ser bien una disposición de islas CpG clonadas o una disposición de oligonucleótidos. Los oligonucleótidos de la microdisposición de oligonucleótidos pueden ser cualquier oligonucleótido adecuado para la detección de la metilación o no metilación de dinucleótidos CpG. Preferiblemente los oligonucleótidos son diseñados después de los fragmentos derivados de acuerdo con las siguientes dos estrategias:

De acuerdo con la primera estrategia, A) el genoma de un organismo deseado es analizado en cuanto a sus primeros fragmentos, los cuales son flanqueados por sitios de reconocimiento de enzimas de restricción específicas de no metilación de interés y que están en el rango de 100-1,200 bp. B) Segundos fragmentos son seleccionados entonces bajo aquellos primeros fragmentos que tienen no más de 50%, preferiblemente no más de 20% de repeticiones. Estas dos etapas A) y B)

pueden llevarse a cabo en orden arbitrario. Adicionalmente, C) los segundos fragmentos seleccionados son analizados en cuanto a la presencia de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de metilación de interés. Esos segundos fragmentos que incluyen tal sitio de reconocimiento son seleccionados como terceros fragmentos. De nuevo, las etapas A), B) y C) pueden ejecutarse en orden arbitrario.

- 5 De acuerdo con la segunda estrategia, A) el genoma de un organismo deseado es analizado en cuanto a primeros fragmentos, los cuales son flanqueados por sitios de reconocimiento de enzimas de restricción específicas de la metilación de interés y que están en el rango de 100-1,200 bp. B) Segundos fragmentos son seleccionados entonces bajo estos primeros fragmentos que no tienen más de 50%, preferiblemente no más de 20% de repeticiones. C) Los segundos fragmentos seleccionados son analizados en cuanto a la presencia de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción específicas de la metilación de interés. Estos segundos fragmentos que incluyen tal sitio de reconocimiento son seleccionados entonces como terceros fragmentos. De nuevo, las etapas A), B) y C) pueden llevarse a cabo en orden arbitrario.

- 15 Los fragmentos seleccionados de acuerdo a estas estrategias pueden coincidir con fragmentos obtenidos por procedimientos de enriquecimiento. La secuencia de los oligonucleótidos de la matriz disposición se escoge a partir de los fragmentos seleccionados, de tal manera que hibriden a los fragmentos seleccionados o que sean idénticos a ellos y por lo tanto hibriden a la contracadena. Estos oligonucleótidos son sintetizados entonces sobre la disposición o son enlazados a ella después de la síntesis. Típicamente se derivan 3-30 oligonucleótidos de un fragmento, con lo cual es posible que las secuencias de oligonucleótidos se superpongan. Preferiblemente los oligonucleótidos tienen una distancia definida entre uno y otro de tal forma que da como resultado la llamada "disposición de arado", similares a la descrita por Kapranov et al., Science, 2002, 296(5569):916-9.

- 25 De acuerdo con el método DMH, los fragmentos hibridados sobre los oligonucleótidos inmovilizados contienen preferiblemente secuencias de ácido nucleico, cuyas posiciones de metilación son no metiladas o metiladas en caso de una enfermedad definida en comparación a la condición normal. Los oligonucleótidos no tienen que codificar necesariamente para las posiciones de metilación por sí mismos, aunque es posible. Además, es posible que la disposición de oligonucleótidos porte diferentes conjuntos de oligonucleótidos, adecuados para la detección de diferentes enfermedades o de predisposiciones para una enfermedad o de la susceptibilidad a efectos secundarios para un tratamiento médico definitivo. Adicionalmente, también es posible predecir el tipo, la agresividad o la progresión de una enfermedad o la efectividad de un tratamiento médico, en caso de que se base sobre las diferencias de metilación. Pueden hacerse conclusiones adicionales por comparación de los resultados obtenidos por medio de una disposición de oligonucleótidos de acuerdo con el método DMH con un resultado obtenido con las disposiciones con diferentes conjuntos de oligonucleótidos, por ejemplo conjuntos de oligonucleótidos adecuados para análisis SNP.

- 35 SECUENCIACIÓN CON BISULFITO. Los patrones de metilación de ADN y distribución de 5-metilcitosina pueden analizarse por análisis de secuenciación de un fragmento amplificado previamente del ADN genómico tratado con bisulfito, como lo describe Frommer et al. (Frommer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1827-1831, 1992). Puesto que el ADN tratado con bisulfito es amplificado antes de la secuenciación, el procedimiento de amplificación de acuerdo con la divulgación puede ser utilizado en combinación con este método de detección.

- 40 COBRA. El análisis COBRA es un ensayo de metilación cuantitativo útil para determinar los niveles de metilación de ADN en loci de genes específicos en pequeñas cantidades de ADN genómico (Xiong & Laird, Nucleic Acids Res. 25:2532-2534, 1997). En resumen, la digestión con enzimas de restricción se utiliza para revelar diferencias en la secuencia dependientes de la metilación en productos de PCR de ADN tratado con bisulfito de sodio. Las diferencias en las secuencias dependientes de la metilación son introducidas primero en el ADN genómico por tratamiento estándar con bisulfito de acuerdo con el procedimiento descrito por Frommer et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1827-1831, 1992) o como la describe Olek et al (Olek A, Oswald J, Walter J. (1996) Nucleic Acids Res. 24: 5064-6). Amplificación por PCR del ADN convertido con bisulfito se lleva a cabo entonces utilizando cebadores no específicos de la metilación seguidos por digestión con endonucleasas de restricción, electroforesis en gel, y detección utilizando sondas de hibridación marcadas específicas. Los niveles de metilación en la muestra de ADN original están representados por cantidades relativas de producto de PCR digerido y no digerido en una forma linealmente cuantitativa a través de un amplio espectro de niveles de metilación de ADN. Además, esta técnica puede ser aplicada confiablemente a ADN obtenido de muestras de tejido microdisecionado embebido en parafina. Reactivos típicos (por ejemplo como pueden encontrarse en un kit basado en COBRA típico) para el análisis COBRA pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores PCR para genes específicos (o secuencia de ADN alterada por metilo o isla CpG); enzima de restricción y de regulador apropiado; oligo de hibridación de gen; oligo de hibridación de control; kit de marcación de quinasa para sonda oligo; y nucleótidos radiactivos. Adicionalmente, los reactivos de conversión por bisulfito pueden incluir: regulador para desnaturalización de ADN; regulador de sulfonación; reactivos o kits para recuperación de ADN (por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, columna por afinidad); regulador de desulfonación; y componentes para recuperación de ADN.

Adicionalmente, la digestión con enzimas de restricción de productos de PCR amplificados a partir de ADN convertido por bisulfito también se usa, en el método descrito por Sadri & Hornsby (Nucl. Acids Res. 24:5058-5059, 1996) El procedimiento de conversión por bisulfito y amplificación de acuerdo con la invención puede ser utilizada en combinación con este método de detección.

5 Ms-SNuPE (Extensión por Cebador de Nucleótido Individual Sensible a Metilación). La técnica Ms-SNuPE es un método cuantitativo para establecer las diferencias en metilación en sitios CpG específicos con base en el tratamiento con bisulfito del ADN, seguido por extensión con cebador de nucleótido individual (Gonzalzo & Jones, Nucleic Acids Res. 25:2529-2531, 1997). En resumen, el ADN genómico se hace reaccionar con bisulfito de sodio para convertir la citosina no metilada en uracilo, con 5-metilcitosina saliente sin cambios. La amplificación de la secuencia objetivo deseada se lleva a cabo entonces
10 utilizando cebadores de PCR específicos para ADN convertido por bisulfito, y el producto resultante es aislado y usado como una plantilla para el análisis de metilación en los sitios CpG de interés. Pueden analizarse cantidades pequeñas de ADN (por ejemplo, secciones de patología microdisecionadas), y evita la utilización de enzimas de restricción para determinar el estado de metilación en sitios CpG.

15 Reactivos típicos (por ejemplo, con los que podrían encontrarse en un kit típico basado en Ms-SNuPE) para el análisis por Ms-SNuPE pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores para PCR para genes específicos (o secuencia de ADN alterada por metilación o isla de CpG); reguladores y desoxinucleótidos para PCR optimizados; kit para extracciones en gel; cebadores de control positivo; cebadores para Ms-SNuPE para genes específicos; reguladores de reacción (para la reacción de Ms-SNuPE); y nucleótidos radiactivos. Adicionalmente, los reactivos de conversión con bisulfito pueden incluir: regulador de desnaturalización de ADN; regulador de sulfonación; reactivos o kits para recuperación de ADN (por ejemplo, precipitación, ultrafiltración, columna de afinidad); regulador de desulfonación; y componentes para recuperación de ADN. El
20 procedimiento de conversión y amplificación por bisulfito de acuerdo con la divulgación puede usarse en combinación con este método de detección.

MSP. El MSP (PCR específico para metilación) permite el establecimiento del estado de metilación de virtualmente cualquier grupo de sitios CpG dentro de una isla CpG, independientemente del uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación (Herman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996; Patente de los Estados Unidos No. 5,786,146). En resumen,
25 el ADN es modificado por bisulfito de sodio convirtiéndolo todo en no metilado, pero la citosina no metilada en uracilo, y amplificado subsecuentemente con cebadores específicos para ADN metilado versus no metilado.

Los pares de cebador MSP contienen al menos un cebador, el cual hibrida a un dinucleótido CpG tratado con bisulfito. Por lo tanto, la secuencia de dichos cebadores comprende al menos un dinucleótido CpG. Los cebadores MSP específicos para
30 ADN no metilado contienen una "T" en la posición 3' de la posición C en el CpG. Preferiblemente, por lo tanto, se requiere que la secuencia base de dichos cebadores comprenda una secuencia que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos la cual hibrida a la secuencia de ácido nucleico convertida con bisulfito, en donde la secuencia base de dichos oligómeros comprende al menos un dinucleótido CpG. El MSP requiere solamente pequeñas cantidades de ADN, es sensible a 0.1% de alelos metilados de un locus de una isla de CpG dada, y puede ser ejecutado sobre el ADN extraído a partir de muestras embebidas en parafina. Reactivos típicos (por ejemplo como los que podrían encontrarse en un kit típico basado en MSP)
35 para análisis por MSP pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores para PCR metilados y no metilados para un gen específico (o secuencia de ADN alterada por metilación o isla CpG), reguladores y desoxinucleótidos para PCR optimizados, y sondas específicas. El procedimiento de conversión y amplificación por bisulfito de acuerdo con la divulgación pueden ser utilizado en combinación con este método de detección.

40 MSP ANIDADO (Belinsky and Palmisano en la solicitud de los Estados Unidos 20040038245). Considerando el conflicto aparente de requerir alta especificidad del cebador MSP para diferenciar únicamente entre posiciones CG y TG, pero que permite una no coincidencia con el fin de crear un sitio de restricción único, se prefiere utilizar una versión enmendada de MSP, conocida como MSP anidado, tal como se describe en WO 02/18649 y la solicitud de patente de los Estados Unidos 20040038245 de Belinsky y Palmisano. Este método para detectar la presencia de metilación del promotor
45 específico del gen comprende las etapas de: expandir el número de copias de la región genética de interés utilizando una reacción en cadena de polimerasa para amplificar una porción de dicha región en donde reside la metilación del promotor, generando por lo tanto un producto de amplificación; y utilizar una alícuota del producto de amplificación generado por la primera reacción en cadena de polimerasa en una segunda reacción en cadena de polimerasa específica de la metilación para detectar la presencia de metilación. En otras palabras un PCR específico de no metilación se lleva a cabo antes del
50 PCR específico de la metilación. El procedimiento de conversión y amplificación por bisulfito de acuerdo con la divulgación puede ser utilizado en combinación con este método de detección.

HEAVYMETILTM. (WO 02/072880 ; Cottrell SE et al. Nucleic Acids Res. 2004 Jan 13;32(1):e10) Una realización adicional preferida del método comprende el uso de oligonucleótidos bloqueadores. En el ensayo HeavyMetilTM se hibridan
55 oligonucleótidos de sonda de bloqueo al ácido nucleico tratado con bisulfito concurrentemente con los cebadores de PCR. La amplificación por PCR del ácido nucleico se termina en la posición 5' de la sonda de bloqueo, de tal manera que la

amplificación de un ácido nucleico es suprimida donde está presente la secuencia complementaria de la sonda bloqueadora. Las sondas pueden ser diseñadas para hibridar al ácido nucleico tratado con bisulfito en una manera específica del estado de metilación. Por ejemplo, para la detección de ácidos nucleicos metilados dentro de una población de ácidos nucleicos no metilados, la supresión de la amplificación de los ácidos nucleicos que son no metilados en la posición en cuestión sería llevada a cabo mediante el uso de sondas de bloqueo que comprende una "CpA" o "TpA" en la posición en cuestión, en oposición a "CpG" si se desea la supresión de la amplificación de los ácidos nucleicos metilados. Para los métodos de PCR que utilizan oligonucleótidos bloqueadores, la perturbación eficiente de la amplificación mediada por la polimerasa requiere que los oligonucleótidos bloqueadores no sean elongados por la polimerasa. Preferiblemente, esto se logra a través del uso de bloqueadores que son 3'-desoxioligonucleótidos u oligonucleótidos derivados en la posición 3' con un grupo diferente a hidroxilo "libre". Por ejemplo, los 3'-O-acetilo oligonucleótidos son representativos de una clase preferida de molécula bloqueadora. Adicionalmente, la descomposición mediada por polimerasa de los oligonucleótidos bloqueadores debería ser precluida. Preferiblemente, tal preclusión comprende bien sea el uso de una polimerasa que carece de actividad de 5'-3'exonucleasa, o el uso de oligonucleótidos bloqueadores modificados que tienen, por ejemplo, puentes tioato en los terminales 5' del mismo y hacen que la molécula de bloqueador sea resistente a la nucleasa. Aplicaciones particulares pueden no requerir tales modificaciones en 5' del bloqueador. Por ejemplo, si el bloqueador - y los sitios de enlazamiento del cebador se superponen, por lo tanto el enlazamiento precluyente del cebador (por ejemplo con bloqueador en exceso), la degradación del oligonucleótido bloqueador será sustancialmente precluida. Esto se debe a que la polimerasa no extenderá el cebador hacia y a través de (en la dirección 5'-3') del bloqueador- un proceso que normalmente da como resultado la degradación del oligonucleótido bloqueador hibridado.

Una realización de bloqueador/PCR particularmente preferida, para propósitos de la presente divulgación y tal como es implementada aquí, comprende el uso de oligómeros de ácido nucleico peptídico (PNA) como oligonucleótidos bloqueadores. Tales oligómeros bloqueadores PNA son adecuados idealmente, puesto que ni son descompuestos ni extendidos por la polimerasa. Preferiblemente, por lo tanto, se requiere que la secuencia base de dichos oligonucleótido bloqueadores comprenda una secuencia que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos la cual hibrida a la secuencia de ácido nucleico tratada químicamente, en donde la secuencia bases de dichos oligonucleótidos comprende al menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA.

El procedimiento de conversión y amplificación con bisulfito de acuerdo con la divulgación puede ser utilizado en combinación con este método de detección.

Preferiblemente, los ensayos de PCR en tiempo real se llevan a cabo especificados por el uso de tales cebadores de acuerdo con la divulgación. Los ensayos de PCR en tiempo real pueden ejecutarse con cebadores específicos de la metilación (MSP- tiempo real) como PCR específica para la metilación ("MSP"; tal como se describió anteriormente), o con cebadores específicos de no metilación en presencia de bloqueadores específicos de metilación (HM en tiempo real) ("HEAVYMETILTM", como se describió anteriormente). El PCR en tiempo real puede llevarse a cabo con cualquier sonda marcada de manera detectable adecuada. Para detalles véase a continuación.

Ambos de estos métodos (MSP o HM) pueden ser combinados con el método de detección conocido como MetiLight™ (una técnica de PCR en tiempo real basada en fluorescencia) (Eads et al., Cancer Res. 59:2302-2306, 1999), el cual en general incrementa la especificidad de la señal generada en tal ensayo. Siempre que la sonda en tiempo real usada sea específica para la metilación en sí mismo, la tecnología debe denominarse como MetiLight™, un método ampliamente usado.

Otro ensayo hace uso de la sonda específica de metilación, el así llamado ensayo "QM" (metilación cuantitativa). Una metilación no específica, por lo tanto una amplificación por PCR en tiempo real, no desplazada se lleva a cabo acompañada mediante el uso de dos sondas específicas de metilación (MetiLiglat™) una para el amplificado metilado y una segunda para el no metilado. De esta manera se generan dos señales que pueden ser utilizadas para a) determinar la relación de ácidos nucleicos metilados (CG) a no metilados (TG), y al mismo tiempo b) la cantidad absoluta de ácidos nucleicos metilados puede ser determinada, cuando se calibre el ensayo con una cantidad conocida de ADN de control.

MetiLight™. El ensayo MetiLight™ es un ensayo de metilación cuantitativo de alto rendimiento que utiliza PCR en tiempo real basado en fluorescencia (TaqMan.™) como tecnología que no requiere manipulaciones adicionales después de la etapa de PCR (Eads et al., Cancer Res. 59:2302-2306, 1999). En resumen, el proceso MetiLight™ comienza con una muestra mixta de ADN genómico que es convertido, en una reacción con bisulfito de sodio, en una reserva mixta de diferencias de secuencia dependientes de la metilación de acuerdo con procedimientos estándar (el proceso con bisulfito convierte residuos de citosina no metilados en uracilo). El PCR basado en fluorescencia se lleva a cabo entonces, bien sea en una reacción "no desplazada" (con cebadores que no se superpone con sitios de metilación de CpG conocidos), o en una reacción "desplazada" (con cebadores de PCR que se superponen con dinucleótidos CpG conocidos). La discriminación de secuencia puede ocurrir bien sea en el nivel del proceso de amplificación o en el nivel del proceso de detección por fluorescencia, o en ambos. El ensayo MetiLight™ puede ser utilizado como prueba cuantitativa para patrones de metilación en la muestra de ADN genómico, en donde la discriminación de secuencia ocurre al nivel de la hibridación con sonda. En

esta versión cuantitativa, la reacción de PCR provee una amplificación no desplazada en la presencia de una sonda fluorescente que se superpone con sitio de metilación putativo particular. Se provee un control no desplazado de la cantidad de ADN ingresado por una reacción en la cual ni los cebadores, ni la sonda se depositan sobre ningún dinucleótido CpG. Alternativamente, se logra una prueba cualitativa para metilación genómica sondeando la reserva de PCR desplazada bien sea con oligonucleótidos de control que no "cubren" sitios de metilación conocidos (una versión basada en fluorescencia de la técnica "MSP"), o con oligonucleótidos que cubren sitios de metilación potenciales.

El proceso MetiLight™ puede ser utilizado con una sonda "TaqMan®" en el proceso de amplificación. Por ejemplo, el ADN genómico de doble cadena es tratado con bisulfito de sodio y luego sometido a uno de dos conjuntos de reacciones de PCR utilizando sondas TaqMan®; por ejemplo, bien sea con cebadores desplazados y sondas TaqMan® o cebadores no desplazados y sondas TaqMan®. La sonda TaqMan® tiene marcación doble con moléculas fluorescentes "informadoras" y "de detención", y está diseñada para ser específica para una región de contenido relativamente alto de GC de tal forma que se funde a una temperatura de aproximadamente 10°C por encima en el ciclo de PCR con respecto a los cebadores de avance o retroceso. Esto permite que la sonda TaqMan® permanezca completamente hibridada durante la etapa de fusión/extensión en PCR. Puesto que la Taq polimerasa sintetiza enzimáticamente una nueva cadena durante el PCR, eventualmente alcanzará la sonda TaqMan® fusionada. La actividad de endonucleasa de la Taq polimerasa 5' a 3' desplazará entonces la sonda TaqMan® digiriéndola para liberar la molécula informadora fluorescente para detección cuantitativa de su señal ahora no detenida utilizando un sistema de detección fluorescente en tiempo real.

Las variaciones de la metodología de detección por TaqMan™, que también son adecuadas para uso con la invención descrita incluyen el uso de tecnología de sonda dual (LightCycler™) o de cebadores de amplificación fluorescentes (tecnología Sunrise™). Ambas de estas técnicas pueden ser adaptadas de una manera adecuada para uso con el ADN tratado con bisulfito y además para el análisis de metilación dentro de dinucleótidos CpG. Reactivos típicos (por ejemplo, como los que podrían encontrarse en un kit típico basado en MetiLight™) para el análisis MetiLight™ pueden incluir, pero no se limitan a: cebadores de PCR para secuencias por bisulfito específicas, esto es, regiones genéticas convertidas con bisulfito (o ADN convertido con bisulfito o islas de CPG convertidas con bisulfito); sondas (por ejemplo TaqMan® o LightCycler™) específicas para dichas secuencias convertidas con bisulfito amplificadas; reguladores y desoxinucleótidos optimizados para PCR; y una polimerasa, tal como Taq polimerasa. El procedimiento de conversión y amplificación con bisulfito de acuerdo con la invención puede ser utilizado en combinación con este método de detección.

Los fragmentos obtenidos por medio de la amplificación pueden llevar un marcador directa o indirectamente detectable. Se prefieren marcadores en la forma de marcadores fluorescentes, radionúclidos o fragmentos de moléculas desprendibles que tienen una masa típica, los cuales pueden ser detectados en un espectrómetro de masas. Cuando dichos marcadores son marcadores de masa, se prefiere que los amplificados marcados tengan una carga neta individual positiva o negativa, permitiendo una mejor detección en el espectrómetro de masas. La detección puede llevarse a cabo y visualizarse por medio de, por ejemplo, espectrometría de masas de matriz de desorción/ionización asistida por láser (MALDI) o utilizando espectrometría de masas con aspersión de electrones (ESI).

La espectrometría de masas de matriz de desorción/ionización asistida por (MALDI-TOF) es un desarrollo muy eficiente para el análisis de biomoléculas (Karas & Hillenkamp, Anal Chem., 60:2299-301, 1988). Un analito es embebido en una matriz absorbente de luz. La matriz es evaporada mediante un pulso corto de láser transportando así la molécula del analito hacia la fase de vapor de una manera no fragmentada. El analito es ionizado por colisiones con moléculas de la matriz. Un voltaje aplicado acelera los iones hacia un tubo de vuelo libre de campo. Debido a sus diferentes masas, los iones son acelerados a diferentes velocidades. Los iones más pequeños alcanzan el detector más pronto que los más grandes. La espectrometría MALDI-TOF es muy adecuada para el análisis de péptidos y proteínas. El análisis de ácidos nucleicos es de alguna manera más difícil (Gut & Beck, Current Innovations and Future Trends, 1:147-57, 1995). La sensibilidad con respecto al análisis de ácidos nucleicos es aproximadamente 100 veces menos que para péptidos, y disminuye de manera no proporcional con el incremento del tamaño del fragmento. Además, para ácidos nucleicos que tienen un esqueleto cargado negativamente de manera múltiple, el proceso de ionización a través de la matriz es considerablemente menos eficiente. En la espectrometría MALDI-TOF, la selección de la matriz juega un papel eminentemente importante. Para la desorción de péptidos, se han encontrado varias matrices muy eficientes que producen una cristalización muy fina. Hay ahora varias matrices que responde al ADN, sin embargo, la diferencia en sensibilidad entre los péptidos y los ácidos nucleicos no ha sido reducida. Esta diferencia en sensibilidad puede ser reducida, sin embargo, modificando químicamente el ADN de tal manera que se haga más similar a un péptido. Por ejemplo, los ácidos nucleicos fosforotioato, en los cuales los fosfatos usuales del esqueleto son sustituidos con tiofosfatos, pueden ser convertidos en un ADN de carga neutra utilizando química de alquilación sencilla (Gut & Beck, Nucleic Acids Res. 23: 1367-73, 1995). El acoplamiento de una etiqueta de carga a este ADN modificado da como resultado un incremento en la sensibilidad por MALDI-TOF al mismo nivel que la encontrada para péptidos.

Los amplificados también pueden ser detectados y/o analizados adicionalmente por medio de oligonucleótidos que constituyen todo o parte de un "arreglo" o "chip de ADN" (esto es, una disposición de diferentes oligonucleótidos y/o

oligómeros de APN enlazados a una fase sólida). Tal disposición de diferentes secuencias de oligonucleótidos y/o oligómeros de APN puede ser caracterizada, por ejemplo, de tal forma de que se disponga sobre la fase sólida en la forma de una red rectangular o hexagonal. La superficie de fase sólida puede estar compuesta de silicio, vidrio, poliestireno, aluminio, acero, hierro, cobre, níquel, plata u oro. También pueden usarse nitrocelulosa así como plásticos tales como nilón, que pueden existir en la forma de pellas o también como matrices de resina. Una revisión de la técnica anterior en la manufactura de disposiciones de oligómeros puede ser obtenida de una edición especial de Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999, y de la literatura citada allí). Se usan frecuentemente sondas marcadas fluorescentemente para el barrido de disposiciones de ADN inmovilizado. La unión simple de colorante Cy3 y Cy5 al 5'-OH de la sonda específica es particularmente adecuada para marcas de fluorescencia. La detección de la fluorescencia de las sondas hibridadas puede ser llevada a cabo, por ejemplo, con un microscopio confocal. Los colorantes Cy3 y Cy5, además de muchos otros, están disponibles comercialmente. La conversión con bisulfito y el proceso de amplificación de acuerdo con la invención pueden ser utilizados en combinación con este método de detección.

Además, métodos adicionales para análisis de metilación son conocidos por personas experimentadas en la técnica. Tales métodos son por ejemplo métodos en los cuales el ADN tratado con bisulfito es sometido a métodos de análisis basados en disposición de ADN tal como los descritos en WO 99/28498, WO 01/38565, o en WO 02/18632.

EJEMPLOS.

Ejemplo 1.

a) Etapa de remoción de parafina

Reactivos químicos necesarios:

20 Limoneno145, Fluka Chemika, Art Nr. 89188

Procedimiento:

1. Tubos de reacción giratorios de cierre seguro o tapa de rosca (que contienen 1-5 secciones de un tejido embebido en parafina fijado con formalina) durante 1 minuto a 5,000 x g
- 25 2. Agregar 1 ml de limoneno a cada tubo. Introducir todas las piezas en el líquido. En algunos casos el material de muestra es muy frágil con piezas pequeñas de parafina/tejido en el tubo - asegurarse de que el material que se adhiere a la tapa del tubo caiga dentro del tubo.
3. 1 hora de incubación a temperatura ambiente a 1,000 rpm en termomezclador, con vórtex vigoroso al menos 3 veces durante la incubación.
- 30 4. Cloque los tubos en centrífuga y hágalos girar a 16,000 rcf (= 16,000 x g) durante 5 minutos, el tejido se aglomerará en el fondo del tubo.
5. Use una pipeta de 1 ml para succionar el limoneno de cada muestra. ¡Debe tenerse gran cuidado de no perturbar la pella!
- Coloque la punta de la pipeta opuesta a la pella sobre el tubo y permita que limoneno entre suavemente a la punta de la pipeta; para retirar las últimas gotitas debe utilizarse una punta amarilla.
6. Si el tejido se deposita sólo débilmente en el fondo (es decir, no forma una pella definida) haga lo siguiente:
- 35 • repita la centrifugación otra vez durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf 5417 a velocidad máxima (> 20,000 rcf)
- repita entonces la remoción del limoneno: asegúrese de que la punta de la pipeta está presionada contra el fondo del tubo y el limoneno es retirado muy lentamente de tal forma que no succione el tejido. Retire tanto limoneno como sea posible.

b) Etapa de lisis

40 Preparar un gran volumen del regulador de lisis (0.5 o 1 l), dependiendo del número de muestras que se van a procesar para un proyecto. Este regulador puede ser almacenado a temperatura ambiente durante 3 meses. Verifique la contaminación y lleve a cabo esterilización por filtración de una alícuota antes de cada uso.

Reactivos químicos:

TRIS (tris-hidroximetil-amino-metano), Merck, Art. Nr. 1.01549.0500, MW = 121.14 g/mol

Prepare una solución de reserva de 1 mol/l:

disuelva 121.14 g en 800 ml de H₂O y ajuste a pH 8.0 con HCl y complete hasta un 1 l

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético),

- 5 EDTA Sodio (Titriplex III) de Merck, Art. Nr. 159294

MW = 372.24 g/mol

Prepare una solución de reserva de 0.5 mol/l: Disuelva 186.1 g en 800 ml de H₂O y ajuste a pH 8.0 con NaOH, completa hasta 1 l.

Tween (Tween 20), Fluka, Chemika Art Nr. 93773

- 10 Este detergente se agrega al regulador en porcentaje en volumen. Para agregar Tween al regulador tómese 1 ml de Tween (en un tubo de 2 ml), caliéntelo a 50°C y agregue el volumen deseado al regulador con una punta de pipeta ancha.

Composición del regulador de lisis: 50 mmol/l TrisHCl, pH 8.0, 1 mmol/l EDTA,

0.5% Tween (volumen %)

Proteinasa K, Roth

- 15 Prepare siempre una solución de reserva fresca de 30 mg/ml en H₂O. El tamaño de la solución de reserva debería ser ajustado para el número de muestras que se van a procesar. Por ejemplo 300 mg de proteinasa K disueltos en 10 ml de H₂O serán suficientes para ~ 400 muestras.

Procedimiento:

- 20 1. Añada 190 µl del regulador de lisis preparado a cada muestra. Es importante asegurar que todo el material de muestra está cubierto por el regulador de lisis.

2. Agregue 20 µl de la solución preparada de proteinasa K.

3. Someta a vórtex el tubo rigurosamente para asegurar una mezcla apropiada de la muestra con el regulador de lisis y la proteinasa K. Asegúrese de que las tapas del tubo están cerradas herméticamente - ¡de otra manera habrá pérdida de líquido!

- 25 4. Incube a 60°C, con agitación a 1,000 rpm (termoagitador).

5. Incube durante 40 a 48 horas, no son necesarias adiciones posteriores de proteinasa K.

6. Haga rotar en la mañana y en la tarde de cada día para eliminar gotitas de la tapa, someta a vórtex vigorosamente.

- 30 7. Incube la muestras a > 95°C durante 10 minutos con el fin de inactivar la proteinasa K. Para esto, fije el termomezclador a una temperatura de 99°C, puesto que la temperatura real en la fijación más alta está algunos grados por debajo de la temperatura indicada.

(proteinasa k activa en el lisado reducirá el rendimiento del PCR, especialmente si el lisado se utiliza directamente para cuantificación del ADN genómico por PCR en tiempo real)

Verificación de la calidad de la lisis (durante la lisis)

- 35 Después de la etapa de lisis 5, debería haber una solución homogénea, tal vez turbia en el tubo sin piezas visibles de tejido remanentes. Sin embargo, debe haber piezas visibles de tejido en muchas de las muestras dejada después de la primera etapa de incubación con proteinasa K adicional y debe considerarse el incremento de volumen de lisis. Si solamente algunas individuales tienen material no digerido remanente este puede ser desechado. ¡Tenga mucho cuidado!

Almacenamiento:

Las muestras sometidas a lisis pueden ser almacenadas bien sea a -20°C, o -80°C (dependiendo del tiempo de almacenamiento) o ser usadas inmediatamente para continuación del procesamiento.

c) Etapa de extracción de ADN

5 Equipo necesario

- centrífuga de placas (Sigma o Qiagen, capaz de hasta 5,758 x g (6,000 rpm))
- pipeteadores para volúmenes de 10 µl hasta 1, 000 µl (multicanal para volúmenes grandes)
- Contenedor de residuos para flujo de ADN (por ejemplo, recipiente con eliminación de ADN) Material requerido:
- Dneasy 96 Tissue Kit (Qiagen # 69581 o 69582)

- 10
- puntas de pipeta (100 µl, 1000 µl)
 - tubos Falcon de 15 µl y 50 µl

Reactivos químicos necesarios:

- etanol, grado biología molecular

Procedimiento:

- 15 Asegúrese con marcación respectiva que todas las placas en un ensamble están giradas en la misma dirección (pozo A1 sobre pozo A1 etc.).
1. Distribuya 400 µl de AL/E en microtubos de recolección y transfiera el lisado (200 µl) a los tubos; selle los tubos con tapas para tubos de recolección; utilice la tapa de la placa para fijar los tubos en la gradilla
- 20 2. Mezcle agitando 15 segundos con AMBAS manos; gire por un período corto (deje que la centrífuga alcance 1,450 x g y detenga);
3. Coloque la placa DNeasy 96 sobre un bloque S (selle los pozos no usados de la placa DNeasy con lámina AirPore Tape). Cuidadosamente aplique la mezcla de la etapa 2 sobre las columnas. Selle con AirPore Tape. Centrifugue a 5,790 x g durante 10 minutos. Si hay todavía fluido visible en las membranas, agregue una etapa de centrifugación.
- 25 4. Remueva la cinta. Agregue 500 µl de AW1. Selle con una lámina AirPore Tape. Vacíe el bloque S. Haga rotar durante 5 minutos a 5,790 x g.
5. Retire la cinta. Agregue 500 µl de AW2. Selle con nueva lámina AirPore Tape. Vacíe el bloque S. Haga rotar durante 15 minutos a 5,790 x g, esto debería dejar la membrana seca.
- 30 6. Coloque la placa DNeasy sobre una placa de microtubos de elución. Para eluir el ADN agregue 120 µl de regulador AE o ddH₂O precalentados a 70°C a cada pozo. Selle la placa con una nueva lamina de AirPore Tape. Incube durante 5 minutos a temperatura ambiente. Haga rotar durante 2 minutos a 5,790 x g.
7. Selle los microtubos de elución con las tapas provistas. Almacene a -20°C o -80°C (dependiendo del tiempo de almacenamiento)

d) Etapa de tratamiento con bisulfito y e) etapa de purificación de ADN

Equipo necesario:

- 35
- Termociclador (por ejemplo Eppendorf, Tetrad)
 - Centrífuga de placas (Sigma o Qiagen, capaz de hasta 5,700 x g)

- Pipeteadores para volúmenes desde 10 µl hasta 1000 µl (Eppendorf multicanal + pipeteadores Matrix)

Material necesario:

- Placas de PCR + tiras de tapas
 - QIAamp 96 DNA Blood Kit (Qiagen #51161 para 4 placas o 51162 para 12)
- 5
- Bloques y tapas de pozos redondos adicionales (1 adicional necesario para cada purificación de 96 muestras; #19576 para 24 placas)
 - Regulador QIA AVL (#19073 para 155 µl, 560 µl por muestra requerida)
 - puntas de pipeta (100 µl, 1,000 µl, Eppendorf + Matrix)
 - Tubos Falcon de 15 ml y 50 ml
- 10
- contenedor de residuos para fluido de ADN (por ejemplo recipiente con eliminación de ADN)

Reactivos químicos necesarios:

- bisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 190.1 g/mol), Merck 1.06528.0500
 - sulfito de sodio, anhidro (Na_2SO_3 , 126.04 g/mol), Fluka 71988
 - ddH₂O grado biología molecular (filtrada por 0.2 µm, tratada con DEPC, sometida a autoclave, libre de DNasas y RNasas)
- 15
- dietilenglicoldimetiléter (DME), Merck 8.02934.0250
 - ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (250.29 g/mol), Aldrich 23, 881-3
 - etanol, grado biología molecular
 - pellas de hidróxido de sodio (NaOHL, 40.0 g/mol), Merck 1.06482.1000

Preparación de soluciones (suficiente para 80 reacciones, ¡siempre para ser preparadas frescas!):

- 20
- Solución de bisulfito: se disuelven disulfito de sodio (4.708 g) y sulfito de sodio (1.128 g) agregando 10 ml de ddH₂O (la solución es 4.9 M). El volumen final es alrededor de 12 ml. Verifique el pH de la solución - si no está entre 5.45 y 5.5, descarte la solución y repita su preparación. Agite vigorosamente y si es necesario, caliente la solución a 50°C en un baño de agua con vórtex a una velocidad máxima durante 30 segundos. Repita este procedimiento tantas veces como sea necesario hasta que la sal se haya disuelto completamente.
- 25
- Solución de DME - depurador de radicales Disuelva 125.3 mg del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico agregando 1.0 ml de DME. Somete a vórtex rigurosamente con el fin de asegurar que todas las partículas no disueltas permanezcan. El DME es peligroso y potencialmente carcinogénico. Por lo tanto, tome precauciones apropiadas cuando maneje este reactivo químico. Si sólo se van a tratar pocas muestras con bisulfito, prepare volúmenes menores.
- 30
- Regulador de desulfonación: Disuelva 0.8 g de hidróxido de sodio en 10 ml de ddH₂O para preparar una solución de reserva 2 mol/l. Para el regulador de desulfonación mezcle 1.0 ml de hidróxido de sodio 2 mol/l y 9.0 ml de etanol. ¡La solución tiene que ser preparada fresca antes de cada purificación!

Procedimiento de reacción con bisulfito (volumen final de 140 µl):

Transfiera con una pipeta las siguientes soluciones en placas de PCR en el orden mostrado.

1. 44 µl de regulador/agua que contiene el ADN que va a ser tratado con bisulfito
- 35
2. 83 µl de solución de bisulfito (la aplicación con pipeteado del bisulfito y la muestra pueden ser intercambiadas)
 3. 13 µl de solución de DME, que contiene el depurador de radicales

4. mezcle exhaustivamente

5. coloque en pozos de 0.2 ml del termociclador. ¡Utilice tiras de tapas para cerrar los pozos!

Programa de temperatura en un termociclador

- 5:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C

5 • 22:00 minutos incubación a 60°C

- 3:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C

- 1:27:00 horas incubación a 60°C

- 3:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C

- 2:57:00 horas incubación a 60°C

10 • enfriamiento a 20°C

Purificación de ADN mediante el uso de una combinación del QIAamp Viral RNA Mini Kit y el QIAamp 96 DNA Blood Kit:

1 Preparación del regulador de enlazamiento AVL

- Agregue 1 ml de regulador AVL a 310 µg de ARN transportador liofilizado. Disuelva exhaustivamente.

15 • Transfiera a la botella de regulador AVL (30 ml), y mezcle exhaustivamente antes de utilizar el regulador AVL por primera vez.

-

Este regulador puede ser almacenado a 2-8°C para uso futuro hasta por 6 meses. Sin embargo, si se desarrolla un precipitado, redissuelva entonces calentando a 80°C por no más de 5 minutos. Esto debe hacerse no más de un total de 6 veces. Enfríe hasta temperatura ambiente antes del uso. Una alícuota del regulador AVL preparado también puede ser almacenada a temperatura ambiente por hasta 2 semanas.

20

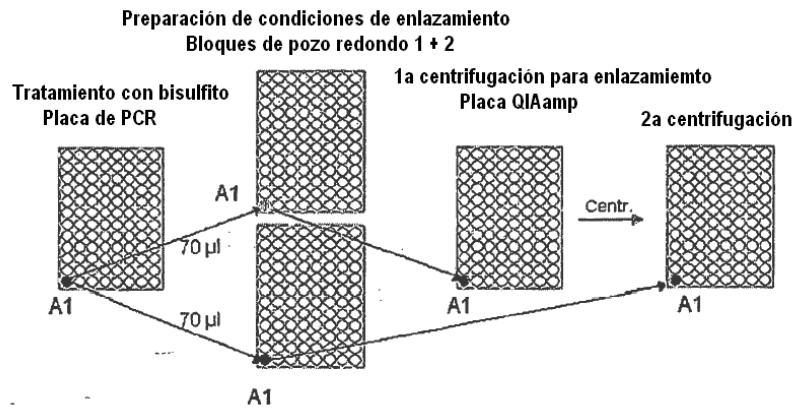
2. Preparación de condiciones de enlazamiento

- Para cada muestra deben usarse dos pozos; estos deberían estar en 2 bloques de pozos redondos con el fin de mantener la disposición original (por ejemplo, pozo A1 de la placa de bisulfito estará dividido en 70 µl en el pozo A1 del bloque 1 y 70 µl en el pozo A1 del bloque 2, véase ilustración más abajo).

25 • En cada pozo de bloques transfiera con una pipeta 280 µl de regulador AVL preparado/ARN transportador. Agregue 70 µl de solución de ADN/bisulfito de la placa de PCR, coloque ADN) directamente en el regulador y transfiera con una pipeta hacia arriba y hacia abajo 3 veces para asegurar una transferencia completa del ADN y mezcle. Agregue 280 µl de etanol. Selle los pozos utilizando tapas para bloques. Mezcle vigorosamente agitando con AMBAS manos durante al menos 15 segundos. (¡¡¡El etanol tiende a rehusar mezclarse con fluidos con base acuosa!!!)

30 • Alternativamente, si las cantidades de ADN son muy críticas: transfiera con una pipeta solamente 200 µl en los bloques, utilice los 80 µl restantes para lavar los pozos de la placa de bisulfitación después de la transferencia del ADN.

- Haga rotar brevemente a 1.450 x g (alcance 1.450 x g y detenga) para hacer que las gotas bajen. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.



3. Enlazamiento

- Ambos pozos son cargados subsecuentemente sobre UNA columna (véase ilustración más arriba)
- Coloque la placa QIAamp 96 sobre la parte superior de un bloque S

- 5
- Aplique 630 µl del primer pozo por muestra de placa QIAamp 96
 - Selle la placa con una lámina de AirPore Tape, haga rotar a 5,790 x g durante 4 minutos
 - Vacíe el bloque S

- Repita el enlazamiento con un segundo pozo de cada muestra sobre la misma columna como con el primer pozo (carga, sellamiento, rotación, vaciamiento de bloque S)

10 4. Lavado y 5. desulfonación

- Coloque la placa QIAamp 96 del bloque S
- Agregue 500 µl de regulador AW1
- Selle la placa con nueva lámina AirPore Tape
- Haga rotar a 5,90 x g durante 2 minutos

15 5. Vacío del bloque S, coloque la placa sobre el bloque S

- Agregue 500 µl de NaOH 0.2 mol/l sobre la placa QIAamp 96
- Selle con una lámina nueva de AirPore Tape, incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugue a 5,90 x g durante 1 minuto.
- Vacíe el bloque S

20 6. Agregue 500 µl de AW2

- Selle la placa con nueva lámina AirPore Tape
- Haga rotar a 5,90 x g durante 15 minutos

6. Elución

- Coloque la placa QIAamp 96 sobre la gradilla de microtubos de elución.

- Agregue 100 µl de AE o ddH₂O precalentados a 70°C.
- Sella la placa con una nueva lámina de AirPore e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos
- Haga rotar a 5,790 x g durante 4 minutos
- Selle los tubos con tapas

5 El ADN puede ser entonces amplificado y analizado posteriormente por medio de los métodos sensibles para el análisis de metilación de ADN.

Ejemplo 2.

10 Todas las etapas se harán en los tubos en los que se proveen las muestras, esto es, los tubos provistos por el proveedor de las muestras, estos pueden ser tubos tanto de 1.5 como de 2.0 ml (preferidos). Por favor, reconfirme que los formatos de tubo encajan en la centrífuga.

Los solventes y reguladores pueden ser suministrados bien sea con pipetas de canal sencillo o multipipetas

a) Remoción de parafina

Reactivo químico necesario:

Limoneno145, Fluka Chemika, Art Nr. 89188

15 Procedimiento:

1. Agregue 1 ml de limoneno a cada tubo (que contiene 1 a 5 láminas de muestra de cirugía embebida en parafina - fijada con formalina). Coloque todas las piezas en el líquido. En algunos casos el material de la muestra es ya muy frágil con pequeñas piezas de parafina/tejido en el tubo - asegurarse de que el material que se adhiera a la tapa del tubo cae dentro del tubo.

20 2. Incubación durante 1 hora a temperatura ambiente a 1000 rpm, vórtex vigorosamente al menos durante 3 veces durante la incubación.

3. Coloque los tubos en la centrífuga y haga rotar a 16,000 rcf (= 16,000 x g) durante 5 minutos, el tejido formará pellas en el fondo del tubo.

25 4. Usa una pipeta de 1 ml para succionar el limoneno de cada muestra. ¡Tenga gran cuidado para no perturbar la pella! Coloque la punta de la pipeta opuesta a la pastilla sobre el tubo y permita que el limoneno entre suavemente a la punta de la pipeta, en algunos casos puede ser más fácil retirar el volumen completo en dos más bien que en una etapa de pipeta. Es correcto si permanecen pequeñas cantidades (hasta 50 µl) de limoneno en el tubo.

5. Si el tejido se deposita sólo débilmente en el fondo (esto es, no forma una pella definida) haga lo siguiente:

- repita la centrifugación de nuevo durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf 5417 a velocidad máxima (> 20,000 rcf)

30 • entonces repita la remoción de limoneno: asegúrese de que la punta de la pipeta es presionada contra el fondo del tubo y que el limoneno es retirado muy lentamente de tal manera que no succione el tejido. Retire tanto limoneno como sea posible.

Obvie la etapa del etanol, si fue posible retirar casi todo el limoneno (si quedan 50 µl, esto estará bien)

6. Agregue 1 ml de etanol (pureza > 99%).

35 7. Someta a vórtex, 10 minutos de incubación a temperatura ambiente a 1,00 rpm.

8. Coloque los tubos en la centrífuga y hágalos rotar a 16,000 rcf durante 5 minutos, el tejido se depositará de nuevo en el fondo del tubo.

9. Utilice la pipeta para succionar el etanol, ¡debe tenerse gran cuidado para no perturbar las pellas! Coloque la punta de la pipeta opuesta a la pella sobre la pared del tubo y permita que suavemente etanol entre a la punta de la pipeta.

10. retire tanto etanol como sea posible con la pipeta.

5 11. el etanol residual no retirado por la pipeta debe ser evaporado por incubación en un termomezclador a 50°C. Esto puede tomar entre 10 a 30 minutos, pero tenga cuidado de no sobresecar las muestras.

No es necesario el secado, si la etapa del etanol fue obviada.

b) Etapa de lisis

10 Prepare un volumen más grande del regulador de lisis (0.5 o 1 l), dependiendo del número de muestras que se van a procesar para un proyecto. Este regulador puede ser almacenado a temperatura ambiente durante 3 meses. Después de este tiempo es prudente preparar un regulador fresco.

Reactivos químicos:

TRIS (tris-hidroximetil-amino-metano), Merck, Art. Nr. 1.01549.0500, MW = 121.14 g/mol

Prepare una solución de reserva de 1 mol/l:

Disuelva 121.14 g en 800 ml de H₂O y ajuste a pH 8.0 con HCl y complete hasta 1 l.

15 EDTA (ácido etilendiaminotetraacético),

EDTA de sodio (Titriplex III) de Merck, Art. Nr. 159294

MW = 372.24 g/mol

Prepare una solución de reserva de 0.5 mol/l:

Disuelva 186.1 g en 800 ml de H₂O y ajuste a pH 8.0 con NaOH, complete hasta 1 l.

20 Tween (Tween 20), Fluka, Chemika Art Nr. 93773

Este detergente se agrega al regulador en porcentaje en volumen. Para agregar Tween al regulador tome 1 ml de Tween (en un tubo de 2 ml), caliéntelo a 50°C y agregue el volumen deseado al regulador con una punta de pipeta ancha.

Composición de regulador de lisis:

50 mmol/l TrisHCl, pH 8.0, 1 mmol/l EDTA, 0.5% Tween (volume %)

25 Proteinasa K, Roth

Preparare una solución de reserva de 30 mg/ml en H₂O. El tamaño de la solución de reserva debe ser ajustado al número de muestras que se van a procesar. Por ejemplo: 300 mg de proteinasa K disueltos en 10 ml de H₂O serán suficientes para ~ 400 muestras. La proteinasa K puede ser almacenada a 4°C durante hasta una semana con seguridad. Si se van a procesar más muestras se recomienda preparar soluciones frescas repetidamente.

30 Procedimiento:

1. Agregue 190 µl del regulador de lisis preparado a cada muestra. Es importante asegurarse de que todo el material de muestra es cubierto por el regulador de lisis.

2. Agregue 20 µl de la solución de proteinasa K preparada.

35 3. Someta a vórtex el tubo rigurosamente para asegurar una mezcla apropiada de la muestra con el regulador de lisis y la proteinasa K. Asegúrese de que las tapas de los tubos están cerradas herméticamente - ¡de otra manera habrá pérdida de líquido!

4. Incubar a 50°C, con agitación a 1,000 rpm (termoagitador).

5. Incubar durante 40 a 48 horas, no son necesarias adiciones posteriores de proteinasa K.

6. Haga rotar en la mañana y en la tarde de cada día para eliminar las gotitas de la tapa, someta a vórtex vigorosamente.

Verificación de la calidad de la lisis (durante la lisis):

5 Después de estas etapas de lisis, debe haber una solución homogénea, tal vez turbia en el tubo sin piezas visibles de tejido remanente. Sin embargo, debería haber piezas visibles de tejido en MUCHAS de las muestras dejadas después de la primera etapa de incubación adicional con proteinasa K y debería tenerse en consideración el incremento del volumen de la lisis. Si sólo las muestras individuales tienen algún material no digerido remanente este puede ser despreciado. ¡Tenga mucho cuidado!

10 7. Incube las muestras Incubar a > 95°C durante 10 minutos con el fin de inactivar la proteinasa K. Para esto fije la temperatura del termomezclador a 99°C, puesto que la temperatura real en la fijación más alta está algunos grados por debajo de la temperatura indicada (La proteinasa K activa en el lisado reducirá el rendimiento del PCR, especialmente si el lisado se usa directamente para la cuantificación de ADN genómico por RT-PCR).

15 8. Las muestras sometidas a lisis pueden ser almacenadas bien sea a -20°C o -80°C (dependiendo del tiempo de almacenamiento) o ser usadas inmediatamente para continuación del procesamiento.

c) Extracción de ADN con el kit QIAGEN DNeasy Tissue

Duración aproximada para 30 muestras:

Preparación de dispositivos y materiales: 15 minutos; Preparación: 30 min; Procedimiento: 1.5 horas

Se necesitan los siguientes dispositivos:

20 centrífuga, por ejemplo modelo Eppendorf 5417R; Pipetas y/o multipipetas Eppendorf; 1tubos de reacción de 1.5 ml y 2 ml; termomezclador.

Se necesitan los siguientes reactivos:

25 Lisados de muestras en parafina (-210 µl o más, si se agregaron regulador de lisis + proteinasa K, los volúmenes actuales pueden diferir ligeramente, pueden presentarse volúmenes inferiores porque fueron tomadas alícuotas para cuantificación, pérdida por evaporación. También pueden presentarse volúmenes más grandes porque la cantidad de tejido lisado fue mayor que el promedio)

Etanol para biología molecular (96-100%)

Kit de DNeasy (Qiagen cat nr. 69504 [50 columns] o 69506 [250 columnas])

Preparación (antes de incoar la extracción real):

30 1. Mezcle el regulador AL exhaustivamente agitando antes del uso. El regulador AL es estable durante 1 año cuando se almacena a temperatura ambiente. Si se ha formado un precipitado en el regulador AL, disuelva incubando a 70°C.

2. Se suministra regulador AW como concentrado. Agregue la cantidad apropiada de etanol (96-100%) antes de un primer uso (estas cantidades difieren para los kits 69504 y 69506, respectivamente). El regulador AW 1 es estable durante 1 año cuando se almacena cerrado a temperatura ambiente.

35 3. El regulador AW 2 se suministra como concentrado, la cantidad apropiada de etanol (96-100%) antes del primer uso (estas cantidades difieren para los kits 69504 y 69506, respectivamente). El regulador AW 2 es estable durante 1 año cuando se almacena cerrado a temperatura ambiente.

4. Si las muestras fueron congeladas después de la lisis del tejido asegúrese de que las muestras están equilibradas a temperatura ambiente.

40 5. Caliente un termomezclador a 70°C.

6. Todos las etapas de centrifugación deben llevarse a cabo a temperatura ambiente.

7. Sea cuidados de no causar derrames cuando utilice la multipipeta en lugar de pipeteadores individuales.

Procedimiento de extracción:

- 5 1. Agregue 210 µl (si el lisado tiene un volumen mayor: 1 volumen de regulador de lisis + volumen de proteinasa K usados) de regulador AL al tubo (1.5 o 2.0 ml) que contiene el lisado, mezcle exhaustivamente vórtex. Coloque el tubo en un termomezclador e incube a 70°C, agitando a 1000 rpm durante 10 minutos.
2. Agregue 210 µl (si el lisado tiene un volumen mayor: de nuevo 1 volumen de regulador de lisis + volumen de proteinasa K usados) de etanol (96-100%) a la muestra, y mezcle por vórtex con pulso durante 15 segundos. Después de la mezcla, centrifugue brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
- 10 3. Aplique cuidadosamente la mezcla de la etapa 2 (hasta 700 µl cabrán dentro de la columna, ¡incluyendo los precipitados!) sobre una columna de rotación DNeasy la cual ya está colocada en un tubo de recolección de 2 ml (provisto por Qiagen) sin humedecer el borde. Cierre la tapa y centrifugue a 6,000 x g (= rcf, u 8,000 rpm) durante 1 minuto. Coloque la columna de rotación DNeasy en un tubo de recolección de 2 ml limpio (provisto por Qiagen), y descarte el tubo que contiene el filtrado.
- 15 4. Si los lisados fueran mayores de 210 µl la columna tiene que ser cargada una segunda vez: colóquela en un tubo de 2 ml nuevo, agregue el volumen remanente de la mezcla de la etapa 2, haga rotar como en la etapa 3.
5. Abra cuidadosamente la columna de rotación y agregue 500 µl de regulador AW 1 (este es el mismo para grandes lisados, también) sin humedecer el borde. Cierre la tapa y centrifugue a 6,000 x g durante 1 minuto. Coloque la columna de rotación en un tubo de recolección de 2 ml limpio (provisto), y descarte el tubo de recolección que contiene el filtrado.
- 20 6. Abra cuidadosamente la columna de rotación y agregue 500 µl de regulador AW 2 sin humedecer el borde. Cierre la tapa y centrifugue a velocidad completa 20,000 x g (14,000 rpm) durante 3 minutos.
7. Opcional: Descarte el filtrado. Con el fin de evitar el arrastre de etanol, deben usarse nuevos tubos (no provistos por Qiagen). Centrifugue de nuevo durante 1 minuto a 20,000 x g (14,000 rpm).
- 25 8. Coloque la columna de rotación DNeasy en un tubo de reacción de 1.5 ml tubo limpio y ya marcado (no provisto por Qiagen), y descarte el tubo de recolección que contiene el filtrado. Abra cuidadosamente la columna de rotación DNeasy y agregue 60 µl del regulador de elución AE (a temperatura ambiente) al centro de la columna. Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto, luego centrifugue a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 1 minuto. Agregue de nuevo 60 µl de nuevo regulador de elución al centro de la columna, incube durante 1 minuto y centrifugue a 6,000 x g durante 1 minuto utilizando el mismo tubo. El volumen final es 120 µl (suficiente para 2 reacciones repetidas con nuevo protocolo), aunque puede ocurrir alguna pérdida debido a la retención de líquido en la columna. Si la concentración final de ADN no es crítica, pueden escogerse también volúmenes de elución más grandes (¡los volúmenes van a ser definidos específicamente para el proyecto!)
- 30 9. Si las muestras se usan para tratamiento con bisulfito dentro de los 2 días siguientes manténgalas a +4°C en un refrigerador. Para almacenamiento a largo plazo se recomienda -20°C.

Análisis:

- 35 Se utiliza una alícuota del eluato (3 µl) para cuantificar la concentración de ADN utilizando un ensayo de PCR genómico en tiempo real. La cuantificación por UV es opcional.

d) Tratamiento con bisulfito y e) Purificación de ADN con el dispositivo Microcon™

Equipo necesario:

- termociclador (por ejemplo, Eppendorf, Tetrad)
- centrífuga (capaz de hasta 14,000 x g)
- 40 • pipeteadores para volúmenes de 100 µl y 1000 µl

Material necesario:

- dispositivos Microcon Centrifugal Filter, Microcon® YM-30 (Millipore/Amicon 42410)
- puntas de pipeta (100 µl, 1000 µl)
- tubos de PCR de 200 µl (por ejemplo, Eppendorf 0030 124.359)
- tubos de 1.5 ml (por ejemplo Eppendorf 0030 120.086)

5 • tubos Falcon de 15 ml y 50 ml

Reactivos químicos necesarios:

- bisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 190.1 g/mol), Merck 1.06528.0500
- sulfito de sodio anhidro (Na_2SO_3 , 126.04 g/mol), Fluka 7 1988
- ddH₂O grado biología molecular (filtrada por 0.2 µm, tratada con DEPC, sometida a autoclave, libre de DNasas y RNasas)
- 10 • dietilenglicoldimetiléter (DME), Merck 8.02934.0250
- ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (250.29 g/mol), Aldrich 23,881-3
- Tris-hidroximetil-aminometano ($\text{C}_4\text{H}_9\text{O}_2$, M = 121.14 g/mol), Merck 1.01549.0500
- pellas de hidróxido de sodio (NaOH, 40.0 g/mol), Merck 1.06482.1000
- EDTA (Titriplex® III, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 372.24 g/mol), Merck 1.08418.0250

15 Preparación de soluciones (suficientes para 80 reacciones):

Solución de bisulfito: Se disuelven disulfito de sodio (4.708 g) y sulfito de sodio (1.128 g) agregando 10 ml de ddH₂O (la solución es 4.9 M). El volumen final es alrededor de 12 ml. Verifique el pH de la solución - si no está entre 5.45 y 5.5, descarte la solución y repita la preparación. Agite vigorosamente y si es necesario, caliente la solución a 50°C en un baño de agua con vórtex a velocidad máxima durante 30 segundos. Repita este procedimiento tan frecuentemente como sea necesario hasta que la sal se haya disuelto completamente.

20

Solución de DME - depurador de radicales: disuelva 125.3 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico agregando 1.0 ml de DME. Somete a vórtex vigorosamente con el fin de asegurarse que no permanecen partículas no disueltas. El DME es peligroso y potencialmente carcinogénico. Por lo tanto tome las precauciones adecuadas cuando manipule este reactivo químico. Si sólo se van a tratar pocas muestras con bisulfito, prepare volúmenes más pequeños.

25 NaOH 0.2 mol/l: Disuelva 0.32 g de hidróxido de sodio en 40 ml de ddH₂O. Regulador TE: 10 mmol/l Tris / 0.1 mmol/l EDTA, pH 8

General:

• Este procedimiento está diseñado para ser aplicado en tubos de PCR de 200 µl. El número total de muestras está limitado por el número de tubos que pueden ser manipulados en los termocicladores, centrífugas, etc.

30 • Las soluciones de trabajo no deberían ser almacenadas durante periodos prolongados de tiempo. Es mejor prepararlas frescas y escalar las soluciones de acuerdo con el número de muestras que se van a procesar.

• Todas las soluciones recolectadas como residuo en este procedimiento deberían ser recolectadas, por ejemplo, en una botella de vidrio y descartadas finalmente como solventes orgánicos libres de halógenos

Procedimiento de tratamiento con bisulfito:

35 Transfiera con una pipeta las siguientes soluciones en tubos de PCR en el orden mostrado.

1. 50 µl de regulador/agua que contiene el ADN que va a ser tratado con bisulfito.

2. 95 µl de solución de bisulfito.

3. 15 µl de solución de DME, que contiene el depurador de radicales.

¡El volumen total de la mezcla de reacción es 160 µl! ¡Cierre herméticamente las tapas de los tubos de PCR!

Programa de temperatura:

- 5
- 5:00 minutos desnaturalización de DNA a 99°C
 - 22:00 minutos incubación a 50°C
 - 3:00 min desnaturalización de DNA a 99°C
 - 1:27:00 horas incubación a 50°C.
 - 3:00 minutos desnaturalización de DNA a 99°C

- 10
- 2:57:00 horas incubación a 50°C
 - Enfriamiento a 20°C

Debido a la alta molaridad de las sales de bisulfito algo de la sal puede precipitar. Estos precipitados no afectarán la reacción con bisulfito.

Procedimiento de purificación de ADN:

- 15
- Después de que la incubación ha terminado, transfiera la solución de reacción (160 µl) en un tubo de recolección de 1.5 ml.
 - Agregue 120 µl ddH₂O al tubo de reacción. Mezcle pipeteando hacia arriba y hacia abajo y transfiera la solución al mismo tubo de recolección.
 - ¡Repita la etapa con 120 µl adicionales de ddH₂O!
 - Cierre las tapas, someta a vórtex intensamente y haga rotar por un período corto para remover gotas de la tapa.
- 20
- Tome toda esta solución (400 µl) y transfírela con una pipeta en un reservorio de muestra de un dispositivo de filtro Microcon ensamblado - ¡no toque la membrana con la punta de la pipeta!
 - Selle con la tapa anexa.
 - Coloque el ensamblaje en la centrífuga, alinee la cinta de la tapa hacia el centro del rotor y haga rotar durante 15 minutos a 14,000 x g.
- 25
- Después de la rotación, extraiga el ensamblaje y descarte el fluido. POR FAVOR TOME NOTA: La eficacia de la centrifugación puede variar dependiendo del modelo de centrífuga en particular y del instrumento usado. ¡Por lo tanto para todas las etapas de centrifugación verifique siempre el volumen de muestra pasado a través de la membrana! Si es necesario, incremente los tiempos de rotación en etapas de 2 minutos.
 - Para desulfonación agregue 400 µl de 0.2 NaOH mol/l a la membrana
- 30
- Coloque el ensamblaje de nuevo en la centrífuga y haga rotar durante 12 minutos a 14,000 x g. Extraiga el ensamblaje y descarte el fluido.
 - Para lavar agregue 400 µl de ddH₂O
 - Coloque el ensamblaje de nuevo en la centrífuga y haga rotarla durante 12 minutos a 14,000 g. Extraiga el ensamblaje y descarte el fluido.
- 35
- ¡Repita esta etapa dos veces adicionales! POR FAVOR TOME NOTA: Después de esto la membrana debería lucir húmeda, pero no debería estar cubierta por un volumen visible de líquido.

- Para la elución saque el ensamblaje de filtro de la centrífuga.

• Agregue 75 µl de regulador TE precalentado (50°C) en el reservorio de la muestra. (Nota: Si la cantidad total es crítica, la elución debería llevarse a cabo durante 2 etapas de elución subsecuentes, por ejemplo 2 x 37.5 µl - debería definirse antes de cada estudio).

- 5 • Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación en un termomezclador a 1,000 rpm.

• Invierta el dispositivo de filtración y colóquelo en un nuevo tubo Microcon de 1.5 ml.

• Eluya el ADN de la membrana haciendo rotar durante 5 minutos a 1,000 g.

• Opcional: Si se desea transfiera el ADN a un tubo nuevo – la tapa de los tubos Microcon tiende a abrirse rápidamente.

• Almacene el ADN a -80°C para almacenamiento a largo plazo o a +4°C para uso inmediato.

10 Ejemplo 3

Todas las etapas se harán en los tubos en que se provean las muestras. Los tubos pueden ser tubos tanto de 1.5 como de 2,0 ml. Por favor reconfirme que los formatos de tubo encajan en la centrífuga. Los solventes y reguladores pueden ser suministrados bien sea con pipetas de canal sencillo o multipipetas

a) Remoción de parafina

15 Reactivo químico necesario:

Limoneno¹⁴⁵, Fluka Chemika, Art Nr. 89188

Procedimiento:

- 20 1. Agregue 1 ml de limoneno a cada tubo (que contiene 1 a 5 láminas de tejido embebido en parafina - fijado con formalina). Coloque todas las piezas en el líquido. En algunos casos el material de la muestra es ya muy frágil con pequeñas piezas de parafina/tejido en el tubo - asegurarse de que el material que se adhiera a la tapa del tubo cae dentro del tubo.

2. Incubación durante 1 hora a TA a 1,000 rpm, vórtex vigorosamente al menos durante 3 veces durante la incubación.

3. Coloque los tubos en la centrífuga y haga rotar a 16,000 rcf (= 16,000 x g) durante 5 minutos, el tejido formará pellas en el fondo del tubo.

- 25 4. Usa una pipeta de 1 ml para succionar el limoneno de cada muestra. ¡Tenga gran cuidado para no perturbar la pella! Coloque la punta de la pipeta opuesta a la pastilla sobre el tubo y permita que el limoneno entre suavemente a la punta de la pipeta, en algunos casos puede ser más fácil retirar el volumen completo en dos más bien que en una etapa de pipeta.

Es correcto si permanecen pequeñas cantidades (hasta 50 µl) de limoneno en el tubo.

5. Si el tejido se deposita sólo débilmente en el fondo (esto es, no forma una pella definida) haga lo siguiente:

- Repita la centrifugación de nuevo durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf 5417 a velocidad máxima (> 20,000 rcf)

- 30 • entonces repita la remoción de limoneno: asegúrese de que la punta de la pipeta es presionada contra el fondo del tubo y que el limoneno es retirado muy lentamente de tal manera que no succione el tejido. Retire tanto limoneno como sea posible.

Obvie la etapa del etanol, si fue posible retirar casi todo el limoneno (si quedan 50 µl, esto estará bien)

6. Agregue 1 ml de etanol (pureza > 99%).

- 35 7. Someta a vórtex, 10 minutos de incubación a TA a 1,00 rpm.

8. Coloque los tubos en la centrífuga y hágalos rotar a 16,000 rcf durante 5 minutos, el tejido se depositará de nuevo en el fondo del tubo.

9. Utilice la pipeta para succionar el etanol, ¡debe tenerse gran cuidado para no perturbar las pellas! Coloque la punta de la pipeta opuesta a la pella sobre la pared del tubo y permita que suavemente etanol entre a la punta de la pipeta.

10. retire tanto etanol como sea posible con la pipeta.

5 11. El etanol residual no retirado por la pipeta debe ser evaporado por incubación en un termomezclador a 50°C. Esto puede tomar entre 10 a 30 minutos, pero tenga cuidado de no sobresecar las muestras.

No es necesario el secado, si la etapa del etanol fue obviada.

b) Etapa de lisis

10 Prepare un volumen más grande del regulador de lisis (0.5 o 1 l), dependiendo del número de muestras que se van a procesar para un proyecto. Este regulador puede ser almacenado a temperatura ambiente durante 3 meses. Después de este tiempo es prudente preparar un regulador fresco.

Reactivos químicos:

TRIS (tris-hidroximetil-amino-metano), Merck, Art. Nr. 1.01549.0500, MW = 121.14 g/mol

Prepare una solución de reserva de 1 mol/l:

Disuelva 121.14 g en 800 ml de H₂O y ajuste a pH 8.0 con HCl y complete hasta 1 l.

15 EDTA (ácido etilendiaminotetraacético),

EDTA de sodio (Titriplex III) de Merck, Art. Nr. 159294

MW = 372.24 g/mol

Prepare una solución de reserva de 0.5 mol/l:

Disuelva 186.1 g en 800 ml de H₂O y ajuste a pH 8.0 con NaOH, complete hasta 1 l.

20 Tween (Tween 20), Fluka, Chemika Art Nr. 93773

Este detergente se agrega al regulador en porcentaje en volumen. Para agregar Tween al regulador tome 1 ml de Tween (en un tubo de 2 ml), caliéntelo a 50°C y agregue el volumen deseado al regulador con una punta de pipeta ancha.

Composición de regulador de lisis:

50 mmol/l TrisHCl, pH 8.0, 1 mmol/l EDTA, 0.5% Tween (volumen %)

25 Proteinasa K, Roth

Preparare una solución de reserva de 30 mg/ml en H₂O. El tamaño de la solución de reserva debe ser ajustado al número de muestras que se van a procesar. Por ejemplo: 300 mg de proteinasa K disueltos en 10 ml de H₂O serán suficientes para ~ 400 muestras. La proteinasa K puede ser almacenada a 4°C durante hasta una semana con seguridad. Si se van a procesar más muestras se recomienda preparar soluciones frescas repetidamente.

30 Procedimiento:

1. Agregue 190 µl del regulador de lisis preparado a cada muestra. Es importante asegurarse de que todo el material de muestra es cubierto por el regulador de lisis.

2. Agregue 20 µl de la solución de proteinasa K preparada.

35 3. Someta a vórtex el tubo rigurosamente para asegurar una mezcla apropiada de la muestra con el regulador de lisis y la proteinasa K. Asegúrese de que las tapas de los tubos están cerradas herméticamente - ¡de otra manera habrá pérdida de líquido!

4. Incubar a 50°C, con agitación a 1,000 rpm (termoagitador).

5. Incubar durante 40 a 48 horas, no son necesarias adiciones posteriores de proteinasa K.

6. Haga rotar en la mañana y en la tarde de cada día para eliminar las gotitas de la tapa, someta a vórtex vigorosamente.

Verificación de la calidad de la lisis (durante la lisis):

5 Después de estas etapas de lisis, debe haber una solución homogénea, tal vez turbia en el tubo sin piezas visibles de tejido remanente. Sin embargo, debería haber piezas visibles de tejido en MUCHAS de las muestras dejadas después de la primera etapa de incubación adicional con proteinasa K y debería tenerse en consideración el incremento del volumen de la lisis. Si sólo las muestras individuales tienen algún material no digerido remanente este puede ser despreciado. ¡Tenga mucho cuidado!

10 7. Incube las muestras Incubar a > 95°C durante 10 minutos con el fin de inactivar la proteinasa K. Para esto fije la temperatura del termomezclador a 99°C, puesto que la temperatura real en la fijación más alta está algunos grados por debajo de la temperatura indicada (La proteinasa K activa en el lisado reducirá el rendimiento del PCR, especialmente si el lisado se usa directamente para la cuantificación de ADN genómico por RT-PCR).

15 8. Las muestras sometidas a lisis pueden ser almacenadas bien sea a -20°C o -80°C (dependiendo del tiempo de almacenamiento) o ser usadas inmediatamente para continuación del procesamiento.

Ejemplo 4:

Todas las etapas se harán en los tubos en los cuales se provean las muestras. Los tubos pueden ser tubos tanto de 1.5 como 2.0 ml. Por favor reconfirme que los formatos de tubo encajan en la centrífuga.

Los solventes y reguladores pueden ser suministrados bien sea con pipetas de canal sencillo o multipipetas.

20 a) Remoción de parafina

Reactivos químicos necesarios:

Limoneno145, Fluka Chemika, Art Nr. 89188

Procedimiento:

25 1. Agregue 1 ml de limoneno a cada tubo (que contiene 1-6 secciones de una muestra de cirugía embebida en parafina fijada con formalina o una cantidad igual de una biopsia). En algunos casos el material de muestra ya es muy frágil con pequeñas piezas de parafina/tejido en el tubo - asegurarse de que el material que se adhiere a la tapa del tubo caiga dentro del tubo.

2. incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, durante la incubación someter a vórtex rigurosamente varias veces (2-4 x 5 segundo) de tal forma que la muestra se desintegre tanto como sea posible. Esto puede variar de muestra a muestra.

30 3. Coloque los tubos en la centrífuga y haga rotar a 16,000 crf(= 16,000 x g) durante 5 minutos. El tejido formará una pella en el fondo del tubo.

35 4. Use una pipeta de 1 ml para succionar el limoneno de cada muestra. ¡Debe tenerse gran cuidado de no perturbar la pella! Coloque la punta de la pipeta opuesta a la pella sobre el tubo y permita que suavemente el limoneno entre en la punta de la pipeta. En algunos casos puede ser más fácil retirar el volumen completo en dos más que en una etapa de pipeteado. Es correcto si permanecen pequeñas cantidades (pocos µl) de limoneno en el tubo.

5. Si el tejido se deposita sólo débilmente en el fondo (esto es, no forma una pella definida) haga lo siguiente:

- repita la centrifugación de nuevo durante 5 minutos en la centrífuga Eppendorf 5417 a velocidad máxima (> 20,000 rcf)

- repita entonces la remoción de limoneno: asegúrese de que la punta de pipeta es presionada contra el fondo del tubo y el limoneno es retirado muy lentamente de tal forma que no succione el tejido. Retire tanto limoneno como sea posible.

40 6. Agregue 1 ml de etanol (pureza > 99%).

7. Incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación someta a vórtex los tubos 2-3 veces de tal forma que la pella se afloje y todo el tejido se empape en etanol.

8. Coloque los tubos en la centrífuga y haga rotar a 16,000 rcf durante 5 minutos, el tejido formará una pella nuevamente en el fondo del tubo.

5 9. Use la pipeta para succionar el etanol, ¡debe tenerse gran cuidado de no perturbar la pella! Coloque la punta de pipeta opuesta a la pella sobre la pared del tubo y permita que el etanol suavemente entre a la punta de pipeta. Retire tanto etanol como sea posible con la pipeta.

10. El etanol residual no retirado por la pipeta debe ser evaporado por incubación en un termomezclador a 50°C. Esto puede tomar entre 10 a 30 minutos, pero debe tenerse cuidado de no sobresecar las muestras.

10 b) Etapa de lisis

Preparar un volumen más grande de regulador de lisis (0.5 o 1 l), dependiendo del número de muestras que se van a procesar para un proyecto. Este regulador puede ser almacenado a temperatura ambiente durante 3 meses. Después de este tiempo es prudente preparar un regulador fresco.

Reactivos químicos

15 TRIS (tris-hidroximetil-amino-metano), Merck, Art. Nr.

1.01549.0500; MW = 121.14 g/mol; Prepare una solución de reserva de 1 mol/l: Disuelva 121.14 g en 800 ml de H₂O y ajuste a pH 8.0 con HCl y complete hasta 1 l. Debe prepararse una solución de Tris de 50 mmol/l a partir de esta reserva por dilución.

20 EDTA (ácido etilendiaminotetraacético); EDTA de sodio (Titriplex III) de Merck, Art. Nr. 159294; MW = 372.24 g/mol; prepare una solución de reserva de 0.5 mol/l: Disuelva 186.1 g en 800 ml de H₂O y ajuste pH 8.0 con NaOH, complete hasta 1 l.

Tween (Tween 20), Fluka, Chemika Art Nr. 93773; este detergente se agrega al regulador en porcentaje en volumen. Para agregar Tween al regulador tome 1 ml de Tween (en un tubo de 2 ml), caliéntelo a 50°C y agregue el volumen deseado al regulador con una punta de pipeta ancha.

Composición de regulador de lisis:

25 50 mmol/l TrisHCl, pH 8.0, 1 mmol/l EDTA, 0.5% Tween (volumen %).

Proteinasa K, Roth

Prepare una solución de reserva de 10 mg/ml en H₂O. El tamaño de la solución de reserva debería ser ajustado al número de muestras que van a ser procesadas. Por ejemplo, 100 mg de proteinasa K disueltos en 10 ml de H₂O será suficiente para ~ 160 muestras. La Proteinasa K puede ser almacenada a +4°C por hasta dos semanas con seguridad. Si se van a procesar más muestras se recomienda preparar soluciones frescas repetidamente.

30

Procedimiento:

1. Agregue 150 ml del regulador de lisis preparado a cada muestra. Es importante asegurarse de que todo el material de la muestra está cubierto por el regulador de lisis.

35 2. Agregue 20 µl de la solución de proteinasa K preparada. Someta a vórtex el tubo rigurosamente para asegurar una mezcla apropiada de la muestra con el regulador de lisis y la proteinasa K. Haga rotar muy brevemente para hacer caer las gotitas. Asegúrese de que las tapas del tubo están cerradas herméticamente - ¡de otra manera habrá pérdida de líquido!

3. Incube a 50°C, agitando a 1,000 rpm (thermoagitador).

4. Incube durante 40 horas, con un total de 3 inyecciones de proteinasa K (siempre de 20 µl).

40 5. Después de cada período de incubación los tubos deberían hacerse rotar brevemente para retirar cualquier líquido de la tapa para evitar el riesgo de contaminación (a través de los guantes). Después de la inyección de la proteinasa K, las muestras deberían ser sometidas a vórtex para asegurar una mezcla apropiada. Haga rotar y continúe con la incubación.

Esquema de incubación: 1 noche, 1 día, 1 noche

Agenda de trabajo sugerida:

- a. Por persona no debería procesarse más de 24 muestras en paralelo.
- b. La desparafinación de las muestras para 24 muestras tomará aproximadamente 2 horas.
- 5 c. Primera etapa de proteinasa K a las 16:00.
- d. Segunda etapa de proteinasa K el día siguiente a las 08:00.
- e. Tercera etapa de proteinasa K este día a las 16:00.
- f. Lisis completa en el día siguiente a las 8:00.

Verificación de la calidad de la lisis (después del final de la lisis):

- 10 Después de estas etapas de lisis, debería haber una solución clara en el tubo sin piezas visibles de tejido remanente. Sin embargo, debería haber piezas visibles de tejidos en MUCHAS de las muestras remanentes. Debería considerarse etapas adicionales con proteinasa K. Si solamente muestras individuales tienen algún material no digerido remanente este puede ser desechado.

- 15 6. Incube las muestras a $> 95^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos con el fin de inactivar la proteinasa K. Para esto la temperatura del termomezclador se fija en 99°C , puesto que la temperatura real en la fijación más alta está algunos grados por debajo de la temperatura indicada. (La proteinasa K activa en el lisado reducirá el rendimiento del PCR, especialmente si el lisado se usa directamente para la cuantificación de ADN genómico por RT-PCR).

7. Las muestras sometidas a lisis pueden ser almacenadas bien sea a -20°C o -80°C (dependiendo del tiempo de almacenamiento) o ser usadas inmediatamente para la continuación del procesamiento.

- 20 c. Extracción del ADN con el QIAGEN DNA-Mini-Kit

Exposición de tiempo para 30 muestras:

Provisión de dispositivos y materiales (15 minutos); Preparación (0.5 horas); Implementación (1.5 horas).

Provisión de dispositivos y materiales:

Se necesitan los siguientes dispositivos/medios de trabajo:

- 25 - centrífuga de Eppendorf 5417R, pipetas Eppendorf, tubos de reacción de 1.5 ml, -tubos de reacción de 2 ml, termomezclador o baño de agua.

Se requieren los siguientes reactivos:

- Unidades de muestra (líquido o tejido)
- Solución salina regulada con fosfato (PBS)

- 30 - Etanol (96-100%)

- Agua para biología molecular (filtrada por $0.2\ \mu\text{m}$, tratada con DEPC, sometida a autoclave, y libre de DNasas, RNasas, proteasas y fosfatasas)

- QIAamp DNA-Mini-Kit

Preparación de soluciones:

- 35 1. Mezcle regulador AL exhaustivamente agitando antes del uso. El regulador AL es estable durante 1 año cuando se almacena a temperatura ambiente. Si se ha formado un precipitado en el regulador AL, disuelva incubando a 70°C .

2. El regulador AW 1 se suministra como concentrado. Agregue 125 ml de etanol (96-100%) antes del primer uso. El regulador AW 1 es estable durante 1 año cuando se almacena cerrado a temperatura ambiente.

3. El regulador AW 2 es suministrado como un concentrado. Agregue 160 ml de etanol (96-100%) antes del primer uso. El regulador AW 2 es estable durante 1 año cuando se almacena cerrado a temperatura ambiente.

5 4. Equilibre las muestras a temperatura ambiente.

5. Caliente un baño de agua o un termomezclador a 56°C.

6. Equilibre el regulador de elución deseado (regulador AE o agua) a temperatura ambiente.

7. Todas las etapas de centrifugación deben llevarse a cabo a temperatura ambiente.

Procedimiento:

10 1. Agregue 200 µl de regulador AL a la muestra. Mezcle sometiendo a vórtex con pulsos durante 15 segundos.

2. Incube a 56°C durante 10 minutos. ¡Una incubación más larga puede llevar a degradación de ADN!

3. Agregue 200 µl de etanol (96-100%) a la muestra, y mezcle sometiendo a vórtex con pulsos durante 15 segundos. Después de mezclar, centrifugue brevemente el tubo de reacción de 1.5 ml para retirar las gotas del interior de la tapa.

15 4. Aplique cuidadosamente la mezcla de la etapa 3 sobre una columna de rotación QIAamp colocada previamente en un tubo de recolección de 2 ml sin humedecer el borde. Cierre la tapa y centrifugue a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 1 minuto. Coloque la columna de rotación QIAamp en un tubo de recolección limpio de 2 ml (provisto), y descarte el tubo que contiene el filtrado.

20 5. Abra cuidadosamente la columna de rotación QIAamp y agregue 500 µl de regulador AW 1 sin humedecer el borde. Cierre la tapa y centrifugue a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 1 minuto. Coloque la columna de rotación QIAamp en un tubo de recolección limpio de 2 ml (provisto), y descarte el tubo de recolección que contiene el filtrado.

6. Abra cuidadosamente la columna de rotación QIAamp y agregue 500 µl de regulador AW 2 sin mojar humedecer el borde. Cierre la tapa y centrifugue a velocidad completa de 20,000 x g (14,000 rpm) durante 3 minutos.

7. Descarte el filtrado, seque los tubos de recolección golpeándolos sobre un tejido de papel sobre el mesón, inserte la columna y haga rotar de nuevo durante 1 minuto a 8,000 rpm para retirar el etanol residual presente en AW2.

25 8. Coloque la columna de rotación QIAamp en un tubo de reacción limpio de 1.5 ml, y descarte el tubo de recolección que contiene el filtrado. Cuidadosamente abra la columna de rotación QIAamp y agregue un volumen adecuado (50-150 µl) de regulador AE o agua tibia (~40°C).

9. Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto, y luego centrifugue a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 1 minuto.

30 10. Tome el eluido y con una pipeta transfiera una segunda vez sobre la columna de rotación QIAamp. Incube a temperatura ambiente durante 1 minuto, y luego centrifugue a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 1 minuto. La incubación de la columna de rotación QIAamp cargada con el regulador durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de la centrifugación incrementa en general el rendimiento de ADN.

11 Para uso inmediato, un almacenamiento a +4°C en el refrigerador es aceptable, mientras que para largo plazo, se recomienda almacenamiento a -20°C.

35 12. Opcionalmente, la calidad y la cantidad debería ser verificada midiendo con el fotómetro. Una muestra de 200 µl de sangre humana entera típicamente produce 6 µg de ADN en 200 µl de agua (30 ng/µl) con una relación A260/A280 de 1.7-1.9. Un control de calidad adicional del estado del ADN sería cargar alrededor de 5 µl (1 µl de muestra + 4 µl de agua) sobre un gel de agarosa al 0.8%. Con esta verificación, puede determinarse el nivel de degradación del ADN y el tamaño de fragmento promedio así como una concentración aproximada.

40 Ejemplo 5.

a) Tratamiento con bisulfito y b) Purificación de ADN con dispositivo Microcon™ y uso de dioxano

Equipo necesario:

- termociclador (por ejemplo, Eppendorf, Tetrad)
- centrífuga (capaz de hasta 14,000 x g)
- pipeteadores para volúmenes de 100 µl y 1000 µl

5 Material necesario:

- Dispositivos Microcon Centrifugal Filter, Microcon® YM-30, Millipore/Amicon
- Puntas de pipeta (100 µl, 1,000 µl)
- Tubos de PCR de 200 µl, de pared delgada
- Tubos de reacción de 1.5 ml

10 • Tubos Falcon de 15 ml y 50 ml

Reactivos químicos necesarios:

- bisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, MW = 190.1 g/mol), Merck 1.06528.0500
- sulfito de sodio, anhidro (Na_2SO_3 , MW = 126.04 g/mol), Fluka 71988
- ddH₂O grado biología molecular (filtrada por 0,2 µm, tratada con DEPC, sometida a autoclave, libre de DNasas y RNasas)
- 15 • 1,4-dioxano, estabilizado (MW = 88.11 g/mol), Riedel de Haën 33147
- ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (MW = 250.29 g/mol), Aldrich 23,881-3
- Tris-hidroximetil-aminometano (M=121.14 g/mol), Merck 1.01549.0500
- perlas de hidróxido de sodio (MW = 40 g/mol), Merck 1.06482.1000

20 Solución de bisulfito: Se disuelven disulfito de sodio (4.708 g) y sulfito de sodio (1.128 g) agregando 10 ml de ddH₂O (la solución es 4.9 M). Se verifica el pH de la solución - si no está entre 5.45 y 5.5, descarte la solución y repita la preparación.

Agite vigorosamente y si es necesario, caliente la solución a 50°C en un baño de agua que se somete a vórtex a una velocidad máxima durante 30 segundos. Repita este procedimiento tan frecuentemente como sea necesario hasta que la sal se haya disuelto completamente.

25 Dioxano solución depuradora de radicales: Disuelva 197.2 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico agregando 5 ml de 1,4-dioxano. Somete a vórtex rigurosamente con el fin de asegurarse que no permanezcan partículas sin disolver. El dioxano es peligroso. Por lo tanto tome las precauciones apropiadas cuando se manipule este reactivo químico. Si se van a tratar solamente unas pocas muestras con bisulfito, prepare volúmenes más pequeños.

NaOH 0.2 M: Disuelva 0.32 g de hidróxido de sodio en 40 ml de ddH₂O.

Regulador TE: 10 mmol/l Tris, 0.1 mmol/l EDTA, pH 8

30 General:

- Este procedimiento puede ser aplicado a una muestra individual o a muchas muestras en paralelo.
- Las soluciones de trabajo no deben ser almacenadas por periodos prolongados de tiempo. Es mejor prepararlas frescas y escalar las soluciones de acuerdo con el número de muestras que se van a procesar.
- 35 • Todas las soluciones recolectadas como residuos en este procedimiento deben ser recolectadas, por ejemplo en una botella de vidrio y descartadas finalmente como solventes orgánicos libres de halógenos.

Procedimiento:

Transferir con pipeta las siguientes soluciones a un tubo de PCR de 200 µl en el orden mostrado:

1. 20 µl de regulador/agua que contiene el ADN que va a ser tratado con bisulfito.

2. 85 µl de solución de bisulfito.

5 3. 35 µl de solución de dioxano, que contiene el depurador de radicales (el volumen total de la mezcla de reacción es 140 µl)

Programa de temperatura:

- 5:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C

- 25 minutos incubación a 60°C

- 5:00 minutos desnaturalización de ADN a 95 °C

10 • 1:25 horas incubación a 60°C

- 5:00 minutos desnaturalización de ADN a 95°C

- 2:55 horas incubación a 60°C

- enfriar a 20°C hasta el final

15 Debido a la alta molaridad de las sales de bisulfito una parte de la sal puede precipitar. Estos precipitados no afectarán la reacción del bisulfito.

Purificación del ADN:

1. Después de que termina la incubación, se transfiere la solución de reacción (140 µl) a un tubo de recolección de 1.5 ml, se agregan 260 µl de ddH₂O en el tubo de recolección.

2. Mezclar mediante vórtex.

20 3. Tomar toda esta solución (400 µl) y transferirla con pipeta al reservorio de muestra de un dispositivo de filtración Microcon ensamblado. (¡No toque la membrana con la punta de la pipeta!)

4 Selle con la tapa anexa.

5. Coloque el ensamblaje en la centrífuga, y la tira de tapas hacia el centro del rotor y haga rotar durante 15 minutos a 14,000 x g (= rcf).

25 6. Después de la rotación retire el ensamblaje y descarte el fluido. TOME NOTA: la eficacia de la centrifugación puede variar dependiendo del modelo particular de centrífuga e instrumento usado. ¡Por lo tanto todas las etapas de centrifugación siempre deben verificar el volumen de muestra que pasa a través de la membrana! Si es necesario, incremente los tiempos de rotación en etapas de 2 minutos.

7. Retire el ensamblaje de filtración de la centrífuga.

30 8. Agregue 400 µl de NaOH 0.2 mol/l a la membrana.

9. Coloque el ensamblaje de nuevo en la centrífuga y haga rotar durante 12 minutos a 14,000 x g, descarte el fluido.

10. Lave la membrana agregando 400 µl de agua y haga rotar durante 12 minutos, descarte el fluido.

11 Repita la etapa de lavado dos veces más.

12. La membrana debería parecer húmeda, pero no debe estar cubierta por un volumen visible de líquido.

13. Para elución, retire el ensamblaje de la centrífuga.

14. Agregue 75 µl de regulador TE precalentado (50°C) (Tris/HCl 10 mmol/l; EDTA 0.1 mmol/l) en el reservorio de muestra.

15. Incube durante 10 minutos con agitación en un termomezclador a 1,000 rpm (50°C).

16. Invierta el dispositivo de filtro y colóquelo en un nuevo tubo Microcon de 1.5 ml.

5 17. Haga rotar durante 5 minutos a 1,000 x g.

18. Almacene el ADN a -20°C para almacenamiento a largo plazo o a +4°C para uso inmediato.

Ejemplo 6. Purificación de ADN por medio de un QIAamp Viral RNA Mini Kit

Equipo necesario:

- Centrífuga para tubos

10 • Pipeteadores para volúmenes de 10 µl a 1,000 µl

Material necesario:

- QIAamp Viral RNA Mini Kit (50) (Qiagen cat# 52904)

- Puntas para pipeta (100 µl, 1,000 µl)

Reactivos químicos necesarios:

15 • Etanol, grado biología molecular

- Pellas de hidróxido de sodio (NaOH, MW = 40.0 g/mol), Merck 1.06482.1000

Preparación de soluciones:

20 Regulador de desulfonación: Disuelva 0.8 g de hidróxido de sodio en 10 ml de ddH₂O para preparar una solución de reserva 2 mol/l. Para el regulador de desulfonación mezcle 1.0 ml de hidróxido de sodio 2 mol/l y 9.0 ml de etanol. ¡La solución tiene que ser preparada fresca antes de cada purificación!

25 Regulador AVL: Agregue 1 ml de regulador AVL a un tubo de ARN transportador liofilizado. Disuelva exhaustivamente. Transfiera a la botella de regulador AVL, y mezcle exhaustivamente antes de utilizar el regulador AVL por primera vez. El regulador puede ser almacenado a 2-8°C para uso futuro. Sin embargo, si se desarrolla un precipitado, redisuélvalo entonces calentando a 80°C. Esto debe hacerse no más de un total de 6 veces. Enfríe a temperatura ambiente antes del uso. Una alícuota pequeña puede mantenerse a temperatura ambiente por hasta 2 semanas.

Procedimiento:

1. Para el enlazamiento del ADN tratado con bisulfito, transfiera con 560 µl del regulador AVL preparado ARN/transportador en los tubos que contienen 140 µl de solución de ADN tratado con bisulfito. Agregue 560 µl de etanol a las muestras. Somete a vórtex con pulso durante 15 segundos. Centrifugue brevemente.

30 2. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.

3. Cargue 630 µl de la mezcla de la etapa 2 en la columna de rotación de QIAamp, la cual está colocada en un tubo de recolección (premarcado). Cierre la tapa y centrifugue a velocidad completa durante 1 minuto.

4. Coloque la columna de rotación en un tubo de recolección limpio de 2 ml y cargue el resto de la mezcla de la etapa 2. Cierre la tapa y centrifugue a velocidad completa durante 1 minuto.

35 5. Para lavar, agregue 500 µl del regulador AW1 a la columna de rotación en un tubo de recolección limpio de 2 ml. Centrifugue a velocidad completa durante 1 minuto. Descarte el filtrado.

6. Para la desulfonación, agregue 500 µl de NaOH/etanol 0.2 mol/l a la columna de rotación en un tubo de recolección limpio de 2 ml. Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugue a velocidad completa durante 1 minuto.
7. Agregue 500 µl de regulador AW2 a la columna de rotación en un tubo de recolección limpio de 2 ml. Centrifugue a 14,000 rpm durante 3 minutos. Descarte el filtrado.
- 5 8. Coloque la columna de rotación QIAamp en un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Centrifuga a 14,000 rpm durante 1 minuto para eliminar arrastre posible del regulador AW2. Descarte el filtrado.
9. Coloque la columna de rotación QIAamp en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml premarcado. Agregue 75 µl de regulador AVE a la columna de rotación QIAamp. Incube durante 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugue a 9,000 rpm durante 1 minuto.
- 10 Ejemplo 7. Etapa de lisis por medio de calentamiento
 1. Centrifugue 1-6 secciones de tejido embebido en parafina fijado con formalina en un tubo de reacción de 1.5 ml durante 5 minutos a 16,000 x g.
 2. Agregue 100 µl de regulador de lisis (50 mmol/l TrisHCl, pH 8.0, 1 mmol/l EDTA, Tween 2 al 0.5% v/v , 5 ng/µl polydA)
 3. Incube durante 10 minutos a 65°C con agitación a 1,000 rpm en un termomezclador.
- 15 4. Fije el termomezclador a 50° C y 1,400 rpm, deje las muestras en el termomezclador y déjelas enfriar.
5. Agregue 10 µl de proteinasa K (30 mg/ml).
6. Haga caer por rotación todas las gotitas de la pared del tubo. Asegúrese de que las tapas del tubo están cerradas herméticamente – de otra manera habrá pérdida de líquido.
7. Incube durante 40-48 horas a 60°C en un termomezclador con agitación a 1,000 rpm.
- 20 8. Incube las muestras a > 95°C durante 10 minutos con el fin de inactivar la proteinasa K. Para esto, fije la temperatura del termomezclador en 99°C. Transfiera los tubos INMEDIATAMENTE a otro termomezclador temperado a 50°C, agite a 1,400 rpm e incube durante 5 minutos. Esto evita la formación de una película de parafina.
9. Aplique 44 µl de este lisado directamente (sin extracción adicional) al ejemplo 8.
- Ejemplo 8.
- 25 a) Tratamiento con bisulfito y b) Purificación de ADN por medio del dispositivo Microcon™ y utilizando DME.
- Equipo necesario:
 - termociclador (por ejemplo Eppendorf, Tetrad)
 - centrífuga (capaz de hasta 14,000 x g)
 - pipeteadores para volúmenes de 100 µl y 1,000 µl
- 30 Material necesario
 - dispositivos Microcon Centrifugal Filter, Microcon® YM-30 (Millipore/Amicon 42410)
 - puntas para pipeta (100 µl, 1,000 µl)
 - tubos de PCR de 200 µl (por ejemplo Eppendorf 0030 124.359)
 - tubos de 1.5 ml (por ejemplo Eppendorf 0030 120.086)
- 35 • tubos Falcon de 15 ml y 50 ml

Reactivos químicos necesarios:

- bisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, MW = 190.1 g/mol), Merck 1.06528.0500
- sulfito de sodio, anhidro (Na_2SO_3 , MW = 126.04 g/mol), Fluka 71988
- 5 • ddH₂O grado de biología molecular (filtrada por 0.2 µm, tratada con DEPC, sometida a autoclave, libre de DNasas y RNasas)
- dietilenglicoldimetiléter (DME), Merck 8.02934.0250
- ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (MW = 250.29 g/mol), Aldrich 23,881-3
- Tris-hidroximetil-aminometano ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, MW = 121.14 g/mol), Merck 1.01549.0500
- pellas de hidróxido de sodio (NaOH, MW = 40.0 g/mol), Merck 1.06482.1000
- 10 • EDTA (Titriplex[®] III, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MW = 372.24 g/mol), Merck 1.08418.0250

Preparación de soluciones (suficiente para 80 reacciones):

- 15 Solución de bisulfito: Se disuelven bisulfito de sodio (4.708 g) y sulfito de sodio (1.128 g) agregando 10 ml de ddH₂O (la solución es 4.9 M). El volumen final es alrededor de 12 ml. Verifique el pH de la solución - si no está entre 5.45 y 5.5, descarte la solución y repita la preparación. Agite vigorosamente y si es necesario, caliente la solución a 50°C en un baño de agua y luego someta a vórtex a una velocidad máxima durante 30 segundos. Repita este procedimiento tan frecuentemente como sea necesario hasta que la sal se disuelva completamente.

Solución de DME-depurador de radicales: Disuelva 125.3 mg del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico agregando 1.0 ml de DME. Somete a vórtex rigurosamente con el fin de asegurar que no permanezcan partículas no disueltas. Si se van a tratar con bisulfito solo pocas muestras, prepare volúmenes menores.

- 20 NaOH 0.2 M: disuelva 0.32 g de hidróxido de sodio en 40 ml de ddH₂O.

Regulador TE: 10 mmol/l Tris, 0.1 mmol/l EDTA, pH 8.

General:

- Este procedimiento está diseñado para ser aplicado en tubos de PCR de 200 µl. El número total de muestras está limitado por el número de tubos que pueden ser manipulados en los termocicladores, centrífugas, etc.
- 25 • Las soluciones de trabajo no deberían ser almacenadas durante periodos prolongados de tiempo. Es mejor prepararlas frescas y escalar las soluciones de acuerdo con el número de muestras que se van a procesar.
- Todas las soluciones recolectadas como residuos en este procedimiento deberían ser recolectadas, por ejemplo, en una botella de vidrio y finalmente descartadas como solventes orgánicos libres de halógenos.

Procedimiento de tratamiento con bisulfito:

- 30 Transfiera con pipeta las siguientes soluciones en los tubos de PCR en el orden mostrado.

1. 45 µl de regulador/ agua que contiene el ADN que va a ser tratado con bisulfito.
2. 83 µl de solución de bisulfito.
3. 13 µl de solución de DME, que contiene el depurador de radicales.
4. Mezclar exhaustivamente.
- 35 5. Colocar en pozos de 0,2 ml en el termociclador.

¡El volumen total de la mezcla de reacción es 141 µl! ¡Cierre herméticamente las tapas de los tubos de PCR!

Protocolo de Temperatura:

- 5:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C.
- 22:00 minutos incubación a 60°C.
- 3:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C.
- 5 • 1:27:00 horas incubación a 60°C.
- 3:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C.
- 2:57:00 horas incubación a 60°C.
- enfriar a 20°C.

10 Debido a la alta molaridad de las sales de bisulfito una parte de la sal puede precipitar. Estos precipitados no afectan la reacción del bisulfito.

Procedimiento de purificación del ADN:

- Después de que termina la incubación, transferir la solución de reacción (141 µl) a un tubo de recolección de 1.5 ml.
- Agregar 260 µl de ddH₂O al tubo de recolección.
- Cierre las tapas, someter a vórtex intensamente y hacer rotar un tiempo corto para retirar las gotas de la tapa.
- 15 • Tomar toda esta solución (400 µl) y transferirla con pipeta al reservorio de muestra de un dispositivo de filtro Microcon ensamblado - ¡no toque la membrana con la punta de la pipeta!
- Selle con la tapa anexa.
- Coloque el ensamblaje en la centrífuga, alinee la tira de tapas hacia el centro del rotor y haga rotar durante 15 minutos a 14,000 x g (= rcf).
- 20 • Después de la rotación retire el ensamblaje y descarte el fluido. TOME NOTA: la eficacia de la centrifugación puede variar dependiendo del modelo particular de centrífuga e instrumento usado. ¡Por lo tanto todas las etapas de centrifugación siempre deben verificar el volumen de muestra que pasa a través de la membrana! Si es necesario, incremente los tiempos de rotación en etapas de 2 minutos.
- Para desulfonación, agregue 400 µl de NaOH 0.2 mol/l a la membrana.
- 25 • Coloque de regreso el ensamblaje en la centrífuga y haga rotar durante 12 minutos a 14,000 x g. Retire el ensamblaje y descarte el fluido.
- Agregue 400 µl de ddH₂O.
- Coloque el ensamblaje de nuevo en la centrífuga y haga rotar durante 12 minutos a 14,000 x g. Retire el ensamblaje y descarte el fluido.
- 30 • ¡Repita esta etapa dos veces adicionales! POR FAVOR TOME NOTA: después de esto la membrana debería parecer húmeda, pero no debería estar cubierta por un volumen visible de líquido.
- Para elución del ADN, retire el ensamblaje de filtro de la centrífuga.
- Agregue 75 µl de regulador TE precalentado (50°C) en el reservorio de muestra. (Nota: Si la cantidad total es crítica, la elución debería ser llevada a cabo en 2 etapas de elución subsecuentes, por ejemplo, 2 x 37.5 µl –lo que debería ser
- 35 definido antes de cada estudio)
- Incube durante 10 minutos a 50°C con agitación en un termomezclador a 1,000 rpm.

- Invierta el dispositivo de filtración y colóquelo en un nuevo tubo Microcon de 1.5 ml.
- Eluya el ADN de la membrana haciendo rotar durante 5 minutos a 1,000 g.
- (si se desea transfiera el ADN a un nuevo tubo – la tapa de los tubos Microcon tiende a abrirse rápidamente)
- almacene el ADN a -80°C para almacenamiento a largo plazo o a +4°C para uso inmediato.

5 Ejemplo 9

9.1. Conjuntos de muestra

9.1.1. Población no tratada positiva para receptor de estrógenos (ER+) negativa para estatus nodal (NO)

Se analizaron muestras de tumores ER+ NO de pacientes no tratados con ninguna terapia adyuvante. Los marcadores que son capaces de mostrar una diferencia de supervivencia significativa en esta población se consideran como pronósticos. Puesto que la terapia adyuvante se ha convertido en el régimen de rutina para pacientes con cáncer de seno durante muchos años, el conjunto de muestras recolectadas es uno histórico de los ochenta del siglo pasado.

Todas las 508 muestras de este conjunto fueron obtenidas del Erasmus Medical Center en Rotterdam como pellas de núcleos celulares (muestras congeladas frescas).

9.1.2. Población ER+ NO tratada con tamoxifen (TAM)

Se supone que la población objetivo de la prueba final son pacientes con tumores ER+ NO que son tratados con terapia hormonal. Para verificar el rendimiento del comportamiento de los candidatos marcadores en esta población, se analizaron 589 muestras de tumores ER+ NO de pacientes tratados con tamoxifen. Todas las muestras fueron recibidas como tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (PET). Se proveyeron secciones de tres a diez 10 µm.

• Además, para 89 muestras de pacientes PET se incluyeron muestras congeladas frescas coincidentes para el mismo tumor en el estudio como controles.

9.2. Extracción de ADN

9.2.1. Extracción de ADN a partir de muestras congeladas frescas

De un total de 508 muestras frescas congeladas disponibles como pellas de núcleos celulares, se aisló el ADN genómico utilizando el DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania). La extracción se hizo de acuerdo con el protocolo Cell Culture utilizando proteinasa K con pocas modificaciones.

Se transfirieron con pipeta 20 µl de proteinasa K (Qiagen, Hilden, Alemania) a un tubo de reacción de 2 ml (Eppendorf Hamburgo, Alemania) que contenía las pellas. Se agregaron 200 µl de regulador PBS y se sometió a vórtex con pulsos durante la noche a 37°C. Se agregaron otros 200 µl de regulador AL y subsecuentemente se sometió a vórtex con pulsos de nuevo a 56°C durante 10 minutos. Después de incubación a 70°C durante 10 minutos, se agregaron 200 µl de etanol (96%) y se incubó durante 15 segundos. La mezcla fue aplicada a una columna y centrifugada a 6,000 x g durante 1 minuto. La columna fue colocada en un tubo de recolección de 2 ml provisto y se agregaron 500 µl de regulador AW 1. Después de la centrifugación a 6,000 x g durante 1 minuto, se agregaron 500 µl de regulador AW 2 a la columna colocada en otro tubo de recolección de 2 ml provisto seguido por centrifugación a 20,000 x g durante 3 minutos. El tubo de recolección fue mantenido abierto para secar la pella de ADN durante varios minutos y se hizo rotar de nuevo a 6,000 x g para retirar el etanol residual presente en el regulador AW 2. La columna fue colocada en un tubo de reacción limpio de 1.5 ml (Eppendorf, Hamburg, Alemania) y se agregaron 60 µl de regulador AE precalentado (~ 40°C). Después de incubación a temperatura ambiente durante 1 minuto, las muestras fueron centrifugadas a 6,000 x g durante 1 minuto. El eluido fue transferido por pipeta una segunda vez sobre la columna incubada de nuevo a temperatura ambiente durante 1 minuto con la siguiente etapa de centrifugación bajo las mismas condiciones. La calidad y cantidad del ADN genómico extraído fue verificada por medición fotométrica (A260 y A280). El ADN extraído fue almacenado a -20°C hasta el procesamiento posterior.

9.2.2. Desparafinación, lisis y extracción de ADN a partir de muestras embebidas en parafina fijadas con formalina (PET)

Para la desparafinación, se procesaron 589 muestras provistas embebidas en parafina fijadas con formalina (PET) directamente en el tubo en el cual fueron suministradas por los proveedores. Se agregó 1 ml de limoneno a cada tubo que contenía 3 a 10 secciones, cada una de aproximadamente 10 µm de espesor y se incubaron a temperatura ambiente

durante 10 minutos. Durante la incubación fueron sometidas a vórtex rigurosamente varias veces (2-4 x 5 segundos). Las muestras en parafina fueron centrifugadas a 16,000 x g durante 5 minutos. El limoneno sobrenadante fue retirado muy cuidadosamente colocando una pipeta sobre el lado opuesto de la pella. Si no se recibió una pella, la centrifugación fue repetida a velocidad más alta (20,000 x g) durante el mismo tiempo y el limoneno remanente fue retirado. Después se agregó 1 ml de EtOH (pureza > 99%) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos mientras se sometía a vórtex 2-3 veces. Luego los tubos fueron centrifugados a 16,000 x g durante 5 minutos. Se retiró tanto etanol como fue posible sin perturbar la pella mediante una pipeta. El etanol residual no retirado por la pipeta fue evaporado por incubación en un termomezclador a 50°C durante 10 hasta 30 minutos.

Para someter el tejido a lisis, se agregaron 150 µl de regulador de lisis (TrisHCl 50 mmol/l, pH 8.0, EDTA 1 mmol/l, Tween al 0.5% (% en volumen), TRIS (tris-hidroximetil-amino-metano), Merck, No. 1.01549.0500, EDTA sodio (Titrplex III) de Merck, No. 159294, Tween (Tween20), Fluka, No. 93773) así como 20 µl de proteinasa K (solución de reserva de 10 mg/ml en H₂O, Roth, Karlsruhe) a cada muestra desparafinada. Después de someter a vórtex rigurosamente, las muestras fueron centrifugadas por poco tiempo e incubadas en un termoagitador a 50°C. Durante el período de incubación de aproximadamente 40 horas, se agregó proteinasa K cada 8-12 horas (en total tres veces). Los tubos fueron siempre centrifugados rápidamente antes de abrirlos para evitar contaminación. Después de la etapa de lisis, las muestras fueron verificadas para ver si eran claras y que no contenían ya residuos. Subsecuentemente la inactivación de la proteinasa K se logró por incubación de las muestras sometidas a lisis a 95°C durante 10 minutos. Si las muestras sometidas a lisis no fueron utilizadas directamente para la extracción del ADN, fueron almacenadas a -20°C.

El aislamiento del ADN de los lisados de las muestras de tejido embebidos en parafina fijados con formalina (PET) se hizo con el kit DNeasy Tissue (Qiagen cat no. 69504 [50 columnas] or 69506 [250 columnas]) con pocas modificaciones. Se agregaron 200 µl de regulador AL a 210 µl de lisado equilibrado a temperatura ambiente y se mezcló exhaustivamente por vórtex. Esta mezcla fue colocada en un termomezclador e incubada a 70°C mientras se agitaba durante 10 minutos. Luego se agregaron 200 µl de etanol al 96% y se mezcló por sometimiento a vórtex con pulso durante 15 segundos. Después de una breve centrifugación, la mezcla completa fue aplicada sobre una columna la cual fue colocada en un tubo de recolección de 2 ml (provisto por Qiagen). Esto fue seguido por centrifugación a 6,000 x g durante 1 minuto. Después de esto la columna fue colocada en un tubo de recolección de 2 ml (provisto por Qiagen) y se agregaron 500 µl de regulador AW 1. Se aplicó recentrifugación bajo las mismas condiciones. La columna fue colocada en un tubo de recolección adicional provisto y se agregó y regulador AW 2 seguido por centrifugación a 20,000 x g durante 3 minutos. Después de algunos minutos de secado, la etapa de centrifugación fue repetida a 20,000 x g durante 1 minuto. Para eluir el ADN, la columna fue colocada en un tubo de reacción de 1.5 ml (Eppendorf, Hamburg, Alemania) y se transfirieron con pipeta sobre el centro de la columna 35 µl de regulador de elución AE (ajustado a temperatura ambiente). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 1 minuto, la columna fue centrifugada a 6,000 x g durante 1 minuto. Se agregaron otros 35 µl de regulador de elución a la columna y se repitió la centrifugación. Por lo tanto, el volumen final del ADN extraído fue aproximadamente 70 µl. El ADN se almacenó -20°C.

9.3. Tratamiento con bisulfito

9.3.1. Tratamiento con bisulfito de muestras congeladas frescas

El ADN genómico extraído fue modificado por tratamiento con bisulfito. Durante la reacción con bisulfito, se sulfonaron primero las citosinas no metiladas, durante una siguiente etapa las desaminadas, y finalmente las desulfonadas convirtiéndolas en uracilo mientras que las 5'-metilcitosina permaneció sin afectarse.

Con el fin de evitar desplazamientos potenciales del proceso, todas las muestras fueron aleatorizadas en lotes de aproximadamente 30 muestras observando su seguimiento clínico. Esta aleatorización fue transferida a la disposición de placas de 384 pozos de las placas de ensayo dando como resultado una aleatorización satisfactoria para estas placas también. El tratamiento con bisulfito del ADN genómico derivado del material congelado fresco fue llevado a cabo como se describe en lo que sigue. 15 µl de ADN genómico lisado fue transferido por pipeta a una placa de 96 pozos para cada lote de bisulfito de acuerdo con la aleatorización. Después de esto se agregaron a cada pozo 60 µl de solución de bisulfito (4.9 M, pH 5.5; bisulfito de sodio, Merck 1.06528.0500, sulfito de sodio, anhidro, Fluka 71988, ddH₂O grado biología molecular) y 25 µl de solución de dioxano que contiene el depurador de radicales (solución dioxano-depurador de radicales: 98.6 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico, Aldrich 23,881-3 con 2.5 ml de 1,4-dioxano, Riedel de Haën 33147). El volumen total de 100 µl por pozo fue sellado mediante tiras de tapas.

La mezcla de reacción fue sometida a termociclización mediante el siguiente protocolo:

5:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C

1:30 minutos enfriamiento a 4°C

23:30 minutos incubación a 50°C

3:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C

1:30 minutos enfriamiento a 4°C

1:25:30 horas incubación a 50°C

5 3:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C

1:30 minutos enfriamiento a 4°C

2:55:30 horas incubación a 50°C

enfriamiento a 4°C

10 Después de la incubación, la reacción fue transferida a un tubo de recolección de 500 µl (Eppendorf No. 124502, Hamburg, Alemania) y se agregaron 300 µl de ddH₂O para incrementar la solubilidad de las sales de bisulfito.

15 La mezcla completa de 400 µl fue transferida con pipeta a un reservorio de un dispositivo de filtro Microcon™ ensamblado (Microcon™ YM-30, 42410, Millipore, Estados Unidos de América) y se selló con la tapa anexa. El ensamblaje fue centrifugado a 14,000 x g durante 15 minutos. Después de descargar el fluido, se agregaron 400 µl de regulador TE y se centrifugaron de nuevo a la misma velocidad durante 12 minutos. La etapa de lavado fue repetida una vez. Para la desulfonación, se agregaron 100 µl de NaOH 0.2 mol/l (Merck No. 1.06482.1000) al ensamblaje de filtro sin tocar la membrana y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. El ensamblaje fue centrifugado de nuevo a la misma velocidad durante 10 minutos. La solución residual de hidróxido de sodio fue retirada lavando la membrana con 400 µl de regulador TE y centrifugación a la misma velocidad durante 12 minutos. Para la elución del ADN convertido con bisulfito (bisADN), se transfirió con pipeta 50 µl del regulador TE precalentado (50°C) (Tris 10 mmol/l, Merck No. 1.01549.0500; EDTA 0.1 mmol/l, pH 8, Merck No. 1.08418.0250) en cada reservorio de muestra y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Subsecuentemente el dispositivo de filtro fue invertido y colocado en un nuevo tubo Microcon™ de 1.5 ml y centrifugado a 1,000 x g durante 5 minutos. Las muestras de ADN tratado con bisulfito fueron transferidas a una nueva placa de 96 pozos de acuerdo con su orden de muestra especificado. Las muestras de ADN tratado de bisulfito fueron almacenadas a -20°C.

25 9.3.2. Tratamiento con bisulfito de muestras de tejido embebido en parafina fijado con formalina (PET)

El tratamiento con bisulfito del ADN genómico derivado de tejido embebido en parafina fijado con formalina fue hecho de acuerdo con el ejemplo 5. Para este proceso, las muestras fueron aleatorizadas no sólo con respecto a su seguimiento clínico, sino también con respecto a sus proveedores. Para las muestras embebidas en parafina fijadas con formalina (PET), se utilizó la mitad del volumen obtenido de la extracción de ADN para la reacción subsecuente con bisulfito.

30 El procedimiento fue diseñado especialmente para el tratamiento con bisulfito de muestras de tejido embebido en parafina fijado con formalina (muestras PET) para incrementar la cantidad de bisADN resultante. Por lo tanto, se llevaron a cabo dos reacciones con bisulfito de la misma muestra de ADN y se purificaron sobre la columna de rotación Microcon™. Se llevaron a cabo las siguientes modificaciones en comparación con el protocolo para muestra fresca congelada (véase anteriormente). La primera etapa de transferir con pipeta 15 µl de ADN genómicos lisado a una placa de 96 pozos con 60 µl de solución de bisulfito (para ingredientes véase más arriba) y 25 µl de solución de dioxano (para ingredientes véase más arriba) que contenía el depurador de radicales se hizo dos veces para cada muestra de ADN. La etapa de incubación fue llevada a cabo con el mismo programa de termociclador que para las muestras frescas congeladas. Después de la incubación, ambas reacciones (200 µl en total) originadas de la misma muestra de ADN fueron transferidas a un tubo de recolección de 500 µl (Eppendorf No. 124.502, Hamburg, Alemania), mientras que cada pozo fue lavado con 100 µl de ddH₂O y también transferido al tubo de recolección que contenía finalmente 400 µl de solución de reacción. Después de mezclar brevemente, la solución fue transferida con pipeta al reservorio de muestra de un dispositivo de filtro Microcon™ ensamblado y se purificó, desulfonó y eluyó el ADN de la muestra fresca congelada. Las muestras de ADN tratadas con bisulfito fueron almacenadas a -20°C.

9.4. Preparación de estándares de ADN para ensayos QM:

45 9.4.1. Preparación de estándares de cuantificación

Se trataron lotes de 2,000 ng de ADN genómico humano (Promega) con bisulfito. Por esto se mezclan 100 µl de ADN (2,000 ng) con 354 µl de solución de bisulfito y 146 µl de solución de dioxano. Por lo tanto, se aplicó el siguiente programa de temperatura para la reacción con bisulfito: 1. Baño de agua a 95°C durante 3 minutos; 2. Termomezclador a 50°C durante 30 minutos, agitando a 1,000 rpm; 3. Baño de agua a 95°C durante 3 minutos.; 4. Termomezclador a 50°C, 1.5 horas, con agitación a 1,000 rpm; 5. Baño de agua a 95°C, 3 minutos; 6. Termomezclador a 50°C durante 3 horas, agitación a 1,000 rpm). La desalinización, lavado y desulfonación se hizo a través de columnas Microcon™ YM-30 (Millipore/Amicon) siguiendo las instrucciones de trabajo. La cuantificación del ADN estándar se hizo con un espectrómetro UV.

9.4.2. Preparación de estándares de calibración

ADN por desplazamiento molecular (MDA)

El ADN por desplazamiento molecular (MDA) se genera de acuerdo con el kit de amplificación GenomiPhi™ DNA (Amersham Bioscience). En resumen, se aplica ADN genómico a una Phi-DNA-polimerasa en la presencia de cebadores aleatorios. Esto lleva a una amplificación del genoma completo de fragmentos de ADN que no están metilados.

Tratamiento Sss1

Para generar ADN MDA metilado, se trataron 13 tubos de 4.5 mg de ADN-MDA (700 ng/ml) con Sss1 en la siguiente reacción con un volumen total de 75 µl (manteniendo las soluciones de reacción sobre hielo):

4.5 µg MDA-DNA (6,3 µl)

57.3 µl H₂O

0.375 µl 200 x SAM

3 µl (12 U) Sss1

7.5 µl NE-regulador2

La incubación se llevó a cabo a 37°C en un baño de agua. Después de aproximadamente 3 horas, se agregaron 0.375 µl de SAM y después de otras 5 horas, se agregaron 3 µl de Sss1 (2 veces). Se incubó durante la noche y subsecuentemente se inactiva a 65°C durante 10 minutos. Se reúnen los 13 tubos (975 µl) se toman 967 µl y se coloca ADN en un nuevo tubo Falcon de 10 ml. Se agregan 2 veces 967 µl de agua (20 ng/µl) y se toman alícuotas del ADN en 25 tubos Eppendorf de 1.5 ml que contienen cada uno 100 µl (2 µg).

Tratamiento con bisulfito del ADN-MDA tratado con Sss1

Se trataron con bisulfito 24 tubos cada uno de 2 µg. Esto se hizo mezclando 100 µl de ADN con 354 µl de solución de bisulfito y 146 µl de solución de dioxano. Después de esto se aplicó el siguiente programa de temperatura para la reacción con bisulfito: 1. Baño de agua a 95°C, 3 minutos; 2. Termomezclador a 50°C, 30 minutos, agitación a 1,000 rpm; 3. Baño de agua a 95°C, 3 minutos; 4. Termomezclador a 50°C, 1.5 horas, agitando a 1,000 rpm; 5. Baño de agua a 95°C durante 3 minutos; 6. Termomezclador a 50°C, agitando a 1,000 rpm, 3 horas. La desalinización, lavado y desulfonación se hizo a través de columnas Microcon™ YM-30 (Millipore/Amicon).

Tratamiento con bisulfito de ADN-MDA no tratado con Sss1

Para el tratamiento con bisulfito de ADN-MDA, se toma 82.9 µl de ADN-MDA (700 ng/µl), y se coloca en un nuevo tubo Falcon de 10 ml. Se agregan 3 veces 939 µl de agua (20 ng/µl), se toman alícuotas del ADN en 25 tubos Eppendorf de 1.5 ml que contienen 100 µl cada uno (2 µg), y se lleva a cabo 24 veces lo siguientes: Se mezclan 100 µl de ADN con 354 µl de solución de bisulfito y 146 µl de solución de dioxano y se aplica a continuación el siguiente programa de temperatura para la reacción con bisulfito: 1. Baño de agua a 95°C, 3 minutos; 2. Termomezclador a 50°C, 30 minutos, agitando a 1,000 rpm; 3. Baño de agua a 95°C 3 minutos; 4. Termomezclador a 50°C, 1.5 horas, agitando a 1,000 rpm; 5. Baño de agua a 95°C durante 3 minutos; 6. Termomezclador a 50°C, agitando 1,000 rpm, 3 horas. La desalinización, lavado y desulfonación se hace a través de columnas Microcon™ YM-30 (Millipore/Amicon).

Cuantificación del ADN-MDA convertido con bisulfito tratada con Sss1- y ADN-MDA no tratado con Sss1

El ADN-MDA tratado con Sss1 y el ADN-MDA no tratado con Sss1 fue diluido hasta 1 a 2 y 1 a 10 cada muestra, y se determinó la concentración de ADN en duplicado utilizando el ensayo C3 y el estándar de cuantificación preparado de

acuerdo con 9.4.1. Ambos estándares fueron diluidos 1 a 10 y 1 a 100. Después de esto, se utilizaron 10 µl para la cuantificación por UV.

La determinación del sulfito residual se llevó a cabo utilizando el Merck Sulfit-Küvettest 1.1 (Merck, Darmstadt) de acuerdo con el procedimiento descrito para la medición de muestras. Las concentraciones de sulfito estuvieron por debajo de 100 mg/l dando como resultado valores más abajo del valor crítico de 50 mg/l de sulfito en el PCR a través de la dilución de la solución de reserva.

Preparación de las mezclas estándar de calibración

Los estándares de calibración fueron preparados utilizando las soluciones de reserva de ADN-MDA tratadas con Sss1 y ADN-MDA no tratadas con Sss1 tratadas separadamente para los conjuntos de muestras de la población no tratada ER+ N0 y de la población tratada y ER+ N0 TAM de acuerdo con la Tabla 1a. Para eso, preparamos soluciones de ADN de 14 diferentes niveles de metilación (serie logarítmica) con la concentración de 1 ng/µl y se distribuyeron 40 µl de cada nivel a varias placas de 96 pozos (placa 05) para transferencia con pipeta automática en placas de ensayo de 384 pozos.

ADN ESTÁNDAR		ADN MDA		22.0	ng/µl	ADN-MDA tratado con Sss1	28	mg/ml
% de metilación	arriba	abajo	ng necesarios	ng arriba	ng abajo	µl arriba	µl abajo	+ µl H2O -> 10ng/µl
0	0	1.00	1500	0	1500	0	75	90
4	0.04	0.98	1500	60	1440	2.36	72	90.64
10	0.1	0.90	1500	150	1350	5.89	67.5	91.61
17	0.17	0.83	1500	255	1245	10.02	62.25	92.73
25	0.25	0.75	1500	375	1125	14.73	56.25	94.02
34	0.34	0.66	1500	510	990	20.04	49.5	95.46
44	0.44	0.56	1500	660	840	25.93	42	97.07
50	0.5	0.50	1500	750	750	29.46	37.5	98.04
56	0.56	0.44	1500	840	660	33	33	99
66	0.66	0.34	1500	990	510	38.89	25.5	100.61
75	0.75	0.25	1500	1125	375	44.2	18.75	102.05
83	0.83	0.17	1500	1245	255	48.91	12.75	103.34
90	0.9	0.10	1500	1350	150	53.04	7.5	104.46
96	0.96	0.04	1500	1440	60	56.57	3	105.43
100	1	0.00	1500	1500	0	58.93	0	106.07
						441.96	562.5	

Tabla 1a: Preparación de estándares de calibración. ADN-MDA tratado con Sss1 y ADN-MDA no tratado con Sss1 fueron mezclados en las proporciones indicadas.

Verificación del estado de metilación de ADN tratado con bisulfito

Para verificar el estado de metilación del ADN-MDA tratado con Sss1 y ADN-MDA no tratado con Sss1, se llevó a cabo una secuenciación con bisulfito. Ambos tipos de ADN fueron amplificados utilizando los siguientes pares de cebadores que producen fragmentos que cubren las regiones que fueron amplificadas por los ensayos QM. La longitud de los productos de PCR para secuenciación está entre 200 y 500 bp.

Cebador 2064:300P22 Seq ID NO 1: GGAGGGGGTAGAGTTATTAGTT	Cebador 2064:514022 Seq ID NO 2: TATACTTCCTCAAACAACCCTC
Cebador 4063:1431P22 Seq ID NO 3: GTGATATTTGGGGATTGTTATT	Cebador 4063:1868O20 Seq ID NO 4: ACTCCCTCCCTATCTTACA
Cebador 15665:699P21 Seq ID NO 5: TTTGTGGGATTTGTTAGGAT	Cebador 15665:1124O22 Seq ID NO 6: AAACATTTTACCCCTCTAAACC
Cebador 15947:907P24 Seq ID NO 7: TGATTGTGTAGATTATTTTGGTT	Cebador 15947:1360023 Seq ID NO 8: CAAACCTCTCTAAACCTCAATCTC
Cebador 2265:176P22 Seq ID NO 9: TTGGTGATGTTGATTAGAGTTT	Cebador 2265:582O22 Seq ID NO 10: TAAACACCTTACATTTTCCCT
Cebador 15908:782P22 Seq ID NO 11: GGTAGAGGAAGTAGTTGTTTG	Cebador 15908:1228O23 Seq ID NO 12: CTTTTATATTTCTCCAATCTCC
Cebador 0003522:2102Q21 Seq ID NO 13: GTAGGGGAGGGAAGTAGATGT	Cebador 0003522:1738R23 Seq ID NO 14: TCCTCAACTCTACAAACCTAAAA

- 5 La secuenciación con bisulfito fue hecha de acuerdo con protocolos estándar y se llevó a cabo en un secuenciador ABI 3770 (placa de 96 pozos). Las secuencias y las proporciones de metilación esperadas pudieron ser confirmados por los fragmentos usados (datos no mostrados).

9.5. Cuantificación y ajuste de la concentración de ADN con bisulfito

9.5.1. Determinación de la concentración de sulfito en el ADN con bisulfito

- 10 Las concentraciones incrementadas de sulfito residual influyen en el ensayo QM. Por lo tanto, decidimos determinar la concentración de sulfito para cada una de las muestras tratadas con bisulfito de ambos conjuntos de muestras. El sulfito incrementado (mayor de 50 mg/l en la reacción de PCR) afecta la amplificación por PCR del ADN con bisulfito dando como resultado valores de CT más altos en comparación con las concentraciones de sulfito por debajo de este rango. Los valores de CT representan el ciclo de umbral del punto de entrecruzamiento de un PCR en tiempo real.
- 15 El sulfito de sodio fue utilizado para preparar una solución de reserva estándar de sulfito con 1 g/l de SO_3^{2-} en 1x regulador TE. Produjimos soluciones estándar desde 100 mg/l a 1.56 mg/l de sulfito a través de dilución paso a paso y vórtex intensivo entre 2 etapas de dilución para producir la curva estándar.

Tabla 2. Estándares de sulfito para prueba de sulfito.

Estándares de sulfito para prueba de sulfito en 384 MTP				
Número	Adición de estándar en μl	Número de solución	Adición de TE μl	Concentración de SO_3^{2-} [mg/l]
1	100	Reserva	900	100
2	500	1	500	50
3	500	2	500	25
4	500	3	500	12.5

Estándares de sulfito para prueba de sulfito en 384 MTP				
Número	Adición de estándar en µl	Número de solución	Adición de TE µl	Concentración de SO_3^{2-} [mg/l]
5	500	4	500	6.25
6	500	5	500	3.13
7	500	6	500	1.56

Se mezclaron la reserva de muestra y 27 µl de ddH₂O. Se colocaron 10 µl de la muestra prediluida y 10 µl del reactivo de sulfito (Sulfit-Küvettest -Merck, 1.14394.0001) en una placa de 384 pozos y se sometió a vórtex. Después de 2 minutos de tiempo de espera se midió la absorbancia de la solución con un lector Photometer-Plate a 412 nm. La concentración de sulfito fue determinada de acuerdo con la curva de calibración en mg/l de sulfito.

Resultados

La cantidad de sulfito determinada para la solución de reserva de todas las muestras de la población ER + N0 no tratada estuvo entre 0-390 mg/l. La cantidad de sulfito se redujo hasta 0-30 mg/l para el conjunto completo de muestra después del ajuste de la concentración de la muestra a 1 ng/µl, excepto para 1 muestra. Aquí medimos exactamente el valor límite de 100 mg/l.

La concentración de sulfito de la población tratada del conjunto de muestras ER+ N0 TAM se determinó con 0-1195 mg/l de sulfito. La concentración de sulfito para 7 muestras estaba en un rango crítico, pero todavía aceptable (entre 50 y 100 mg/l) y para 2 muestras por encima de 100 mg/l (120 mg/l).

En conclusión, el sulfito residual en el ADN tratado con bisulfito no constituyó un problema mayor.

9.5.2. Cuantificación basada en PCR en tiempo real del ADN con bisulfito

El diseño del ensayo GSTP1-C3 lo hace adecuado para cuantificar ADN de diferentes fuentes, incluyendo muestras frescas/congeladas, muestras remotas tales como plasma o suero, y ADN obtenido de especímenes en archivo tales como material embebido en parafina fijado con formalina. La Tabla 3 provee una revisión de fragmentos y secuencias de oligonucleótidos.

Tabla 3: Información de secuencia de fragmentos C3 y oligos

Gen GSTP1 – Número Genbank para secuencia genómica: AY324387	
Bis-secuencia GSTP1-C3	130 bp
Seq ID No 15: GGAGTGGAGGAAAtTGAGAtttAtTGAGGTTACGTAGTTTGtttAAGGTtAAGttTGGGTGttT GtAATtttTGtttTGTGttAGGtTGttTtttAGGTGTtAGGTGAGtTtTGAGtAttTGtTGTGT GG	
Cebador 2111.C3F	Seq ID NO 16: GGAGTGGAGGAAAtTGAGAt
Cebador 2111.C3R	Seq ID NO 17: CCACACAaCAaaTaCTCAaAaC
Sonda TaqMan	
C3-TAQ2	Seq ID NO 18: FAM-TGGGTGTTTGTAAATTTTGTTTTGTGTTAGGT-TAMRA

La preparación del estándar de cuantificación de ADN se describió en 9.4.1. La concentración de ADN fue ajustada entre 4-0.0312 4 ng/μl y colocada en un formato de 96 pozos para pipeta automática en una placa de de ensayo de PCR de 384 pozos. Cada ADN estándar de calibración fue amplificado hasta 3 x (luz verde en la placa de 96 pozos y en la placa de PCR de 384).

5 Tabla 4: Cantidades de ADN y etapas de dilución seriada para cuantificación de muestras de ADN tratadas con bisulfito.

ng de ADN por PCR	Etapas y dilución de reserva
40.000 ng	1_1
20.000 ng	2_1:2
10.000 ng	3_1:4
5.000 ng	4_1:8
2.500 ng	5_1:16
1.250 ng	6_1:32
0.625 ng	7_1:64

Tabla 5: Placa de 96 pozos con estándar de calibración UNA, placa 05. (Ntc. = Sin control de plantilla)

Placa de 96 pozos con estándar de cuantificación con estándar de cuantificación, placa 05

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	40 ng	Ntc										
B	20 ng	Ntc										
C	10 ng	Ntc										
D	5 ng	Ntc										
E	2.5 ng											
F	1.25 ng											
G	0.625 ng											
H	0.312 ng											

10 La mezcla maestra para la placa de PCR 384 completa fue transferida con pipeta de acuerdo con la Tabla 6, mezclada en un tubo Falcon de 15 ml y distribuida en 8 viales de tapa de rosca de 500 μl para transferencia con pipeta automática con estación de trabajo TECAN.

Tabla 6: Preparación de mezcla maestra para PCR para cuantificación por ensayo C3.

Solución	Concentración	Volumen	Concentración final	Proveedor
Regulador PCR	10x	2 µl	1x	Eurogentec
Mezcla dNTP	25 mmol/l (cada una)	0.2 µl	250 µmol/l (cada una)	Fermentas
MgCl ₂	25 mmol/l	2.4 µl	3 µmol/l	Eurogentec
ADN polimerasa	5 U/µl	0.2µl	1 unidad	Eurogentec
Mezcla de cebador	5 µmol/l (cada una)	1.25 µl	0.313 µmol/l	MWG
Sonda TaqMan	10 µmol/l	0.6 µl	0.3 µmol/l	TibMolBiol
Agua		3.35 µl		Fluka
ADN diluido		10 µl		
Volumen total de reacción		20 µl		

Tabla 7: Condiciones de ciclización por PCR para el ensayo C3 en un instrumento ABI 7700 o 7900.

1	Desnaturalización inicial	95 °C	10 min
2	Desnaturalización	95 °C	15 seg
3	Fusión /extensión	58 °C	60 seg
4	Ciclización	Etapas repetidas (2+3) 45x	

- 5 Las muestras de ADN tratadas con bisulfito de la población no tratada ER+ N0 fueron almacenadas en 7 placas de 96 pozos (placa 01-07) y de la población no tratada ER+ N0 en 8 placas de 96 pozos (placa 01-08). Para cuantificar todas las muestras, se tomaron 3 µl de la muestra y se agregaron 27 µl de agua. Esto da como resultado una dilución 1:10 de la concentración de reserva de ADN. Posteriormente, se diluyeron 3 µl adicionales de la primera dilución (1:10) de nuevo con 27 µl de agua para obtener una dilución 1:100 del ADN de reserva. Este proceso da como resultado 2 placas de dilución (1:10 y 1:100) para cada muestra de ADN en placas de 96 pozos separadas. Las placas de PCR 384 para cuantificación fueron transferidas con pipeta con la estación de trabajo TECAN utilizando siempre 4 placas de 96 pozos (2 x dilución 1:10 y 2 x dilución 1:100). De esta forma cada ejecución de cuantificación por PCR cuantificó 2 de las placas de reserva de ADN en 2 replicados uno siguiente al otro para cada muestra de ADN. El programa de transferencia por pipeta de la estación de trabajo TECAN transfirió primero 10 µl de la Mezcla maestra y después 10 µl del ADN respectivo en el pozo designado. De esta forma los ADN de las placas 01 y 02 (una placa de reserva de ADN) dio como resultado colores naranja y de la placa 03 y 04 en color azul sobre la placa de PCR de 384 pozos. Los pozos de ADN estándar fueron marcados verde claro y las reacciones de PCR de control negativo en verde oscuro sobre la placa final.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01A1	01A2	01A3	01A4	01A5	01A6	01A7	01A8	01A9	01A10	01A11	
B	01B1	01B2	01B3	01B4	01B5	01B6	01B7	01B8	01B9	01B10	01B11	
C	01C1	01C2	01C3	01C4	01C5	01C6	01C7	01C8	01C9	01C10	01C11	
D	01D1	01D2	01D3	01D4	01D5	01D6	01D7	01D8	01D9	01D10	01D11	
E	01E1	01E2	01E3	01E4	01E5	01E6	01E7	01E8	01E9	01E10	01E11	
F	01F1	01F2	01F3	01F4	01F5	01F6	01F7	01F8	01F9	01F10	01F11	
G	01G1	01G2	01G3	01G4	01G5	01G6	01G7	01G8	01G9	01G10	01G11	
H	01H1	01H2	01H3	01H4	01H5	01H6	01H7	01H8	01H9	01H10	01H11	

Tabla 8: Placa de 96 pozos con muestras tratadas con bisulfito (dilución 1:10 y 1:100)

Disposición	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	01A1	01A2	01A3	01A4	01A5	01A6	01A7	01A8	01A9	01A10	01A11	01A12	01A13	01A14	01A15	01A16	01A17	01A18	01A19	01A20	01A21	01A22	01A23	01A24
B	01B1	01B2	01B3	01B4	01B5	01B6	01B7	01B8	01B9	01B10	01B11	01B12	01B13	01B14	01B15	01B16	01B17	01B18	01B19	01B20	01B21	01B22	01B23	01B24
C	01C1	01C2	01C3	01C4	01C5	01C6	01C7	01C8	01C9	01C10	01C11	01C12	01C13	01C14	01C15	01C16	01C17	01C18	01C19	01C20	01C21	01C22	01C23	01C24
D	01D1	01D2	01D3	01D4	01D5	01D6	01D7	01D8	01D9	01D10	01D11	01D12	01D13	01D14	01D15	01D16	01D17	01D18	01D19	01D20	01D21	01D22	01D23	01D24
E	01E1	01E2	01E3	01E4	01E5	01E6	01E7	01E8	01E9	01E10	01E11	01E12	01E13	01E14	01E15	01E16	01E17	01E18	01E19	01E20	01E21	01E22	01E23	01E24
F	01F1	01F2	01F3	01F4	01F5	01F6	01F7	01F8	01F9	01F10	01F11	01F12	01F13	01F14	01F15	01F16	01F17	01F18	01F19	01F20	01F21	01F22	01F23	01F24
G	01G1	01G2	01G3	01G4	01G5	01G6	01G7	01G8	01G9	01G10	01G11	01G12	01G13	01G14	01G15	01G16	01G17	01G18	01G19	01G20	01G21	01G22	01G23	01G24
H	01H1	01H2	01H3	01H4	01H5	01H6	01H7	01H8	01H9	01H10	01H11	01H12	01H13	01H14	01H15	01H16	01H17	01H18	01H19	01H20	01H21	01H22	01H23	01H24
I	01I1	01I2	01I3	01I4	01I5	01I6	01I7	01I8	01I9	01I10	01I11	01I12	01I13	01I14	01I15	01I16	01I17	01I18	01I19	01I20	01I21	01I22	01I23	01I24
J	01J1	01J2	01J3	01J4	01J5	01J6	01J7	01J8	01J9	01J10	01J11	01J12	01J13	01J14	01J15	01J16	01J17	01J18	01J19	01J20	01J21	01J22	01J23	01J24
K	01K1	01K2	01K3	01K4	01K5	01K6	01K7	01K8	01K9	01K10	01K11	01K12	01K13	01K14	01K15	01K16	01K17	01K18	01K19	01K20	01K21	01K22	01K23	01K24
L	01L1	01L2	01L3	01L4	01L5	01L6	01L7	01L8	01L9	01L10	01L11	01L12	01L13	01L14	01L15	01L16	01L17	01L18	01L19	01L20	01L21	01L22	01L23	01L24
M	01M1	01M2	01M3	01M4	01M5	01M6	01M7	01M8	01M9	01M10	01M11	01M12	01M13	01M14	01M15	01M16	01M17	01M18	01M19	01M20	01M21	01M22	01M23	01M24
N	01N1	01N2	01N3	01N4	01N5	01N6	01N7	01N8	01N9	01N10	01N11	01N12	01N13	01N14	01N15	01N16	01N17	01N18	01N19	01N20	01N21	01N22	01N23	01N24
O	01O1	01O2	01O3	01O4	01O5	01O6	01O7	01O8	01O9	01O10	01O11	01O12	01O13	01O14	01O15	01O16	01O17	01O18	01O19	01O20	01O21	01O22	01O23	01O24
P	01P1	01P2	01P3	01P4	01P5	01P6	01P7	01P8	01P9	01P10	01P11	01P12	01P13	01P14	01P15	01P16	01P17	01P18	01P19	01P20	01P21	01P22	01P23	01P24

Tabla 9: Placa de PCR de 384 pozos para cuantificación

5 Resultados de la cuantificación

Tabla 10: Resultados de cuantificación de C3 en muestras congeladas frescas (población ER+ N0 no tratada).

Población ER+ N0 no tratada		
Cantidad de ADN cuantificado con C3, ng	Concentración de ADN, ng/μl	Número de muestras
1807 -9992	40 -222	57
900 -1732	20 -40	112
454 -898	10 -20	181
225 -442	5 -10	90
87.3 -221	2 -5	36
41.5 -81.5	1 -2	10
11.7 -41.0	0.25 -1	10
0	0.0	12

Tabla 11: Resultados de cuantificación de C3 en muestras embebidos en parafina fijadas con formalina (PET) (población ER+ NO TAM tratada).

Población ER+ NO TAM tratada		
Cantidad de ADN cuantificado con ensayo C3, ng	Concentración de ADN, ng/μl	Número de muestras
1813 -24500	40 -545	75
905 -1795	20 -40	52
452 -886	10 -20	74
225 -447	5.0 -10.0	72
90.4 -225	2.0 -5.0	98
45.4 -88.4	1.0 -2.0	69
4.7 -45.2	0.1 -1	96
0.24 -4.5	0.01 -0.1	33
0.0	0.0	20

9.5.3. Ajuste de concentración de ADN

- 5 De acuerdo con la concentración resultante determinada a través de la cuantificación, ajustamos cada muestra hasta una concentración de 1 ng/μl, si es posible. Esta concentración da como resultado hasta 10 ng de ADN en la reacción de ensayo QM. Para el ajuste de las muestras de ADN de una placa de reserva de ADN de 96 pozos se transfirieron con pipeta en una placa de pozo profundo utilizando 390 ng, produciendo una placa de copia de concentración ajustada (96 pozos). La etapa de ajuste también fue hecha con la estación de trabajo TECAN transfiriendo con pipeta entre 4 μl y 32 μl de ADN y
- 10 agregando la cantidad respectiva de agua (hasta 900 μl) para alcanzar 1 ng/μl. La solución de ADN ajustada fue transferida después de esto desde las placas de pozo profundo en varias placas de 96 pozos idénticas para la transferencia con pipeta del ensayo QM final.

15 Tómese nota de que no todas las muestras pudieron ser ajustadas hasta la concentración deseada de 1 ng/μl debido a material limitada. La Tabla 12 y la Tabla 13 muestran la distribución de las cantidades reales de ADN que fue utilizada en los ensayos QM.

Tabla 12: Cantidad final de ADN en el ensayo QM para muestras congeladas frescas (población ER+ NO no tratadas) después del ajuste.

Población ER+ NO no tratada	
Cantidad de ADN (ajustada) en el ensayo QM	Número de muestras
10 ng	357
5 -10 ng	85
2 -5 ng	34
1 -2 ng	10
0 -1 ng	10
0 ng	12

Tabla 13: Cantidad final de ADN en el ensayo QM para muestras embebidas en parafina fijadas con formalina (PET) (población ER+ N0 TAM tratada) después del ajuste.

Población ER+ N0 TAM tratada	
Cantidad de ADN (ajustada) en el ensayo QM	Número de muestras
10 -24 ng	9
10 ng	263
5 -10 ng	72
2 -5 ng	96
1 -2 ng	41
0 -1 ng	88
0 ng	20

9.6. Ejecuciones del ensayo QM

- 5 El ADN tratado con bisulfito y las muestras ajustadas en concentración de la población ER+ N0 no tratada fueron almacenadas en 7 placas de 96 pozos (placas 01-07) y la población ER + N0 no tratada en 8 placas de 96 pozos (placa 01-08). Para medir el conjunto de muestra completo de ambas poblaciones ejecutamos 2 placas de reacción de PCR de 384 pozos para cada ensayo y población QM. Cada placa de ensayo QM contiene las muestras de 3 o 4 placas de 96 pozos (88 pozos usados realmente por placa) y 1 placa de 96 pozos con ADN estándar (14 mezclas del ADN de calibración y agua para la reacción de PCR de control sin plantilla, véase Tabla 15 más adelante). Las repeticiones de las mediciones de las muestras se hicieron repitiendo la ejecución del ensayo QM 3 veces.

- 15 Las placas de PCR de 384 pozos también fueron transferidas con pipeta con la estación de trabajo TECAN. El programa de transferencia con pipeta transfirió inicialmente 10 µl de la mezcla maestra y después 10 µl del ADN respectivo en el pozo designado. Como se describió para la etapa de cuantificación, los ADN de las placa 01 y 02 dieron como resultado colores naranja y de las placas 03 y 04 color azul sobre la placa de PCR de 384 pozos (véase 9.5.2.). Los pozos de ADN estándar fueron señalados en verde claro y las reacciones de PCR de control negativo en verde oscuro sobre la placa final. Los componentes de la mezcla maestra para cada ensayo de QM fueron adaptados de acuerdo con la tabla 14. La mezcla fue transferida con pipeta en un tubo Falcon y distribuida en 8 viales de tapa de rosca de 500 µl para transferencia por pipeta automática con la estación de trabajo TECAN.

- 20 Tabla 14: Componentes de PCR para placa de PCR de 384 pozos (por ejemplo, para el ensayo QM 3522-II).

Número de reacciones:384	384	Factor: 1.1		
Componente	Concentración de reserva	µl/reacción	µl en MM	Concentración final
Regulador de reacción Ampli	10x	2	844.8	1x
Ampli MgCl ₂	25 mmol/l	2	844.8	2.5 µmol/l
dNTPs	25 mmol/l cada una	0.2	84.48	250 µmol/l
Mezcla de cebadores	6.25 mmol/l	2	84.48	625 nmol/l
Sonda cg	4 µmol/l	1	422.4	200 nmol/l

Número de reacciones:384	384	Factor: 1.1		
Componente	Concentración de reserva	μl/reacción	μl en MM	Concentración final
Sonda Tg	4 μmol/l	1	422.4	200 nmol/l
AmpliTaQGold	5U/μl	0.2	84.48	1U
Agua		1.6	675.84	Ad 10
		10	4224	

Tabla 15: Mezclas de ADN estándar de calibración y control sin plantilla (placa 05) (Ntc = Sin control de plantilla)

	Placa de 96 pozos												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0%	66%	Ntc										
B	4%	75%	Ntc										
C	10%	83%	Ntc										
D	17%	90%	Ntc										
E	25%	96%											
F	34%	100%											
G	44%												
H	56%												

5

Todos los ensayos QM fueron ejecutados en un dispositivo en tiempo real ABI TAQMAN 7900HT (software SDS 2.2.) con un volumen de reacción de 20 μl y una emulación 9600 (emulación de ABI TAQMAN 7700). Se usó una disposición de muestra automática para transferir los nombres de muestra y los colorantes detector/informador correctos al software TAQMAN. Las condiciones de ciclización fueron ajustadas manualmente (Tabla 16) y se utilizó ROX como colorante de referencia pasivo.

Tabla 16: Concentraciones optimizadas de MgCl₂ y temperaturas de fusión de los ensayos QM.

Ensayo	Gen	Concentración de MgCl ₂	Temperatura de fusión
3522 I	PITX2	3 mM	62°C
3522 II	PITX2	2.5 mM	60°C
2395	PLAU	2.5 mM	60°C
2064	ERBB2	2.5 mM	62°C
15908 II	TBC1D3	4.5 mM	60°C

Ensayo	Gen	Concentración de MgCl ₂	Temperatura de fusión
15665	ONECUT2	3 mM	60°C
15947	ABCA8/9	3 mM	62°C
2265	TFF1	2.5 mM	60°C

Todas las placas de PCR de 384 pozos fueron reanalizadas mediante el software SDS2.2 utilizando fijación de análisis manual (fijación de línea base con valores de inicio y detención y umbral manual) para producir archivos de resultados para cada ejecución individualmente.

5 Ejemplo 10. Métodos de cuantificación de ADN

a) Determinación por UV de la concentración de física de ADN.

La cuantificación por UV fue llevada a cabo para determinar la cantidad total de ADN presente incluyendo el ADN que no puede ser amplificado utilizando una metodología basada en PCR de tiempo real. La cuantificación por UV se hizo utilizando un espectrofotómetro estándar, por ejemplo, el espectrofotómetro UV mini 1240 UV-VIS (Shimadzu).

10 b) Determinación por PCR en tiempo real del ADN convertido por bisulfito (ensayo HB14) por medio de un instrumento LightCycler (Roche).

La cuantificación por PCR en tiempo real detecta específicamente el ADN convertido por bisulfito. Solamente el ADN que no es afectado por la degradación debido a la fijación con formalina, al embebimiento en parafina y al almacenamiento se cuantifica utilizando una metodología de PCR en tiempo real. La cuantificación se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl que contenían 10 µl de ADN de plantilla o una dilución del mismo, 1U o 3U de FastStart Taq ADN polimerasa (Roche), respectivamente, MgCl₂ 4 mmol/l, 500 nmol/l (cada uno) de cebadores de avance y retroceso (cebador de avance ID NO 19: TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT, cebador de retroceso Seq ID No 20: AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA), 1 regulador de PCR (Roche), dNTP 0.25 mmol/l o 0.5 mmol/l de cada uno (Fermentas), respectivamente, BSA a 0.25 mg/ml (Sigma Aldrich) y 250 nmol/l de cada sonda de detección (Seq ID NO 21: TTGTGAATTTGTGTTTGTATTGTGTGTTG-Fluo y Seq ID NO 22: Red640-TGGTGTTATTTTTTTTATTAGGTTGTGGT-Fosfato). La ciclización se realizó utilizando un sistema de detección LightCycler (Roche), con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 58°C durante 20 segundos, 72°C durante 10 segundos o 72°C durante 70 segundos, detección a 58°C, y ratas de incremento de 20°C/s. La amplificación dio como resultado fragmentos de 133 bp.

25 c) Determinación por PCR en tiempo real del ADN convertido por bisulfito (ensayo C3) por medio de un sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems).

El ensayo C3 detecta específicamente el ADN convertido con bisulfito. La cuantificación por PCR en tiempo real (ensayo C3) fue llevada a cabo en un volumen total de 20 µl que contenía 10 µl de ADN de plantilla o una dilución del mismo, 1 U de HotGoldStar polimerasa (Eurogentec), MgCl₂ 3 mmol/l, 625 nmol/l de cebadores de avance y retroceso (cada uno) (cebador de avance Seq ID NO 23: GGAGTGGAGGAAATTGAGAT, cebador de retroceso Seq ID NO 24: CCACACAACAAATACTCAAAAAC), una referencia pasiva ROX que contiene 1 regulador de reacción (Eurogentec), 0.25 mmol/l de cada uno de dNTP (Fermentas) y 200 nmol/l de sonda de detección (Seq ID NO 25: FAM-TGGGTGTTTGTAAATTTTGTGTTTGTGTTAGGTT-EclipseDQ o BNQ1). La ciclización se hizo utilizando un sistema Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 60 segundos, detección a 72°C, y ratas de incremento de 3°C/s.

35 d) Determinación simultanea con base en PCR en tiempo real de ADN convertido y no convertido por bisulfito (ensayo CFF1) por medio de un sistema 7900HT Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems).

El ensayo CFF1 está localizado en una región sin citosinas y por lo tanto esta región no es afectada por la conversión con bisulfito. De acuerdo con esto, este ensayo permite la determinación tanto del ADN genómico convertido como del convertido con bisulfito simultáneamente. La cuantificación por PCR en tiempo real (ensayo CFF1) fue llevada a cabo en un volumen total de 20 µl que contenían 10 µl de ADN de plantilla, 1 U de HotGoldStar polimerasa (Eurogentec), MgCl₂ 2.5 mmol/l, 625 nmol/l de cebadores de avance y retroceso (cada uno) (cebador de avance Seq ID NO 26: TAAGAGTAATAATGGATGGATGATG, cebador de retroceso Seq ID NO 27: CCTCCCATCTCCCTTCC), una referencia

pasiva de ROX que contiene 1 regulador de reacción (Eurogentec), 0.25 mmol/l de cada uno de dNTP (Fermentas) y 200 nmol/l de sonda de detección (Seq ID NO 28: FAM-ATGGATGAAGAAAGAAAGGATGAGT-EclipseDQ o BHQ1). La ciclización se hizo utilizando un sistema Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 60 segundos, detección a 72°C, y ratas de incremento de 3°C/s.

Ejemplo 11. ADN tratado con bisulfito derivado de tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (PET) en PCR en tiempo real.

Se procesaron varios especímenes de tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (PET) (4 de seno, 12 de vesícula, 12 de amígdalas) de acuerdo con el ejemplo 2. El ADN tratado con bisulfito y purificado de estos especímenes fue reunido y sometido subsecuentemente a PCR en tiempo real por ejemplo 10b (ensayo HB14). La Figura 2 muestra que la entrada de ADN efectivo en el ensayo de cuantificación de PCR en tiempo real (ensayo HB14) está en fuerte concordancia con la cantidad de ADN cuantificado en un amplio rango de cantidades de entrada de ADN. El uso de dNTP cada 250 µmol/l en el ensayo de cuantificación lleva a una amplificación confiable y por lo tanto a una cuantificación de hasta 25 ng de ADN de entrada. Entradas de ADN superiores dan como resultado un relativo descenso del ADN amplificado en comparación con la entrada efectiva lo que indica una inhibición del PCR. El incremento de la concentración de dNTP a 500 µmol/l para cada nucleótido permite una amplificación apropiada y por lo tanto una cuantificación de hasta 100 ng de ADN de entrada.

Un incremento en el tiempo de extensión dentro de cada ciclo de PCR también lleva a una amplificabilidad superior del ADN tratado con bisulfito derivado de muestras archivadas en caso de que se usen altas cantidades de ADN. La Figura 3 muestra la amplificación y cuantificación de hasta 130 ng de ADN de entrada utilizando un tiempo de extensión prolongado de 90 segundos en comparación con un tiempo de extensión de 30 segundos. Para este experimento, se tiene en cuenta que la actividad de la polimerasa ya comienza durante la etapa de fusión a 58°C, el cual por lo tanto es considerado también como tiempo de extensión.

En el caso del uso de niveles más altos de cantidades de entrada de ADN, el rendimiento del PCR en tiempo real también es afectado por la cantidad de polimerasa. La Figura 4 muestra la influencia positiva del incremento de tres veces en la actividad de la polimerasa. Este incremento permite la amplificación y cuantificación apropiada de hasta 200 ng de ADN con bisulfito en una reacción de PCR sencilla.

Ejemplo 12. Procesamiento de secciones de tejido derivadas de biopsias de próstata embebidas en parafina fijadas con formalina (procesamiento de 2x24 muestras)

Se analizaron secciones de 24 especímenes de biopsia de próstata diferentes embebidas en parafina fijadas con formalina (1-3 núcleos de biopsia por bloque de parafina). Se procesaron dos muestras (a y b) de cada espécimen consistiendo cada uno de 5 secciones (10 µm) dando como resultados 48 muestras en total. Las muestras fueron procesadas de acuerdo con el ejemplo 7 seguido por un tratamiento con bisulfito y purificación del ADN por medio del dispositivo Microcon™ como se describió en el ejemplo 8. El rendimiento de ADN después del tratamiento con bisulfito y la purificación subsecuente fue determinado de acuerdo con el ejemplo 10c. La Figura 5 muestra que el rendimiento del ADN purificado con bisulfito y tratado es más de 100 ng para al cada una de las dos muestras por espécimen, excepto para el espécimen 5 y 6. Las muestras del espécimen 6 dieron como resultado más de 500 ng de ADN con bisulfito. El ADN producido de ambas muestras de cada uno de los especímenes muestra una fuerte concordancia. Esto ilustra la alta reproducibilidad y confiabilidad del método de acuerdo con la invención. La mayoría de las muestras comprenden 20%-50% de ADN amplificable (Figura 6) el cual está caracterizado por la relación de cantidades de ADN resultantes de la cuantificación por medio del ejemplo 10c y del valor UV (véase ejemplo 10a).

Ejemplo 13. Amplificación de los amplicones por PCR de diferentes longitudes a partir de tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (PET)

Se procesaron varios especímenes diferentes de tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (PET) (4 muestras de seno, 12 de vesícula, 12 de amígdalas) de acuerdo con el ejemplo 2. El ADN purificado después del tratamiento con bisulfito fue reunido y subsecuentemente sometido a PCR en el cual deberían amplificarse los amplicones de diferentes longitudes (185 bp -711 bp). El PCR fue llevado a cabo en un volumen total de 25 µl que contenían 1 U y 3 U de Hotstar Taq polimerasa (Qiagen), respectivamente, 12.5 pmol de cebadores de avance y retroceso (secuencias de cebadores como se muestran en la Tabla 17a), un regulador para PCR (Qiagen), 0.2 mmol/l de cada uno de dNTP (Fermentas). La ciclización se realizó utilizando un Mastercycler (Eppendorf) con las siguientes condiciones: 15 minutos a 95°C y 40 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante 1:30 minutos. Cada PCR contenía 30 ng de ADN de plantilla. Esta cantidad está basada sobre una cuantificación por PCR en tiempo real anterior según lo ejemplifica el ejemplo 10b (ensayo HB14), y por lo tanto refleja la partición amplificable de la cantidad de ADN total presente físicamente.

Tabla 17a: Tamaños de amplicón y las respectivas secuencias cebadoras.

Tamaño del amplicón [bp]	Cebador de avance (5'→3')	Cebador de retroceso (5'→3')
185	Seq ID No 29: TTTTGTAGTTTAGAAGGAGGTTAG.	Seq ID No 30: ACACAATAAATTCAACCACCAA
210	Seq ID No 31: GGGAGATTTAATTTGGGG	Seq ID No 32: CACCCTCTAATAACCAACCA
235	Seq ID No 33: TTAGGTATAAGTTGGTGGTGG	Seq ID No 34: CCCATAAACAACCCCTAAAA
260	Seq ID No 35: AGGTATAGGATGGGGAATTAGT	Seq ID No 36: AACCCAAACCCCTTATACAAAC
285	Seq ID No 37: GTTTTTGGAGTTAATTGGGAG	Seq ID No 38: CACCCCATCATTACTATTC
310	Seq ID No 39: AGGGTAGAGGGTGTGGT	Seq ID No 40: CCAAACTATAAACCTTCCCA
335	Seq ID No 41: TTTAGTATGGGTGAGAGGAGT	Seq ID No 42: CCTCTTCTCTAAACTACACATTC
360	Seq ID No 43: GGATTATTGTTGGGTATTTGTT	Seq ID No 44: ACACTTCCCTAAAATCTTCAAA
385	Seq ID No 45: GTTGGATTTGTTTAGAGAGAGG	Seq ID No 46: ACATTTAACTCTTTATCCCCAAA
410	Seq ID No 47: TTATTTGATGGGGATAGAGATT	Seq ID No 48: ACAACAACACACCCCTCATAC
435	Seq ID No 49: TGTAATGAAAGAAGGTGTTGAG	Seq ID No 50: TTAATAAACCATCCATAACCC
460	Seq ID No 51: GGATTATAGGAATTAGAATGGGT	Seq ID No 52: TCTTTCCAACCTCAACATCTTACT
485	Seq ID No 53: TGGTGGTATGGATTGGATAA	Seq ID No 54: TCCCCCAAATAACACAATATAC
511	Seq ID No 55: AGAGGAAAGAGTAAGGAATTTTT	Seq ID No 56: CTTATCCCCCACAAAACC
535	Seq ID No 57: GGTGGAGGGAGAGTTAAGG	Seq ID No 58: CCAACAAAACGCCCTCTCC
561	Seq ID No 59: GATTGAGATTATTTTGGGTTTT	Seq ID No 60: ACTTAAACCTTCCCTCTCCAC
586	Seq ID No 61: TTAAGTATTGGATTGGGGTTA	Seq ID No 62: ACCTACCCTCTAACTCTACAAAAA

Tamaño del amplicón [bp]	Cebador de avance (5'→3')	Cebador de retroceso (5'→3')
606	Seq ID No 63: AGTAAATAGTGGGTGAGTTATGAA	Seq ID No 64: AAAAACCTCTAAAACTACTCTCC
636	Seq ID No 65: AAGGTTTTAGGGAAGAGTGT	Seq ID No 66: ACCTTTTCCTATCACAAAAATAA
660	Seq ID No 67: AGGGGGAATTAAATAGAAAGAG	Seq ID No 68: CAATAAAACCATCCCAAATACT
678	Seq ID No 69: TATGGGAGGAGGTTAGTAAGTG	Seq ID No 70: CCCCAAATCCTACATATAAAAA
711	Seq ID No 71: GTATTATGTGGTTTAAGGAGGG	Seq ID No 72: ACTCCAAACAAATTCAACAAC

El ADN de alto peso molecular (HMW) tratado con bisulfito (ADN genómico humano, Promega, Estados Unidos) fue utilizado como control positivo para cada amplicón de PCR.

- 5 La Figura 7 muestra los resultados de las amplificaciones por PCR. El uso de 1 U de Taq polimerasa por reacción dio como resultado la amplificación exitosa de amplicones de hasta 335 bp. Por el contrario, fue posible amplificar exitosamente amplicones de hasta 511 bp por medio de 3 U de Taq polimerasa por reacción.

Ejemplo 14: Remoción de parafina, lisis y extracción de ADN a escala de placa.

- 10 Las muestras de diferentes 18 especímenes de próstata embebidos en parafina fijados con formalina (P1, P2, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, ST-268, ST-269, ST-270, ST-271, ST-272, ST-273, ST-274, ST-275, ST-276) fueron procesadas de acuerdo con el ejemplo 1 a) (etapa de remoción de parafina), ejemplo 1 b) (etapa de lisis) y ejemplo 1 c) (etapa de extracción de ADN). Se procesaron independientemente cuatro muestras por espécimen. Cada muestra consistía de 3 secciones (10 µm). La concentración del ADN amplificable después de la lisis y la extracción del ADN se determinaron de acuerdo con el ejemplo 10d (ensayo CFF1), respectivamente. La relación de concentración de ADN amplificable cuantificado después de la etapa de extracción de ADN y de la concentración de ADN amplificable cuantificado después de la etapa de lisis refleja el rendimiento del procedimiento de extracción. La cantidad total de ADN físicamente presente en el extracto fue determinada por espectrofotometría UV (ejemplo 10a). El contenido de ADN amplificable en el extracto es reflejado por la relación de ADN cuantificado de acuerdo con el ejemplo 10d y de la cantidad total de ADN determinada por medio de espectrofotometría UV (ejemplo 10a). Los resultados se muestran en la Tabla 17b y en las Figuras 8-12.

Tabla 11b. Procesamiento de 10 especímenes de tejido empaquetados en parafina fijos con formalina. Resultados de cuantificación basada en PCN en tiempo real (ejemplo 10d) y basados en espectrofotometría UV (ejemplo 10a). Todos los datos son promedio de 2-40 muestras procesadas independientemente por espécimen incluyendo la desviación estándar										
Muestra	ADN total en lisado - ensayo CF-1 [ng]	Desviación estándar	ADN total en extracto - ensayo CF-1 [ng]	Desviación estándar	Rendimiento [%]	Desviación estándar	ADN total en extracto - ensayo CF-1 [ng]	Desviación estándar	Amplificabilidad [%]	Desviación estándar
P1	769.57	212.86	465.42	62.10	67.30	54.95	3490	1056.98	5.49	0.58
P2	4108.87	3310.73	2657.73	408.28	185.17	164.36	23680	8277.25	12.02	2.59
P4	1735.07	378.86	1151.97	25.15	58.68	64.95	13660	6032.29	6.76	1.75
P6	1235.85	331.47	516.31	134.47	61.92	36.32	13560	3131.49	4.83	1.30
P6	1389.80	438.28	551.95	71.40	73.78	22.61	13240	4313.88	5.46	1.45
P7	3245.55	2235.37	2126.81	53.40	67.88	46.33	21080	1832.68	10.14	0.78
P8	2620.05	1791.35	1557.70	144.38	59.66	65.33	21765	367.83	7.76	0.75
P9	1808.95	549.44	1032.30	688.75	69.39	65.33	21240	10361.27	5.34	4.39
P10	1037.65	326.70	555.47	62.02	71.48	17.23	14865	18187.6	4.76	0.30
ST-268	18906.18	1397.40	4554.72	255.32	23.10	1.54	45195	4658.57	9.67	0.32
ST-269	22888.11	201.42	5756.64	415.22	16.92	1.39	55545	4737.77	6.73	0.46
ST-270	4197.214	14525.27	10516.21	525.41	27.36	10.65	45495	6035.72	22.82	1.56
ST-271	38288.56	21812.737	7542.60	675.43	25.91	14.93	37185	4039.22	21.28	3.53
ST-272	30026.72	3536.77	6578.05	1035.90	23.29	5.43	43725	94397.4	13.37	0.36
ST-273	69900.08	35052.28	15576.32	2554.88	26.92	11.00	73470	6251.05	22.60	3.40
ST-274	19929.55	1098.59	2758.55	754.36	13.797	5.27	50085	9252.94	5.52	1.11
ST-275	46583.52	25018.63	14482.29	1766.26	38.00	17.43	52640	22705.76	25.80	10.11
ST-276	21562.06	701.41	4755.23	450.75	22.257	2.35	43200	4213.47	11.98	1.40

Ejemplo 15. Remoción de parafina, lisis y extracción de ADN en escala de tubo.

Se procesaron secciones de 17 diferentes especímenes de próstata embebidos en parafina fijados con formalina (P1, P2, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, ST-268, ST-269, ST-270, ST-271, ST-272, ST-274, ST-275, ST-276) de acuerdo con el ejemplo 1a) (etapa de remoción de parafina), ejemplo 1 b) (etapa de lisis) y ejemplo 2 c) (extracción de ADN con kit QIAGEN DNeasy Tissue). Cada muestra consistía de 3 secciones (10 µm). La concentración del ADN amplificable después de la lisis y de la extracción del ADN fue determinada de acuerdo con el ejemplo 10d (ensayo CFF1), respectivamente. La relación de la concentración de ADN amplificable cuantificado después de la etapa de extracción y de la concentración de ADN amplificable cuantificado después de la etapa de lisis refleja el rendimiento del procedimiento de extracción. La cantidad total de ADN físicamente presente en el extracto fue determinada por espectrofotometría UV (ejemplo 10a). El contenido del ADN amplificable en los extractos es reflejado por la relación del ADN cuantificado de acuerdo con el ejemplo 10d y de la cantidad de ADN total determinada por medio de espectrofotometría UV (ejemplo 10a). Los resultados se muestran en la Tabla 18 y las Figuras 13-17.

Tabla 18: Procesamiento de 17 especímenes de tejido embebidos en parafina fijados con formalina. Resultados de cuantificación basada en PCR en tiempo real (ejemplo 10d) y cuantificación basada en espectrofotometría UV (ejemplo 10a).

Muestra	ADN total en lisado- ensayo CFF1 [ng]	ADN total en extracto – ensayo CFF1 [ng]	Rendimiento [%]	ADN total en extracto cuantificación UV [ng]	en – por	Contenido de ADN amplificable [%]
P1	179.73	77.29	43.00	4704		1.64
P2	4884.12	1961.33	40.16	9240		21.23
P4	2036.82	732.73	35.97	11460		6.39
P5	903.14	400.61	44.36	5520		7.26
P6	1750.69	491.23	28.06	6480		7.58
P7	3863.33	1176.92	30.46	12240		9.62
P8	957.18	542.60	56.69	9900		5.48
P9	715.74	561.57	78.46	6540		8.59
P10	946.06	417.50	44.13	9240		4.52
ST-268	4383.18	1639.30	37.40	24720		6.63
ST-269	7497.87	1593.21	21.25	36180		4.40
ST-270	9151.79	1081.93	11.82	13260		8.16
ST-271	5954.34	641.61	10.78	5148		12.46
ST-272	9897.51	3335.76	33.70	36960		9.03
ST-274	8230.91	1894.26	23.01	39180		4.83
ST-275	41461.29	11122.82	26.83	77400		14.37
ST-276	7272.27	2139.90	29.43	33600		6.37

Ejemplo 16. Procesamiento de acuerdo con el ejemplo 2 de 24 muestras embebidas en parafina fijadas con formalina derivadas de tejido de próstata o seno, escala tubo.

Se procesaron 24 especímenes de tejido embebido en parafina fijado con formalina (próstata: PET P1 -P10 y ST-268 -ST-276 y seno: PET B2 -B10) de acuerdo con el ejemplo 2. Se procesaron dos muestras por espécimen dando como resultado 48 muestras en total. Cada muestra consistía de 3 secciones (cada una de 10 µm) provistas en tubos de 1.5 ml. El ADN después del tratamiento con bisulfito y después de la purificación fue caracterizado de acuerdo con el ejemplo 10d (ensayo CFF1; determinación de la cantidad de ADN convertido por tratamiento con bisulfito y de la cantidad de ADN no convertido por el tratamiento con bisulfito y por lo tanto representa el ADN genómico) y de acuerdo con el ejemplo 10c (ensayo C3; determinación solamente del ADN convertido por el tratamiento con bisulfito). Los resultados de estas cuantificaciones se muestran en la Tabla 19, en la Figura 18 y en la Figura 19, respectivamente.

Tabla 19: Procesamiento de 24 especímenes de tejido embebidos en parafina fijados con formalina. Resultados de la cuantificación en los ensayos C3 y CFF1 (ejemplo 10c y 10d, respectivamente) y la relación entre ellos. Todos los datos son promedios de dos muestras procesadas independientemente por espécimen (ejemplo 16).

Muestra	Rendimiento de ADN – ensayo CFF1	Desviación estándar	Rendimiento de ADN – ensayo C3	Desviación estándar
PET P1	31.51	5.35	26.85	3.73
PET P2	307.22	42.33	143.93	9.34
PET P4	167.69	23.03	103.21	2.18
PET P5	176.06	33.61	86.27	17.43
PET P6	598.59	37.35	358.71	28.01
PET P7	137.10	1.56	74.49	1.40
PET P8	511.88	79.05	219.63	25.52
PET P9	189.48	42.02	121.15	36.88
PET P10	158.89	4.36	83.30	8.25
PET B2	3.57	0.76	1.86	0.58
PET B5	1.88	0.03	0.83	0.67
PET B6	34.20	1.56	10.17	2.18
PET B7	48.11	15.50	21.81	5.51
PET B9	9.34	0.05	2.51	0.40
PET B10	2.57	2.18	0.56	0.61
ST-268	301.94	83.41	171.65	26.14
ST-269	304.14	151.26	173.86	93.37
ST-270	106.51	25.52	0.29	0.21
ST-271	125.88	16.18	1.23	0.03

Muestra	Rendimiento de ADN – ensayo CFF1	Desviación estándar	Rendimiento de ADN – ensayo C3	Desviación estándar
ST-272	1422.66	1959.30	597.51	841.84
ST-273	205.11	6.22	3.83	0.75
ST-274	521.57	3.11	271.13	13.07
ST-275	264.96	1.24	169.23	16.50
ST-276	547.98	59.13	289.39	38.90

Ejemplo 17. Procesamiento de 24 muestras embebidas en parafina fijadas con formalina derivadas de tejido de próstata o seno, a escala de placa.

Se procesaron 24 especímenes de tejido embebido en parafina fijado con formalina (próstata: PET P1 -P10 y ST-268 -ST-276] y seno: PET B2 -B10) de acuerdo con el ejemplo 1. Se procesaron cuatro muestras por espécimen dando como resultado 96 muestras en total. Cada muestra consistía de 3 secciones (10 µm cada una) provistas en tubos de 1.5 ml. El ADN resultante tratado con bisulfito y purificado fue caracterizado de acuerdo con el ejemplo 10d (ensayo CFF1; determinación de la cantidad de ADN convertido por tratamiento con bisulfito y la cantidad de ADN no convertida por el tratamiento con bisulfito y por lo tanto representa el ADN genómico) y de acuerdo con el ejemplo 10c (ensayo C3; determinación de solamente el ADN convertido por el tratamiento con bisulfito).

Resultados de estas cuantificaciones se muestran en la Tabla 20, Figura 20 y Figura 21, respectivamente.

Tabla 20: Procesamiento de 24 especímenes de tejido embebido en parafina fijado con formalina. Los resultados de la cuantificación con los ensayos C3 y CFF1 (ejemplo 10c y 10d, respectivamente) y la relación entre ellos. Todos los datos son promedio de cuatro muestras procesadas independientemente por espécimen

Muestra	Rendimiento de ADN – ensayo CFF1	Desviación estándar	Rendimiento de ADN – ensayo C3	Desviación estándar
PET P1	71.03	3.65	85.42	7.50
PET P2	920.67	203.57	556.83	129.87
PET P4	311.33	41.97	173.67	36.73
PET P5	273.67	46.65	194.33	30.60
PET P6	263.33	31.26	181.50	17.29
PET P7	736.67	116.22	398.50	60.04
PET P8	411.00	29.14	225.83	23.96
PET P9	319.83	98.97	256.75	70.86
PET P10	230.00	44.73	139.50	15.17
PET B2	75.53	40.85	61.69	39.48
PET B5	2.72	1.99	2.19	1.87

Muestra	Rendimiento de ADN – ensayo CFF1	Desviación estándar	Rendimiento de ADN – ensayo C3	Desviación estándar
PET B6	7.79	5.25	9.07	12.10
PET B7	10.27	6.96	9.40	5.90
PET B9	6.47	2.25	3.02	3.07
PET B10	42.92	24.85	15.53	9.48
ST-268	948.00	206.25	585.83	175.80
ST-26.9	96.9.00	135.27	515.83	92.15
ST-270	2973.33	363.52	1075.83	134.40
ST-271	2983.33	441.33	1054.17	207.50
ST-272	1641.67	307.50	980.83	227.73
ST-273	5263.33	848.62	2598.33	357.87
ST-274	479.67	47.60	259.58	70.33
ST-275	3856.67	896.37	1794.17	470.42
ST-276	871.67	220.93	320.08	94.72

Ejemplo 18. Procesamiento de muestras derivadas de 150 especímenes de cáncer de seno embebidos en parafina fijados con formalina

5 Se procesaron muestras de 150 muestras de cáncer de seno embebidos en parafina fijados con formalina (E001-E150) de acuerdo con el ejemplo 9. Cada muestra consistió de 3 secciones (10 µm cada una) las cuales fueron provistas en tubos de 1.5 ml. El rendimiento del ADN genómico después de la extracción fue determinado usando espectrofotometría UV (ejemplo 10a) y el ensayo CFF1 (ejemplo 10d). El rendimiento de ADN convertido por bisulfito después del tratamiento con bisulfito y la purificación subsecuente fue determinado utilizando el ensayo C3 (ejemplo 10c).

10 Tabla 21: Rendimientos de ADN convertido con bisulfito y no convertido con bisulfito derivado de especímenes de cáncer de seno embebidos en parafina fijados con formalina. El ADN fue cuantificado de acuerdo con el Ejemplo 10d (ensayo CFF1), de acuerdo con el ejemplo 10c (ensayo C3) y de acuerdo con el ejemplo 10a (espectrofotometría UV).

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 µl de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E001	13545.0	1812.0	1760.6
E002	6125.0	688.6	215.8
E003	5760.0	348.9	140.0
E004	20160.0	338.6	174.5

ES 2 521 115 T3

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 ul de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 ul de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 µl de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E005	6852.6	1017.9	514.2
E006	26460.0	11173.0	1541.6
E007	16905.0	8213.1	2410.4
E008	16012.5	9725.2	4452.0
E009	15866.7	8657.4	1749.4
E010	27195.0	14169.6	200.6
E011	7680.0	4115.0	1009.2
E012	16380.0	2102.2	1032.4
E013	1866.7	1962.8	1374.3
E014	15225.0	2430.8	1028.0
E015	13835.3	1779.8	857.2
E016	17684.2	1866.5	894.2
E017	10350.0	1240.1	240.1
E018	8085.0	1326.0	873.7
E019	16357.9	3256.2	1341.4
E020	21123.5	3401.2	1785.1
E021	10278.9	1395.2	1201.2
E022	20432.4	4540.2	2970.8
E023	22976.5	2506.7	1651.6
E024	5250.0	1691.7	1027.4
E025	24465.0	4408.7	2358.7
E026	17170.6	8749.5	3195.7
E027	17616.7	2819.4	1327.1
E028	4817.6	11498.9	4516.8
E029	30333.3	4922.3	2185.2
E030	16305.9	16442.2	6160.9

ES 2 521 115 T3

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 ul de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 ul de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 µl de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E031	7455.0	3703.1	1278.7
E032	10005.9	4757.4	2073.8
E033	9173.7	4922.1	1628.7
E034	8715.0	4010.9	1686.4
E035	10994.1	6841.9	1496.6
E036	10500.0	4358.7	2828.2
E037	20650.0	5711.1	4439.0
E038	30333.3	3311.1	2801.3
E039	9240.0	2956.5	2325.2
E040	6930.0	2261.9	981.5
E041	8505.0	446.5	387.1
E042	4550.0	789.6	669.6
E043	3315.8	779.7	425.8
E044	4095.0	845.1	489.5
E045	4089.5	795.8	531.4
E046	6052.9	107.2	164.8
E047	11200.0	200.1	113.4
E048	5682.4	149.7	248.8
E049	3990.0	76.3	35.9
E050	4531.6	235.4	85.7
E051	13042.1	6107.0	2887.2
E052	8295.0	3162.3	1063.5
E053	11235.0	4412.9	3815.7
E054	8866.7	3196.3	2329.3
E055	7245.0	2458.7	1452.5
E056	14595.0	3257.7	5484.6

ES 2 521 115 T3

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 ul de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 ul de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 µl de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E057	11970.0	3005.9	2533.5
E058	17047.1	3892.1	2368.3
E059	13094.1	6094.4	4047.3
E060	35870.3	2849.6	3108.8
E061	22750.0	715.8	440.5
E062	13920.0	840.0	340.1
E063	14452.9	3292.1	3313.1
E064	4095.0	761.4	510.1
E065	3705.9	2855.2	3153.8
E066	2625.0	244.7	11.2
E067	3383.3	417.2	362.6
E068	3088.2	718.6	321.9
E069	2216.7	118.0	17.3
E070	11520.0	214.8	71.5
E071	10623.5	1463.9	1361.2
E072	26950.0	2064.7	2121.6
E073	12723.5	2277.5	2169.1
E074	2333.3	3841.5	3249.4
E075	11488.2	1545.8	1235.2
E076	31360.0	14426.1	5108.5
E077	18060.0	8039.9	3387.0
E078	23415.0	14134.2	6859.3
E079	14000.0	10264.3	5371.6
E080	21735.0	9167.2	2812.9
E081	6883.3	31543.5	25884.0
E082	23730.0	12237.9	7183.1

ES 2 521 115 T3

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 ul de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 ul de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 µl de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E083	17541.2	7782.0	4135.6
E084	30836.8	19137.9	12754.5
E085	21466.7	13501.5	5589.2
E086	16026.3	3724.7	2177.5
E087	9173.7	1701.5	1091.9
E088	27176.5	3309.1	1072.5
E089	19950.0	3831.9	1739.0
E090	23566.7	3985.7	3139.2
E091	2594.1	5222.6	5906.1
E092	19600.0	2055.6	1131.1
E093	10500.0	2585.4	1223.6
E094	15093.8	4220.0	300.6
E095	9555.0	1630.1	840.0
E096	14700.0	2675.9	1076.2
E097	21525.0	4163.3	1840.9
E098	13416.7	4691.0	883.6
E099	13230.0	2024.5	1765.6
E100	12250.0	1903.4	852.3
E101	4725.0	4695.8	1007.1
E102	14910.0	6633.8	2066.2
E103	19841.4	10410.8	3738.5
E104	22283.3	10963.4	4059.1
E105	31994.1	15319.9	3397.5
E106	6930.0	968.2	511.4
E107	5526.3	616.5	261.6
E108	5968.4	875.8	175.0

ES 2 521 115 T3

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 ul de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 ul de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 µl de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E109	5906.3	753.1	234.5
E110	4830.0	782.8	594.2
E111	2625.0	4344.9	2081.4
E112	14880.0	4266.1	2366.6
E113	6090.0	2727.2	1636.4
E114	10710.0	4280.6	2824.6
E115	7665.0	3166.8	3354.9
E116	6176.5	342.0	64.5
E117	2216.7	385.3	146.0
E118	50770.6	486.5	104.3
E119	4935.0	439.2	406.8
E120	10266.7	929.9	516.2
E121	8925.0	2893.5	259.9
E122	13533.3	7499.9	3242.3
E123	49411.8	16014.1	8003.4
E124	19010.5	6660.4	4336.0
E125	10383.3	2631.8	1100.9
E126	23231.3	8386.5	3450.2
E127	8820.0	2078.4	2172.0
E128	2730.0	676.6	166.4
E129	32160.0	1465.8	606.5
E130	4083.3	Indeterminado	1068.5
E131	3045.0	396.5	181.0
E132	3780.0	507.3	515.9
E133	7669.6	526.0	570.5
E134	6650.0	896.0	561.3

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 μ l de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 μ l de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 μ l de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E135	6052.9	903.1	314.5
E136	22260.0	6770.9	2886.7
E137	19600.0	4402.2	1359.9
E138	8400.0	10852.0	4979.4
E139	19635.0	6613.7	4495.2
E140	27650.0	9160.8	6587.8
E141	26194.7	8656.0	4678.9
E142	4550.0	10660.7	3116.2
E143	26600.0	9404.2	2983.5
E144	33705.0	12358.5	4073.3
E145	10252.9	5114.6	2774.1
E146	31850.0	19365.9	5729.1
E147	24780.0	11532.6	6048.3
E148	21000.0	11540.2	4106.7
E149	2400.0	13681.8	6231.2
E150	29750.0	18923.4	3814.9

Ejemplo 19. Procesamiento de células microdisseccionadas por captura de láser

Las células microdisseccionadas por captura de láser de un espécimen de cáncer de seno embebido en parafina fijado con formalina fueron tratadas con bisulfato

5 a) Microdissección.

La sección de 10 μ m que fue montada sobre una lámina de microscópico fue sometida a un procedimiento de tinción con azul de metileno y subsecuentemente microdisseccionada por captura de láser. La microdissección fue llevada a cabo utilizando un instrumento Microbeam (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Alemania). Dos áreas de la sección (comprendiendo cada una aproximadamente 0.25 mm²) fueron microdisseccionadas y recolectadas en dos tubos de 200 μ l con tapas adhesivas (Tapas adhesivas 200, P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Alemania). Debido a la Microdissección no es necesaria la remoción de parafina.

b) Etapa de lisis

El material de la muestra se adhirió a las tapas adhesivas después de la microdissección y fue sometido a una etapa de lisis. Por lo tanto se agregaron cuidadosamente a las tapas 20 μ l de regulador de lisis (Tris-HCl 50 mmol/l, pH 8.0, EDTA 1 mmol/l, Tween 0.5% v/v, 10 ng/ μ l de poli-dA, 3 mg/ml de proteinasa K). Se llevaron a cabo cuatro reacciones de control: dos controles negativos con tubos que no contenían muestra pero sí regulador de lisis y dos controles positivos con tubos que

5 contenían regulador de lisis y 500 pg de ADN genómico humano (Promega, Estados Unidos de América). Los tubos fueron cerrados cuidadosamente evitando pérdida de la gota de la tapa. Los tubos fueron incubados durante 12 horas a 60° C en una máquina Mastercycler PCR (Eppendorf, Alemania). Puesto que el material de la muestra estaba localizado en las tapas la cubierta del Mastercycler también fue colocada a 60°C. Después de la incubación las muestras fueron centrifugadas en una centrífuga de mesa durante 30 segundos para transferir la muestra lisada al fondo del tubo.

c) Tratamiento con bisulfito

10 Después de esto, las muestras fueron sometidas a tratamiento con bisulfito como sigue. Para disolver cualquier ADN que podría permanecer en la tapa, se agregaron 19 µl de solución de bisulfito (470.8 g/l de disulfito de sodio [Merck] y 112.8 g/l de sulfito de sodio [Fluka]) a la tapa, los tubos fueron cerrados cuidadosamente e incubados durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas ahora durante 30 segundos utilizando una centrífuga de mesa. La última etapa (adición de solución de bisulfito a la tapa, incubación y centrifugación) fue repetida una vez. Se agregaron 6 µl de solución de DME a cada muestra, comprendiendo la solución de DME un depurador de radicales (125.3 g/l de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico) en DME (dietilen-glicoldimetiléter Merck]). Las muestras fueron incubadas bajo las siguientes condiciones: 5 minutos a 99°C, 22 minutos a 60°C, 3 minutos a 99°C, 97 minutos a 60°C, 3 minutos a 99°C y 177 minutos a 60°C. La incubación se llevó a cabo utilizando un Mastercycler (Eppendorf).

d) Purificación de ADN

20 La purificación de ADN después del tratamiento con bisulfito fue llevada a cabo por medio de columnas Zymo-Spin IC (Zymo Research, Estados Unidos de América). Se agregaron 166 µl de regulador AVL (Qiagen, Alemania) a las columnas Zymo-Spin IC. La mezcla de reacción con bisulfito (64 µl en total por muestra) fue agregada a las columnas. Las puntas de pipeta utilizadas fueron colocadas en los tubos de reacción de bisulfito respectivos para uso posterior con el fin de evitar la pérdida de ADN debido a las gotas que se adhieren en las puntas. Se agregaron 90 µl de regulador AVL a los tubos de reacción de bisulfito y después se transfirieron a las columnas Zymo-Spin IC utilizando las puntas de pipeta respectivas que habían sido colocadas previamente en los tubos respectivos. La mezcla de reacción de bisulfito y el regulador AVL fueron colocados en las columnas movilizándolo con pipeta hacia arriba y hacia abajo varias veces y luego se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 250 µl de etanol a las columnas y se mezclaron con la pipeta. De nuevo, la misma pipeta fue utilizada para mezclar con el fin de evitar pérdidas de ADN debidas a las gotas que se adhieren a las puntas como ya se explicó más arriba. Las columnas fueron centrifugadas durante 1 minuto a 16,000 x g. Las columnas fueron transferidas a un nuevo tubo de recolección de 2 ml y se agregaron 500 µl de regulador de desulfonación (NaOH 0.2 mol/l, etanol al 90% v/v) a cada columna. Las columnas fueron centrifugadas durante 1 minuto a 16,000 x g. Las columnas fueron transferidas a un nuevo tubo de recolección de 2 ml y se agregaron 500 µl de regulador AW1 (Qiagen, Alemania) a cada columna. Las columnas fueron centrifugadas durante 1 minuto a 16,000 x g. Las columnas fueron transferidas a un nuevo tubo de recolección de 2 ml y se agregaron 500 µl de regulador AW2 (Qiagen, Alemania) a cada columna. Las columnas fueron centrifugadas durante 3 minutos a 16,000 x g. Las columnas fueron colocadas en un tubo de recolección de 1.5 ml para la elución del ADN. El ADN fue eluido agregando 12.5 µl de agua (precalentada a 50°C) a las columnas, se incubaron durante 1 minuto y se centrifugaron durante 1 minuto a 6,000 x g. La etapa de elución fue repetida dando como resultado aproximadamente 20 µl de eluido total (5 µl de pérdida debido a la geometría de las columnas y a la evaporación).

e) Análisis subsecuente

40 Después de esto, el ADN estaba listo para las aplicaciones de PCR subsecuentes, por ejemplo la cuantificación por PCR en tiempo real, PCR y secuenciación, etc. Las seis reacciones procesadas (dos muestras, dos controles negativos y dos controles positivos) fueron sometidas a cuantificación por PCR en tiempo real con HB14 utilizando el sistema LightCycler (Roche, Alemania) de acuerdo con el ejemplo 10b. Cada cuantificación fue llevada a cabo en duplicados (entrada de 10 µl en la reacción de PCR cada uno). La Tabla 22 muestra los resultados de esta cuantificación. El rendimiento de ADN está en el rango de 66% a 80% (con base en los controles positivos con entradas de ADN conocidas). Las muestras dieron como resultado ADN de 175 pg y 73 pg, respectivamente (Tabla 22).

Tabla 22: Rendimiento de ADN convertido con bisulfito derivado de células microdisseccionadas con captura de láser y controles.

Muestra		ADN en 1. PCR (entrada 10 µl) [pg]	ADN en 2. PCR (entrada 10 µl) [pg]	ADN total en rendimiento [%] ambos PCR [pg]
control positivo (ADN de 500 pg)	1	192	206	398 79.6
control positivo (ADN de 500 pg)	2	234	96.5	330.5 66.1
control negativo (sin ADN)	1	0	0	0 x
control negativo (sin ADN)	0	0	0	0 x
Muestra 1		96.1	78.6	174.7 x
Muestra 2		7.5	65.1	72.6 x

Listado de secuenciación

5 <110> Epigenomics AG

Ballhause, Matthias

Berlin, Kurt

Dietrich, Dimo

Kluth, Antje

10 Schuster, Matthias

Wagner, Ute

Wasserkort, Reinhold

Ziebarth, Heike

<120> MÉTODO PARA PROVEER FRAGMENTOS DE ADN DERIVADOS DE UNA MUESTRA ARCHIVADA

15 <130> 47675-136

<140>

<141> 2005-09-30

<150> US 60/614,697

<151> 2004-09-30

<160> 72
 <210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Homo Sapiens
 <400> 1
 ggagggggta gagttattag tt 22
 <210> 2
 <211> 22
 10 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 2
 tatacttcct caaacaaccc tc 22
 <210> 3
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 3
 gtgatatttg gggattgtta tt 22
 20 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 4
 25 actccctccc ctatcttaca 20
 -<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 30 <400> 5
 ttgttgga ttgttagga t 21

	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
5	<400> 6	
	aaacatttta cccctctaaa cc	22
	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
10	<213> Homo Sapiens	
	<400> 7	
	tgattgtgta gattattttt gggt	24
	<210> 8	
	<211> 23	
15	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 8	
	caaactctct aaacctcaat ctc	23
	<210> 9	
20	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 9	
	ttggtgatgt tgattagagt tt	22
25	<210> 10	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 10	
30	taaaacacct tacattttcc ct	22
	<210> 11	

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 11
 5 ggtagaggaa gtagttggtt tg 22
 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 10 <400> 12
 cttttatatt tctccaatc tcc 23
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Homo Sapiens
 <400> 13
 gtaggggagg gaagtagatg t 21
 <210> 14
 <211> 23
 20 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 14
 tcctcaactc tacaaaccta aaa 23
 <210> 15
 25 <211> 130
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> GSTP1-C3_bis-sequence_example_9.5.1.
 30 <400> 15

ES 2 521 115 T3

```

ggagtggagg aaattgagat ttattgaggt tacgtagttt gtttaagggt aagtttgggt      60
gtttgtaatt ttgttttgt gttagggtgt ttttaggtg ttaggtgagt tttagagtatt    120
tgttgtgtgg                                     . . . . .                130

```

<210> 16

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Homo Sapiens

<400> 16

ggagtggagg aaattgagat 20

<210> 17

<211> 22

10 <212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 17

ccacacaaca aatactcaaa ac 22

<210> 18

15 <211> 33

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 18

tgggtgttg taattttgt ttgtgttag gtt 33

20 <210> 19

<211> 25

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 19

25 tggatgatga ggaggttag taagt 25

<210> 20

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 20
 aaccaataaa acctactcct cccttaa 27
 <210> 21
 <211> 30
 5 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 21
 ttgtgaattt gtgtttgta ttgtgtgtg 30
 <210> 22
 10 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 22
 tgggtggtat ttttttatt aggtgtggt 30
 15 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 23
 20 ggagtggagg aaattgagat 20
 <210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 25 <400> 24
 ccacacaaca aataactcaaa ac 22
 <210> 25
 <211> 33
 <212> ADN
 30 <213> Homo Sapiens
 <400> 25

	tgggtgttg taattttgt ttgtgtag gtt	33
	<210> 26	
	<211> 25	
	<212> ADN	
5	<213> Homo Sapiens	
	<400> 26	
	taagagtaat aatggatgga tgatg	25
	<210> 27	
	<211> 17	
10	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 27	
	cctcccatct cccttc 17	
	<210> 28	
15	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 28	
	atggatgaag aaagaaagga tgagt	25
20	<210> 29	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 29	
25	ttttgtagt ttagaaggag gtag	25
	<210> 30	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
30	<400> 30	
	acacaataaa ttcaaccacc aa	22

	<210> 31	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
5	<400> 31	
	gggagattta atttgggg	18
	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> ADN	
10	<213> Homo Sapiens	
	<400> 32	
	caccctctaa taaccaacca	20
	<210> 33	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 33	
	ttaggtataa gttggtggtg g	21
	<210> 34	
20	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 34	
	cccataaaca acccctaaaa	20
25	<210> 35	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 35	
30	aggtatagga tggggaatta gt	22
	<210> 36	

	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 36	
5	aacccaaacc cttatacaaa c	21
	<210> 37	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
10	<400> 37	
	gttttggag ttaattggga g	21
	<210> 38	
	<211> 20	
	<212> ADN	
15	<213> Homo Sapiens	
	<400> 38	
	caccccatc attactattc	20
	<210> 39	
	<211> 18	
20	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 39	
	agggttagagg gtgttgg	18
	<210> 40	
25	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 40	
	ccaaaactat aaaccttccc a	21
30	<210> 41	
	<211> 22	

	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 41	
	ttagtatgg gttgagagga gt	22
5	<210> 42	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 42	
10	cctcttcct aaaactacac attc	24
	<210> 43	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
15	<400> 43	
	ggattattgt tgggtatttg tt	22
	<210> 44	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Homo Sapiens	
	<400> 44	
	acacttcct aaaatcttca aa	22
	<210> 45	
	<211> 22	
25	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 45	
	gttgatttg ttagagaga gg	22
	<210> 46	
30	<211> 23	
	<212> ADN	

<213> Homo Sapiens
 <400> 46
 acatttaact ctttatccca aaa 23
 <210> 47
 5 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 47
 ttatttgatg gggatagaga tt 22
 10 <210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 48
 15 acaaacaaca caccctcata c 21
 <210> 49
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 20 <400> 49
 tgtaatgaaa gaagggttg ag 22
 <210> 50
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Homo Sapiens
 <400> 50
 ttaactaaac catccataac cc 22
 <210> 51
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

	<400> 51	
	ggattatagg aattagaatg ggt	23
	<210> 52	
	<211> 23	
5	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 52	
	tctttccaac tcaacatctt act	23
	<210> 53	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 53	
	tggtggtatg gattggataa	20
15	<210> 54	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 54	
20	tcccccaaat aacacaatat ac	22
	<210> 55	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
25	<400> 55	
	agaggaaaga gtaaggaatt ttt	23
	<210> 56	
	<211> 18	
	<212> ADN	
30	<213> Homo Sapiens	
	<400> 56	

	cttatccccc acaaaacc	18
	<210> 57	
	<211> 19	
	<212> ADN	
5	<213> Homo Sapiens	
	<400> 57	
	ggtggaggga gagttaagg	19
	<210> 58	
	<211> 19	
10	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 58	
	ccaacaaaac gccctctcc	19
	<210> 59	
15	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 59	
	gattgagatt atttgggtt tt	22
20	<210> 60	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
	<400> 60	
25	acttaaacct tccctctcca c	21
	<210> 61	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Homo Sapiens	
30	<400> 61	
	ttaagtattg gatttgggt ta	22

<210> 62
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 62
 acctaccctc taactctaca aaaa 24
 <210> 63
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Homo Sapiens
 <400> 63
 agtaaatagt gggtgagtta tgaa 24
 <210> 64
 <211> 24
 15 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 64
 aaaaacctct aaaaactact ctcc 24
 <210> 65
 20 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 65
 aaggttttag ggaagagtgt tt 22
 25 <210> 66
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 66
 30 accttttct atcacaaaaa taa 23
 <210> 67

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 67
 5 agggggaatt aaatagaaag ag 22
 <210> 68
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 10 <400> 68
 caataaaacc atcccaaata ct 22
 <210> 69
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Homo Sapiens
 <400> 69
 tatgggagga ggtagtaag tg 22
 <210> 70
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 70
 ccccaaacc tacatataaa aa 22
 <210> 71
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 71
 gtattatgtg gtttaaggag gg 22
 30 <210> 72
 <211> 22

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 72

actcacaaca aattcaacaa ct 22

5

Reivindicaciones

1. Un método para proveer fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada, que comprende: obtener una muestra archivada que comprende ADN y parafina y opcionalmente un agente de fijación;
- 5 (a) someter la muestra archivada directamente a una etapa de lisis con una proteasa, en donde la parafina es licuada por calentamiento para proveer una cantidad de ADN tratado con proteasa accesible;
- (b) inactivar la proteasa mediante calor, adición de un inhibidor de proteasa, o ambos; y
- (c) tratar el ADN con un reactivo de bisulfito sin una etapa previa de extracción de ADN.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende purificar el ADN tratado con bisulfito utilizando un método de purificación de ADN adecuado.
- 10 3. El método de la reivindicación 2, que comprende adicionalmente la etapa de amplificar el ADN.
4. El método de la reivindicación 1, en donde la proteasa es seleccionada del grupo consistente de una serina proteasa, una tiol proteasa, una carboxi proteasa, una metaloproteasa, proteinasa K y combinaciones de estas proteasas.
5. El método de la reivindicación 2, en donde la purificación del ADN comprende el enlazamiento del ADN a superficies de sílica, o a membranas de sílica.
- 15 6. El método de la reivindicación 3, en donde la purificación de ADN se lleva a cabo por medio de ultrafiltración o partículas magnéticas.
7. El método de la reivindicación 3, en donde la amplificación del ADN comprende detectar al menos una posición que está metilada en el ADN genómico de la muestra archivada, al menos una posición que no está metilada en el ADN genómico de la muestra archivada, o ambas.
- 20 8. El método de la reivindicación 3, en donde la amplificación del ADN comprende el uso de al menos un método seleccionado del grupo consistente de: el método PCR; el método de secuenciación por bisulfito; el método COBRA; el método Ms-SNuPE (Extensión de Cebador de Nucleótido Individual Sensible a Metilación); el método MSP (PCR específico para metilación); el método MSP anidado; el método HeavyMetil™; el método MetiLight™; y el ensayo QM.
- 25 9. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra archivada consiste de 1-6 secciones de 10 micrómetros de espesor con un área de tejido en el rango de 0.7 cm x 0.7 cm a 2.5 cm x 3.5 cm.
10. Uso del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para la detección del estado de metilación de ADN.
11. Uso de un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para identificar las posiciones CpG con un estado de metilación específico de una enfermedad, en donde
- 30 a) se prepara el ADN de una muestra archivada originada de un tejido enfermo y se determina el estado de metilación del ADN;
- b) se prepara el ADN de una muestra originada de un tejido saludable y se determina el estado de metilación del ADN;
- y
- 35 c) se define un objetivo específico de la indicación con base en las diferencias en el estado de metilación del ADN del ADN derivado del tejido enfermo en comparación con el ADN derivado del tejido sano.
12. Uso del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para diagnóstico, prognosis o ambas de efectos adversos para pacientes o individuos, en donde los efectos adversos comprenden al menos una categoría seleccionada del grupo consistente de: interacciones indeseadas entre fármacos; enfermedades cancerosas; disfunciones, daño o enfermedad del CNS;; síntomas de agresión o perturbaciones de comportamiento; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de daños en el cerebro; perturbaciones psicóticas y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad, disfunción o daños cardiovasculares, disfunción, daños o enfermedad del tracto gastrointestinal; disfunción, daño o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o
- 40

convalecencia; disfunción, daño o enfermedad del cuerpo tal como una anormalidad en el proceso de desarrollo; disfunción, daño o enfermedad de la piel, de los músculos, del tejido conectivo o de los huesos; disfunción, daño o enfermedad endocrina y metabólica; y dolores de cabeza o disfunción sexual.

- 5 13. Uso del método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para distinguir tipos de células o tejido o para investigar la diferenciación celular.

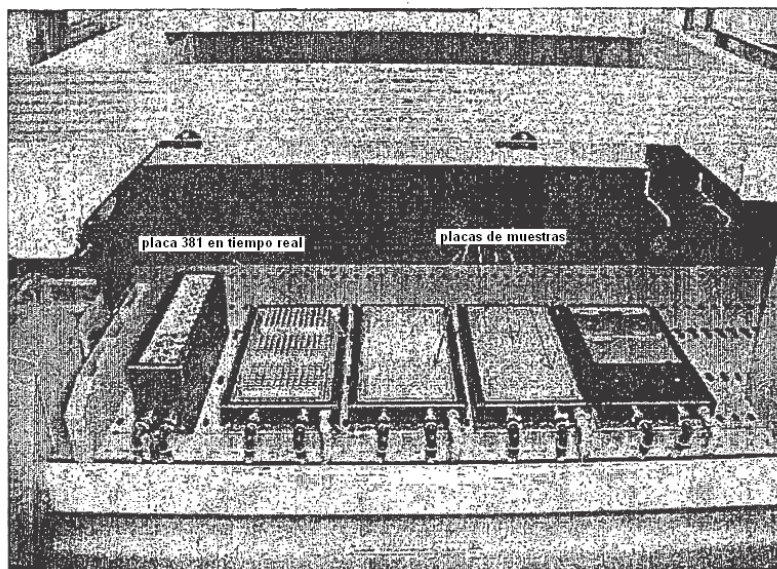
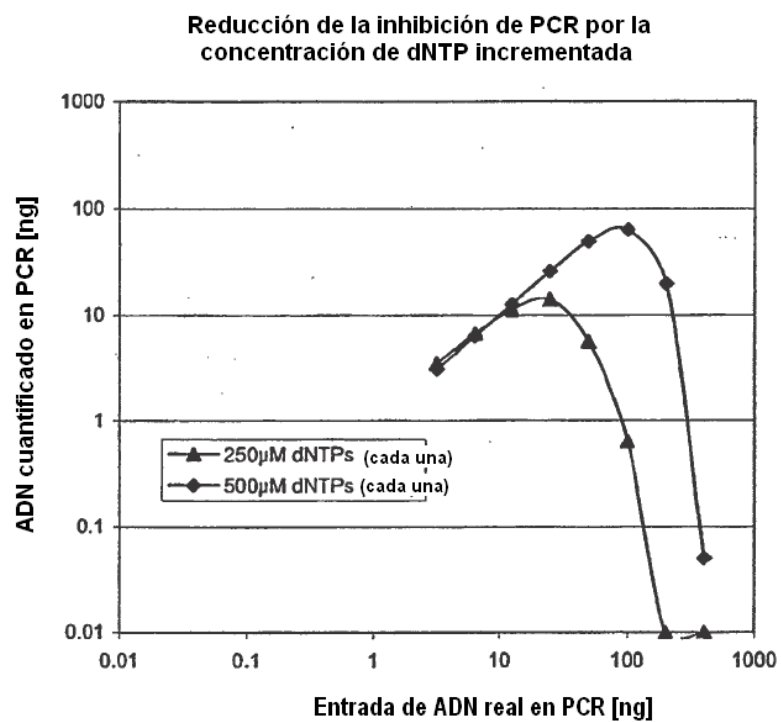


FIGURA 1

**FIGURA 2**

Reducción de la inhibición de PCR por extensión prolongada

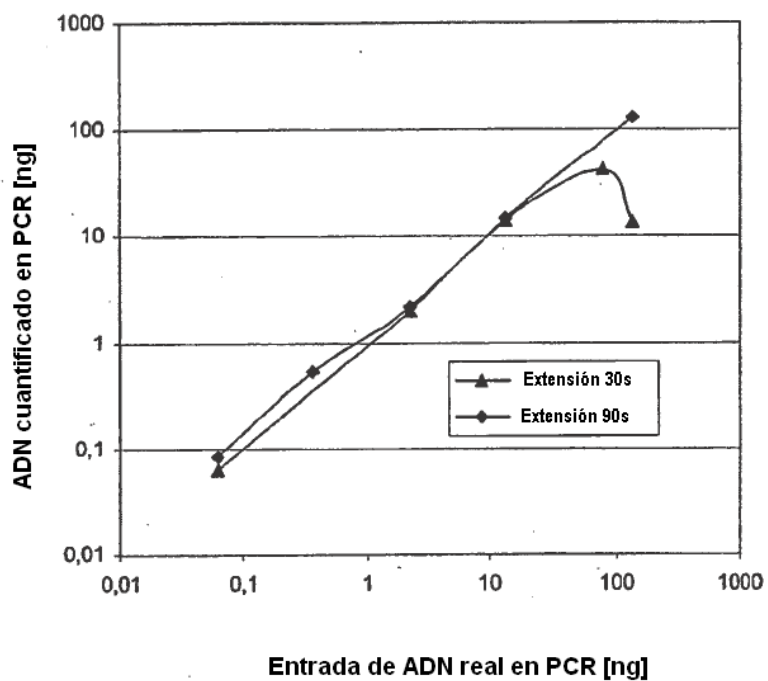


FIGURA 3

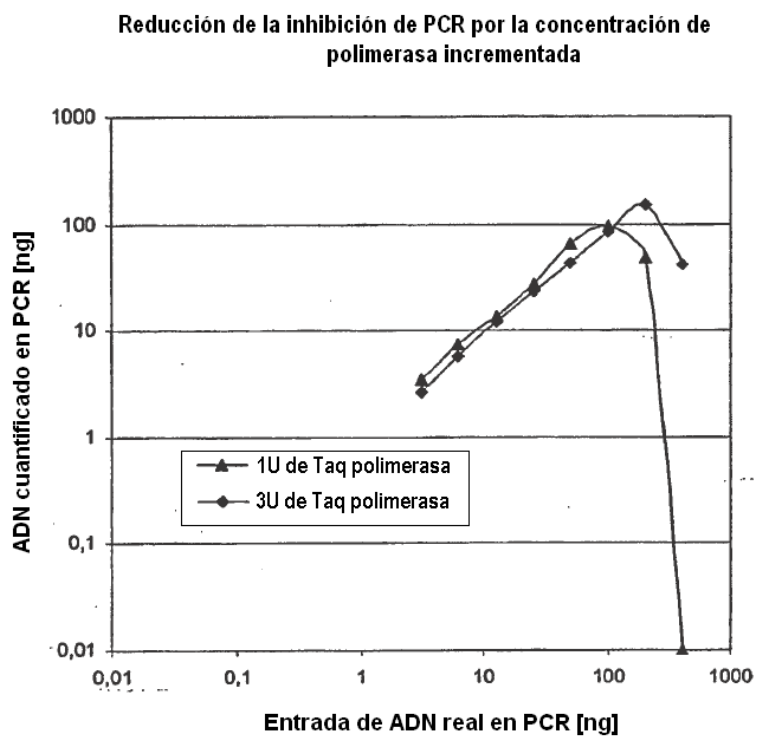


FIGURA 4

Biopsias de próstata - Rendimiento de ADN bisulfito total

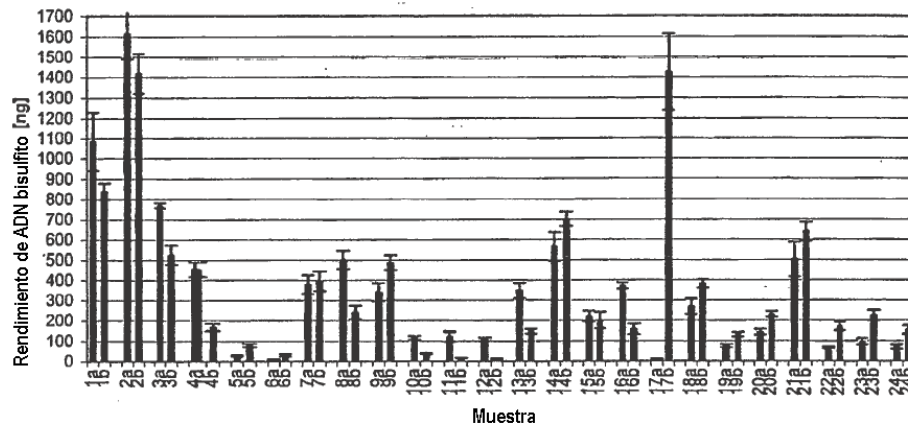


FIGURA 5

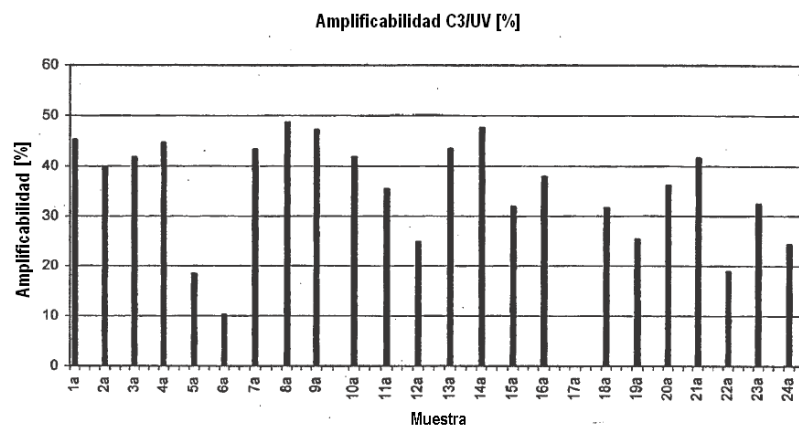


FIGURA 6

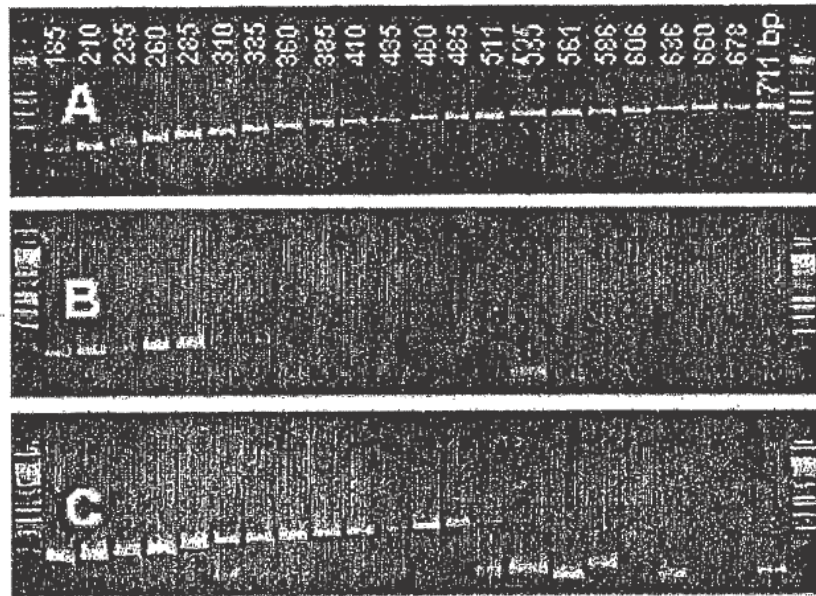


FIGURA 7

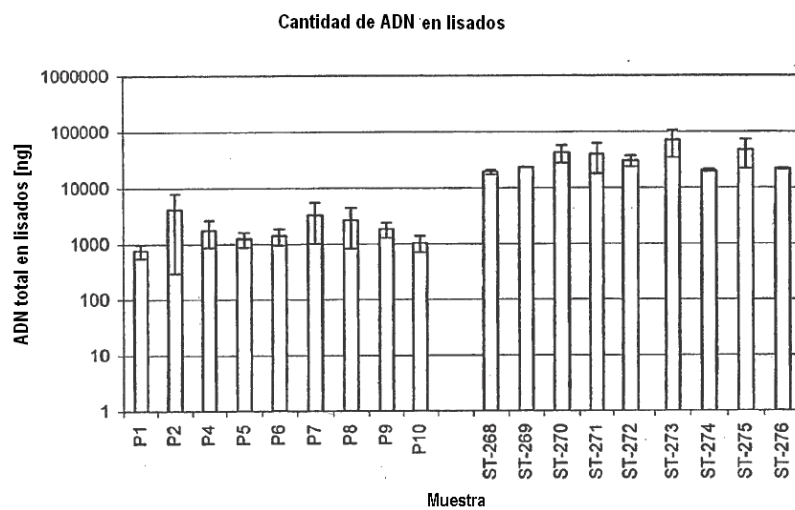


FIGURA 8

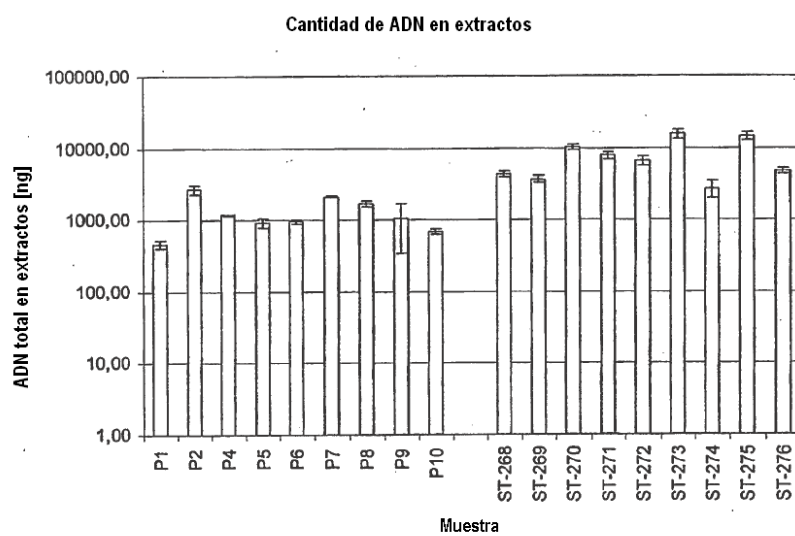


FIGURA 9

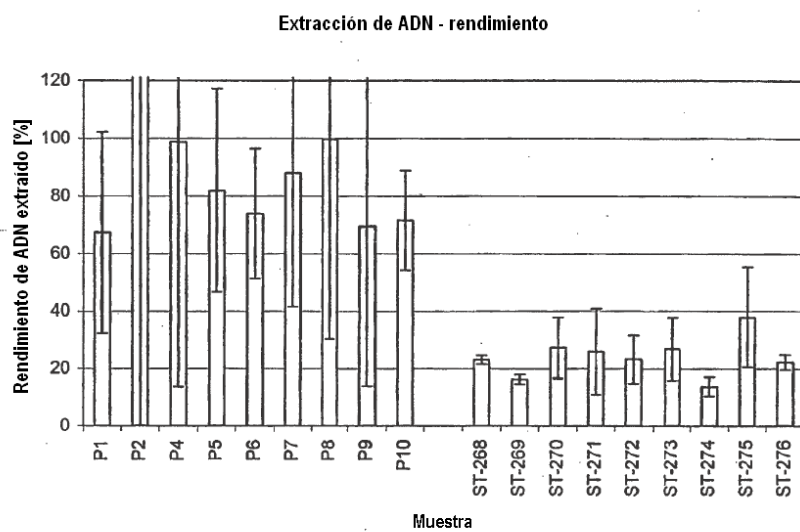


FIGURA 10

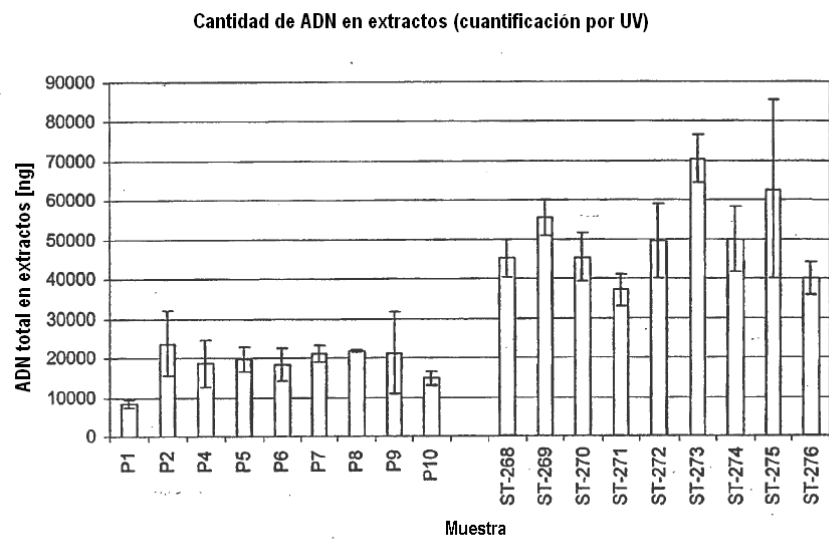


FIGURA 11

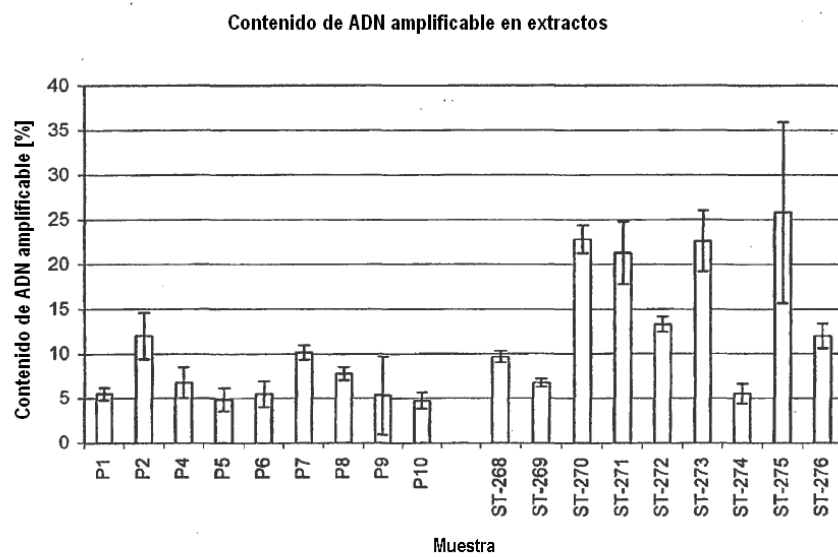


FIGURA 12

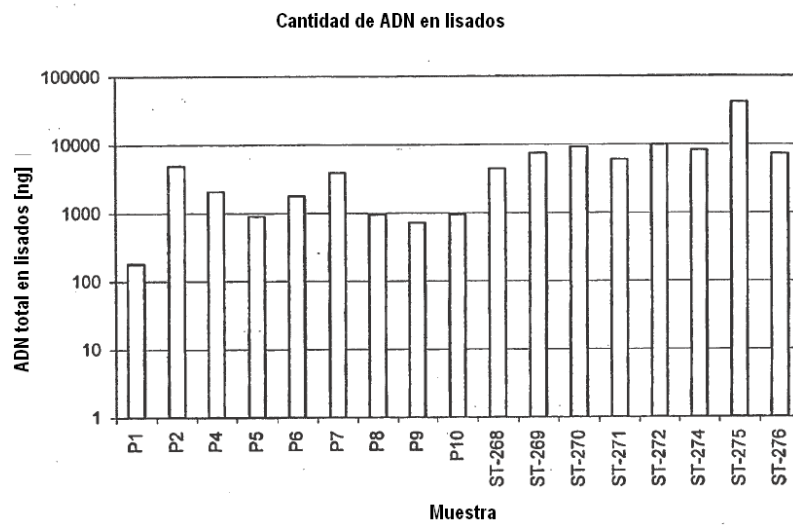


FIGURA 13

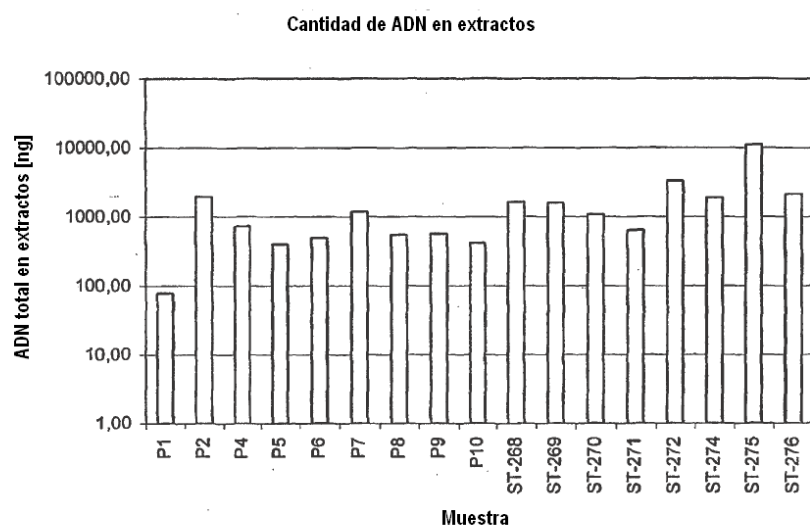


FIGURA 14

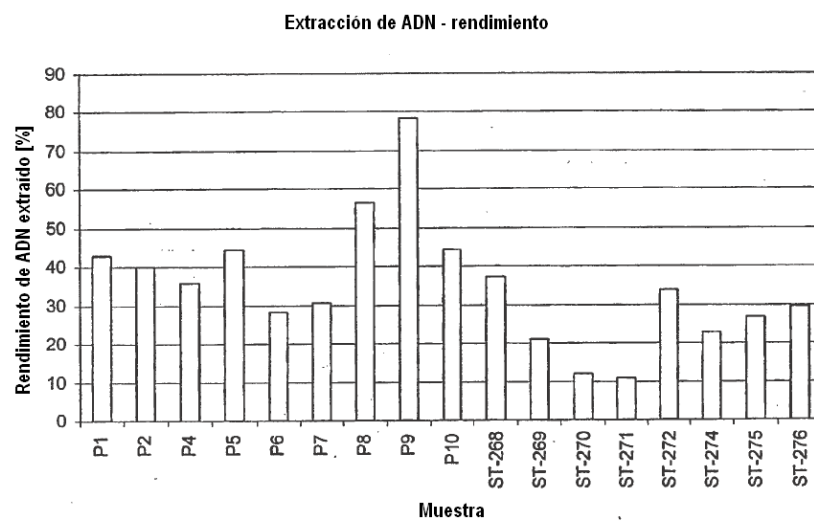


FIGURA 15

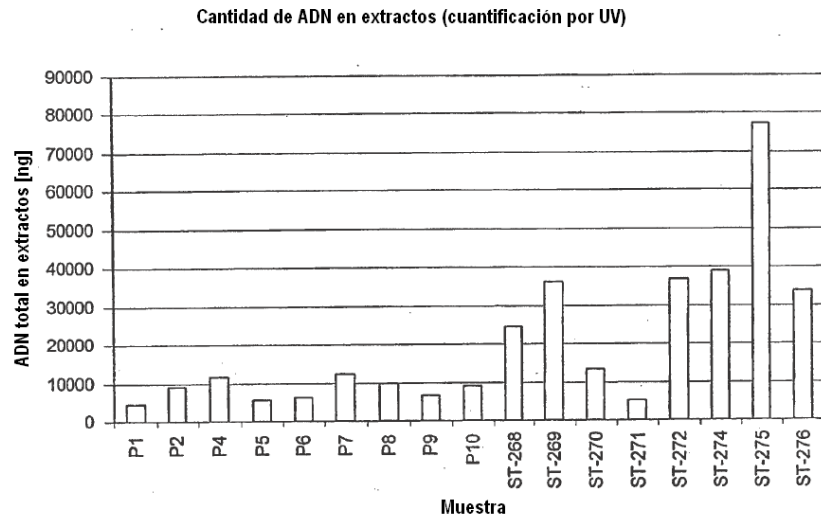


FIGURA 16

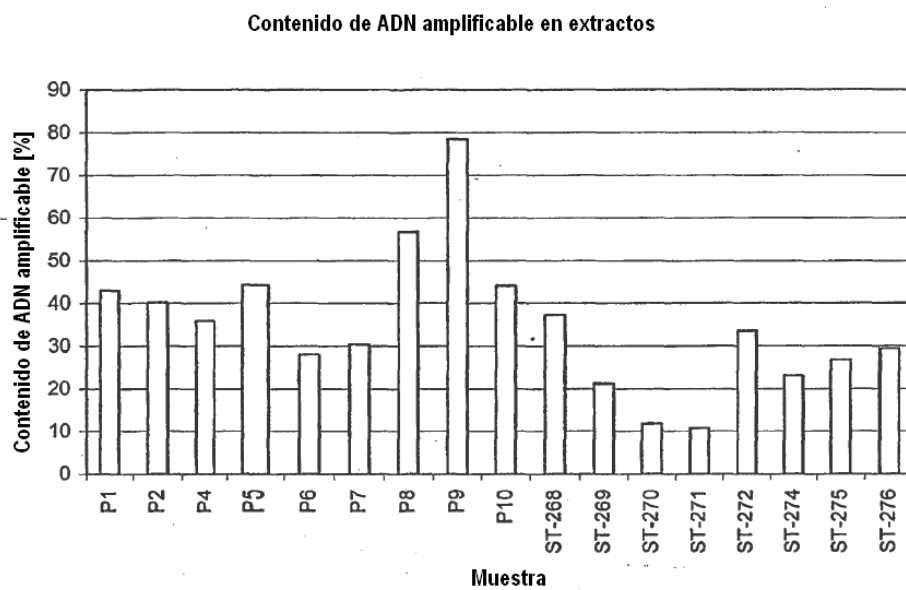


Figura 17

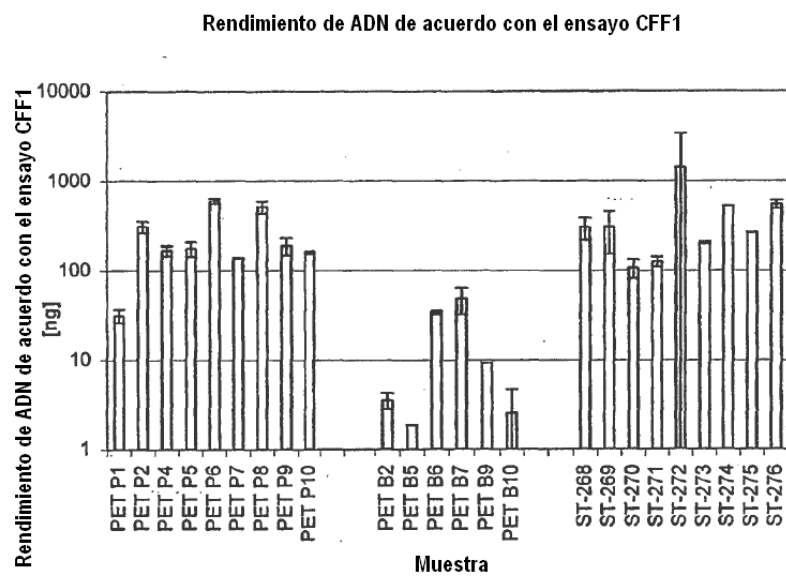


FIGURA 18

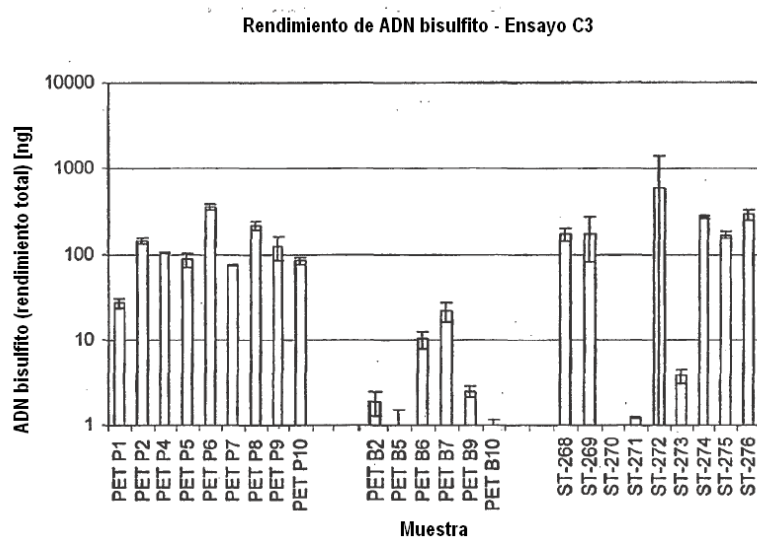


FIGURA 19

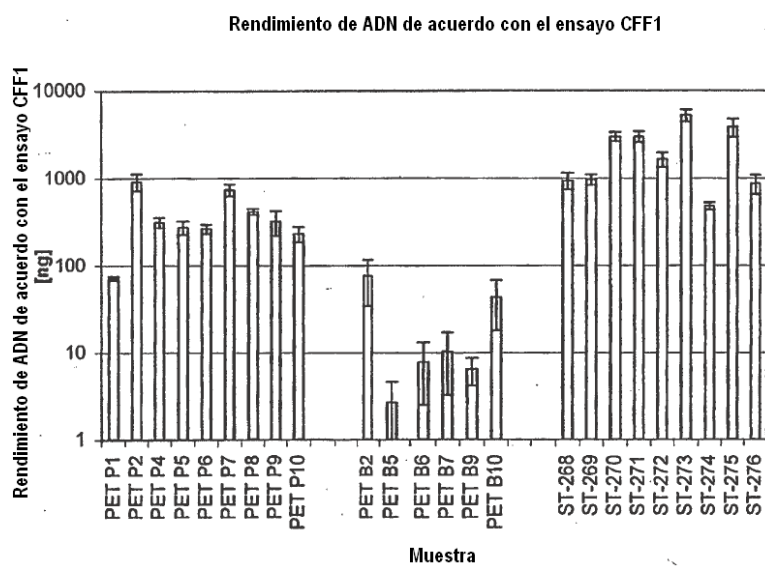


FIGURA 20

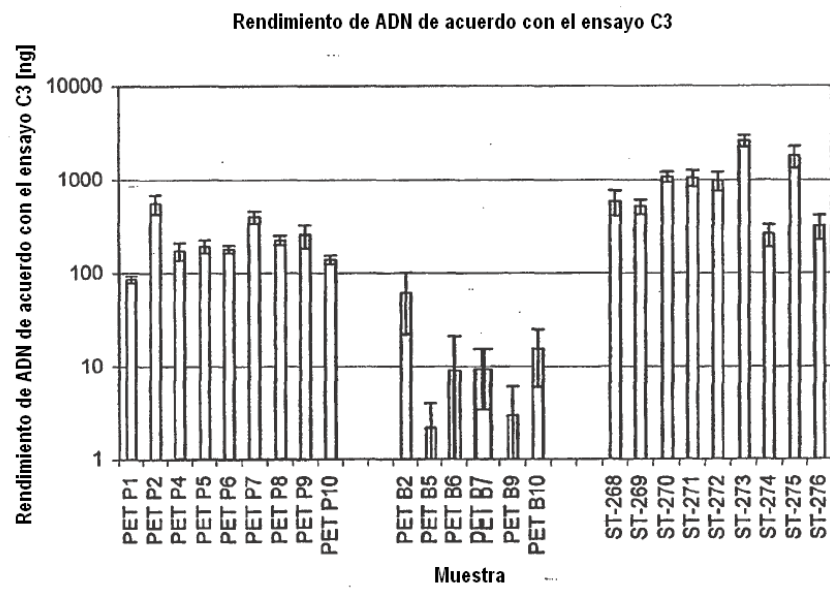


FIGURA 21