

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 876**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2004 E 04796412 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1694859**

54 Título: **Análisis multiplexado de ácidos nucleicos mediante fragmentación de ADN bicatenario**

30 Prioridad:

29.10.2003 US 515413 P

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

15.04.2015

73 Titular/es:

**BIOARRAY SOLUTIONS LTD (100.0%)
35 TECHNOLOGY DRIVE, SUITE 100
WARREN, NEW JERSEY 07059, US**

72 Inventor/es:

YANG, JIACHENG

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 533 876 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análisis multiplexado de ácidos nucleicos mediante fragmentación de ADN bicatenario

5 **Antecedentes**

En un protocolo de ensayo de hibridación mediante transferencia puntual inversa multiplexado convencional usado en el procedimiento de detección de la presencia de alelos particulares en una muestra, en primer lugar se amplifican loci seleccionados en el ADN genómico bicatenario usando pares de cebadores directos e inversos y se retira una hebra designada de cada uno de los amplicones bicatenarios, por ejemplo mediante digestión enzimática o separación magnética. Sólo las hebras restantes, preferiblemente marcadas, se ponen en contacto con un par de sondas relacionadas, aplicadas o puestas de otro modo sobre un sustrato, tal como una tira de nitrocelulosa, o presentadas en micropartículas codificadas en una preparación para un ensayo de hibridación. La hibridación se detecta normalmente basándose en la presencia de un marcador asociado con el conjunto de dianas capturadas o con las sondas correspondientes. La decodificación permite la determinación de las subsecuencias de las hebras capturadas por sondas particulares, indicando que las sondas de captura son complementarias a tales subsecuencias.

La retirada de las hebras designadas pretende mejorar la eficacia de captura de las hebras restantes en las sondas, eliminando el reapareamiento hebra-hebra, un proceso que compite con el apareamiento con las sondas de captura relacionadas, y que tendría lugar si no sin la selección y la retirada de hebra en el protocolo.

Las hebras pueden retirarse mediante digestión, en la que las hebras seleccionadas para la retirada se fosforilan en primer lugar y se digieren luego enzimáticamente usando una enzima de digestión tal como λ -endonucleasa para las hebras fosforiladas. Las hebras también pueden retirarse mediante separación magnética. Tanto la digestión como la separación magnética añaden costes y mano de obra al protocolo de ensayo. Una alternativa preferida sería generar fragmentos monocatenarios a partir de amplicones, eliminando de ese modo la necesidad de digestión o separación magnética.

Se conocen varios métodos para generar fragmentos monocatenarios de longitud aleatoria a partir de ADN bicatenario. En el método de secuenciación de Maxam y Gilbert convencional (A. Maxam and W. Gilbert, PNAS 74, pág. 560, 1977), se generan fragmentos de ADN bicatenario mediante la degradación química selectiva de múltiples copias de las especies de ADN que van a secuenciarse. Se ajustan las condiciones para producir fragmentos de todas las longitudes posibles; es decir, pueden separarse fragmentos en fracciones que difieren entre sí en longitud en una única base. Cuando se ordenan, la secuencia de fracciones con sus bases terminales respectivas representa la secuencia de la especie de ADN original.

E. Southern *et al.* también han generado fragmentos monocatenarios de tamaño aleatorio a partir de ADN bicatenario para facilitar la transferencia del ADN desde geles de agarosa para su transferencia sobre membranas para un análisis adicional mediante hibridación con sondas de oligonucleótidos, lo que representa un formato de transferencia puntual. Se ajustan las condiciones para producir fragmentos que lo son suficientemente cortos como para minimizar el enmarañado dentro del gel.

Hasta la fecha, nadie ha sugerido el uso de fragmentos de amplicones sin digestión o separación de hebras para su uso en formatos de ensayo de hibridación mediante transferencia puntual inversa. Por tanto, no hay ninguna sugerencia de que, para análisis multiplexado de polimorfismos (MAP), sea preferible el uso de una mezcla compleja de fragmentos dianas altamente heterogéneos al uso de una única secuencia diana, o como máximo unas pocas secuencias diana. Además, para usar la fragmentación para MAP, a menos que se ajusten las condiciones correctamente, pueden eliminarse algunos o todos los sitios polimórficos, o puede ser poco práctico el marcaje, y no se han sugerido ninguno de estos problemas ni sus soluciones.

Proudnikov *et al.*, Analytical Biochemistry 259, 34-41 (1998) se refiere a la inmovilización del ADN en gel de poliacrilamida para la fabricación de microchips de ADN y oligonucleótidos de ADN. A este respecto, se despurinó ADN amplificado por PCR durante 3-60 min en ácido fórmico al 80%, seguido por modificación con amino en los sitios despurinizados con o sin fragmentación del ADN, para la inmovilización sobre una micromatriz de gel.

Lhomme *et al.*, Biopolymers 52, 65-83 (1999) comentan la generación de sitiosapurínicos en condiciones ácidas y la posterior fragmentación en condiciones alcalinas.

Un método convencional de marcaje de amplicones es realizar la amplificación con cebadores marcados en el extremo terminal 5' para producir amplicones marcados en los extremos. Este método de marcaje de extremos requiere que las hebras marcadas permanezcan intactas porque, después de la fragmentación, únicamente se marcará una pequeña parte de los fragmentos que contienen el extremo terminal 5. Por tanto, se necesita un método de marcaje diferente en el que no se fragmenten los amplicones.

65 **Sumario**

La presente invención proporciona un método para detectar secuencias de nucleótidos particulares en una muestra de oligonucleótidos bicatenarios, que consiste esencialmente en las siguientes etapas:

- 5 a. amplificar segmentos de la muestra e incorporar marcadores en los amplicones durante la amplificación para generar amplicones bicatenarios marcados;
- b. escindir los amplicones bicatenarios usando ácido clorhídrico durante 15 minutos para despurinizar las bases, seguido por la adición de hidróxido de sodio y desnaturalización térmica, en ubicaciones que no
10 están alineadas entre las hebras de amplicón, para generar fragmentos sentido y antisentido que no son totalmente complementarios seguido por la congelación rápida de los fragmentos;
- c. mezclar los fragmentos con un tampón de hibridación;
- 15 d. poner los fragmentos en contacto con un conjunto de oligonucleótidos monocatenarios en condiciones de apareamiento, en el que los oligonucleótidos monocatenarios del conjunto son complementarios a los fragmentos o a subsecuencias de los fragmentos y
- 20 e. detectar la hibridación entre dicho conjunto de oligonucleótidos monocatenarios y los fragmentos.

Se definen realizaciones adicionales de la invención en las reivindicaciones.

Se da a conocer un método de fragmentación de ADN bicatenario para su uso en el análisis de ácidos nucleicos, notablemente en el análisis multiplexado de polimorfismos y mutaciones. El método produce una multiplicidad de
25 fragmentos sentido y antisentido marcados que no son complementarios, y por tanto no se reaparean significativamente en condiciones adecuadas para el análisis de hibridación (o análisis de elongación mediada por captura) de los polimorfismos y/o las mutaciones. Los fragmentos presentan una distribución de longitud deseada o predicha. Pueden seleccionarse sitios de escisión de tal manera que los fragmentos sean cortos, aunque lo suficientemente largos como para permitir la discriminación entre fragmentos en un ensayo, y por probabilidad
30 estadística, de tal manera que la mayoría de los fragmentos contengan al menos un nucleótido marcado para facilitar la detección. Es decir, se ajustan las condiciones para producir una distribución de longitud de fragmento que genera una densidad lineal seleccionada de marcaje de hebras, mediante la inclusión de nucleótidos marcados. En una realización alternativa, la mayoría de fragmentos son comparables en longitud con la longitud de las sondas de captura relacionadas.

Se transforma ADN bicatenario (o amplicones bicatenarios derivados de ADN bicatenario mediante amplificación) en un conjunto de fragmentos sentido y antisentido mediante escisión de hebras en una multiplicidad de sitios que
35 están distribuidos aleatoriamente a lo largo de cada hebra para producir fragmentos que no son totalmente complementarios. Esto puede lograrse simplemente mediante escisión en la misma base en cada hebra. Estos fragmentos luego se ponen en contacto, en condiciones de apareamiento, con sondas que son totalmente complementarias a al menos algunos de los fragmentos predichos. Se detectan acontecimientos de hibridación, y basándose en los resultados, se determina la presencia o ausencia de segmentos de oligonucleótidos particulares en la muestra.

45 Las ventajas de este método son:

- (i) eliminar la etapa de selección de hebra tras PCR;
- (ii) potenciar la eficacia de captura de diana seleccionando la densidad de sitios de fragmentación para
50 generar dianas relativamente cortas que tienen una estructura secundaria mínima y presentan una alta afinidad eficaz, tal como se detalla en la solicitud de patente en tramitación junto con la presente, titulada: "Optimization of Gene Expression Analysis using Immobilized Capture Probes", presentada el 28 de octubre de 2004.
- (iii) permitir el uso de sondas de captura tanto sentido como antisentido para la interrogación de sitios
55 polimórficos en ambas hebras. Este es un aspecto de diseño que es ventajoso en un ensayo multiplexado, porque puede ser deseable usar sondas particulares que se unen de manera selectiva a hebras o bien sentido o bien antisentido, para evitar la hibridación cruzada con dianas no relacionadas. Véase, por ejemplo, la solicitud estadounidense con n.º de publicación US 2004-0229269 (n.º de serie 10/847.046),
60 presentada el 17/5/2004 "Hybridization-Mediated Analysis of Polymorphisms (hMAP)". Además, la inclusión de la sonda antisentido junto con la sonda sentido correspondiente potencia la eficacia de captura porque la sonda antisentido retira de la disolución una parte de la diana sentido reduciendo de ese modo adicionalmente el grado de reapareamiento de hebras en disolución.

65 Puede incorporarse, durante la amplificación por PCR que genera los amplicones, el marcador que identifica en última instancia las dianas hibridadas. Debe tenerse en cuenta en este caso que el marcador debe incorporarse con

suficiente frecuencia durante la PCR de tal manera que la probabilidad sea que todos los fragmentos resultantes incorporen al menos algún marcador. Por tanto, necesariamente, cuando los fragmentos son más cortos, la frecuencia del marcador debe ser mayor en cada uno de los fragmentos.

5 Como etapa opcional, tras la hibridación y la identificación de las dianas hibridadas en la muestra, puede verificarse la fiabilidad de los resultados de hibridación usando un análisis de elongación mediada por captura. En esta etapa, se diseña un nuevo conjunto de sondas, algunas de las cuales pueden ser más cortas que o complementarias al conjunto de sondas inicial usado para el análisis de hibridación. Las sondas más cortas se necesitarán en los casos en los que haya en las dianas esperadas, más de un locus polimórfico (o subsecuencia correspondiente a un locus polimórfico) a lo largo de la longitud del fragmento. Para lograr un resultado fiable en un análisis de elongación mediada por captura, un nucleótido de sonda terminal debe alinearse con cada nucleótido polimórfico ("SNP"). Véase la solicitud estadounidense con n.º de publicación US 2004-0002073 (n.º de serie 10/271.602), titulada "Multiplexed Analysis of Polymorphic Loci by Concurrent Interrogation and Enzyme-Mediated Detection", presentada el 15/10/2002.

15 Además, puede usarse una sonda complementaria si ayuda a evitar la hibridación cruzada entre las dianas en el conjunto. Las sondas complementarias se hibridarán a la hebra diana complementaria (la hebra o bien sentido o bien antisentido) de la hebra diana que se hibrida con el conjunto de sondas inicial.

20 El análisis de elongación mediada por captura es deseable para aumentar la fiabilidad de los resultados del ensayo porque con el análisis de hibridación solo (usando sólo un conjunto de sondas inicial) se generan falsos positivos por hibridación cruzada. Tras el análisis de elongación mediada por captura, los resultados pueden compararse con el análisis mediado por hibridación, aumentando de ese modo adicionalmente la fiabilidad. La última etapa de comparación puede realizarse usando un programa y software.

25 Los métodos anteriores se describen a continuación con referencia a los dibujos.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 muestra productos de PCR teñidos a partir de ADN genómico, visualizados en gel de agarosa con iluminación UV.

La figura 2 muestra productos de PCR de HLA de clase I y clase II marcados que se han procesado para dar fragmentos de ADN monocatenarios mediante escisión química y desnaturalización.

35 Las figuras 3A-3D ilustran las etapas involucradas en la realización de un ensayo mediado por hibridación usando los métodos expuestos en el presente documento.

40 La figura 4 muestra una ilustración de la intensidad frente al tiempo de despurinización para la unión de varias dianas.

Las figuras 5A-5D ilustran las etapas involucradas en la realización de un ensayo mediado por elongación y captura usando los métodos expuestos en el presente documento.

45 La figura 6 muestra una titulación del umbral frente a las sondas para seis sondas sentido diferentes.

La figura 7 muestra la distribución del tamaño acumulativa de los fragmentos resultantes de la hebra de ADN elegida con un valor de P_{cut} del 5%.

50 La figura 8 muestra la probabilidad de supervivencia de dos regiones diferentes de longitud desigual pero la misma razón de enlaces fragmentables con respecto a no fragmentables en la hebra de ADN elegida.

Descripción detallada

55 Para realizar los métodos expuestos anteriormente, en primer lugar se aísla una muestra de ADN bicatenario, por ejemplo, ADN genómico. Se amplifican determinadas partes que representan loci de interés, usando PCR. Después de eso, pueden ponerse las hebras sentido y antisentido complementarias en condiciones que permitan el apareamiento, o, pueden ponerse en un gel que mantenga separadas las hebras complementarias. En cualquier caso, eventualmente se aparean para dar amplicones de ADN bicatenarios. En la siguiente etapa, las dos hebras complementarias se escinden en pares de bases no complementarios, generando hebras sentido y antisentido que son sólo parcialmente complementarias. Las hebras totalmente complementarias se aparearán entre sí cuando se pongan, en condiciones de apareamiento, en contacto con un alineamiento de sondas, compitiendo de ese modo con el apareamiento de las sondas y afectando a los resultados del ensayo.

65 Un método bien conocido para escindir hebras de amplicones sentido y antisentido en bases particulares que no son complementarias es mellar aleatoriamente las bases de purina en los amplicones usando ácido clorhídrico,

despurinizando de ese modo estas bases. Los ADN bicatenarios mellados se desnaturalizan luego térmicamente en una disolución alcalina generando de ese modo fragmentos de ADN no complementarios monocatenarios. Cuanto mayor es el grado de la despurinización, más corta es la longitud de los fragmentos de ADN monocatenarios resultantes después de la despurinización.

5 Como etapa en la amplificación por PCR de ADN bicatenario, es ventajoso incorporar el marcador que se usará en última estancia en la identificación de hebras particulares que se hibridan con un conjunto de sondas. Un método para lograr esto es añadir desoxinucleótidos (o didesoxinucleótidos) marcados a la mezcla de reacción de PCR para marcar ambas hebras de amplicón durante la reacción. Otro método es añadir bases biotinizadas durante la PCR, que luego se acoplan con la estreptavidina marcada de manera fluorescente para el marcaje en tales bases. Se prefiere biotinilar los nucleótidos de bases de citocina en vez de los de adenina, ya que las bases de adenina se despurinizarán durante la etapa de despurinización, provocando de ese modo la pérdida del marcaje. Tal como se observó anteriormente, la frecuencia de marcaje debe ser lo suficientemente alta como para garantizar que incluso los fragmentos más cortos que se desea detectar tengan marcador incorporado. El marcaje durante la PCR es ventajoso para el ADN monocatenario generado mediante fragmentación, ya que de lo contrario sería necesario marcar cada hebra individualmente en una etapa de procesamiento tras la PCR, lo que sería caro y requeriría mucho tiempo.

20 Como etapa adicional, tras la hibridación, los resultados pueden verificarse o refutarse para aumentar la fiabilidad si se realiza una reacción de elongación mediada por captura, tal como se describió anteriormente, en los amplicones escindidos. La reacción de elongación mediada por captura puede realizarse usando sondas complementarias o más cortas que aquéllas en el conjunto inicial, tal como se describió anteriormente.

25 Los ejemplos a continuación ilustran adicionalmente los métodos expuestos en el presente documento.

EJEMPLO 1: AMPLIFICACIÓN POR PCR

30 Se usa ADN genómico aislado de células y tejidos humanos como molde en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se usan oligonucleótidos que flanquean genes de HLA de clase I y II como cebadores directos e inversos para la amplificación de loci específicos o fragmentos génicos específicos. Podrían usarse más de un par de cebadores en la PCR para la amplificación de múltiples loci. Además, los cebadores pueden contener bases degeneradas para el cebado de ADN genómico en sitios polimórficos. Se realiza la PCR según los métodos bien conocidos.

35 Preferiblemente, se añade al menos un tipo de desoxinucleótido marcado con ligando a la mezcla de reacción de PCR, para generar amplicones en los que están marcadas ambas hebras. El ligando puede ser un colorante fluorescente o una molécula tal como biotina, que puede acoplarse con un marcador después de la reacción.

40 Se realiza la PCR usando un termociclador programable. Se corren alícuotas de los productos de PCR sobre gel de agarosa o poliacrilamida usando electroforesis, con marcadores de masa molecular de ADN incluidos en el gel como marcadores. Se tiñen los ADN en el gel con bromuro de etidio y se visualizan con un transiluminador UV para verificar la integridad y el rendimiento de los amplicones de PCR. Por ejemplo, se amplificaron el exón 2 y el exón 3 de los loci A y B en PCR multiplexada usando dos conjuntos de cebadores. Se amplificó el exón 2 del locus DR usando un conjunto de cebadores. Se biotinilaron los productos de PCR en ambas hebras con una densidad de más de un nucleótido biotilado por cada 20 bases de los amplicones. Se corrieron alícuotas de los productos de PCR sobre gel de agarosa seguido por tinción con bromuro de etidio. En la figura 1, pueden visualizarse los productos de PCR teñidos sobre el gel de agarosa con iluminación UV.

EJEMPLO 2: PROCESAMIENTO DE MUESTRAS TRAS PCR

50 Se procesan los productos de PCR de clase I y clase II marcados para dar fragmentos de ADN monocatenarios mediante escisión química y desnaturalización. Brevemente, se tratan los productos de PCR con ácido clorhídrico para despurinizarlos, tal como se conoce bien (véanse, por ejemplo, M.H. Caruthers *et al.*, en Genetic Engineering: Principles and Methods, J.K. Setlow *et al.*, Eds. (Nueva York: Plenum Press, 1982)). Se mella aleatoriamente ADN bicatenario en las bases de purina, es decir adenina y guanina en presencia de ácido clorhídrico. Se desnaturalizan térmicamente los ADN bicatenarios mellados a 94°C en disolución alcalina dando como resultado la generación de fragmentos de ADN monocatenarios. El grado de despurinización se correlaciona directamente con el tamaño de los fragmentos de ADN monocatenarios.

60 Se optimizó la despurinización de los amplicones de PCR de los genes de clase I y II para obtener fragmentos de ADN monocatenario pequeños que, basándose en una determinación de probabilidad, contendrán al menos un nucleótido biotilado. Una distribución del tamaño de los productos de escisión separados sobre gel de poliacrilamida mostró que la mayoría de los fragmentos de ADN monocatenarios eran de aproximadamente 75 bases de longitud. Cada uno de los fragmentos de ADN debe contener, por tanto, aproximadamente dos nucleótidos biotinizados, según las condiciones descritas en el ejemplo 1.

Se realizó un experimento de transcurso temporal para optimizar las condiciones de despurinización. Se incubaron los productos de PCR biotinilados para el exón 2 y 3 del locus B con cantidades específicas de ácido clorhídrico y se incubaron en un baño de agua durante periodos de tiempo crecientes, seguido por la adición de hidróxido de sodio y desnaturalización térmica. Se corrieron los productos de PCR escindidos químicamente con secuenciación con urea al 8% para separar los productos digeridos, seguido por tinción con bromuro de etidio. Se visualizaron los productos escindidos con un transiluminador UV (figura 2), lo que demuestra que aumenta la cantidad de productos de escisión pequeños a medida que aumenta el tiempo de despurinización (figura 2).

EJEMPLO 3: ENSAYO DE HIBRIDACIÓN EN CHIP

Se desnaturalizaron térmicamente productos de PCR procesados preparados tal como se describe en el ejemplo 2 para obtener grandes números de fragmentos de ADN monocatenarios. Después de la desnaturalización, se congelan rápidamente las muestras en hielo para conservar los fragmentos de ADN en un estado monocatenario. Luego se mezclan las muestras de ADN con un tampón de hibridación para una hibridación en chip con sondas de oligonucleótidos complementarias, en las que diferentes tipos de sondas están inmovilizados cada uno sobre micropartículas codificadas de distinta manera, y se colocan las micropartículas en un alineamiento sobre un sustrato sólido (un "BeadChip™"). Véase, por ejemplo, la solicitud estadounidense con n.º de publicación US 2004-0132122 (n.º de serie 10/204.799): "Multianalyte Molecular Analysis Using Application-Specific Random Particle Arrays", presentada el 23/8/2002.

Las condiciones de hibridación y la fuerza iónica del tampón de hibridación son convencionales en la técnica. Preferiblemente, se lleva a cabo la hibridación en chip en una incubadora de temperatura y humedad controladas, para una dinámica de reacción rápida y eficaz. Véase la solicitud de patente estadounidense: "Controlled Evaporation, Temperature Control and Packaging for Optical Inspection of Biological Samples", n.º de publicación US 2005-0079517 (n.º de serie 10/870.213), presentada el 17/6/2004.

Tras la hibridación, se retira el ADN marcado no unido mediante lavado intenso. Cuando los oligonucleótidos se unen con ligandos, tales como biotina, en vez de con colorantes fluorescentes, se incuban los chips de ensayo con disolución de tinción que contiene moléculas marcadas de manera fluorescente que tienen una alta afinidad por los ligandos. Por ejemplo, puede usarse estreptavidina marcada de manera fluorescente para la unión a los fragmentos de ADN biotinilados.

Si existe una hibridación cruzada significativa, pueden capturarse las dianas de ADN marcadas mediante más de un tipo de sonda y asociarse con más de un tipo de micropartícula codificada en los BeadChip.

Tal como se muestra en la figura 3, un ensayo con BeadChip de hMAP típico tendrá cuatro etapas tal como sigue: etapa 1, amplificación por PCR de ADN genómicos en presencia de dNTP marcados, tales como dATP biotinilado y dCTP biotinilado. Se marcan ambas hebras de los productos de PCR en la reacción de PCR. Etapa 2, se despurinizaron los productos de PCR marcados en presencia de ácido clorhídrico seguido por desnaturalización térmica en disolución alcalina. Etapa 3, se usaron las dianas de ADN monocatenarias fragmentadas como dianas para un ensayo con BeadChip. Etapa 4, se detectaron las dianas capturadas en las perlas mediante incubación con ligandos marcados de manera fluorescente que tienen alta afinidad por los marcadores, tales como estreptavidina conjugada con Cy3 para la detección de las dianas biotiniladas, seguido por detección mediante READ (figura 3).

Se usaron los productos de ADN de escisión descritos en el ejemplo 2 en un ensayo con BeadChip de hMAP. Brevemente, se usó cada uno de los productos del tratamiento de despurinización, es decir, aquéllos que resultaron de la despurinización durante 0, 10, 13, 15, 17, 20, 25 y >25 min, como diana en el ensayo con BeadChip de hMAP. Se analizaron las intensidades de hibridación de las dianas con un panel de sondas específicas de secuencia. Tal como se muestra en la figura 4, disminuye la intensidad para la sonda A y la sonda C a medida que aumenta el tiempo de despurinización, sugiriendo la escisión creciente de las dianas de ADN largas para dar fragmentos más pequeños a partir de la despurinización. Sin embargo, las intensidades para las sondas B, D, E y F aumentan en primer lugar en la despurinización parcial, luego disminuyen en la despurinización adicional, sugiriendo resultados de escisión parciales en la liberación de determinadas secuencias diana que no estaban disponibles en los ADN largos debido a otros factores, tales como la estructura secundaria de las dianas (figura 4).

EJEMPLO 4: PREPARACIÓN DE BEADCHIP A MEDIDA

Las sondas de oligonucleótidos de ADN usadas en el ensayo mediado por hibridación pueden contener un grupo reactivo terminal, una molécula espaciadora interna y un tramo de nucleótidos que son complementarios a los ADN diana de interés. Las sondas de oligonucleótidos pueden ser complementarias a la hebra sentido o la hebra antisentido de las moléculas de ADN. Se selecciona una hebra o la otra para reducir la hibridación cruzada.

Después de acoplar oligonucleótidos de ADN con las micropartículas codificadas por colores, se combinan diferentes micropartículas funcionalizadas con oligonucleótidos en un tubo para el ensamblaje de un alineamiento de perlas planas aleatorias sobre una oblea de silicio (o BeadChip). En el tipado molecular de HLA, cada BeadChip debe contener múltiples sondas sentido y antisentido para un locus específico de moléculas de clase I y clase II.

Pueden unirse BeadChip para diferentes loci en una cámara común para la reacción de hibridación.

EJEMPLO 5: ANÁLISIS DE ELONGACIÓN MEDIADA POR CAPTURA

5 Tal como se comentó anteriormente, tras el análisis mediado por hibridación, pueden confirmarse o refutarse los resultados usando reacciones de elongación mediada por captura. Tal como se muestra en la figura 5, un ensayo con BeadChip de eMAP típico usando dianas de ADN escindidas químicamente debe tener cuatro etapas tal como sigue: etapa 1, amplificación por PCR de ADN genómicos. Etapa 2, se despurinizan los productos de PCR en presencia de ácido clorhídrico seguido por desnaturalización térmica en disolución alcalina. Etapa 3, se usan los ADN monocatenarios fragmentados como dianas para la hibridación con sondas específicas de secuencia seguido por una reacción de elongación en presencia de dNTP marcados de manera fluorescente, tales como dCTP y dATP marcados con Cy3. Etapa 4, se retiran los moldes diana mediante lavado intenso seguido por detección mediante READ de las sondas elongadas (figura 5).

EJEMPLO 6: SONDAS SENTIDO Y ANTISENTIDO EN UN ENSAYO DE HMAP MULTIPLEXADO

Pueden hibridarse las dianas de ADN escindidas químicamente descritas en el presente documento con un panel de múltiples sondas de oligonucleótidos en formato de ensayo multiplexado, por ejemplo, pueden someterse a ensayo genes de HLA en un formato de este tipo. En un ensayo multiplexado de este tipo, las sondas de oligonucleótidos pueden contener secuencias de captura complementarias a las hebras o bien sentido o bien antisentido de subsecuencias de HLA diana. Cuando se usó tal ensayo en el examen de un conjunto de muestras de ADN humano de genotipos conocidos, pudo determinarse la razón de señal de sonda con respecto a señal de control positivo (la “razón de señal”) en cada muestra para cada una de las sondas del conjunto de sondas. Puede ajustarse un umbral arbitrariamente en la razón de señal para distinguir el “apareamiento perfecto”, entre sonda y diana, del “apareamiento erróneo”. Mediante la unión a la hebra complementaria de los ADN diana, la adición de sondas antisentido en el panel puede potenciar la eficacia de captura de las sondas sentido en el ensayo de hMAP multiplexado. Experimentalmente, se mostró que la adición de sondas antisentido no redujo la eficacia de captura de ninguna de las sondas sentido y de hecho mejoró la eficacia de captura cuando se añadieron las sondas antisentido (resultados no mostrados). En la figura 6, sólo se muestra un ensayo de sondas sentido.

EJEMPLO 7: MODELADO DE LA FRAGMENTACIÓN DE ADN

En este ejemplo se trata sobre el modelado de dos aspectos diferentes del proceso de fragmentación de ADN, es decir, la distribución del tamaño de fragmento de ADN monocatenario (de una composición conocida) y la probabilidad de supervivencia de un tramo particular de ADN en la hebra tras la fragmentación. El valor de este análisis es doble. En primer lugar, identifica cómo evoluciona la distribución del tamaño de fragmento en función del % de fragmentación. En segundo lugar, mediante el modelado de la distribución del tamaño de fragmento, proporciona una manera única de estimar la probabilidad de supervivencia de una región diana en la hebra de ADN de interés. Esto tiene implicaciones importantes en lo que se refiere al diseño de las sondas de captura porque sólo aquella fracción de fragmentos que contienen las subsecuencias intactas de interés, o aquellos fragmentos que permiten un solapamiento sonda-diana sustancial, pueden aparearse satisfactoriamente con la sonda de captura. Los fragmentos con regiones de solapamiento mutuo más pequeñas se desnaturalizan antes de que tenga lugar la detección o extensión. Además, puesto que la distribución del tamaño de fragmento y el % de hebras que contiene una región sin cortar de interés son ambas cantidades accesibles experimentalmente, este método proporciona una manera única de corresponder los resultados experimentales con los del modelado, permitiendo posiblemente cuantificar parámetros importantes en el modelo.

Para el fin de la simulación, se supone que el protocolo de fragmentación experimental descrito anteriormente genera una distribución aleatoria de fragmentos de polinucleótidos. La fragmentación aleatoria implica que cada unión nucleótido-nucleótido escindible tiene una probabilidad igual, P_{cut} , de romperse. Esta suposición es razonable porque no se sabe si el protocolo de fragmentación depende de la frecuencia y si fragmenta todas las A y G disponibles de forma no sesgada. Otra suposición es que los acontecimientos de rotura de enlaces son independientes y así el orden en el que se producen los fragmentos no afecta a sus probabilidades de producirse. Se realizaron simulaciones usando un amplicón del exón 2 de HLA B monocatenario, que tiene 268 bases de longitud. Se muestra la secuencia a continuación (SEQ ID NO.1).

1	GCTCCCACTC	CATGAGGTAT	TTCTACACCT	CCGTGTCCCG	GCCCGGCCGC
51	GGGGAGCCCC	GCTTCATCTC	AGTGGGCTAC	GTGGACGACA	CCCAGTTCGT
101	GAGGTTCGAC	AGCGACGCCG	CGAGTCCGAG	AGAGGAGCCG	CGGGCGCCGT
151	GGATAGAGCA	GGAGGGGCCG	GAGTATTGGG	CCGGAACACA	CAGATCTACA
201	AGGCCCAGGC	ACAGACTGAC	CGAGAGAGCC	TGCGGAACCT	GCGCGGCTAC
251	TACAACCAGA	GCGAGGCC			

Metodología:

- 5 1) Dados los parámetros P_{cut} ($P_{cut} = \% \text{ de fragmentación}$) y secuencia de hebra.
- 2) Dividir la secuencia en regiones diferenciables mediante enlaces que pueden romperse y que no pueden romperse por el protocolo. Se indica el número total de enlaces fragmentables como n_F . Se agrupan entre sí los enlaces adyacentes no fragmentables como regiones no fragmentables flanqueadas por enlaces fragmentables.
- 10 3) Crear un grupo de N secuencias, que contienen cada una n_F regiones (fragmentables). Normalmente, $N = 1000$.
- 15 4) Generar 2 vectores de números aleatorios uniformes, R_1 y R_2 , entre 0 y 1, cada uno de tamaño $N_{cut} = (n_F * P_{cut} * N) / 100$, donde N_{cut} indica el número total de enlaces en el grupo que van a romperse. A partir del primer vector, determinar ubicaciones aleatorias dentro de una secuencia en las que se producen cortes. Por tanto, para el vector R_1 , se calculan las ubicaciones de corte evaluando la cantidad $(n_F * R_1)$. A partir del segundo vector, se determina el replicado particular en el grupo que se corta, tal como sigue, $(N * R_2)$. Por tanto, para cada corte, i , que va a operarse en la secuencia, se genera un conjunto de dos números (f_i, n_i) en el que n_i es el número de replicado en el que va a realizarse el corte y f_i es el enlace fragmentable en ese replicado que va a cortarse. Sin embargo, puede que cada conjunto de (f_i, n_i) generado no sea único. Por tanto, puede volver a visitarse un enlace particular en un replicado particular durante el ejercicio. Una vez que se designa un enlace dado como roto, se descarta el conjunto repetido (f_i, n_i) , que define la ubicación de ese enlace, siempre que se encuentre. Por tanto en la práctica el número total de enlaces rotos durante el ejercicio es $n_{cut} \leq N_{cut}$.
- 25 5) Se calculan el número de bases (regiones no fragmentadas y regiones fragmentables agrupadas conectadas) flanqueadas o bien por enlaces rotos o por los extremos terminales de la secuencia para la distribución del tamaño de fragmento dada.
- 30

La figura 7 muestra la distribución del tamaño acumulativa de los fragmentos que resultan de la hebra de ADN elegida con un valor de P_{cut} del 5%. La figura ilustra que los fragmentos pequeños son más ubicuos que los grandes (constituyendo los fragmentos de longitud menor de ~ 20 bases el 50% de la mezcla final de fragmentos). La figura 8 muestra la probabilidad de supervivencia de dos regiones diferentes de longitud desigual pero de la misma razón de enlaces fragmentables con respecto a no fragmentables en la hebra de ADN elegida.

35

Debe entenderse que los términos, las expresiones y los ejemplos usados en el presente documento sólo son a modo de ejemplo, y no limitativos, y que el alcance de la invención se define sólo en las reivindicaciones que siguen, e incluye todos los equivalentes del contenido de las reivindicaciones. Las etapas de procedimiento y método en las reivindicaciones pueden llevarse a cabo en cualquier orden, incluyendo el orden expuesto en las reivindicaciones, a menos que se especifique de otro modo en las reivindicaciones.

40

Lista de secuencias

- 45 <110> Yang, Jiachen
- <120> Análisis multiplexado de ácidos nucleicos mediante fragmentación de ADN bicatenario
- <130> FRGMNT
- 50 <150> Documento 60/515.413
- <151> 29-10-2003
- <160> 1
- 55 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- <210> 1
- <211> 268
- 60 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Amplicón artificial
- 65 <400> 1

ES 2 533 876 T3

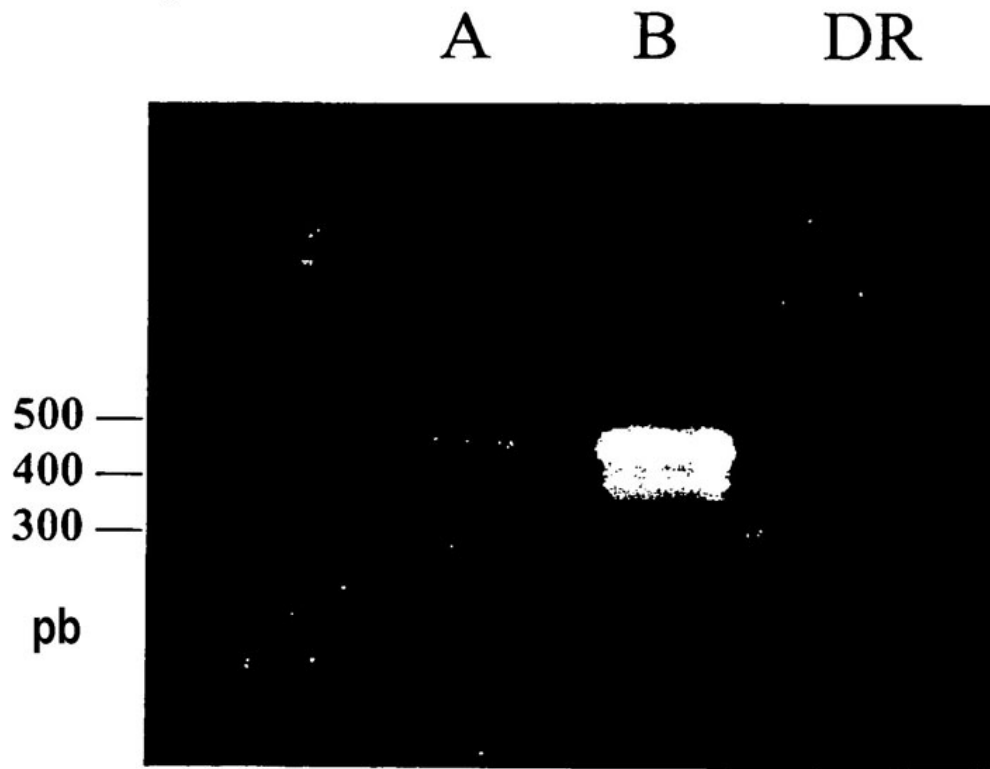
gctcccactc catgaggat ttctacacct ccgtgtcccg gcccggccgc ggggagcccc 60
gcttcatctc agtgggctac gtggacgaca cccagttcgt gaggttcgac agcgacgccg 120
cgagtccgag agaggagccg cgggcgccgt ggatagagca ggaggggccc gagtattggg 180
ccggaacaca cagatctaca aggcccaggc acagactgac cgagagagcc tgcggaacct 240
gcgcggttac tacaaccaga gcgaggcc 268

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar secuencias de nucleótidos particulares en una muestra de oligonucleótidos bicatenarios, que consiste esencialmente en las siguientes etapas:
 - a. amplificar segmentos de la muestra e incorporar marcadores en los amplicones durante la amplificación para generar amplicones bicatenarios marcados;
 - b. escindir los amplicones bicatenarios usando ácido clorhídrico durante 15 minutos para despurinizar las bases, seguido por la adición de hidróxido de sodio y desnaturalización térmica, en ubicaciones que no están alineadas entre las hebras de amplicón, para generar fragmentos sentido y antisentido que no son totalmente complementarios seguido por congelación rápida de los fragmentos;
 - c. mezclar los fragmentos con un tampón de hibridación;
 - d. poner los fragmentos en contacto con un conjunto de oligonucleótidos monocatenarios en condiciones de apareamiento, en el que los oligonucleótidos monocatenarios en el conjunto son complementarios a los fragmentos o a subsecuencias de los fragmentos y
 - e. detectar la hibridación entre dicho conjunto de oligonucleótidos monocatenarios y los fragmentos.
2. Método según la reivindicación 1, en el que los oligonucleótidos monocatenarios son ADN.
3. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra de oligonucleótidos bicatenarios es ADN genómico.
4. Método según cualquiera una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra de oligonucleótidos bicatenarios incluye loci genéticos de interés.
5. Método según la reivindicación 1, en el que se controla la selección de sitios de escisión controlando el pH del ácido clorhídrico, el tiempo de exposición al ácido clorhídrico y la temperatura de reacción.
6. Método según cualquiera una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el marcaje es mediante la incorporación de biotina que luego se acopla con estreptavidina marcada.
7. Método según la reivindicación 6, en el que la biotina se asocia con dNTP que se incorporan.
8. Método según la reivindicación 1, en el que dNTP o ddNTP marcados de manera fluorescente se incorporan en los amplicones.
9. Método según la reivindicación 1, en el que se ajusta la frecuencia de marcaje dependiendo de la longitud de fragmento predicha, de tal manera que cuando se predigan fragmentos más cortos tras la escisión, se aumente la frecuencia de marcaje.
10. Método según la reivindicación 1, en el que se ajusta la longitud de fragmento para generar fragmentos que se aproximan a la longitud de los oligonucleótidos monocatenarios.
11. Método según la reivindicación 1, que incluye además la etapa de proporcionar condiciones adecuadas para la elongación de los oligonucleótidos monocatenarios y detectar la elongación de los oligonucleótidos monocatenarios.
12. Método según la reivindicación 11, en el que se detecta la hibridación de un oligonucleótido monocatenario y fragmentos particulares basándose en si hay elongación de dicho oligonucleótido monocatenario particular.
13. Método según la reivindicación 1, que incluye además la etapa de proporcionar un conjunto de sondas de oligonucleótidos monocatenarios, algunas de las cuales pueden ser más cortas que o complementarias a los oligonucleótidos monocatenarios.
14. Método según la reivindicación 13, que incluye además la etapa de proporcionar condiciones adecuadas para la elongación de las sondas de oligonucleótidos monocatenarios y detectar la elongación de las sondas de oligonucleótidos monocatenarios.
15. Método según la reivindicación 14, que incluye además la etapa de comparar los resultados de la elongación de las sondas de oligonucleótidos monocatenarios con los resultados de la elongación de los oligonucleótidos monocatenarios.

16. Método según la reivindicación 15, en el que la comparación se realiza automáticamente usando un programa de software.

Figura 1



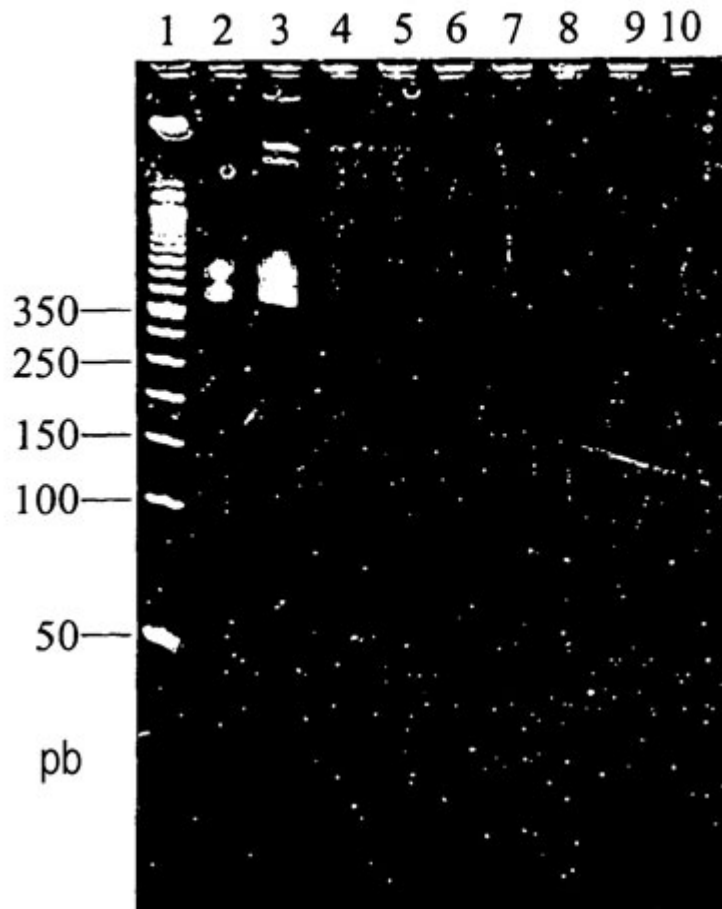
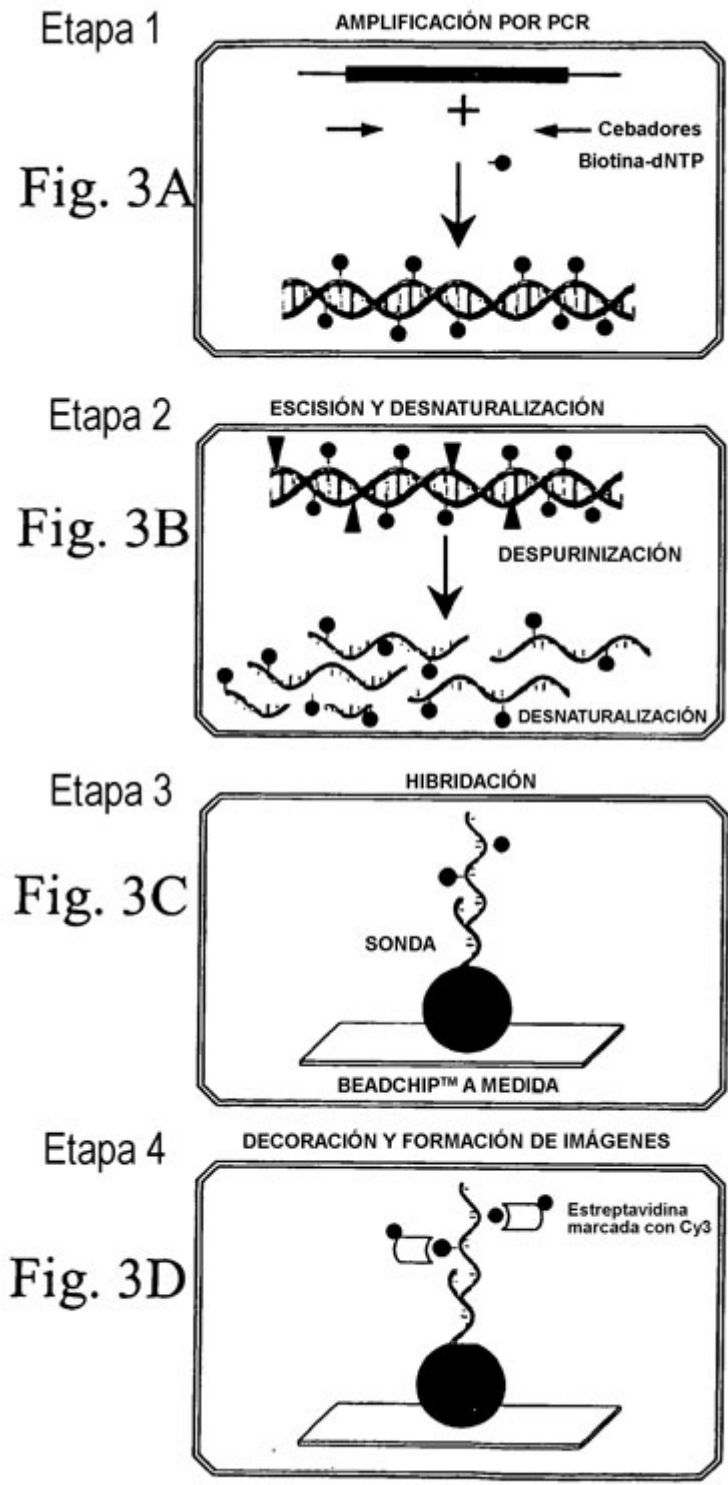


Figura 2

Carril

- 1: marcador de masa molecular de ADN de 50 pb
- 2: productos de PCR sin escisión
- 3: despurinización durante 0 min
- 4: despurinización durante 10 min a 37°C
- 5: despurinización durante 13 min a 37°C
- 6: despurinización durante 15 min a 37°C
- 7: despurinización durante 17 min a 37°C
- 8: despurinización durante 20 min a 37°C
- 9: despurinización durante 25 min a 37°C
- 10: despurinización durante 25 min a 37°C, luego 15 min a 56°C



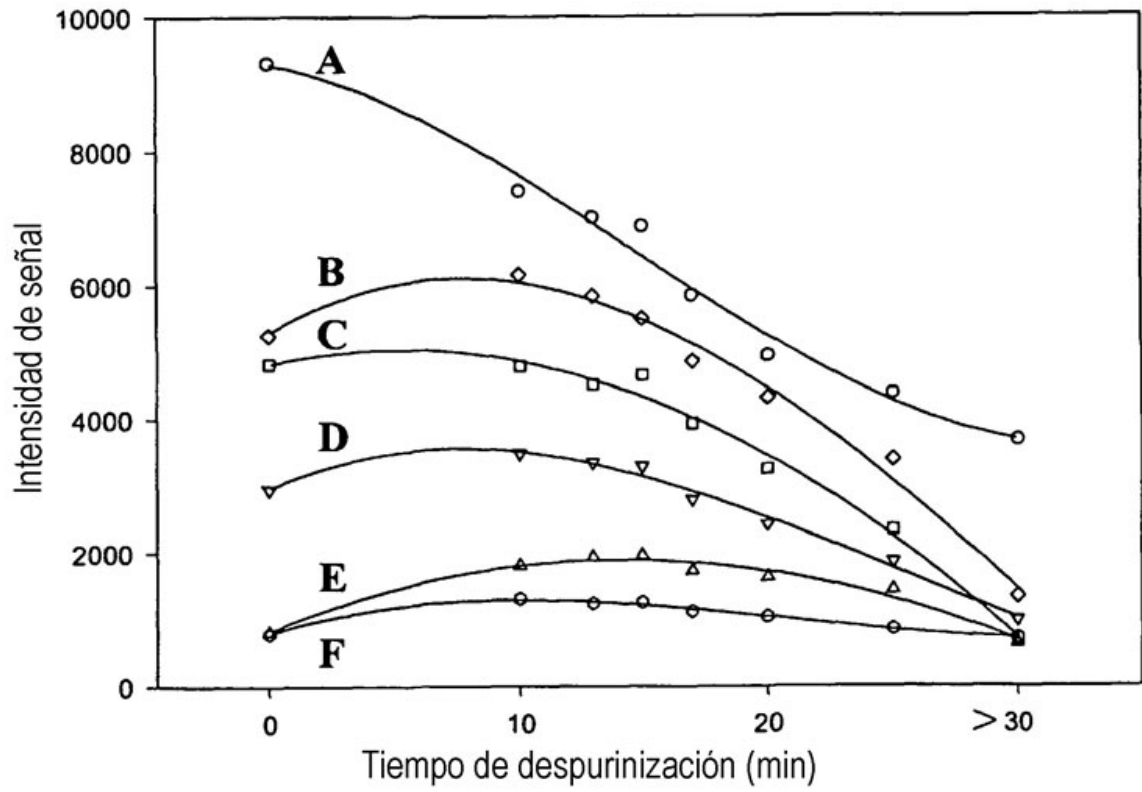
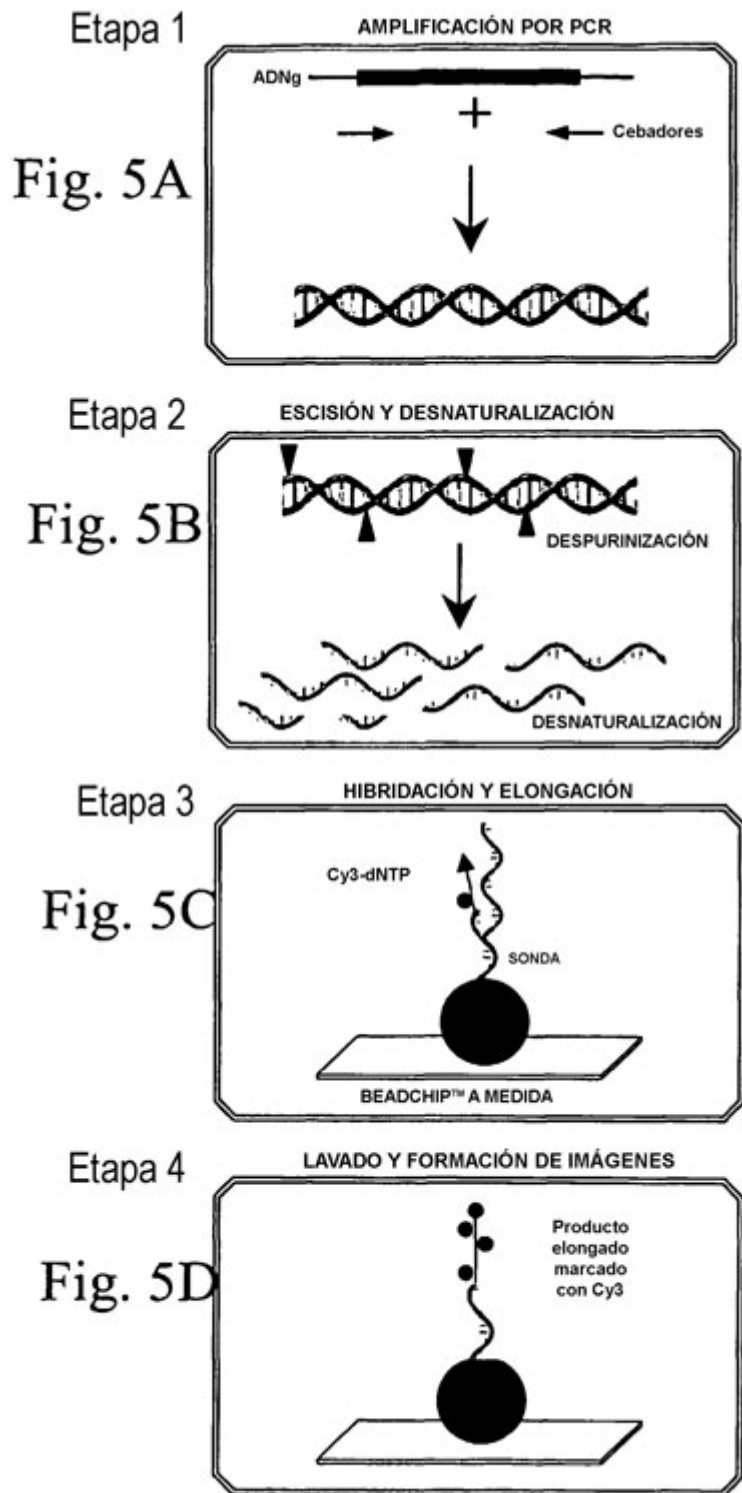


Figura 4



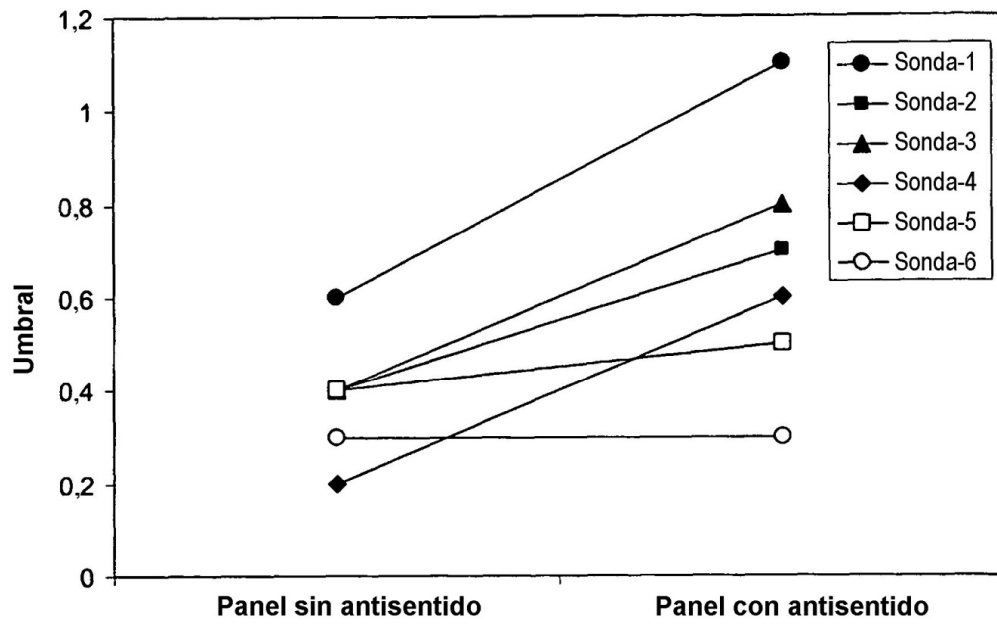


Fig. 6

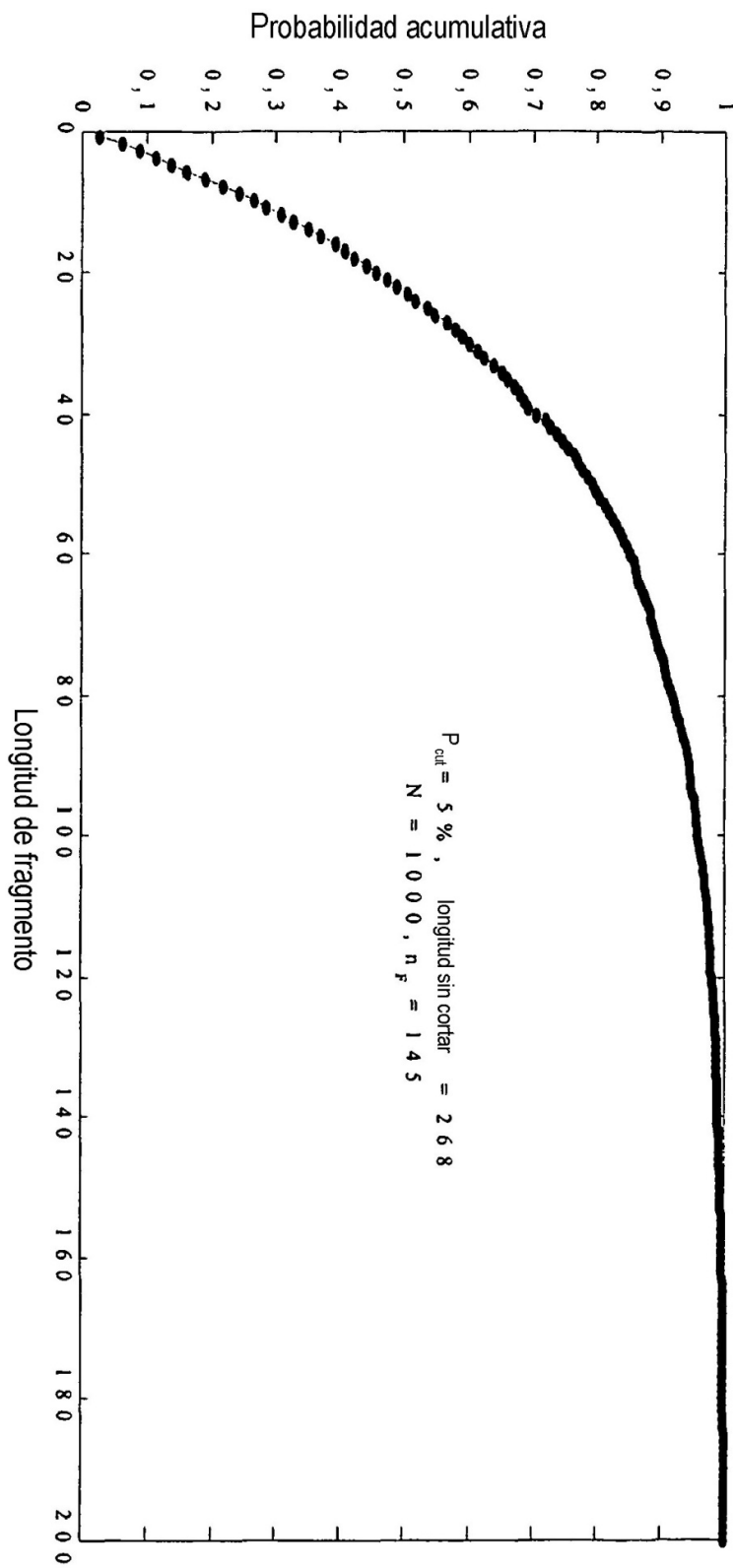


Fig 7

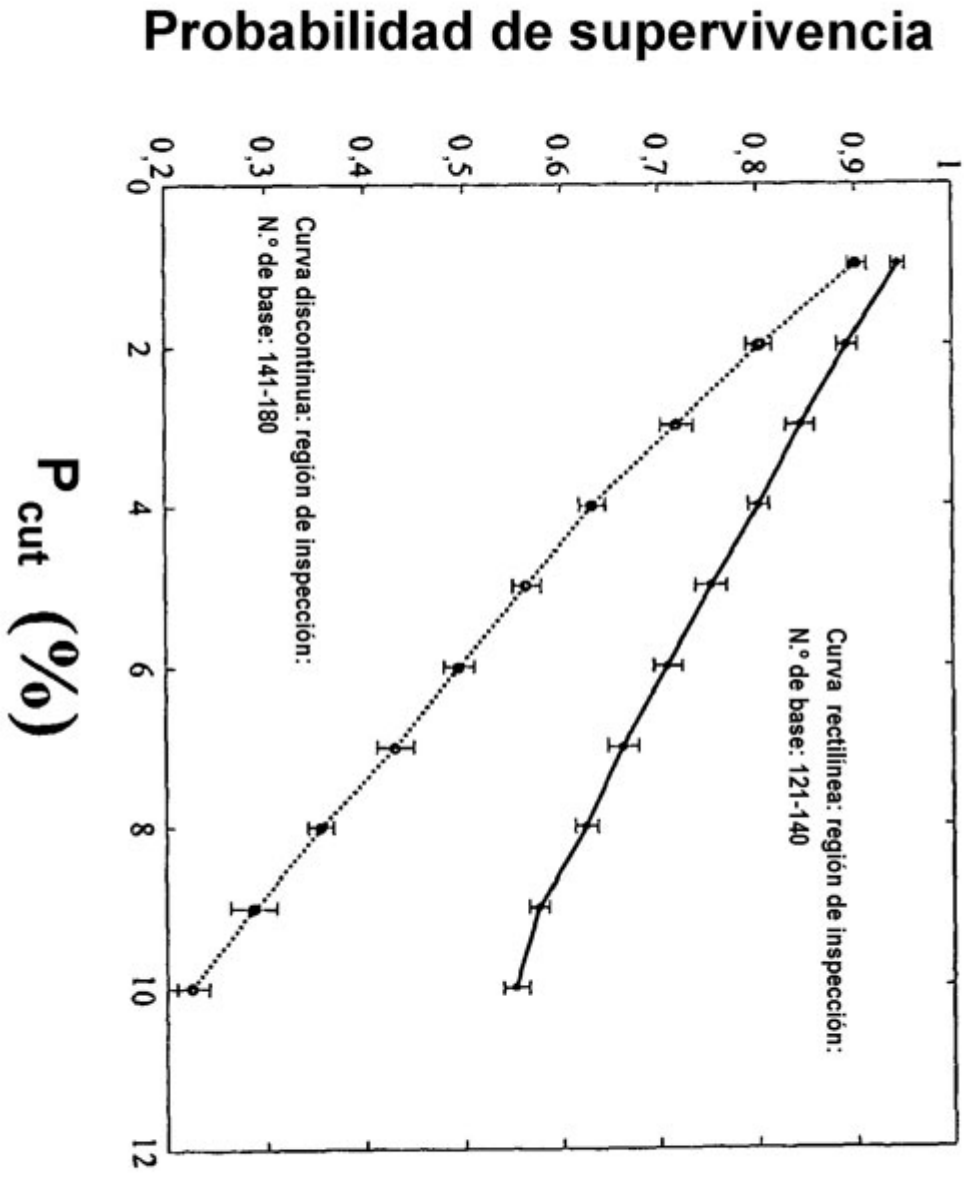


Fig 8