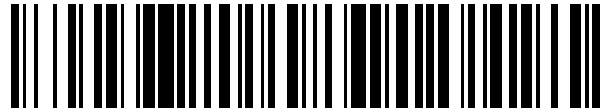


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 031**

51 Int. Cl.:

G01N 21/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.02.2012 E 12710670 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 2681532**

54 Título: **Determinación de ADN y/o ARN a partir de datos de espectrofotómetro UV-VIS**

30 Prioridad:

01.03.2011 US 201161447941 P

29.05.2011 EP 11168005

03.01.2012 GB 201200031

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

13.08.2015

73 Titular/es:

**TRINEAN NV (100.0%)
Dulle-Grietlaan 17 bus 3
9050 Gentbrugge, BE**

72 Inventor/es:

BOONEFAES, TOM

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 543 031 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

Determinación de ADN y/o ARN a partir de datos de espectrofotómetro UV-VIS

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la caracterización de muestras. Más en particular, la presente invención se refiere a métodos y sistemas para analizar muestras usando espectros registrados, tal como por ejemplo para analizar unas muestras que comprenden ADN y/o ARN.

10

Antecedentes de la invención

Aunque existen numerosas técnicas de análisis para la cualificación y cuantificación de muestras, sólo algunas técnicas de análisis son fáciles de realizar, rápidas y precisas como la espectrofotometría. Un ejemplo de espectrofotometría es la espectroscopía de absorbanza de UV-VIS. Durante tales experimentos, se irradian muestras con radiación UV-VIS de diferentes longitudes de onda, se detecta la radiación restante después del paso a través de la muestra y se determina la absorbanza a diferentes longitudes de onda. Debido a que componentes particulares mostrarán una absorbanza particular a longitudes de onda particulares, un perfil de absorbanza particular de este tipo puede usarse como huella dactilar, lo que permite, al compararse con espectros de referencia, identificar los componentes. Cuando se estudian muestras más complejas, las características de absorbanza en el espectro pueden ser más amplias, haciendo sustancialmente más difícil la interpretación de los espectros.

15

20

25

En el pasado se han descrito varias técnicas diferentes de análisis espectral. Algunos métodos son proporcionados permiten determinar la concentración o concentración relativa de los componentes de una muestra basándose en la aproximación del espectro medido con una combinación lineal de espectros convencionales, también denominados de referencia, de los componentes individuales. Una aproximación del espectro medido con espectros de referencia puede realizarse usando técnicas de minimización para el ajuste de los espectros de referencia a los espectros de absorción, como por ejemplo regresión de mínimos cuadrados o regresión de de las mínimas desviaciones absolutas. Tales métodos pueden aplicarse también de forma iterativa.

30

Se conocen métodos más complejos, tales como métodos que hacen uso de derivadas de un espectro, debido a que, entre otras cosas, estas últimas pueden permitir aumentar la insensibilidad a los desplazamientos de longitud de onda. Un ejemplo de un método que usa derivadas es el análisis de una mezcla de proteínas usando la segunda derivada del espectro de la muestra. Otro método conocido se basa en la computación matricial para determinar la concentración de un número de componentes químicos usando un número de datos espectrales predeterminados de cada componente químico, por el cual el número de datos espectrales previamente determinados es más grande que el número de componentes químicos que va a determinarse. Algunos de los métodos conocidos se basan en una correlación cruzada de muestras y espectros de referencia, ponderándose ambos mediante la transmitancia media por longitud de onda. Se han descrito unas aplicaciones particulares para analizar muestras con una composición conocida, tal como por ejemplo un análisis de la composición de una proteína usando espectroscopía electromagnética, análisis de ARN en el que las muestras se dividen por medios químicos en fracciones de AC y de GU y la composición de AC y de GU se determina entonces basada en la absorción a 260 nm.

35

40

45

Además, también se conocen algunos métodos que abordan espectros de componentes desconocidos. Se conocen métodos en los que la separación de espectros de componentes desconocidos a partir de muestras se basa en programación lineal o cuadrática restringida y muestra transformada, es decir, ondícula transformada. Otros métodos hacen uso de espectros de componentes aproximados mediante una correlación cruzada punto a punto de absorbanza y al hacer uso de una concentración conocida. Varias técnicas hacen uso de un análisis de componentes principales (PCA) para obtener espectros de referencia relevantes para el diagnóstico a partir de una base de datos de espectros asociados con patologías mediante lo cual una correlación con espectros de referencia se usa para ayudar al diagnóstico de una nueva muestra.

50

Spjotvoll y col. describen en *Technometrics* 24 (1982) una técnica para determinar espectros y concentraciones de mezclas de dos constituyentes sobre la base de un estimador de mínimos cuadrados. Un método se analiza para la identificación de dos compuestos químicos desconocidos y una estimación de su proporción en un conjunto de mezclas desconocidas de los dos compuestos. Está basado en un ajuste de mínimos cuadrados y un análisis de componentes principales para la separación mediante lo cual se introducen unas restricciones adicionales tales como que la suma de concentraciones sea igual a la unidad y que los espectros y las concentraciones sean no negativos.

55

60

El uso de datos de espectrofotómetro UV-VIS para la cuantificación o el análisis de ADN y / o de ARN sigue sin dar un paso adelante debido a la carencia de una técnica de análisis precisa y eficiente para los resultados obtenidos.

65

El documento US7786295 describe un método implementado por ordenador para analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una muestra que comprende ADN y / o ARN, siendo el método adecuado para aislar ADN a partir de muestras biológicas. El documento EP1524514 describe un método de medición de una

concentración de ADN usando datos de espectrofotómetro UV-VIS.

Por lo tanto, existe la necesidad de un método que permita un análisis de unas muestras que comprenden componentes de ADN y/o de ARN, en particular usando espectroscopía UV-VIS.

5

Resumen de la invención

Un objeto de realizaciones de la presente invención es la provisión de métodos y sistemas buenos para analizar espectros de espectroscopía UV-VIS de muestras y los correspondientes métodos y sistemas buenos para caracterizar muestras que comprenden ADN y/o ARN. La muestra de forma ventajosa comprende ADN bicatenario, a pesar de que la técnica también puede usarse para muestras que comprenden solo ARN. Los espectros de espectroscopía UV-VIS pueden ser espectros de absorbancia UV-VIS.

10

Es una ventaja de las realizaciones de acuerdo con la presente invención que se proporcionan sistemas y métodos que permiten ayudar al análisis de PCR, por ejemplo, sin la necesidad de purificar la mezcla de reacción, incluso si la mezcla de reacción es una mezcla de 4dNTP, oligonucleótidos cebadores, enzima polimerasa y ADN en la muestra.

15

Es una ventaja que métodos y sistemas de acuerdo con las realizaciones de la presente invención permitan la obtención de resultados relevantes y concluyentes.

20

El objetivo anterior se logra mediante un método y dispositivo de acuerdo con la presente invención.

La presente invención se refiere a un método implementado por ordenador para analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una muestra que comprende por lo menos ADN y/o ARN, el por lo menos ADN y / o ARN siendo de forma ventajosa por lo menos ADN bicatenario, comprendiendo el método la recepción de datos de espectrofotómetro UV-VIS, ajustar los datos de espectrofotómetro UV-VIS teniendo en cuenta por lo menos un espectro representativo de un par de bases siendo cualquiera entre adenina-timina (AT) o guanina-citosina (GC) o adenina-uracilo (AU), y obtener a partir del ajuste una cuantificación de una cantidad de ADN y/o ARN, siendo la obtención de forma ventajosa, la obtenida a partir del ajuste una cuantificación de una cantidad de ADN bicatenario. Es una ventaja de las realizaciones de la presente invención que datos de espectrofotómetro UV-VIS puedan usarse para caracterizar, sin una gran cantidad de conocimiento anterior, una muestra que contiene ADN y/o ARN. La cuantificación puede ser la cuantificación de una cantidad de ADN bicatenario (ADNbc).

25

30

Dicho ajuste puede comprender tener en cuenta un conjunto de espectros de referencia representativos que contiene de dos pares de bases distintas. Los espectros representativos que contienen pares de bases distintas pueden ser representativos de contenidos en pares de bases que difieren por lo menos un 20%, de forma ventajosa por lo menos un 30%, de forma más ventajosa por lo menos un 40%, por ejemplo, por lo menos un 50%.

35

Dicho ajuste puede comprender tener en cuenta un conjunto de dos espectros de referencia representativos de dos contenidos de GC distintos.

40

Dicho ajuste puede comprender tener en cuenta un conjunto de exactamente dos espectros de referencia representativos de dos contenidos de GC distintos.

45

Dicho ajuste puede comprender ajustar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una muestra que comprende ADN y / o ARN que tiene por lo menos 50 pares de bases, de forma ventajosa por lo menos 100 pares de bases. Es una ventaja de acuerdo con las realizaciones de la presente invención que un ajuste puede obtenerse usando un número restringido de espectros de referencia para pares de bases, dando como resultado un ajuste preciso y eficiente.

50

La muestra puede comprender ADN y el ajuste puede comprender usar una combinación de un conjunto de espectros de referencia representativos de pares de bases y espectros de referencia que son representativos de bases nitrogenadas separadas.

55

Dicho ajuste usando una combinación de espectros de referencia representativos de pares de bases y espectros de referencia que son representativos de bases nitrogenadas separadas, puede comprender ajustar usando espectros que son los espectros de diferencia entre espectros de referencia representativos de pares de bases y espectros de referencia que son representativos de bases nitrogenadas separadas. Es una ventaja de las realizaciones de acuerdo con la presente invención, que para el análisis de una muestra que comprende ADN, el equilibrio de AT y de GC se tiene en cuenta de forma automática. Es una ventaja de las realizaciones de la presente invención que solo el ADN bicatenario formado se cuantifica y no es una mezcla del ADNbc y los amplicones formados, lo que puede tener lugar, por ejemplo, en una PCR.

60

Los espectros de diferencia entre espectros de referencia representativos de pares de bases y espectros de referencia que son representativos de bases nitrogenadas separadas, pueden ser espectros que se obtienen mediante la sustracción con respecto a un espectro de referencia dado representativo de un par de bases dado, los

65

espectros de referencia que son representativos de las bases nitrogenadas separadas correspondientes.

El conjunto de espectros representativos de pares de bases puede consistir en dos espectros de referencia representativos de muestras que tienen dos contenidos de GC distintos, por ejemplo, dos contenidos de GC extremos.

Los espectros de referencia representativos de bases nitrogenadas separadas pueden ser espectros de referencia para adenina, guanina, timina, citosina y / o uracilo.

El método puede adaptarse para analizar una reacción de PCR de una muestra que comprende ADN, mediante lo cual la obtención puede comprender determinar una cantidad de ADN bicatenario que se forma durante o después de una reacción de PCR. Es una ventaja de las realizaciones de acuerdo con la presente invención que pueda hacerse un análisis de una reacción de PCR de una muestra que comprende ADN usando espectrometría UV-VIS, sin la necesidad de purificar en primer lugar la mezcla de reacción que se forma durante la reacción de PCR.

El ajuste además puede comprender tener en cuenta una componente espectral para un componente de contaminación.

Tener en cuenta una componente espectral para un componente de contaminación puede comprender tener en cuenta una componente espectral, por ejemplo, para uno o más de; trimetilglicina, guanidinatiocianato, fenol, ácido etilendiaminotetraacético, proteínas o hemoglobina. Es una ventaja de las realizaciones de acuerdo con la presente invención que pueda obtenerse una compensación para uno de los contaminantes más importantes en la reacción de PCR.

Ajustar datos del espectrofotómetro UV-VIS de una muestra puede comprender ajustar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una mezcla que comprende desoxinucleótidos trifosfato, oligonucleótidos cebadores y polimerasa y ADN. Es una ventaja de las realizaciones de acuerdo con la presente invención que pueden usarse los datos de espectrofotómetro UV-VIS que se registran directamente sobre la mezcla de partida de PCR, a pesar de que estos tienen un valor de densidad óptica alto a 260 nm, evitando de este modo la necesidad de procesar, por ejemplo, purificar, la mezcla de partida de PCR antes de la caracterización.

El ajuste además puede comprender tener en cuenta una o más componentes espectrales representativas de la dispersión en la muestra.

El ajuste además puede comprender tener en cuenta una o más componentes espectrales representativas de la turbidez en la muestra.

La presente invención también se refiere a un sistema implementado por ordenador para analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una o más muestras que comprenden ADN y/o ARN, de forma ventajosa una o más muestras que comprenden por lo menos ADN bicatenario, comprendiendo el sistema un medio de entrada para recibir dichos datos de espectrofotómetro UV-VIS, un medio de procesamiento que está programado para el ajuste de los datos de espectrofotómetro UV-VIS teniendo en cuenta por lo menos un espectro representativo de un par de bases que es cualquiera entre: adenina-timina (AT) o guanina-citosina (GC) o adenina-uracilo (AU), y obtener a partir del ajuste una cuantificación de una cantidad de ADN y / o ARN, de forma ventajosa una cantidad de ADN bicatenario, y un medio de salida para emitir una cuantificación de una cantidad de ADN y/o ARN, de forma ventajosa la cantidad de ADN bicatenario, para las una o más muestras bajo estudio.

Dicho medio de procesamiento puede adaptarse para realizar un ajuste tal como se describe en cualquiera de los métodos que se han mencionado anteriormente.

La presente invención también se refiere al uso de un método tal como se ha descrito anteriormente para cuantificar una cantidad de ADN y/o ARN.

La presente invención además se refiere a un producto de programa informático para, si se implementa en una unidad de procesamiento, realizar un método tal como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también se refiere a un medio de soporte de datos que comprende un producto de programa informático de este tipo y/o a la transmisión del mismo a través de una red de área amplia o local.

El aspecto descrito anteriormente puede ser parte de, puede corresponderse con, puede comprender las etapas o características de, o puede hacer uso de los siguientes aspectos de la presente invención.

También se describe un método para analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una o más muestras, consistiendo las una o más muestras en un número de constituyentes, comprendiendo el método obtener una información anterior para las una o más muestras con respecto a sus constituyentes, obtener datos de espectrofotómetro UV-VIS para las una o más muestras, definir un número de componentes que se superponen que

contribuyen en los datos de espectrofotómetro UV-VIS, comprendiendo el número de componentes que se superponen uno o más componentes que están asignados a constituyentes conocidos de las una o más muestras y comprendiendo el número de componentes uno o más componentes que no pueden asignarse a constituyentes conocidos de las una o más muestras, usando la información anterior para las una o más muestras con respecto a sus constituyentes y usando los datos de espectrofotómetro UV-VIS, estimar la composición de constituyentes y las contribuciones de componente a los datos del espectrofotómetro UV-VIS para el número de componentes para las una o más muestras mediante la minimización de un resto entre los datos de espectrofotómetro UV-VIS y un ajuste sobre la base de dicha composición de constituyentes y dichas contribuciones de componente, obteniendo de este modo una información con respecto al uno o más componentes que no pueden asignarse a constituyentes conocidos de las una o más muestras. Es una ventaja que el método de análisis prevea una detección precisa de contribuciones al espectro que se originan en constituyentes modificados, en la interacción de diferentes constituyentes o en la contaminaciones en las una o más muestras.

La estimación de la composición de los constituyentes y las contribuciones de componente a los datos de espectrofotómetro UV-VIS para el número de componentes para las una o más muestras mediante la minimización de un resto entre los datos de espectrofotómetro UV-VIS y un ajuste basado en dicha composición de constituyentes y dichas contribuciones de componente, puede realizarse de forma iterativa hasta que se obtiene un resto más pequeño que un nivel previamente determinado. Esto es una ventaja de usar un procedimiento iterativo porque pueden obtenerse una precisión aumentada para el ajuste y la composición constituyente y la contribución del componente correspondiente.

El método además puede comprender realizar una verificación cruzada de la información anterior basada en cualquiera o más constituyentes de la composición, la contribución del constituyente o el resto entre los datos de espectrofotómetro UV-VIS y el ajuste. Es una ventaja que una verificación cruzada con respecto a los resultados obtenidos pueda realizarse usando la información anterior con respecto a las una o más muestras.

Dicha información anterior puede comprender unas contribuciones de referencia en datos de espectrofotómetro UV-VIS para componentes que están asignados a constituyentes conocidos y dicha estimación de los constituyentes de la composición y las contribuciones del componente, puede comprender estimar las contribuciones de componente al espectrofotómetro UV-VIS para todos los componentes basada en las contribuciones de referencia y determinar una estimación para los constituyentes de la composición basada en la minimización del resto entre el espectrofotómetro UV-VIS y el ajuste basado en la contribución de dicho componente estimado a los datos de espectrofotómetro UV-VIS para todos los componentes. Es una ventaja que una información de composición precisa de las una o más muestras pueda obtenerse basada en los espectros de referencia de los constituyentes presentes en las una o más muestras, teniendo en cuenta la presencia de contribuciones desconocidas en los datos del espectrofotómetro UV-VIS.

Dicha información anterior puede comprender información de la composición de constituyentes para las una o más muestras, para los constituyentes conocidos, y dicha estimación de la composición de constituyentes y las contribuciones del componente pueden comprender la estimación de la composición de constituyentes para todos los constituyentes, basado en la información anterior sobre la información de composición de constituyentes para las una o más muestras para los constituyentes conocidos, y determinar una estimación de la contribución del componente a los datos de espectrofotómetro UV-VIS basados en la minimización del resto entre los datos de espectrofotómetro UV-VIS y el ajuste basado en dicha composición de constituyentes estimada para todos los constituyentes. Es una ventaja que una información de la composición precisa de las una o más muestras pueda obtenerse basada en los espectros de referencia de los constituyentes presentes en las una o más muestras, teniendo en cuenta la presencia de contribuciones desconocidas en los datos de espectrofotómetro UV-VIS.

La composición de constituyentes y las contribuciones de componente pueden interrelacionarse mediante un modelo que define unos factores de ponderación para las contribuciones de componente como una función de la composición de constituyentes y en el que determinar una estimación para la composición de constituyentes o para la contribución de componente comprende tener en cuenta los factores de ponderación. Es una ventaja que la composición de constituyentes en las muestras puede tenerse en cuenta.

Puede realizarse un análisis de los datos de espectrofotómetro para una pluralidad de muestras, y dicha estimación de forma iterativa puede realizarse para aquellas muestras que tienen el resto más pequeño.

Los componentes que no pueden asignarse a constituyentes conocidos de las una o más muestras pueden ser representativos de cualquiera o más de los constituyentes modificados, efectos contiguos de diferentes constituyentes o contaminaciones en las una o más muestras. Otro componente que, de forma ventajosa, puede tenerse en cuenta por componentes que no pueden asignarse a constituyentes conocidos de las una o más muestras, puede ser representativo de la turbidez causada por los efectos de agregación o concentración. El método puede comprender emitir una contribución en relación con tal turbidez. Es una ventaja que pueda obtenerse una cuantificación buena y / o precisa de los componentes en las muestras que muestran una turbidez alta, por ejemplo, basadas en un conocimiento anterior de espectros de referencia de los componentes en la muestra. Otro componente que, de forma ventajosa, puede tenerse en cuenta para componentes que no puedan asignarse a

- constituyentes conocidos de las una o más muestras, puede ser representativo de la dispersión por micropartículas residuales. Tales partículas pueden encontrarse presentes de forma no deliberada en la muestra, tal como por ejemplo introducidas por un procesamiento anterior de la muestra. En un ejemplo, tales partículas residuales pueden ser micropartículas magnéticas. El método puede comprender emitir una contribución en relación con tal dispersión a partir de partículas residuales. Es una ventaja que una cuantificación buena y / o precisa de componentes en muestras que comprenden partículas residuales pueda obtenerse, por ejemplo, sobre la base de un conocimiento anterior de espectros de referencia de componentes en la muestra.
- 5
- El método puede comprender usar datos espectrofotométricos de una pluralidad de muestras, en el que las muestras comprenden por lo menos una muestra en la que por lo menos un constituyente desconocido se encuentra presente y por lo menos una muestra en la que el por lo menos un constituyente desconocido se encuentra ausente.
- 10
- El número de componentes puede determinarse mediante un análisis de componentes.
- 15 El número de componentes puede determinarse sobre la base de un análisis de componentes principales.
- También se describe un sistema para analizar los datos de espectrofotómetro UV-VIS de una o más muestras, consistiendo las una o más muestras en un número de constituyentes, comprendiendo el sistema un medio de entrada para obtener una información anterior para las una o más muestras con respecto a sus constituyentes y para obtener datos de espectrofotómetro UV-VIS para las una o más muestras, un medio de procesamiento que está programado para definir un número de componentes que contribuyen en los datos de espectrofotómetro UV-VIS, comprendiendo el número de componentes uno o más componentes que están asignados a constituyentes conocidos de las una o más muestras y comprendiendo el número de componentes uno o más componentes que no pueden asignarse a constituyentes conocidos de las una o más muestras, estando además el medio de procesamiento programado para usar la información anterior para las una o más muestras con respecto a sus constituyentes y usar los datos de espectrofotómetro UV-VIS, estimar la composición de constituyentes y las contribuciones de componente a los datos de espectrofotómetro UV-VIS para el número de componentes para las una o más muestras mediante la minimización de un resto entre los datos del espectrofotómetro UV-VIS y un ajuste sobre la base de dicha composición de constituyentes y dichas contribuciones de componente, obteniendo de este modo una información con respecto al uno o más componentes que no pueden asignarse a constituyentes conocidos de las una o más muestras.
- 20
- 25
- 30
- También se describe el uso de un método tal como se describió anteriormente para identificar y / o cuantificar contaminantes en muestras de ADN y / o ARN. Dichos contaminantes pueden ser contaminación con proteínas. Los contaminantes pueden ser contaminantes que inhiben la PCR. Se describe también el uso de un método tal como se describió anteriormente para cuantificar una cantidad de ADN bicatenario en una mezcla de ADN bicatenario y ADN y / o ARN monocatenario.
- 35
- También se describe el uso de un método tal como se ha descrito anteriormente para obtener la composición de un polinucleótido o proteína.
- 40
- También se describe el uso de un método tal como se ha descrito anteriormente para la cuantificación de la eficiencia de modificación en una muestra.
- 45
- También se describe el uso de un método tal como se ha descrito anteriormente para validar una composición de muestra o un constituyente de la misma.
- También se describe un producto de programa informático para, si se implementa en una unidad de procesamiento, realizar un método tal como se ha descrito anteriormente. Esta también se refiere a un soporte de datos que almacena el producto de programa informático y a una transmisión del producto de programa informático a través de una red.
- 50
- Es una ventaja que se obtiene un análisis de datos potente de espectros de espectroscopía UV-VIS.
- 55
- Es una ventaja que puede obtenerse una buena cuantificación, tanto para aplicaciones de rutina como para aplicaciones más complejas.
- Es una ventaja que sobre la base de un conocimiento anterior en una o más muestras, pueden obtenerse espectros de referencia precisos para componentes en la muestra.
- 60
- Es una ventaja que sobre la base de un conocimiento anterior de espectros de referencia de uno o más componentes en las una o más muestras, puede obtenerse una información precisa de la concentración de los componentes en la muestra.
- 65
- Es una ventaja que se proporcionan métodos y sistemas que prevén obtener unos resultados relevantes y concluyentes.

Aspectos particulares y preferidos de la invención se exponen en las reivindicaciones independientes y dependientes adjuntas. Las características a partir de las reivindicaciones dependientes pueden combinarse con las características de las reivindicaciones independientes y con las características de otras reivindicaciones dependientes según sea apropiado y no meramente tal como se ha expuesto de forma explícita en las reivindicaciones. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes a partir de y se esclarecerán con referencia a la realización o realizaciones que se describen en lo sucesivo en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra un diagrama de flujo de un método para analizar espectros de acuerdo con una realización de la presente invención.

La figura 2 ilustra un ejemplo de un flujo de datos tal como puede obtenerse usando las realizaciones de la presente invención.

La figura 3 ilustra un ejemplo de un flujo de datos tal como puede obtenerse usando las realizaciones de la presente invención.

La figura 4 ilustra las diferentes formas espectrales para nucleótidos libres, nucleótidos en ADN monocatenario y ADN bicatenario para adenina y timina (gráfica superior) y para guanina y citosina (gráfica inferior), tal como pueden usarse de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

De la figura 5a a la figura 5f se ilustran unos resultados de simulación que demuestran la variación espectral para diferentes longitudes de cadenas de pares de bases en función del contenido de GC, tal como puede usarse de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

La figura 6 es otra ilustración de la variación espectral en función de la longitud de cadenas de pares de bases, tal como puede usarse de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

La figura 7a, la figura 7b, la figura 8a y la figura 8b ilustran resultados de la medición obtenida con diferentes técnicas de ajuste para distinguir entre una muestra que comprende ADN bicatenario y una muestra que no comprende ADN bicatenario, tal como puede usarse en las realizaciones de la presente invención.

La figura 9 ilustra espectros espectroscópicos de ARN y ADN mezclados, tal como puede analizarse usando métodos de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

De la figura 10 a la figura 11 ilustran unos ejemplos de desconvolución de dos muestras que comprenden ARN, analizadas usando métodos de acuerdo con las realizaciones de la presente invención.

Los dibujos son solo esquemáticos y son no limitantes. En los dibujos, el tamaño de algunos de los elementos puede exagerarse y no dibujarse a escala para fines ilustrativos.

No debería interpretarse como limitantes del alcance cualquier signo de referencia alguno en las reivindicaciones.

En los diferentes dibujos, los mismos signos de referencia hacen referencia a los mismos elementos, o a unos análogos.

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares y con referencia a determinados dibujos, pero la invención no está limitada a las mismas sino solo a las reivindicaciones. Los dibujos que se describen son solo esquemáticos y son no limitantes. En los dibujos, el tamaño de algunos de los elementos puede exagerarse y no dibujarse a escala para fines ilustrativos. Las dimensiones y las dimensiones relativas no se corresponden con unas reducciones reales para la práctica de la invención.

Además, las expresiones primero, segundo y similares, en la descripción y en las reivindicaciones, se usan para distinguir entre elementos similares y no necesariamente para describir una secuencia, bien de forma temporal, o de forma espacial, en una clasificación o de cualquier otra forma. Ha de entenderse que las expresiones que se usan de este modo son intercambiables bajo unas circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención que se describen en el presente documento pueden funcionar en unas secuencias que no sean las que se describen o las que se ilustran en el presente documento.

Además, las expresiones parte de arriba, por debajo de y similares en la descripción y las reivindicaciones se usan para fines descriptivos y no necesariamente para describir posiciones relativas. Ha de entenderse que las expresiones que se usan de este modo son intercambiables bajo circunstancias apropiadas y que las realizaciones de la invención que se describen en el presente documento pueden funcionar en unas orientaciones que no sean las que se describen o las que se ilustran en el presente documento.

Ha de observarse que la expresión "comprendiendo / que comprende", usada en las reivindicaciones, no debería interpretarse como que está restringida a los medios que se han enunciado a continuación de lo anterior; esta no excluye otros elementos o etapas. Por lo tanto, esta ha de interpretarse como que especifica la presencia de las características expuestas, números enteros, etapas o componentes tal como se haga referencia a los mismos, pero no excluye la presencia o la adición de otras una o más características, números enteros, etapas o componentes, o

grupos de los mismos. Por lo tanto, el alcance de la expresión “un dispositivo que comprende unos medios A y B” no debería limitarse a dispositivos que consisten solo en los componentes A y B. Esto quiere decir que, con respecto a la presente invención, los únicos componentes relevantes del dispositivo son A y B.

- 5 La referencia por la totalidad de la presente memoria descriptiva a “una realización” quiere decir que un rasgo distintivo, estructura o característica particular que se describe en conexión con la realización, está incluido en por lo menos una realización de la presente invención. Por lo tanto, las apariciones de las expresiones “en una realización” o “en una realización” en diversos lugares a lo largo de la totalidad de la presente memoria descriptiva no hacen necesariamente referencia a la misma realización, pero puede que lo hagan. Además, los rasgos distintivos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier forma adecuada, tal como sería evidente para un experto en la materia a partir de la presente divulgación, en una o más realizaciones.

15 De forma similar, debería apreciarse que en la descripción de realizaciones a modo de ejemplo de la invención, que diversas características de la invención a veces se agrupan unas con otras en una única realización, figura o descripción de la misma para el fin de racionalizar la divulgación y de ayudar a la comprensión de uno o más de los diversos aspectos inventivos. Este método de divulgación, no obstante, no ha de interpretarse como que refleja una intención de que la invención que se reivindica requiera más características de las que se enuncian de forma expresa en cada reivindicación. En su lugar, tal como reflejan las siguientes reivindicaciones, los aspectos inventivos residen en menos que todas las características de una única realización divulgada anterior. Por lo tanto, las reivindicaciones que siguen a la descripción detallada se incorporan de forma expresa en la presente descripción detallada, con cada reivindicación suponiendo por sí misma una realización separada de la presente invención.

20 Además, mientras que algunas realizaciones que se describen en el presente documento incluyen algunas características pero no otras incluidas en otras realizaciones, se pretende que combinaciones de características de diferentes realizaciones se encuentren dentro del alcance de la invención, y forman diferentes realizaciones, tal como entenderían los expertos en la materia. Por ejemplo, en las siguientes reivindicaciones, cualquiera de las realizaciones que se reivindican puede usarse en cualquier combinación.

30 Cuando, en realizaciones de la presente invención, se hace referencia a datos de espectrofotómetro, se hace referencia a una intensidad de reflectancia, de transmitancia o de absorbancia a una longitud de onda dada o como una función de la longitud de onda. De forma ventajosa, el método puede aplicarse a datos de espectrofotómetro que son un espectro de espectrofotómetro, indicando una intensidad como una función de la longitud de onda. En realizaciones ventajosas, los datos son datos de absorbancia, representativos de la absorción que ha tenido lugar en las una o más muestras.

35 Realizaciones de la presente invención se dirigen a métodos y sistemas para analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS. Cuando se hace referencia a UV-VIS, se hace referencia a una región de longitud de onda que tiene una longitud de onda superior en la región de 700 nm a 1100 nm y una longitud de onda inferior en la región de 150 nm a 300 nm.

40 Cuando, en realizaciones de la presente invención, se hace referencia a componentes que contribuyen a los datos de espectrofotómetro UV-VIS, se hace referencia a componentes a una fracción de la intensidad para una o más longitudes de onda en los datos de espectrofotómetro, por ejemplo, espectro de espectrofotómetro. Un componente de este tipo puede ser directamente asignable a un constituyente en las una o más muestras o puede ser no, o no directamente, asignable a un constituyente en las una o más muestras.

50 Cuando, en realizaciones de la presente invención, se hace referencia a componentes que no pueden asignarse a constituyentes conocidos de las una o más muestras, se hace referencia a componentes que no se corresponden con o para los que no se conoce aún que estos se correspondan con una característica de absorción físico-química de los constituyentes de las una o más muestras. Por lo tanto, los componentes no se corresponden necesariamente con una característica de absorción físico-química de los constituyentes. No es necesario que los componentes se correspondan con unos constituyentes que tengan una contribución significativa, por ejemplo, absorbancia, dentro de la región de longitud de onda bajo estudio.

55 Cuando, en realizaciones de la presente invención, se hace referencia a constituyentes de una o más muestras, se hace referencia a elementos biológicos o no biológicos tales como elementos químicos que se encuentran presentes en la muestra. Tales constituyentes pueden ser, por ejemplo, uno de los siguientes o elementos o grupos de elementos de los mismos: biopolímeros, moléculas orgánicas pequeñas, metabolitos tales como glucosa o etanol, proteínas, péptidos, segmentos de ácido nucleico, oligonucleótidos, oligonucleótidos que contienen una o más modificaciones tales como por ejemplo marcadores de colorantes fluorescentes o cromóforos, modificaciones de ligador químico tales como aldehído, fosfato, modificaciones de amina o de tiol, marcadores de afinidad tales como biotina, componentes reactivos tales como enzimas (ALP, HRP), bases alternativas tales como desoxiuracilo, desoxiinosina, fosfotiolatos, ácidos nucleicos bloqueados, polinucleótidos, nucleótidos, oligonucleótidos, ácidos péptido nucleicos, anticuerpos y variaciones de los mismos tales como por ejemplo nanocuerpos o alfacuerpos, micro- y nanopartículas que se añaden bien de forma deliberada o bien de forma no deliberada, partículas magnéticas o no magnéticas, lípidos, micelas, vesículas, partículas virales, complejos de metal, colorantes de

intercalación y polímeros tales como derivados de politiofeno, cromógenos tales como p-NPP, sales de tetrazolio, reactivos de tinción tales como Coomassie, azul de metileno, eosina, moléculas tales como productos farmacéuticos de moléculas pequeñas, antibióticos o fármacos, moléculas con un efecto de regulación en procesos enzimáticos tales como promotores, activadores, inhibidores o cofactores, virus, bacterias, células, componentes celulares, membranas celulares, esporas, ADN, ARN, microorganismos y fragmentos y productos. Tales constituyentes también pueden ser, por ejemplo, elementos químicos tales como elementos químicos presentes en un producto farmacéutico o un producto químico.

Cuando, en realizaciones de acuerdo con la presente invención, se hace referencia a unos componentes que se superponen, se hace referencia al hecho de que la contribución de componente al espectro de tales componentes es significativa a la misma longitud de onda o en el mismo intervalo de longitud de onda.

Cuando, en realizaciones de la presente invención, se hace referencia a la turbidez, se hace referencia al enturbiamiento o nebulosidad de un fluido causado por partículas individuales que, en general, son invisibles a simple vista.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una o más muestras. Una desventaja típica de datos de espectrofotómetro UV-VIS de datos complejos es que diferentes contribuciones, por ejemplo, que se corresponden con diferentes constituyentes en la muestra o con unos constituyentes desconocidos, darán como resultado unas contribuciones que se superponen. Esto da como resultado unos espectros de banda ancha, mediante lo cual, las diferentes contribuciones no son, como tales, identificables a partir de los espectros en forma de resaltes o picos. Realizaciones de la presente invención permiten analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS de tales muestras complejas dando como resultado espectros con una absorción de banda ancha desarrollados mediante contribuciones que se superponen. Métodos de acuerdo con realizaciones de la presente invención pueden usarse para el análisis de una o más muestras. Mientras que el análisis de una única muestra es posible, el método es especialmente adecuado para analizar datos de espectrofotómetro de múltiples muestras. Las una o más muestras comprenden un número de constituyentes. Los métodos de acuerdo con realizaciones de la presente invención son especialmente adecuados para analizar unos datos para muestras que tienen dos o más, de forma ventajosa tres o más constituyentes. De acuerdo con realizaciones de la presente invención, los métodos son especialmente adecuados para analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una muestra que comprende por lo menos ADN y / o ARN. El método de acuerdo con realizaciones de la presente invención, que es un método implementado por ordenador, comprende recibir datos de espectrofotómetro UV-VIS, ajustar los datos de espectrofotómetro UV-VIS teniendo en cuenta por lo menos un espectro representativo de un par de bases que es cualquiera de adenina-timina (AT) o guanina-citosina (GC) o adenina-uracilo, y obtener a partir del ajuste una cuantificación de una cantidad de ADN y / o ARN. La recepción de datos de espectrofotómetro, UV-VIS puede comprender obtener datos de espectrofotómetro UV-VIS previamente almacenados o medir datos de espectrofotómetro UV-VIS para las una o más muestras que comprenden ADN y / o ARN. Tales datos de espectrofotómetro UV-VIS por lo general pueden ser un espectro del espectrofotómetro, a pesar de que también puede usarse información a una o más longitudes de onda individuales o intervalos de longitud de onda. La muestra que comprende ADN y / o ARN puede comprender ADN monocatenario, ADN bicatenario (ADNbc) y / o ARN.

De acuerdo con realizaciones de la presente invención, una etapa del método comprende ajustar los datos de espectrofotómetro UV-VIS teniendo en cuenta por lo menos un espectro representativo de un par de bases que es cualquiera de adenina-timina (AT) o guanina-citosina (GC) o adenina-uracilo. En algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, se usan exactamente dos espectros representativos de un par de bases que es cualquiera de adenina-timina (AT) o guanina-citosina (GC) o adenina-uracilo. Más en particular, en algunas realizaciones se hará uso de dos espectros de referencia representativos de muestras que tienen unos contenidos de GC distintos. En otras realizaciones a modo de ejemplo, tales componentes espectrales se usan en combinación con otros espectros, o se combinan con otros espectros de tal modo que se obtienen nuevos espectros que pueden usarse para el ajuste. Un ejemplo de diferentes formas espectrales en las que los nucleótidos adenina, timina, guanina y citosina pueden tener lugar se muestra en la figura 4, que ilustra la aparición a partir de adenina y timina por un lado (parte superior del dibujo) y de guanina y citosina por otro lado (parte inferior del dibujo) así como una combinación de nucleótidos libres (curva A+T 402; curva G+C 412) respectivamente, como lo que tiene lugar en el ADN monocatenario (curva A+T 404; curva G+C 414) y lo que tiene lugar como en las pares de bases en el ADN bicatenario (curva A+T 406; curva G+C 416). Las diferentes formas espectrales pueden identificarse con claridad. Cuando, en realizaciones de acuerdo con la presente invención, se hace referencia a un espectro representativo de un par de bases, se hace referencia al espectro en el que los nucleótidos existen como pares de bases en ADN bicatenario o a un espectro que comprende unas características espectrales para la situación en la que nucleótidos existen como pares de bases en ADN bicatenario.

El método de acuerdo con realizaciones de la presente invención también comprende obtener a partir del ajuste, una cuantificación de una cantidad de ADN y / o ARN. La obtención de una cuantificación de una cantidad de ADN y / o ARN puede comprender, por ejemplo, obtener una cantidad de ADN monocatenario, una cantidad de ADN bicatenario y / o una cantidad de ARN. Realizaciones de la presente invención pueden adaptarse para determinar una cantidad de ADN bicatenario y obtener, a partir del mismo, una cantidad de ADN monocatenario o una cantidad de ARN.

A modo de ilustración, no estando limitadas a esto las realizaciones de la presente invención, un número de realizaciones particulares se describirá adicionalmente a continuación.

En un primer conjunto de realizaciones particulares de acuerdo con la presente invención, se divulga un método implementado por ordenador tal como se ha descrito anteriormente, mediante lo cual el ajuste de datos de espectrofotómetro UV-VIS de una muestra que comprende ADN y/o ARN, comprende ajustar los datos de espectrofotómetro UV-VIS usando exactamente dos espectros de referencia representativos de pares de bases. En la presente realización, estos dos espectros de referencia son espectros representativos de dos muestras que tienen un contenido en pares de bases particular distinto, tal como por ejemplo un contenido de GC. Por lo general, en tales realizaciones un espectro de referencia será representativo de una muestra que tiene un contenido de GC más alto, mientras que el otro espectro de referencia será representativo de una muestra que tiene un contenido de GC más bajo. Cuando se hace referencia a unos contenidos de GC distintos, la diferencia en cuanto al contenido puede ser, por ejemplo, por lo menos un 20%, de forma ventajosa por lo menos un 30 %, de forma más ventajosa por lo menos un 40%, como por ejemplo por lo menos un 50%. Tales realizaciones pueden ser especialmente adecuadas para el ajuste de unas muestras que comprenden unas cadenas de ADN y/o ARN que tienen por lo menos 50 pares de bases, de forma ventajosa por lo menos 100 pares de bases. Un ajuste eficiente puede obtenerse de este modo. Esto último se basa en la observación sorprendente de que la variación espectral para ADN con secuencias generadas de forma aleatoria que tienen una longitud suficiente, puede explicarse plenamente teniendo en cuenta el contenido de GC, y puede ajustarse de forma precisa usando dos espectros representativos de muestras que tienen un contenido de GC distinto.

En realizaciones particulares de acuerdo con la presente invención, se divulga un método para analizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sobre la base del método implementado por ordenador que se ha descrito anteriormente. Para una reacción de PCR, por lo general se comienza a partir de una mezcla que comprende desoxinucleótidos trifosfato, oligonucleótidos cebadores, polimerasa y una determinada cantidad de ADN. Los dNTP en la mezcla por lo general tienen una densidad óptica alta a 260 nm enmascarando la contribución de los cebadores, la diana y el amplicón, volviendo de este modo difícil analizar tales muestras con respecto a una discriminación específica entre los diferentes componentes. Usar realizaciones de acuerdo con la presente invención permitirá evaluar y/o analizar la reacción de PCR, incluso sin purificar la mezcla de reacción, es decir, sin separar componentes en la mezcla de reacción. Usando realizaciones de acuerdo con la presente invención, la cantidad de ADN bicatenario que se forma, que es por lo general relativamente pequeña, puede cuantificarse de forma precisa, así como la pérdida de desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP). El amplicón formado puede diferir de forma sustancial en cuanto al contenido de GC, dependiente de la secuencia final. La forma variable del espectro de ADN bicatenario, que es dependiente del contenido de GC tal como se ha indicado anteriormente, puede ajustarse usando realizaciones de la presente invención tal como se ilustra en la presente descripción. Además, en algunas realizaciones, también la dependencia de la forma con la mezcla de dNTP libres puede tenerse en cuenta. Esta dependencia de la forma puede estar causada, por ejemplo, por el grado de consumo o de incorporación de nucleótidos A+T y G+C.

En un segundo conjunto de realizaciones particulares, se describe un método para analizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el que para el ajuste se usan dos espectros de referencia para distintas muestras que tienen un contenido en pares de bases distinto, como por ejemplo, un contenido de GC distinto, en combinación con espectros de referencia para bases nitrogenadas separadas. Estos últimos espectros de referencia pueden ser, por ejemplo, espectros de referencia para componentes AT y GC respectivamente, que son combinaciones de espectros individuales para las bases nitrogenadas y que no son el espectro de dinucleótidos. Al hacer uso de estos espectros de referencia puede obtenerse un ajuste apropiado. Adicionalmente, también otros componentes pueden tenerse en cuenta para el ajuste, tal como por ejemplo un componente para la dispersión o turbidez, un componente para una contaminación tal como por ejemplo para uno o más de trimetilglicina, guanidinatiocianato, fenol, ácido etilendiaminotetraacético, proteínas o hemoglobina, etc.

En un tercer conjunto de realizaciones particulares, se describe un método para analizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en el que para el ajuste se hace uso de un espectro de la muestra antes de que haya tenido lugar la acción de PCR y dos espectros de referencia que son espectros de diferencia que expresan la incorporación de bases nitrogenadas, por ejemplo, nucleótidos AT y GC. Tales espectros de diferencia se obtienen como el resultado de la diferencia del espectro de pares de bases de por ejemplo, pares de bases, AT, respecto a GC en una molécula bicatenaria, por un lado y el espectro que se obtiene para bases nitrogenadas separadas, por ejemplo, mezclas de nucleótidos AT, con respecto a GC por otro lado.

A modo de ilustración, no estando limitadas por esto las realizaciones de la presente invención, se proporcionan unos resultados de simulación, que ilustran cómo las técnicas de desconvolución que se han descrito anteriormente, pueden usarse de forma ventajosa para analizar unas muestras que comprenden ADN.

Un primer conjunto de resultados de simulación ilustra que para ADN bicatenario largo, todas las diferencias espectrales pueden explicarse usando dos componentes espectrales, por ejemplo, una componente espectral de AT y una componente espectral de GC. El conjunto de resultados de simulación comprende ajustar para moléculas de ADN bicatenario con tamaños que varían desde 10 pares de bases a 500 pares de bases, con incrementos de 10 pares de bases. El contenido de GC para estas partículas varía de un 20% a un 80% con incrementos de un 10%. Para cada clase de muestras, se generaron 200 secuencias aleatorias.

A continuación, se realizó una predicción de los espectros de absorción para todas las secuencias usando un método tal como se describe en el documento "Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids", Biophysical Chemistry 133 (2008) 66 - 70 de Tataurov y col. Los diferentes espectros se muestran en la figura 5 para una selección de diferentes longitudes de ADN bicatenario. La figura 5(a), 5(b), 5(c), 5(d), 5(e), 5(f) ilustran los espectros para ADNbc que tienen una longitud de 10, 20, 50, 100, 200 y 500

pares de bases respectivamente.

Para cada clase, se estudió la dispersión de los 200 espectros en cada clase y se identificó si puede observarse o no una dependencia como una función del contenido diferente de GC. Puede verse que para moléculas de ADN bicatenario cortas, una gran variación se encuentra presente. No se obtiene una dependencia clara del contenido de GC para moléculas cortas de ADN bicatenario, y se concluye que el efecto del contenido GC está enmascarado por la variación del contenido del vecino más cercano. Por el contrario, para las moléculas largas de ADN bicatenario, la varianza en cuanto a la forma espectral para los 200 espectros en cada clase, puede explicarse principalmente por la varianza en cuanto al contenido de GC. Dicho de otra forma, la varianza en la forma espectral puede explicarse sustancialmente mediante una única variable, que es el contenido de GC. A modo de ilustración, para ADN bicatenario con una longitud de 500 pares de bases, se observa la posibilidad del ajuste de todos estos espectros diferentes con uno de dos espectros de referencia que tienen un contenido de GC particular (uno con un contenido de GC alto y uno con un contenido de GC bajo).

La figura 6 ilustra para un contenido de GC dado (que en el presente caso es un 50 % de contenido de GC), la varianza en cuanto a la forma espectral entre diferentes espectros, como una función del tamaño del fragmento del ADN bicatenario. Puede verse que la varianza es grande para unos tamaños de fragmento entre 1 y 50 pares de bases. Para unos tamaños de fragmento de 50 pares de bases o más grandes, por ejemplo, 100 pares de bases o más grandes, la varianza en cuanto a la forma espectral es sustancialmente más baja, lo que es indicativo una vez más del hecho de que, para tamaños de fragmento mayores (a pesar de que se generan de forma aleatoria), la forma espectral del espectro de absorción es característica para un contenido de GC dado. A modo de ilustración, no estando limitadas por esto las realizaciones de la presente invención, un ejemplo de la aplicación de un método de análisis para analizar una medición de PCR de acuerdo con una realización de la presente invención, se analiza en lo sucesivo con referencia a la figura 7a y la figura 7b. La figura 7a ilustra la salida para el análisis de un espectro de absorción de una muestra mediante lo cual no se forma ADN bicatenario alguno y la figura 7b ilustra la salida para el análisis de un espectro de absorción de una muestra en la que se forma ADN bicatenario. A pesar de que las muestras en las que se usa PCR por lo general tienen una densidad óptica alta, los espectros siguen pudiendo ser analizados, tal como se muestra en la figura 7a y la figura 7b.

El método de desconvolución que se usa se basa en el uso de dos espectros de referencia para diferentes concentraciones de GC (representativas de pares de bases; a las que se hace referencia como ADNbc_AT o A=T y ADNbc_GT o G≡C), por ejemplo, unas concentraciones de GC extremas, y usando dos espectros de referencia para componentes para AT y GC respectivamente (que son combinaciones de espectros individuales y no son el espectro de dinucleótidos; a los que se hace referencia como dNTPs_AT y dNTPs_GC). Al hacer uso de estos espectros de referencia, en el presente ejemplo, también teniendo en cuenta otros componentes tales como por ejemplo un componente para la turbidez, puede obtenerse un ajuste apropiado, y puede, de hecho, distinguirse si se forma o no ADN bicatenario mediante una reacción de PCR. A partir de las concentraciones ajustadas de contenido de ADN bicatenario de AT y de GC, también puede realizarse una cuantificación. El espectro medido 702 y el espectro con mejor ajuste 704 coinciden sustancialmente. También se indican el componente de dNTPs_AT 706 y el componente de dNTPs_GC 708 así como el componente de ADNbc_AT 710, el componente de ADNbc_GC 712, un componente de resto 714 y un componente de otros componentes que contribuyen conocidos 716. Los últimos cuatro apenas suponen una contribución.

A modo de ilustración, no estando limitadas por esto las realizaciones de la presente invención, otro ejemplo de la aplicación de un método de análisis para analizar una medición de PCR de acuerdo con una realización de la presente invención se analiza en lo sucesivo con referencia a la figura 8a y la figura 8b. La figura 8a y la figura 8b ilustran la salida para el análisis de un espectro de absorción de una muestra mediante la cual no se forma ADN bicatenario alguno (figura 8a) y una muestra en la que se forma ADN bicatenario (figura 8b). A pesar de que las muestras en las que se usa PCR por lo general tienen una densidad óptica alta, los espectros siguen pudiendo ser analizados, tal como se muestra en la figura 8a y la figura 8b.

El método de desconvolución que se usa se basa en el uso de un espectro de la muestra antes de que haya tenido lugar la acción de la PCR (a la que se hace referencia como mezcla de PCR) y de dos espectros de referencia que son espectros de diferencia que expresan la construcción de AT y GC. Tales espectros de diferencia para AT y GC se obtienen como la diferencia del espectro que se obtiene para mezclas de nucleótidos separadas AT respecto a GC y el espectro de pares de bases AT respecto a GC en una configuración bicatenaria, es decir, como par de bases. Se muestran el espectro medido 802 y el espectro con mejor ajuste 804. Para la figura 8a, los otros componentes y el resto son sustancialmente iguales a 0. Para la figura 8b, además también se indican: el componente de incorporación de AT 806, el componente de incorporación de GC 808 y un componente de mezclado de PCR 810. Los otros componentes y el resto son sustancialmente iguales a 0.

Al hacer uso de estos espectros de referencia, en el presente ejemplo, opcionalmente también teniendo en cuenta otros componentes tales como por ejemplo un componente para la turbidez, puede obtenerse un ajuste apropiado y puede, de hecho, distinguirse si se forma o no ADN bicatenario mediante una reacción de PCR. A partir de las concentraciones ajustadas de AT y de GC en ADN bicatenario, también puede realizarse una cuantificación. Es una ventaja de realizaciones de acuerdo con la presente invención que el resultado del ajuste es una medida del ADN bicatenario formado y, por lo tanto, permite una mejor cuantificación de la reacción de PCR que en el caso de un método que proporcione como resultado final la combinación del ADN bicatenario original y los amplicones formados. Es además una ventaja de realizaciones de acuerdo con la presente invención que se tiene en cuenta de forma automática el equilibrio del contenido de AT y de GC. Las realizaciones anteriores ilustran que mediante el uso de métodos de desconvolución que tienen en cuenta el espectro de GC, se permite un análisis apropiado del ADN bicatenario y además incluso permite un análisis de las reacciones de PCR.

A modo de ilustración, no estando limitadas por esto las realizaciones de la presente invención, otro ejemplo de la aplicación de un método de análisis para analizar una muestra que comprende ADN y ARN de acuerdo con una realización de la presente invención, se analiza a continuación con referencia a la figura 9. La figura 9 ilustra un conjunto de muestras que comprenden muestras con diferentes relaciones de ADN con respecto a ARN. Las relaciones de ADN/ARN variaron de 4:1 a 1:4. Puede verse que las contribuciones espectrales de ADN y ARN se superponen de forma significativa. Cuando el conjunto de muestras con las relaciones de ADN/ARN previamente determinadas se desconvolucionan usando métodos de acuerdo con realizaciones de la presente invención, unas relaciones de ADN/ARN que se corresponden con las fracciones de ADN / ARN previamente determinadas se hallan dentro del error experimental, ilustrando características y ventajas de métodos de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

Además a modo de ilustración, la desconvolución de dos muestras que comprenden ARN se ilustra en las figuras 10 y 11. La figura 10 ilustra la desconvolución de una muestra que comprende tanto ARN como nucleótidos de ARN y ADN, en la que se indica el espectro medido 1002, se indica el mejor ajuste 1004, se indica el componente de ARN 1006, se indica el componente de ADN 1008, se indica un componente de nucleótidos de ARN 1010, así como se indica una fracción de resto 1012. Podría verse que la fracción de resto es menor del 3%, lo que es indicativo de que el ajuste es preciso. El recuadro ilustra resultados de medición alternativos sobre la base de una separación electroforética y un análisis de fluorescencia y confirma la presencia de ARN (la puntuación RIN de 10 se corresponde con una alta integridad de ARN), tal como se detecta usando la técnica de desconvolución de acuerdo con una realización de la presente invención. La figura 11 ilustra la desconvolución de otra muestra que comprende ARN, en la que se indica el espectro medido 1002, se indica el mejor ajuste 1004, se indica el componente de ARN 1006, también se indica un componente de Guanidinio tiocianato, marcado como componente de Guanidinio 1014, y también se indica el resto 10012. La fracción de ADN y Proteína es despreciable. Podría verse que la fracción de resto es solo 0,83%, lo que es indicativo de un ajuste lo bastante bueno. El recuadro ilustra resultados de medición alternativos sobre la base de una separación electroforética y un análisis de fluorescencia y confirma la calidad del ARN de muestra (la puntuación RIN de 10) que se corresponde con una alta integridad de ARN, tal como se detecta usando la técnica de desconvolución de acuerdo con una realización de la presente invención.

Realizaciones de la presente invención además pueden ser parte de, pueden corresponderse con, pueden comprender una o más etapas o características de o pueden hacer uso de uno o más de los siguientes aspectos, que también son realizaciones de la presente invención.

A modo de ilustración, en la figura 1 se muestra un diagrama de flujo a modo de ejemplo de un método de acuerdo con una realización de la presente invención, que comprende etapas convencionales y opcionales, y se describirá adicionalmente como referencia a la misma en lo sucesivo. El método de acuerdo con las realizaciones de la presente invención (100) comprende obtener información anterior para las una o más muestras con respecto a sus constituyentes (120). Tal información anterior para las una o más muestras con respecto a sus constituyentes puede comprender en algunas realizaciones uno o más espectros de referencia. Tal información anterior también puede comprender, como alternativa o además de los mismos, una información de composición esperada, tal como por ejemplo concentraciones esperadas, relaciones esperadas entre diferentes constituyentes, etc. Un ejemplo de tal información de composición puede ser, por ejemplo, la presencia de un polinucleótido conocido, mediante lo cual el polinucleótido conocido es una secuencia conocida de nucleótidos de tal modo que relaciones conocidas de constituyentes, que en el presente ejemplo son nucleótidos, se encuentran disponibles. En algunas realizaciones la información anterior puede obtenerse sobre la base de las muestras bajo estudio. En algunas realizaciones la información anterior puede ser una información previamente almacenada, como por ejemplo, espectros de referencia para constituyentes previamente almacenados. En algunas realizaciones también puede usarse una combinación de la información anterior. El método también comprende obtener datos de espectrofotómetro UV-VIS para las una o más muestras (110). Tales datos de espectrofotómetro UV-VIS por lo general pueden ser un espectro de espectrofotómetro, a pesar de que también pueda usarse una información a una o más longitudes de onda individuales o intervalos de longitud de onda.

El método de acuerdo con la presente invención también comprende definir un número de componentes que se superponen que contribuyen en los datos de espectrofotómetro UV-VIS (130), comprendiendo el número de componentes que se superponen, uno o más componentes que están asignados a constituyentes conocidos de las una o más muestras y comprendiendo el número de componentes uno o más componentes que no pueden asignarse a constituyentes conocidos de las una o más muestras. Los componentes de acuerdo con realizaciones de la presente invención que expresan la contribución a los datos de espectrofotómetro UV-VIS en algunas realizaciones, pueden comprender una contribución espectral con una forma que difiere de una Gaussiana, una distribución Lorentziana o una mezcla de las mismas. La forma de la contribución espectral puede ser una contribución más amplia. Uno o más componentes que no pueden asignarse a constituyentes conocidos de las una o más muestras pueden ser, se ha descrito anteriormente, por ejemplo constituyentes modificados, efectos contiguos entre dos constituyentes o contaminantes. La definición del número de componentes que se superponen puede basarse en un algoritmo previamente determinado, una red neural, etc. El método puede hacer uso de un análisis de componentes para definir el número de componentes que se superponen, como por ejemplo usando una técnica de análisis de componentes principales. En algunas realizaciones, el número de componentes independientes puede obtenerse al poner un gran número de espectros de absorbancia de la muestra en una matriz y calcular un rango de la matriz.

El método de acuerdo con la presente invención además comprende, usando la información anterior para las una o

más muestras con respecto a sus constituyentes y usando los datos de espectrofotómetro UV-VIS, estimar la composición de constituyentes y las contribuciones de componente a los datos de espectrofotómetro UV-VIS para el número de componentes para las una o más muestras, mediante la minimización de un resto entre los datos de espectrofotómetro UV-VIS y un ajuste sobre la base de dicha composición de constituyentes y dichas contribuciones de componente (140). Para minimizar un resto, pueden emplearse diferentes técnicas tales como, por ejemplo, un método de mínimos cuadrados, una minimización de error iterativa, una minimización de entropía de errores, una minimización de errores ponderada,...

En algunas realizaciones, la información anterior comprende las contribuciones de referencia en los datos de espectrofotómetro UV-VIS, tal como por ejemplo los espectros de referencia, para componentes que están asignados a constituyentes conocidos. La estimación de la composición de constituyentes y las contribuciones de componente puede por lo tanto comprender la estimación de las contribuciones de componente a los datos de espectrofotómetro UV-VIS para todos los componentes basado en las contribuciones de referencia. Basado en las contribuciones de componente, una estimación de la composición de constituyentes se determina por lo tanto sobre la base de la minimización del resto entre el espectrofotómetro UV-VIS y el ajuste sobre la base de las contribuciones de componente estimadas a los datos de espectrofotómetro UV-VIS para todos los componentes.

En algunas realizaciones, la información anterior comprende una información de composición de constituyentes para las una o más muestras para los constituyentes conocidos. La estimación de la composición de constituyentes y las contribuciones de componente comprende además estimar la composición de constituyentes para todos los constituyentes sobre la base de la información anterior sobre la información de composición de constituyentes para las una o más muestras para los constituyentes conocidos, y determinar una estimación para la contribución de componente a los datos de espectrofotómetro UV-VIS sobre la base de la minimización del resto entre los datos de espectrofotómetro UV-VIS y el ajuste sobre la base de dicha composición de constituyentes estimada para todos los constituyentes.

En algunas realizaciones se obtiene una mezcla de la información anterior, mediante la cual la mezcla de información prevé determinar una estimación de la composición de constituyentes y las contribuciones de componente.

La composición de constituyentes y las contribuciones del componente pueden interrelacionarse mediante un modelo que define unos factores de ponderación para distribuciones de los componentes como una función de la composición de constituyentes. Tales factores de ponderación pueden tenerse en cuenta cuando se determina una estimación para la composición de constituyentes o la contribución de componente.

El método también puede comprender repetir la etapa de estimación y la etapa de ajuste para minimizar adicionalmente el resto total mediante la aplicación de forma iterativa de estas etapas (150). Tal proceso iterativo puede realizarse hasta que el resto restante entre los datos de espectrofotómetro UV-VIS y el ajuste sobre la base de la composición de constituyentes es más pequeño que un valor previamente determinado, o hasta que se alcanzase un número máximo de etapas de iteración. El valor previamente determinado al que se hace referencia puede basarse en unas reglas previamente determinadas, sobre la base de una red neural, sobre la base de algoritmos previamente determinados, sobre la base de información con respecto a las una o más muestras, etc. En algunas realizaciones, la minimización del resto solo puede realizarse para aquellas muestras que tienen el resto más pequeño, permitiendo obtener unos resultados más precisos y/o una convergencia más rápida.

El método permite proporcionar como una información de salida con respecto a la composición de la muestra y/o información con respecto a la contribución espectral de constituyentes a los espectros de absorbancia. En algunos ejemplos, la información obtenida puede permitir obtener un espectro de referencia para un constituyente, un constituyente modificado, un contaminante, un efecto contiguo. Esto último puede usarse para configurar una biblioteca de espectros de referencia diferentes compatible con diferentes constituyentes o efectos de los mismos.

En una realización, el método también comprende usar el resto de cada muestra o información relacionada con la misma para verificar la información a priori disponible. Dicho de otra forma, los resultados que se obtienen usando el método pueden usarse para realizar una verificación cruzada de la información a priori disponible.

El método de acuerdo con realizaciones de la presente invención puede ser especialmente adecuado para analizar una pluralidad de muestras, mediante lo cual en una parte de las muestras el componente desconocido se encuentra presente y en otra parte de las muestras el componente desconocido se encuentra ausente.

El método de acuerdo con las realizaciones de la presente invención puede implementarse como soporte lógico así como soporte físico. A modo de ilustración, no estando limitadas a esto las realizaciones de la presente invención, un ejemplo de cómo pueden combinarse y obtenerse datos se ilustra en la figura 2. La figura 2 muestra cómo, de acuerdo con las realizaciones de la presente invención, sobre la base de datos de espectrofotómetro e información de composición (por ejemplo, obtenida sobre la base de un conocimiento anterior), las contribuciones de componente pueden determinarse, por ejemplo, en la forma de espectros de referencia mediante la minimización del resto. Sobre la base de las contribuciones de componente obtenidas y usando los datos de espectrofotómetro, pueden obtenerse unas estimaciones mejoradas de la composición. La figura 3 ilustra una realización adicional de la presente invención, mediante la cual tras la estimación de la información de la composición o la información de contribución de componente, puede decidirse añadir un componente adicional o retirar un componente mediante la evaluación de los datos de contribución de componente que se obtienen, por ejemplo, a la luz de los resultados esperados a la vista de los datos anteriores, o puede decidirse retirar una muestra en la evaluación basándose en una evaluación de la información de la composición que se obtiene, por ejemplo, a la luz de los resultados esperados a la vista de los datos anteriores.

El método puede ser adecuado para extraer una información cuantitativa acerca de uno o más constituyentes en la muestra y la contribución de componente correspondiente en el espectro UV-VIS. En algunas realizaciones,

espectros de referencia correspondientes de componentes conocidos y desconocidos cuya presencia se sospecha en la muestra, pueden usarse para el ajuste de los datos de espectrofotómetro UV-VIS. Puede que las contribuciones de componente no se limiten a los espectros de referencia de los componentes puros individuales, sino que puedan ampliarse con unas funciones espectrales correctivas de componentes que no se correspondan necesariamente con una característica de absorción físico-química del componente, ni tampoco es necesario que el propio componente muestre unas características de absorción significativas dentro de la región de longitud de onda bajo estudio. En un ejemplo, una de las contribuciones de componente puede ser una contribución que se corresponde con la turbidez causada por efectos de agregación o concentración. En un ejemplo, una de las contribuciones de componente puede ser una contribución que se corresponde con la dispersión causada por partículas residuales, por ejemplo, partículas presentes debido a un pre-procesamiento de la muestra.

A modo de ilustración, no estando limitadas a esto las realizaciones de la presente invención, se describirá un algoritmo que comprende un número de etapas particulares que ilustra una forma a modo de ejemplo la forma de implementar el método de acuerdo con realizaciones de la presente invención o que puede usarse en las realizaciones para el ajuste en métodos para el análisis de muestras que comprenden ADN y/o ARN. El método se describirá usando un formalismo matricial matemático particular, a pesar de que las realizaciones de la presente invención no están limitadas al mismo, también puede usarse otro formalismo matemático. El ejemplo ilustra los métodos que se usan para la desconvolución de datos espectrofotométricos. Los principios son de aplicación para diferentes tipos de muestras.

Para ilustrar el algoritmo, en primer lugar se proporcionan una serie de definiciones:

A_i : esta es una medida (expresada en absorbancias, OD10 mm) en la que el subíndice i denota las longitudes de onda (que varían de 220 nm a 360 nm en saltos de 1 nm, en el caso de ácidos nucleicos)

Q_j : esta matriz contiene las presencias relativas de los diferentes constituyentes conocidos y desconocidos, efectos de interacción, modificaciones o contaminaciones de la mezcla. En el presente ejemplo estos pueden ser, por ejemplo, los nucleótidos A, G, C y T pero también modificaciones (como marcadores) o dinucleótidos tal como por ejemplo AG, debido a que algunos espectros de dinucleótido difieren de los espectros combinados de sus constituyentes. En el algoritmo actual, los dinucleótidos se tratan de forma idéntica a las modificaciones y los contaminantes. j es el número de subcomponentes en la mezcla.

R_{ij} : los espectros de referencia. Estos son los espectros (conocidos) de los nucleótidos y los espectros de las modificaciones, dinucleótidos y contaminantes. Con i las longitudes de onda y j los subcomponentes.

Cuando se trabaja con espectros de referencia almacenados, R_j , los coeficientes de cada espectro de referencia, Q_{ij} , pueden ser la parte desconocida. Cuando se miden componentes conocidos, Q_{ij} ya está especificado y los espectros de referencia R_i pueden obtenerse.

En realidad, un procedimiento iterativo se usará cuando, en una primera etapa, se determina R_j y en etapas subsiguientes se halla Q_{ij} y una vez más y una vez más.

Las mediciones, las presencias relativas y las contribuciones (que en el presente ejemplo son espectros de referencia conocidos) se dan como

$$R_{ij}Q_j = A_i \quad \text{or} \quad RQ = A \quad [1]$$

Las definiciones, en el caso de que se mida una pluralidad de muestras, dan como resultado que la matriz de mediciones convirtiéndose

A_{ik} : esta es una medición (que se expresa en absorbancias, OD10 mm) en la que el subíndice i denota las longitudes de onda (que varían de 220 nm a 360 nm en saltos de 1 nm, en el caso de los ácidos nucleicos) y k el número de las mediciones, convirtiéndose la matriz de coeficientes

Q_{jk} : esta matriz contiene los coeficientes (las presencias relativas) de cada subcomponente de la mezcla. En el presente caso, los subcomponentes pueden ser los nucleótidos A, G, C y T pero también modificaciones (como marcadores) y dinucleótidos (por ejemplo, AG) y contaminantes. Una vez más, j es el número de subcomponentes, y k el número de mediciones.

Resultando en la siguiente ecuación que expresa la relación entre los componentes (que en el presente ejemplo se conoce a partir de una información anterior y que son espectros de referencia R) la matriz de coeficientes (en el presente ejemplo expresando la composición de constituyentes) y la matriz de mediciones.

$$R_{ij}Q_{jk} = A_{ik} \quad \text{or} \quad RQ = A \quad [2]$$

En el presente ejemplo, la información anterior disponible se corresponde con los espectros de referencia para los constituyentes en la muestra. En un caso de este tipo, tanto la información de contribución de componente R como los datos de espectrofotómetro A en la ecuación [2] se conocen. Para determinar la composición de la muestra Q en primer lugar multiplíquese por la izquierda la ecuación con la información de la contribución de componente R

traspuesta y, a continuación, multiplíquese por la izquierda ambos lados de la ecuación con la inversa del producto matricial de la contribución de componente R traspuesta y la contribución de componente R

$$(R^T \cdot R)^{-1} \cdot R^T \cdot R \cdot Q = (R^T \cdot R)^{-1} \cdot R^T \cdot A \quad [3]$$

$$Q = (R^T \cdot R)^{-1} \cdot R^T \cdot A = \text{pinv}(R) \cdot A \quad [4]$$

Esta es, de hecho, la ecuación para la *regresión lineal matricial* o *mínimos cuadrados lineales*. La expresión en el lado derecho antes de los datos de espectrofotómetro A se conoce como la pseudo-inversa de la matriz R y por ejemplo puede calcularse usando una descomposición en valores singulares.

A modo de ilustración, también se analizará un ejemplo para la situación inversa, mediante lo cual se conoce la composición de constituyentes y en la que es necesario que se determinen los espectros de referencia.

Por lo tanto, el problema inverso en el que se conocen los coeficientes de los subcomponentes, las mediciones se conocen y el objeto es la obtención de los espectros de referencia, se analiza a continuación.

Mediante la trasposición de la totalidad de la ecuación [1] se obtiene la siguiente relación.

$$Q^T \cdot R^T = A^T \quad [5]$$

y los espectros de referencia pueden hallarse mediante

$$R^T = \text{pinv}(Q^T) \cdot A^T \quad [6]$$

En los dos ejemplos anteriores, se muestra la situación de constituyentes conocidos.

El algoritmo anterior indica las características y ventajas que pueden obtenerse usando un método tal como se describe en una realización de la presente invención.

En un aspecto, la presente invención también se refiere a un sistema para analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una o más muestras que comprenden ADN y/o ARN, comprendiendo el sistema un medio de entrada para recibir dichos datos de espectrofotómetro UV-VIS, un medio de procesamiento que esté programado para el ajuste de los datos de espectrofotómetro UV-VIS, teniendo en cuenta por lo menos un espectro representativo de un par de bases que es cualquiera de entre adenina-timina (AT) o guanina-citosina (GC) o adenina-uracilo, y obtener, a partir del ajuste, una cuantificación de una cantidad de ADN y/o ARN y un medio de salida para emitir una cuantificación de una cantidad de ADN y/o ARN para las una o más muestras bajo estudio. Las características y ventajas opcionales adicionales pueden corresponderse con componentes que llevan a cabo la funcionalidad de las etapas que se expresan en los métodos descritos anteriormente. Además, las características y ventajas de los sistemas adicionales o componentes de los mismos que se describen a continuación, que también son aspectos de la presente invención, también pueden incorporarse parcial o plenamente en sistemas para analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una o más muestras que comprenden ADN y/o ARN a los que se ha hecho referencia anteriormente. Tales sistemas adicionales pueden ser, por ejemplo, un sistema para realizar un análisis de datos de espectrofotómetro de una o más muestras que consisten en un número de constituyentes. El sistema comprende un medio de entrada para obtener una información anterior para las una o más muestras con respecto a sus constituyentes y para obtener datos de espectrofotómetro UV-VIS para las una o más muestras. Esto último puede ser un acceso de entrada para recibir una información anterior y datos de espectrofotómetro. Como alternativa, el medio de entrada también puede comprender un sistema de medición para registrar datos de espectrofotómetro UV-VIS, tal como por ejemplo, un espectrofotómetro. El sistema además comprende un medio de procesamiento que está programado para definir un número de componentes superpuestos que contribuyen en los datos de espectrofotómetro UV-VIS, comprendiendo el número de componentes uno o más componentes que están asignados a constituyentes conocidos de las una o más muestras, y comprendiendo el número de componentes uno o más componentes que no pueden asignarse a constituyentes conocidos de las una o más muestras. Un medio de procesamiento de este tipo puede ser por ejemplo una CPU, a pesar de que las realizaciones de la presente invención no están limitadas a esto. El medio de procesamiento de acuerdo con realizaciones de la presente invención además está programado para usar la información anterior para las una o más muestras con respecto a sus constituyentes y usar los datos de espectrofotómetro UV-VIS, estimar la composición de constituyentes y las contribuciones de componente a los datos de espectrofotómetro UV-VIS para el número de componentes para las una o más muestras mediante la minimización de un resto entre los datos de espectrofotómetro UV-VIS y un ajuste sobre la base de dicha composición de constituyentes y dichas contribuciones de componente, obteniendo de este modo una información con respecto al uno o más componentes que no pueden asignarse a constituyentes conocidos de las una o más muestras. Tal información puede extraerse usando un medio de emisión, tal como, por

ejemplo, una memoria, una pantalla, una impresora o un plóter.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para extraer contribuciones de componente, por ejemplo, los espectros de referencia para constituyentes particulares de la muestra de para las contribuciones de
5 tales constituyentes que se están modificando, perturbando o que se encuentran en un entorno particular. Los espectros de referencia pueden extraerse usando métodos tal como se ha descrito anteriormente. Un método de este tipo para extraer contribuciones de componente puede corresponderse con un método para analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una muestra que comprende ADN y/o ARN tal como se ha descrito en lo que antecede.

10 En un aspecto, la presente invención también se refiere al uso de un método tal como se ha descrito anteriormente para aplicaciones particulares. Una de estas aplicaciones puede ser identificar y/o cuantificar contaminantes en muestras de ADN o ARN. Los contaminantes pueden ser una contaminación proteica. Los contaminantes en una aplicación pueden ser contaminantes inhibidores de la PCR. Otra aplicación que se prevé es la cuantificación de una
15 cantidad de ADN bicatenario en una mezcla de ADN bicatenario y ADN o ARN monocatenario. Otra aplicación más es la determinación de la composición de un polinucleótido o proteína. Una aplicación adicional es la cuantificación de la eficiencia de modificación en una muestra. El método también puede aplicarse para validar una composición de muestra o un constituyente de la misma o un grupo de constituyentes de la misma. Por extensión, el método permite extraer una información más detallada acerca de la composición de un componente, en particular de
20 polímeros y, de forma más específica, en biopolímeros tales como polinucleótidos y proteínas. A la inversa, el método también permite extraer una información cuantitativa de polímeros sobre la base del conocimiento a priori de la composición de los componentes conocidos, en lugar del conocimiento del espectro del componente.

25 En otro aspecto, realizaciones de la presente invención también se refieren a métodos implementados por ordenador para realizar, por lo menos, parte de los métodos para analizar datos de espectrofotómetro. Realizaciones de la presente invención también se refieren a productos del programa informático correspondientes. Los métodos pueden implementarse en un sistema de cómputo. Estos pueden implementarse como soporte lógico, como soporte físico o como una combinación de los mismos. Tales métodos pueden adaptarse para realizarse en un ordenador de una
30 forma automatizada y/o automática. En el caso de una implementación o implementación de forma parcial como soporte lógico, tal soporte lógico puede adaptarse para su ejecución en un ordenador o una plataforma informática adecuada, sobre la base de uno o más procesadores. El soporte lógico puede adaptarse para su uso con cualquier sistema operativo adecuado tal como por ejemplo un sistema operativo Windows o un sistema operativo Linux. El medio de cómputo puede comprender un medio de procesamiento o procesador para procesar datos. De acuerdo con algunas realizaciones, el medio de procesamiento o procesador puede adaptarse para analizar espectros de
35 acuerdo con cualquiera de los métodos tal como se ha descrito en lo que antecede o extraer espectros de referencia de acuerdo con cualquiera de los métodos tal como se ha descrito en lo que antecede. Además de un procesador, el sistema de cómputo además puede comprender un sistema de memoria incluyendo por ejemplo ROM o RAM, un sistema de salida tal como por ejemplo una unidad de CD-ROM o de DVD o medios para emitir información a través de una red. También pueden incluirse componentes informáticos convencionales tales como por ejemplo un teclado,
40 una pantalla, un dispositivo apuntador, accesos de entrada y de salida, etc. El transporte de datos puede proporcionarse sobre la base de buses de datos. La memoria del sistema de cómputo puede comprender un conjunto de instrucciones que, cuando se implementan en el sistema de cómputo, dan como resultado una implementación de parte o la totalidad de las etapas convencionales de los métodos tal como se ha expuesto en lo que antecede y, opcionalmente, de las etapas opcionales tal como se ha expuesto en lo que antecede. Los
45 resultados obtenidos pueden emitirse a través de un medio de salida tal como por ejemplo un dispositivo trazador de gráficos, una impresora, una pantalla o como datos de salida en formato electrónico.

50 Aspectos adicionales de realizaciones de la presente invención abarcan productos de programa informático incorporados en un medio de soporte que porta un código legible por máquina para la ejecución en un dispositivo de cómputo, los productos del programa informático, como tales, así como el soporte de datos tal como DVD o CD-ROM o dispositivo de memoria. Aspectos de las realizaciones además abarcan la transmisión de un producto de programa informático a través de una red, tal como por ejemplo una red local o una red de área extensa, así como las señales de transmisión que se corresponden con la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un método implementado por ordenador para analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una muestra que comprende ADN y / o ARN, comprendiendo el método
- 5
- recibir datos de espectrofotómetro UV-VIS de la muestra,
 - ajustar los datos de espectrofotómetro UV-VIS teniendo en cuenta por lo menos un espectro representativo de una muestra que tiene un contenido en pares de bases, siendo el par de bases cualquiera de adenina-timina (AT) o guanina-citosina (GC) o adenina-uracilo (AU), y
 - 10 - obtener a partir del ajuste una cuantificación de una cantidad de ADN y / o ARN.
2. Un método implementado por ordenador de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho ajuste comprende tener en cuenta un conjunto de espectros de referencia representativos de dos contenidos en pares de bases distintos.
- 15
3. Un método implementado por ordenador de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho ajuste comprende tener en cuenta un conjunto de dos o un conjunto de exactamente dos espectros de referencia representativos de dos contenidos de GC distintos.
- 20
4. Un método implementado por ordenador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que dicho ajuste comprende ajustar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una muestra que comprende ADN y / o ARN que tiene por lo menos 50 pares de bases, de forma ventajosa por lo menos 100 pares de bases y / o en el que dicha muestra comprende ADN y dicho ajuste comprende usar una combinación de un conjunto de espectros de referencia representativos de pares de bases y espectros de referencia que son representativos de bases nitrogenadas separadas.
- 25
5. Un método implementado por ordenador de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho ajuste usando una combinación de espectros de referencia representativos de pares de bases y espectros de referencia que son representativos de bases nitrogenadas separadas comprende ajustar usando espectros que son los espectros de diferencia entre los espectros de referencia representativos de pares de bases y los espectros de referencia que son representativos de bases nitrogenadas separadas.
- 30
6. Un método implementado por ordenador de acuerdo con la reivindicación 5, en el que los espectros de diferencia entre espectros de referencia representativos de pares de bases y espectros de referencia que son representativos de bases nitrogenadas separadas, son espectros obtenidos de la sustracción con respecto a unos espectros de referencia dados representativos de un par de bases dado, los espectros de referencia que son representativos de las bases nitrogenadas separadas correspondientes.
- 35
7. Un método implementado por ordenador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que los espectros de referencia representativos de bases nitrogenadas separadas son espectros de referencia para adenina, guanina, timina, citosina y / o uracilo.
- 40
8. Un método implementado por ordenador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, estando el método adaptado para analizar una reacción de PCR de una muestra que comprende ADN, en el que dicha obtención comprende determinar una cantidad de ADN bicatenario que se forma durante o después de una reacción de PCR.
- 45
9. Un método implementado por ordenador de acuerdo con la reivindicación 8, en el que ajustar además comprende tener en cuenta una componente espectral para un componente de contaminación.
- 50
10. Un método implementado por ordenador de acuerdo con la reivindicación 9, en el que tener en cuenta una componente espectral para un componente de contaminación, comprende tener en cuenta una componente espectral para uno o más de trimetilglicina, guanidinatiocianato, fenol, ácido etilendiaminotetraacético, proteínas azida de sodio o hemoglobina y / o en el que ajustar datos del espectrofotómetro UV-VIS de una muestra comprende ajustar datos del espectrofotómetro UV-VIS de una mezcla que comprende desoxinucleótidos trifosfato, oligonucleótidos cebadores, polimerasa y ADN.
- 55
11. Un método implementado por ordenador de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que ajustar además comprende tener en cuenta una o más componentes espectrales representativas de la dispersión en la muestra y / o tener en cuenta una o más componentes espectrales representativas de la turbidez en la muestra y / o en el que el ADN y / o ARN es por lo menos una cantidad de ADN bicatenario.
- 60
12. Un sistema implementado por ordenador para analizar datos de espectrofotómetro UV-VIS de una muestra que comprende ADN y / o ARN, comprendiendo el sistema
- 65

- un medio de entrada para recibir dichos datos de espectrofotómetro UV-VIS,
 - un medio de procesamiento programado para el ajuste de los datos de espectrómetro UV-VIS teniendo en cuenta por lo menos un espectro representativo de un par de bases siendo cualquiera de adenina-timina (AT) o guanina-citosina (GC) o adenina-uracilo, y obtener a partir del ajuste una cuantificación de una cantidad de ADN y / o ARN, y
 - un medio de salida para emitir una cuantificación de una cantidad de ADN y / o ARN para la muestra bajo estudio.
- 5
- 10 13. Un sistema implementado por ordenador de acuerdo con la reivindicación 12, en el que dicho medio de procesamiento está adaptado para realizar un ajuste tal como se describe en cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1 a 11.
- 15 14. Un producto de programa informático para, si se implementa en una unidad de procesamiento, realizar un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 20 15. Un medio de soporte de datos que comprende un producto de programa informático de acuerdo con la reivindicación 14.
16. Transmisión de un producto de programa informático de acuerdo con la reivindicación 14 a través de una red de área amplia o local.

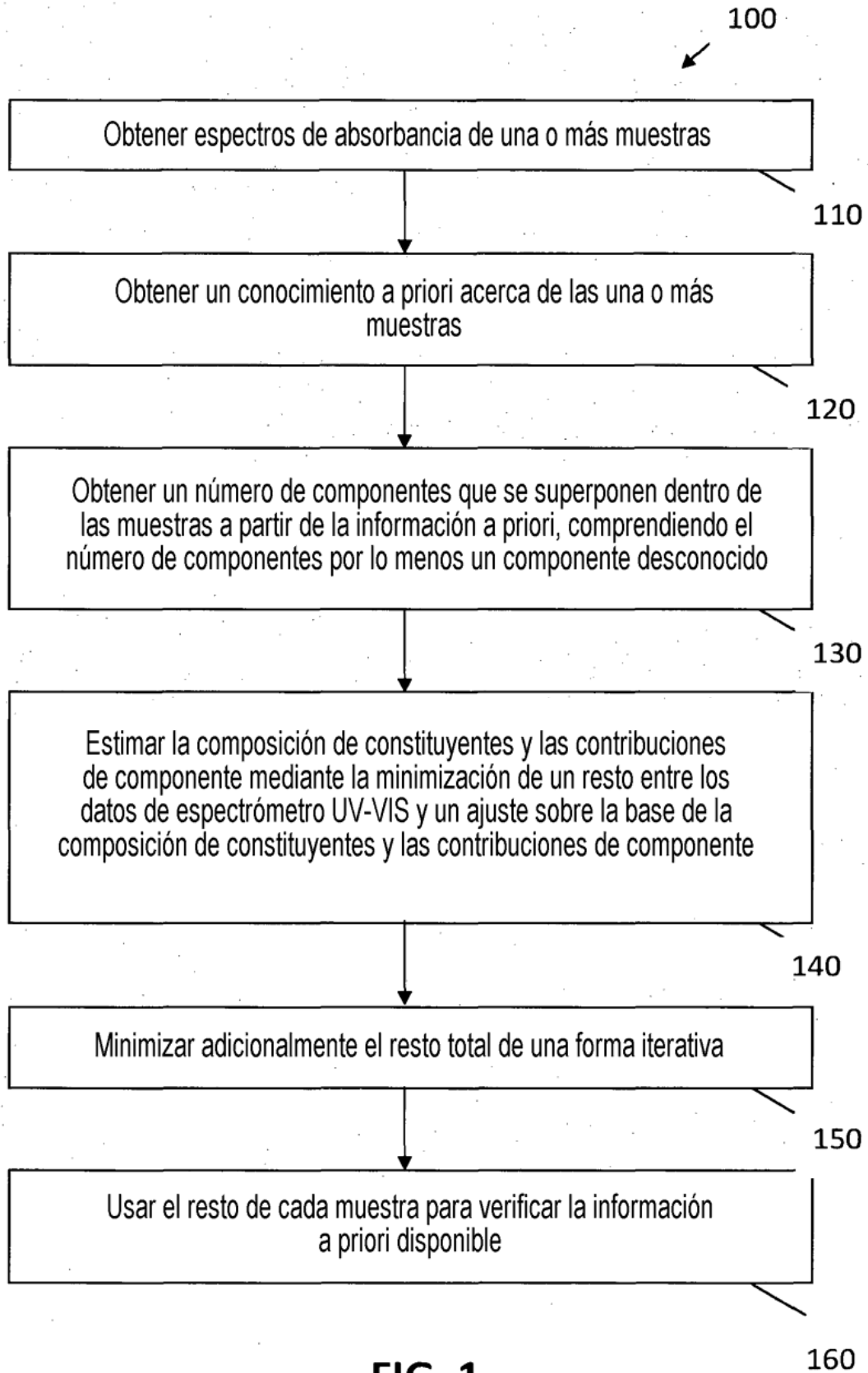


FIG. 1

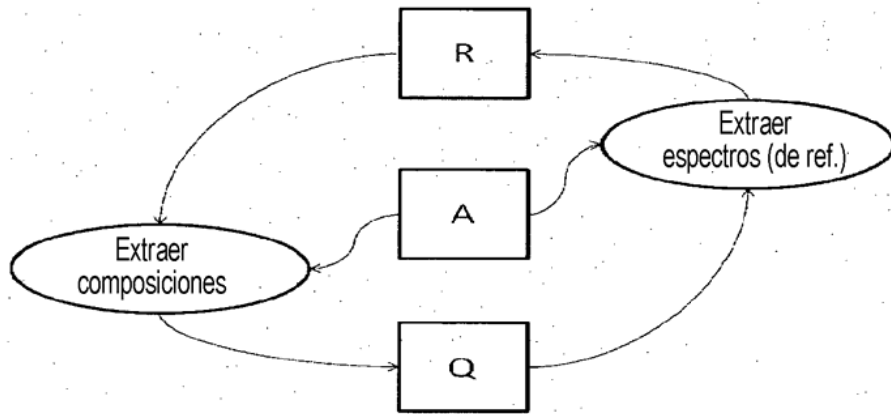


FIG. 2

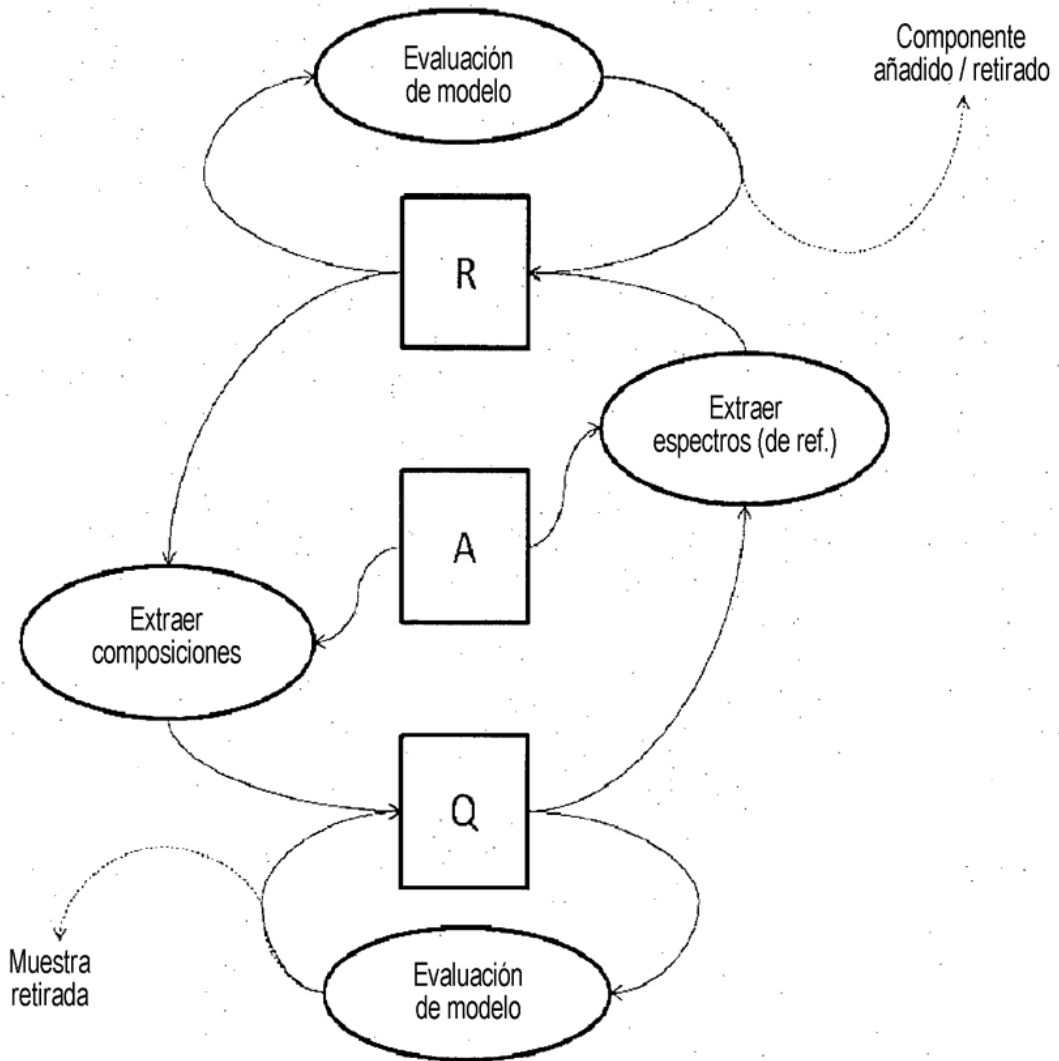


FIG. 3

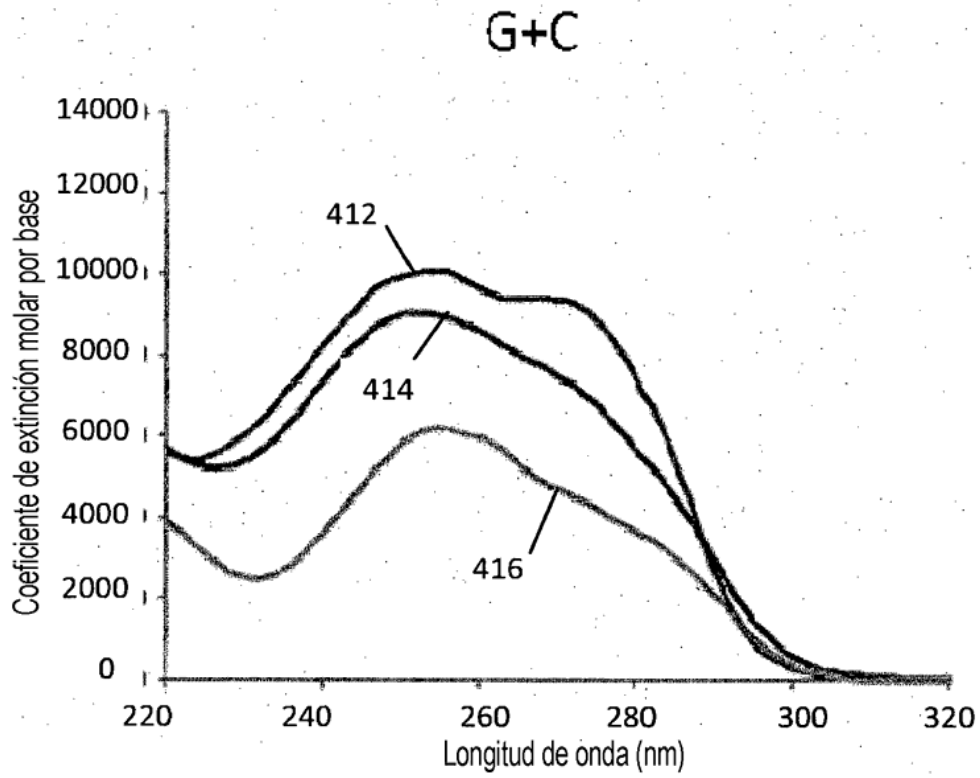
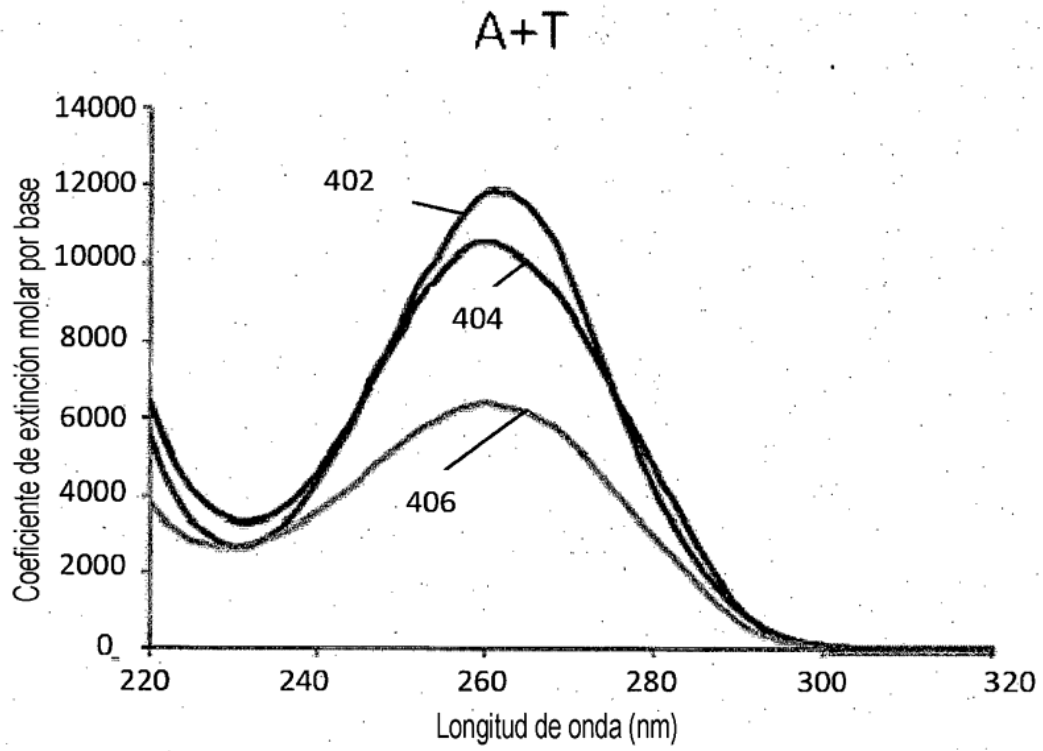


FIG. 4

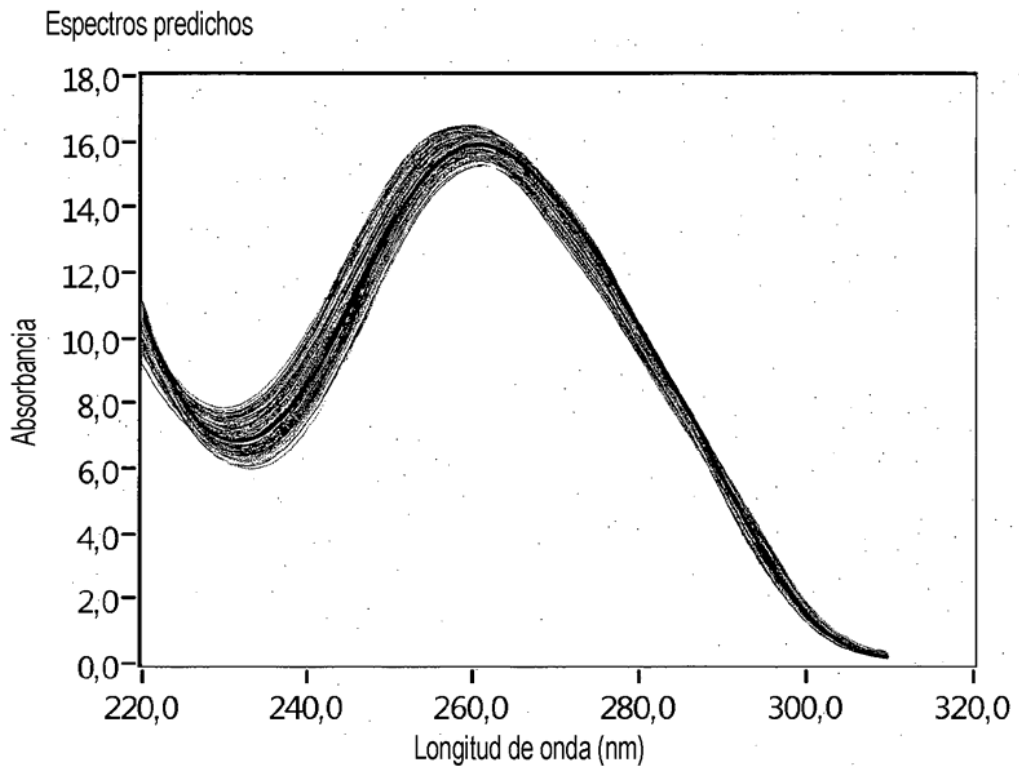


FIG. 5a

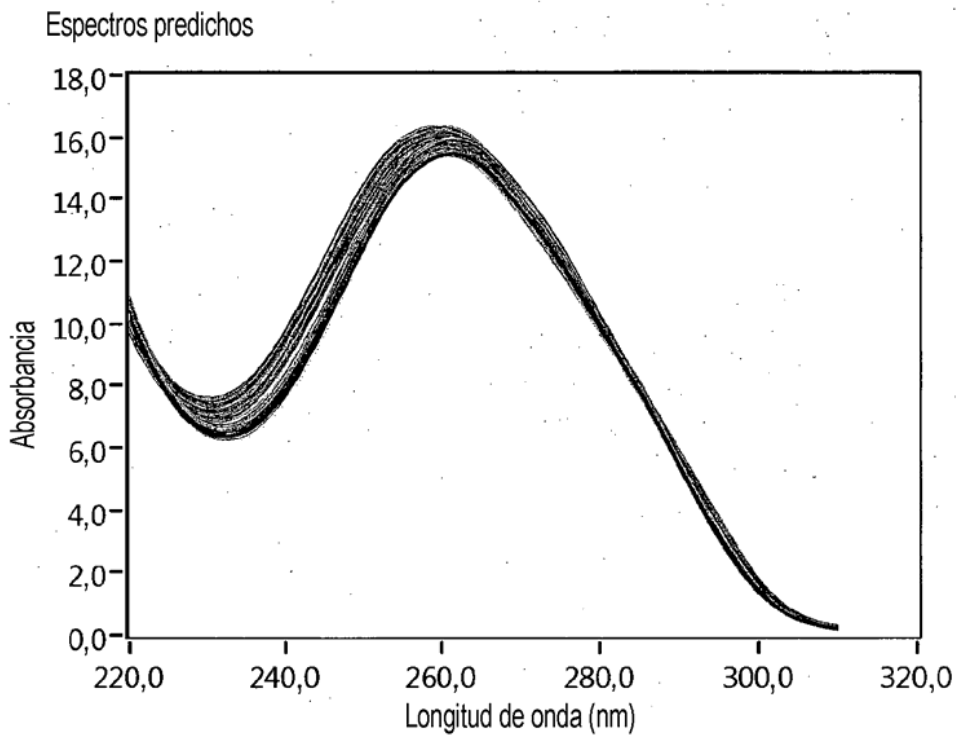


FIG. 5b

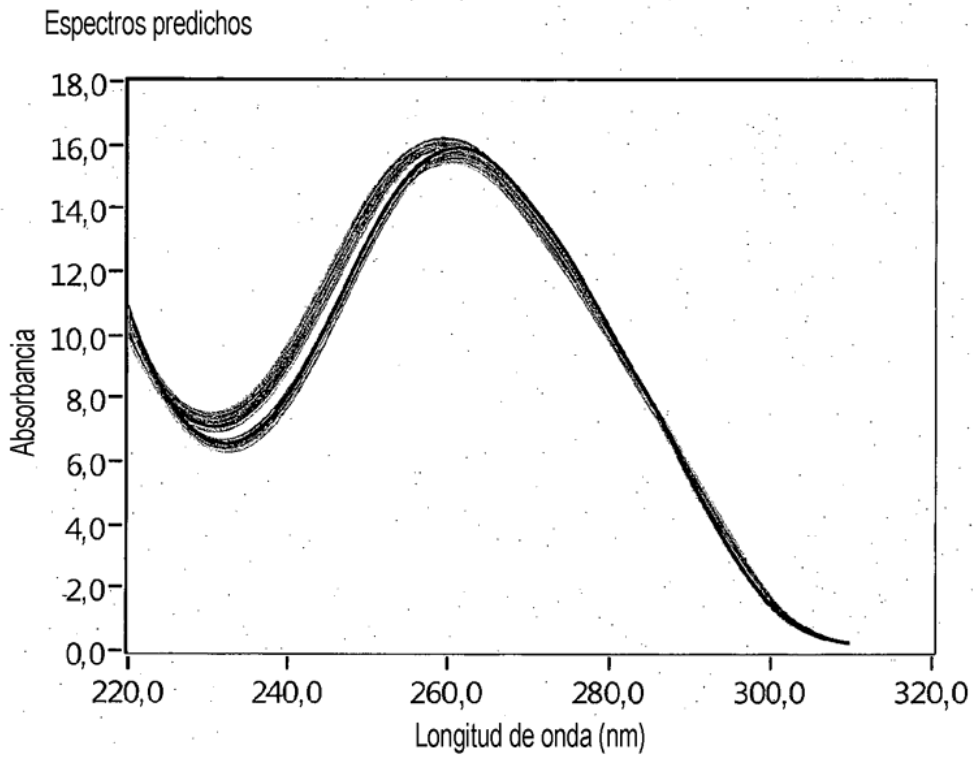


FIG. 5c

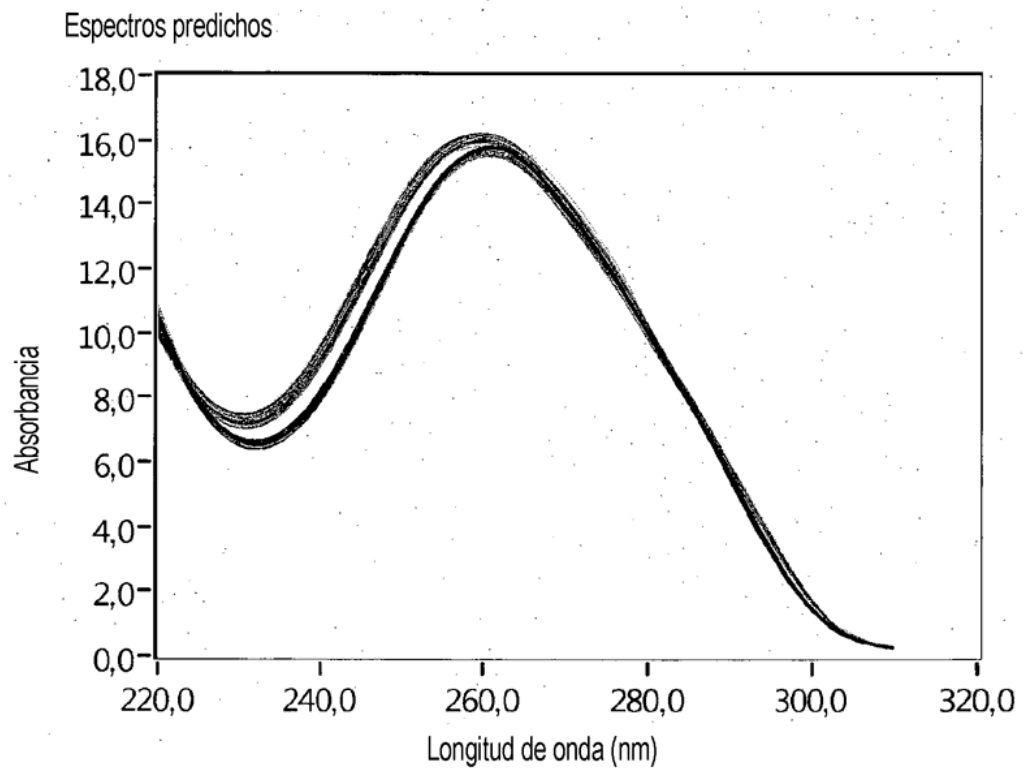


FIG. 5d

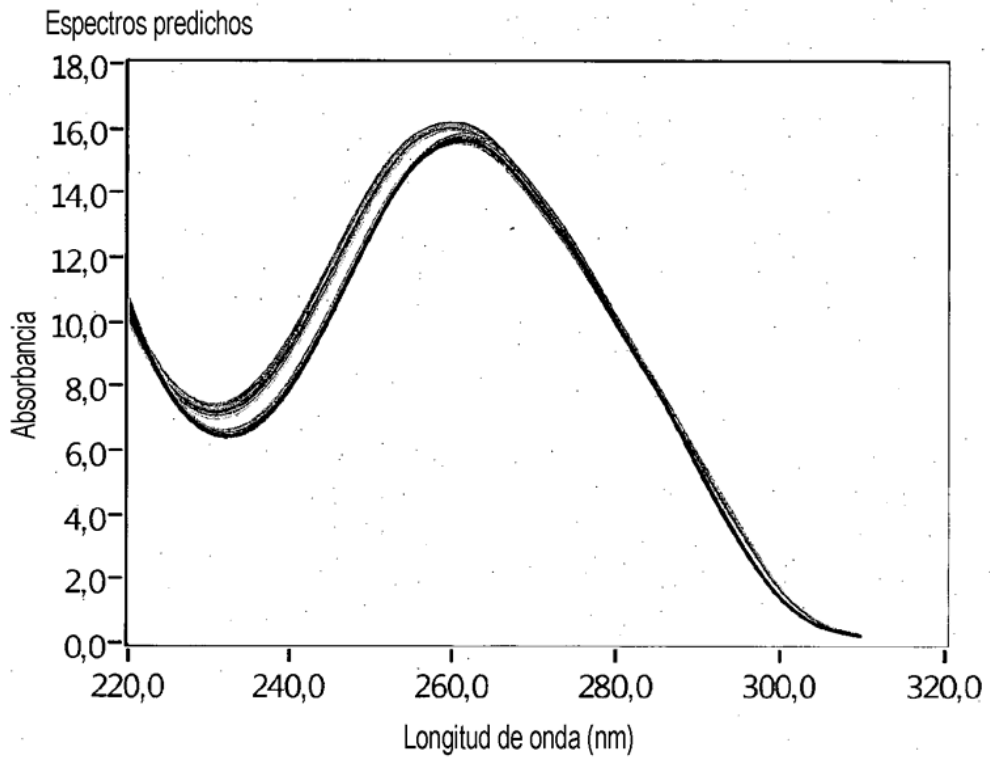


FIG. 5e

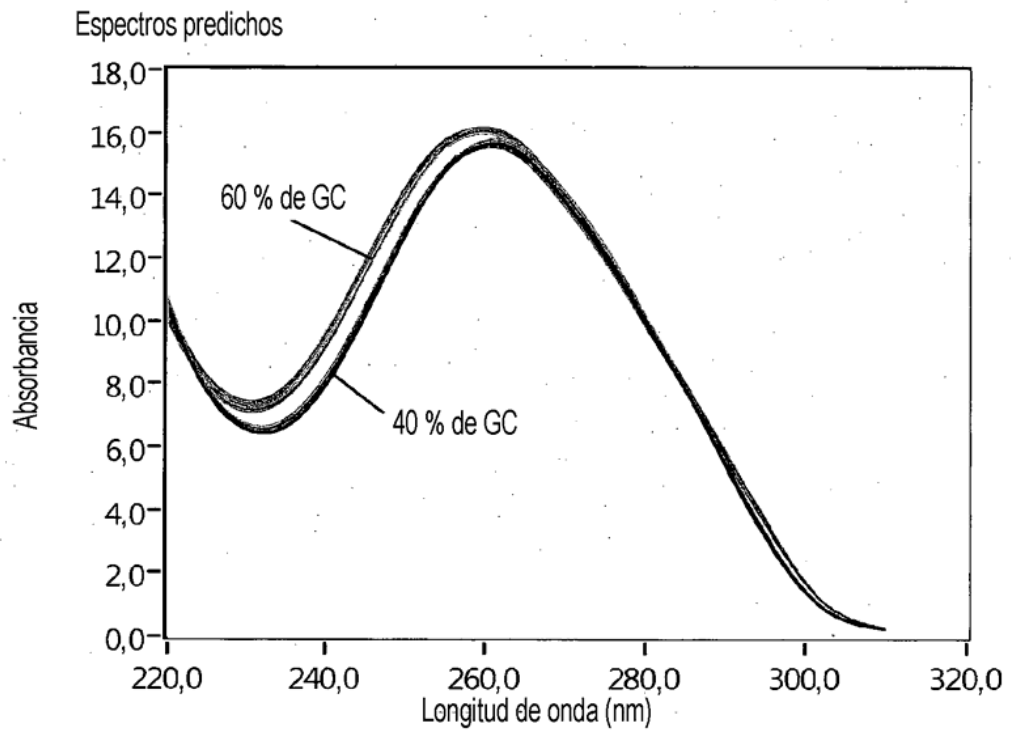


FIG. 5f

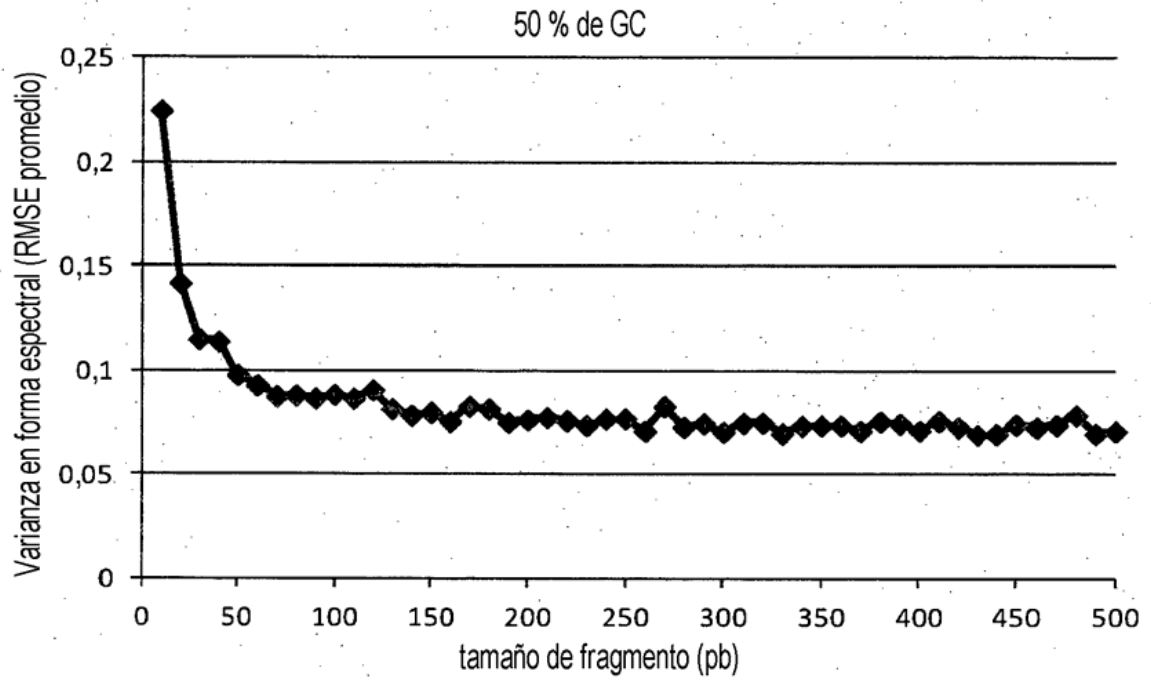


FIG. 6

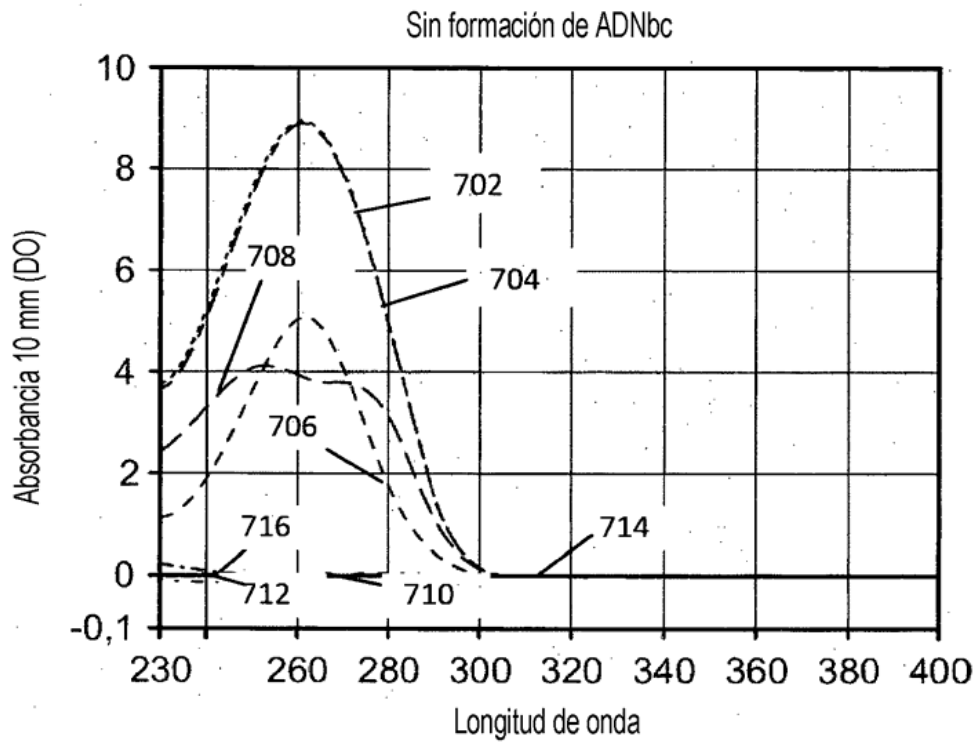


FIG. 7a

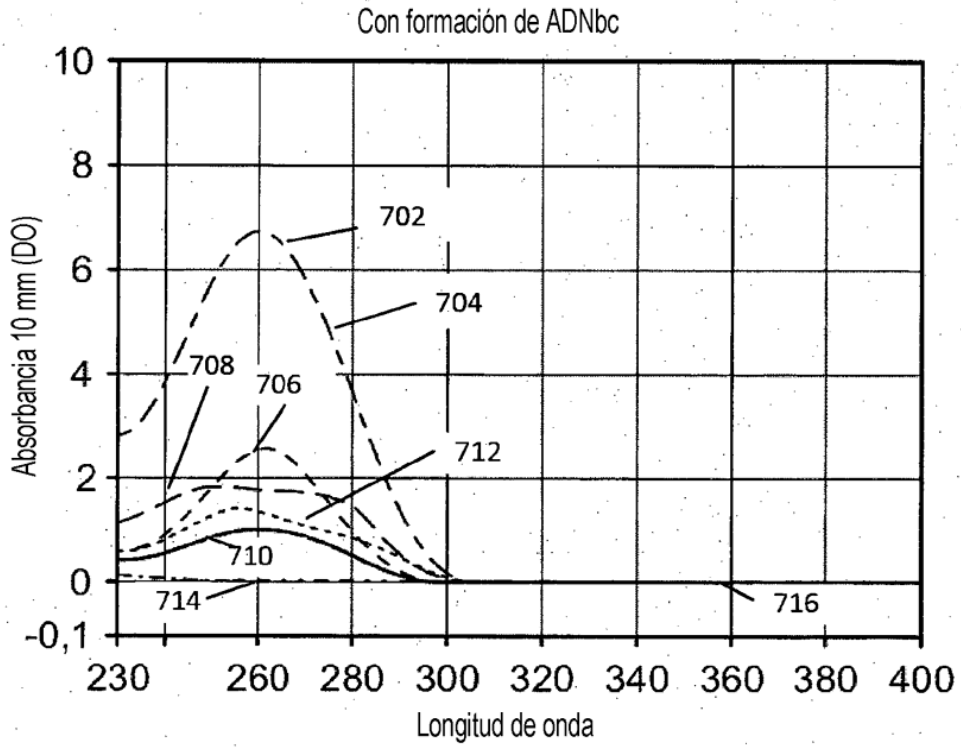


FIG. 7b

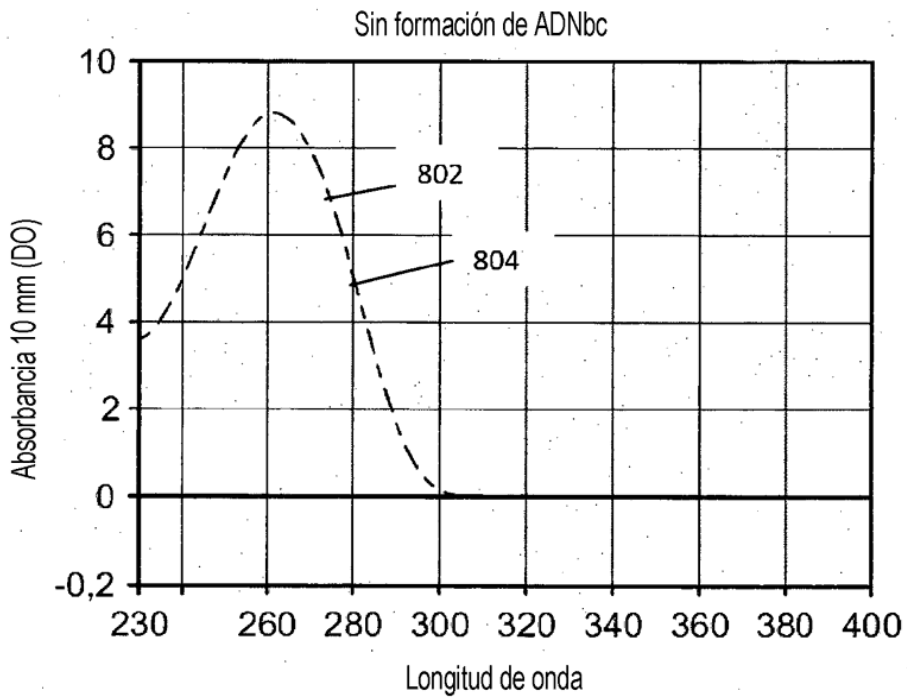


FIG. 8a

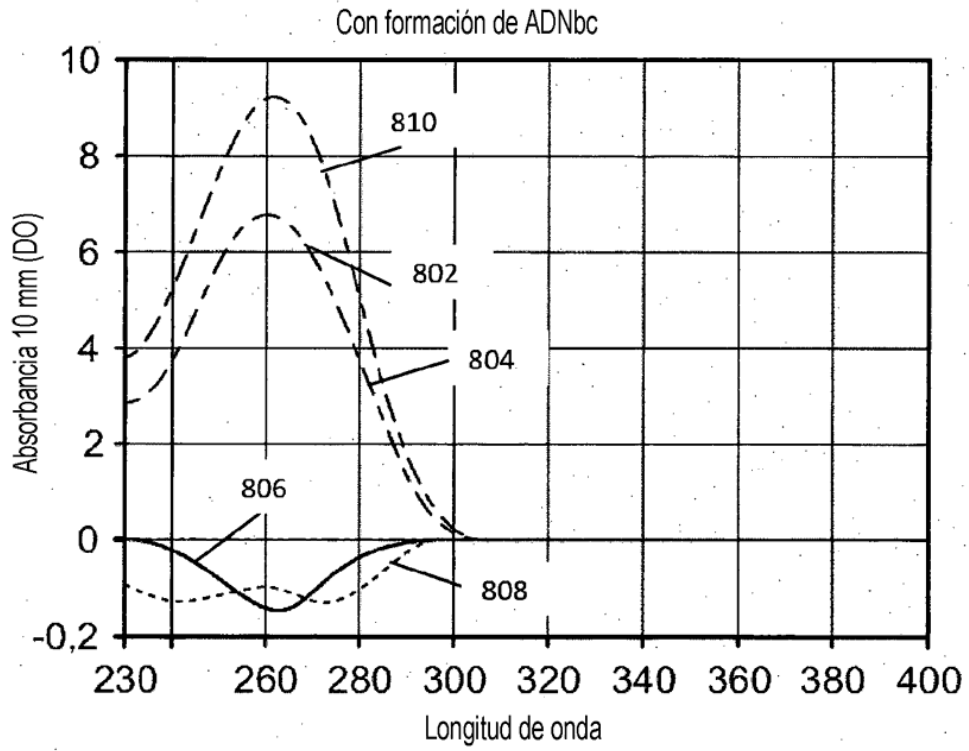


FIG. 8b

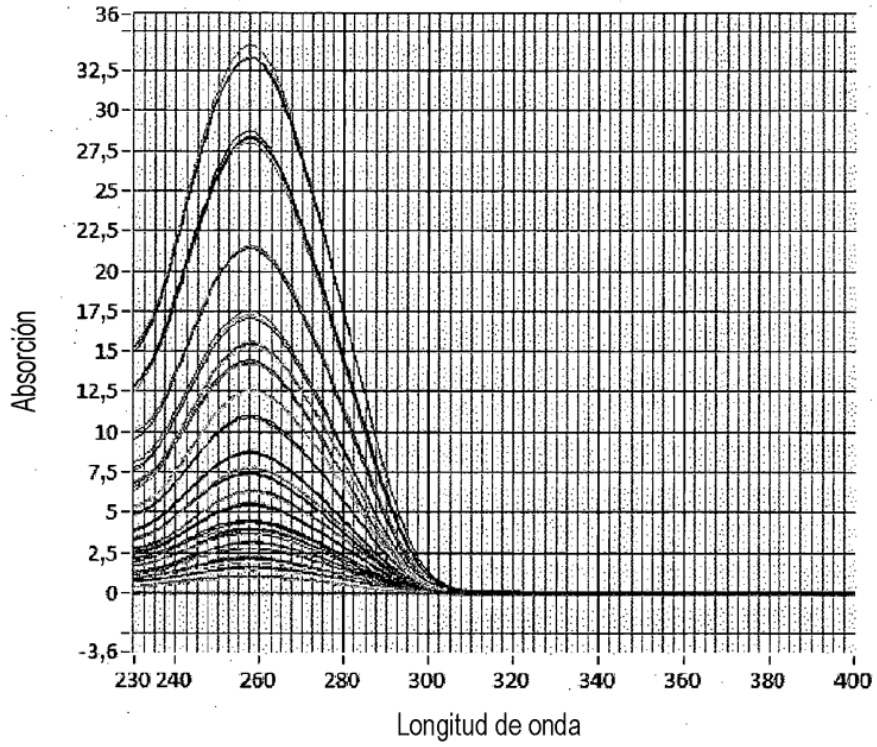


FIG. 9

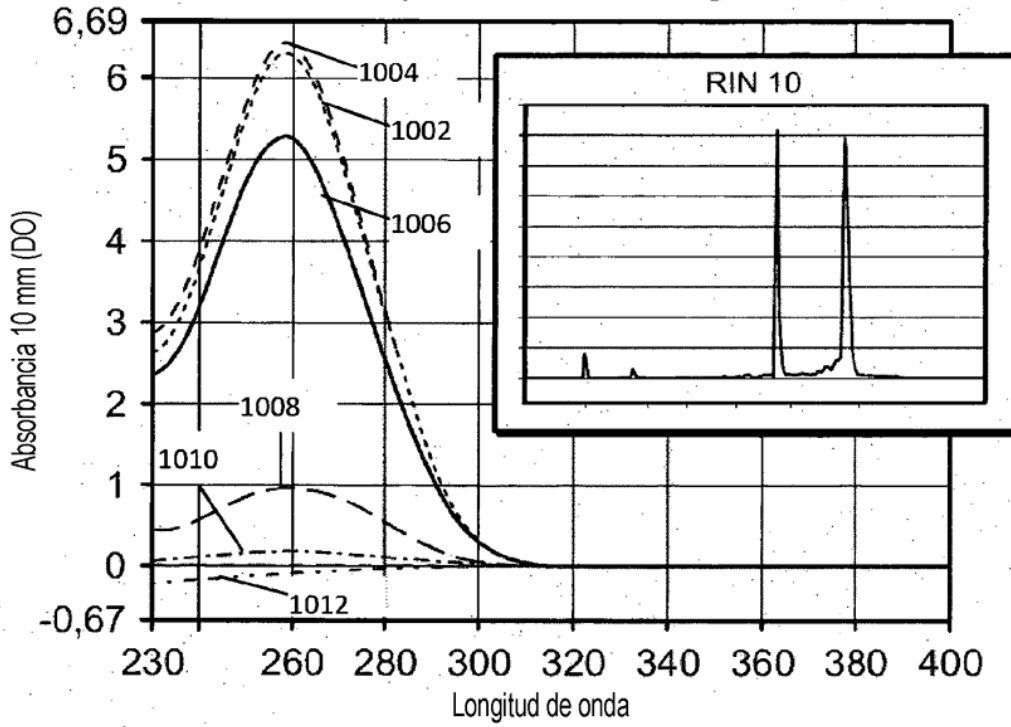


FIG. 10

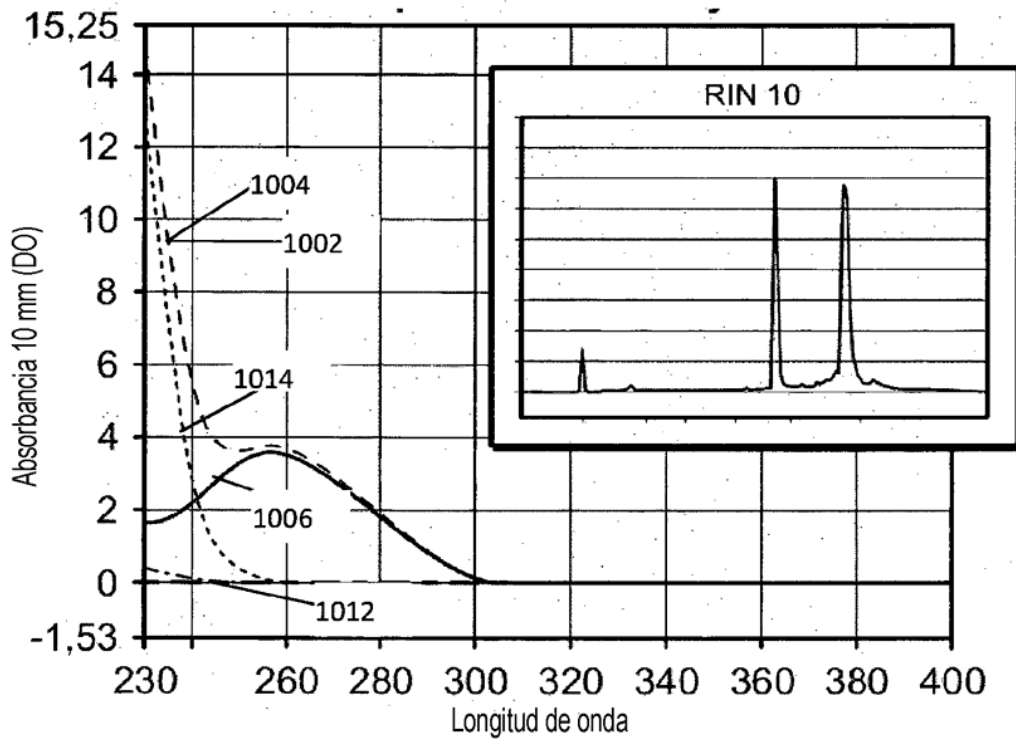


FIG. 11

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

5

Documentos de patente citados en la descripción

US 7786295 B [0008]

EP 152451 A [0008]4

10

Documentos no literatura patente citados en la descripción

SPJOTVOLL et al. *Technometrics*, 1982, 24 [0006]

TATAUROV. Predicting ultraviolet spectrum of single Stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. *Biophysical Chemistry*, 2008, vol. 133, 66-70 [0077]