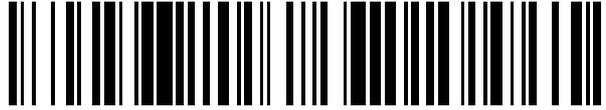


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 659**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2005 E 11009790 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 2458015**

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

30 Prioridad:

30.09.2004 US 614697 P

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

28.03.2016

73 Titular/es:

**EPIGENOMICS AG (100.0%)
Geneststrasse 5
10829 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 564 659 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para proveer fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada

Campo de la invención

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

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

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

10 Antecedentes de aspectos de la invención

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

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

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

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

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

40 Akalu et al. ("A reliable PCR amplification method for microdissected tumor cells obtained from paraffin-embedded tissue" GENETIC ANALYSIS: BIOMOLECULAR ENGINEERING 1999 vol. 15, no. 6, páginas 229-233) describe un método para proveer fragmentos de ADN derivados de una muestra archivada y amplificar dichos fragmentos por PCR.

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

50 Se describe un método diferente en GB 2369822. De acuerdo con esta, se colocan secciones de una muestra embebida en parafina fijada con formalina en un tubo. Se agrega un detergente, una cera y una enzima digestora de tejido, antes de que el tubo sea calentado hasta aproximadamente 60°C durante aproximadamente 30 minutos.

Después de esto la enzima es inactivada por un incremento de temperatura hasta 96°C. Una etapa de centrifugación subsecuente lleva a una formación de capas dentro del tubo, conteniendo la capa media el ADN genómico así como el ARN.

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

10 Se han hecho varias propuestas para obtener fragmentos más largos: Bonin et al., enseña una exposición de una escisión de cadena sencilla después del aislamiento del ADN y una etapa de desnaturalización antes de la amplificación por PCR (Bonin S., Petrera, F., Niccolini, B., Stanta, G. (2003) *J. Clin Pathol. Mol. Pathol.* 56, 184-186). De acuerdo con este método son amplificables fragmentos de hasta 300 bp. Inadome et al., sugiere el aislamiento de la porción de fragmentos de ADN más largos por HPLC (Inadome, Y., Noguchi, M. (2003) *Diagn. Mol. Pathol* 12, 231-236). Este procedimiento lleva sólo a rendimientos muy bajos de ADN.

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

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

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

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

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

50 Las islas CpG localizadas en las regiones promotoras tienen frecuentemente una función reguladora para la expresión del gen correspondiente. Por ejemplo, en el caso de que la isla CpG sea hipometilada, el gen puede ser expresado. Por otro lado, la hipermetilación frecuentemente lleva a una supresión de la expresión. Normalmente los genes supresores de tumores son hipometilados. Pero si se hacen hipermetilados, su expresión se suprime. Esto se observa muchas veces en tejidos tumorales. En contraste, los oncogenes son hipermetilados en tejidos saludables, mientras que son hipometilados muchas veces en tejidos tumorales.

55 La metilación de la citosina tiene el efecto de que el enlazamiento de la proteína es prohibido normalmente lo cual regula la transcripción de los genes. Esto lleva a una alteración de la expresión del gen. Con respecto al cáncer, la expresión de los genes que regulan la división celular son alteradas por lo tanto, por ejemplo, la expresión de un gen apoptótico es subregulada, mientras que la expresión de un oncógeno es sobrerregulada. Adicionalmente, la

hipermetilación puede tener una influencia a largo plazo en la regulación. Las proteínas, las cuales desacetilan las histonas, son capaces de enlazarse a través de su dominio de enlace 5-metilcitosina al ADN cuando las citosinas se metilan. Esto da como resultado una desacetilación de las histonas, lo cual lleva pos sí mismo a un empaquetamiento más apretado del ADN. Debido a esto, las proteínas reguladoras no son precluidas del enlazamiento al ADN.

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

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

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

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

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

Breve descripción de las figuras

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50

Descripción detallada de aspectos de la invención

Muestra archivada

5 De acuerdo con la invención la muestra archivada es una biopsia embebida en parafina y/ o fijada o una sección de tejido embebida en parafina y/o fijada o partes de la misma, por ejemplo muestras microdisecionadas. Por lo tanto el término "biopsia" se refiere a cualquier clase de biopsia por aguja o cualquier clase de muestra de tejido recolectada durante una cirugía. Además, el término "sección de tejido" se refiere a cualquier parte de una biopsia por ejemplo derivada por seccionamiento por micrótopo de la biopsia.

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

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

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

Etapa de amplificación

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

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

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

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

5 En una realización preferida de la invención la etapa de amplificación se lleva a cabo con el uso de ADN polimerasa y comprende lo siguiente: A) La concentración de ADN polimerasa está en el rango de **de 0.15-0.3 U/μl** de la mezcla de reacción. B) La concentración de cada nucleótido está en el rango de 200-800 μmol/l. Por lo tanto la concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂) en la mezcla de reacción se ajusta a la concentración de nucleótidos como es bien conocido por los experimentados en la técnica. C) El tiempo para elongar el ADN de plantilla está en el rango de 0.1-1.0 s/bp del ADN de plantilla. Este tiempo usualmente comprende para un PCR la etapa de elongación así como la etapa de fusión si el caso. Si la fusión se lleva a cabo a una temperatura por debajo de 53°C, este tiempo corresponde solamente a la etapa de elongación.

10 En una realización, el método de la invención incluye un método para amplificar ADN derivado de una muestra archivada, que comprende lo siguientes:

- la concentración de polimerasa está en el rango de 0.15-0.3 U/μl,
- la concentración de cada nucleótido está en el rango de 200-800 μmol/l,;
- el tiempo de la etapa de elongación está en el rango de 0.1-1.0 s/bp.

15 En una realización particularmente preferida la etapa de amplificación comprende uno o más de los siguientes: A) Una concentración de polimerasa en el rango de 0.08-0.25 U/μl, preferiblemente la concentración es 0.15 U/μl en la mezcla de reacción. B) La concentración de cada nucleótido está en el rango de 350-650 μmol/l, preferiblemente la concentración de cada nucleótido es 400 μmol/l en la mezcla de reacción. Como ya se explicó anteriormente la concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂) en la mezcla de reacción se ajusta por lo tanto a la concentración de los nucleótidos como es bien conocido por los expertos en la técnica. C) El tiempo para elongar el ADN de plantilla está en el rango de 0.25-0.75 s/bp del ADN de plantilla, preferiblemente es 0.5 s/bp del ADN de plantilla. Como ya se describió, este tiempo comprende usualmente para un PCR en la etapa de elongación así como la etapa de fusión si el caso. Si la fusión se lleva a cabo a temperaturas por debajo de 53°C, este tiempo corresponde solamente a la etapa de elongación.

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

- 25
- la concentración de polimerasa es 0.15 U/μl,
 - la concentración de cada nucleótido es 400 μmol/l,
 - el tiempo de la etapa de elongación es 0.5 s/bp.

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

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

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

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

Tratamiento con bisulfito

50 En una realización, la muestra lisada es sometida entonces directamente a tratamiento con bisulfito debido a la pequeña cantidad de material de partida y por lo tanto de ADN. Para el tratamiento con bisulfito, se agregan a la tapa 9-70 μl, preferiblemente 12-52 μl, y lo más preferiblemente 38 μl de solución de bisulfito. Se utiliza una solución de

- 5 bisulfito tal como ya describió anteriormente. Subsecuentemente la solución de bisulfito en la tapa es incubada durante 0.5-15 minutos, preferiblemente durante 2-10 minutos, y lo más preferiblemente durante 5 minutos a 0-80°C, preferiblemente a 10-40°C, en particular preferiblemente a 15-30°C, y lo más preferiblemente a temperatura ambiente. La adición e incubación de la solución de bisulfito en la tapa disuelve cualquier ADN remanente en la tapa. Después de la incubación, la muestra es centrifugada.
- 10 En una realización preferida, la adición de la solución de bisulfito se lleva a cabo en dos etapas que se parecen entre sí. Esto tiene la ventaja de que todo el ADN unido a la tapa es sujeto para procesamiento posterior. En la primera etapa, se agregan 9-35 µl, preferiblemente 12-26 µl, y lo más preferiblemente 19 µl de solución de bisulfito. Se utiliza una solución de bisulfito como ya se describió anteriormente. Subsecuentemente la solución de bisulfito en la tapa es incubada durante 0.5-15 minutos, preferiblemente durante 2-10 minutos y lo más preferiblemente durante 5 minutos a 0-80°C, preferiblemente a 10-40°C, en particular preferiblemente a 15 a 3.0°C, y lo más preferiblemente a temperatura ambiente. La adición e incubación de la solución de bisulfito en la tapa disuelve cualquier ADN remanente en la tapa. Después de la incubación, la muestra es centrifugada, antes de que se agregue de nuevo solución de bisulfito en una segunda etapa que es repetición de la primera etapa.
- 15 Después de esto, en una realización, se agregan 2-12 µl, preferiblemente 4-8 µl, y lo más preferiblemente 6 µl de la solución de DME como se describió anteriormente. La conversión con bisulfito en lo que sigue se lleva a cabo como se describió ya anteriormente. Las realizaciones correspondientes para cantidades pequeñas de material de partida están incluidas aquí. En una realización particular se aplica el siguiente protocolo de temperaturas: 5 minutos 99°C, 22 minutos 60°C, 3 minutos 99°C, 97 minutos 60°C, 3 minutos 99°C y 177 minutos 60°C. Por lo tanto se usan uno o
- 20 más baño de agua, termomezcladores o ciclizadores de PCR.
- Uso de los métodos
- 25 Los métodos divulgados aquí se usan preferiblemente para la detección del estado de metilación del ADN de una muestra tomada de un tejido de una persona enferma o saludable o de una persona cuyo estado de salud no está determinado hasta el momento con respecto a una enfermedad definida. En una manera particularmente preferida los estados de metilación de ADN así determinados son comparados entonces uno con otro y/o con referencia a un estado de metilación de ADN de referencia.
- Por lo tanto la invención también comprende el uso del método de acuerdo con una o más de las realizaciones para la detección del estado de metilación del ADN.
- 30 En caso de que el estado de salud de una persona de quien se deriva la muestra no está o está solo insuficientemente determinado hasta el momento, los resultados del análisis de estado de metilación del ADN pueden ser utilizados para determinar el estado de salud de dicha persona con respecto a una enfermedad específica o cualquier predisposición para una enfermedad específica. Por lo tanto se prefiere particularmente que el estado de metilación de ADN se use para diagnóstico de una enfermedad o para diagnosticar una predisposición hacia una enfermedad. Adicionalmente,
- 35 también se prefiere particularmente que el estado de metilación de ADN se utiliza para el diagnóstico de una progresión de una enfermedad, si el estado de salud de una persona con respecto a dicha enfermedad específica ha sido ya determinado.
- De acuerdo con la invención, el uso de los métodos descritos aquí se prefiere especialmente si la enfermedad es una enfermedad de tipo cáncer.
- 40 El uso de métodos descritos aquí se prefiere en particular, si el uso está caracterizado porque el estado de metilación de ADN se utiliza para diagnosticar una enfermedad, para diagnosticar una predisposición para una enfermedad y/o para diagnosticar la progresión de una enfermedad, en donde en particular la enfermedad es una enfermedad tipo cáncer.
- 45 El uso de métodos descritos aquí se prefiere en particular, si está caracterizado porque se predice si el estado de salud de una persona será influenciado positiva o negativamente por un fármaco o sustancia química o no. Esto es preferido particularmente si el uso de los métodos descritos aquí está caracterizado porque el estado de metilación de ADN se utiliza para predecir si el estado de salud de una persona será influenciado positiva o negativamente por un fármaco o sustancia química o no. El uso es preferido especialmente si el estado de salud está caracterizado por una enfermedad, una predisposición para una enfermedad y/o por una progresión de una enfermedad. Esto es lo más especialmente preferido si la enfermedad es una enfermedad tipo cáncer.
- 50 El uso de los métodos descritos aquí es especialmente preferido si el estado de metilación de ADN es caracterizado porque las posiciones están metiladas o no metiladas en comparación con condiciones normales y si existe una enfermedad definida individual o una predisposición para una enfermedad definida individual. Desde luego, el uso de los métodos y kits descritos aquí también es preferido si el estado de metilación de ADN puede ser también caracterizado en que las posiciones están metiladas o no metiladas en comparación con diversos niveles de
- 55 condiciones de enfermedad y si existe una enfermedad gradualmente progresiva.

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

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

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

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

a) se prepara el ADN de una muestra archivada originada de un tejido enfermo y se determina el estado de metilación del ADN,

b) se prepara el ADN de una muestra originada de un tejido saludable y se determina el estado de metilación del ADN,

25 c) se define un objetivo específico de indicación como las diferencias en el estado de metilación de ADN de un ADN derivado de un tejido enfermo en comparación con el ADN derivado de un tejido saludable.

El uso de los métodos descritos aquí es preferido si el objetivo específico de indicación es una proteína, péptido o ARN o cualquier otra sustancia bioactiva endógena como por ejemplo hormonas.

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

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

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

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

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

Métodos para el análisis de metilación de ADN

50 Los siguientes métodos para la detección de la metilación de ADN son métodos preferidos para uso con la invención. Estos métodos permiten la determinación del estado de metilación de uno o de una pluralidad de dinucleótidos CpG (por ejemplo, islas CpG) dentro de una secuencia de ADN. Tales métodos que involucran, entre otras técnicas, el método DMH, secuenciación de ADN tratado con bisulfito, un cierto número de ensayos de metilación con base en

PCR, algunos de ellos - conocidos como COBRA, MS-SNuPE, MSP, MSP anidado, HeavyMetilTM, MetilLightTM y ensayo QM – son descritos en mayor detalle ahora:

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

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

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

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

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

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

50 Un enriquecimiento del ADN metilado o no metilado también puede suceder por medio de proteínas, péptidos u oligómeros que se enlazan específicamente a ADN metilado o no metilado. El enlazamiento puede ser específico o no específico de la secuencia. Sin embargo, se separa un ADN no enlazado por ADN enlazado a través del enlazamiento. Dependiendo de qué clase de ADN es de interés, el ADN metilado o no metilado, o cual clase de ADN está enlazado, la fracción enlazada o no enlazada de ADN es analizada adicionalmente. Esto significa que las proteínas pueden ser usadas con ADN no metilado específicamente elanzado, así como proteínas que se enlacen específicamente a ADN metilado. Adicionalmente, es posible enlazar ese ADN, el cual se analiza posteriormente. Por lo tanto el ADN no enlazado es retirado antes de que el ADN enlazado sea liberado de la proteína. Por otro lado también es posible dejar enlazar el ADN de fondo a las proteínas y por lo tanto ser retirado de la mezcla de reacción.

55 Desde luego, también es posible llevar a cabo tal enriquecimiento en dos etapas subsecuentes mediante con lo cual el orden no es relevante. En una etapa, se usan las proteínas que se enlazan específicamente a ADN no metilado y en la otra etapa, las proteínas que se enlazan específicamente a ADN metilado. Tal procedimiento tiene la ventaja de

que simultáneamente el ADN no metilado y el ADN metilado son enriquecidos mientras que el ADN sin o con solo unas pocas posiciones CpG es removido.

5 Puede lograrse un enriquecimiento por proteínas cuya metilación enlace específicamente a ADN y también mediante el uso de sus dominios o péptidos. Tales proteínas pueden ser, por ejemplo MeCP2, MBD1, MBD2, MBD₄ y Kaiso. Esta última enlaza la secuencia específicamente a saber sobre posiciones CpGpCpG simétricas metiladas. A manera de ejemplo, el dominio de enlace Metilo-CpG de la proteína MeCP2 o el dominio CXXC-3 de la proteína MBD1 se mencionan como dominios adecuados para enriquecimiento (para una revisión: Shiraishi et al., *Anal Biochem.* 2004 Jun 1; 329 (1):1-10; Hendrich and Tweedie, *Trends Genet.* 2003 May, 19 (5): 269-77; Jørgensen et al., *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 3387-3395).

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

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

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

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

30 En principio, un ADN puede ser fragmentado aleatoriamente o no aleatoriamente antes de ser sometido a enriquecimiento por cualquier método usando proteínas, péptidos u oligómeros. Esto se hace como es conocido por los experimentados en la técnica. La fragmentación puede ser llevada a cabo aleatoriamente por ejemplo con sonicación o desgarramiento. Pero también puede ser llevada a cabo no aleatoriamente, preferiblemente mediante el uso de endonucleasas de restricción específicas de la metilación, en particular del grupo de "*BisI*, *Bst*UI, *Bsh*1236I, *Acc*II, *Bst*FNI, *Mcr*BC, *Mvn*I, *Hpa*II (*Hpa*II), *Hha*I, *Ac*I, *Sma*I, *Hin*P1I, *Hpy*CH4IV y cualquier mezcla de dos o más de las enzimas antes mencionadas".

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

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

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

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

55

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

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

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

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

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

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

Adicionalmente, la digestión con enzimas de restricción de productos de PCR amplificados a partir de ADN convertido por bisulfito también se usa, en el método descrito por Sadri & Hornsby (Nucl. Acids Res. 24:5058-5059, 1996).

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

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

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

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

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

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

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

55 HEAVYMETILTM. (WO 02/072880 ; Cottrell SE et al. Nucleic Acids Res. 2004 Jan 13;32(1):e10) Una realización adicional preferida del método comprende el uso de oligonucleótidos bloqueadores. En el ensayo HeavyMetilTM se hibridan oligonucleótidos de sonda de bloqueo al ácido nucleico tratado con bisulfito concurrentemente con los

cebadores de PCR. La amplificación por PCR del ácido nucleico se termina en la posición 5' de la sonda de bloqueo, de tal manera que la amplificación de un ácido nucleico es suprimida donde está presente la secuencia complementaria de la sonda bloqueadora. Las sondas pueden ser diseñadas para hibridar al ácido nucleico tratado con bisulfito en una manera específica del estado de metilación. Por ejemplo, para la detección de ácidos nucleicos metilados dentro de una población de ácidos nucleicos no metilados, la supresión de la amplificación de los ácidos nucleicos que son no metilados en la posición en cuestión sería llevada a cabo mediante el uso de sondas de bloqueo que comprende una "CpA" o "TpA" en la posición en cuestión, en oposición a "CpG" si se desea la supresión de la amplificación de los ácidos nucleicos metilados.

Para los métodos de PCR que utilizan oligonucleótidos bloqueadores, la perturbación eficiente de la amplificación mediada por la polimerasa requiere que los oligonucleótidos bloqueadores no sean elongados por la polimerasa. Preferiblemente, esto se logra a través del uso de bloqueadores que son 3'desoxioligonucleótidos u oligonucleótidos derivados en la posición 3' con un grupo diferente a hidroxilo "libre". Por ejemplo, los 3'-O-acetilo oligonucleótidos son representativos de una clase preferida de molécula bloqueadora.

Adicionalmente, la descomposición mediada por polimerasa de los oligonucleótidos bloqueadores debería ser precluida. Preferiblemente, tal preclusión comprende bien sea el uso de una polimerasa que carece de actividad de 5'-3'exonucleasa, o el uso de oligonucleótidos bloqueadores modificados que tienen, por ejemplo, puentes tioato en los terminales 5' del mismo y hacen que la molécula de bloqueador sea resistente a la nucleasa. Aplicaciones particulares pueden no requerir tales modificaciones en 5' del bloqueador. Por ejemplo, si el bloqueador - y los sitios de enlazamiento del cebador se superponen, por lo tanto el enlazamiento precluyente del cebador (por ejemplo con bloqueador en exceso), la degradación del oligonucleótido bloqueador será sustancialmente precluida. Esto se debe a que la polimerasa no extenderá el cebador hacia y a través de (en la dirección 5'-3') del bloqueador- un proceso que normalmente da como resultado la degradación del oligonucleótido bloqueador hibridado.

Una realización de bloqueador/PCR particularmente preferida, para propósitos de la presente invención y tal como es implementada aquí, comprende el uso de oligómeros de ácido nucleico peptídico (PNA) como oligonucleótidos bloqueadores. Tales oligómeros bloqueadores PNA son adecuados idealmente, puesto que ni son descompuestos ni extendidos por la polimerasa.

Preferiblemente, por lo tanto, se requiere que la secuencia base de dichos oligonucleótido bloqueadores comprenda una secuencia que tiene una longitud de al menos 9 nucleótidos la cual hibrida a la secuencia de ácido nucleico tratada químicamente, en donde la secuencia bases de dichos oligonucleótidos comprende al menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA.

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

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

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

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

MetiLight™. El ensayo MetiLight™ es un ensayo de metilación cuantitativo de alto rendimiento que utiliza PCR en tiempo real basado en fluorescencia (TaqMan™) como tecnología que no requiere manipulaciones adicionales después de la etapa de PCR (Eads et al., Cancer Res. 59:2302-2306, 1999). En resumen, el proceso MetiLight™ comienza con una muestra mixta de ADN genómico que es convertido, en una reacción con bisulfito de sodio, en una reserva mixta de diferencias de secuencia dependientes de la metilación de acuerdo con procedimientos estándar (el proceso con bisulfito convierte residuos de citosina no metilados en uracilo). El PCR basado en fluorescencia se lleva a cabo entonces, bien sea en una reacción "no desplazada" (con cebadores que no se superpone con sitios de

metilación de CpG conocidos), o en una reacción "desplazada" (con cebadores de PCR que se superponen con dinucleótidos CpG conocidos). La discriminación de secuencia puede ocurrir bien sea en el nivel del proceso de amplificación o en el nivel del proceso de detección por fluorescencia, o en ambos.

5 El ensayo MetiLight™ puede ser utilizado como prueba cuantitativa para patrones de metilación en la muestra de ADN genómico, en donde la discriminación de secuencia ocurre al nivel de la hibridación con sonda. En esta versión cuantitativa, la reacción de PCR provee una amplificación no desplazada en la presencia de una sonda fluorescente que se superpone con sitio de metilación putativo particular. Se provee un control no desplazado de la cantidad de ADN ingresado por una reacción en la cual ni los cebadores, ni la sonda se depositan sobre ningún dinucleótido CpG. Alternativamente, se logra una prueba cualitativa para metilación genómica sondeando la reserva de PCR desplazada bien sea con oligonucleótidos de control que no "cubren" sitios de metilación conocidos (una versión basada en fluorescencia de la técnica "MSP"), o con oligonucleótidos que cubren sitios de metilación potenciales.

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

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

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

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

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

son sustituidos con tiofosfatos, pueden ser convertidos en un ADN de carga neutra utilizando química de alquilación sencilla (Gut & Beck, Nucleic Acids Res. 23: 1367-73, 1995). El acoplamiento de una etiqueta de carga a este ADN modificado da como resultado un incremento en la sensibilidad por MALDI-TOF al mismo nivel que la encontrada para péptidos.

- 5 Los amplificados también pueden ser detectados y/o analizados adicionalmente por medio de oligonucleótidos que constituyen todo o parte de un "arreglo" o "chip de ADN" (esto es, una disposición de diferentes oligonucleótidos y/o oligómeros de APN enlazados a una fase sólida). Tal disposición de diferentes secuencias de oligonucleótidos y/o oligómeros de APN puede ser caracterizada, por ejemplo, de tal forma de que se disponga sobre la fase sólida en la forma de una red rectangular o hexagonal. La superficie de fase sólida puede estar compuesta de silicio, vidrio, poliestireno, aluminio, acero, hierro, cobre, níquel, plata u oro. También pueden usarse nitrocelulosa así como plásticos tales como nilón, que pueden existir en la forma de pellas o también como matrices de resina. Una revisión de la técnica anterior en la manufactura de disposiciones de oligómeros puede ser obtenida de una edición especial de Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999, y de la literatura citada allí). Se usan frecuentemente sondas marcadas fluorescentemente para el barrido de disposiciones de ADN inmovilizado. La unión simple de colorante Cy3 y Cy5 al 5'-OH de la sonda específica es particularmente adecuada para marcas de fluorescencia. La detección de la fluorescencia de las sondas hibridadas puede ser llevada a cabo, por ejemplo, con un microscopio confocal. Los colorantes Cy3 y Cy5, además de muchos otros, están disponibles comercialmente. La conversión con bisulfito y el proceso de amplificación de acuerdo con la invención pueden ser utilizados en combinación con este método de detección.
- 10
- 15
- 20 Además, métodos adicionales para análisis de metilación son conocidos por personas experimentadas en la técnica. Tales métodos son por ejemplo métodos en los cuales el ADN tratado con bisulfito es sometido a métodos de análisis basados en disposición de ADN tal como los descritos en WO 99/28498, WO 01/38565, o en WO 02/18632.

EJEMPLOS.

Ejemplo 1.

- 25 a) Etapa de remoción de parafina

Reactivos químicos necesarios:

Limoneno145, Fluka Chemika, Art Nr. 89188

Procedimiento:

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

b) Etapa de lisis

ES 2 564 659 T3

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

Reactivos químicos:

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

Prepare una solución de reserva de 1 mol/l:

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

EDTA (ácido etilendiaminotetraacético),

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

- 10 MW = 372.24 g/mol

Prepare una solución de reserva de 0.5 mol/l: Disuelva 186.1 g en 800 ml de H₂O y ajuste a pH 8.0 con NaOH, completa hasta 1 l. Tween (Tween 20), Fluka, Chemika Art Nr. 93773

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

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

0.5% Tween (volumen %)

Proteinasa K, Roth

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

Procedimiento:

1. Añada 190 µl del regulador de lisis preparado a cada muestra. Es importante asegurar que todo el material de muestra está cubierto por el regulador de lisis.
- 25 2. Agregue 20 µl de la solución preparada de proteinasa K.
3. Someta a vórtex el tubo rigurosamente para asegurar una mezcla apropiada de la muestra con el regulador de lisis y la proteinasa K. Asegúrese de que las tapas del tubo están cerradas herméticamente - ¡de otra manera habrá pérdida de líquido!
4. Incube a 60°C, con agitación a 1,000 rpm (termoagitador).
- 30 5. Incube durante 40 a 48 horas, no son necesarias adiciones posteriores de proteinasa K.
6. Haga rotar en la mañana y en la tarde de cada día para eliminar gotitas de la tapa, someta a vórtex vigorosamente.
7. Incube la muestras a > 95°C durante 10 minutos con el fin de inactivar la proteinasa K. Para esto, fije el termomezclador a una temperatura de 99°C, puesto que la temperatura real en la fijación más alta está algunos grados por debajo de la temperatura indicada.
- 35 (proteinasa k activa en el lisado reducirá el rendimiento del PCR, especialmente si el lisado se utiliza directamente para cuantificación del ADN genómico por PCR en tiempo real)

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

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

ES 2 564 659 T3

Almacenamiento:

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

c) Etapa de extracción de ADN

5 Equipo necesario

- centrifuga de placas (Sigma o Qiagen, capaz de hasta $5,758 \times g$ ($6,000 \text{ rpm}$))
- pipeteadores para volúmenes de $10 \mu\text{l}$ hasta $1,000 \mu\text{l}$ (multicanal para volúmenes grandes)
- Contenedor de residuos para flujo de ADN (por ejemplo, recipiente con eliminación de ADN) Material requerido:
- Dneasy 96 Tissue Kit (Qiagen # 69581 o 69582)

10 • puntas de pipeta ($100 \mu\text{l}$, $1000 \mu\text{l}$)

- tubos Falcon de $15 \mu\text{l}$ y $50 \mu\text{l}$

Reactivos químicos necesarios:

- etanol, grado biología molecular

Procedimiento:

15 Asegúrese con marcación respectiva que todas las placas en un ensamble están giradas en la misma dirección (pozo A1 sobre pozo A1 etc.).

1. Distribuya $400 \mu\text{l}$ de AL/E en microtubos de recolección y transfiera el lisado ($200 \mu\text{l}$) a los tubos; selle los tubos con tapas para tubos de recolección; utilice la tapa de la placa para fijar los tubos en la gradilla

20 2. Mezcle agitando 15 segundos con AMBAS manos; gire por un período corto (deje que la centrifuga alcance $1,450 \times g$ y detenga);

3. Coloque la placa DNeasy 96 sobre un bloque S (selle los pozos no usados de la placa DNeasy con lámina AirPore Tape). Cuidadosamente aplique la mezcla de la etapa 2 sobre las columnas. Selle con AirPore Tape. Centrifugue a $5,790 \times g$ durante 10 minutos. Si hay todavía fluido visible en las membranas, agregue una etapa de centrifugación.

25 4. Remueva la cinta. Agregue $500 \mu\text{l}$ de AW1. Selle con una lámina AirPore Tape. Vacíe el bloque S. Haga rotar durante 5 minutos a $5,790 \times g$.

5. Retire la cinta. Agregue $500 \mu\text{l}$ de AW2. Selle con nueva lámina AirPore Tape. Vacíe el bloque S. Haga rotar durante 15 minutos a $5,790 \times g$, esto debería dejar la membrana seca.

30 6. Coloque la placa DNeasy sobre una placa de microtubos de elución. Para eluir el ADN agregue $120 \mu\text{l}$ de regulador AE o ddH_2O precalentados a 70°C a cada pozo. Selle la placa con una nueva lamina de AirPore Tape. Incube durante 5 minutos a temperatura ambiente. Haga rotar durante 2 minutos a $5,790 \times g$.

7. Selle los microtubos de elución con las tapas provistas. Almacene a -20°C o -80°C (dependiendo del tiempo de almacenamiento)

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

Equipo necesario:

- #### 35
- Termociclador (por ejemplo Eppendorf, Tetrad)
 - Centrifuga de placas (Sigma o Qiagen, capaz de hasta $5,700 \times g$)
 - Pipeteadores para volúmenes desde $10 \mu\text{l}$ hasta $1000 \mu\text{l}$ (Eppendorf multicanal + pipeteadores Matrix)

Material necesario:

- Placas de PCR + tiras de tapas

ES 2 564 659 T3

- QIAamp 96 DNA Blood Kit (Qiagen #51161 para 4 placas o 51162 para 12)
- Bloques y tapas de pozos redondos adicionales (1 adicional necesario para cada purificación de 96 muestras; #19576 para 24 placas)
- Regulador QIA AVL (#19073 para 155 µl, 560 µl por muestra requerida)

- 5
- puntas de pipeta (100 µl, 1,000 µl, Eppendorf + Matrix)
 - Tubos Falcon de 15 ml y 50 ml
 - contenedor de residuos para fluido de ADN (por ejemplo recipiente con eliminación de ADN)

Reactivos químicos necesarios:

- bisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, 190.1 g/mol), Merck 1.06528.0500
- 10
- sulfito de sodio, anhidro (Na_2SO_3 , 126.04 g/mol), Fluka 71988
 - ddH₂O grado biología molecular (filtrada por 0.2 µm, tratada con DEPC, sometida a autoclave, libre de DNasas y RNasas)
 - dietilenglicoldimetiléter (DME), Merck 8.02934.0250
 - ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (250.29 g/mol), Aldrich 23, 881-3
- 15
- etanol, grado biología molecular
 - pellas de hidróxido de sodio (NaOH, 40.0 g/mol), Merck 1.06482.1000

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

- 20
- Solución de bisulfito: se disuelven disulfito de sodio (4.708 g) y sulfito de sodio (1.128 g) agregando 10 ml de ddH₂O (la solución es 4.9 M). El volumen final es alrededor de 12 ml. Verifique el pH de la solución - si no está entre 5.45 y 5.5, descarte la solución y repita su preparación. Agite vigorosamente y si es necesario, caliente la solución a 50°C en un baño de agua con vórtex a una velocidad máxima durante 30 segundos. Repita este procedimiento tantas veces como sea necesario hasta que la sal se haya disuelto completamente.

- 25
- Solución de DME - depurador de radicales Disuelva 125.3 mg del ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico agregando 1.0 ml de DME. Somete a vórtex rigurosamente con el fin de asegurar que todas las partículas no disueltas permanezcan. El DME es peligroso y potencialmente carcinogénico. Por lo tanto, tome precauciones apropiadas cuando maneje este reactivo químico. Si sólo se van a tratar pocas muestras con bisulfito, prepare volúmenes menores.

- 30
- Regulador de desulfonación: Disuelva 0.8 g de hidróxido de sodio en 10 ml de ddH₂O para preparar una solución de reserva 2 mol/l. Para el regulador de desulfonación mezcle 1.0 ml de hidróxido de sodio 2 mol/l y 9.0 ml de etanol. ¡La solución tiene que ser preparada fresca antes de cada purificación!

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

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

1. 44 µl de regulador/agua que contiene el ADN que va a ser tratado con bisulfito
 2. 83 µl de solución de bisulfito (la aplicación con pipeteado del bisulfito y la muestra pueden ser intercambiadas)
- 35
3. 13 µl de solución de DME, que contiene el depurador de radicales
 4. mezcle exhaustivamente
 5. coloque en pozos de 0.2 ml del termociclador. ¡Utilice tiras de tapas para cerrar los pozos!

Programa de temperatura en un termociclador

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

- 22:00 minutos incubación a 60°C
- 3:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C
- 1:27:00 horas incubación a 60°C
- 3:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C

5 • 2:57:00 horas incubación a 60°C

- enfriamiento a 20°C

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

1 Preparación del regulador de enlazamiento AVL

- 10 • Agregue 1 ml de regulador AVL a 310 µg de ARN transportador liofilizado. Disuelva exhaustivamente.
- Transfiera a la botella de regulador AVL (30 ml), y mezcle exhaustivamente antes de utilizar el regulador AVL por primera vez.

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

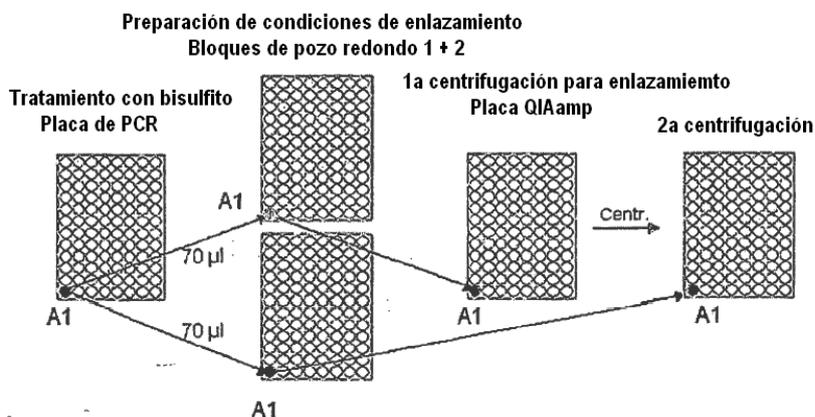
2. Preparación de condiciones de enlazamiento

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

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

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

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



3. Enlazamiento

- Ambos pozos son cargados subsecuentemente sobre UNA columna (véase ilustración más arriba)

- Coloque la placa QIAamp 96 sobre la parte superior de un bloque S
 - Aplique 630 µl del primer pozo por muestra de placa QIAamp 96
 - Selle la placa con una lámina de AirPore Tape, haga rotar a 5,790 x g durante 4 minutos
 - Vacíe el bloque S
- 5
- Repita el enlazamiento con un segundo pozo de cada muestra sobre la misma columna como con el primer pozo (carga, sellamiento, rotación, vaciamiento de bloque S)
4. Lavado y 5. desulfonación
- Coloque la placa QIAamp 96 del bloque S
 - Agregue 500 µl de regulador AW1
- 10
- Selle la placa con nueva lámina AirPore Tape
 - Haga rotar a 5,90 x g durante 2 minutos
 - Vacíe el bloque S, coloque la placa sobre el bloque S
 - Agregue 500 µl de NaOH 0.2 mol/l sobre la placa QIAamp 96
 - Selle con una lámina nueva de AirPore Tape, incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 15
- Centrifugue a 5,90 x g durante 1 minuto.
 - Vacíe el bloque S
 - Agregue 500 µl de AW2
 - Selle la placa con nueva lámina AirPore Tape
 - Haga rotar a 5,90 x g durante 15 minutos
- 20
6. Elución
- Coloque la placa QIAamp 96 sobre la gradilla de microtubos de elución.
 - Agregue 100 µl de AE o ddH₂O precalentados a 70°C.
 - Sella la placa con una nueva lámina de AirPore e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos
 - Haga rotar a 5,790 x g durante 4 minutos
- 25
- Selle los tubos con tapas
- El ADN puede ser entonces amplificado y analizado posteriormente por medio de los métodos sensibles para el análisis de metilación de ADN.
- Ejemplo 2.
- 30
- Todas las etapas se harán en los tubos en los que se proveen las muestras, esto es, los tubos provistos por el proveedor de las muestras, estos pueden ser tubos tanto de 1.5 como de 2.0 ml (preferidos). Por favor, reconfirme que los formatos de tubo encajan en la centrifuga.
- Los solventes y reguladores pueden ser suministrados bien sea con pipetas de canal sencillo o multipipetas
- a) Remoción de parafina
- Reactivo químico necesario:
- 35
- Limoneno145, Fluka Chemika, Art Nr. 89188

ES 2 564 659 T3

Procedimiento:

- 5 1. Agregue 1 ml de limoneno a cada tubo (que contiene 1 a 5 láminas de muestra de cirugía embebida en parafina - fijada con formalina). Coloque todas las piezas en el líquido. En algunos casos el material de la muestra es ya muy frágil con pequeñas piezas de parafina/tejido en el tubo - asegurarse de que el material que se adhiera a la tapa del tubo cae dentro del tubo.
2. Incubación durante 1 hora a temperatura ambiente a 1000 rpm, vórtex vigorosamente al menos durante 3 veces durante la incubación.
3. Coloque los tubos en la centrífuga y haga rotar a 16,000 rcf (= 16,000 x g) durante 5 minutos, el tejido formará pellas en el fondo del tubo.
- 10 4. Usa una pipeta de 1 ml para succionar el limoneno de cada muestra. ¡Tenga gran cuidado para no perturbar la pella! Coloque la punta de la pipeta opuesta a la pastilla sobre el tubo y permita que el limoneno entre suavemente a la punta de la pipeta, en algunos casos puede ser más fácil retirar el volumen completo en dos más bien que en una etapa de pipeta. Es correcto si permanecen pequeñas cantidades (hasta 50 µl) de limoneno en el tubo.
5. Si el tejido se deposita sólo débilmente en el fondo (esto es, no forma una pella definida) haga lo siguiente:
 - 15 • repita la centrifugación de nuevo durante 5 minutos en una centrífuga Eppendorf 5417 a velocidad máxima (> 20,000 rcf)
 - entonces repita la remoción de limoneno: asegúrese de que la punta de la pipeta es presionada contra el fondo del tubo y que el limoneno es retirado muy lentamente de tal manera que no succione el tejido. Retire tanto limoneno como sea posible.
- 20 Obvie la etapa del etanol, si fue posible retirar casi todo el limoneno (si quedan 50 µl, esto estará bien)
6. Agregue 1 ml de etanol (pureza > 99%).
7. Someta a vórtex, 10 minutos de incubación a temperatura ambiente a 1,00 rpm.
8. Coloque los tubos en la centrífuga y hágalos rotar a 16,000 rcf durante 5 minutos, el tejido se depositará de nuevo en el fondo del tubo.
- 25 9. Utilice la pipeta para succionar el etanol, ¡debe tenerse gran cuidado para no perturbar las pellas! Coloque la punta de la pipeta opuesta a la pella sobre la pared del tubo y permita que suavemente etanol entre a la punta de la pipeta.
10. retire tanto etanol como sea posible con la pipeta.
11. el etanol residual no retirado por la pipeta debe ser evaporado por incubación en un termomezclador a 50°C. Esto puede tomar entre 10 a 30 minutos, pero tenga cuidado de no sobresecar las muestras.
- 30 No es necesario el secado, si la etapa del etanol fue obviada.
- b) Etapa de lisis
- Prepare un volumen más grande del regulador de lisis (0.5 o 1 l), dependiendo del número de muestras que se van a procesar para un proyecto. Este regulador puede ser almacenado a temperatura ambiente durante 3 meses. Después de este tiempo es prudente preparar un regulador fresco.
- 35 Reactivos químicos:
TRIS (tris-hidroximetil-amino-metano), Merck, Art. Nr. 1.01549.0500, MW = 121.14 g/mol
Prepare una solución de reserva de 1 mol/l:
Disuelva 121.14 g en 800 ml de H₂O y ajuste a pH 8.0 con HCl y complete hasta 1 l.
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético),
- 40 EDTA de sodio (Titriplex III) de Merck, Art. Nr. 159294
MW = 372.24 g/mol

ES 2 564 659 T3

Prepare una solución de reserva de 0.5 mol/l:

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

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

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

Composición de regulador de lisis:

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

Proteinasa K, Roth

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

Procedimiento:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

c) Extracción de ADN con el kit QIAGEN DNeasy Tissue

Duración aproximada para 30 muestras:

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

- 40 Se necesitan los siguientes dispositivos:

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

ES 2 564 659 T3

Se necesitan los siguientes reactivos:

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

Etanol para biología molecular (96-100%)

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

Preparación (antes de incoar la extracción real):

- 10 1. Mezcle el regulador AL exhaustivamente agitando antes del uso. El regulador AL es estable durante 1 año cuando se almacena a temperatura ambiente. Si se ha formado un precipitado en el regulador AL, disuelva incubando a 70°C.
2. Se suministra regulador AW como concentrado. Agregue la cantidad apropiada de etanol (96-100%) antes de un primer uso (estas cantidades difieren para los kits 69504 y 69506, respectivamente). El regulador AW 1 es estable durante 1 año cuando se almacena cerrado a temperatura ambiente.
- 15 3. El regulador AW 2 se suministra como concentrado, la cantidad apropiada de etanol (96-100%) antes del primer uso (estas cantidades difieren para los kits 69504 y 69506, respectivamente). El regulador AW 2 es estable durante 1 año cuando se almacena cerrado a temperatura ambiente.
4. Si las muestras fueron congeladas después de la lisis del tejido asegúrese de que las muestras están equilibradas a temperatura ambiente.
5. Caliente un termomezclador a 70°C.
- 20 6. Todas las etapas de centrifugación deben llevarse a cabo a temperatura ambiente.
7. Sea cuidadoso de no causar derrames cuando utilice la multipipeta en lugar de pipeteadores individuales.

Procedimiento de extracción:

- 25 1. Agregue 210 µl (si el lisado tiene un volumen mayor: 1 volumen de regulador de lisis + volumen de proteinasa K usados) de regulador AL al tubo (1.5 o 2.0 ml) que contiene el lisado, mezcle exhaustivamente vórtex. Coloque el tubo en un termomezclador e incube a 70°C, agitando a 1000 rpm durante 10 minutos.
2. Agregue 210 µl (si el lisado tiene un volumen mayor: de nuevo 1 volumen de regulador de lisis + volumen de proteinasa K usados) de etanol (96-100%) a la muestra, y mezcle por vórtex con pulso durante 15 segundos. Después de la mezcla, centrifugue brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
- 30 3. Aplique cuidadosamente la mezcla de la etapa 2 (hasta 700 µl cabrán dentro de la columna, ¡incluyendo los precipitados!) sobre una columna de rotación DNeasy la cual ya está colocada en un tubo de recolección de 2 ml (provisto por Qiagen) sin humedecer el borde. Cierre la tapa y centrifugue a 6,000 x g (= rcf, u 8,000 rpm) durante 1 minuto. Coloque la columna de rotación DNeasy en un tubo de recolección de 2 ml limpio (provisto por Qiagen), y descarte el tubo que contiene el filtrado.
- 35 4. Si los lisados fueran mayores de 210 µl la columna tiene que ser cargada una segunda vez: colóquela en un tubo de 2 ml nuevo, agregue el volumen remanente de la mezcla de la etapa 2, haga rotar como en la etapa 3.
5. Abra cuidadosamente la columna de rotación y agregue 500 µl de regulador AW 1 (este es el mismo para grandes lisados, también) sin humedecer el borde. Cierre la tapa y centrifugue a 6,000 x g durante 1 minuto. Coloque la columna de rotación en un tubo de recolección de 2 ml limpio (provisto), y descarte el tubo de recolección que contiene el filtrado.
- 40 6. Abra cuidadosamente la columna de rotación y agregue 500 µl de regulador AW 2 sin humedecer el borde. Cierre la tapa y centrifugue a velocidad completa 20,000 x g (14,000 rpm) durante 3 minutos.
7. Opcional: Descarte el filtrado. Con el fin de evitar el arrastre de etanol, deben usarse nuevos tubos (no provistos por Qiagen). Centrifugue de nuevo durante 1 minuto a 20,000 x g (14,000 rpm).
- 45 8. Coloque la columna de rotación DNeasy en un tubo de reacción de 1.5 ml tubo limpio y ya marcado (no provisto por Qiagen), y descarte el tubo de recolección que contiene el filtrado. Abra cuidadosamente la columna de rotación DNeasy y agregue 60 µl del regulador de elución AE (a temperatura ambiente) al centro de la columna. Incube a

5 temperatura ambiente durante 1 minuto, luego centrifugue a 6,000 x g (8,000 rpm) durante 1 minuto. Agregue de nuevo 60 µl de nuevo regulador de elución al centro de la columna, incube durante 1 minuto y centrifugue a 6,000 x g durante 1 minuto utilizando el mismo tubo. El volumen final es 120 µl (suficiente para 2 reacciones repetidas con nuevo protocolo), aunque puede ocurrir alguna pérdida debido a la retención de líquido en la columna. Si la concentración final de ADN no es crítica, pueden escogerse también volúmenes de elución más grandes (¡los volúmenes van a ser definidos específicamente para el proyecto!)

9. Si las muestras se usan para tratamiento con bisulfito dentro de los 2 días siguientes manténgalas a +4°C en un refrigerador. Para almacenamiento a largo plazo se recomienda -20°C.

Análisis:

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

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

Equipo necesario:

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

Material necesario:

- dispositivos Microcon Centrifugal Filter, Microcon® YM-30 (Millipore/Amicon 42410)
- puntas de pipeta (100 µl, 1000 µl)
- 20 • tubos de PCR de 200 µl (por ejemplo, Eppendorf 0030 124.359)
- tubos de 1.5 ml (por ejemplo Eppendorf 0030 120.086)
- tubos Falcon de 15 ml y 50 ml

Reactivos químicos necesarios:

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

Preparación de soluciones (suficientes para 80 reacciones):

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

40 Solución de DME - depurador de radicales: disuelva 125.3 mg de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-cromano-2-carboxílico agregando 1.0 ml de DME. Somete a vórtex vigorosamente con el fin de asegurarse que no permanecen

ES 2 564 659 T3

partículas no disueltas. El DME es peligroso y potencialmente carcinogénico. Por lo tanto tome las precauciones adecuadas cuando manipule este reactivo químico. Si sólo se van a tratar pocas muestras con bisulfito, prepare volúmenes más pequeños.

NaOH 0.2 mol/l: Disuelva 0.32 g de hidróxido de sodio en 40 ml de ddH₂O. Regulador

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

General:

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

Procedimiento de tratamiento con bisulfito:

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

- 15
1. 50 µl de regulador/agua que contiene el ADN que va a ser tratado con bisulfito.
 2. 95 µl de solución de bisulfito.
 3. 15 µl de solución de DME, que contiene el depurador de radicales.

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

Programa de temperatura:

- 20
- 5:00 minutos desnaturalización de DNA a 99°C
 - 22:00 minutos incubación a 50°C
 - 3:00 min desnaturalización de DNA a 99°C
 - 1:27:00 horas incubación a 50°C.
 - 3:00 minutos desnaturalización de DNA a 99°C
- 25
- 2:57:00 horas incubación a 50°C
 - Enfriamiento a 20°C

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

Procedimiento de purificación de ADN:

- 30
- Después de que la incubación ha terminado, transfiera la solución de reacción (160 µl) en un tubo de recolección de 1.5 ml.
 - Agregue 120 µl ddH₂O al tubo de reacción. Mezcle pipeteando hacia arriba y hacia abajo y transfiera la solución al mismo tubo de recolección.
 - ¡Repita la etapa con 120 µl adicionales de ddH₂O!
- 35
- Cierre las tapas, someta a vórtex intensamente y haga rotar por un período corto para remover gotas de la tapa.
 - Tome toda esta solución (400 µl) y transfírela con una pipeta en un reservorio de muestra de un dispositivo de filtro Microcon ensamblado - ¡no toque la membrana con la punta de la pipeta!
 - Selle con la tapa anexa.

ES 2 564 659 T3

- Coloque el ensamblaje en la centrífuga, alinee la cinta de la tapa hacia el centro del rotor y haga rotar durante 15 minutos a 14,000 x g.
 - Después de la rotación, extraiga el ensamblaje y descarte el fluido. POR FAVOR TOME NOTA: La eficacia de la centrifugación puede variar dependiendo del modelo de centrífuga en particular y del instrumento usado. ¡Por lo tanto para todas las etapas de centrifugación verifique siempre el volumen de muestra pasado a través de la membrana! Si es necesario, incremente los tiempos de rotación en etapas de 2 minutos.
- 5
- Para desulfonación agregue 400 µl de 0.2 NaOH mol/l a la membrana
 - Coloque el ensamblaje de nuevo en la centrífuga y haga rotar durante 12 minutos a 14,000 x g. Extraiga el ensamblaje y descarte el fluido.
- 10
- Para lavar agregue 400 µl de ddH₂O
 - Coloque el ensamblaje de nuevo en la centrífuga y haga rotarla durante 12 minutos a 14,000 g. Extraiga el ensamblaje y descarte el fluido.
 - ¡Repita esta etapa dos veces adicionales! POR FAVOR TOME NOTA: Después de esto la membrana debería lucir húmeda, pero no debería estar cubierta por un volumen visible de líquido.
- 15
- Para la elución saque el ensamblaje de filtro de la centrífuga.
 - Agregue 75 µl de regulador TE precalentado (50°C) en el reservorio de la muestra. (Nota: Si la cantidad total es crítica, la elución debería llevarse a cabo durante 2 etapas de elución subsecuentes, por ejemplo 2 x 37.5 µl - debería definirse antes de cada estudio).
 - Incube durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación en un termomezclador a 1,000 rpm.
- 20
- Invierta el dispositivo de filtración y colóquelo en un nuevo tubo Microcon de 1.5 ml.
 - Eluya el ADN de la membrana haciendo rotar durante 5 minutos a 1,000 g.
 - Opcional: Si se desea transfiera el ADN a un tubo nuevo – la tapa de los tubos Microcon tiende a abrirse rápidamente.
 - Almacene el ADN a -80°C para almacenamiento a largo plazo o a +4°C para uso inmediato.

Ejemplo 3

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

Equipo necesario:

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

- 30 Material necesario:

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

- 35 • Tubos Falcon de 15 ml y 50 ml

Reactivos químicos necesarios:

- bisulfito de sodio (Na₂S₂O₅, MW = 190.1 g/mol), Merck 1.06528.0500
- sulfito de sodio, anhidro (Na₂SO₃, MW = 126.04 g/mol), Fluka 71988

ES 2 564 659 T3

- ddH₂O grado biología molecular (filtrada por 0,2 µm, tratada con DEPC, sometida a autoclave, libre de DNasas y RNasas)

- 1,4-dioxano, estabilizado (MW = 88.11 g/mol), Riedel de Haën 33147

- ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (MW = 250.29 g/mol), Aldrich 23,881-3

5 • Tris-hidroximetil-aminometano (M=121.14 g/mol), Merck 1.01549.0500

- pellas de hidróxido de sodio (MW = 40 g/mol), Merck 1.06482.1000

- EDTA (Titriplex® III, MW = 372.24 g/mol), Merck 1.08418.0250

Preparación de soluciones:

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

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

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

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

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

General:

- Este procedimiento puede ser aplicado a una muestra individual o a muchas muestras en paralelo.

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

- Todas las soluciones recolectadas como residuos en este procedimiento deben ser recolectadas, por ejemplo en una botella de vidrio y descartadas finalmente como solventes orgánicos libres de halógenos.

Procedimiento:

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

30 1. 20 µl de regulador/agua que contiene el ADN que va a ser tratado con bisulfito.

2. 85 µl de solución de bisulfito.

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

Programa de temperatura:

35 • 5:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C

- 25 minutos incubación a 60°C

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

- 1:25 horas incubación a 60°C

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

ES 2 564 659 T3

- 2:55 horas incubación a 60°C
- enfriar a 20°C hasta el final

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

- 5 Purificación del ADN:
1. Después de que termina la incubación, se transfiere la solución de reacción (140 µl) a un tubo de recolección de 1.5 ml, se agregan 260 µl de ddH₂O en el tubo de recolección.
 2. Mezclar mediante vórtex.
 3. Tomar todo esta solución (400 µl) y transferirla con pipeta al reservorio de muestra de un dispositivo de filtración Microcon ensamblado. (¡No toque la membrana con la punta de la pipeta!)
 - 4 Selle con la tapa anexa.
 5. Coloque el ensamblaje en la centrifuga, y la tira de tapas hacia el centro del rotor y haga rotar durante 15 minutos a 14,000 x g (= rcf).
 6. Después de la rotación retire el ensamblaje y descarte el fluido. TOME NOTA: la eficacia de la centrifugación puede variar dependiendo del modelo particular de centrifuga e instrumento usado. ¡Por lo tanto todas las etapas de centrifugación siempre deben verificar el volumen de muestra que pasa a través de la membrana! Si es necesario, incremente los tiempos de rotación en etapas de 2 minutos.
 7. Retire el ensamblaje de filtración de la centrifuga.
 8. Agregue 400 µl de NaOH 0.2 mol/l a la membrana.
 9. Coloque el ensamblaje de nuevo en la centrifuga y haga rotar durante 12 minutos a 14,000 x g, descarte el fluido.
 10. Lave la membrana agregando 400 µl de agua y haga rotar durante 12 minutos, descarte el fluido.
 - 11 Repita la etapa de lavado dos veces más.
 12. La membrana debería parecer húmeda, pero no debe estar cubierta por un volumen visible de líquido.
 13. Para elución, retire el ensamblaje de la centrifuga.
 14. Agregue 75 µl de regulador TE precalentado (50°C) (Tris/HCl 10 mmol/l; EDTA 0.1 mmol/l) en el reservorio de muestra.
 15. Incube durante 10 minutos con agitación en un termomezclador a 1,000 rpm (50°C).
 - 16 Invierta el dispositivo de filtro y colóquelo en un nuevo tubo Microcon de 1.5 ml.
 17. Haga rotar durante 5 minutos a 1,000 x g.
 18. Almacene el ADN a -20°C para almacenamiento a largo plazo o a +4°C para uso inmediato.
- Ejemplo 4. Etapa de lisis por medio de calentamiento
1. Centrifugue 1-6 secciones de tejido embebido en parafina fijado con formalina en un tubo de reacción de 1.5 ml durante 5 minutos a 16,000 x g.
 2. Agregue 100 µl de regulador de lisis (50 mmol/l TrisHCl, pH 8.0, 1 mmol/l EDTA, Tween 20 al 0.5% v/v, 5 ng/µl polydA)
 3. Incube durante 10 minutos a 65°C con agitación a 1,000 rpm en un termomezclador.
 4. Fije el termomezclador a 50° C y 1,400 rpm, deje las muestras en el termomezclador y déjelas enfriar.
 5. Agregue 10 µl de proteinasa K (30 mg/ml).

ES 2 564 659 T3

6. Haga caer por rotación todas las gotitas de la pared del tubo. Asegúrese de que las tapas del tubo están cerradas herméticamente – de otra manera habrá pérdida de líquido.

7. Incube durante 40-48 horas a 60°C en un termomezclador con agitación a 1,000 rpm.

5 8. Incube las muestras a > 95°C durante 10 minutos con el fin de inactivar la proteinasa K. Para esto, fije la temperatura del termomezclador en 99°C. Transfiera los tubos INMEDIATAMENTE a otro termomezclador temperado a 50°C, agite a 1,400 rpm e incube durante 5 minutos. Esto evita la formación de una película de parafina.

9. Aplique 44 µl de este lisado directamente (sin extracción adicional) al ejemplo 8.

Ejemplo 5.

a) Tratamiento con bisulfito y b) Purificación de ADN por medio del dispositivo Microcon™ y utilizando DME.

10 Equipo necesario:

- termociclador (por ejemplo Eppendorf, Tetrad)
- centrífuga (capaz de hasta 14,000 x g)
- pipeteadores para volúmenes de 100 µl y 1,000 µl

Material necesario

15 • dispositivos Microcon Centrifugal Filter, Microcon® YM-30 (Millipore/Amicon 42410)

- puntas para pipeta (100 µl, 1,000 µl)
- tubos de PCR de 200 µl (por ejemplo Eppendorf 0030 124.359)
- tubos de 1.5 ml (por ejemplo Eppendorf 0030 120.086)
- tubos Falcon de 15 ml y 50 ml

20 Reactivos químicos necesarios:

- bisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, MW = 190.1 g/mol), Merck 1.06528.0500
- sulfito de sodio, anhidro (Na_2SO_3 , MW = 126.04 g/mol), Fluka 71988
- ddH₂O grado de biología molecular (filtrada por 0.2 µm, tratada con DEPC, sometida a autoclave, libre de DNasas y RNasas)

25 • dietilenglicoldimetiléter (DME), Merck 8.02934.0250

- ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (MW = 250.29 g/mol), Aldrich 23,881-3
- Tris-hidroximetil-aminometano ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, MW = 121.14 g/mol), Merck 1.01549.0500
- pellas de hidróxido de sodio (NaOH, MW = 40.0 g/mol), Merck 1.06482.1000
- EDTA (Titriplex® III, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MW = 372.24 g/mol), Merck 1.08418.0250

30 Preparación de soluciones (suficiente para 80 reacciones):

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

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

ES 2 564 659 T3

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

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

General:

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

10 Procedimiento de tratamiento con bisulfito:

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

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

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

Protocolo de Temperatura:

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

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

Procedimiento de purificación del ADN:

- Después de que termina la incubación, transferir la solución de reacción (141 µl) a un tubo de recolección de 1.5 ml.
- 30 • Agregar 260 µl de ddH₂O al tubo de recolección.
- Cierre las tapas, someter a vórtex intensamente y hacer rotar un tiempo corto para retirar las gotas de la tapa.
- Tomar toda esta solución (400 µl) y transferirla con pipeta al reservorio de muestra de un dispositivo de filtro Microcon ensamblado - ¡no toque la membrana con la punta de la pipeta!
- Selle con la tapa anexa.
- 35 • Coloque el ensamblaje en la centrifuga, alinee la tira de tapas hacia el centro del rotor y haga rotar durante 15 minutos a 14,000 x g (= rcf).

- Después de la rotación retire el ensamblaje y descarte el fluido. TOME NOTA: la eficacia de la centrifugación puede variar dependiendo del modelo particular de centrífuga e instrumento usado. ¡Por lo tanto todas las etapas de centrifugación siempre deben verificar el volumen de muestra que pasa a través de la membrana! Si es necesario, incremente los tiempos de rotación en etapas de 2 minutos.
- 5
- Para desulfonación, agregue 400 µl de NaOH 0.2 mol/l a la membrana.
 - Coloque de regreso el ensamblaje en la centrífuga y haga rotar durante 12 minutos a 14,000 x g. Retire el ensamblaje y descarte el fluido.
 - Agregue 400 µl de ddH₂O.
- 10
- Coloque el ensamblaje de nuevo en la centrífuga y haga rotar durante 12 minutos a 14,000 x g. Retire el ensamblaje y descarte el fluido.
 - ¡Repita esta etapa dos veces adicionales! POR FAVOR TOME NOTA: después de esto la membrana debería parecer húmeda, pero no debería estar cubierta por un volumen visible de líquido.
 - Para elución del ADN, retire el ensamblaje de filtro de la centrífuga.
- 15
- Agregue 75 µl de regulador TE precalentado (50°C) en el reservorio de muestra. (Nota: Si la cantidad total es crítica, la elución debería ser llevada a cabo en 2 etapas de elución subsecuentes, por ejemplo, 2 x 37.5 µl –lo que debería ser definido antes de cada estudio)
 - Incube durante 10 minutos a 50°C con agitación en un termomezclador a 1,000 rpm.
 - Invierta el dispositivo de filtración y colóquelo en un nuevo tubo Microcon de 1.5 ml.
 - Eluya el ADN de la membrana haciendo rotar durante 5 minutos a 1,000 g.
- 20
- (si se desea transfiera el ADN a un nuevo tubo – la tapa de los tubos Microcon tiende a abrirse rápidamente)
 - almacene el ADN a -80°C para almacenamiento a largo plazo o a +4°C para uso inmediato.

Ejemplo 6

9.1. Conjuntos de muestra

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

- 25 Se analizaron muestras de tumores ER+ NO de pacientes no tratados con ninguna terapia adyuvante. Los marcadores que son capaces de mostrar una diferencia de supervivencia significativa en esta población se consideran como pronósticos. Puesto que la terapia adyuvante se ha convertido en el régimen de rutina para pacientes con cáncer de seno durante muchos años, el conjunto de muestras recolectadas es uno histórico de los ochenta del siglo pasado.
- 30 Todas las 508 muestras de este conjunto fueron obtenidas del Erasmus Medical Center en Rotterdam como pellas de núcleos celulares (muestras congeladas frescas).

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

- 35 Se supone que la población objetivo de la prueba final son pacientes con tumores ER+ NO que son tratados con terapia hormonal. Para verificar el rendimiento del comportamiento de los candidatos marcadores en esta población, se analizaron 589 muestras de tumores ER+ NO de pacientes tratados con tamoxifen. Todas las muestras fueron recibidas como tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (PET). Se proveyeron secciones de tres a diez 10 µm.
- Además, para 89 muestras de pacientes PET se incluyeron muestras congeladas frescas coincidentes para el mismo tumor en el estudio como controles.

9.2. Extracción de ADN

40 9.2.1. Extracción de ADN a partir de muestras congeladas frescas

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

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

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

Para la desparafinación, se procesaron 589 muestras provistas embebidas en parafina fijadas con formalina (PET) directamente en el tubo en el cual fueron suministradas por los proveedores. Se agregó 1 ml de limoneno a cada tubo que contenía 3 a 10 secciones, cada una de aproximadamente 10 µm de espesor y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Durante la incubación fueron sometidas a vórtex rigurosamente varias veces (2-4 x 5 segundos). Las muestras en parafina fueron centrifugadas a 16,000 x g durante 5 minutos. El limoneno sobrenadante fue retirado muy cuidadosamente colocando una pipeta sobre el lado opuesto de la pella. Si no se recibió una pella, la centrifugación fue repetida a velocidad más alta (20,000 x g) durante el mismo tiempo y el limoneno remanente fue retirado. Después se agregó 1 ml de EtOH (pureza > 99%) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos mientras se sometía a vórtex 2-3 veces. Luego los tubos fueron centrifugados a 16,000 x g durante 5 minutos. Se retiró tanto etanol como fue posible sin perturbar la pella mediante una pipeta. El etanol residual no retirado por la pipeta fue evaporado por incubación en un termomezclador a 50°C durante 10 hasta 30 minutos.

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

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

9.3. Tratamiento con bisulfito

9.3.1. Tratamiento con bisulfito de muestras congeladas frescas

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

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

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

5:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C

1:30 minutos enfriamiento a 4°C

23:30 minutos incubación a 50°C

3:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C

20 1:30 minutos enfriamiento a 4°C

1:25:30 horas incubación a 50°C

3:00 minutos desnaturalización de ADN a 99°C

1:30 minutos enfriamiento a 4°C

2:55:30 horas incubación a 50°C

25 enfriamiento a 4°C

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

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

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

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

El procedimiento fue diseñado especialmente para el tratamiento con bisulfito de muestras de tejido embebido en parafina fijado con formalina (muestras PET) para incrementar la cantidad de bisADN resultante. Por lo tanto, se

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

9.4. Preparación de estándares de ADN para ensayos QM:

9.4.1. Preparación de estándares de cuantificación

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

9.4.2. Preparación de estándares de calibración

ADN por desplazamiento molecular (MDA)

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

Tratamiento Sss1

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

4.5 µg MDA-DNA (6,3 µl)

57.3 µl H₂O

0.375 µl 200 x SAM

3 µl (12 U) Sss1

7.5 µl NE-regulador2

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

Tratamiento con bisulfito del ADN-MDA tratado con Sss1

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

Tratamiento con bisulfito de ADN-MDA no tratado con Sss1

ES 2 564 659 T3

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

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

- 10 El ADN-MDA tratado con Sss1 y el ADN-MDA no tratado con Sss1 fue diluido hasta 1 a 2 y 1 a 10 cada muestra, y se determinó la concentración de ADN en duplicado utilizando el ensayo C3 y el estándar de cuantificación preparado de acuerdo con 9.4.1. Ambos estándares fueron diluidos 1 a 10 y 1 a 100. Después de esto, se utilizaron 10 µl para la cuantificación por UV.

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

Preparación de las mezclas estándar de calibración

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

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

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

ES 2 564 659 T3

Verificación del estado de metilación de ADN tratado con bisulfito

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

5

Cebador 2064:300P22 Seq ID NO 1: GGAGGGGGTAGAGTTATTAGTT	Cebador 2064:514O22 Seq ID NO 2: TATACTTCTCAAACAACCCTC
Cebador 4063:1431P22 Seq ID NO 3: GTGATATTTGGGGATTGTTATT	Cebador 4063:1868O20 Seq ID NO 4: ACTCCCTCCCCTATCTTACA
Cebador 15665:699P21 Seq ID NO 5: TTTGGTGGGATTTGTTAGGAT	Cebador 15665:1124O22 Seq ID NO 6: AAACATTTTACCCCTCTAAACC
Cebador 15947:907P24 Seq ID NO 7: TGATTGTGTAGATTATTTTTGGTT	Cebador 15947:1360O23 Seq ID NO 8: CAAACCTCTAAACCTCAATCTC
Cebador 2265:176P22 Seq ID NO 9: TTGGTGATGTTGATTAGAGTTT	Cebador 2265:582O22 Seq ID NO 10: TAAAACACCTTACATTTTCCCT
Cebador 15908:782P22 Seq ID NO 11: GGTAGAGGAAGTAGTTGGTTTG	Cebador 15908:1228O23 Seq ID NO 12: CTTTTATATTTCTCCCAATCTCC
Cebador 0003522:2102Q21 Seq ID NO 13: GTAGGGGAGGGAAGTAGATGT	Cebador 0003522:1738R23 Seq ID NO 14: TCCTCAACTCTACAAACCTAAAA

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

10 9.5. Cuantificación y ajuste de la concentración de ADN con bisulfito

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

15 Las concentraciones incrementadas de sulfito residual influyen en el ensayo QM. Por lo tanto, decidimos determinar la concentración de sulfito para cada una de las muestras tratadas con bisulfito de ambos conjuntos de muestras. El sulfito incrementado (mayor de 50 mg/l en la reacción de PCR) afecta la amplificación por PCR del ADN con bisulfito dando como resultado valores de CT más altos en comparación con las concentraciones de sulfito por debajo de este rango. Los valores de CT representan el ciclo de umbral del punto de entrecruzamiento de un PCR en tiempo real.

El sulfito de sodio fue utilizado para preparar una solución de reserva estándar de sulfito con 1 g/l de SO_3^{2-} en 1x regulador TE. Produjimos soluciones estándar desde 100 mg/l a 1.56 mg/l de sulfito a través de dilución paso a paso y vórtex intensivo entre 2 etapas de dilución para producir la curva estándar.

Tabla 2. Estándares de sulfito para prueba de sulfito.

Estándares de sulfito para prueba de sulfito en 384 MTP				
Número	Adición de estándar en μl	Número de solución	Adición de TE μl	Concentración de SO_3^{2-} [mg/l]
1	100	Reserva	900	100
2	500	1	500	50
3	500	2	500	25
4	500	3	500	12.5
5	500	4	500	6.25
6	500	5	500	3.13
7	500	6	500	1.56

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

Resultados

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

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

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

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

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

Tabla 3: Información de secuencia de fragmentos C3 y oligos

GSTP1 gene -Número Genbank para secuencia genómica: AY324387	
GSTP1-C3 bis-sequence	130 bp
Seq ID No 15:	GGAGTGGAGGAAATGAGATtAtTGAGGTACGTAGTTGtLtAAGGtAAGtLtTGGGTGtLtT GtAAAtLtTTGtLtTAGGtTgTtTtTAGGTGtTAGGTAGTtTtTGAGtAtLtTgTtGTGT GG
Cebador 2111.C3F	Seq ID NO 16: GGAGTGGAGGAAATGAGAT
Cebador 2111.C3R	Seq ID NO 17: CCACACAaAaT aCTC AaAaC
Sonda TaqMan C3-TAQ2	Seq ID NO 18: FAM-TGGGTGTTTGTAAATTTTGTGTTAGGTT- TAMRA

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

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

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

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

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

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

10

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

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

Solución	Concentración	Volumen	Concentración final	Proveedor
Regulador PCR	10x	2 μl	1x	Eurogentec
Mezcla dNTP	25 mmol/l (cada una)	0.2 μl	250 μmol/l (cada una)	Fermentas
MgCl ₂	25 mmol/l	2.4 μl	3 μmol/l	Eurogentec

Solución	Concentración	Volumen	Concentración final	Proveedor
ADN polimerasa	5 U/μl	0.2μl	1 unidad	Eurogentec
Mezcla de cebador	5 μmol/l (cada una)	1.25 μl	0.313 μmol/l	MWG
Sonda TaqMan	10 μmol/l	0.6 μl	0.3 μmol/l	TibMolBiol
Agua		3.35 μl		Fluka
ADN diluido		10 μl		
Volumen total de reacción		20 μl		

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

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

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

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

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

Disposición		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	D1A1	D2A1	D3A1	D4A1	D5A1	D6A1	D7A1	D8A1	D9A1	D10A1	D11A1	D12A1	D13A1	D14A1	D15A1	D16A1	D17A1	D18A1	D19A1	D20A1	D21A1	D22A1	D23A1	D24A1	
B	D1A2	D2A2	D3A2	D4A2	D5A2	D6A2	D7A2	D8A2	D9A2	D10A2	D11A2	D12A2	D13A2	D14A2	D15A2	D16A2	D17A2	D18A2	D19A2	D20A2	D21A2	D22A2	D23A2	D24A2	
C	D1B1	D2B1	D3B1	D4B1	D5B1	D6B1	D7B1	D8B1	D9B1	D10B1	D11B1	D12B1	D13B1	D14B1	D15B1	D16B1	D17B1	D18B1	D19B1	D20B1	D21B1	D22B1	D23B1	D24B1	
D	D1B2	D2B2	D3B2	D4B2	D5B2	D6B2	D7B2	D8B2	D9B2	D10B2	D11B2	D12B2	D13B2	D14B2	D15B2	D16B2	D17B2	D18B2	D19B2	D20B2	D21B2	D22B2	D23B2	D24B2	
E	D1C1	D2C1	D3C1	D4C1	D5C1	D6C1	D7C1	D8C1	D9C1	D10C1	D11C1	D12C1	D13C1	D14C1	D15C1	D16C1	D17C1	D18C1	D19C1	D20C1	D21C1	D22C1	D23C1	D24C1	
F	D1C2	D2C2	D3C2	D4C2	D5C2	D6C2	D7C2	D8C2	D9C2	D10C2	D11C2	D12C2	D13C2	D14C2	D15C2	D16C2	D17C2	D18C2	D19C2	D20C2	D21C2	D22C2	D23C2	D24C2	
G	D1D1	D2D1	D3D1	D4D1	D5D1	D6D1	D7D1	D8D1	D9D1	D10D1	D11D1	D12D1	D13D1	D14D1	D15D1	D16D1	D17D1	D18D1	D19D1	D20D1	D21D1	D22D1	D23D1	D24D1	
H	D1D2	D2D2	D3D2	D4D2	D5D2	D6D2	D7D2	D8D2	D9D2	D10D2	D11D2	D12D2	D13D2	D14D2	D15D2	D16D2	D17D2	D18D2	D19D2	D20D2	D21D2	D22D2	D23D2	D24D2	
I	D1E1	D2E1	D3E1	D4E1	D5E1	D6E1	D7E1	D8E1	D9E1	D10E1	D11E1	D12E1	D13E1	D14E1	D15E1	D16E1	D17E1	D18E1	D19E1	D20E1	D21E1	D22E1	D23E1	D24E1	
J	D1E2	D2E2	D3E2	D4E2	D5E2	D6E2	D7E2	D8E2	D9E2	D10E2	D11E2	D12E2	D13E2	D14E2	D15E2	D16E2	D17E2	D18E2	D19E2	D20E2	D21E2	D22E2	D23E2	D24E2	
K	D1F1	D2F1	D3F1	D4F1	D5F1	D6F1	D7F1	D8F1	D9F1	D10F1	D11F1	D12F1	D13F1	D14F1	D15F1	D16F1	D17F1	D18F1	D19F1	D20F1	D21F1	D22F1	D23F1	D24F1	
L	D1F2	D2F2	D3F2	D4F2	D5F2	D6F2	D7F2	D8F2	D9F2	D10F2	D11F2	D12F2	D13F2	D14F2	D15F2	D16F2	D17F2	D18F2	D19F2	D20F2	D21F2	D22F2	D23F2	D24F2	
M	D1G1	D2G1	D3G1	D4G1	D5G1	D6G1	D7G1	D8G1	D9G1	D10G1	D11G1	D12G1	D13G1	D14G1	D15G1	D16G1	D17G1	D18G1	D19G1	D20G1	D21G1	D22G1	D23G1	D24G1	
N	D1G2	D2G2	D3G2	D4G2	D5G2	D6G2	D7G2	D8G2	D9G2	D10G2	D11G2	D12G2	D13G2	D14G2	D15G2	D16G2	D17G2	D18G2	D19G2	D20G2	D21G2	D22G2	D23G2	D24G2	
O	D1H1	D2H1	D3H1	D4H1	D5H1	D6H1	D7H1	D8H1	D9H1	D10H1	D11H1	D12H1	D13H1	D14H1	D15H1	D16H1	D17H1	D18H1	D19H1	D20H1	D21H1	D22H1	D23H1	D24H1	
P	D1H2	D2H2	D3H2	D4H2	D5H2	D6H2	D7H2	D8H2	D9H2	D10H2	D11H2	D12H2	D13H2	D14H2	D15H2	D16H2	D17H2	D18H2	D19H2	D20H2	D21H2	D22H2	D23H2	D24H2	

Tabla 9: Placa de PCR de 384 pozos para cuantificación

Resultados de la cuantificación

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

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

5 Tabla 11: Resultados de cuantificación de C3 en muestras embebidas en parafina fijadas con formalina (PET) (población ER+ N0 TAM tratada).

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

ES 2 564 659 T3

Población ER+ NO TAM tratada		
Cantidad de ADN cuantificado con ensayo C3, ng	Concentración de ADN, ng/μl	Número de muestras
4.7 -45.2	0.1 -1	96
0.24 -4.5	0.01 -0.1	33
0.0	0.0	20

9.5.3. Ajuste de concentración de ADN

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

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

Tabla 12: Cantidad final de ADN en el ensayo QM para muestras congeladas frescas (población ER+ N0 no tratadas) después del ajuste.

Población ER+ N0 no tratada	
Cantidad de ADN (ajustada) en el ensayo QM	Número de muestras
10 ng	357
5 -10 ng	85
2 -5 ng	34
1 -2 ng	10
0 -1 ng	10
0 ng	12

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

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

Población ER+ N0 TAM tratada	
Cantidad de ADN (ajustada) en el ensayo QM	Número de muestras
0 -1 ng	88
0 ng	20

9.6. Ejecuciones del ensayo QM

- 5 El ADN tratado con bisulfito y las muestras ajustadas en concentración de la población ER+ N0 no tratada fueron almacenadas en 7 placas de 96 pozos (placas 01-07) y la población ER + N0 no tratada en 8 placas de 96 pozos (placa 01-08). Para medir el conjunto de muestra completo de ambas poblaciones ejecutamos 2 placas de reacción de PCR de 384 pozos para cada ensayo y población QM. Cada placa de ensayo QM contiene las muestras de 3 o 4 placas de 96 pozos (88 pozos usados realmente por placa) y 1 placa de 96 pozos con ADN estándar (14 mezclas del ADN de calibración y agua para la reacción de PCR de control sin plantilla, véase Tabla 15 más adelante). Las repeticiones de las mediciones de las muestras se hicieron repitiendo la ejecución del ensayo QM 3 veces.
- 10 Las placas de PCR de 384 pozos también fueron transferidas con pipeta con la estación de trabajo TECAN. El programa de transferencia con pipeta transfirió inicialmente 10 µl de la mezcla maestra y después 10 µl del ADN respectivo en el pozo designado. Como se describió para la etapa de cuantificación, los ADN de las placa 01 y 02 dieron como resultado colores naranja y de las placas 03 y 04 color azul sobre la placa de PCR de 384 pozos (véase 9.5.2.). Los pozos de ADN estándar fueron señalados en verde claro y las reacciones de PCR de control negativo en verde oscuro sobre la placa final. Los componentes de la mezcla maestra para cada ensayo de QM fueron adaptados de acuerdo con la tabla 14. La mezcla fue transferida con pipeta en un tubo Falcon y distribuida en 8 viales de tapa de rosca de 500 µl para transferencia por pipeta automática con la estación de trabajo TECAN.
- 15

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

Número de reacciones:384	384	Factor: 1.1		
Componente	Concentración de reserva	µl/reacción	µl en MM	Concentración final
Regulador de reacción Ampli	10x	2	844.8	1x
Ampli MgCl ₂	25 mmol/l	2	844.8	2.5 µmol/l
dNTPs	25 mmol/l cada una	0.2	84.48	250 µmol/l
Mezcla de cebadores	6.25 mmol/l	2	844.8	625 nmol/l
Sonda cg	4 µmol/l	1	422.4	200 nmol/l
Sonda Tg	4 µmol/l	1	422.4	200 nmol/l
AmpliTaqGold	5U/µl	0.2	84.48	1U
Agua		1.6	675.84	Ad 10
		10	4224	

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

	Placa de 96 pozos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0%	66%	Ntc									

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

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

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

Ensayo	Gen	Concentración de MgCl ₂	Temperatura de fusión
3522 I	PITX2	3 mM	62°C
3522 II	PITX2	2.5 mM	60°C
2395	PLAU	2.5 mM	60°C
2064	ERBB2	2.5 mM	62°C
15908 II	TBC1D3	4.5 mM	60°C
15665	ONECUT2	3 mM	60°C
15947	ABCA8/9	3 mM	62°C
2265	TFF1	2.5 mM	60°C

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

Ejemplo 7. Métodos de cuantificación de ADN

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

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

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

20 La cuantificación por PCR en tiempo real detecta específicamente el ADN convertido por bisulfito. Solamente el ADN que no es afectado por la degradación debido a la fijación con formalina, al embebimiento en parafina y al almacenamiento se cuantifica utilizando una metodología de PCR en tiempo real. La cuantificación se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl que contenían 10 µl de ADN de plantilla o una dilución del mismo, 1U o 3U de FastStart Taq

ADN polimerasa (Roche), respectivamente, $MgCl_2$ 4 mmol/l, 500 nmol/l (cada uno) de cebadores de avance y retroceso (cebador de avance ID NO 19: TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT, cebador de retroceso Seq ID No 20: AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA), 1 regulador de PCR (Roche), dNTP 0.25 mmol/l o 0.5 mmol/l de cada uno (Fermentas), respectivamente, BSA a 0.25 mg/ml (Sigma Aldrich) y 250 nmol/l de cada sonda de detección (Seq ID NO 21: TTGTGAATTTGTGTTTGTATTGTGTGTTG-Fluo y Seq ID NO 22: Red640-TGGTGGTTATTTTTTTTATTAGTTGTGGT-Fosfato). La ciclización se realizó utilizando un sistema de detección LightCycler (Roche), con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos a 95°C durante 10 segundos, 58°C durante 20 segundos, 72°C durante 10 segundos o 72°C durante 70 segundos, detección a 58°C, y ratas de incremento de 20°C/s. La amplificación dio como resultado fragmentos de 133 bp.

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

15 El ensayo C3 detecta específicamente el ADN convertido con bisulfito. La cuantificación por PCR en tiempo real (ensayo C3) fue llevada a cabo en un volumen total de 20 μ l que contenía 10 μ l de ADN de plantilla o una dilución del mismo, 1 U de HotGoldStar polimerasa (Eurogentec), $MgCl_2$ 3 mmol/l, 625 nmol/l de cebadores de avance y retroceso (cada uno) (cebador de avance Seq ID NO 23: GGAGTGAGGAAATTGAGAT, cebador de retroceso Seq ID NO 24: CCACACAACAAATACTCAAAAC), una referencia pasiva ROX que contiene 1 regulador de reacción (Eurogentec), 0.25 mmol/l de cada uno de dNTP (Fermentas) y 200 nmol/l de sonda de detección (Seq ID NO 25: FAM-TGGGTGTTTGTAAATTTTTGTTTTGTGTTAGTT-EclipseDQ o BNQ1). La ciclización se hizo utilizando un sistema Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 60 segundos, detección a 72°C, y ratas de incremento de 3°C/s.

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

25 El ensayo CFF1 está localizado en una región sin citosinas y por lo tanto esta región no es afectada por la conversión con bisulfito. De acuerdo con esto, este ensayo permite la determinación tanto del ADN genómico convertido como del convertido con bisulfito simultáneamente. La cuantificación por PCR en tiempo real (ensayo CFF1) fue llevada a cabo en un volumen total de 20 μ l que contenían 10 μ l de ADN de plantilla, 1 U de HotGoldStar polimerasa (Eurogentec), $MgCl_2$ 2.5 mmol/l, 625 nmol/l de cebadores de avance y retroceso (cada uno) (cebador de avance Seq ID NO 26: TAAGAGTAATAATGGATGGATGATG, cebador de retroceso Seq ID NO 27: CCTCCCATCTCCCTCC), una referencia pasiva de ROX que contiene 1 regulador de reacción (Eurogentec), 0.25 mmol/l de cada uno de dNTP (Fermentas) y 200 nmol/l de sonda de detección (Seq ID NO 28: FAM-ATGGATGAAGAAAGAAAGGATGAGT-EclipseDQ o BHQ1). La ciclización se hizo utilizando un sistema Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR con las siguientes condiciones: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 58°C durante 60 segundos, detección a 72°C, y ratas de incremento de 3°C/s.

35 Ejemplo 8. ADN tratado con bisulfito derivado de tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (PET) en PCR en tiempo real.

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

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

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

55 Ejemplo 9. Procesamiento de secciones de tejido derivadas de biopsias de próstata embebidas en parafina fijadas con formalina (procesamiento de 2x24 muestras)

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

Ejemplo 10. Amplificación de los amplicones por PCR de diferentes longitudes a partir de tejidos embebidos en parafina fijados con formalina (PET)

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

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

Tamaño del amplicón [bp]	Cebador de avance (5'→3')	Cebador de retroceso (5'→3')
185	Seq ID No 29: TTTTTGTAGTTTAGAAGGAGGTTAG	Seq ID No 30: ACACAATAAATTCACCACCAA
210	Seq ID No 31: GGGAGATTTAATTTGGGG	Seq ID No 32: CACCCTCTAATAACCAACCA
235	Seq ID No 33: TTAGGTATAAGTTGGTGGTGG	Seq ID No 34: CCCATAAACACCCTAAAA
260	Seq ID No 35: AGGTATAGGATGGGAATTAGT	Seq ID No 36: AACCCAAACCCTTATACAAAC
285	Seq ID No 37: GTTTTTGGAGTTAATTGGGAG	Seq ID No 38: CACCCCATCATTACTATTC
310	Seq ID No 39: AGGGTAGAGGGTGTGGT	Seq ID No 40: CCAAACTATAAACCTTCCCA
335	Seq ID No 41: TTTAGTATGGGTTGAGAGGAGT	Seq ID No 42: CCTCTTTCCTAAAACACACATTC
360	Seq ID No 43: GGATTATTGTTGGTATTTGTT	Seq ID No 44: ACACTTCCCTAAAATCTTCAAA
385	Seq ID No 45: GTTGGATTTGTTAGAGAGAGG	Seq ID No 46: ACATTTAACTCTTTATCCCAAAA
410	Seq ID No 47: TTATTTGATGGGGATAGAGATT	Seq ID No 48: ACAACAACACACCCTCATAC
435	Seq ID No 49: TGTAATGAAAGAAGGTGTTGAG	Seq ID No 50: TTAACCTAAACCATCCATAACCC
460	Seq ID No 51: GGATTATAGGAATTAGAATGGGT	Seq ID No 52: TCTTTCCAACCTCAACATCTTACT
485	Seq ID No 53: TGGTGGTATGGATTGGATAA	Seq ID No 54: TCCCCCAAATAACACAATATAC
511	Seq ID No 55: AGAGGAAAGAGTAAGGAATTTTT	Seq ID No 56: CTTATCCCCCACAAAACC
535	Seq ID No 57: GGTGGAGGGAGAGTTAAGG	Seq ID No 58: CCAACAAAACGCCCTCTCC
561	Seq ID No 59: GATTGAGATTATTTGGGTTTT	Seq ID No 60: ACTTAAACCTTCCCTCTCCAC
586	Seq ID No 61: TTAAGTATTGGATTGGGGTTA	Seq ID No 62: ACCTACCCTCTAACTCTACAAAAA

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

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

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

Ejemplo 11: Remoción de parafina, lisis y extracción de ADN a escala de placa.

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

20

Tabla 17b. Procesamiento de 18 especímenes de tejido embebidos en parafina fijados con formalina. Resultados de cuantificación basada en PCR en tiempo real (ejemplo 10d) y basada en espectrofotometría UV (ejemplo 10a). Todos los datos son promedio de cuatro muestras procesadas independientemente por espécimen incluyendo la desviación estándar

Muestra	ADN total en lisado – ensayo CFF1 [ng]	Desviación estándar	ADN total en extracto – ensayo CFF1 [ng]	Desviación estándar	Rendimiento [%]	Desviación estándar	ADN total en extracto – cuantificación por UV [ng]	Desviación estándar	Amplificabilidad [%]	Desviación estándar
P1	769.37	212.86	463.42	62.10	67.30	34.96	8490	1056.98	5.49	0.68
P2	4108.87	3810.73	2697.79	406.28	185.17	184.96	23580	8277.25	12.02	2.59
P4	1735.07	878.86	1181.97	23.15	98.68	84.95	18660	6092.29	6.76	1.75
P5	1235.85	361.47	916.91	134.47	81.92	35.32	19560	3191.49	4.83	1.30
P6	1389.80	438.28	951.95	71.40	73.78	22.61	18240	4313.88	5.46	1.45
P7	3245.58	2235.31	2126.81	53.40	87.89	46.38	21090	1992.69	10.14	0.79
P8	2620.08	1791.35	1687.70	144.38	99.66	69.38	21765	367.83	7.76	0.75
P9	1808.96	549.44	1032.30	686.75	69.39	55.39	21240	10360.27	5.34	4.39
P10	1031.69	326.70	696.47	62.02	71.48	17.29	14865	1818.16	4.76	0.90
ST-268	18906.18	1697.40	4354.72	299.62	23.10	1.54	45195	4658.51	9.67	0.62
ST-269	22888.11	201.42	3736.64	415.22	16.32	1.69	55545	4707.71	6.73	0.46
ST-270	41912.14	14525.27	10316.21	828.41	27.36	10.65	45495	6065.72	22.82	1.56
ST-271	39288.96	21812.73	7842.60	975.43	25.91	14.93	37185	4089.22	21.28	3.53
ST-272	30026.72	6636.77	6578.06	1035.90	23.29	8.43	49725	9499.14	13.31	0.86
ST-273	69900.08	36062.28	15876.32	2394.68	26.92	11.00	70470	6251.05	22.60	3.40
ST-274	19929.85	1098.59	2758.56	754.86	13.78	3.27	50085	8262.94	5.52	1.11
ST-275	46583.92	25018.63	14482.29	1766.26	38.00	17.48	62640	22706.76	25.80	10.11
ST-276	21562.06	701.41	4785.23	430.75	22.25	2.65	40200	4213.41	11.98	1.40

Ejemplo 12. Remoción de parafina, lisis y extracción de ADN en escala de tubo.

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

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

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

Ejemplo 13. Procesamiento de acuerdo con el ejemplo 2 de 24 muestras embebidas en parafina fijadas con formalina derivadas de tejido de próstata o seno, escala tubo.

20 Se procesaron 24 especímenes de tejido embebido en parafina fijado con formalina (próstata: PET P1 -P10 y ST-268 -ST-276 y seno: PET B2 -B10) de acuerdo con el ejemplo 2. Se procesaron dos muestras por espécimen dando como resultado 48 muestras en total. Cada muestra consistía de 3 secciones (cada una de 10 µm) provistas en tubos de 1.5 ml. El ADN después del tratamiento con bisulfito y después de la purificación fue caracterizado de acuerdo con el ejemplo 10d (ensayo CFF1; determinación de la cantidad de ADN convertido por tratamiento con bisulfito y de la

cantidad de ADN no convertido por el tratamiento con bisulfito y por lo tanto representa el ADN genómico) y de acuerdo con el ejemplo 10c (ensayo C3; determinación solamente del ADN convertido por el tratamiento con bisulfito). Los resultados de estas cuantificaciones se muestran en la Tabla 19, en la Figura 18 y en la Figura 19, respectivamente.

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

Muestra	Rendimiento de ADN –Desviación estándar ensayo CFF1	Desviación estándar	Rendimiento de ADN –Desviación estándar ensayo C3	Desviación estándar
PET P1	31.51	5.35	26.85	3.73
PET P2	307.22	42.33	143.93	9.34
PET P4	167.69	23.03	103.21	2.18
PET P5	176.06	33.61	86.27	17.43
PET P6	598.59	37.35	358.71	28.01
PET P7	137.10	1.56	74.49	1.40
PET P8	511.88	79.05	219.63	25.52
PET P9	189.48	42.02	121.15	36.88
PET P10	158.89	4.36	83.30	8.25
PET B2	3.57	0.76	1.86	0.58
PET B5	1.88	0.03	0.83	0.67
PET B6	34.20	1.56	10.17	2.18
PET B7	48.11	15.50	21.81	5.51
PET B9	9.34	0.05	2.51	0.40
PET B10	2.57	2.18	0.56	0.61
ST-268	301.94	83.41	171.65	26.14
ST-269	304.14	151.26	173.86	93.37
ST-270	106.51	25.52	0.29	0.21
ST-271	125.88	16.18	1.23	0.03
ST-272	1422.66	1959.30	597.51	841.84
ST-273	205.11	6.22	3.83	0.75
ST-274	521.57	3.11	271.13	13.07
ST-275	264.96	1.24	169.23	16.50
ST-276	547.98	59.13	289.39	38.90

Ejemplo 14. Procesamiento de 24 muestras embebidas en parafina fijadas con formalina derivadas de tejido de próstata o seno, a escala de placa.

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

15

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

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

Muestra	Rendimiento de ADN –Desviación estándar ensayo CFF1	Desviación estándar	Rendimiento de ADN –Desviación estándar ensayo C3	Desviación estándar
PET P1	71.03	3.65	85.42	7.50

ES 2 564 659 T3

Muestra	Rendimiento de ADN ensayo CFF1	Desviación estándar	Rendimiento de ADN ensayo C3	Desviación estándar
PET P2	920.67	203.57	556.83	129.87
PET P4	311.33	41.97	173.67	36.73
PET P5	273.67	46.65	194.33	30.60
PET P6	263.33	31.26	181.50	17.29
PET P7	736.67	116.22	398.50	60.04
PET P8	411.00	29.14	225.83	23.96
PET P9	319.83	98.97	256.75	70.86
PET P10	230.00	44.73	139.50	15.17
PET B2	75.53	40.85	61.69	39.48
PET B5	2.72	1.99	2.19	1.87
PET B6	7.79	5.25	9.07	12.10
PET B7	10.27	6.96	9.40	5.90
PET B9	6.47	2.25	3.02	3.07
PET B10	42.92	24.85	15.53	9.48
ST-268	948.00	206.25	585.83	175.80
ST-269	969.00	135.27	515.83	92.15
ST-270	2973.33	363.52	1075.83	134.40
ST-271	2983.33	441.33	1054.17	207.50
ST-272	1641.67	307.50	980.83	227.73
ST-273	5263.33	848.62	2598.33	357.87
ST-274	479.67	47.60	259.58	70.33
ST-275	3856.67	896.37	1794.17	470.42
ST-276	871.67	220.93	320.08	94.72

Ejemplo 15. Procesamiento de muestras derivadas de 150 especímenes de cáncer de seno embebidos en parafina fijados con formalina

- 5 Se procesaron muestras de 150 muestras de cáncer de seno embebidos en parafina fijados con formalina (E001-E150) de acuerdo con el ejemplo 9. Cada muestra consistió de 3 secciones (10 µm cada una) las cuales fueron provistas en tubos de 1.5 ml. El rendimiento del ADN genómico después de la extracción fue determinado usando espectrofotometría UV (ejemplo 10a) y el ensayo CFF1 (ejemplo 10d). El rendimiento de ADN convertido por bisulfito después del tratamiento con bisulfito y la purificación subsecuente fue determinado utilizando el ensayo C3 (ejemplo 10c).
- 10 Tabla 21: Rendimientos de ADN convertido con bisulfito y no convertido con bisulfito derivado de especímenes de cáncer de seno embebidos en parafina fijados con formalina. El ADN fue cuantificado de acuerdo con el Ejemplo 10d (ensayo CFF1), de acuerdo con el ejemplo 10c (ensayo C3) y de acuerdo con el ejemplo 10a (espectrofotometría UV).

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 µl de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E001	13545.0	1812.0	1760.6
E002	6125.0	688.6	215.8
E003	5760.0	348.9	140.0
E004	20160.0	338.6	174.5
E005	6852.6	1017.9	514.2

ES 2 564 659 T3

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 µl de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E006	26460.0	11173.0	1541.6
E007	16905.0	8213.1	2410.4
E008	16012.5	9725.2	4452.0
E009	15866.7	8657.4	1749.4
E010	27195.0	14169.6	200.6
E011	7680.0	4115.0	1009.2
E012	16380.0	2102.2	1032.4
E013	1866.7	1962.8	1374.3
E014	15225.0	2430.8	1028.0
E015	13835.3	1779.8	857.2
E016	17684.2	1866.5	894.2
E017	10350.0	1240.1	240.1
E018	8085.0	1326.0	873.7
E019	16357.9	3256.2	1341.4
E020	21123.5	3401.2	1785.1
E021	10278.9	1395.2	1201.2
E022	20432.4	4540.2	2970.8
E023	22976.5	2506.7	1651.6
E024	5250.0	1691.7	1027.4
E025	24465.0	4408.7	2358.7
E026	17170.6	8749.5	3195.7
E027	17616.7	2819.4	1327.1
E028	4817.6	11498.9	4516.8
E029	30333.3	4922.3	2185.2
E030	16305.9	16442.2	6160.9
E031	7455.0	3703.1	1278.7
E032	10005.9	4757.4	2073.8
E033	9173.7	4922.1	1628.7
E034	8715.0	4010.9	1686.4
E035	10994.1	6841.9	1496.6

ES 2 564 659 T3

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 µl de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E036	10500.0	4358.7	2828.2
E037	20650.0	5711.1	4439.0
E038	30333.3	3311.1	2801.3
E039	9240.0	2956.5	2325.2
E040	6930.0	2261.9	981.5
E041	8505.0	446.5	387.1
E042	4550.0	789.6	669.6
E043	3315.8	779.7	425.8
E044	4095.0	845.1	489.5
E045	4089.5	795.8	531.4
E046	6052.9	107.2	164.8
E047	11200.0	200.1	113.4
E048	5682.4	149.7	248.8
E049	3990.0	76.3	35.9
E050	4531.6	235.4	85.7
E051	13042.1	6107.0	2887.2
E052	8295.0	3162.3	1063.5
E053	11235.0	4412.9	3815.7
E054	8866.7	3196.3	2329.3
E055	7245.0	2458.7	1452.5
E056	14595.0	3257.7	5484.6
E057	11970.0	3005.9	2533.5
E058	17047.1	3892.1	2368.3
E059	13094.1	6094.4	4047.3
E060	35870.3	2849.6	3108.8
E061	22750.0	715.8	440.5
E062	13920.0	840.0	340.1
E063	14452.9	3292.1	3313.1
E064	4095.0	761.4	510.1
E065	3705.9	2855.2	3153.8

ES 2 564 659 T3

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 µl de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E066	2625.0	244.7	11.2
E067	3383.3	417.2	362.6
E068	3088.2	718.6	321.9
E069	2216.7	118.0	17.3
E070	11520.0	214.8	71.5
E071	10623.5	1463.9	1361.2
E072	26950.0	2064.7	2121.6
E073	12723.5	2277.5	2169.1
E074	2333.3	3841.5	3249.4
E075	11488.2	1545.8	1235.2
E076	31360.0	14426.1	5108.5
E077	18060.0	8039.9	3387.0
E078	23415.0	14134.2	6859.3
E079	14000.0	10264.3	5371.6
E080	21735.0	9167.2	2812.9
E081	6883.3	31543.5	25884.0
E082	23730.0	12237.9	7183.1
E083	17541.2	7782.0	4135.6
E084	30836.8	19137.9	12754.5
E085	21466.7	13501.5	5589.2
E086	16026.3	3724.7	2177.5
E087	9173.7	1701.5	1091.9
E088	27176.5	3309.1	1072.5
E089	19950.0	3831.9	1739.0
E090	23566.7	3985.7	3139.2
E091	2594.1	5222.6	5906.1
E092	19600.0	2055.6	1131.1
E093	10500.0	2585.4	1223.6
E094	15093.8	4220.0	300.6
E095	9555.0	1630.1	840.0

ES 2 564 659 T3

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 µl de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E096	14700.0	2675.9	1076.2
E097	21525.0	4163.3	1840.9
E098	13416.7	4691.0	883.6
E099	13230.0	2024.5	1765.6
E100	12250.0	1903.4	852.3
E101	4725.0	4695.8	1007.1
E102	14910.0	6633.8	2066.2
E103	19841.4	10410.8	3738.5
E104	22283.3	10963.4	4059.1
E105	31994.1	15319.9	3397.5
E106	6930.0	968.2	511.4
E107	5526.3	616.5	261.6
E108	5968.4	875.8	175.0
E109	5906.3	753.1	234.5
E110	4830.0	782.8	594.2
E111	2625.0	4344.9	2081.4
E112	14880.0	4266.1	2366.6
E113	6090.0	2727.2	1636.4
E114	10710.0	4280.6	2824.6
E115	7665.0	3166.8	3354.9
E116	6176.5	342.0	64.5
E117	2216.7	385.3	146.0
E118	50770.6	486.5	104.3
E119	4935.0	439.2	406.8
E120	10266.7	929.9	516.2
E121	8925.0	2893.5	259.9
E122	13533.3	7499.9	3242.3
E123	49411.8	16014.1	8003.4
E124	19010.5	6660.4	4336.0
E125	10383.3	2631.8	1100.9

ES 2 564 659 T3

Muestra	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (basado en determinación con UV; ejemplo 10a)	ADN genómico [ng] total en 70 µl de extracto (con base en el ensayo CFF1; ejemplo 10d)	Rendimiento total [ng] de ADN convertido con bisulfito en 50 µl de eluido después de purificación (con base en el ensayo C3; ejemplo 10c)
E126	23231.3	8386.5	3450.2
E127	8820.0	2078.4	2172.0
E128	2730.0	676.6	166.4
E129	32160.0	1465.8	606.5
E130	4083.3	Indeterminado	1068.5
E131	3045.0	396.5	181.0
E132	3780.0	507.3	515.9
E133	7669.6	526.0	570.5
E134	6650.0	896.0	561.3
E135	6052.9	903.1	314.5
E136	22260.0	6770.9	2886.7
E137	19600.0	4402.2	1359.9
E138	8400.0	10852.0	4979.4
E139	19635.0	6613.7	4495.2
E140	27650.0	9160.8	6587.8
E141	26194.7	8656.0	4678.9
E142	4550.0	10660.7	3116.2
E143	26600.0	9404.2	2983.5
E144	33705.0	12358.5	4073.3
E145	10252.9	5114.6	2774.1
E146	31850.0	19365.9	5729.1
E147	24780.0	11532.6	6048.3
E148	21000.0	11540.2	4106.7
E149	2400.0	13681.8	6231.2
E150	29750.0	18923.4	3814.9

Ejemplo 16. Procesamiento de células microdisecionadas por captura de láser

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

5 a) Microdisección.

La sección de 10 µm que fue montada sobre una lámina de microscópico fue sometida a un procedimiento de tinción con azul de metileno y subsecuentemente microdisecionada por captura de láser. La microdisección fue llevada a

cabo utilizando un instrumento Microbeam (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Alemania). Dos áreas de la sección (comprendiendo cada una aproximadamente 0.25 mm²) fueron microdisecionadas y recolectadas en dos tubos de 200 µl con tapas adhesivas (Tapas adhesivas 200, P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Alemania). Debido a la Microdisección no es necesaria la remoción de parafina.

5 b) Etapa de lisis

El material de la muestra se adhirió a las tapas adhesivas después de la microdisección y fue sometido a una etapa de lisis. Por lo tanto se agregaron cuidadosamente a las tapas 20 µl de regulador de lisis (Tris-HCl 50 mmol/l, pH 8.0, EDTA 1 mmol/l, Tween 0.5% v/v, 10 ng/µl de poli-dA, 3 mg/ml de proteinasa K). Se llevaron a cabo cuatro reacciones de control: dos controles negativos con tubos que no contenían muestra pero sí regulador de lisis y dos controles positivos con tubos que contenían regulador de lisis y 500 pg de ADN genómico humano (Promega, Estados Unidos de América). Los tubos fueron cerrados cuidadosamente evitando pérdida de la gota de la tapa. Los tubos fueron incubados durante 12 horas a 60° C en una máquina Mastercycler PCR (Eppendorf, Alemania). Puesto que el material de la muestra estaba localizado en las tapas la cubierta del Mastercycler también fue colocada a 60°C. Después de la incubación las muestras fueron centrifugadas en una centrifuga de mesa durante 30 segundos para transferir la muestra lisada al fondo del tubo.

15 c) Tratamiento con bisulfito

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

25 d) Purificación de ADN

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

35 e) Análisis subsecuente

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

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

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

Listado de secuenciación

- 5 <110> Epigenomics AG
- <120> MÉTODO PARA PROVEER FRAGMENTOS DE ADN DERIVADOS DE UNA MUESTRA ARCHIVADA
- <130> 536-44 EPT1
- <140>
- <141> 2005-09-30
- 10 <150> US 60/614,697
- <151> 2004-09-30
- <160> 72
- <210> 1
- <211> 22
- 15 <212> ADN
- <213> Homo Sapiens
- <400> 1
- ggaggggta gagtattag tt 22
- <210> 2
- 20 <211> 22
- <212> ADN

<213> Homo Sapiens
 <400> 2
 tataacttct caaacaaccc tc 22
 <210> 3
 5 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 3
 gtgatattg gggattgta tt 22
 10 <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 4
 15 actccctccc ctatctaca 20
 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 20 <400> 5
 tttgtggga tttgtagga t 21
 <210> 6
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Homo Sapiens
 <400> 6
 aaacattta cccctctaaa cc 22
 <210> 7
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 7
 tgattgta gattatttt gggt 24

<210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 8
 caaactctct aaacctcaat ctc 23
 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Homo Sapiens
 <400> 9
 ttggtgatgt tgattagagt tt 22
 <210> 10
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 10
 taaaacacct tacatfttcc ct 22
 <210> 11
 20 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 11
 ggtagaggaa gtagttggtt tg 22
 25 <210> 12
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 12
 30 cttttatatt tctccaatc tcc 23
 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN

ES 2 564 659 T3

```

<213> Homo Sapiens
<400> 13
gtaggggagg gaagtagatg t          21
<210> 14
5  <211> 23
    <212> ADN
    <213> Homo Sapiens
    <400> 14
    tcctcaactc tacaaacct aaaa          23
10 <210> 15
    <211> 130
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
15 <223> GSTP1-C3_bis-sequence_example_9.5.1.
    <400> 15

    ggagtggagg aaattgagat ttattgaggt tacgtagttt gtttaagggt aagtttgggt      60
    gtttgtaatt ttgttttgt gttagggttg ttttaggtg ttaggtgagt ttgagtatt      120
    tgttgtgtgg                                     130
<210> 16
<211> 20
20 <212> ADN
    <213> Homo Sapiens
    <400> 16
    ggagtggagg aaattgagat          20
    <210> 17
25 <211> 22
    <212> ADN
    <213> Homo Sapiens
    <400> 17
    ccacacaaca aataactcaaa ac          22
30 <210> 18
    <211> 33
    <212> ADN

```

<213> Homo Sapiens
 <400> 18
 tgggtgttg taattttgt ttgtgtag gtt 33
 <210> 19
 5 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 19
 tgggatgga ggaggttag taagt 25
 10 <210> 20
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 20
 15 aaccaataaa acctactcct ccctaa 27
 <210> 21
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 20 <400> 21
 ttgtgaatt gtgttgta ttgtgttg 30
 <210> 22
 <211> 30
 <212> ADN
 25 <213> Homo Sapiens
 <400> 22
 tgggtgttat ttttttatt aggtgtggt 30
 <210> 23
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 23
 ggagtggagg aaattgagat 20

<210> 24
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 24
 ccacacaaca aataactcaaa ac 22
 <210> 25
 <211> 33
 <212> ADN
 10 <213> Homo Sapiens
 <400> 25
 tgggtgttg taattttgt ttgtgtag gtt 33
 <210> 26
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 26
 taagagtaat aatggatgga tgatg 25
 <210> 27
 20 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 27
 cctcccatct cccttc 17
 25 <210> 28
 <211> 25.
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 28
 30 atggatgaag aaagaaagga tgagt 25
 <210> 29
 <211> 25
 <212> ADN

ES 2 564 659 T3

<213> Homo Sapiens
 <400> 29
 tttttgtagt ttagaaggag gttag 25
 <210> 30
 5 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 30
 acacaataaa tcaaccacc aa 22
 10 <210> 31
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 31
 15 gggagattta attgggg 18
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 20 <400> 32
 caccctctaa taaccaacca 20
 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Homo Sapiens
 <400> 33
 ttaggtataa gttggtggtg g 21
 <210> 34
 <211> 20
 30 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 34
 ccataaaca acccctaaaa 20

ES 2 564 659 T3

<210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 35
 aggtatagga tggggaatta gt 22
 <210> 36
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Homo Sapiens
 <400> 36
 aacccaaacc ctatacaaa c 21
 <210> 37
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 37
 gttttggag ttaattggga g 21
 <210> 38
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 38
 caccatc attactatc 20
 25 <210> 39
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 39
 30 aggtagagg gtgttgg 18
 <210> 40
 <211> 21
 <212> ADN

ES 2 564 659 T3

<213> Homo Sapiens
 <400> 40
 ccaaaaactat aaaccttccc a 21
 <210> 41
 5 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 41
 ttagtatgg gttgagagga gt 22
 10 <210> 42
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 42
 15 cctcttctct aaaactacac attc 24
 <210> 43
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 20 <400> 43
 ggattattgt tgggtatttg tt 22
 <210> 44
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Homo Sapiens
 <400> 44
 acacttcctt aaaatcttca aa 22
 <210> 45
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 45
 gttggatttg ttagagaga gg 22

<210> 46
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 46
 acatttaact ctttatccca aaa 23
 <210> 47
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Homo Sapiens
 <400> 47
 ttatttgatg gggatagaga tt 22
 <210> 48
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 48
 acaaacaaca caccctcata c 21
 <210> 49
 20 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 49
 tgtaatgaaa gaaggtgtg ag 22
 25 <210> 50
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 50
 30 ttaactaaac catccataac cc 22
 <210> 51
 <211> 23
 <212> ADN

ES 2 564 659 T3

<213> Homo Sapiens
 <400> 51
 ggattatagg aattagaatg ggt 23
 <210> 52
 5 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 52
 tctttccaac tcaacatctt act 23
 10 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 53
 15 tgggtgatg gattggataa 20
 <210> 54
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 20 <400> 54
 tcccccaaat aacacaatat ac 22
 <210> 55
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Homo Sapiens
 <400> 55
 agaggaaaga gtaaggaatt ttt 23
 <210> 56
 <211> 18
 30 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 56
 cttatcccc acaaaacc 18

ES 2 564 659 T3

<210> 57
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 57
 ggtggaggga gagttaagg 19
 <210> 58
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Homo Sapiens
 <400> 58
 ccaacaaaac gccctctcc 19
 <210> 59
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 59
 gattgagatt atttgggtt tt 22
 <210> 60
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 60
 acttaaacct tcctctcca c 21
 25 <210> 61
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 61
 30 ttaagtattg gattgggggt ta 22
 <210> 62
 <211> 24
 <212> ADN

<213> Homo Sapiens
 <400> 62
 acctaccctc taactctaca aaaa 24
 <210> 63
 5 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 63
 agtaaatagt ggtgagtta tgaa 24
 10 <210> 64
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 64
 15 aaaaacctct aaaaactact ctcc 24
 <210> 65
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 20 <400> 65
 aaggtttag ggaagagtgt tt 22
 <210> 66
 <211> 23
 <212> ADN
 25 <213> Homo Sapiens
 <400> 66
 accttttct atcacaataa taa 23
 <210> 67
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 67
 agggggaatt aatagaag ag 22

<210> 68
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 5 <400> 68
 caataaaacc atcccaata ct 22
 <210> 69
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Homo Sapiens
 <400> 69
 tatgggagga ggtagtaag tg 22
 <210> 70
 <211> 22
 15 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 70
 ccccaaatcc tacatataaa aa 22
 <210> 71
 20 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 71
 gtattatgtg gtttaaggag gg 22
 25 <210> 72
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 72
 30 actccaaca aattcaaca ct 22

Reivindicaciones

1. Un método para amplificar ADN derivado de una muestra archivados por reacción en cadena de la polimerasa, que comprende amplificar ADN en una etapa de amplificación de ADN que comprende el uso de una concentración de polimerasa en el rango de 0.15 a 0.3 U/ μ l y al menos un parámetro de amplificación de ADN seleccionado del grupo que consiste de: una concentración de cada nucleótido en el rango de 200 a 800 μ mol/l; y un tiempo de una etapa de elongación en el rango de 0.1 a 1.0 s / pb.
2. El método de la reivindicación 1, en donde al menos un parámetro de amplificación de ADN seleccionado del grupo que consiste de: una concentración de cada nucleótido en el rango de 350 a 650 μ mol/l y el tiempo de una etapa de elongación en el rango de 0.25 a 0.75 s/pb.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la etapa de amplificación de ADN comprende el uso de una concentración de polimerasa de 0.15 U/ μ l y al menos un parámetro de amplificación de ADN seleccionado del grupo que consiste de: una concentración de cada nucleótido de 500 μ mol/l; y un tiempo de una etapa de elongación de 0.68 s/pb.
4. Uso del método de acuerdo con la reivindicación 1 a 3, para la detección del estado de metilación de ADN.
5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el estado de metilación de ADN se utiliza para diagnosticar una enfermedad, para diagnosticar una predisposición hacia una enfermedad o para diagnosticar una progresión de una enfermedad, y en donde la enfermedad es una enfermedad o condición proliferativa celular, o es cáncer o enfermedad asociada.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el estado de metilación de ADN es el de posiciones que están metiladas, o el de las posiciones que están no metiladas en comparación con condiciones normales, y en donde existe una enfermedad definida individual.
7. Uso de un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3 para la detección del objetivo específico de indicación, en donde
 - a) se prepara el ADN de una muestra archivada originada de un tejido enfermo y se determina el estado de metilación del ADN;
 - b) se prepara el ADN de una muestra originada de un tejido saludable y se determina el estado de metilación del ADN;
 y
 - c) se define un objetivo específico de indicación con base en las diferencias en el estado de metilación del ADN del ADN derivado del tejido enfermo en comparación con el ADN derivado del tejido sano.
8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el objetivo específico de indicación es una proteína, péptido o ARN.
9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde un modulador conocido per se de la proteína, péptido o ARN está asignado a la indicación específica del tejido enfermo.
10. Uso del método de acuerdo con la reivindicación 1 a 3 para diagnóstico, prognosis o ambas de efectos adversos para pacientes o individuos, en donde los efectos adversos comprenden al menos una categoría seleccionada del grupo consistente de: interacciones indeseadas entre fármacos; enfermedades cancerosas; disfunciones, daño o enfermedad del CNS;; síntomas de agresión o perturbaciones de comportamiento; consecuencias clínicas, psicológicas y sociales de daños en el cerebro; perturbaciones psicóticas y trastornos de la personalidad; demencia y/o síndromes asociados; enfermedad cardiovascular del tracto gastrointestinal; disfunción, daño o enfermedad del sistema respiratorio; lesión, inflamación, infección, inmunidad y/o convalecencia; disfunción, daño o enfermedad del cuerpo tal como una anomalía en el proceso de desarrollo; disfunción, daño o enfermedad de la piel, de los músculos, del tejido conectivo o de los huesos; disfunción, daño o enfermedad endocrina y metabólica; y dolores de cabeza o disfunción sexual.
11. Uso del método de acuerdo con la reivindicación 1 a 3 para distinguir tipos de células o tejido o para investigar la diferenciación celular.

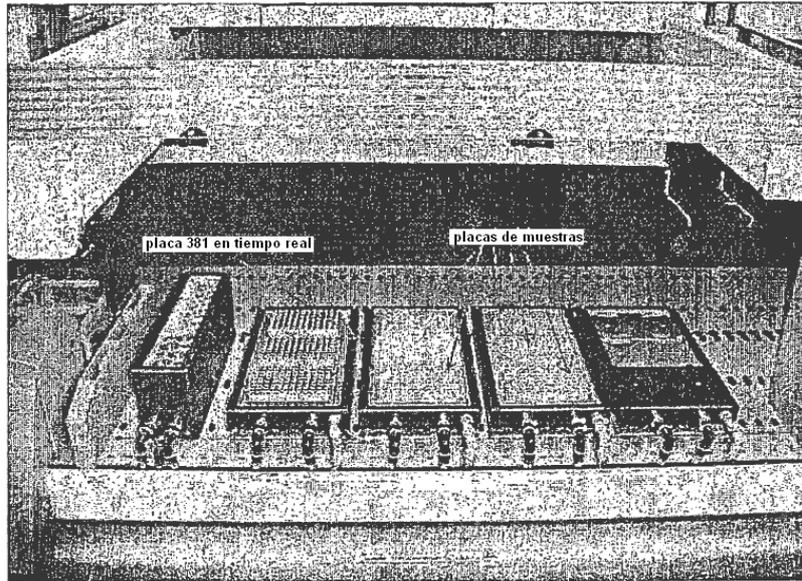


FIGURA 1

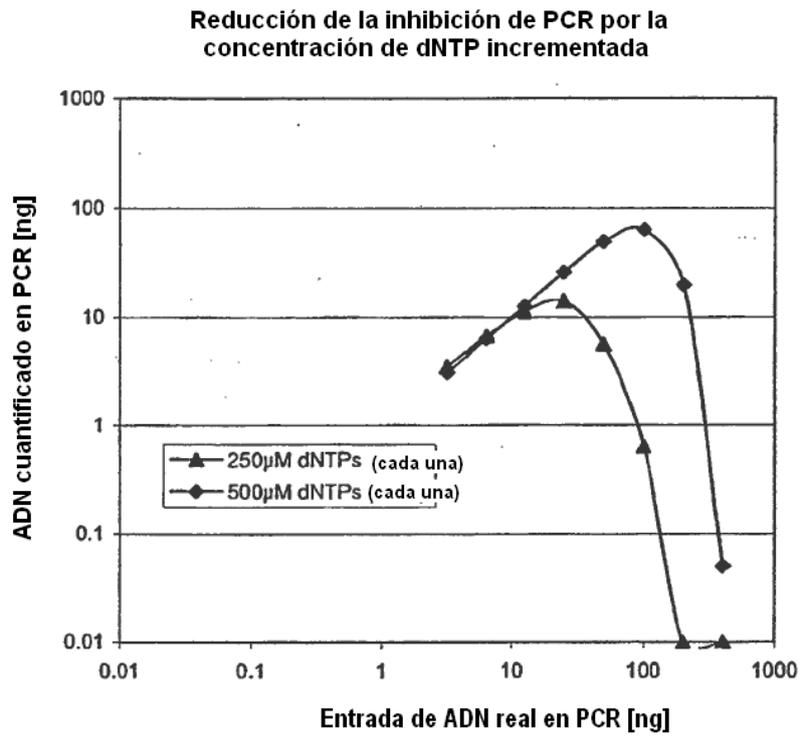


FIGURA 2

Reducción de la inhibición de PCR por extensión prolongada

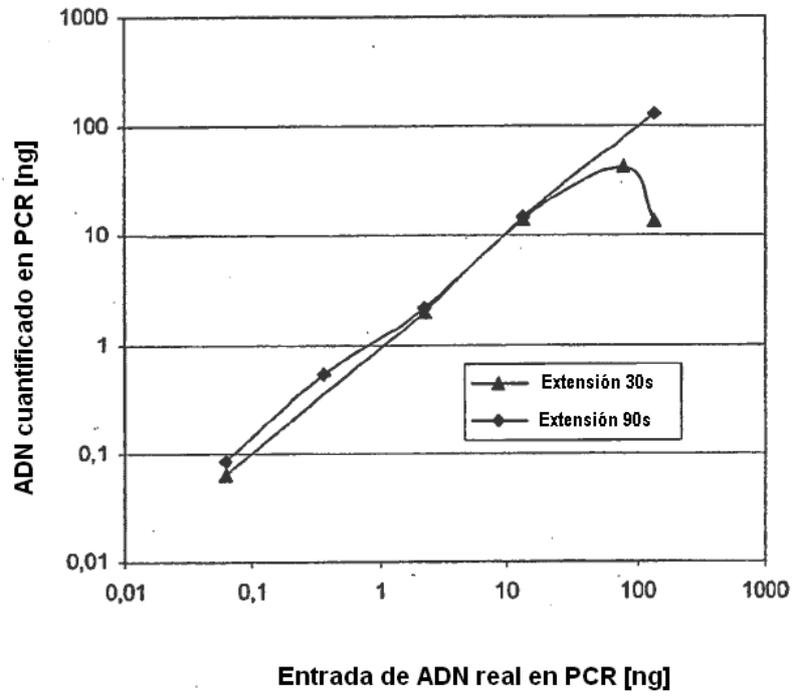


FIGURA 3

Reducción de la inhibición de PCR por la concentración de polimerasa incrementada

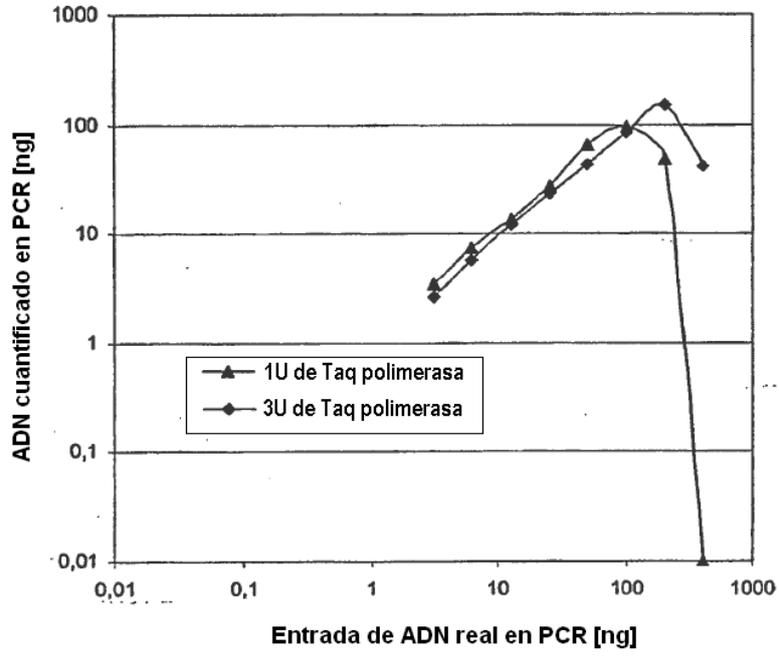


FIGURA 4

Biopsias de próstata - Rendimiento de ADN bisulfito total

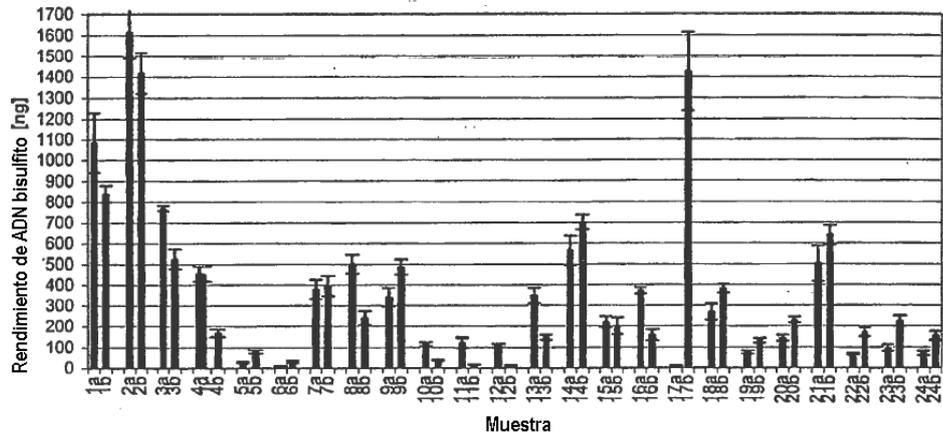


FIGURA 5

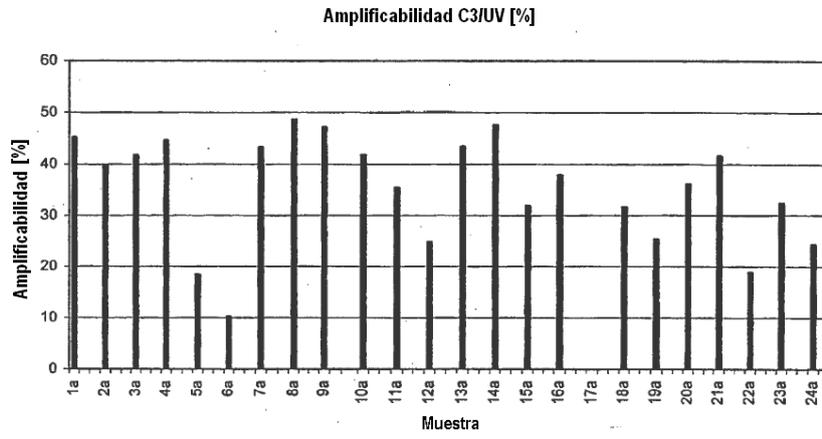


FIGURA 6

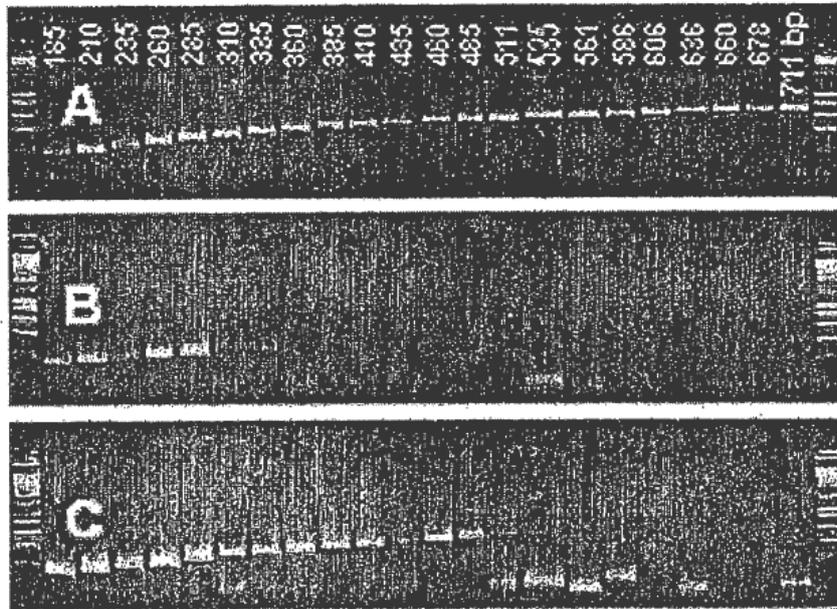


FIGURA 7

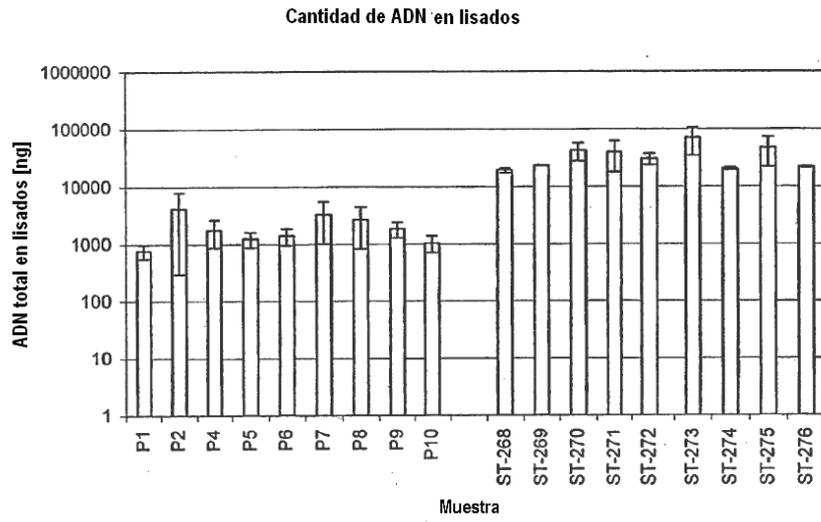


FIGURA 8

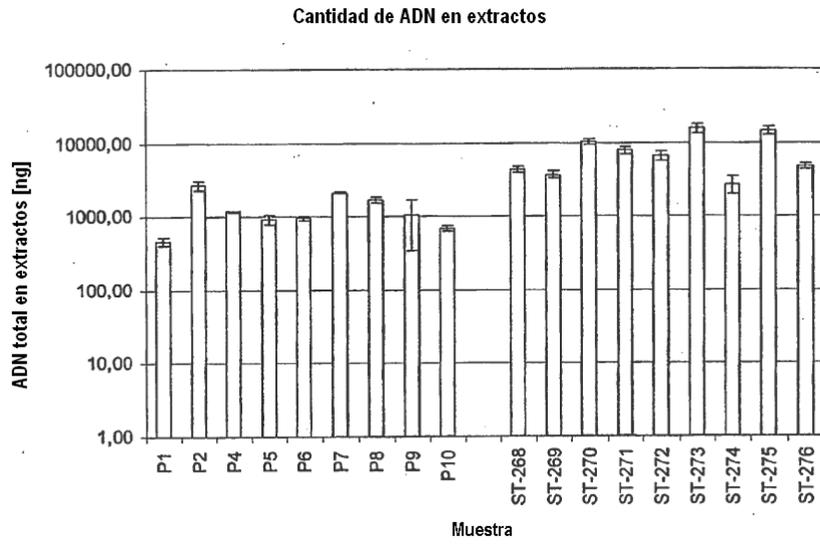


FIGURA 9

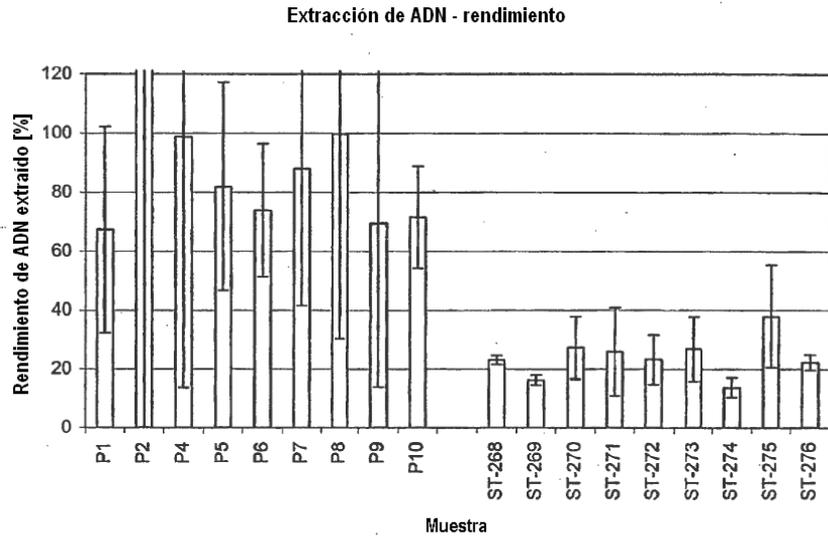


FIGURA 10

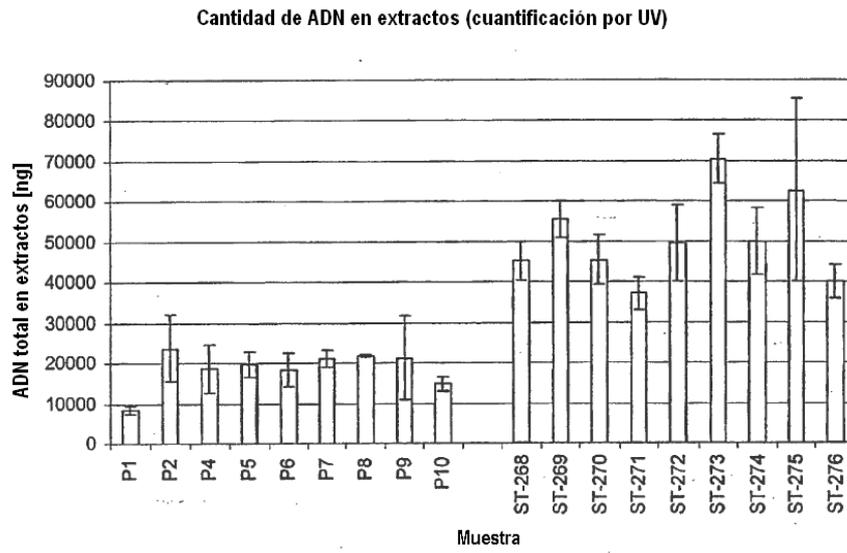


FIGURA 11

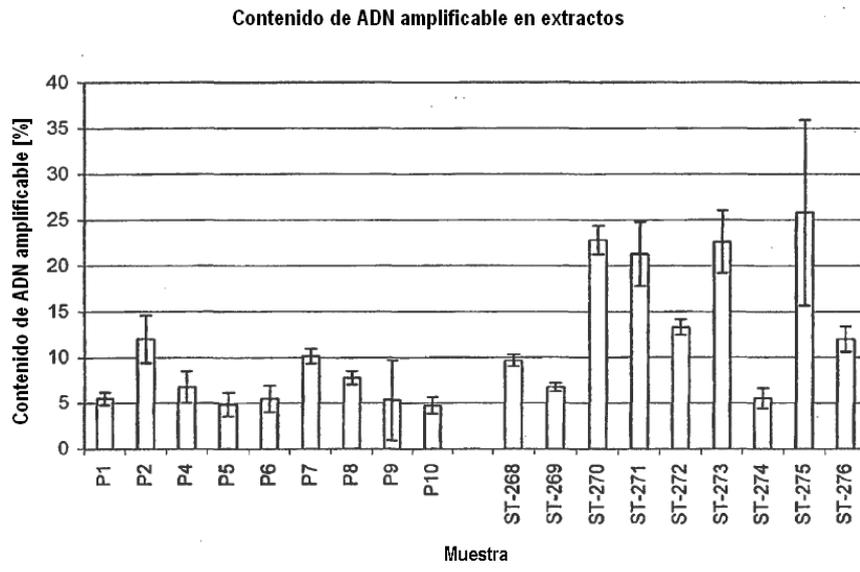


FIGURA 12

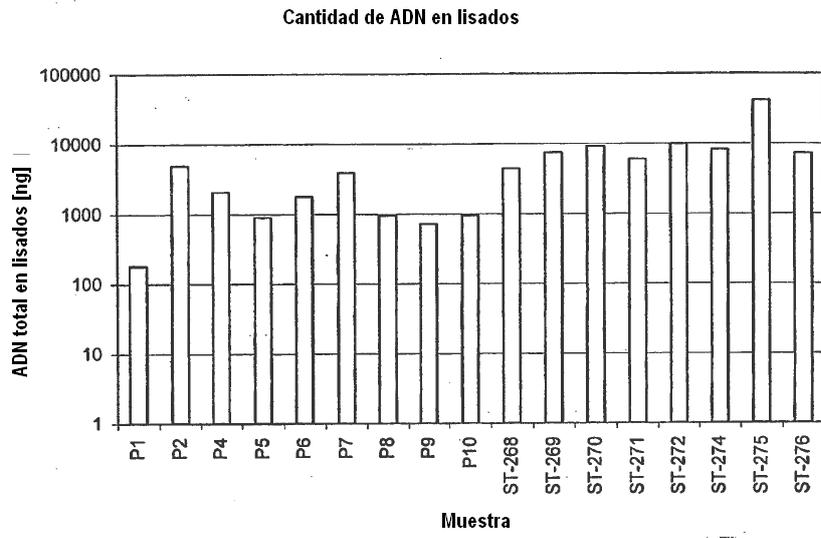


FIGURA 13

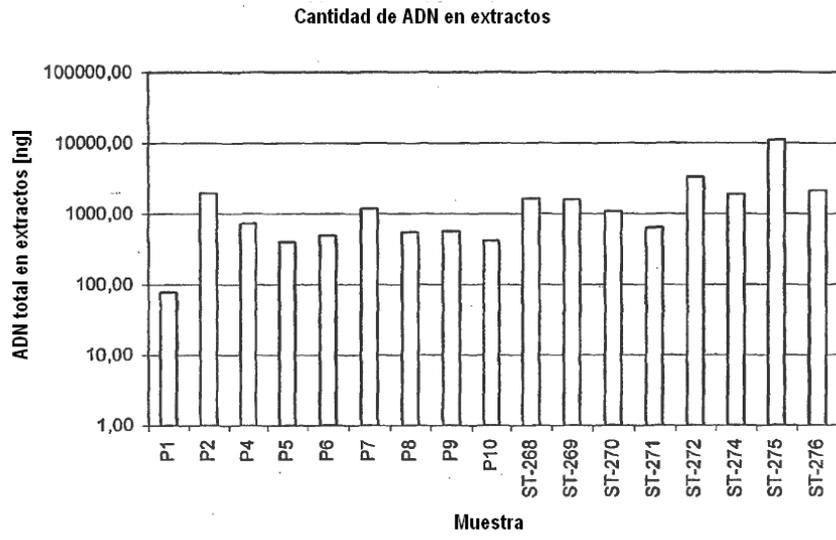


FIGURA 14

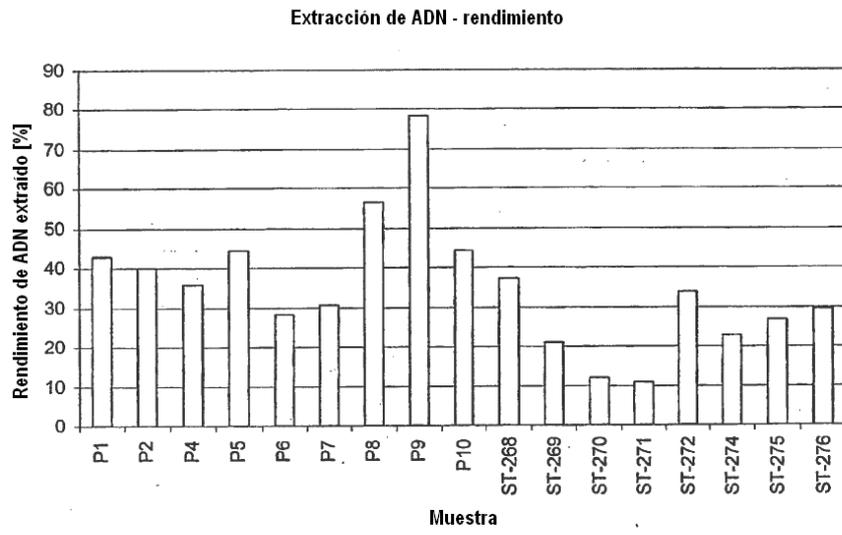


FIGURA 15

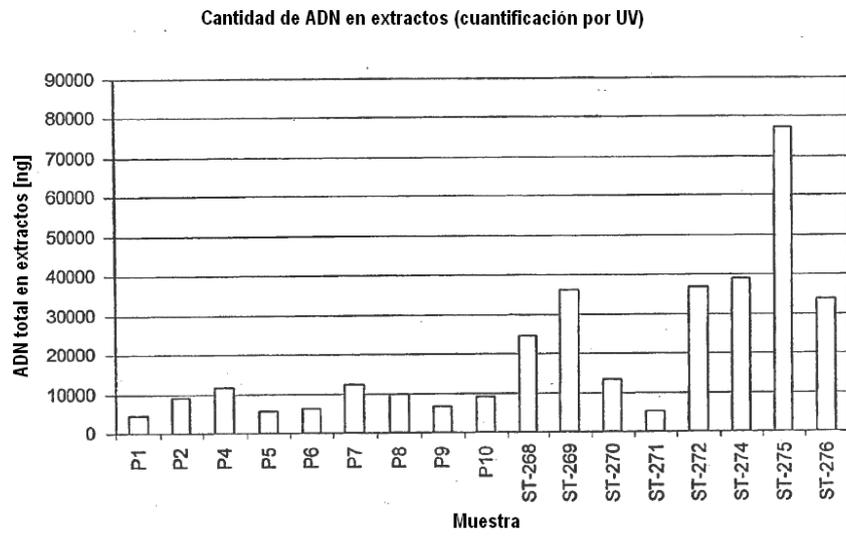


FIGURA 16

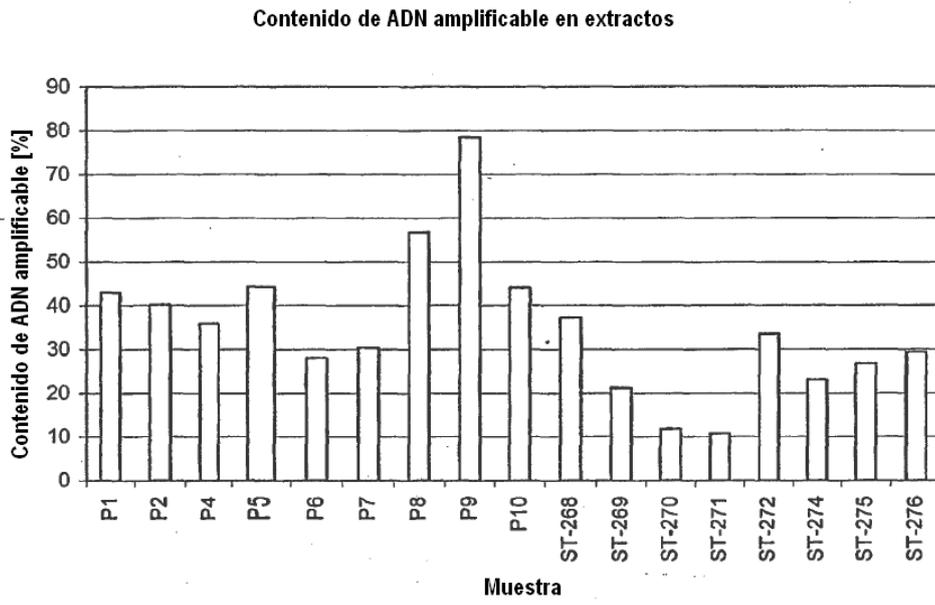


Figura 17

Rendimiento de ADN de acuerdo con el ensayo CFF1

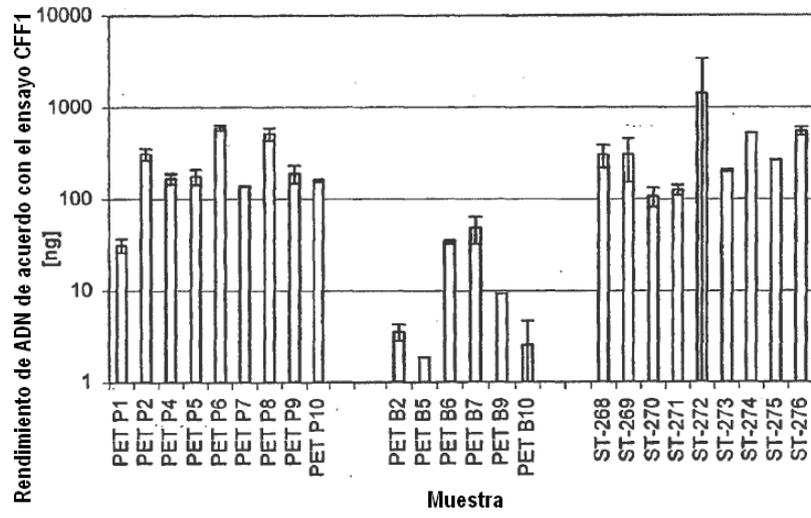


FIGURA 18

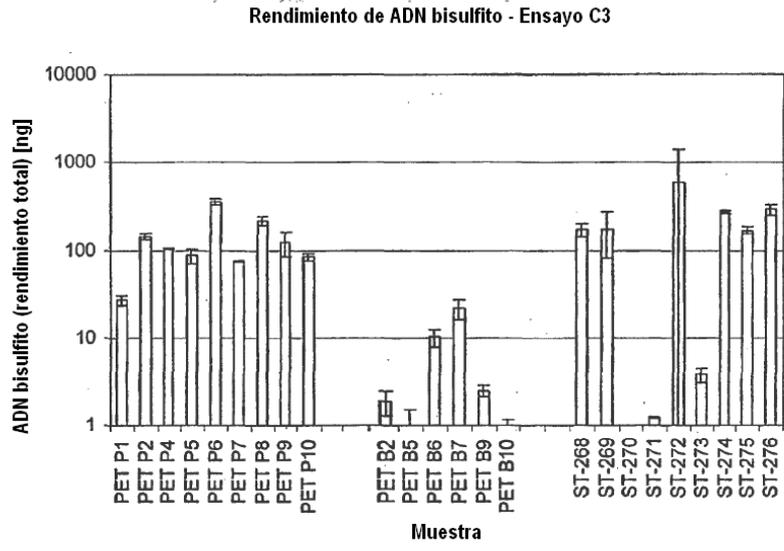


FIGURA 19

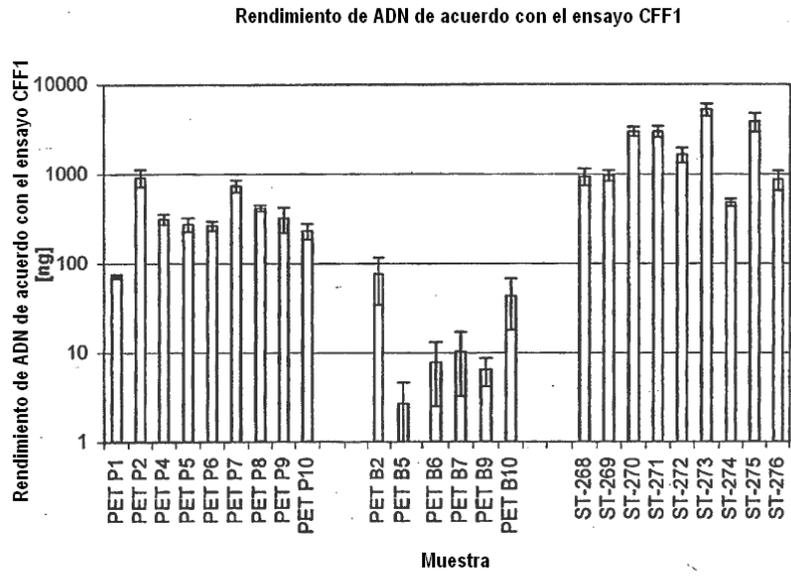


FIGURA 20

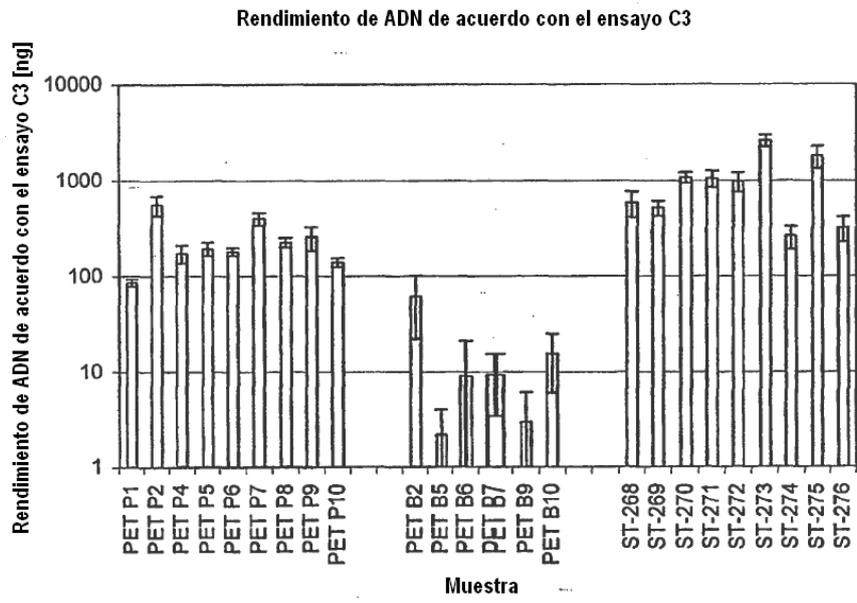


FIGURA 21

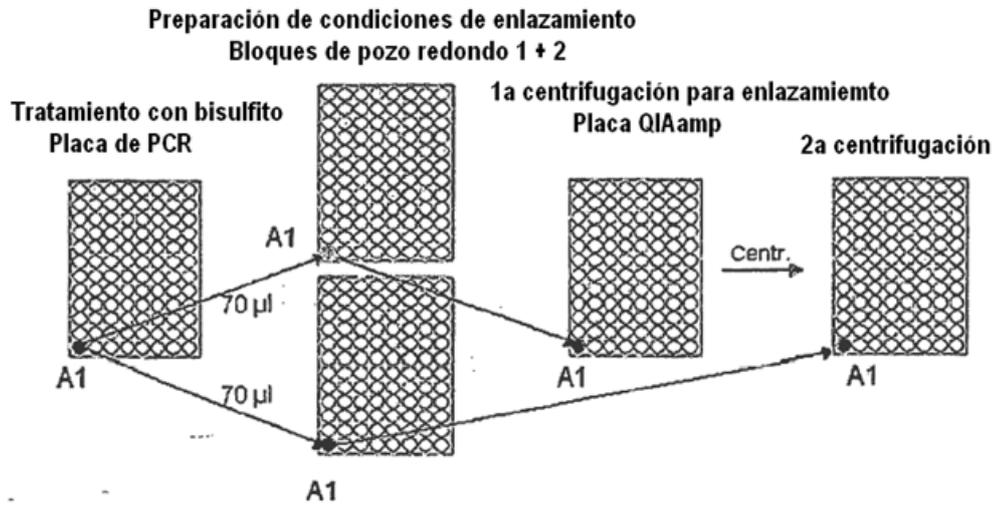


FIGURA 22