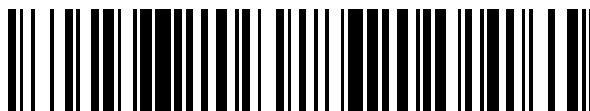


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 092**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.07.2010 E 10797975 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2016 EP 2451984**

54 Título: **Detección de repeticiones de multinucleótido**

30 Prioridad:

10.07.2009 US 224651 P
21.12.2009 US 288518 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.06.2016

73 Titular/es:

PERKINELMER HEALTH SCIENCES, INC.
(100.0%)
940 Winter Street
Waltham, MA 02451, US

72 Inventor/es:

ADLER, KARL EDWIN JR.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 573 092 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

Detección de repeticiones de multinucleótido

5 CAMPO DE LA INVENCION

Los métodos descritos se refieren en general a ensayos para determinar el alcance de regiones de repetición de multinucleótido en un ácido nucleico diana. En aspectos específicos, los métodos descritos se refieren a ensayos para determinar el grado de repeticiones de multinucleótido en un ácido nucleico diana en el que los ácidos nucleicos diana amplificados se marcan con un primer marcador que es independiente del número de repeticiones de multinucleótido y un segundo marcador que es proporcional al número de repeticiones de multinucleótido con el fin de determinar una relación entre las señales detectadas a partir de los marcadores, que es indicativo del número de repeticiones de multinucleótido.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Varios trastornos constitutivos en los seres humanos se caracterizan por una región ampliada de repeticiones de trinucleótidos en un locus particular del genoma de un individuo. Los dos trastornos más conocidos de este tipo son el síndrome del cromosoma X frágil y la enfermedad de Huntington. El número de repeticiones de trinucleótidos presentes en el locus del genoma de un individuo está correlacionado con la gravedad del trastorno. Por lo tanto, se han desarrollado varios métodos para determinar la longitud de la región de repetición de trinucleótidos de ciertos genes relacionados con el trastorno. En el síndrome del cromosoma X frágil, el motivo de repetición es CGG. El método clínico establecido para el diagnóstico del cromosoma X frágil es la transferencia de Southern, en la que el ADN genómico de un individuo se digiere con una enzima de restricción para escindir la región de repeticiones de trinucleótidos a partir del ADN genómico. A continuación esta región de repetición de trinucleótidos se separa por tamaños mediante electroforesis en un gel de agarosa, se transfiere sobre una membrana, y la membrana se examina con una sonda marcada específica para el locus del cromosoma X frágil. Este método utiliza la capacidad de separación por tamaños de la electroforesis para medir el tamaño de la región de repetición, y es un trabajo intensivo, que consume tiempo, y que requiere la interpretación subjetiva del tamaño del fragmento.

Otros métodos publicados para la determinación de la longitud de una región de repeticiones de trinucleótidos suponen la amplificación de la región diana por PCR seguida de la evaluación del tamaño mediante electroforesis capilar usando un instrumento de secuenciación. La PCR de la región diana se lleva a cabo usando cebadores que se extienden sobre la región de repetición. La PCR se ha optimizado para amplificar hasta 1000 o más repeticiones con lo mejor de estos métodos.

La interpretación de resultados de la electroforesis en un gel plano convencional puede ser un reto. La lectura del tamaño es algo subjetivo y supone la comparación de las distancias de excursión entre un patrón y una muestra, suponiendo una distorsión insignificante a lo largo del gel. Un método por PCR en gel utiliza cebadores de repetición, en el que los cebadores son complementos totales o parciales del motivo de repetición de la diana. La electroforesis de los productos de la PCR realizada con los cebadores de repetición produce un frotis; los productos son una mezcla de muchos productos diferentes de diferentes longitudes. La interpretación de estas imágenes de electroforesis por PCR de cebadores de repetición es subjetiva.

Otro método publicado utiliza cebadores de repetición como alternativa a los cebadores puente, con una evaluación de alta resolución en un instrumento de secuenciación capilar. Aunque se mejoran la resolución y la claridad de los resultados frente a la electroforesis plana, la interpretación puede ser un reto, especialmente en los casos de tartamudeo PCR.

Fojta et al. describen un método para la detección electroquímica de la expansión de repetición de ADN (GAA)_n en ataxia de Friedreich (FRDA), en el que el ADN diana se amplifica por PCR y se marca por modificación con tetróxido de osmio 2,2'-bipiridina (J Am Chem Soc. 2004 Jun 2; 126 (21): 6532-3). El documento WO 2005/085476 describe un método para la detección de un polimorfismo de repetición corto en tándem, en el que el ADN genómico se amplifica por PCR, de manera que el producto comprende toda la región de repetición y una región flanqueadora contigua sustancial.

Todos los métodos que utilizan los instrumentos de secuenciación capilar como mecanismo de lectura están limitados por el alto coste de esos instrumentos, y por el hecho de que su funcionamiento (por ejemplo, el intervalo de temperatura ambiente) y los requisitos de mantenimiento son bastante estrictos.

SUMARIO DE LA INVENCION

En el presente documento se proporcionan métodos para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido en un ácido nucleico diana que incluyen la amplificación de un ácido nucleico diana que contiene una región de repetición de multinucleótido para producir ácidos nucleicos diana amplificados; el marcaje de los ácidos nucleicos diana amplificados con un primer marcador y un segundo marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido y el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido, en el que el primer y segundo marcadores se incorporaron cada uno independientemente en los ácidos nucleicos diana amplificados durante la amplificación o después de la amplificación; la unión de los ácidos nucleicos diana amplificados a una sonda de captura específica para los ácidos nucleicos diana amplificados; la detección del primer marcador asociado a la sonda de captura para producir una primera señal; la detección del segundo marcador asociado a la sonda de captura para producir una segunda señal; y determinar una relación de la primera señal y la segunda señal, en la que la relación es indicativa de la longitud de la región de repetición de multinucleótido en el ácido nucleico diana.

De acuerdo con formas de realización de los métodos descritos, la unión de los ácidos nucleicos diana amplificados comprende la hibridación específica de los ácidos nucleicos diana amplificados a sondas de captura de ácido nucleico complementarias.

El primer marcador se incorpora a un cebador puente utilizado en la amplificación del ácido nucleico diana.

En otras opciones, el segundo marcador está presente en los nucleótidos utilizados en la amplificación del ácido nucleico diana para producir los ácidos nucleicos diana amplificados o está presente en las sondas que se unen específicamente a repeticiones de multinucleótido en los ácidos nucleicos diana amplificados. Por ejemplo, las sondas que se unen específicamente a repeticiones de multinucleótido en los ácidos nucleicos diana amplificados son sondas de ácido nucleico complementarias a las repeticiones de multinucleótido en los ácidos nucleicos diana amplificados.

El ácido nucleico diana se aísla de una muestra biológica de acuerdo con formas de realización de los métodos proporcionados en este documento. El término "aislar" se refiere a la separación de los ácidos nucleicos a partir de al menos algunos componentes del entorno en el que se encuentran naturalmente. Así, por ejemplo, se pueden separar ácidos nucleicos aislados de los restos celulares.

En el presente documento se describen métodos en los que el ácido nucleico diana es ADN genómico.

Se obtiene una muestra biológica de un sujeto individual, tal como, pero no limitado a, un sujeto humano para su uso en los métodos descritos en este documento.

Por ejemplo, se obtiene una muestra biológica usada según las realizaciones descritas en este documento de un sujeto individual que padece o está en riesgo de padecer un trastorno de expansión de repeticiones de trinucleótidos seleccionado del grupo que consiste en: atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, enfermedad de Huntington, atrofia muscular espinobulbar, ataxia espinocerebelosa tipo 1, ataxia espinocerebelosa tipo 2, ataxia espinocerebelosa tipo 3, ataxia espinocerebelosa tipo 6, ataxia espinocerebelosa tipo 7, ataxia espinocerebelosa tipo 17, síndrome del cromosoma X frágil; retraso mental XE frágil; ataxia de Friedreich; distrofia miotónica; ataxia espinocerebelosa tipo 8 y ataxia espinocerebelosa tipo 12.

Los métodos descritos en este documento incluyen la amplificación de una región de repetición de multinucleótido de ácido nucleico de referencia para producir ácidos nucleicos de referencia diana amplificados de acuerdo con algunas realizaciones. Los métodos de este tipo incluyen, además, el marcaje de los ácidos nucleicos de referencia diana amplificados con un primer marcador y un segundo marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido y el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido, en el que el primer y segundo marcadores se incorporan cada uno independientemente a los ácidos nucleicos de referencia diana amplificados durante la amplificación o después de la amplificación; la unión de los ácidos nucleicos de referencia diana amplificados a una sonda de captura específica para los ácidos nucleicos de referencia diana amplificados; la detección del primer marcador asociado a la sonda de captura para producir una tercera señal; la detección del segundo marcador asociado a la sonda de captura para producir una cuarta señal; la determinación de una relación de la tercera señal y la cuarta señal, en la que la relación es indicativa de la longitud de la región de repetición de multinucleótido en el ácido nucleico de referencia diana; y la comparación de la relación de la primera

señal y la segunda señal con la relación de la tercera señal y la cuarta señal. La comparación de la relación de la primera señal y la segunda señal con la relación de la tercera señal y la cuarta señal permite detectar las diferencias entre una primera región de repetición de multinucleótido de ácido nucleico, tal como ADN genómico de la muestra que contiene una región de repetición de multinucleótido de un sujeto individual que padece o está en riesgo de padecer un trastorno de expansión de repeticiones de trinucleótidos y una referencia.

Opcionalmente, además se incluye la amplificación de un segundo ácido nucleico diana que contiene una segunda región de repetición de multinucleótido para producir unos segundos ácidos nucleicos diana amplificados; el marcaje de los segundos ácidos nucleicos diana amplificados con un primer marcador y un segundo marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido y el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido; la unión de los segundos ácidos nucleicos diana amplificados a una sonda de captura específica para los segundos ácidos nucleicos diana amplificados; la detección del primer marcador asociado a la sonda de captura para producir una primera señal; la detección del segundo marcador asociado a la sonda de captura para producir una segunda señal; y determinar una relación de la primera señal y la segunda señal, en la que la relación es indicativa de la longitud de la repetición de multinucleótido en el segundo ácido nucleico diana.

Opcionalmente, el segundo sustrato codificado es una pluralidad de partículas codificadas, que producen un segundo grupo de partículas.

El primer y segundo grupos de partículas están juntos en un recipiente de reacción durante la unión de los primer y segundo ácidos nucleicos diana amplificados al primer y segundo sustratos codificados de acuerdo con algunas realizaciones.

Los métodos para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido en un ácido nucleico diana, que incluyen la división de una muestra que contiene ácidos nucleicos diana en al menos dos alícuotas, incluyendo una primera alícuota de la muestra y una segunda alícuota de la muestra; amplificar un ácido nucleico diana en la primera alícuota de la muestra para producir ácidos nucleicos diana amplificados; el marcaje de los ácidos nucleicos diana amplificados con un primer marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido; la unión de los ácidos nucleicos diana amplificados a una primera sonda de captura específica para los ácidos nucleicos diana amplificados; amplificar el ácido nucleico diana en la segunda alícuota de la muestra para producir ácidos nucleicos de la región de repetición de multinucleótido; el marcaje de los ácidos nucleicos de la región de repetición de multinucleótido con un segundo marcador, el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido; la unión de los ácidos nucleicos de la región de repetición de multinucleótido a una segunda sonda de captura específica para los ácidos nucleicos de la región de repetición de multinucleótido; la detección del primer marcador asociado a la primera sonda de captura para producir una primera señal; la detección del segundo marcador asociado a la segunda sonda de captura para producir una segunda señal; y determinar una relación de la primera señal y la segunda señal, en la que la relación es indicativa de la longitud de la repetición de multinucleótido en el ácido nucleico diana. Opcionalmente, la primera y segunda sondas de captura son idénticas.

En realizaciones adicionales, la primera y segunda sondas de captura son diferentes.

Los métodos de cribado de un individuo para una afección genética que se caracteriza por una región de repetición de multinucleótido alterada en un ácido nucleico diana, que incluyen la amplificación de una muestra obtenida de un ácido nucleico diana del individuo para producir ácidos nucleicos diana amplificados, en el que los ácidos nucleicos diana amplificados contienen un primer marcador y un segundo marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido y el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido; la unión de los ácidos nucleicos diana amplificados a una sonda de captura específica para la repetición de multinucleótido de los ácidos nucleicos diana amplificados; la detección del primer marcador asociado a la sonda de captura para producir una primera señal; la detección del segundo marcador asociado a la sonda de captura para producir una segunda señal; la determinación de una relación de la primera señal a la segunda señal, en la que la relación es indicativa de la longitud de la repetición de multinucleótido en el ácido nucleico diana, y la comparación de la relación determinada con la de una muestra de referencia para determinar la presencia de una región de repetición de multinucleótido alterada en el individuo.

De acuerdo con las realizaciones descritas en este documento se proporcionan composiciones de ensayo que incluyen ácidos nucleicos diana amplificados que contienen una región de repetición de multinucleótido, los ácidos nucleicos diana amplificados que incluyen un primer marcador y un segundo marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido y el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido, en el que el primer y segundo marcadores se incorporaron cada uno de forma

independiente en los ácidos nucleicos diana amplificados durante la amplificación, y en el que los ácidos nucleicos diana amplificados se unen a una sonda de captura específica para los ácidos nucleicos diana amplificados.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 Las Figuras 1A, 1B y 1C son diagramas de flujo esquemáticos de proceso que representan métodos de ejemplo para determinar la longitud de repeticiones de multinucleótido en una molécula de ADN diana;
- 10 La Figura 2 es un dibujo esquemático que representa una configuración de ejemplo de un par de cebadores puente diana;
- La Figura 3 es un dibujo esquemático que representa una configuración de ejemplo de un par de cebadores de repetición específica, en el que el cebador no de repetición está aguas arriba del cebador de repetición específica;
- 15 La Figura 4 es un dibujo esquemático que representa una configuración de ejemplo de un par de cebadores de repetición específica, en el que el cebador no de repetición está aguas abajo del cebador de repetición específica;
- La Figura 5A es un dibujo esquemático que representa una molécula de ADN diana amplificada preparada usando un par de cebadores puente diana como se muestra en la Figura 2;
- 20 La Figura 5B es un dibujo esquemático que representa una molécula de ADN de repetición específica amplificada preparada usando un par de cebadores como se representa en la Figura 3;
- La Figura 5C es un dibujo esquemático que representa una molécula de ADN de repetición específica amplificada preparada usando un par de cebadores como se representa en la Figura 4;
- 25 La Figura 6 es un dibujo esquemático de una molécula de ADN diana amplificada unida específicamente a una molécula de captura de oligonucleótido inmovilizada sobre una partícula codificada;
- 30 La Figura 7 es un dibujo esquemático de una molécula de ADN de repetición específica amplificada unida específicamente a una molécula de captura de oligonucleótido inmovilizada sobre una partícula codificada;
- La Figura 8 es un dibujo esquemático de una molécula de ADN diana amplificada hibridada a dos sondas detectoras de repeticiones y unida específicamente a una molécula de captura de oligonucleótido inmovilizada sobre una partícula codificada;
- 35 La Figura 9 es un gráfico de los datos de resultados de los ensayos generados a partir de muestras de referencia de la línea de células Coriell de cromosoma X frágil con longitudes de repetición conocidas usando el método de ejemplo representado en la Figura 1A;
- 40 La Figura 10 es un gráfico de los resultados del ensayo generados a partir de muestras de referencia de la línea de células Coriell de cromosoma X frágil con longitudes de repetición conocidas usando el método de ejemplo representado en la Figura 1B;
- 45 La Figura 11 es un dibujo esquemático que representa un método de ejemplo para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido presente en una molécula de ADN diana;
- La Figura 12 es un gráfico de datos de los resultados del ensayo utilizando el método de ejemplo representado en la Figura 11 para muestras de referencia de hombres (Figura 12A) y muestras de referencia de mujeres realizadas bajo un primer grupo de condiciones de hibridación (Figura 12B) y un segundo grupo de condiciones de hibridación (Figura 12C); y
- 50 La Figura 13 es un dibujo esquemático que representa un método de ejemplo para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido presente en una molécula de ADN diana.
- 55 Los dibujos esquemáticos proporcionados junto con el presente documento no están dibujados a escala.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En el presente documento se describen métodos para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido presente en un ácido nucleico diana.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “longitud de una región de repetición de multinucleótido” significa el número de motivos multinucleótido, que normalmente contiene 3 o 4 nucleótidos, presentes de manera repetitiva en un segmento de ácido nucleico diana.

10 Se proporcionan métodos para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido en un ácido nucleico diana, que incluyen la amplificación de un ácido nucleico diana para producir ácidos nucleicos diana amplificados. Se proporcionan partículas codificadas que incluyen sondas de captura específicas para los ácidos nucleicos diana amplificados. A continuación los ácidos nucleicos diana amplificados se unen a partículas codificadas mediante la unión específica a las sondas de captura. Los ácidos nucleicos diana amplificados se marcan con un primer marcador y un segundo marcador. El primer marcador es independiente del número de repeticiones de multinucleótido y también se denomina “marcador de detección de dianas” en el presente documento. El segundo marcador es proporcional al número de repeticiones de multinucleótido y también se denomina “marcador de detección de repeticiones” en el presente documento. El primer marcador se detecta para producir una primera señal y el segundo marcador se detecta para producir una segunda señal. Se determina la relación de la primera señal a la segunda señal y la relación es indicativa de la longitud de la repetición de multinucleótido en el ácido nucleico diana.

20 En realizaciones particulares, el primer marcador, es decir, el “marcador de detección de dianas”, se incorpora a un cebador puente utilizado en la amplificación del ácido nucleico diana.

25 En algunas realizaciones, el segundo marcador, es decir, el “marcador de detección de repeticiones” está presente en un cebador de repetición específica utilizado en la amplificación del ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, el “marcador de detección de repeticiones” está presente en los nucleótidos utilizados en la amplificación del ácido nucleico diana para producir los ácidos nucleicos diana amplificados.

30 En algunas realizaciones, el “marcador de detección de repeticiones” está presente en las sondas que se unen específicamente a repeticiones de multinucleótido en los ácidos nucleicos diana amplificados. Por ejemplo, las sondas que se unen específicamente a repeticiones de multinucleótido en los ácidos nucleicos diana amplificados son sondas de ácido nucleico que tienen una secuencia de ácido nucleico complementaria de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

35 El término “ácido nucleico” tal como se utiliza en el presente documento se refiere a moléculas de ARN o de ADN que tienen más de un nucleótido en cualquier forma, incluyendo de cadena sencilla, de doble cadena, oligonucleótido o polinucleótido.

40 El ácido nucleico diana es ADN en realizaciones particulares y el ADN puede estar en cualquier forma, tal como ADN cromosómico, ADN mitocondrial, ADNc, ADN cromosómico microdisecionado, un inserto en un vector que de forma ilustrativa incluye un cromosoma artificial bacteriano, un cromosoma artificial de levadura, un cromosoma artificial humano, un cósmido, plásmido, fagémido, ADN de fago, y fósido.

45 El ácido nucleico diana se puede obtener de cualquier fuente, incluyendo, pero no limitado a, un ser humano, un mamífero no humano, un vertebrado, un invertebrado, un microorganismo, o una planta. El ácido nucleico diana se puede obtener a partir de una o más células en vivo o *in vitro*. Por ejemplo, el ácido nucleico diana se puede obtener a partir de células cultivadas, incluyendo, pero no limitado a, líneas celulares, células primarias o células manipuladas en laboratorio tales como células recombinantes.

50 El ácido nucleico diana normalmente está contenido dentro de una muestra biológica, que se puede obtener de un individuo, tal como de una muestra corporal, por ejemplo, sangre, un hisopo bucal, tejido cutáneo, orina, saliva, tejido, y similares, y líneas celulares derivadas de los mismos. Se puede obtener una muestra prenatal de líquido amniótico, de productos de la concepción, de blastocistos y blastómeros, vellosidades coriónicas, células fetales y ADN fetal que circula en la sangre materna. En los métodos descritos en el presente documento se pueden utilizar muestras archivadas extraídas de muestras patológicas embebidas en parafina y fijadas con formalina (FFPE). Las muestras también se pueden obtener a partir de fuentes *in vitro* tales como líneas celulares.

Las muestras biológicas se pueden obtener de cualquier fuente, incluyendo, pero no limitado a, un ser humano, un

mamífero no humano, un vertebrado, un invertebrado, un microorganismo, o una planta. Las muestras biológicas se pueden obtener de una o más células en vivo o *in vitro*. Por ejemplo, las muestras biológicas se pueden obtener a partir de células cultivadas, incluyendo, pero no limitadas a, líneas celulares, células primarias o células manipuladas en laboratorio tales como células recombinantes.

5

El ácido nucleico diana, tal como ADN diana, se obtiene por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Tercera Ed., 2001 o F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5ª Ed., 2002.

10 El ácido nucleico diana, tal como ADN diana, también se puede obtener en el mercado y/o usando kits comerciales para el aislamiento de ácidos nucleicos diana, tales como ADN diana.

Los términos científicos y técnicos utilizados en esta memoria está previsto que tengan los significados que entienden habitualmente los expertos en la materia. Dichos términos se encuentran definidos y se utilizan en el contexto de varias referencias convencionales que de forma ilustrativa incluyen J. Sambrook y D.W. Russell, 15 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª Ed., 2001; F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5ª Ed., 2002, B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4ª edición, Garland, 2002; D. L. Nelson y M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4ª Ed., W.H. Freeman & Company, 2004; y Herdewijn, P. (Ed.), *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004.

20

Los métodos para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido presente en un ácido nucleico diana son útiles, por ejemplo, al determinar si un locus de la enfermedad, como el locus del cromosoma X frágil, contiene un número de repeticiones de trinucleótidos que se correlaciona con un fenotipo de la enfermedad. Los métodos descritos actualmente emplean marcadores detectables que generan señales que se correlacionan con 25 la longitud de una repetición de multinucleótido, y por lo tanto permiten la determinación de la longitud de una región de repetición de multinucleótido sin necesidad de evaluar el peso molecular de la región de repetición o sus partes.

Los trastornos asociados a repeticiones de multinucleótido incluyen trastornos de expansión de repeticiones de trinucleótidos tales como, pero no limitado a atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana (DRPLA), enfermedad de 30 Huntington, atrofia muscular espinobulbar (SBMA), ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA1), ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA2), ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA3), ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA6), ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA 7), ataxia espinocerebelosa tipo 17 (SCA17), síndrome de X frágil; retraso mental de XE frágil; ataxia de Friedreich; distrofia miotónica; ataxia espinocerebelosa tipo 8 (SCA8), ataxia espinocerebelosa tipo 12 (SCA12). Todos estos trastornos de expansión de repeticiones de trinucleótidos están bien caracterizados. 35 Se conoce el gen afectado por expansión de repeticiones de trinucleótidos en cada trastorno y la ubicación de la expansión de repeticiones de trinucleótidos en cada uno de los genes afectados es bien conocida.

El gen implicado en la DRPLA está en el cromosoma 12 y se designa "DRPLA". Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 6 a 35 copias de CAG en el locus de repetición de trinucleótidos de DRPLA. Los individuos 40 sintomáticos tienen alrededor de 49 a 88 copias o más de las repeticiones CAG. El gen afectado en la enfermedad de Huntington se designa "huntingtina". Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 10 a 35 copias de CAG en el locus de repetición de trinucleótidos de huntingtina. Los individuos sintomáticos tienen alrededor de 40 copias o más de la repetición CAG. El gen afectado en SBMA es el gen del receptor de andrógenos que se encuentra en el cromosoma X. Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 9 a 36 copias de CAG en el locus de repetición de 45 trinucleótidos del receptor de andrógenos. Los individuos sintomáticos tienen alrededor de 38 a 62 copias. El gen implicado en la SCA1 está en el cromosoma 6 y se designa "SCA1". Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 6 a 44 copias de CAG en el locus de repetición de trinucleótidos de SCA1. Los individuos sintomáticos tienen alrededor de 39 a 81 copias de CAG. El gen implicado en la SCA2 se encuentra en el cromosoma 12 y se designa "SCA2". Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 14 a 31 copias de CAG en el locus de repetición de 50 trinucleótidos de SCA2. Los individuos sintomáticos tienen alrededor de 36 a 64 copias. El gen implicado en la SCA3 se encuentra en el cromosoma 14 y se designa "SCA3". Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 12 a 43 copias de CAG en el locus de repetición de trinucleótidos de SCA3. Los individuos sintomáticos tienen alrededor de 56 a 86 copias. El gen implicado en la SCA6 se encuentra en el cromosoma 19 y se designa "SCA6". Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 4 a 18 copias de CAG en el locus de repetición de trinucleótidos de SCA6. Los 55 individuos sintomáticos tienen alrededor de 21 a 33 copias. El gen implicado en la SCA7 se encuentra en el cromosoma 3 y se designa "SCA7". Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 4 a 19 copias de CAG en el locus de repetición de trinucleótidos de SCA7. Los individuos sintomáticos tienen alrededor de 37 a 306 copias. El gen implicado en la SCA17 está en el cromosoma 6 y se designa "SCA17". Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 29 a 42 copias de CAG en el locus de repetición de trinucleótidos de SCA17. Los individuos

5 10 15

sintomáticos tienen alrededor de 47-55 copias o más de las repeticiones CAG. El gen afectado en el síndrome de X frágil, que se designa "FMR1", está en el cromosoma X. Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 6 a 53 repeticiones CGG en el locus de repetición de trinucleótidos de FMR1. Los individuos sintomáticos tienen alrededor de 230 o más repeticiones. El gen afectado en retraso mental de XE frágil se designa "FMR2" que se encuentra en el cromosoma X. Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 6 a 35 copias de GCC en el locus de repetición de trinucleótidos de FMR2. Los individuos sintomáticos tienen alrededor de 200 copias o más. El gen afectado en la ataxia de Friedreich se denomina "X25". Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 7 y 34 repeticiones GAA en el locus de repetición de trinucleótidos de X25. Los individuos sintomáticos tienen alrededor de 100 o más repeticiones. El gen afectado en la distrofia miotónica se designa "gen de la proteína quinasa de la distrofia miotónica" (DMPK). Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 5 y 37 repeticiones de CTG en el locus de repetición de trinucleótidos de DMPK. Los individuos sintomáticos tienen alrededor de 50 repeticiones o más. El gen afectado en SCA8 se designa "SCA8". Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 16 a 37 repeticiones de CTG en el locus de repetición de trinucleótidos de SCA8. Los individuos sintomáticos tienen alrededor de 110 a 250 repeticiones. El gen afectado en SCA12 se designa "SCA12". Los individuos asintomáticos tienen alrededor de 7 a 28 repeticiones de CAG en el locus de repetición de trinucleótidos de SCA12. Los individuos sintomáticos tienen alrededor de 66 a 78 repeticiones.

20

Se proporcionan métodos de cribado de un individuo para una afección genética que se caracteriza por una región de repetición de multinucleótido alterada en un ácido nucleico diana de acuerdo con las realizaciones descritas en este documento.

25

El término "región de repetición de multinucleótido alterada" se refiere a una región de repetición de multinucleótido que contiene un número de repeticiones de multinucleótido que difiere del número normal de repeticiones de multinucleótido en la región de repetición de multinucleótido. Una región de repetición de multinucleótido alterada se puede detectar usando una región de repetición de multinucleótido normal como referencia en formas de realización de los métodos descritos en este documento. Por lo tanto, de acuerdo con formas de realización de los métodos descritos en este documento, se incluye un ácido nucleico diana que es una muestra de "referencia", es decir, un ácido nucleico diana que tiene un número conocido de repeticiones de multinucleótido.

30

Una región de repetición de multinucleótido alterada se puede detectar comparando el número de repeticiones de multinucleótido detectadas usando métodos descritos en este documento con el número conocido de repeticiones de multinucleótido presentes en la región de repetición de multinucleótido normal. El término "normal" se refiere al número de repeticiones de multinucleótido predominante presentes en la región de repetición de multinucleótido análoga particular, que se encuentra en sujetos sanos.

35

Los métodos de cribado de un individuo para una afección genética que se caracteriza por una región de repetición de multinucleótido alterada en un ácido nucleico diana incluyen la amplificación de un ácido nucleico diana de una muestra obtenida del individuo para producir ácidos nucleicos diana amplificados que contienen un primer marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido en el ácido nucleico diana y un segundo marcador, el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido en el ácido nucleico diana. Los ácidos nucleicos diana amplificados se unen a una sonda de captura específica para la repetición de multinucleótido de los ácidos nucleicos diana amplificados. Se detecta el primer marcador asociado a la sonda de captura para producir una primera señal y se detecta el segundo marcador asociado a la sonda de captura para producir una segunda señal. Se determina una relación de la primera señal a la segunda señal en la que la relación es indicativa de la longitud de la repetición de multinucleótido en el ácido nucleico diana. La relación determinada con respecto a la muestra del individuo se compara con una referencia. De acuerdo con formas de realización de los métodos descritos, la referencia es una muestra de control de los ácidos nucleicos obtenidos a partir de un individuo normal.

40 45 50 55

Los métodos de cribado de un individuo para una afección genética que se caracteriza por una región de repetición de multinucleótido alterada en un locus genómico diana que contiene una región de repetición de multinucleótido incluyen la amplificación de un locus genómico diana que contiene una región de repetición de multinucleótido a partir de una muestra obtenida del individuo para producir ADN genómico diana amplificado que contiene un primer marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido en el ADN genómico diana y un segundo marcador, el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido en el ADN genómico diana. El ADN genómico diana amplificado se une a las sondas de captura específicas para la repetición de multinucleótido del ADN genómico diana amplificado. Se detecta el primer marcador asociado a la sonda de captura para producir una primera señal y se detecta el segundo marcador asociado a la sonda de captura para producir una segunda señal. Se determina una relación de la primera señal a la segunda señal en la que la

relación es indicativa de la longitud de la repetición de multinucleótido en el locus genómico diana. La relación determinada con respecto a la muestra del individuo se compara con una referencia. De acuerdo con formas de realización de los métodos descritos, la referencia es una muestra de control de ADN genómico obtenido a partir de un individuo normal.

5

MARCADORES

Como se describe en el presente documento, los ácidos nucleicos diana amplificados se marcan con un primer marcador, el "marcador de detección de dianas" y un segundo marcador, el "marcador de detección de repeticiones".

10

El marcador de detección de dianas es independiente del número de repeticiones de multinucleótido en la región de repetición de multinucleótido del ácido nucleico diana. Se puede incorporar cualquier número de marcadores de detección de dianas en los ácidos nucleicos diana amplificados, siempre y cuando el número de marcadores de detección de dianas incorporados no varíe significativamente entre las moléculas de ácido nucleico amplificadas individuales. De acuerdo con formas de realización descritas en el presente documento, cada molécula de ácido nucleico amplificado contiene un marcador incorporado en al menos un cebador de un par cebador utilizado en la amplificación de los ácidos nucleicos diana para producir los ácidos nucleicos diana amplificados.

15

Por lo tanto, en realizaciones particulares, el "marcador de detección de dianas", se incorpora a al menos un cebador puente de un par de cebadores puente utilizado en la amplificación del ácido nucleico diana. Opcionalmente, ambos cebadores de un par de cebadores puente utilizado en la amplificación del ácido nucleico diana están marcados.

20

El "marcador de detección de repeticiones" es proporcional al número de repeticiones de multinucleótido en la región de repetición de multinucleótido del ácido nucleico diana.

25

En algunas realizaciones, el "marcador de detección de repeticiones" está presente en un cebador de repetición específica utilizado en la amplificación del ácido nucleico diana.

En algunas realizaciones, el "marcador de detección de repeticiones" está presente en los nucleótidos utilizados en la amplificación del ácido nucleico diana para producir los ácidos nucleicos diana amplificados.

30

En algunas realizaciones, el "marcador de detección de repeticiones" está presente en las sondas que se unen específicamente a repeticiones de multinucleótido en los ácidos nucleicos diana amplificados. Por ejemplo, las sondas que se unen específicamente a repeticiones de multinucleótido en los ácidos nucleicos diana amplificados son sondas de ácido nucleico que tienen una secuencia de ácido nucleico complementaria de acuerdo con realizaciones de la presente invención.

35

El término "marcador" se refiere a una sustancia que se puede medir y/u observar, visualmente o mediante cualquier método directo o indirecto adecuado que de forma ilustrativa incluye, pero no está limitado a, métodos de detección espectroscópicos, ópticos, fotoquímicos, bioquímicos, enzimáticos, eléctricos y/o inmunoquímicos, para indicar la presencia del marcador. Los ejemplos no limitantes de marcadores que se pueden utilizar junto con los métodos descritos en este documento incluyen de manera ilustrativa un resto fluorescente, un resto quimioluminiscente, un resto bioluminiscente, una partícula magnética, una enzima, un sustrato, un radioisótopo y un cromóforo.

40

Por ejemplo, se pueden marcar nucleótidos, análogos de nucleótidos y/o cebadores con un colorante, tal como un fluoróforo, un cromóforo, un resto radiactivo o un miembro de un par de unión específica tal como biotina. El término "miembro de un par de unión específica" se refiere a una sustancia que reconoce e interactúa específicamente con una segunda sustancia ejemplificada por pares de unión específica tales como biotina-avidina, biotina-estreptavidina, anticuerpo-antígeno, y diana-aptámero. Los ejemplos no limitantes de marcadores que se pueden usar incluyen colorantes fluorescentes tales como fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, isotiocianato de rodamina, Texas Red, colorantes de cianina tales como Cyanine 3 y Cyanine 5, y colorantes ALEXA; cromóforos tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y digoxigenina; y restos radioactivos tales como ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{125}I o ^{14}C ; y parejas de unión tales como biotina y derivados de biotina. Los métodos para el marcaje detectable de nucleótidos, análogos de nucleótidos y/o cebadores son muy conocidos en la técnica.

45

50

55

Se pueden incluir nucleótidos, incluyendo, pero no limitado a, desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) y sus análogos, marcados o no marcados, en cebadores y/o mezclas de reacción de amplificación según los métodos descritos en el presente documento. El término "análogo de nucleótido" en este contexto se refiere a un nucleótido de origen no natural o modificado, en particular análogos de nucleótidos que se pueden polimerizar con nucleótidos de origen

natural o nucleótidos de origen no natural mediante amplificación de un ácido nucleico dirigida por un molde catalizada por un ácido nucleico polimerasa. Los análogos de nucleótidos son muy conocidos en la técnica. Los análogos de nucleótidos particulares son capaces de formar emparejamientos de Watson-Crick mediante enlaces de hidrógeno con un nucleótido complementario y de forma ilustrativa incluyen, pero no están limitados a, los que contienen un análogo de una base de nucleótidos tales como purinas o pirimidinas sustituidas, deazapurinas, metilpurinas, metilpirimidinas, aminopurinas, aminopirimidinas, tiopurinas, tiopirimidinas, indoles, pirroles, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, 7-metiltransferasa, hipoxantina, pseudocitosina, pseudoisocitosina, isocitosina, isoguanina, 2-tiopirimidinas, 4-tiotimina, 6-tioguanina, nitropirrol, nitroindol, y 4-metilindol. Los análogos de nucleótidos incluyen los que contienen un análogo de una desoxirribosa tal como una desoxirribosa sustituida, una arabinosa sustituida o no sustituida, una xilosa sustituida o no sustituida o, y una piranosa sustituida o no sustituida. Los análogos de nucleótidos incluyen los que contienen un análogo de un éster de fosfato tales como fosforotioatos, fosforditioatos, fosforamidatos, fosforoselenoatos, fosforoanilotoatos, fosforoanilidatos, fosforamidatos, boronofosfatos, fosfotriésteres, y alquilfosfonatos tales como metilfosfonatos.

15 SONDAS DE CAPTURA

Una sonda de captura específica para el ácido nucleico amplificado está presente sobre un sustrato sólido o semi-sólido para la unión del ácido nucleico amplificado al sustrato. Las sondas de captura pueden estar en cualquier forma que permita la unión al sustrato y la captura específica del ácido nucleico amplificado.

De acuerdo con algunas realizaciones, las sondas de captura son ácidos nucleicos que incluyen una secuencia de ácido nucleico complementaria a los ácidos nucleicos diana amplificados. Las sondas de captura unidas a un sustrato pueden ser ácidos nucleicos de cadena sencilla y/o de doble cadena. En realizaciones particulares, en las que las sondas de captura de ácidos nucleicos de doble cadena están unidas al sustrato, se desnaturalizan y hacen monocatenarias después de la inmovilización al sustrato para su preparación para el uso en ciertas realizaciones de métodos de ensayo. Opcionalmente, las sondas de ácidos nucleicos de doble cadena se desnaturalizan antes de la inmovilización y los ácidos nucleicos de cadena sencilla se unen entonces al sustrato.

El término "complementario" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a emparejamientos de bases de Watson-Crick entre los nucleótidos y, específicamente, se refiere a los nucleótidos con enlaces de hidrógeno entre sí con restos de timina o uracilo unidos a restos de adenina por dos enlaces de hidrógeno y restos de citosina y guanina unidos por tres enlaces de hidrógeno. En general, un ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos descrita como que tiene un "porcentaje de complementariedad" a una segunda secuencia de nucleótidos especificada. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos puede tener el 80 %, 90 %, o 100 % de complementariedad con una segunda secuencia de nucleótidos especificada, lo que indica que 8 de cada 10, 9 de cada 10 o 10 de cada 10 nucleótidos de una secuencia son complementarios a la segunda secuencia de nucleótidos especificada. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos 3'-TCGA-5' es 100 % complementaria a la secuencia de nucleótidos 5'-AGCT-3'. Además, la secuencia de nucleótidos 3'-TCGA- es 100 % complementaria, o completamente complementaria, a una región de la secuencia de nucleótidos 5'-TTAGCTGG-3'. La determinación de las condiciones de hibridación particulares relativas a un ácido nucleico especificado es rutinaria y es muy conocida en la técnica, por ejemplo, como se describe en J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3ª Ed., 2001; y F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5ª Ed., 2002. Las condiciones de hibridación muy rigurosas son aquellas que solo permiten la hibridación de ácidos nucleicos sustancialmente complementarios. Normalmente, los ácidos nucleicos que tienen del 85 al 100 % de complementariedad aproximadamente se consideran altamente complementarios y se hibridan en condiciones muy rigurosas. Las condiciones de rigurosidad intermedia están ejemplificadas por condiciones en las que se hibridan ácidos nucleicos que tienen una complementariedad intermedia, una complementariedad del 50-84 % aproximadamente, así como las que tienen un alto grado de complementariedad. Por el contrario, las condiciones de hibridación poco rigurosas son aquellas en las que se hibridan ácidos nucleicos que tienen un bajo grado de complementariedad. Los términos "hibridación específica" y "se hibrida específicamente" se refieren a la hibridación de un ácido nucleico particular a un ácido nucleico complementario sin hibridación sustancial a los ácidos nucleicos que no sean el ácido nucleico complementario en una muestra.

SUSTRATOS

Un sustrato sólido, que incluye un sustrato semi-sólido, para la fijación de una sonda de captura puede ser cualquiera de diversos materiales tales como vidrio; plástico, tal como polipropileno, poliestireno, nailon; papel; silicio; nitrocelulosa; o cualquier otro material al que se pueda unir un ácido nucleico para su uso en un ensayo. El sustrato puede estar en cualquiera de varias formas o estructuras, incluyendo planas, tales como chips de silicio y

placas de vidrio; y tridimensionales, tales como partículas, placas de microtitulación, pocillos de microtitulación, pasadores, fibras y similares.

Un sustrato al que se une una sonda de captura se codifica de acuerdo con formas de realización de los métodos y composiciones de la presente invención. Los sustratos codificados se pueden distinguir entre sí en base a una característica que de forma ilustrativa incluye una propiedad óptica tal como el color, el índice de reflexión y/o un patrón impreso o detectable ópticamente de otra manera. Por ejemplo, los sustratos se pueden codificar usando marcadores ópticos, químicos, físicos o electrónicos.

10 En aspectos particulares, un sustrato sólido al que se le une una sonda de captura es una partícula.

Las partículas a las que se le une una sonda de captura puede ser cualquier partícula sólida o semi-sólida que sea estable e insoluble durante su uso, como por ejemplo en condiciones de hibridación y detección de marcadores. Las partículas pueden ser de cualquier forma, tal como cilíndrica, esférica, etc.; tamaño, tales como micropartículas y nanopartículas; composición; y tener diferentes características fisicoquímicas. El tamaño o la composición de la partícula se pueden seleccionar de modo que la partícula se pueda separar del fluido, por ejemplo, sobre un filtro con un tamaño de poro particular o por alguna otra propiedad física, por ejemplo, una propiedad magnética.

Las micropartículas utilizadas, tales como microcuentas, pueden tener un diámetro de menos de un milímetro, por ejemplo, un tamaño que varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1000 micrómetros de diámetro, inclusive, tal como de 3-25 micras de diámetro aproximadamente, inclusive, o de 5-10 micras de diámetro aproximadamente, inclusive. Las nanopartículas utilizadas, tales como nanocuentas, pueden tener un diámetro de 1 nanómetro (nm) aproximadamente a 100.000 nm de diámetro aproximadamente, inclusive, por ejemplo, un tamaño que varía de 10-1000 nm aproximadamente, inclusive, o por ejemplo, un tamaño que varía de 200-500 nm, inclusive.

25 En ciertas realizaciones, las partículas usadas son cuentas, en particular microcuentas y nanocuentas.

Las partículas, de forma ilustrativa, son partículas orgánicas o inorgánicas, tales como vidrio o metal y pueden ser partículas de un polímero sintético o de origen natural, tal como poliestireno, policarbonato, silicona, nailon, celulosa, agarosa, dextrano y poliacrilamida. Las partículas son cuentas de látex en realizaciones particulares.

30 Las partículas usadas incluyen grupos funcionales para la fijación de sondas de captura de ácido nucleico en realizaciones particulares. Por ejemplo, las partículas pueden incluir grupos funcionales carboxilo, amina, amino, carboxilato, haluro, éster, alcohol, carbamida, aldehído, clorometilo, óxido de azufre, óxido de nitrógeno, epoxi y/o tosilo. Los grupos funcionales de las partículas, sus modificaciones y la unión de un resto químico a la misma, tal como un ácido nucleico, se conocen en la técnica, por ejemplo como se describe en Fitch, R.M., Polymer Colloids: A Comprehensive Introduction, Academic Press, 1997. La patente de Estados Unidos n.º 6.048.695 describe un método ejemplar para la fijación de sondas de captura de ácidos nucleicos a un sustrato, tales como partículas. En un ejemplo particular adicional, se puede utilizar la química del clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida, EDC o EDAC, para unir sondas de captura de ácidos nucleicos a las partículas.

40 Las partículas a las que se une una sonda de captura son partículas codificadas de acuerdo con las realizaciones de los métodos y composiciones de la presente invención. Las partículas codificadas son partículas que se pueden distinguir de otras partículas en base a una característica ilustrativa, incluyendo una propiedad óptica tal como el color, el índice de reflexión y/o un patrón impreso u ópticamente detectable de otra manera. Por ejemplo, las partículas se pueden codificar usando marcadores ópticos, químicos, físicos o electrónicos. Las partículas codificadas pueden contener o estar unidas a uno o más fluoróforos que se pueden distinguir, por ejemplo, por la longitud de onda de excitación y/o emisión, la intensidad de emisión, el tiempo de vida del estado excitado o una combinación de estas u otras características ópticas. Se pueden utilizar códigos de barras ópticos para codificar partículas.

50 En realizaciones particulares, el código está incrustado, por ejemplo, en el interior de la partícula, o unido de otro modo a la partícula de forma que sea estable mediante hibridación y análisis. El código se puede proporcionar por cualquier medio detectable, tal como por codificación holográfica, por una propiedad de fluorescencia, color, forma, tamaño, emisión de luz, emisión de puntos cuánticos y similares para identificar las partículas y por lo tanto las sondas de captura inmovilizadas a la misma. En algunas realizaciones, el código es distinto del proporcionado por un ácido nucleico.

Una plataforma ejemplar utiliza mezclas de colorantes fluorescentes impregnados en partículas de polímero como medios para identificar cada miembro de un grupo de partículas al cual se ha inmovilizado una sonda de captura

específica. Otra plataforma a modo de ejemplo utiliza códigos de barras holográficas para identificar partículas de vidrio cilíndricas. Por ejemplo, Chandler et al. (Patente de Estados Unidos n.º 5.981.180) describe un sistema a base de partículas en las que diferentes tipos de partículas son codificadas por mezclas de diversas proporciones de dos o más colorantes fluorescentes impregnados en partículas de polímero. Soini (Patente de Estados Unidos n.º 5.028.545) describe un sistema de ensayo de multiplexado a base de partículas que emplea fluorescencia resuelta en el tiempo para la identificación de partículas. Fulwyler (Patente de Estados Unidos n.º 4.499.052) describe un método de ejemplo para el uso de partículas que se distinguen por el color y/o el tamaño. Las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos 2004/0179267, 2004/0132205, 2004/0130786, 2004/0130761, 2004/0126875, 2004/0125424 y 2004/0075907 describen partículas ejemplares codificadas por códigos de barras holográficos. La patente de Estados Unidos n.º 6.916.661 describe micropartículas poliméricas que están asociadas a nanopartículas que tienen colorantes que proporcionan un código para las partículas.

Si bien una forma de realización que se describe en detalle en este documento utiliza la plataforma de cuentas codificadas con Luminex, se pueden utilizar otros tipos de plataformas de ensayo de partículas codificadas, tales como las cuentas de Veracode y el sistema BeadXpress (Illumina Inc., San Diego CA), xMAP 3D (Luminex) y similares. Se pueden utilizar cuentas magnéticas Luminex que permiten realizar etapas de lavado con imanes de placa y pipeteo en lugar de con placas de filtro y un colector de vacío. Cada una de estas plataformas normalmente se proporciona en forma de cuentas de carboxilo pero también puede estar configurada para incluir una química de acoplamiento diferente, tal como amino-silano.

Las partículas normalmente se evalúan individualmente para detectar la codificación. Por ejemplo, las partículas se pueden pasar a través de un citómetro de flujo. Citómetros de flujo de ejemplo incluyen el citómetro de flujo Coulter Elite-ESP, o FACScan™. El citómetro de flujo disponible en Beckman Coulter, Inc. (Fullerton Calif.) y el citómetro de flujo MOFLO™ disponible en Cytomation, Inc., Fort Collins, Colorado. Además de la citometría de flujo, como instrumento para separar y clasificar las partículas se puede utilizar una centrífuga. Un sistema adecuado es el descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.926.387. Además de la citometría de flujo y la centrifugación, se puede utilizar un aparato de electroforesis de flujo libre como instrumento para separar y clasificar las partículas. Un sistema adecuado es el descrito en la patente de Estados Unidos n.º 4.310.408. Las partículas también se pueden colocar sobre una superficie y se pueden escanear o crear una imagen.

Se proporcionan ensayos de acuerdo con realizaciones de la presente invención usando más de un tipo de partículas codificadas. En realizaciones particulares, se proporciona un "grupo de partículas" en el que cada partícula del grupo de partículas está codificada con el mismo código de tal manera que cada partícula de un grupo de partículas se puede distinguir de cada partícula de otro "grupo de partículas". En otras realizaciones, se pueden utilizar dos o más códigos para un único grupo de partículas. Cada partícula puede incluir un código único, por ejemplo. En ciertas realizaciones, la codificación de partículas incluye un código distinto o además de la asociación de una partícula y una sonda de captura de ácido nucleico específica para un ácido nucleico diana.

Se pueden utilizar métodos que incluyen dos o más grupos de partículas en formatos de ensayo multiplex o separados.

UNIÓN DE SONDAS DE CAPTURA AL SUSTRATO

La unión de las sondas de captura de ácido nucleico a un sustrato se consigue mediante cualquiera de los diversos métodos eficaces para unir un ácido nucleico a un sustrato sólido o semi-sólido, que de forma ilustrativa incluye adsorción y unión química. Los ácidos nucleicos pueden estar unidos directamente al material de las partículas codificadas o indirectamente unidos a las partículas codificadas, por ejemplo, mediante la unión a un recubrimiento o grupo de enlace dispuesto sobre las partículas. Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar, y/o modificarse una vez sintetizados, para que incluyan un grupo funcional para su uso en la unión de los ácidos nucleicos a las partículas. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos utilizadas como sondas pueden incluir grupos funcionales carboxilo, amina, amino, carboxilato, haluro, éster, alcohol, carbamida, aldehído, clorometilo, óxido de azufre, óxido de nitrógeno, epoxy y/o tosilo.

En realizaciones particulares de ensayos descritos en el presente documento, los ácidos nucleicos diana amplificadas son capturados por las sondas de captura unidas a las partículas codificadas por hibridación.

Los términos "hibridación" y "hibridado" se refieren al emparejamiento y unión de los ácidos nucleicos complementarios. La hibridación se produce en diversos grados entre dos ácidos nucleicos, dependiendo de factores tales como el grado de complementariedad de los ácidos nucleicos, la temperatura de fusión, T_m , de los ácidos

nucleicos y la rigurosidad de las condiciones de hibridación, como es bien conocido en la técnica. El término "rigurosidad de las condiciones de hibridación" se refiere a las condiciones de temperatura, concentración iónica, y composición de un medio de hibridación con respecto a determinados aditivos comunes tales como la formamida y la solución de Denhardt.

5

AMPLIFICACIÓN

La amplificación de un ácido nucleico diana se consigue utilizando un método de amplificación *in vitro*. El término "método de amplificación" se refiere a un método para la copia de un ácido nucleico diana molde, produciendo de este modo los ácidos nucleicos que incluyen copias de todo o de una parte del ácido nucleico diana molde.

10

Los métodos de amplificación incluidos en realizaciones de la presente invención son aquellos que incluyen la extensión del cebador dirigida por molde catalizada por una polimerasa de ácido nucleico utilizando un par de cebadores flanqueadores del ácido nucleico diana, que de forma ilustrativa incluye, pero no está limitado a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR de transcripción inversa (RT-PCR), PCR mediada por ligación (LM-PCR), PCR phi-29, y otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, como se describe en C.W. Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003; y V. Demidov et al., DNA Amplification: Current Technologies and Applications, Taylor & Francis, 2004.

15

Los términos "ácido nucleico amplificado" y "ADN amplificado", así como sus plurales se refieren al producto de un proceso de copia de un molde de ácido nucleico diana.

20

CEBADORES

El término "cebador" se refiere a un ácido nucleico oligonucleótido que es capaz de actuar como sitio de iniciación de la síntesis de un producto de extensión del cebador dirigida por molde en condiciones de reacción apropiadas. Un cebador de oligonucleótido normalmente tiene una longitud de 10 a 30 nucleótidos contiguos aproximadamente y puede ser más largo o más corto. Un cebador de oligonucleótido es completa o sustancialmente complementario a una región de un ácido nucleico molde de forma que, en condiciones de hibridación, el cebador del oligonucleótido se hibrida con la región complementaria del ácido nucleico molde. Las condiciones de reacción apropiadas para la síntesis de un producto de extensión del cebador incluyen la presencia de componentes de reacción adecuados, incluyendo, pero no limitado a, una polimerasa y nucleótidos trifosfato. El diseño de cebadores de oligonucleótidos adecuados para su uso en reacciones de amplificación es bien conocido en la técnica, por ejemplo como se describe en A. Yuryev et al., PCR Primer Design, Humana Press, 2007.

35

El diseño de cebadores para la amplificación de un ácido nucleico diana es bien conocido por los expertos en la materia. Los cebadores para la amplificación de un ácido nucleico diana se diseñan de acuerdo con métodos y criterios muy conocidos. Por ejemplo, la temperatura de hibridación de los cebadores debe ser aproximadamente la misma, en el intervalo de unos pocos grados, los cebadores no deben formar dímeros entre sí y los cebadores no deben formar estructuras secundarias, tales como horquillas. Los métodos y consideraciones para los procedimientos de diseño de cebadores y amplificación se describen en detalle en Yuryev, A., PCR Primer Design, Methods in Molecular Biology, vol. 42, Humana Press, 2007; C.W. Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003; y V. Demidov et al., DNA Amplification: Current Technologies and Applications, Taylor & Francis, 2004.

40

Los ácidos nucleicos amplificados opcionalmente contienen materiales adicionales tales como, pero no limitados a, secuencias de ácido nucleico, grupos funcionales para la reacción químicas y marcadores detectables, presentes en los cebadores y no presentes en el molde de ADN original. Dichos materiales derivados de cebadores añaden funcionalidad, tales como sitios de unión de cebadores para reacciones de amplificación adicionales y/o un grupo funcional para la unión química a un sustrato.

50

En realizaciones de la presente invención, un par de cebadores utilizados en la amplificación incluye cebadores flanqueadores de una región de repetición de multinucleótido, es decir, uno de los cebadores presenta una secuencia de nucleótidos complementaria a una región del ácido nucleico diana aguas arriba de la región de repetición de multinucleótido y un segundo cebador de la pareja de cebadores tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una región del ácido nucleico diana aguas abajo de la región de repetición de multinucleótido. Dichos cebadores se denominan "cebadores puente" en el presente documento. En la técnica se conocen numerosos pares de cebadores puente diseñados para amplificar un ácido nucleico diana que contiene una repetición de multinucleótido y flanqueadora de la región de repetición de multinucleótido, cualquiera de los cuales

55

que se puede utilizar junto con los métodos y composiciones de la presente invención. Como alternativa, los cebadores puente se pueden diseñar y utilizar solo con experimentación rutinaria.

Los cebadores puente a modo de ejemplo y su uso para amplificar un ácido nucleico diana que incluye una región de repetición de multinucleótido se describen en los Ejemplos que se detallan en este documento.

Los cebadores puente para amplificar un ácido nucleico diana que incluye una región de repetición de multinucleótido presente en el gen FMR1 se describen en Wilson, JA et al., J. Molec. Diagnostics, 10(1):2-12, 2008 e incluyen: 1) el cebador directo 5'-GGAACAGCGTTGATCACGTGACGTGGTTTC-3' (SEQ ID No. 1); el cebador
 10 inverso 5'-GGGGCCTGCCCTAGAGCCAAGTACCTTGT-3' (SEQ ID No. 2) (Chong, SS. et al., Am. J. Med. Genet., 1994, 51:522-526.); 2) el cebador directo 5'-GACGGAGGCGCCCGTGCCAGG-3' (SEQ ID No. 3); el cebador inverso 5'-TCCTCCATCTTCTTTCAGCCCT-3' (SEQ ID No. 4) (Pergolizzi, RG. et al., Lancet, 1992, 339:271-272); 3) el cebador directo 5' TGACGGAGGCGCCGCTGCCAGGGGGCGTGC-3' (SEQ ID No. 5); el cebador inverso 5'-GAGAGGTGGGCTGCGGGCGCTCGAGGCCCA-3' (SEQ ID No. 6) (Wang Q., et al., J. Med Genet., 1995, 32:170-
 15 173.); 4) el cebador directo 5'-AGGCGCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTC-3' (SEQ ID No. 7); el cebador inverso 5'-GTGGGCTGCGGGCGCTCGAGG-3' (SEQ ID No. 8) (Tarlton, J., Neurogenetics: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, v. 217, Potter, N., Ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2003), pp 29-39.); 5) el cebador directo 5'-GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT-3' (SEQ ID No. 9); el cebador inverso 5'-AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA-3' (SEQ ID No. 10) (Verkerk, AJ. et al., Cell, 1991, 65:905-914; Fu,
 20 YH et al., Cell, 1991, 67:1047-1058.); 6) el cebador directo 5'-GACGGAGGCGCCGCTGCCAGG-3' (SEQ ID No. 11); el cebador inverso 5'-GTGGGCTGCGGGCGCTCGAGG-3' (SEQ ID No. 12) (Verkerk, AJ. et al., Cell, 1991, 65:905-914.); y 7) el cebador directo 5'-GTGACGGAGGCGCCGCTGCCA-3' (SEQ ID No. 13); el cebador inverso 5'-AGCTCCTCCATCTTCTTTCAGCCCTGCTA-3'(SEQ ID No. 14) (Fu, YH et al., Cell, 1991, 67:1047-1058).

25 En realizaciones de la presente invención, un par de cebadores utilizados en la amplificación incluye un cebador puente y un cebador de repetición específica. El cebador puente tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una región del ácido nucleico diana aguas arriba de la región de repetición de multinucleótido o complementaria a una región del ácido nucleico diana aguas abajo de la región de repetición de multinucleótido. El cebador de repetición específica tiene una secuencia de nucleótidos complementaria a una parte de la región de repetición de
 30 multinucleótido del ácido nucleico diana. En este documento se describen pares de cebadores de ejemplo que incluyen un cebador puente y un cebador de repetición específica. Como alternativa, dichos cebadores se pueden diseñar y utilizarse solo con experimentación rutinaria.

En una realización, el método supone la amplificación de la molécula de ácido nucleico diana usando un par de
 35 cebadores puente diana, en el que un cebador contiene un marcador de detección de dianas; la hibridación de la molécula de ADN diana amplificada a un grupo de partículas codificadas, las partículas que comprenden una molécula de captura selectiva para la molécula de ácido nucleico diana amplificado; la detección de una señal producida por el marcador de detección de dianas; la amplificación de segmentos de la región de repetición de multinucleótido usando un par de cebadores de repetición específica, en el que un cebador del par de cebadores de
 40 repetición específica es específico para el motivo de repetición de multinucleótido, y el otro cebador del par de cebadores de repetición específica es específico para una secuencia de una molécula de ácido nucleico diana fuera de la región de repetición de multinucleótido y contiene un marcador de detección de repeticiones, para producir moléculas de ácido nucleico de repetición específica amplificado; y la hibridación de las moléculas de ácido nucleico de repetición específica amplificado a un grupo de partículas codificadas, las partículas que comprenden una
 45 molécula de captura selectiva para las moléculas de ácido nucleico de repetición específica amplificado; la detección de una señal producida por el marcador de detección de repeticiones; la determinación de una relación de señales producidas por el marcador de detección de dianas y el marcador de detección de repeticiones; la determinación de la longitud de la región de repetición de multinucleótido en base a la relación determinada.

50 Como se describe en el presente documento a continuación, también se hibridaron a las moléculas de ADN diana amplificado una o más sondas detectoras de repeticiones, que contienen un marcador de detección de repeticiones. Las moléculas de la sonda detectora de repeticiones son complementarias a la región de repetición (es decir, el motivo de repetición de multinucleótido) y por lo tanto una pluralidad de sondas detectoras de repeticiones se puede hibridar a la región de repetición. Las sondas detectoras de repeticiones se pueden hibridar con las moléculas de
 55 ADN diana amplificado junto con o después de que las moléculas de ADN diana amplificado hayan sido capturadas por las partículas.

En otra realización, el método para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido presente en una molécula de ácido nucleico diana supone la amplificación de la molécula de ácido nucleico diana usando un par

de cebadores puente diana, en el que un cebador contiene un marcador de detección de dianas; la hibridación de una primera parte de las moléculas de ácido nucleico diana amplificado a un primer grupo de partículas codificadas, las partículas que incluyen una molécula de captura selectiva para las moléculas de ácido nucleico diana amplificado; la detección de una señal producida por el marcador de detección de dianas; la hibridación de una
 5 segunda parte de las moléculas de ácido nucleico diana amplificado con una sonda detectable específica para el motivo de repetición de multinucleótido y un segundo grupo de partículas codificadas, las partículas que incluyen una molécula de captura selectiva para las moléculas de ADN diana amplificado; la detección de una señal producida por la sonda (es decir, la sonda de detección de repeticiones que contiene el marcador de detección de repeticiones); la determinación de una relación de señales producidas por el marcador de detección de dianas y la sonda; y
 10 determinar la longitud de la región de repetición de multinucleótido en base a la relación determinada.

En una realización adicional, el método para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido presente en una molécula de ácido nucleico diana supone la amplificación de la molécula de ácido nucleico diana usando un par de cebadores puente diana, en el que un cebador contiene un marcador de detección de dianas, en
 15 presencia de al menos un tipo de desoxinucleótido que comprende un marcador de detección de repeticiones; la hibridación de la molécula de ácido nucleico diana amplificado a un grupo de partículas codificadas, las partículas que comprenden una molécula de captura selectiva para la molécula de ácido nucleico diana amplificado, y la detección de una señal producida por el marcador de detección de dianas. El método además puede incluir la detección de una señal producida por el marcador de detección de repeticiones; la determinación de una relación de
 20 señales producidas por el marcador de detección de dianas y el marcador de detección de repeticiones; y determinar la longitud de la región de repetición de multinucleótido en base a la relación determinada. Hay un marcador de detección de repeticiones sobre una sonda específica detectable para el motivo de repetición de multinucleótido.

En una realización, el método supone la amplificación de la molécula de ácido nucleico diana usando un par de
 25 cebadores puente diana, en presencia de desoxinucleótido que comprende un marcador de detección de repeticiones, en el que un cebador del par contiene un marcador de detección de dianas, la unión de la molécula de ADN diana amplificada a un grupo de partículas codificadas, cada partícula que comprende un elemento de unión selectivo para la repetición de multinucleótido de la molécula de ácido nucleico diana amplificado; la detección de una señal que corresponde a una cantidad del marcador de detección de dianas presente en moléculas de ácido
 30 nucleico diana amplificado que están unidas a partículas; la detección de una señal correspondiente a una cantidad del marcador de detección de repeticiones presente en las moléculas de ácido nucleico diana amplificado unidas a las partículas; determinar una relación de las señales del marcador de detección de dianas y el marcador de detección de repeticiones; y determinar la longitud de la región de repetición de multinucleótido en base a la relación determinada.

35 En otra realización, el método supone la amplificación de la molécula de ácido nucleico diana usando un par de cebadores puente diana, en presencia de desoxinucleótido que comprende un marcador de detección de repeticiones, en el que un cebador del par contiene un marcador de detección de dianas, la unión de la molécula de ADN diana amplificada a un grupo de partículas codificadas, cada partícula que comprende un elemento de unión
 40 selectivo para la molécula de ácido nucleico diana amplificado; la puesta en contacto de una porción del ácido nucleico diana amplificado unido a partículas con un informador que hace detectable el marcador de detección de dianas; la detección de una señal que corresponde a una cantidad del marcador de detección de dianas presente en moléculas de ácido nucleico diana amplificado que están unidas a partículas; la puesta en contacto de otra porción de las moléculas de ácidos nucleicos diana amplificadas unidas a partículas con un informador que hace detectable
 45 el marcador de detección de repeticiones; la detección de una señal correspondiente a una cantidad del marcador de detección de repeticiones presente en las moléculas de ácido nucleico diana amplificado unidas a las partículas; determinar una relación de las señales del marcador de detección de dianas y el marcador de detección de repeticiones; y determinar la longitud de la región de repetición de multinucleótido en base a la relación determinada. Un ejemplo de implementación de este método se ilustra en la Fig. 11. En este ejemplo específico, el elemento de
 50 unión selectivo para la molécula de ácido nucleico diana amplificado está presente en la región de repetición de multinucleótido. También se pueden utilizar otras porciones de una molécula de ácido nucleico diana amplificado.

Los métodos descritos en el presente documento suponen el uso de partículas codificadas para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido presente en una molécula de ácido nucleico diana. En una
 55 realización, la determinación se basa tanto en el número o cantidad relativa de moléculas de ácido nucleico diana amplificado como en el número o cantidad relativa de repeticiones multinucleótido dentro de la molécula de ácido nucleico amplificado. El número o cantidad relativa de moléculas de ácido nucleico diana amplificado y el número de repeticiones de multinucleótido se pueden determinar usando grupos independientes de ácidos nucleicos amplificados como se ilustra en la Figura 1A, o se puede determinar a partir de una reserva común de ácido nucleico

diana amplificado, como se ilustra en las Figuras 1B y 11. Los métodos se pueden desarrollar utilizando diversas estrategias, que el usuario puede seleccionar en función, por ejemplo, del formato de ensayo y las preferencias del marcador detectable o los requisitos impuestos por la instrumentación disponible.

5 La Figura 13 ilustra una forma de realización de los métodos descritos en este documento en el que un ácido nucleico diana que contiene una región de repetición de multinucleótido (el marcaje "repeticiones CGG" se amplifica usando un par de cebadores puente, en el que uno del par tiene un marcador de detección de dianas). En este caso el marcador de detección de dianas es un marcador de fluoresceína. Después de la amplificación, el marcador de detección de dianas se incorpora a los ácidos nucleicos amplificados, como se ilustra.

10

Los ácidos nucleicos amplificados se unen a las partículas codificadas mediante su hibridación con sondas de captura de ácido nucleico complementarias y el grupo de partículas resultante se divide en dos partes.

Una primera parte se une a sondas de detección de repeticiones, en este caso por hibridación específica con oligonucleótidos marcados que tienen una secuencia complementaria a una parte de la región de repetición de multinucleótido. Los oligonucleótidos marcados en este caso con biotina son el marcador de detección de repeticiones. Se utiliza un informador de estreptavidina para detectar el marcador y generar una primera señal.

15

Una segunda parte se une a un informador específico para el marcador de detección de dianas de fluoresceína, en este caso un anticuerpo dirigido contra fluoresceína, y generar una segunda señal.

20

La señal procedente del marcador de detección de repeticiones se compara con la señal detectada procedente del marcador de detección de dianas para determinar la longitud de la región de repetición de multinucleótido.

25 Los métodos descritos en este documento suponen la amplificación de moléculas de ADN. La amplificación se puede realizar utilizando cualquier técnica de amplificación de polinucleótidos adecuada. En el presente documento se describe la reacción en cadena de la polimerasa, y se pueden adaptar otros métodos de amplificación publicados para su uso con los métodos descritos en el presente documento.

30 Los métodos descritos en este documento suponen la detección de marcadores. En la puesta en práctica de los métodos descritos se puede utilizar cualquiera de una variedad de marcadores y sus modos de detección complementarios. Los ejemplos siguientes describen el uso del marcador fluorescente ficoeritrina junto con un lector de fluorescencia de un instrumento Luminex 200, aunque podrían utilizarse otras plataformas de lectura de ensayo tales como la Illumina BeadExpress, microplacas, microarrays, etc. con sus marcadores apropiados. Las plataformas que utilizan 2 o más marcadores podrían llevar a cabo el ensayo sin necesidad de dividir el producto de ensayo intermedio en dos recipientes antes de la lectura, como requieren los ejemplos de Luminex de un solo marcador incorporados en este documento.

35

Para detectar un marcador en un ensayo descrito en el presente documento se utiliza cualquier método apropiado, que de forma ilustrativa incluye métodos espectroscópicos, ópticos, fotoquímicos, bioquímicos, enzimáticos, eléctricos y/o inmunquímicos. La relación de la primera señal a la segunda señal se puede determinar por métodos manuales, mecanizados o automatizados y la relación resultante es indicativa de la longitud de la repetición de multinucleótido en el ácido nucleico diana.

40

Se proporciona un método de ensayo de una muestra de ácido nucleico que incluye dos o más grupos de partículas codificadas de tal manera que cada partícula de cada grupo de partículas codificadas se puede distinguir de forma detectable de cada partícula de cada uno de los otros grupos de partículas codificadas. Las partículas codificadas de un primer grupo de partículas incluyen sondas de captura que capturan específicamente ácidos nucleicos diana amplificados correspondientes a un ácido nucleico diana que contiene una primera región de repetición de multinucleótido unida. Las partículas codificadas de un segundo grupo de partículas incluyen sondas de captura que capturan específicamente ácidos nucleicos diana amplificados correspondientes a un ácido nucleico diana que contiene una segunda región de repetición de multinucleótido unida.

50

Los métodos descritos se pueden realizar en cualquier recipiente adecuado. En realizaciones particulares, por ejemplo, cuando se han de someter a ensayo múltiples muestras, se puede utilizar un recipiente de varias cámaras. Los recipientes de varias cámaras incluyen de forma ilustrativa sustratos multi-depresión, tales como portas, chips o cubetas de silicio. En algunas formas de realización, cada muestra se dispone en un pocillo diferente de una placa multi-pocillos. Por ejemplo, una placa multi-pocillos puede ser una placa de ensayo de 96 pocillos, 384 pocillos, 864 pocillos o 1536 pocillos.

55

Se proporcionan kits para la determinación de la longitud de repeticiones de multinucleótido en un ácido nucleico diana. En realizaciones particulares, se proporciona un kit que incluye un grupo de partículas codificadas y/o una mezcla de dos o más grupos de partículas codificadas, en el que cada grupo de partículas incluye sondas de captura
 5 anexas específicas para un ácido nucleico diana. Opcionalmente se incluye en el kit un material con instrucciones para el uso del grupo de partículas codificadas y/o reactivo múltiplex que incluye dos o más grupos de partículas codificadas. Opcionalmente también se incluye un reactivo auxiliar tal como tampones, enzimas, soluciones de lavado, soluciones de hibridación, marcadores detectables, reactivos de detección y similares.

10 Se proporcionan composiciones de ensayo de acuerdo con las realizaciones descritas en este documento que incluyen ácidos nucleicos diana amplificados que contienen una región de repetición de multinucleótido, los ácidos nucleicos diana amplificados que incluyen un primer marcador y un segundo marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido y el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido, en el que el primer y segundo marcadores se incorporaron cada uno de forma
 15 independiente en los ácidos nucleicos diana amplificados durante la amplificación, y en el que los ácidos nucleicos diana amplificados se unen a una sonda de captura específica para los ácidos nucleicos diana amplificados.

Las composiciones y kits descritos en este documento son útiles, por ejemplo, en la realización de métodos para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido sustancialmente como se describe en el
 20 presente documento.

Las realizaciones de composiciones y métodos de la invención se ilustran en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no se consideran limitaciones sobre el alcance de las composiciones y métodos de la invención.

25 **Ejemplo 1**

En un método de ejemplo, la muestra de ADN **1** se divide en dos alícuotas, cada una de las cuales se procesa independientemente por el ensayo hasta que los datos fluorescentes de cada trayectoria se procesan para generar
 30 una o más relaciones. Un primer proceso de una alícuota de la muestra **1** se inicia con la amplificación por PCR del cebador de repetición específica **3**. El par de cebadores de repetición específica **2** incluye un cebador que se hibrida con el ADN diana fuera de la región de repetición de multinucleótido y un segundo cebador que se hibrida con una pluralidad de regiones dentro de la región de repetición. El cebador no de repetición en este ejemplo está marcado terminalmente para facilitar la detección subsiguiente de las moléculas del producto de la PCR. En este caso, el
 35 marcador terminal es la biotina. El producto de reacción en este escenario es una población heterogénea de ácidos nucleicos marcados terminalmente que contienen un número variable de motivos de repetición de multinucleótido. Más adelante en el proceso, la biotina se une a estreptavidina marcada con un marcador detectable. Se pueden utilizar marcadores terminales alternativos, incluyendo moléculas que, como la biotina, se vuelven detectables tras su unión a una pareja, así como moléculas que son detectables de forma inherente. El kit de reactivos de la PCR **7**
 40 incluye una enzima polimerasa, nucleótidos y tampones.

El ADN producto de repetición específica amplificado **4**, a continuación se captura específicamente y se somete a un ensayo de hibridación de partículas codificadas **5**. La captura específica puede ser, por ejemplo, a base de una secuencia de nucleótidos complementaria, u otras interacciones de unión asociadas. Los reactivos de hibridación **8**
 45 incluyen un tampón de hibridación, un tampón de lavado, y un informador fluorescente. En este ejemplo específico, el informador fluorescente es estreptavidina-ficoeritrina, el informador convencional para los ensayos de Luminex. Las moléculas de ADN de repetición específica amplificadas son capturadas específicamente sobre el grupo de partículas codificadas con moléculas de captura de oligonucleótidos inmovilizadas **16**. El ensayo de hibridación **5** da lugar a la generación de datos de la señal fluorescente de ADN de repetición específica amplificado **6**.

50 La segunda alícuota de la muestra **1** se procesa en paralelo usando el mismo proceso pero con diferentes cebadores de PCR. La amplificación de la diana **10** se realiza usando un par de cebadores de PCR puente diana **9**. La amplificación de la diana y la amplificación específica de la repetición se muestran como un procesamiento simultáneo en la Figura 1A. Se entiende que en la práctica, las amplificaciones se pueden llevar a cabo
 55 simultáneamente, consecutivamente, o de manera superpuesta, de acuerdo con las preferencias del usuario. Esto produce ADN diana amplificado **11** que se hibrida con las moléculas de captura. El grupo de partículas codificadas **17** puede ser el mismo que el de **16**, por ejemplo, cuando la región de captura de las dos muestras de ADN amplificadas es la misma. La hibridación **12** produce datos de la señal fluorescente de ADN diana amplificado **13**.

A continuación se obtiene la relación de los datos de la señal fluorescente de ADN de repetición específica amplificado a los datos de la señal fluorescente de ADN diana. Usando una relación de las dos señales se compensan las variaciones en el rendimiento de los dos procesos de PCR. La Figura 9 muestra que la relación de la señal fluorescente es sustancialmente proporcional al contenido de repeticiones de las muestras del cromosoma X frágil masculino de 25 a 500 repeticiones aproximadamente.

Por lo tanto, se pueden usar los métodos descritos en el presente documento para determinar la longitud de la región de repetición de multinucleótido que está entre 25 aproximadamente y 500 repeticiones aproximadamente. Por ejemplo, la longitud de la región de repetición de multinucleótido puede estar entre 200 aproximadamente y 500 repeticiones aproximadamente, y 300 aproximadamente y 500 repeticiones aproximadamente.

La Figura 2 representa una configuración de una PCR ejemplar para un par de cebadores puente diana y ADN diana. La secuencia diana **21** incluye una secuencia de repetición de multinucleótido **24** que puede ser de longitud variable, dependiendo del locus genético del individuo. La región de repetición está flanqueada por secuencias no de repetición **22** y **23** en los extremos 5' y 3', respectivamente. Los cebadores puente diana **25** y **26** son complementarios a las secuencias no de repetición flanqueadoras de la región de repetición. En este ejemplo, el cebador 5' está marcado terminalmente con biotina **27** para facilitar la detección subsiguiente de los productos de la PCR (también referido como moléculas de ADN diana amplificado) con un informador de estreptavidina-ficoeritrina fluorescente. También en este ejemplo, el cebador en el extremo 5' está situado de tal manera que hay una secuencia de captura **28** entre el final del cebador y el inicio de la región de repetición. Esta secuencia se utiliza para la posterior captura por hibridación de productos de la PCR.

La Figura 3 representa una configuración de PCR ejemplar para un par de cebadores específicos de repetición y ADN de repetición específica. La secuencia diana **31** incluye una secuencia de repetición de multinucleótido **34** que puede ser de longitud variable, dependiendo del locus genético del individuo. La región de repetición está flanqueada por secuencias no de repetición **32** y **33** en los extremos 5' y 3', respectivamente. El cebador 5' no de repetición **36** se encuentra 5' de la región de repetición **34**, y en este ejemplo, el cebador está marcado terminalmente con biotina **37** para facilitar la detección del ADN producto resultante de la PCR (también denominado moléculas de ADN de repetición específica amplificado). El cebador no de repetición se define de modo que no es una región de ADN no de repetición **38** entre el cebador no de repetición y la región de repetición, en la que esta región no de repetición se puede utilizar para la subsiguiente captura o detección de los productos de la PCR resultante. Este cebador no de repetición puede ser el mismo que un cebador puente diana 5' descrito anteriormente. El segundo cebador **35** es un cebador de repetición específica, lo que significa que se hibrida con la región de repetición. Dicho cebador de repetición se puede hibridar en cualquiera de un gran número de lugares a lo largo de la región de repetición.

La Figura 4 representa una configuración de la PCR alternativa ejemplar, similar a la de la Figura 3 excepto porque las ubicaciones relativas de los cebadores no de repetición y de repetición están invertidas. La secuencia diana **41** incluye una secuencia de repetición **44** que puede tener una longitud variable. La región de repetición está flanqueada por secuencias no de repetición **42** y **43** en los extremos 5' y 3', respectivamente. El cebador no de repetición 3' **46** se encuentra 3' de la región de repetición **44**, y en este ejemplo, el cebador está marcado terminalmente con biotina **47** para facilitar la detección del ADN producto de la PCR resultante (también denominada como moléculas de ADN de repetición específica amplificado). El cebador no de repetición se define de modo que no es una región de ADN no de repetición **48** entre el cebador no de repetición y la región de repetición, en la que esta región no de repetición se puede utilizar para la subsiguiente captura o detección de los productos de la PCR resultante. Este cebador no de repetición puede ser el mismo que el cebador puente diana 5' descrito anteriormente. El segundo cebador **46** es un cebador de repetición específica, lo que significa que se hibrida con la región de repetición. Dicho cebador de repetición específica se puede hibridar a cualquiera de un gran número de lugares a lo largo de la región de repetición.

La Figura 5A representa una molécula de ADN amplificada **52** producida por la configuración de PCR de la Figura 2. Esta molécula de ADN diana amplificada contiene un marcador de biotina **50** en el extremo 5', una secuencia no de repetición 5' **53**, una región de repetición de longitud variable **51**, y una región no de repetición 3' **54**. La Figura 5B representa una molécula de ADN amplificada **58** producida por la configuración de PCR de la figura 3. Esta molécula de ADN de repetición específica amplificada contiene un marcador de biotina **55** sobre el extremo 5', una secuencia no de repetición 5' **56**, y una secuencia de repetición **57** de longitud variable. La Figura 5C representa una molécula de ADN amplificada producida por la configuración de la PCR de la Figura 4. Esta molécula de ADN de repetición específica amplificada contiene un marcador de biotina **61** en el extremo 3', una secuencia no de repetición 3' **59**, y una secuencia de repetición **60** variable.

La Figura 6 representa, esquemáticamente, una sola molécula de captura de oligonucleótido inmovilizada sobre una partícula codificada, con una molécula de ADN diana amplificada unida de configuraciones de la PCR tal como la mostrada en la Figura 5A. Una partícula codificada **77**, tal como una cuenta Luminex xMAP, en este ejemplo, tiene un gran número de moléculas de captura de oligonucleótidos **74** acopladas a su superficie (en esta figura solo se muestra una molécula). El oligonucleótido de captura **74** está diseñado para ser complementario a una región no de repetición **72** de una molécula de ADN diana **76** producida por el método descrito anteriormente. La molécula de ADN diana amplificada capturada contiene un marcador detectable **71**, biotina en este ejemplo, en un extremo y contiene una región de repetición **75** y una región no de repetición **73**.

10

La Figura 7 representa, esquemáticamente, una sola molécula de captura de oligonucleótido inmovilizada sobre una partícula codificada con una molécula de ADN de repetición específica amplificada unida. Una partícula codificada **86**, tal como una cuenta Luminex xMAP en este ejemplo, tiene un gran número de moléculas de captura de oligonucleótidos **83** acopladas a su superficie (en esta figura solo se muestra una molécula). El oligonucleótido de captura **83** está diseñado para ser complementario a una región no de repetición **82** de las moléculas de ADN de repetición específica producida por cebadores de repetición específica tales como los descritos por las Figuras 5B o 5C. La molécula de ADN de repetición específica capturada tiene un marcador detectable **81**, biotina en este ejemplo, en un extremo, y una región de repetición **84**.

La Figura 8 representa, esquemáticamente, una sola molécula de captura de oligonucleótido inmovilizada sobre una partícula codificada, y una única molécula de ADN diana amplificada a partir de una de las configuraciones de PCR tales como las mostradas en la Figura 5. Una partícula codificada **97**, tal como una cuenta Luminex xMAP en este ejemplo, tiene un gran número de moléculas de captura de oligonucleótidos **94** acopladas a su superficie (en esta figura solo se muestra una molécula). El oligonucleótido de captura **94** está diseñado para ser complementario a una región no de repetición **92** de una molécula de ADN diana amplificada producida por el par de cebadores puente diana como se describe en la Figura 5A. La molécula de ADN diana amplificada capturada tiene un marcador detectable **91**, biotina en este ejemplo, en un extremo, y tiene una región de repetición **98**.

También hibridado con la molécula de ADN diana amplificada **96** hay una o más sondas detectoras de repeticiones **99**. Se incorporan uno o más marcadores detectables **100**, biotina en este ejemplo, en cada sonda detectora de repeticiones. Las moléculas de la sonda detectora de repeticiones son complementarias a la región de repetición **98** y una pluralidad de sondas detectoras de repeticiones se puede hibridar con la región de repetición. Las sondas detectoras de repeticiones se pueden hibridar con las moléculas de ADN diana amplificado junto con o después de que las moléculas de ADN diana amplificado hayan sido capturadas por las cuentas.

35

En particular, cuanto más larga sea la región de repetición en la molécula de ADN diana amplificada capturada, más se hibridarán a la misma las sondas detectoras de repeticiones marcadas y mayor será la señal generada y detectada. En consecuencia, el presente método produce señales fluorescentes proporcionales a la longitud de la región de repetición de multinucleótido contenida en la molécula de ADN diana amplificada.

40

La Figura 9 es un ejemplo de datos de un primer ejemplo de ensayo de acuerdo con el proceso descrito en la Figura 1. Los valores a lo largo del eje horizontal son el número de repeticiones CGG según el proveedor de las muestras de ADN de líneas celulares (Instituto Coriell de Investigación Médica, Trenton, NJ). Las muestras representan varones con longitudes de repetición de cromosoma X frágil de 25, 83, 110 y 477. Los valores a lo largo del eje vertical de la gráfica son la relación tal como se calcula de acuerdo con el primer ejemplo, la relación de la señal fluorescente generada por el ADN de repetición específica dividido por la señal fluorescente de ADN diana amplificado de la misma muestra. Los datos de la relación crecen monótonamente y de forma aproximadamente lineal con la longitud de la región de repetición a lo largo de este intervalo.

50 Ejemplo 2

La Figura 1B es un diagrama de flujo de proceso esquemático que muestra otro método de ejemplo para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido en una molécula de ADN diana.

En referencia a la Figura 1B en detalle, el ADN de la muestra **114** se amplifica por PCR **102** utilizando cebadores puente diana **111** y un kit de reactivos de PCR **101**. Se produce la molécula de ADN diana amplificada **103**, y a continuación dos alícuotas de este producto se dirigen a través de dos caminos de ensayo. Una primera alícuota se somete a un ensayo de sonda de detección de repeticiones **106** como se muestra en la Figura 8. Se combinan las sondas de detección de repeticiones **105**, un grupo de partículas codificadas con oligonucleótidos de captura

inmovilizados **115** y reactivos de hibridación **106** y se hibridan. Los reactivos de hibridación incluyen tampones de hibridación, tampones de lavado, y un indicador fluorescente de estreptavidina-ficoeritrina que se une específicamente a los marcadores de biotina previamente incorporados. Como alternativa, un grupo de partículas codificadas con sondas inmovilizadas y las sondas detectoras de repeticiones se pueden hibridar de forma

5 secuencial en cualquier orden. Las sondas de detección de repeticiones se hibridan con la molécula de ADN diana amplificada de manera prácticamente proporcional a la longitud de la región de repetición, además de un marcador adicional del marcador terminal de la molécula de ADN diana amplificada. Cuando el producto de este ensayo se lee en el instrumento de detección apropiado, un Luminex 200 en este ejemplo, se producen los datos de la señal fluorescente de la sonda de detección de repeticiones **107**.

10

La segunda alícuota del ADN diana se procesa con un ensayo similar que omite la sonda de detección de repeticiones. El ensayo de cebadores puente de partículas codificadas **112** tiene entradas de la molécula de ADN diana amplificada **103**, el mismo grupo de partículas codificadas con sondas inmovilizadas **115**, y los reactivos de hibridación **110**. Usando el mismo protocolo de ensayo, esta versión produce datos de la señal fluorescente de la

15 molécula de ADN diana amplificada **113** a partir de un marcador de biotina en cada molécula de producto de la PCR independientemente de la longitud de la región de repetición.

Para cada muestra, se calcula una relación de los datos de la señal fluorescente de la molécula de ADN de repetición específica amplificada **107** a los datos de la señal fluorescente de la molécula de ADN diana amplificada

20 **113**. Calculando la relación con los datos de la señal fluorescente de la molécula de ADN diana amplificada en el denominador, se generan datos de repetición de la muestra, una representación aproximada de la longitud de la región de repetición de multinucleótido como se muestra en los datos de ejemplo siguientes.

La Figura 10 es un ejemplo de datos de un segundo ejemplo de ensayo de acuerdo con el proceso descrito en la

25 Figura 1B. Los valores a lo largo del eje horizontal son el número de repeticiones CGG según el proveedor de las muestras de ADN de líneas celulares (Instituto Coriell de Investigación Médica, Trenton, NJ). Las muestras representan varones con longitudes de repetición de cromosoma X frágil de 25, 83, 110, 477 y 1200. Los valores a lo largo del eje vertical de la gráfica son la relación tal como se calcula de acuerdo con el segundo ejemplo, la relación de la señal fluorescente generada por las sondas detectoras de repetición hibridadas, dividida por la señal

30 fluorescente de ADN diana amplificado de la misma muestra. Los datos de la relación crecen monótonamente y de forma aproximadamente lineal con la longitud de la región de repetición a lo largo de este intervalo.

Ejemplo 3

35 El ejemplo muestra un protocolo para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido de una molécula de ADN diana del gen X frágil.

Materiales de PCR

40 Kit de reactivos de PCR: Fast Start Taq Polimerasa (Cat # 12 032 902 001 ó 12032937001, Roche Molecular, Indianápolis, IN)

Betaína 5 M (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)

45 ADN masculino normal (Promega, Madison, WI) ADN normal femenino (Promega)

Cebadores puente (Eurofins GTM Operon, Huntsville, AL) (la fuente de todos los oligonucleótidos en esta descripción)

50 Cebador 5': [biotina-5] GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT (SEQ ID No. 9)

Cebador 3': AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA (SEQ ID No. 10)

Cebadores de repetición CCG

55

Cebador 5': [biotina-5] GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT (SEQ ID No. 9) (igual que el cebador puente 5' anterior)

Cebador 3' CCG-CTCGAGGCCAGCCGCCGCCG (SEQ ID No. 15)

PCR del ADN de la muestra

Completar la mezcla de PCR utilizando Roche Fast Start

5 En hielo, completar la premezcla de PCR de la siguiente manera

Premezcla para 1 reacción, 25 µl de volumen:

9 µl de dH₂O

10

10 µl de betaína 5 M

2,5 µl de Tampón de reacción PCR 10X (con MgCl₂ 20 mM)

15 1,25 µl de dNTP 10 mM

0,75 µl de cebador 1 10 µM

0,75 µl de cebador 2 10 µM

20

0,25 µl de 5U/µl de Taq ADN polimerasa

0,5 µl de molde (ADN de la muestra) a 100-300 ng/µl

25 O bien, premezcla para 10 reacciones, 50 µl de volumen:

180 µl de dH₂O

200 µl, betaína 5 M

30

5 µl de Tampón de reacción PCR 10X (con MgCl₂ 20 mM)

2,5 µl de dNTP 10 mM

35 15 µl de cebador 1 10 µM

15 µl de cebador 2 10 µM

5 µl de 5U/µl de Taq ADN polimerasa

40

Dispensar 49 µl de premezcla + muestra de ADN en tubos de pared delgada o placa de PCR sobre hielo

Añadir 1 µl de referencia de hombre y de mujer a 100-300 ng/µl a cada pocillo con cebadores puente y cebadores de repetición CGG.

45

Tapar los tubos o la placa apropiadamente.

Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el perfil de PCR FMR1 (tiempo estimado 6 horas).

50 Retirar los tubos del termociclador. Almacenar a -20 °C o continuar el análisis en gel

Ciclos de PCR (PTC100, MJ Research, Watertown, MA):

98 °C durante 10 min

55

10 ciclos a:

97 °C durante 35 s,

64 °C durante 35 s,

68 °C durante 4 min.

5 25 ciclos a:

97 °C durante 35 s,

64 °C durante 35 s,

10

68 °C durante 4 min, además de 20 s de extensión gradual para cada ciclo.

68 °C durante 10 min

15 mantener a 4 °C

Hibridación con cuentas de Luminex

Molécula de captura inmovilizada 5' CTGGCAGCGGCGCCTCCGTCAC (SEC ID N° 19) Código de las cuentas 27 y/o 28

Acoplamiento de oligo a cuentas según el protocolo convencional EDC de Luminex

Reactivos de hibridación

1,5 X tampón de hibridación TMAC 250 ml de Reactivo	Número de catálogo	Concentración final	Cantidad/250 ml
TMAC 5 M	Sigma T3411	4,5 M	225 ml
Solución Sarkosyl al 20 %	Sigma L7414	0,15 %	1,88 ml
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	Sigma T3038	75 mM	18,75 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	Invitrogen 15575-020	6 mM	3,0 ml
H ₂ O	-----	-----	1,37 ml

25

Informador de estreptavidina-ficoeritrina PJRS34 DH23 012 2,02 mg/ml (ProZyme, San Leandro, CA) de tampón de lavado 1X PBS, 0,01 % de Tween-20

Completar la premezcla de hibridación

30

Premezcla para 1 muestra, 33 µl/muestra de producto de la PCR:

32 µl de tampón de hibridación TMAC 1,5 M

35 1 µl de captura 5' CTGGCAGCGGCGCCTCCGTCAC (SEC ID N° 19) cuentas a 1000 cuentas/µl

Premezcla para 10 muestras:

320 µl de 1,5X TMAC

40

10 µl de molécula de captura_CTGGCAGCGGCGCCTCCGTCAC (SEQ ID No. 19) cuentas a 1000 cuentas/µl

330 µl total

45 Premezcla con un vórtex vigorosamente inmediatamente antes de dispensar.

Hibridación y análisis

Dispensar 33 µl de premezcla de hibridación/pocillo que se hibrida en tubos o placas de PCR. Añadir 2 µl de cada producto de la PCR (producto de la PCR con cebador puente o cebador de repetición). Añadir 15 µl de dH₂O a 50 µl

50

de volumen final. Sellar los tubos con tapones o la placa con sellador de papel. Poner en un termociclador y desnaturalizar a 95 °C durante cinco minutos. Enfriar a 50 °C, mantener durante 15 minutos.

Retirar las reacciones de hibridación del termociclador y añadir 100 µl de tampón de lavado. Transferir el tampón y la solución de hibridación a una placa de filtro Multiscreen MSHVN4510 de 0,45 µm (Millipore, Bedford MA). Aplicar vacío para filtrar la parte inferior de la placa para aspirar el líquido. Añadir 100 µl de tampón de lavado. Aplicar vacío. Repetir la etapa 7 una vez.

Añadir 100 µl de informador estreptavidina-ficoeritrina a 4 µg/ml en diluyente de BSA a cada pocillo. Lavar los pocillos con 100 µl de tampón. Aplicar vacío para eliminar el líquido.

Secar el fondo de la placa de filtro con una almohadilla absorbente.

Añadir 100 µl de tampón de lavado para volver a suspender las cuentas y leer en un instrumento Luminex 200 con el molde adecuado.

Calcular la relación de producto de la PCR del cebador de repetición a las señales de fluorescencia del producto de la PCR puente para cada muestra. Comparar las relaciones de la muestra a las producidas por los patrones de la carrera.

20

Ejemplo 4

Este ejemplo muestra un protocolo para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido de una molécula de ADN diana del gen X frágil.

25

Materiales de PCR

Kit de reactivos de PCR: Fast Start Taq Polimerasa (Cat # 12 032 902 001 o 12032937001, Roche Molecular, Indianápolis, IN)

30

Betaína 5 M (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)

ADN masculino normal (Promega, Madison, WI)

35 ADN femenino normal (Promega)

Cebadores puente (Eurofins GTM Operon, Huntsville aL) (la fuente de todos los oligonucleótidos en esta descripción):

40

Cebador 5': [biotina-5] GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT (SEQ ID No. 9)

Cebador 3': AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA (SEQ ID No. 10)

PCR de la muestra de ADN

45

Completar la mezcla de PCR utilizando Roche Fast Start
En hielo, completar la premezcla de PCR de la siguiente manera:

Premezcla para 1 reacción, 25 µl de volumen:

50

9 µl de dH₂O

10 µl de betaína 5 M

55 2,5 µl de Tampón de reacción PCR 10X (con MgCl₂ 20 mM)

1,25 µl de dNTP 10 mM

0,75 µl de cebador 1 10 µM

ES 2 573 092 T3

0,75 µl de cebador 2 10 µM

0,25 µl de 5U/µl de Taq ADN polimerasa

5 0,5 µl de molde (ADN de la muestra) a 100-300 ng/µl

O, premezcla para 10 reacciones, 50 µl de volumen:

10 180 µl de dH₂O

200 µl de betaina 5 M

5 µl de Tampón de reacción PCR 10X (con MgCl₂ 20 mM)

15 2,5 µl de dNTP 10 mM

15 µl de cebador 1 10 µM

20 15 µl de cebador 2 10 µM

5 µl de 5U/µl de Taq ADN polimerasa

25 Dispensar 49 µl de premezcla + muestra de ADN en tubos de pared delgada o placa de PCR sobre hielo. Añadir 1 µl de referencia de hombre y de mujer a 100-300 ngs/µl a cada pocillo con cebadores puente y cebadores de repetición CGG. Tapar los tubos o placa apropiadamente. Colocar los tubos en el termociclador y ejecutar el perfil de PCR FMR1 (tiempo estimado 6 horas). Retirar los tubos del termociclador. Almacenar a 20 °C o continuar el análisis en gel.

30 **Ciclos de PCR** (PTC100, MJ Research, Watertown, MA):

98 °C durante 10 min

10 ciclos a:

35 97 °C durante 35 s,

64 °C durante 35 s,

40 68 °C durante 4 min.

25 ciclos a:

97 °C durante 35 s,

45 64 °C durante 35 s,

68 °C durante 4 min, además de 20 s de extensión gradual para cada ciclo.

50 68 °C durante 10 min

mantener a 4 °C

Hibridación con cuentas de Luminex

55 **Molécula de captura inmovilizada** 5 'CTGGCAGCGGCGCCTCCGTAC (SEQ ID No. 19) Código de cuentas 27 y/o 28

Acoplamiento de oligo a cuentas según el protocolo convencional EDC de Luminex

Sonda informadora del motivo de repetición de biotina biotina-CCGCCGCCGCCG (SEQ ID No. 20)

Reactivos de hibridación

5

1,5 X tampón de hibridación TMAC 250 ml de Reactivo	Numero de catalogo	concentración final	Cantidad/250 ml
TMAC5 M	Sigma T3411	4,5 M	225 ml
Solución Sarkosyl al 20 %	Sigma L7414	0,15 %	1,88 ml
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	Sigma T3038	75 mM	18,75 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	Invitrogen 15575-020	6 mM	3,0 ml
H ₂ O	-----	-----	1,37 ml

Informador de estreptavidina-ficoeritrina PJRS34 DH23 012 2,02 mg/ml (ProZyme, San Leandro, CA)

Tampón de lavado 1X PBS, 0,01 % de Tween-20

10 Completar las premezclas de hibridación 1 y 2

Premezcla de hibridación 1 10 X (para medir el producto de cebador puente)
320 µl de 1,5 X TMAC

15 10 µl de Captura_CTGGCAGCGCGCCTCCGTAC (SEC ID N° 19) cuentas a 1000 cuentas/µl

330 µl total

Mezclar con un vórtex vigorosamente inmediatamente antes de dispensar.

20

Premezcla de hibridación 2 10 X (para medir la longitud de repetición con la sonda informadora del motivo de repetición)

319 µl de 1,5 X TMAC

25 10 µl de Captura_CTGGCAGCGCGCCTCCGTAC (SEC ID N° 19) cuentas a 1000 cuentas/µl
1 µl de informador de biotina CCGGCCGCCGCCG (SEC ID N° 20) 100 µM
330 µl total

Mezclar con un vórtex vigorosamente inmediatamente antes de dispensar.

30

Proceso de hibridación

Dispensar 33 µl/pocillo de Premezcla de hibridación 1 y Premezcla 2 para cada producto de la PCR en tubos o pocillos de placa de PCR separados.

35

Añadir 2 µl de cada producto de la PCR del cebador puente a un pocillo con Premezcla Hyb 1 y un pocillo con Premezcla Hyb 2. Añadir 15 µl de dH₂O a todos los pocillos de hibridación. Mezclar con pipeta. Sellar tubos con tapones o la placa con sellador de placas de aluminio. Poner en un termociclador y desnaturar a 95 °C durante cinco minutos. Enfriar a 50 °C y mantener durante 15 minutos. Retirar las reacciones de hibridación del termociclador

40 y añadir 100 µl de tampón de lavado. Transferir el tampón de lavado más mezcla de hibridación a una placa de filtro Multiscreen MSHVN4510 de 0,45 µm (Millipore, Bedford MA). Aplicar vacío para filtrar la parte inferior de la placa para aspirar el líquido. Añadir 100 µl de tampón de lavado. Aplicar vacío. Repetir la etapa 7 una vez. Añadir 100 µl de informador estreptavidina-ficoeritrina a 4 µg/ml en diluyente BSA a cada pocillo. Lavar los pocillos con 100 µl de tampón. Aplicar vacío para eliminar el líquido. Secar el fondo de la placa de filtro con almohadilla absorbente. Añadir

45 100 µl de tampón de lavado para volver a suspender las cuentas y leer en un instrumento Luminex 200 con el molde adecuado. Calcular la relación de sonda informadora del motivo de repetición a las señales de fluorescencia del producto de la PCR puente para cada muestra. Comparar las relaciones de muestra a las producidas por los patrones en la carrera.

50 **Ejemplo 5**

La Figura 1C es un diagrama de flujo de proceso esquemático que muestra otro método de ejemplo para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido en una molécula de ADN diana.

5 En referencia a la Figura 1C, el ADN de la muestra se amplifica por PCR utilizando cebadores puente diana y una mezcla de nucleótido marcado. La mezcla de nucleótido marcado puede contener cualquier desoxinucleótido contenido en la secuencia de repetición de multinucleótido, y puede tener cualquier marcador directo o indirecto, siempre que el marcador se pueda unir a un desoxinucleótido sin afectar a la función del desoxinucleótido, a la capacidad del desoxinucleótido para incorporarse a un ácido nucleico por una polimerasa de ADN, o a la función del
 10 marcador. En un caso ejemplar, la mezcla de nucleótido marcado contiene dCTP biotinilado. La cebador puente diana contiene un cebador que contiene un marcador de detección de dianas. El marcador de detección de dianas y el marcador de detección de repeticiones puede ser cualquier marcador que se pueda detectar o se pueda hacer detectable mediante un tratamiento o mediante la unión a un informador. En un caso ejemplar, el marcador de detección de dianas es fluoresceína. Un informador útil para hacer detectable la fluoresceína es un anticuerpo
 15 dirigido contra fluoresceína conjugado con ficoeritrina. Se produce la molécula de ADN diana amplificada, y se hibrida a las partículas codificadas. La hibridación puede ser entre una secuencia de repetición de multinucleótido en la molécula de ácido nucleico diana amplificado, y una secuencia complementaria unida a las partículas codificadas. Las partículas codificadas hibridadas se dividen en partes alícuotas. Una alícuota se incuba con una sonda informadora que se une a los restos de biotina del ácido nucleico diana amplificado (por ejemplo, estreptavidina
 20 conjugada a un resto detectable, tal como estreptavidina conjugada con ficoeritrina), y se incuba otra alícuota con una sonda informadora que se une a un marcador impartido por uno de los cebadores puente diana.

Por lo tanto, como se ejemplifica en la Figura 11, los marcadores detectables incorporados o unidos a intervalos regulares a lo largo de la longitud de la región de repetición indicarán la longitud mediante la fuerza agregada de la
 25 señal. Para resumir en pocas palabras, se realiza una amplificación por PCR de la región de repetición del ADN diana. Durante este proceso, se incorpora un marcador detectable (biotina) a los productos de la PCR. La señal producida en última instancia por el marcador detectable es proporcional a la longitud de la región de repetición amplificada. También hay un marcador detectable (fluoresceína en forma de hapteno) de un solo cebador usado para amplificar el producto de la PCR. La señal producida en última instancia por este marcador detectable es
 30 esencialmente 1 señal por producto de la PCR. Los productos de la PCR se capturan sobre partículas codificadas tales como cuentas Lumindex y los dos marcadores se detectan por separado. El marcador incorporado correspondiente al marcador de detección de repeticiones corresponde a un número medio de repeticiones CGG. El marcador incorporado correspondiente al marcador de detección de dianas (es decir, el marcador del cebador) corresponde al número de moléculas de producto de la PCR. Entonces es posible calcular la relación de los dos
 35 marcadores detectables. La estrategia de la relación permite normalizar la disminución de los rendimientos de PCR a medida que aumentan las longitudes de las repeticiones.

Una característica adicional de la realización descrita anteriormente es que el marcador de fluoresceína en un cebador, aunque se utiliza como hapteno en el presente ensayo de hibridación, también se puede utilizar como
 40 marcador detectado directamente en electroforesis capilar. Esto permite la opción alternativa de utilizar una primera parte de los productos de la PCR realizada de acuerdo con este ejemplo para su uso en el ensayo de hibridación, por ejemplo en un entorno de ensayo de selección, mientras se utiliza una segunda parte a evaluar mediante electroforesis capilar como segunda prueba para muestras que dieron positivo en un ensayo de hibridación como se describe en el presente documento.

45 Las Figuras 12A y 12B son datos de un primer ejemplo de ensayo de acuerdo con el proceso descrito en las Figuras 1C y 11. Los valores a lo largo del eje horizontal son el número de repeticiones CGG según el proveedor de las muestras de ADN de líneas celulares (Instituto Coriell de Investigación Médica, Trenton, NJ). Las muestras representan varones con longitudes de repetición de cromosoma X frágil de entre 20 aproximadamente y 650
 50 aproximadamente. Los valores a lo largo del eje vertical de la gráfica son la relación de la señal fluorescente generada por el marcador de detección de repeticiones dividido por la señal fluorescente de ADN diana amplificado (derivado del marcador de detección de dianas) de la misma muestra. Los datos de la relación crecen monótonamente y de forma aproximadamente lineal con la longitud de la repetición a lo largo de todo o la mayoría de este intervalo.

55 A continuación se presentan los protocolos ejemplares para etapas experimentales útiles para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido de una molécula de ADN diana del gen X frágil, utilizando desoxinucleótidos marcados durante la amplificación del ADN diana.

Cebadores puente de repeticiones CGG:

5' Cebador 1: GCTCAGCTCCGTTTCGGTTTCACTTCCGGT (Nº 9 SEC ID)

5 3' Cebador 2: Flúor 5' AGCCCCGCACTTCCACCACCAGCTCCTCCA (SEQ ID No. 10) 100 µM de biotina dCTP

20-30 ng/µl de ADN genómico

10 PCR de ADN genómico

Completar la mezcla de PCR Abbott GPR reagents & Protocol
En hielo, completar la premezcla de PCR de la siguiente manera:

15 Enzima Abbott TR y tampón de PCR High GC

1x volumen de reacción 25 µl

8,15 µl de dH₂O

20 13 µl de tampón de PCR High GC

0,8 µl de Cebador 1 10 µM

25 0,8 µl de cebador 2 10 µM

1,25 µl de Mezcla de Enzimas TR

1 µl de biotina dCTP 100 µM

30 1 µl de Molde a 10-30 ng/µl

Dispensar 22 µl en tubos de pared delgada o placa de PCR en hielo. Añadir 1 µl a 10-30 ngs/µl a cada pocillo con cebadores puente. Tapar los tubos o la placa apropiadamente. Iniciar el perfil de PCR Abbott FrX (tiempo estimado 6 horas). Poner los tubos sobre el Cyclor y colocar los tubos en el termociclador cuando la temperatura alcanza los 98,5 °C. Retirar los tubos del termociclador. Almacenar a -20 °C o continuar el análisis en gel

35

Ciclo de PCR (progr. ABBO FrX): **Condiciones de amplificación**

Temperatura	Tiempo (min: seg)	Ciclos
98,5 °C	0:10	15
58,0 °C	1:00	
75,0 °C	6:00	
Auto extender 98,5 °C		
0,1 °C/ciclo *	0:10	15
56,0 °C 1:00		
75,0 °C 6:00		
Mantener a 4,0 °C		
* 0,1 cada ciclo.		

40 Análisis en gel de productos de la PCR:

Tampón de carga 10X Blue Juice de Invitrogen

45 Escalera de ADN 2 log de NEB

2,0 % de eGel de agarosa, Invitrogen Cat G5618-02

1) Pre-correr el eGel de agarosa al 2,0 % como recomienda el fabricante.

- 2) Completar con 0,5X Blue Juice suficiente para el número de muestras a correr o usar la solución madre actual.
- 3) Completar con marcadores de ADN utilizando la escalera de ADN 2 log de NEB a 300 ng/10 µl en 0,5X Blue o usar la dilución actual.

5

- 4) Añadir 5 µl de cada cebador puente de la reacción de la muestra de PCR y producto de cebador de la repetición CGG a tubos separados.

- 5) Añadir 15 µl de 0,5X Blue Juice a cada tubo para el análisis en gel. Mezclar las muestras en un vórtex.

10

- 6) Añadir 10 µl de escalera 2 log a un pocillo de eGel de agarosa al 2,0 %.

- 7) Añadir 20 µl de cada PCR en el tampón de carga.

15

- 8) Correr el gel durante 30 minutos utilizando comandos preestablecidos en el aparato del eGel.

Capturar la imagen del gel en una estación de imágenes Kodak

Ajustar el filtro a 4 F stop 1.2, Zoom 25, Focus 5(1,5)

20

Exposición; 20 s 8 veces

Guardar la imagen para su documentación.

25 Hibridación

- 1) Dispensar 23 µl/pocillo de premezcla Hyb en tubos o placas de PCR.

- 2) Añadir 2 µl (1:3 de dilución) de cada producto de la PCR en pocillos individuales.

30

- 3) Sellar los tubos con tapones o la placa con papel de aluminio.

- 4) Poner el termociclador y desnaturalizar a 100 °C durante cinco minutos

35

- 5) Realizar un ciclo a 50 °C durante 30 minutos.

- 6) Eliminar las reacciones de hibridación de termociclador y añadir 100 µl

40

- 7) Dividir la PCR hibridada mediante la transferencia de 50 µl de mezcla Hyb de lavado en 2 pocillos de una placa de filtro Millipore 0,4 µm. Aplicar vacío para eliminar el líquido.

- 8) Añadir 100 µl de mezcla de lavado 2. Aplicar vacío.

- 9) Repetir la etapa 7 una vez.

45

- 10) Añadir 100 µl de SA PE a 2 µg/ml en diluyente a un pocillo de cada PCR hibridada.

- 11) Añadir 100 µl de antiluoresceína PE a 2µg/µl de diluyente en otro pocillo de PCR hibridada.

50

- 12) Incubar 30 minutos con agitación.

- 13) Aplicar vacío para eliminar el líquido.

- 14) Lavar los pocillos con 100 µl de tampón de lavado. Aplicar vacío para eliminar el líquido.

55

- 15) Secar la parte inferior de la placa de filtro con almohadilla absorbente.

- 16) Añadir 100 µl de tampón de lavado y leer en Luminex con el molde adecuado.

Cuentas FrX 83 y 91 CGGCGGCGGCGGCGG (SEC ID N° 21) cuentas de captura a 2000 cuentas/μl

Solución de hibridación 1,5 X TMAC (microesfera diluyente) 250 ml de Reactivo	Número de catálogo	Concentración final	Cantidad/250 ml
TMAC 5 M	Sigma T3411	4,5 M	225 ml
Solución Sarkosyl al 20 %	Sigma L7414	0,15 %	1,88 ml
Tris-HCl 1 M, pH 8,0	Sigma T3038	75 mM	18,75 ml
EDTA 0,5 M, pH 8,0	Invitrogen 15575-020	6 mM	3,0 ml
H ₂ O	-----	-----	1,37 ml

Prozyme SA PE PJRS34 DH23 012 2,02 mgs/ml

5

Invitrogen Antifluoresceína PE: Cat A21250, lote 41973A 2 mgs/ml

Anti-fluoresceína & SA PE Diluyente 1X PBS 0,01 % de Tween, 0,1 % de BSA

10 Lavado 1X PBS 0,01 % de Tween

Placa de filtro Millipore 0,4 μm

Reacción de PCR biotina fluoresceína Método 2

15

Hibridación:

25 μl/muestra

20 10 X Premezcla

160 μl de 1,5X TMAC

80 μl de dH₂O

25

2,5 μl de Capture 83&91 Cuentas a 2000 cuentas/μl

250 μl total

30 Mezclar con un vórtex vigorosamente inmediatamente antes de dispensar.

Ejemplo 6

La Figura 12C proporciona los datos de un segundo ejemplo de ensayo de enumeración de trinucleótidos de acuerdo con el proceso descrito en las Figuras 1C y 11. Los valores en el eje horizontal son el número de repeticiones CGG según el proveedor de las muestras de ADN de líneas celulares. Las muestras representan mujeres con longitudes de repetición de X frágil en sus alelos más largos de entre 29 aproximadamente a 650 aproximadamente. Los valores a lo largo del eje vertical de la gráfica son la relación de la señal fluorescente generada por el marcador de detección de repeticiones dividido por la señal fluorescente de ADN diana amplificado (derivado de marcador de detección de dianas) de la misma muestra. Los datos crecen monótonamente con la relación de la longitud de repetición hasta bien entrado el intervalo de mutación completa (repeticiones superiores a 200).

A continuación se presentan los protocolos de etapas experimentales útiles para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido de una molécula de ADN diana del gen X frágil, utilizando desoxinucleótidos marcados durante la amplificación del ADN, y utilizando un segundo proceso de ensayo de ejemplo.

La PCR se realizó utilizando los reactivos de la PCR Asuragen Human FMR1 (Asuragen, Austin TX) con su protocolo convencional, con la adición de 1 μl de biotina-dCTP 100 μM en 20 μl de la mezcla de reacción de PCR del kit. El ensayo de enumeración se realizó usando los mismos materiales y métodos del Ejemplo 5 anterior, excepto para el tampón de hibridación que se prepara como se describe a continuación.

Componente	Cantidad	Concentración final
50 % de sulfato de dextrano	2,15 g	8,3 %
Formamida	5 ml	50 %
20x SSC	1 ml	2x
H ₂ O	2,37 ml	
Total	10 ml	

El sulfato de dextrano era Millipore S4030 (Millipore, Bedford MA), la formamida era Millipore S4117, y el SSC era Sigma-Aldrich S6639. Esta hibridación también se realizó a 60 °C durante 60 minutos.

5

Las composiciones y métodos descritos en el presente documento actualmente son representativos de realizaciones preferidas a modo de ejemplo, y no pretenden ser limitaciones del alcance de la invención. A los expertos en la materia se les ocurrirán cambios en ellas y otros usos. Dichos cambios y otros usos se pueden realizar sin apartarse del alcance de la invención como se expone en las reivindicaciones.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido en un ácido nucleico diana, que comprende:
- 5
amplificar un ácido nucleico diana que comprende una región de repetición de multinucleótido para producir ácidos nucleicos diana amplificados que incorporan un cebador puente marcado con un primer marcador, los ácidos nucleicos diana amplificados que de este modo están marcados con el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido;
- 10
el marcaje de los ácidos nucleicos diana amplificados con un segundo marcador, el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido, en el que el segundo marcador se incorpora a los ácidos nucleicos diana amplificados durante la amplificación o después de la amplificación;
- 15
la unión de los ácidos nucleicos diana amplificados a una sonda de captura específica para los ácidos nucleicos diana amplificados;
- la detección del primer marcador asociado a la sonda de captura para producir una primera señal;
- 20
la detección del segundo marcador asociado a la sonda de captura para producir una segunda señal; y
- la determinación de una relación de la primera señal y la segunda señal, en la que la relación es indicativa de la longitud de la región de repetición de multinucleótido en el ácido nucleico diana.
- 25
2. El método de la reivindicación 1, en el que la unión de los ácidos nucleicos diana amplificados comprende la hibridación específica de los ácidos nucleicos diana amplificados a sondas de captura de ácido nucleico complementarias.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el segundo marcador está presente en los nucleótidos
- 30
utilizados en la amplificación del ácido nucleico diana para producir los ácidos nucleicos diana amplificados.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el segundo marcador está presente en las sondas que se unen específicamente a repeticiones de multinucleótido en los ácidos nucleicos diana amplificados.
- 35
5. El método de la reivindicación 4, en el que las sondas son sondas de ácido nucleico.
6. El método de la reivindicación 1, en el que la sonda de captura es específica para la región de repetición de multinucleótido de los ácidos nucleicos diana amplificados.
- 40
7. El método de la reivindicación 1, en el que la sonda de captura comprende un sustrato codificado.
8. El método de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana se aísla a partir de una muestra biológica.
- 45
9. El método de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico diana es ADN genómico.
10. El método de la reivindicación 8, en el que la muestra biológica se obtiene de un sujeto humano individual.
- 50
11. El método de la reivindicación 10, en el que el sujeto individual padece o se encuentra en riesgo de padecer un trastorno de expansión de repeticiones de trinucleótidos seleccionado del grupo que consiste en:
- atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, enfermedad de Huntington, atrofia muscular espinobulbar, ataxia espinocerebelosa tipo 1, ataxia espinocerebelosa tipo 2, ataxia espinocerebelosa tipo 3, ataxia espinocerebelosa tipo
- 55
6, ataxia espinocerebelosa tipo 7, ataxia espinocerebelosa tipo 17, síndrome del cromosoma X frágil; retraso mental de XE frágil; ataxia de Friedreich; distrofia miotónica; ataxia espinocerebelosa tipo 8 y ataxia espinocerebelosa tipo 12.
12. El método de la reivindicación 7, en el que el sustrato codificado es una pluralidad de partículas

codificadas, produciendo un primer grupo de partículas.

13. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

5 amplificar una región de repetición de multinucleótido de ácido nucleico de referencia para producir ácidos nucleicos diana amplificados de referencia;

el marcaje de los ácidos nucleicos de referencia diana amplificados con un primer marcador y un segundo marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido y el segundo marcador proporcional
10 al número de repeticiones de multinucleótido, en el que el primer y segundo marcadores se incorporaron cada uno independientemente a los ácidos nucleicos de referencia diana amplificados durante la amplificación o después de la amplificación;

la unión de los ácidos nucleicos de referencia diana amplificados a una sonda de captura específica para los ácidos
15 nucleicos de referencia diana amplificados;

la detección del primer marcador asociado a la sonda de captura para producir una tercera señal;

la detección del segundo marcador asociado a la sonda de captura para producir una cuarta señal;

20 la determinación de una relación de la tercera señal y la cuarta señal, en la que la relación es indicativa de la longitud de la región de repetición de multinucleótido en el ácido nucleico de referencia diana; y

la comparación de la relación de la primera señal y la segunda señal con la relación de la tercera señal y la cuarta
25 señal.

14. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

la amplificación de un segundo ácido nucleico diana para producir segundos ácidos nucleicos diana amplificados;

30 el marcaje de los segundos ácidos nucleicos diana amplificados con un primer marcador y un segundo marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido y el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido;

35 la unión de los segundos ácidos nucleicos diana amplificados a una sonda de captura específica para los segundos ácidos nucleicos diana amplificados;

la detección del primer marcador asociado a la sonda de captura para producir una primera señal;

40 la detección del segundo marcador asociado a la sonda de captura para producir una segunda señal; y

la determinación de una relación de la primera señal y la segunda señal, en la que la relación es indicativa de la longitud de la repetición de multinucleótido en el segundo ácido nucleico diana.

45 15. El método de la reivindicación 14, en el que el segundo sustrato codificado es una pluralidad de partículas codificadas, produciendo un segundo grupo de partículas.

16. El método de la reivindicación 15, en el que el primer y segundo grupos de partículas están juntos en un recipiente de reacción durante la unión de los primer y segundo ácidos nucleicos diana amplificados al primer y
50 segundo sustratos codificados.

17. Un método para determinar la longitud de una región de repetición de multinucleótido en un ácido nucleico diana, que comprende:

55 dividir una muestra que contiene ácidos nucleicos diana en al menos dos alícuotas, incluyendo una primera alícuota de la muestra y una segunda alícuota de la muestra;

amplificar un ácido nucleico diana en la primera alícuota de la muestra para producir ácidos nucleicos diana amplificados;

el marcaje de los ácidos nucleicos diana amplificados con un primer marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido;

5 la unión de los ácidos nucleicos diana amplificados a una primera sonda de captura específica para los ácidos nucleicos diana amplificados;

amplificar el ácido nucleico diana en la segunda alícuota de la muestra para producir ácidos nucleicos de la región de repetición de multinucleótido;

10

el marcaje de los ácidos nucleicos de la región de repetición de multinucleótido con un segundo marcador, el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido;

15 la unión de los ácidos nucleicos de la región de repetición de multinucleótido a una segunda sonda de captura específica para los ácidos nucleicos de la región de repetición de multinucleótido;

la detección del primer marcador asociado a la primera sonda de captura para producir una primera señal;

20 la detección del segundo marcador asociado a la segunda sonda de captura para producir una segunda señal; y

la determinación de una relación de la primera señal y la segunda señal, en la que la relación es indicativa de la longitud de la repetición de multinucleótido en el ácido nucleico diana.

25 18. El método de la reivindicación 17, en el que la primera y segunda sondas de captura son iguales o diferentes.

19. Un método de selección de un individuo para una afección genética que se **caracteriza por** una región de repetición de multinucleótido alterada en un ácido nucleico diana, que comprende:

30 la amplificación de una muestra obtenida de un ácido nucleico diana del individuo para producir ácidos nucleicos diana amplificados, en el que los ácidos nucleicos diana amplificados contienen un primer marcador y un segundo marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido y el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido;

35 la unión de los ácidos nucleicos diana amplificados a una sonda de captura específica para la repetición de multinucleótido de los ácidos nucleicos diana amplificados;

la detección del primer marcador asociado a la sonda de captura para producir una primera señal;

40 la detección del segundo marcador asociado a la sonda de captura para producir una segunda señal;

la determinación de una relación de la primera señal a la segunda señal, en la que la relación es indicativa de la longitud de la repetición de multinucleótido en el ácido nucleico diana, y

45 la comparación de la relación determinada con la de una muestra de control para determinar la presencia de una región de repetición de multinucleótido alterada en el individuo.

20. Una composición, que comprende:

50 ácidos nucleicos diana amplificados que comprenden una región de repetición de multinucleótido, los ácidos nucleicos diana amplificados que comprenden un primer marcador y un segundo marcador, el primer marcador independiente del número de repeticiones de multinucleótido y el segundo marcador proporcional al número de repeticiones de multinucleótido, en el que el primer y segundo marcadores se incorporaron cada uno de forma independiente a los ácidos nucleicos diana amplificados durante la amplificación, en el que los ácidos nucleicos diana amplificados se unen a una sonda de captura específica para los ácidos nucleicos diana amplificados.

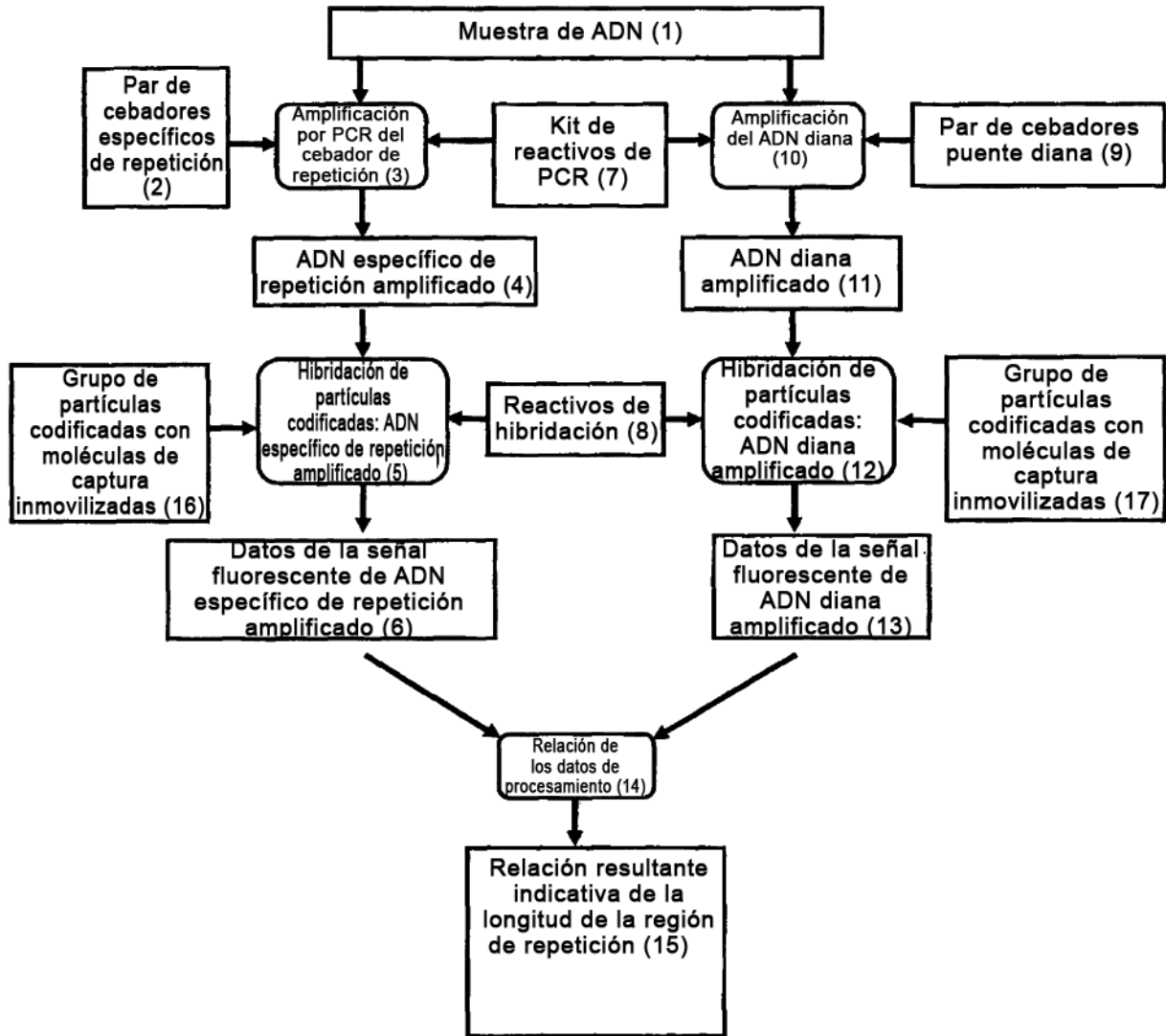


Figura 1A

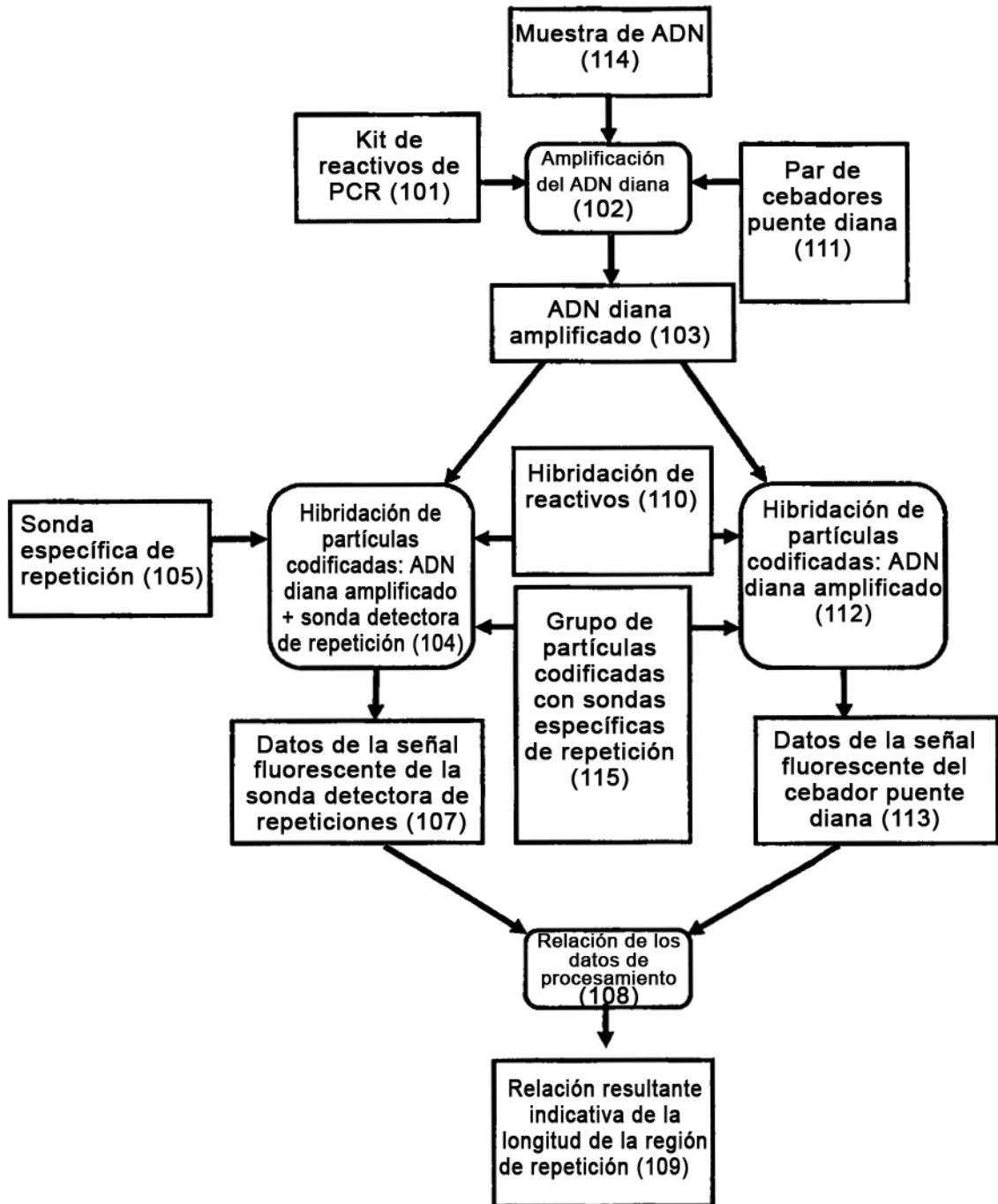


Figura 1B

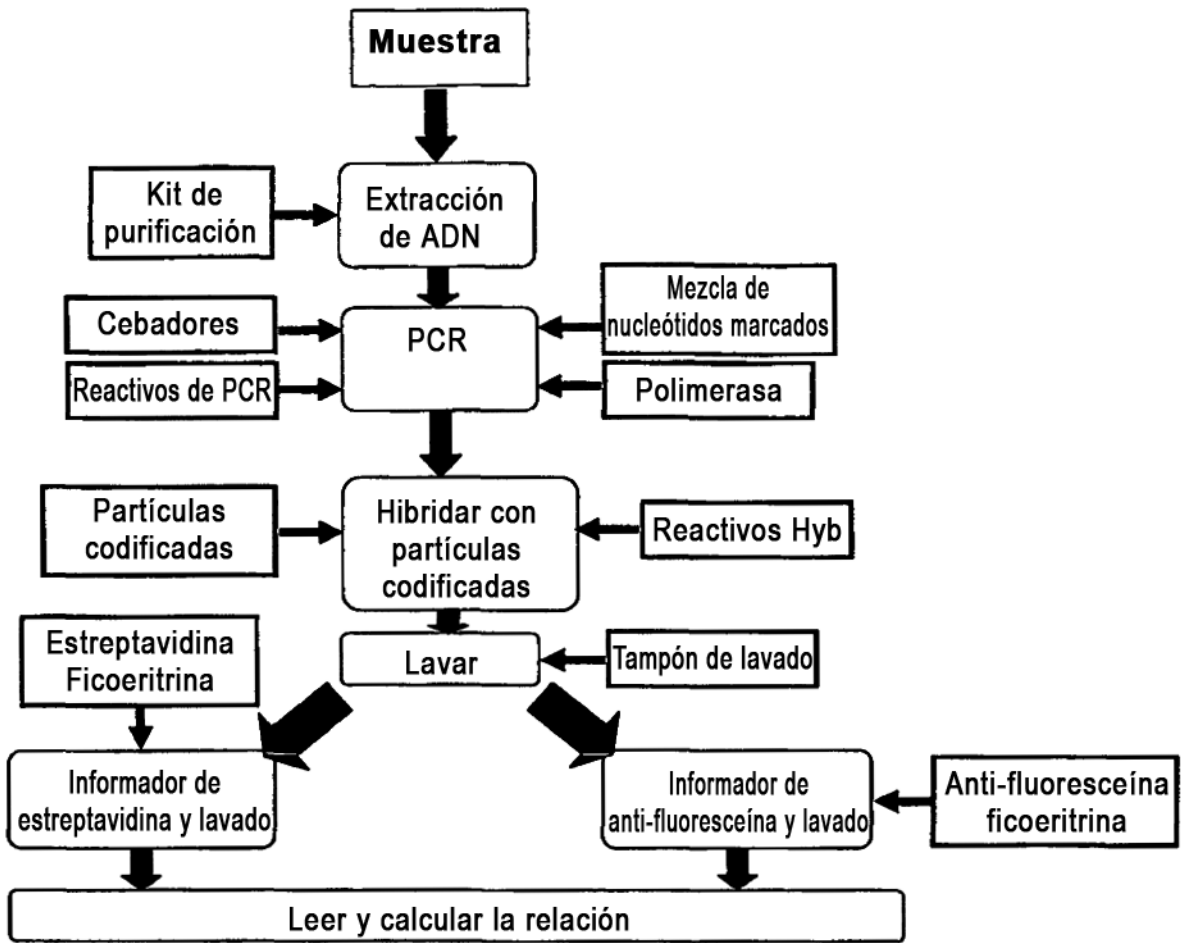


Figura 1C

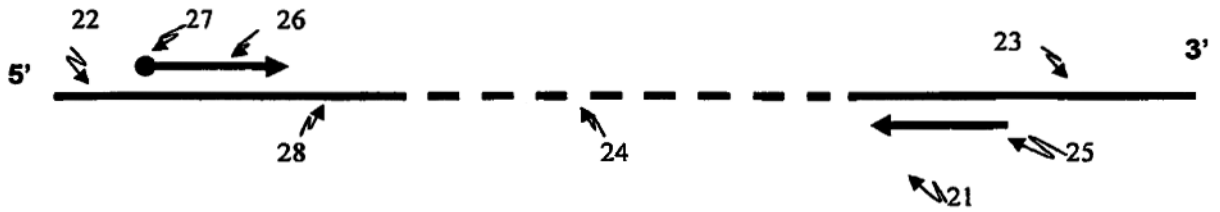


Figura 2

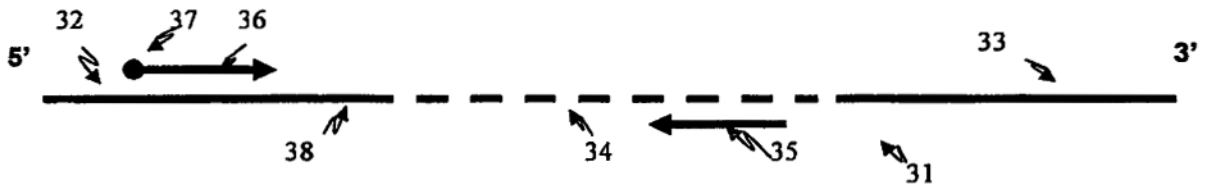


Figura 3

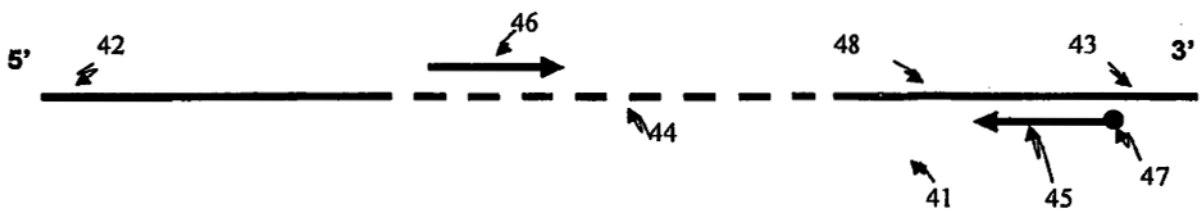


Figura 4

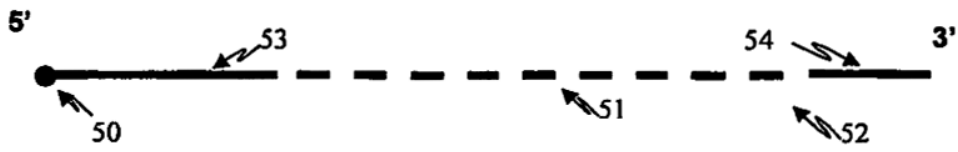


Figura 5A

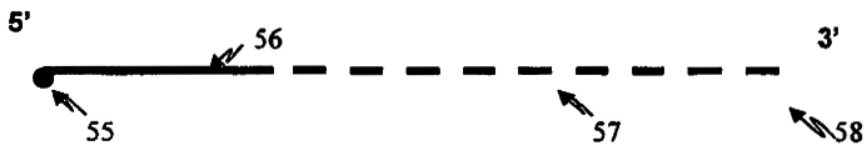


Figura 5B

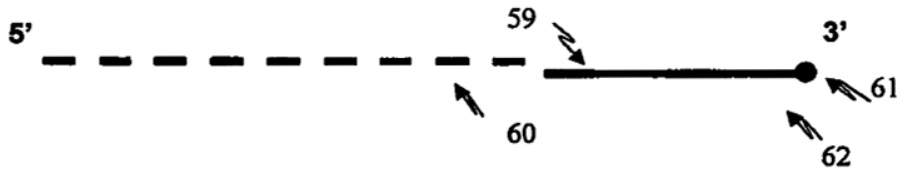


Figura 5C

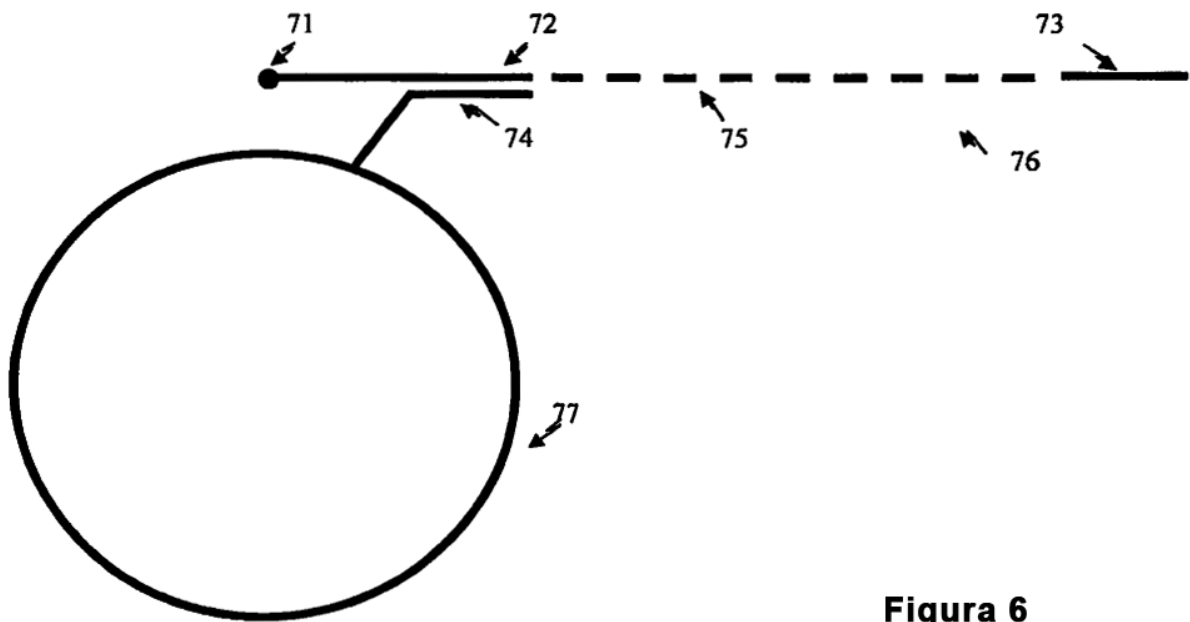


Figura 6

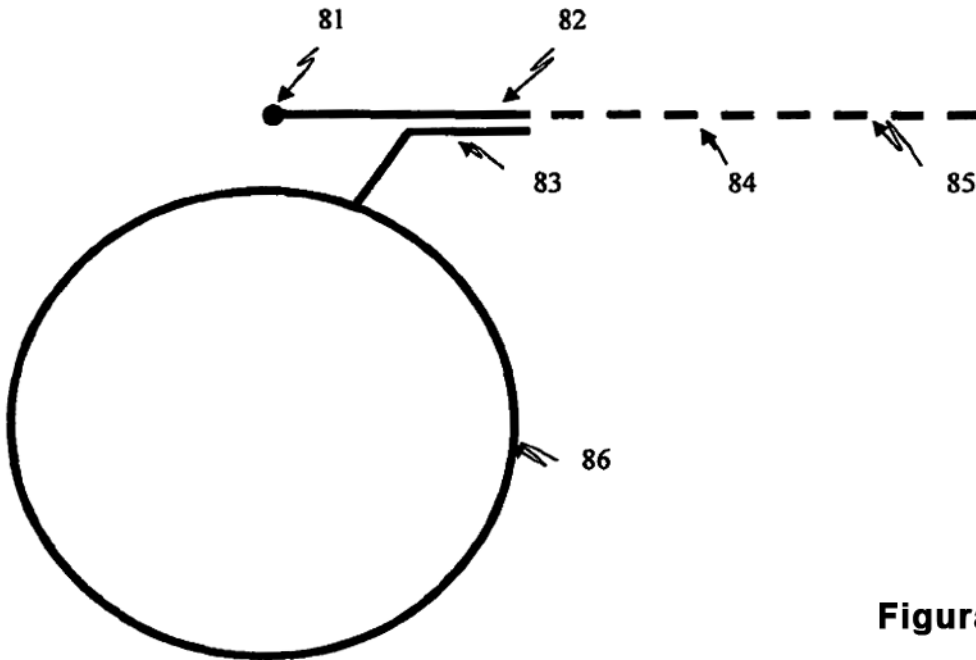


Figura 7

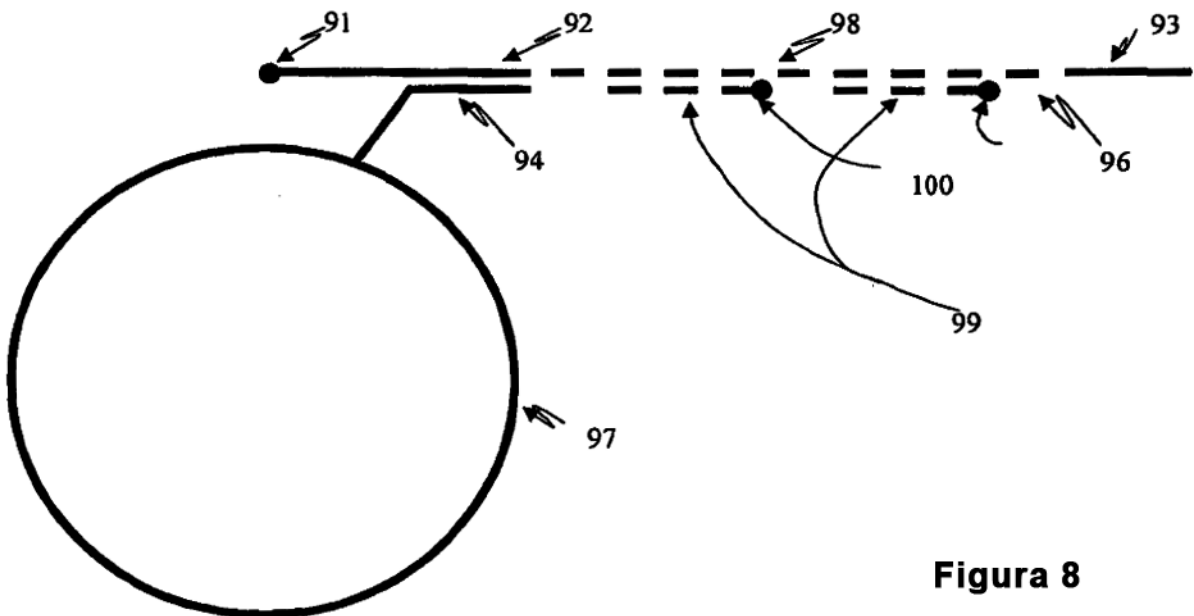


Figura 8

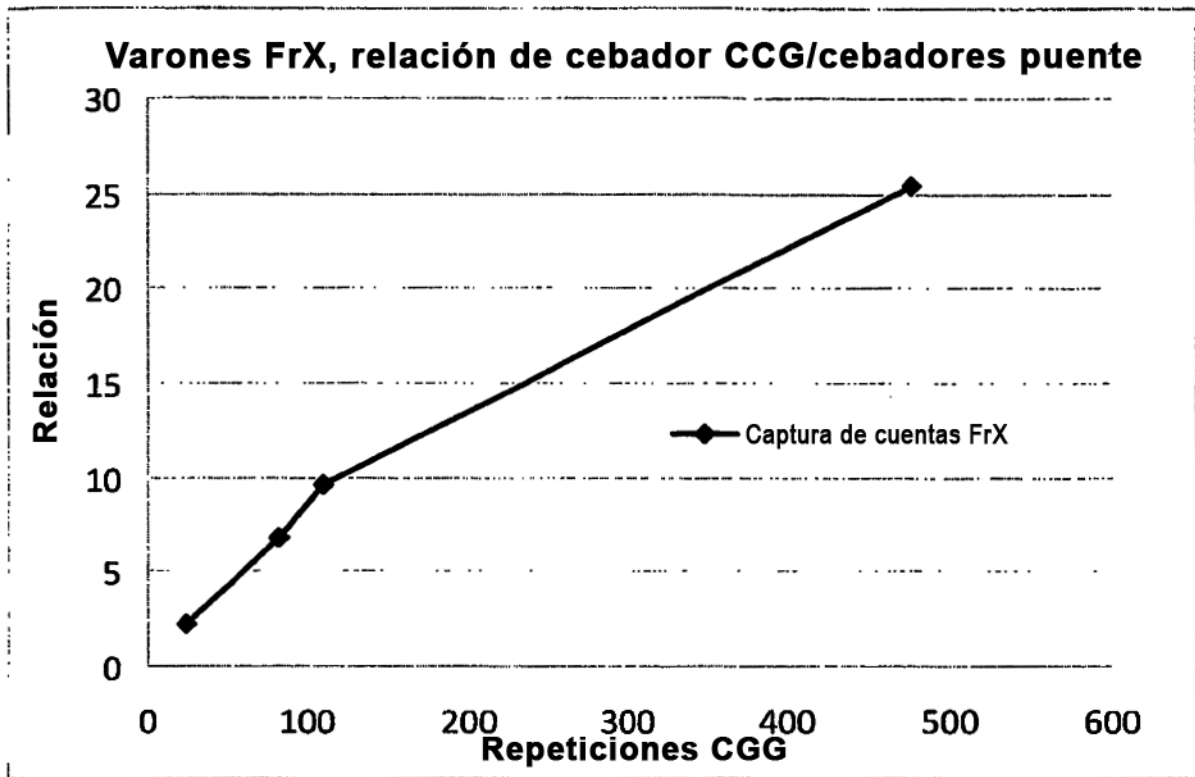


Figura 9

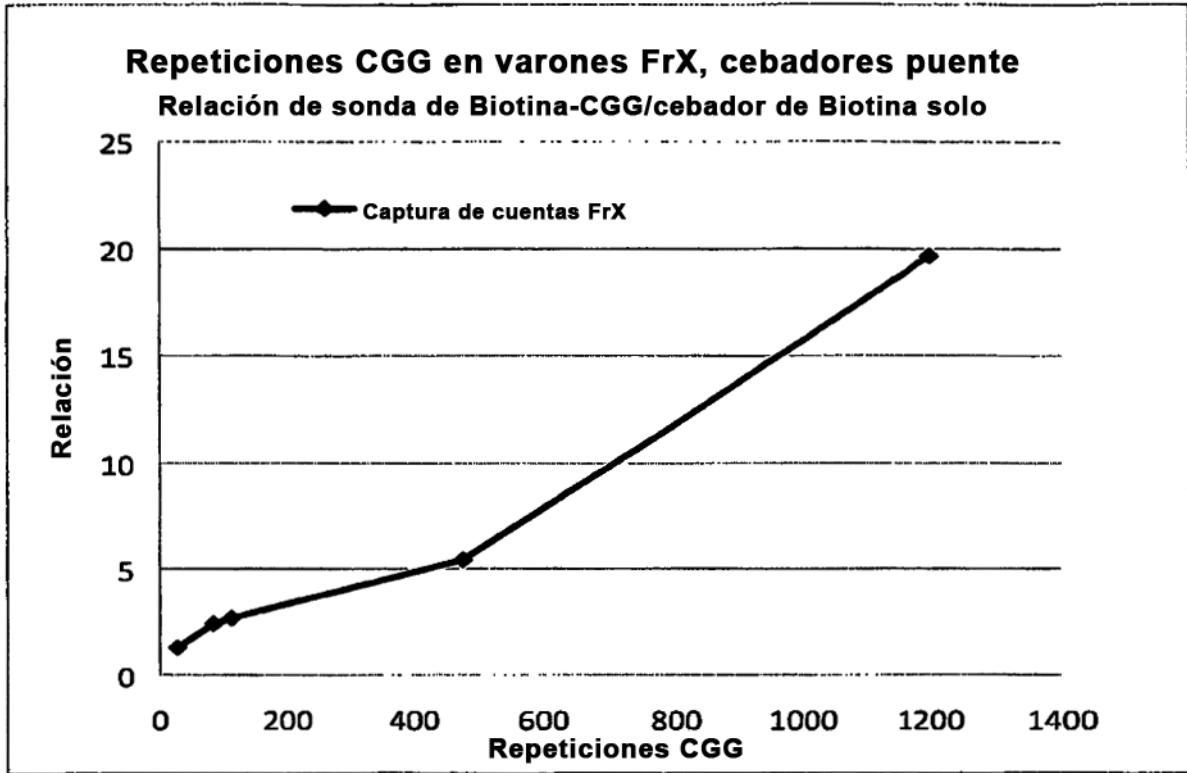


Figura 10

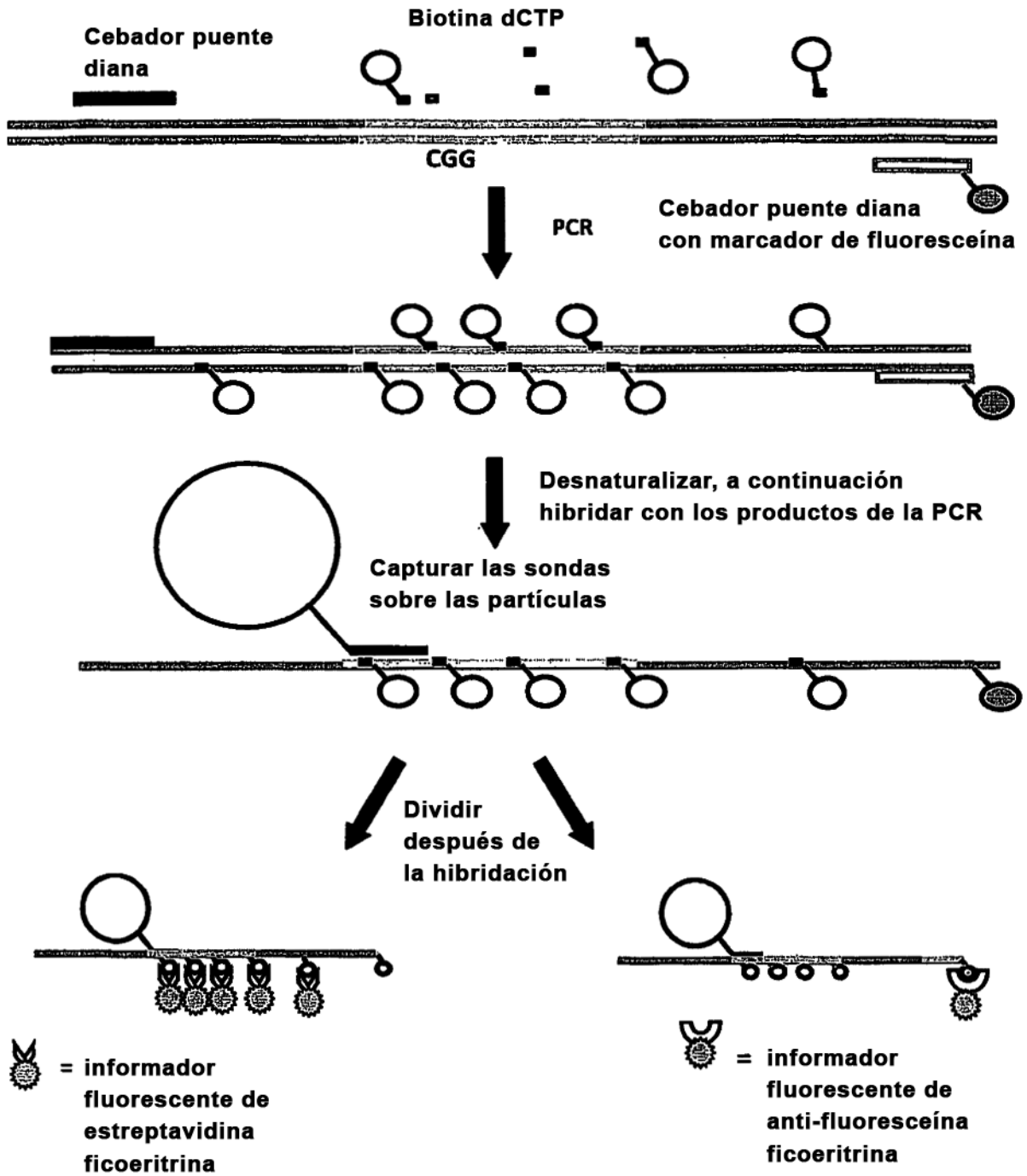


Figura 11

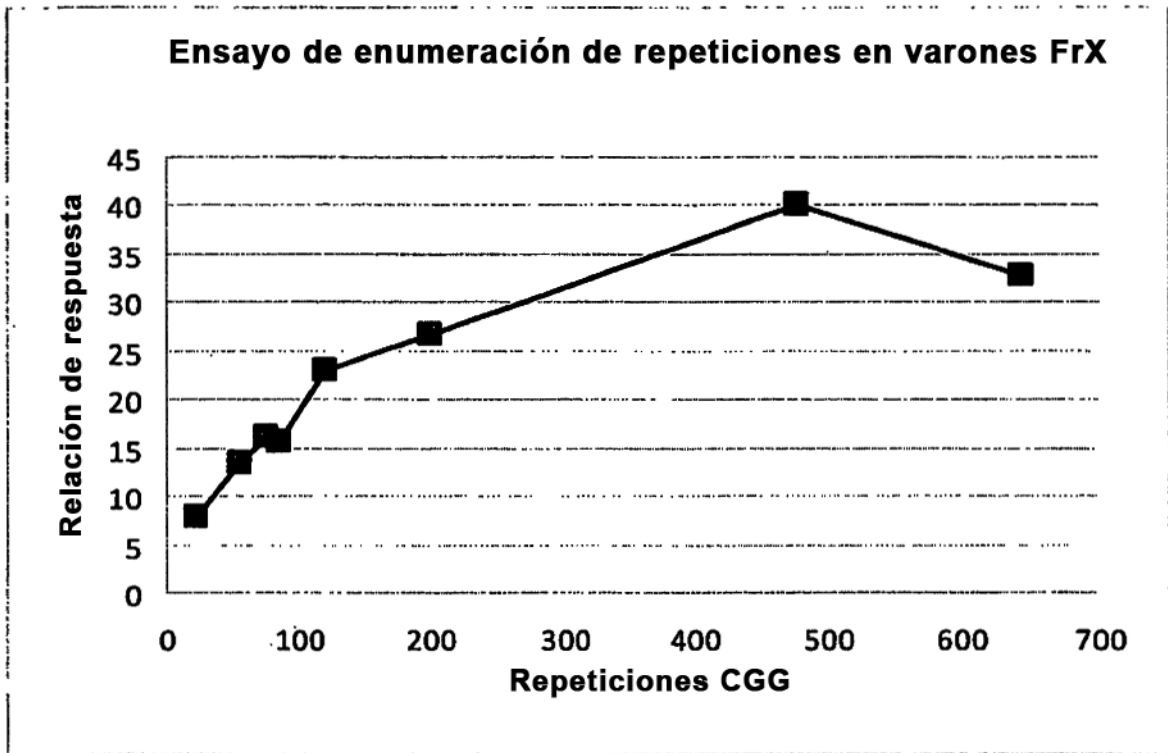


Figura 12A

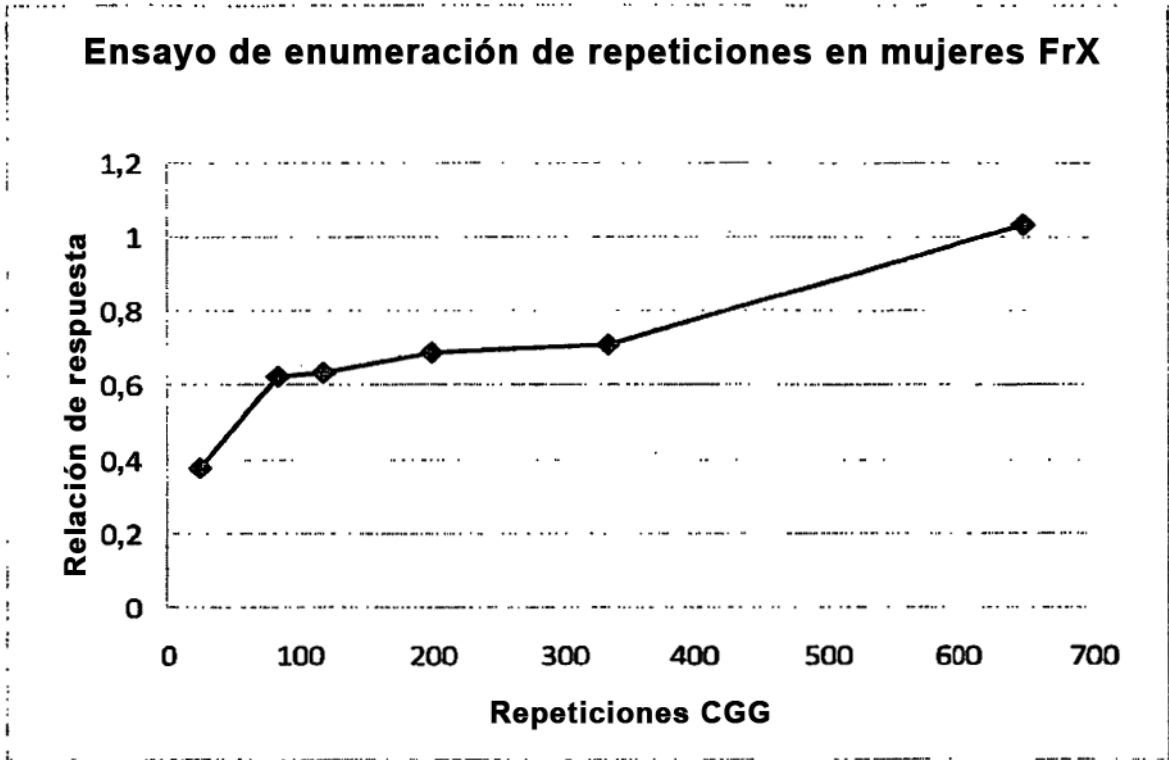


Figura 12B

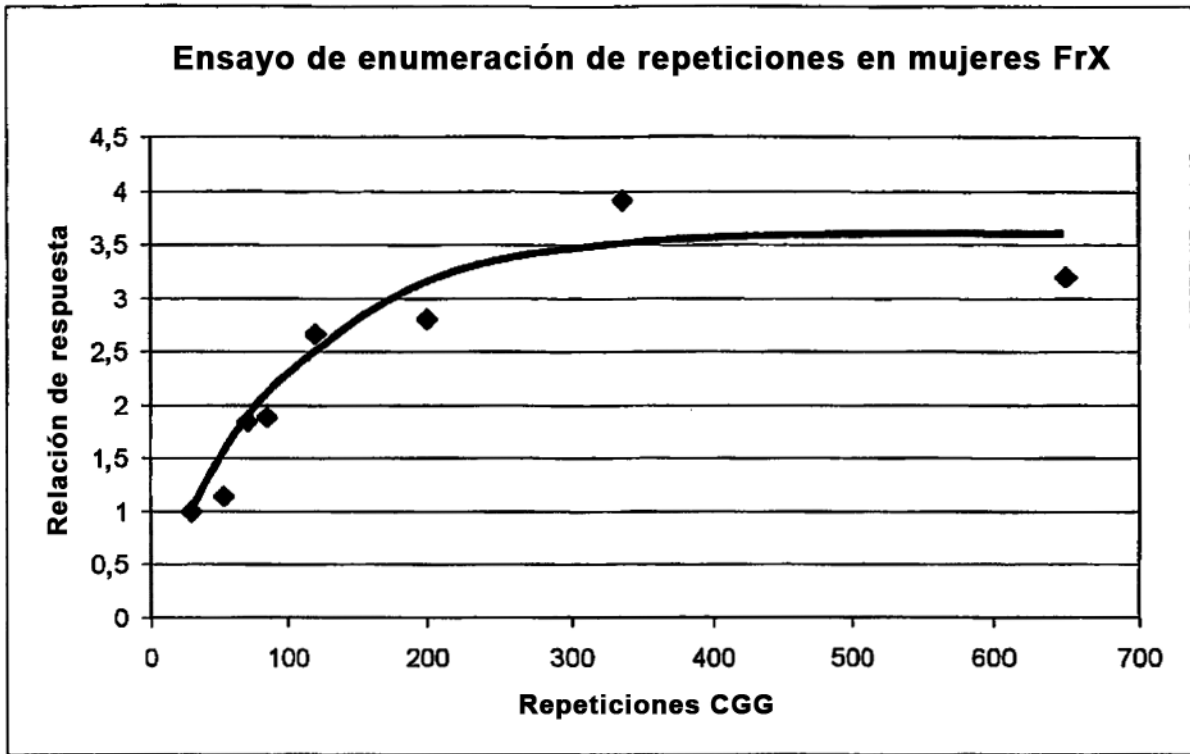


Figura 12C

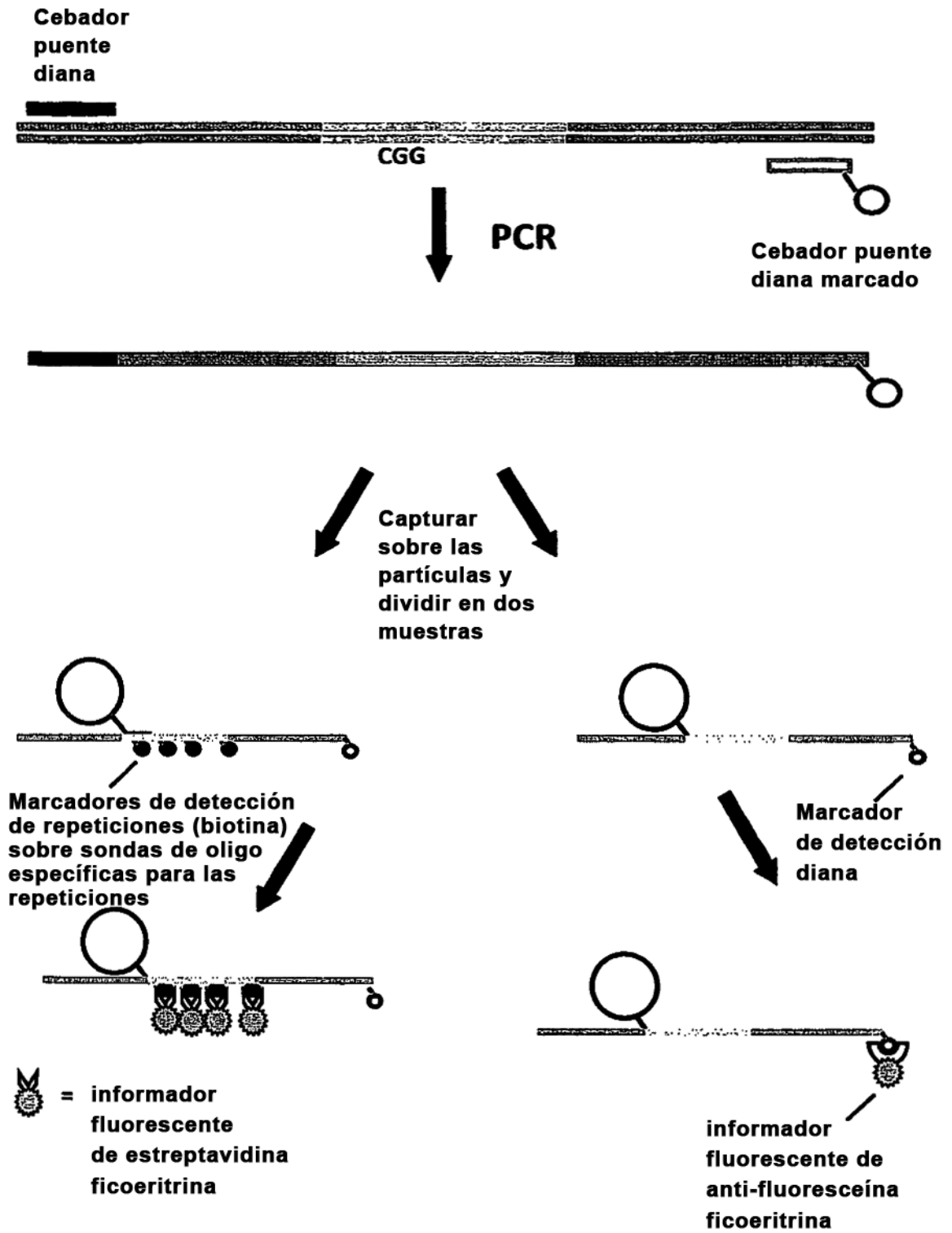


Figura 13