

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 733**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2002 PCT/US2002/33244**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2003 WO03033724**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2002 E 02801776 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 1444355**

54 Título: **Amplificación de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**15.10.2001 US 977868**

**18.10.2001 US 982212**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.07.2017**

73 Titular/es:

**QIAGEN GMBH (100.0%)**

**QIAGEN STRASSE 1**

**40724 HILDEN, DE**

72 Inventor/es:

**DEAN, FRANK, B.;**

**LASKEN, ROGER, S.;**

**FANG, LINHUA;**

**FARUQI, FAWAD, A.;**

**ALSMADI, OSAMA, A.;**

**DRISCOLL, MARK, D.;**

**HOSONO, SEIYU;**

**WISNIEWSKI, MICHELE y**

**SONG, WANMIN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 622 733 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

Amplificación de ácidos nucleicos

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud es una solicitud de continuación en parte en tramitación con la presente N.º 09/982,212, presentada el 18 de octubre de 2001, la cual es una continuación de la solicitud en tramitación con la presente N.º 09/977,868, presentada el 15 de octubre de 2001, las cuales se incorporan a la presente por referencia en su totalidad.

**Campo de la invención**

La invención descrita, en términos generales, pertenece al campo de la amplificación de ácidos nucleicos.

10 **Antecedentes de la invención**

Se han desarrollado una cantidad de métodos para la amplificación exponencial de ácidos nucleicos. Estos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la reacción en cadena de la ligasa (LCR, por sus siglas en inglés), la replicación de secuencias autosostenida (3SR, por sus siglas en inglés), la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA, por sus siglas en inglés), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, por sus siglas en inglés) y la amplificación con replicasa Q $\beta$  (Birkenmeyer y Mushahwar, *J. Virological Methods*, **35**:117-126; Landegren, *Trends Genetics* **9**:199-202 (1993)).

Fundamental para la mayoría de los análisis genéticos es la disponibilidad de ADN genómico de calidad y cantidad adecuada. Dado que el rendimiento del ADN a partir de muestras humanas es con frecuencia restrictivo, se ha dedicado un gran esfuerzo en métodos generales para propagar y almacenar ADN genómico. Los métodos incluyen la creación de líneas celulares transformadas con VEB o la amplificación del genoma completo (WGA, por sus siglas en inglés) mediante la PCR con cebado de oligonucleótidos degenerados o aleatorios. La PCR del genoma completo, una variante de la amplificación por PCR, implica el uso de cebadores aleatorios o parcialmente aleatorios para amplificar todo el genoma de un organismo en la misma reacción de PCR. Esta técnica se basa en tener una cantidad suficiente de cebadores de la secuencia aleatoria o parcialmente aleatoria de modo que los pares de cebadores se hibridarán a lo largo del ADN genómico a intervalos moderados. La replicación iniciada en los cebadores puede dar lugar luego a sitios de superposición de cadenas replicadas donde puede hibridarse otro cebador. Al someter la muestra genómica a múltiples ciclos de amplificación, las secuencias genómicas se amplificarán. La PCR del genoma completo tiene las mismas desventajas que las demás formas de PCR. Sin embargo, los métodos de WGA se ven afectados por su alto costo o cobertura insuficiente y tamaño de ADN promedio inadecuado (Telenius *et al.*, *Genomics*. 13:718-725 (1991); Cheung y Nelson, *Proc Natl Acad Sci EUA*. 93:14676-14679 (1996); Zhang *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EUA*. 89:5847-5851 (1992)).

Otra forma de amplificación de ácidos nucleicos que implica el desplazamiento de cadena ha sido descrita en la patente estadounidense N.º 6,124,120 para Lizardi. En una forma del método, se utilizan dos conjuntos de cebadores que son complementarios a las cadenas opuestas de secuencias de nucleótidos que flanquean una secuencia diana. La amplificación sigue mediante la replicación iniciada en cada cebador y continúa a través de la secuencia de ácido nucleico diana, es decir, que las crecientes cadenas encuentran y desplazan a las cadenas replicadas previamente. En otra forma del método, se utiliza un conjunto aleatorio de cebadores para cebar aleatoriamente una muestra de ácido nucleico genómico. Los cebadores en el conjunto son colectiva y aleatoriamente complementarios a las secuencias de ácido nucleico distribuidas en todo el ácido nucleico en la muestra.

La amplificación sigue mediante la replicación que se inicia en cada cebador y continúa de forma tal que las crecientes cadenas encuentran y desplazan a las cadenas replicadas adyacentes. En otra forma del método, el ADN concatenado se amplifica mediante síntesis de desplazamiento de cadena con un conjunto aleatorio de cebadores o cebadores complementarios a las secuencias enlazadoras entre el ADN concatenado. La síntesis procede desde los enlazadores, a través de una sección del ADN concatenado hacia el siguiente enlazador, y continúa más allá, es decir, que las cadenas crecientes encuentran y desplazan a las cadenas replicadas previamente.

**Breve compendio de la invención**

Se describen composiciones y un método para la amplificación de las secuencias de ácido nucleico de interés. El método se basa en la replicación con desplazamiento de cadena de las secuencias de ácido nucleico por parte de múltiples cebadores. El método descrito, denominado amplificación por desplazamiento múltiple (MDA, por sus siglas en inglés) mejora los métodos anteriores de replicación por desplazamiento de cadena. El método descrito implica generalmente poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promuevan la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas de modo que, durante la replicación, las cadenas replicadas se desplazan de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

En algunas formas del método descrito, se prepara una muestra genómica exponiendo las células a condiciones alcalinas, lisando así las células y provocando un lisado celular; reduciendo el pH del lisado celular para hacer que el pH del lisado celular sea compatible con la replicación del ADN; e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación del genoma de las células mediante amplificación por desplazamiento múltiple. Se ha descubierto que la lisis alcalina puede provocar menos daño al ADN genómico y que la lisis alcalina es compatible con la amplificación por desplazamiento múltiple. Las condiciones alcalinas pueden ser, por ejemplo, aquellas que provocan que se lise una cantidad sustancial de células o aquellas que provocan que se lise una cantidad suficiente de células. La cantidad de células lisadas puede considerarse suficiente si el genoma puede amplificarse suficientemente en el método descrito. La amplificación es suficiente si se produce suficiente producto de amplificación para permitir algún uso del producto de amplificación, tal como la detección de secuencias u otros análisis. La reducción en el pH se encuentra generalmente en el intervalo neutro de pH 9,0 a pH 6,0.

En algunas realizaciones, las células no se lisan por calor y/o los ácidos nucleicos en el lisado celular no se desnaturalizan mediante calentamiento. Los expertos en la técnica entenderán que diferentes células en distintas condiciones se lisarán a distintas temperaturas y así se pueden determinar las temperaturas y los tiempos en los cuales las células no se lisarán mediante calor. En general, las células no se someten al calentamiento por encima de una temperatura y durante un tiempo que provocaría una lisis celular sustancial en ausencia de las condiciones alcalinas utilizadas. En algunas realizaciones, las células y/o el lisado celular no se someten a un calentamiento sustancialmente por encima de la temperatura en la que crecen las células. En otras realizaciones, las células y/o el lisado celular no se someten a un calentamiento sustancialmente por encima de la temperatura de la reacción de amplificación (donde se replica el genoma). La reacción de amplificación por desplazamiento múltiple descrita se lleva a cabo generalmente a una temperatura sustancialmente constante (es decir, la reacción de amplificación es sustancialmente isotérmica) y esta temperatura se encuentra, generalmente, por debajo de la temperatura en la que los ácidos nucleicos se desnaturalizarían sustancial o considerablemente.

En algunas realizaciones, el lisado celular no se somete a purificación antes de la reacción de amplificación. En el contexto del método descrito, la purificación hace referencia, generalmente, a la separación de ácidos nucleicos de otro material en el lisado celular. Se ha descubierto que la amplificación por desplazamiento múltiple puede realizarse en muestras no purificadas o parcialmente purificadas. Se cree comúnmente que las reacciones de amplificación no se pueden llevar a cabo de manera eficiente utilizando ácido nucleico no purificado. En particular, la PCR es muy sensible a los contaminantes.

En algunas formas del método descrito, la muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. Se descubrió que no es necesario que los ácidos nucleicos diana, el ADN genómico, por ejemplo, sean desnaturalizados para una amplificación por desplazamiento múltiple eficiente. Se descubrió que eliminar una etapa de desnaturalización y las condiciones de desnaturalización tiene ventajas adicionales, por ejemplo, reducir el sesgo de secuencia en los productos amplificados. En otra realización, los cebadores pueden ser cebadores hexámeros. Se descubrió que dichos cebadores de 6 nucleótidos cortos pueden aún cebar la replicación por desplazamiento de cadena múltiple de manera eficiente. Dichos cebadores cortos son más fáciles de producir como un conjunto completo de cebadores de secuencia aleatoria (cebadores aleatorios) que los cebadores más largos porque hay menos especies separadas de cebadores en un grupo de cebadores más cortos. En otra realización, los cebadores pueden incluir cada uno al menos un nucleótido modificado, de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa. En otra realización, los cebadores pueden incluir cada uno al menos un nucleótido modificado, de modo que la temperatura de fusión del cebador se altera con respecto a un cebador de la misma secuencia sin el o los nucleótidos modificados. Para estas dos últimas realizaciones, se prefiere que los cebadores sean ARN modificado. En otra realización, la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi 29$ . Se descubrió que la ADN polimerasa  $\Phi 29$  produce mayor amplificación en la amplificación por desplazamiento múltiple. La combinación de dos o más de las características anteriores produce también mejores resultados en la amplificación por desplazamiento múltiple. En una realización preferida, por ejemplo, la muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, los cebadores son cebadores hexámeros y contienen nucleótidos modificados de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi 29$ . Las características anteriores son especialmente útiles en la amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo (WGSDA, por sus siglas en inglés).

En algunas formas del método descrito, el método incluye etiquetar las cadenas replicadas (es decir, las cadenas producidas en la amplificación por desplazamiento múltiple) usando la desoxinucleotidil transferasa terminal. Las cadenas replicadas pueden etiquetarse, por ejemplo, por medio de la adición de nucleótidos modificados, tales como nucleótidos biotinilados, nucleótidos fluorescentes, 5 metil dCTP, trifosfato de bromodeoxiuridina (BrdUTP), o 5-(3-aminoalil)-2'-deoxiuridina 5'-trifosfatos, a los extremos 3' de las cadenas replicadas. Las cadenas replicadas pueden etiquetarse también incorporando nucleótidos modificados durante la replicación. Las sondas replicadas de esta manera son particularmente útiles para la hibridación, lo que incluye el uso en formatos de micromatrices.

En una forma del método descrito, denominada amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo (WGSDA), se utiliza un conjunto aleatorio de cebadores para cebar aleatoriamente una muestra de ácido nucleico genómico (u otra muestra de ácido nucleico de alta complejidad). Al elegir un conjunto de cebadores suficientemente grande de secuencia aleatoria o parcialmente aleatoria, los cebadores en el conjunto serán, de forma conjunta y

aleatoria, complementarios a las secuencias de ácido nucleico distribuidas en todo el ácido nucleico en la muestra. La amplificación sigue mediante replicación con una polimerasa sumamente asociativa que se inicia en cada cebador y que continúa hasta la terminación espontánea. Una característica fundamental de este método es el desplazamiento de cebadores intervinientes durante la replicación por medio de la polimerasa. De esta manera, pueden sintetizarse múltiples copias superpuestas del genoma completo en poco tiempo. El método tiene ventajas con respecto a la reacción en cadena de la polimerasa dado que este puede llevarse a cabo en condiciones isotérmicas. Otras ventajas de la amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo incluyen un mayor nivel de amplificación que la PCR del genoma completo (hasta cinco veces mayor), la amplificación depende menos de la secuencia que la PCR y no hay ningún artefacto de realineación o artefactos para la transposición genética como puede ocurrir con la PCR (ya que no hay ningún ciclo de desnaturalización y realineación). En realizaciones preferidas de la WGSDA, la muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, los cebadores son cebadores hexámeros y contienen nucleótidos modificados de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi 29$ , o cualquier combinación de estas características.

En otra forma del método, denominada amplificación por desplazamiento de cadena múltiple (MSDA, por sus siglas en inglés), se utilizan dos conjuntos de cebadores, un conjunto derecho y un conjunto izquierdo. Los cebadores en el conjunto derecho pueden tener cada uno una parte complementaria a las secuencias de nucleótidos que flanquean un lado de una secuencia de nucleótidos diana y los cebadores en el conjunto izquierdo de cebadores pueden tener una parte complementaria a las secuencias de nucleótidos que flanquean el otro lado de la secuencia de nucleótidos diana. Los cebadores en el conjunto derecho son complementarios a una cadena de la molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos diana y los cebadores en el conjunto izquierdo son complementarios a la cadena opuesta. El extremo 5' de los cebadores en ambos conjuntos se encuentra distal con respecto a la secuencia de ácido nucleico de interés cuando los cebadores se hibridan con las secuencias flanqueantes en la molécula de ácido nucleico. Preferiblemente, cada miembro de cada conjunto tiene una parte complementaria a una secuencia de nucleótidos no superpuesta y separada que flanquea la secuencia de nucleótidos diana. La amplificación sigue mediante replicación iniciada en cada cebador y que continúa a través de la secuencia de ácido nucleico diana. En otra forma de MSDA, denominada MSDA lineal, la amplificación se realiza con un conjunto de cebadores complementarios a una sola cadena, lo que implica, por lo tanto, solamente una de las cadenas.

En otra forma del método, denominada amplificación por desplazamiento de cadena específico para el gen (GS-MSDA, por sus siglas en inglés) el ADN diana se digiere primero con una endonucleasa de restricción. Los fragmentos digeridos se ligan luego de extremo a extremo para formar círculos de ADN. Estos círculos pueden ser monómeros o concatémeros. Se utilizan dos conjuntos de cebadores para la amplificación, un conjunto derecho y un conjunto izquierdo. Los cebadores en el conjunto derecho pueden tener cada uno una parte complementaria a secuencias de nucleótidos que flanquean un lado de una secuencia de nucleótidos diana y los cebadores en el conjunto izquierdo de cebadores pueden tener cada uno una parte complementaria a secuencias de nucleótidos que flanquean el otro lado de la secuencia de nucleótidos diana. Los cebadores en el conjunto derecho son complementarios a una cadena de la molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos diana y los cebadores en el conjunto izquierdo son complementarios a la cadena opuesta. Los cebadores están diseñados para cubrir toda la secuencia que se necesita amplificar o una parte de esta. Preferiblemente, cada miembro de cada conjunto tiene una parte complementaria a una secuencia de nucleótidos no superpuesta y separada que flanquea la secuencia de nucleótidos diana. La amplificación sigue mediante la replicación iniciada en cada cebador y que continúa a través de la secuencia de ácido nucleico diana. En una forma de GS-MSDA, denominada GS-MSDA lineal, la amplificación se realiza con un conjunto de cebadores complementarios a una sola cadena, amplificando así solamente una de las cadenas. En otra forma de GS-MSDA, las secuencias de ADNc se pueden circularizar para formar círculos de ADN monocatenario. La amplificación se realiza luego con un conjunto de cebadores complementarios a un ADNc circular monocatenario.

Una característica fundamental de este método es el desplazamiento de cebadores intervinientes durante la replicación. Una vez que las cadenas de ácidos nucleicos alargadas desde el conjunto derecho de cebadores alcanzan la región de la molécula de ácido nucleico con la cual se hibrida el conjunto izquierdo de cebadores, y viceversa, se produce otra ronda de cebado y replicación. Esto permite que se sinteticen múltiples copias de un conjunto anidado de la secuencia de ácido nucleico en un período de tiempo corto. Al utilizar una cantidad suficiente de cebadores en los conjuntos derecho e izquierdo, se requieren solamente unas pocas rondas de replicación para producir cientos de miles de copias de la secuencia de ácido nucleico de interés. El método descrito tiene ventajas con respecto a la reacción en cadena de la polimerasa dado que este puede llevarse a cabo en condiciones isotérmicas. No es necesario ningún ciclo térmico porque la polimerasa que encabeza una cadena alargada (o una proteína de desplazamiento de cadena compatible) se desplazará, y, por lo tanto, pone a disposición para la hibridación, la cadena por delante de esta. Otras ventajas de la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple incluyen la capacidad de amplificar segmentos de ácido nucleico muy largos (en el orden de los 50 kilobases) y la amplificación rápida de segmentos más cortos (10 kilobases o menos). En la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple, los eventos de cebado único en sitios no deseados no conducirá a una amplificación hecha por el hombre en estos sitios (dado que la amplificación en el sitio deseado sobrepasará rápidamente la replicación de cadena simple en el sitio no deseado). En realizaciones preferidas de la MSDA, la muestra objetivo no se somete a

condiciones de desnaturalización, los cebadores son cebadores hexámeros y contienen nucleótidos modificados de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi 29$ , o cualquier combinación de estas características.

5 En realizaciones preferidas de la WGSDA, la muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, los cebadores son cebadores hexámeros y contienen nucleótidos modificados de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi 29$ , o cualquier combinación de estas características.

10 Después de la amplificación, las secuencias amplificadas se pueden utilizar con cualquier propósito, tal como para usos conocidos y establecidos para las secuencias amplificadas por PCR. Por ejemplo, las secuencias amplificadas pueden detectarse usando cualquiera de los sistemas de detección convencionales para ácidos nucleicos tales como la detección de etiquetas fluorescentes, los sistemas de detección ligado a enzimas, la detección de etiquetas mediada por anticuerpos y la detección de etiquetas radioactivas. Una forma preferida de etiquetar implica etiquetar las cadenas replicadas (es decir, las cadenas producidas en la amplificación por desplazamiento múltiple) usando la desoxinucleotidil transferasa terminal. Las cadenas replicadas pueden etiquetarse, por ejemplo, por medio de la adición de nucleótidos modificados, tales como nucleótidos biotinilados, nucleótidos fluorescentes, 5 metil dCTP, BrdUTP, o 5-(3-aminoalil)-2'-deoxiuridina 5'-trifosfatos, a los extremos 3' de las cadenas replicadas.

20 En el método descrito la amplificación no se produce en círculos sino en una replicación isotérmica continua. Esto hace que la amplificación sea menos complicada y mucho más consistente en la producción. El desplazamiento de cadena permite la rápida generación de múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico o muestra en una reacción isotérmica, continua y única. El ADN que se produjo usando el método descrito se puede utilizar luego para cualquier propósito o en cualquier otro método deseado. Por ejemplo, la PCR se puede utilizar para amplificar adicionalmente cualquier secuencia de ADN específica que haya sido amplificada previamente mediante el método de desplazamiento de cadena del genoma completo.

25 El análisis genético se debe realizar frecuentemente con ADN proveniente de muestras biológicas, tal como sangre, células de cultivo tisular, hisopos bucales, enjuague bucal, heces, fragmentos de tejido, aspiración por biopsia y muestras arqueológicas tales como hueso o tejido momificado. En algunos casos, las muestras son demasiado pequeñas para extraer una cantidad suficiente de ADN puro y es necesario llevar a cabo ensayos basados en el ADN directamente desde la muestra no procesada. Asimismo, lleva mucho tiempo aislar el ADN puro y por eso el método descrito, que puede amplificar el genoma directamente a partir de las muestras biológicas, representa una mejora sustancial.

30 El método descrito presenta varias ventajas diferentes con respecto a las metodologías actuales. El genoma puede amplificarse directamente a partir de la sangre completa o las células cultivadas con técnicas simples de lisis celular tal como el tratamiento de KOH. La PCR y otros métodos de amplificación del ADN se ven seriamente obstaculizados por los contenidos celulares y, por lo tanto, es necesaria la purificación del ADN antes de la amplificación y la prueba. Por ejemplo, el hemo presente en las células sanguíneas lisadas inhibe la PCR. Por el contrario, la forma descrita de la amplificación del genoma completo puede realizarse en lisados brutos sin necesidad de separar físicamente el ADN mediante procedimientos de extracción y precipitación miniprep o con métodos de cartucho giratorio o columna.

35 Las bacterias, hongos y virus pueden estar todos implicados en las infecciones hospitalarias. La identificación de patógenos hospitalarios al nivel de subespecies requiere de técnicas discriminatorias sofisticadas. Dichas técnicas utilizan métodos tradicionales, así como moleculares para la tipificación. Algunas técnicas tradicionales son el ensayo de sensibilidad antimicrobiana, la determinación de la capacidad de utilizar sustratos bioquímicos y el serotipado. Una limitación importante de estas técnicas es que estas demoran varios días en completarse, dado que estas exigen cultivos bacterianos puros. Debido a que dichas técnicas son prolongadas y que incluso las bacterias pueden no ser viables en las muestras clínicas, existe la necesidad de tener un método rápido y confiable para la identificación de especies bacterianas.

40 Algunos de los métodos moleculares basados en el ADN para la identificación de especies bacterianas son el análisis de macrorestricción (MRA, por sus siglas en inglés) seguido de la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés), el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés) y la PCR con cebado arbitrario (AP-PCR, por sus siglas en inglés) (Tenover et al., J. Clin. Microbiol. 32:407-415 (1994) y Pruckler et al., J. Clin. Microbiol. 33:2872-2875 (1995)). Estas técnicas moleculares son trabajosas y difíciles de estandarizar entre los distintos laboratorios.

45 El método descrito proporciona un método alternativo y útil para identificar cepas bacterianas mediante la amplificación del ADN microbiano de análisis. A diferencia de la PCR (Lantz et al., Biotechnol. Amiu. Rev. 5:87-130 (2000)), el método descrito es rápido, objetivo, reproducible y capaz de amplificar grandes segmentos de ADN a partir de genomas bacterianos, virales o fúngicos.

El método descrito puede utilizarse, por ejemplo, para obtener suficiente ADN de organismos no cultivables para la secuenciación u otros estudios. La mayoría de los microorganismos no pueden propagarse fuera de su entorno

natural y, por lo tanto, sus ácidos nucleicos no se pueden secuenciar. Muchos de los organismos no cultivables viven en condiciones extremas, lo cual hace que su complemento genético sea de interés para los investigadores. Otros microorganismos viven en comunidades que juegan un papel vital en determinados ecosistemas. Los organismos individuales o las comunidades enteras de organismos pueden amplificarse y secuenciarse de forma individual o conjunta.

Las proteínas recombinantes se pueden purificar a partir de una biomasa grande crecida a partir de cepas bacterianas o de levadura que albergan vectores de expresión deseados. Puede resultar deseable un alto grado de pureza para la proteína recombinante aislada, que requiere de un procedimiento sensible para detectar los niveles de trazas de la proteína o contaminantes de ADN. El método descrito es una reacción de amplificación de ADN que es sumamente fuerte incluso en presencia de niveles bajos de plantilla de ADN y puede utilizarse para monitorear las preparaciones de proteína recombinante para pequeñas cantidades de ADN genómico de levadura o bacteriano contaminante.

La amplificación del material forense para pruebas basadas en RFLP es una aplicación útil para el método descrito.

Se describe también un método para amplificar y reparar el ADN dañado. Este método es útil, por ejemplo, para amplificar el ADN genómico degradado. El método implica desnaturalizar sustancialmente una muestra de ADN dañado (generalmente mediante exposición al calor y condiciones alcalinas), quitar o reducir las condiciones de desnaturalización (tales como a través de la reducción del pH y la temperatura de la muestra de ADN desnaturalizada) y replicar el ADN. El ADN dañado se repara durante la replicación al aumentar la longitud promedio del ADN dañado. Por ejemplo, la longitud promedio de los fragmentos de ADN puede aumentarse, por ejemplo, de 2 kb en la muestra de ADN dañado hasta, por ejemplo, 10 kb o más para el ADN replicado. Este método de reparación puede provocar una mejora general en la amplificación del ADN dañado aumentando la longitud promedio del producto, aumentando la calidad de los productos de amplificación 3 veces (por ejemplo, aumentando la representación del marcador en la muestra), y mejorando el genotipo de los productos amplificados al reducir la frecuencia de la disminución alélica; todo en comparación con los resultados cuando se amplifica el ADN dañado por medio de otros métodos. La eliminación de las condiciones de desnaturalización puede permitir que las cadenas desnaturalizadas del ADN dañado se hibriden con el otro ADN dañado desnaturalizado. La replicación puede ser la amplificación por desplazamiento múltiple. La desnaturalización sustancial y la desnaturalización temporal de las muestras de ADN se realiza generalmente de modo tal que el ADN no resulte aún más dañado. Este método puede combinarse o utilizarse generalmente con cualquiera de los métodos de amplificación descritos.

Un objetivo de la invención descrita es proporcionar un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana en una reacción isotérmica continua.

Otro objetivo de la invención descrita es proporcionar un método para amplificar un genoma completo u otra muestra de ácido nucleico sumamente compleja en una reacción isotérmica continua.

Otro objetivo de la invención descrita es proporcionar un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana donde se producen múltiples copias de la secuencia de ácido nucleico diana en un único ciclo de amplificación.

Otro objetivo de la invención descrita es proporcionar un método para amplificar un ADN concatenado en una reacción isotérmica continua.

Otro objetivo de la invención descrita es proporcionar un kit para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana en una reacción isotérmica continua.

Otro objetivo de la invención descrita es proporcionar un kit para amplificar un genoma completo u otra muestra de ácido nucleico sumamente compleja en una reacción isotérmica continua.

#### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es una gráfica de la síntesis de ADN (en  $\mu\text{g}$ ) en función del tiempo (en horas) que utiliza diferentes cantidades de ácido nucleico para su amplificación en el método descrito.

La Figura 2 es una gráfica del efecto del tiempo de incubación a 95 °C sobre la longitud del ADN de plantilla.

La Figura 3 es una gráfica del efecto del tiempo de incubación a 95 °C sobre la velocidad y producción de la MDA.

La Figura 4 es una gráfica del efecto del tiempo de incubación a 95 °C sobre el tamaño promedio de las cadenas del producto de ADN.

La Figura 5 es una gráfica que muestra una comparación del efecto de la incubación de plantilla a 95 °C en función de la no incubación a 95 °C en la representación del locus en el ADN amplificado mediante la MDA.

Las Figuras 6A, 6B y 6C son gráficas que muestran el efecto de la amplificación en el sesgo de representación

génica para tres procedimientos de amplificación diferentes, MDA, DOP-PCR y PEP.

La Figura 7 es una gráfica que muestra la amplificación de secuencias c-jun mediante el uso de cebadores anidados.

5 La Figura 8 es una gráfica de la representación relativa de ocho loci para el ADN a partir de cinco reacciones de amplificación diferentes. El eje Y es la representación del locus, expresada como porcentaje, con respecto al ADN genómico de entrada, que se calcula como el rendimiento del producto de PCR cuantitativa a partir de 1 µg de ADN amplificado dividido por el rendimiento de 1 µg de control de ADN genómico.

10 La Figura 9 es una gráfica que muestra una comparación del porcentaje de representación para 8 loci para el ADN amplificado en una reacción que contiene 100 % de dTTP y ADN amplificado en una reacción que contiene 30 % de dTTP /70 % de AAdUTP.

La Figura 10 es una gráfica que muestra la amplificación de secuencias c-jun mediante el uso de una plantilla genómica circularizada. El eje Y es la representación del locus, expresada como porcentaje, con respecto al ADN genómico de entrada, que se calcula como el rendimiento del producto de PCR cuantitativa a partir de 1 µg de ADN amplificado dividido por el rendimiento de 1 µg de control de ADN genómico.

15 La Figura 11 es una gráfica que muestra una comparación del porcentaje de representación para 8 loci en el ADN amplificado mediante el uso de cebadores específicos para c-jun y diana de ADN circularizado.

La Figura 12 es una gráfica del porcentaje de representación del locus de diferentes muestras de ADN expuestas a diferentes tratamientos (tratamientos de control o reparación).

20 La Figura 13 es una gráfica del porcentaje de representación del locus de 40 muestras con o sin tratamiento de reparación.

### Descripción detallada de la invención

El método descrito utiliza determinados materiales y procedimientos que permiten la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos y genomas completos u otras muestras de ácidos nucleicos altamente complejas. A continuación, se describen en forma detallada estos materiales y procedimientos.

#### 25 Materiales

##### A. Secuencia diana

La secuencia diana, que es el objetivo de la amplificación, puede ser cualquier ácido nucleico. La secuencia diana puede incluir múltiples moléculas de ácido nucleico tal como en el caso de la amplificación del genoma completo, múltiples sitios en una molécula de ácido nucleico o una única región de una molécula de ácido nucleico. Para la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple, generalmente, la secuencia diana es una región única en una molécula de ácido nucleico o muestra de ácido nucleico. Para la amplificación del genoma completo, la secuencia diana es el genoma completo o muestra de ácido nucleico. Una muestra objetivo puede ser cualquier muestra de ácido nucleico de interés. Se conocen la fuente, la identidad y la preparación de muchas de estas muestras de ácido nucleico. Se prefiere que las muestras de ácido nucleico conocidas o identificadas para su uso en los métodos de amplificación o detección sean utilizadas para el método descrito en la presente. La muestra de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, una muestra de ácido nucleico de una o más células, tejidos o fluidos corporales como sangre, orina, semen, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo o líquido amniótico u otras muestras biológicas tales como células de cultivo tisular, exudados bucales, enjuagues bucales, heces, cortes tisulares, biopsia aspirativa y muestras arqueológicas, por ejemplo, tejido óseo o momificado. Los tipos de muestras diana útiles incluyen muestras de sangre, muestras de orina, muestras de semen, muestras de líquido linfático, muestras de líquido cefalorraquídeo, muestras de líquido amniótico, muestras de biopsia, muestras de biopsia aspirativa con aguja, muestras de cáncer, muestras de tumores, muestras de tejidos, muestras de células, muestras de lisados celulares, muestras de lisados celulares en bruto, muestras forenses, muestras arqueológicas, muestras de infecciones, muestras de infecciones hospitalarias, muestras de producción, muestras de preparación de fármacos, muestras de producción de moléculas biológicas, muestras de preparación de proteínas, muestras de preparación de lípidos y/o muestras de preparación de carbohidratos.

Para la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple, las secuencias diana preferidas son aquellas que son difíciles de amplificar mediante el uso de PCR debido, por ejemplo, a la longitud o composición. Para la amplificación del genoma completo, las secuencias diana preferidas son muestras de ácido nucleico de una única célula. Para la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple del ADN concatenado la diana es el ADN concatenado. La secuencia diana puede ser una o ambas cadenas del ADNc. Las secuencias diana para uso en el método descrito forman parte preferiblemente de moléculas de ácido nucleico o muestras que con complejas y no repetitivas (con la excepción de los enlazadores en el ADN concatenado con enlazador y secciones de ADN repetitivo en el ADN genómico).

Los ácidos nucleicos diana pueden incluir ADN dañado y muestras de ADN dañado. Por ejemplo, la preparación de muestras de ADN genómico puede provocar daño al ADN genómico (por ejemplo, degradación y fragmentación). Esto puede hacer que la amplificación del genoma o secuencias en este sea más difícil y proporciona menos resultados confiables (por ejemplo, provocando la amplificación de muchas secuencias genómicas fragmentadas y parciales). El ADN dañado y las muestras de ADN dañado son, por lo tanto, útiles para el método descrito para amplificar el ADN dañado. Se puede utilizar cualquier ADN degradado, fragmentado o de otra manera dañado o muestra que contenga dicho ADN en el método descrito.

#### 1. Secuencias diana para la amplificación por desplazamiento de cadena

Aunque se pueden amplificar múltiples sitios en una muestra de ácido nucleico de forma simultánea en la misma reacción de MSDA, para simplificar, el siguiente análisis hará referencia a las características de una única secuencia de ácido nucleico de interés que será amplificada. Esta secuencia se denomina en la presente «secuencia diana». Se prefiere que una secuencia diana para la MSDA incluya dos tipos de regiones diana, una diana de amplificación y una diana de hibridación. La diana de hibridación incluye las secuencias en la secuencia diana que son complementarias a los cebadores en un conjunto de cebadores. La diana de amplificación es la parte de la secuencia diana que se debe amplificar. Con esta finalidad, la diana de amplificación es preferiblemente posterior o está flanqueada por la o las dianas de hibridación. No hay ningún requisito estructural o secuencia específica para elegir una secuencia diana. La diana de hibridación y la diana de amplificación dentro de la secuencia diana se definen en términos de la relación de la secuencia diana con respecto a los cebadores en un conjunto de cebadores. Los cebadores están diseñados para que coincidan con la secuencia diana elegida. Aunque se prefiere, no es necesario que las secuencias que se van a amplificar y los sitios de hibridación de los cebadores estén separados, dado que se amplificarán las secuencias en los sitios y alrededor de estos donde se hibridan los cebadores.

En la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple del ADN circularizado, los fragmentos de ADN circulares son las dianas de amplificación. Las dianas de hibridación incluyen las secuencias que son complementarias a los cebadores utilizados para la amplificación. Una forma de ADN circular para la amplificación es el ADNc circularizado.

En la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple del ADN concatenado con enlazadores, los fragmentos de ADN unidos por los enlazadores son las dianas de amplificación y los enlazadores son la diana de hibridación. Las dianas de hibridación (es decir, los enlazadores) incluyen las secuencias que son complementarias a los cebadores utilizados para la amplificación. Una forma de ADN concatenado para la amplificación es el ADNc concatenado.

#### B. Cebadores

Los cebadores para uso en el método de amplificación descrito son oligonucleótidos que tienen una secuencia complementaria a la secuencia diana. A esta secuencia se la conoce como la parte complementaria del cebador. La parte complementaria de un cebador puede tener cualquier longitud que apoye la hibridación específica y estable entre el cebador y la secuencia diana conforme a las condiciones de reacción. Generalmente, para las reacciones a 37 °C, esta puede tener una longitud de 10 a 35 nucleótidos o una longitud de 16 a 24 nucleótidos. Para la amplificación del genoma completo, los cebadores pueden tener una longitud de 5 a 60 nucleótidos, y en particular, pueden tener una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y/o 20 nucleótidos.

Para algunas formas del método descrito, tales como aquellas que usan cebadores o secuencia degenerada o aleatoria (es decir, el uso de una colección de cebadores que tienen una variedad de secuencias), la hibridación de cebadores no necesita ser específica. En dichos casos, los cebadores necesitan ser efectivos solamente en la síntesis de cebado. Por ejemplo, en la amplificación del genoma completo la especificidad del cebado no es esencial dado que el objetivo, por lo general, es simplificar todas las secuencias por igual. Los conjuntos de cebadores aleatorios o degenerados pueden estar compuestos por cebadores de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y/o 20 nucleótidos de longitud o más. A los cebadores de seis nucleótidos de longitud se los conoce como cebadores hexámeros. Los cebadores preferidos para la amplificación del genoma completo son cebadores hexámeros aleatorios, por ejemplo, cebadores hexámeros aleatorios donde cada posible secuencia de seis nucleótidos está representada en el conjunto de cebadores. De manera similar, los conjuntos de cebadores aleatorios de otras longitudes particulares, o de una mezcla de longitudes contienen preferiblemente cada secuencia posible la longitud del cebador o, en particular, la longitud de la parte complementaria del cebador. Se describe el uso de los cebadores aleatorios en la patente estadounidense N.º 5,043,272 y la patente estadounidense N.º 6,214,587.

Los cebadores descritos pueden presentar uno o más nucleótidos modificados. En la presente se hace referencia a dichos cebadores como cebadores modificados. Los cebadores modificados presentan varias ventajas. En primer lugar, algunas formas de cebadores modificados, tal como los cebadores quiméricos de ARN/2'-0-metilo ARN, tienen una mayor temperatura de fusión ( $T_m$ , por sus siglas en inglés) que los cebadores de ADN. Esto aumenta la estabilidad de la hibridación del cebador y aumentará la invasión de cadena por parte de los cebadores. Esto conducirá a un cebado más eficiente. Además, dado que los cebadores están hechos de ARN, estos serán resistentes a la exonucleasa. Dichos cebadores, si se etiquetan con aglutinantes de surco menor en su extremo 5' tendrán también una mejor invasión de la cadena de ADNcd de plantilla. Además, los cebadores de ARN pueden ser

también muy útiles para la WGA a partir de muestras biológicas tales como células o tejido. Dado que las muestras biológicas contienen ARN endógeno, este ARN puede degradarse con RNasa para generar un conjunto de oligómeros aleatorios, el cual puede usarse luego para cebar la polimerasa para la amplificación del ADN. Esto elimina toda necesidad de agregar cebadores a la reacción. De manera alternativa, la digestión de la DNasa de muestras biológicas puede generar un conjunto de cebadores oligo de ADN para la amplificación de ADN dependiente del ARN.

También es posible emplear cebadores quiméricos. Los cebadores quiméricos son cebadores que tienen al menos dos tipos de nucleótidos, por ejemplo, desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, ribonucleótidos y nucleótidos modificados o dos tipos diferentes de nucleótidos modificados. Una forma de cebador quimérico son los cebadores de ácido nucleico/ácido péptidonucleico. Por ejemplo, los cebadores 5'-PNA-ADN-3' o 5'-PNA-ARN-3' pueden ser utilizados para una invasión de polimerización o invasión de cadena más eficaz. Las partes del ADN y ARN de dichos cebadores pueden tener secuencias aleatorias o degeneradas. Otras formas de cebadores quiméricos son, por ejemplo, 5'-(2'-O-Metilo)ARN-ARN-3' o 5'-(2'-O-Metilo)ARN-ADN-3'.

Se conocen muchos nucleótidos modificados (análogos de nucleótidos) y pueden ser utilizados en oligonucleótidos. Un análogo de nucleótido es un nucleótido que contiene algún tipo de modificación, ya sea en los restos básicos, de azúcares o de fosfatos. Las modificaciones al resto básico incluirían modificaciones naturales y sintéticas de A, C, G y T/U, así como diferentes bases purinas o pirimidinas, tal como uracil-5-ilo, hipoxantina-9-ilo (I) y 2-aminoadenin-9-ilo. Una base modificada incluye, pero no se limita a 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-substituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos 5-substituidos y citosina, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Se pueden encontrar otras modificaciones de base, por ejemplo, en la patente estadounidense N.º 3,687,808, Englisch et al., *Angewandte Chemie*, edición internacional, 1991, 30, 613, y Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, páginas 289-302, Croolce, S. T. y Lebleu, B. ed., CRC Press, 1993. Determinados análogos de nucleótidos, tales como pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. La 5-metilcitosina puede aumentar la estabilidad de la formación de dúplex. Otras bases modificadas son aquellas que funcionan como bases universales. Las bases universales incluyen 3-nitropirrollo y 5-nitroindolo. Las bases universales sustituyen las bases normales, pero no tienen preferencias en el apareamiento de bases. Esto quiere decir que las bases universales pueden aparearse con cualesquiera otras bases. Los cebadores compuestos, en parte o en su totalidad, por nucleótidos con bases universales son útiles para reducir o eliminar el sesgo de amplificación contra las secuencias repetidas en una muestra objetivo. Esto sería útil, por ejemplo, cuando no se desea una pérdida de complejidad de la secuencia en los productos amplificados. A menudo, las modificaciones de bases pueden combinarse, por ejemplo, con una modificación de azúcar, tal como 2'-O-metoxietilo, para lograr propiedades únicas tales como mayor estabilidad de dúplex. Existen numerosas patentes estadounidenses tales como 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617 y 5,681,941, en las que se detalla y describe una variedad de modificaciones de bases. Cada una de dichas patentes se incorpora a la presente por referencia.

Los análogos de nucleótidos también pueden incluir modificaciones del resto de azúcar. Las modificaciones del resto de azúcar incluirían modificaciones naturales de la ribosa y la desoxirribosa, así como modificaciones sintéticas. Las modificaciones de azúcares incluyen, pero no se limitan a, las siguientes modificaciones en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueno y alquino pueden estar sustituidos o no sustituidos por alquilo C1 a C10, o alqueno y alquino C2 a C10. Las modificaciones de azúcares 2' incluyen también pero no se limitan a -O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> O]<sub>m</sub> CH<sub>3</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> OCH<sub>3</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> NH<sub>2</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> CH<sub>3</sub>, -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> -ONH<sub>2</sub> y -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, donde n y m son de aproximadamente 1 a aproximadamente 10.

Otras modificaciones en la posición 2' incluyen, pero no se limitan a: alquilo inferior de C1 a C10, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes con propiedades similares. Pueden realizarse también modificaciones similares en otras posiciones en el azúcar, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en los oligonucleótidos unidos en la posición 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los azúcares modificados también incluirían los que contienen modificaciones en el oxígeno del anillo que forma un puente, tales como CH<sub>2</sub> y S. Los análogos de azúcares de nucleótidos también pueden presentar miméticos de azúcares tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Existe gran cantidad de patentes estadounidenses que presentan información sobre la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas, tales como 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427;

5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633 y 5,700,920, cada una de las cuales se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

Los análogos de nucleótidos también pueden modificarse en el resto fosfato. Los restos fosfato modificados incluyen, pero no se limitan a, aquellos que pueden ser modificados de forma tal que el enlace entre dos nucleótidos contenga un fosforotioato, fosforotioato quirál, fosforoditioato, fosforotriéster, aminoalquilfosforotriéster, fosfonatos de metilo y otros alquilo que incluyen 3'alquilenfosfonato y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos. Se entiende que estos enlaces fosfato o fosfato modificados entre dos nucleótidos pueden establecerse a través de un enlace 2'-5' o enlace 3'-5', y el enlace puede contener polaridad inversa, tal como 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas ácidas libres. Gran cantidad de patentes estadounidenses presentan información relativa a la producción y el uso de fosfatos modificados que contienen nucleótidos, e incluyen pero no se limitan a 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361 y 5,625,050, cada una de las que se incorpora en la presente por referencia.

Se entiende que solo es necesario que los análogos de nucleótidos contengan una única modificación, pero también pueden contener múltiples modificaciones en uno de los restos o entre restos diferentes.

Los sustitutos de nucleótidos son moléculas con propiedades funcionales similares a las de los nucleótidos, pero que no contienen un resto fosfato, tal como un ácido péptidonucleico (PNA, por sus siglas en inglés). Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que reconocerán ácidos nucleicos complementarios y que se hibridarán con ellos conforme al modelo de Watson y Crick o al de Hoogsteen, pero que se enlazan entre sí a través de un resto diferente a un resto fosfato. Los sustitutos de nucleótidos tienen la capacidad de conformar una estructura tipo doble hélice al interactuar con el ácido nucleico diana adecuado.

Los sustitutos de nucleótidos son nucleótidos o análogos de nucleótidos en los que se reemplazó el resto fosfato y/o los restos de azúcares. Los sustitutos de nucleótidos no contienen un átomo de fósforo estándar. Por ejemplo, los sustitutos de fosfato pueden ser enlaces internucleosídicos cicloalquilo o alquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos cicloalquilo o alquilo y heteroátomos mezclados, o uno o más enlaces internucleosídicos heterocíclicos o heteroatómicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos con enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metileno formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenoimino y metilenoimidazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otras que tienen partes componentes N, O, S y CH<sub>2</sub> mezcladas. Gran cantidad de patentes estadounidenses describen formas de producción y de uso de dichos tipos de reemplazos de fosfatos e incluyen pero no se limitan a 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437 y 5,677,439, cada una de las que se incorpora en la presente por referencia.

También se entiende que en un sustituto de nucleótido tanto los restos azúcares como fosfato del nucleótido pueden ser reemplazados, por ejemplo, por un enlace tipo amida (aminoetilglicina) (PNA). Las patentes estadounidenses 5,539,082; 5,714,331 y 5,719,262 indican cómo producir y utilizar moléculas de PNA, cada una de las cuales se incorpora a la presente por referencia. (Véase también Nielsen *et al.*, *Science* 254:1497-1500 (1991)).

Los cebadores pueden comprender nucleótidos y pueden producirse a partir de diferentes tipos de nucleótidos o del mismo tipo de nucleótidos. Por ejemplo, uno o más de los nucleótidos en un cebador pueden ser ribonucleótidos, 2'-O-metil ribonucleótidos o una mezcla de ribonucleótidos y 2'-O-metil ribonucleótidos; aproximadamente 10 % a aproximadamente 50 % de los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, 2'-O-metil ribonucleótidos o una mezcla de ribonucleótidos y 2'-O-metil ribonucleótidos; aproximadamente 50 % o más de los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, 2'-O-metil ribonucleótidos o una mezcla de ribonucleótidos y 2'-O-metil ribonucleótidos; o todos los nucleótidos son ribonucleótidos, 2'-O-metil ribonucleótidos o una mezcla de ribonucleótidos y 2'-O-metil ribonucleótidos. Los nucleótidos pueden comprender bases (es decir, la parte básica del nucleótido) y pueden comprender diferentes tipos de bases (y, normalmente, los comprenderán). Por ejemplo, una o más de las bases pueden ser bases universales, tales como 3-nitropirrol o 5-nitroindolo; aproximadamente 10 % a aproximadamente 50 % de las bases pueden ser bases universales; aproximadamente 50 % o más de las bases pueden ser bases universales, o todas las bases pueden ser bases universales.

Los cebadores pueden, pero no necesariamente, incluir además una secuencia adicional en el extremo 5' del cebador que no es complementario a la secuencia diana. A esta secuencia se la conoce como parte no complementaria del cebador. La parte no complementaria del cebador, si se encuentra presente, sirve para facilitar el desplazamiento de cadena durante la replicación del ADN. La parte no complementaria del cebador puede incluir además una secuencia funcional tal como un promotor para la ARN polimerasa. La parte no complementaria de un cebador puede tener cualquier longitud, pero, por lo general, tiene una longitud de 1 a 100 nucleótidos y

preferiblemente una longitud de 4 a 8 nucleótidos. El uso de una parte no complementaria no se prefiere cuando se utilizan cebadores aleatorios o parcialmente aleatorios para la amplificación del genoma completo.

1. Cebadores para la amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo

5 En el caso de la amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo, se prefiere utilizar un conjunto de cebadores con secuencias de nucleótidos aleatorios o parcialmente aleatorios. En una muestra de ácido nucleico de complejidad considerable o significativa, que es la secuencia diana preferida para la WGSDA, no es necesario conocer las secuencias de ácido nucleico específicas presentes en la muestra y no es necesario diseñar cebadores para que sean complementarios a cualquier secuencia particular. En vez de eso, la complejidad de la muestra de ácido nucleico da lugar a una gran cantidad de secuencias diana de hibridación diferente en la muestra, que serán complementarias a diversos cebadores de secuencia aleatoria o parcialmente aleatoria. La parte complementaria de los cebadores para uso en la WGSDA puede estar completamente aleatorizada, puede tener solo una parte que esté aleatorizada o puede estar de otra manera selectivamente aleatorizada.

15 La cantidad de posiciones de bases aleatorias en la parte complementaria de los cebadores son preferiblemente de 20 % a 100 % de la cantidad total de nucleótidos en la parte complementaria de los cebadores. Más preferiblemente, la cantidad de posiciones de bases aleatorias son de 30 % a 100 % de la cantidad total de nucleótidos en la parte complementaria de los cebadores. Más preferiblemente, la cantidad de posiciones de bases aleatorias son de 50 % a 100 % de la cantidad total de nucleótidos en la parte complementaria de los cebadores. Los conjuntos de cebadores con secuencias aleatorias o parcialmente aleatorias pueden sintetizarse usando técnicas estándar que permiten la adición de cualquier nucleótido en cada posición a aleatorizar. Además, se prefiere que los conjuntos de cebadores estén compuestos por cebadores con longitud y/o características de hibridación similares.

2. Cebadores para la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple

25 En el caso de la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple, la parte complementaria de cada cebador está diseñada para ser complementaria a la diana de hibridación en la secuencia diana. En un conjunto de cebadores, se prefiere que la parte complementaria de cada cebador sea complementaria a una parte diferente de la secuencia diana. Es más preferible que los cebadores en el conjunto sean complementarios a los sitios adyacentes en la secuencia diana. Se prefiere además que dichos sitios adyacentes en la secuencia diana se encuentren adyacentes también a la diana de amplificación en la secuencia diana.

30 Se prefiere que, cuando se hibridan con una secuencia diana, los cebadores en un conjunto de cebadores se encuentren separados unos de otros. Se prefiere que, cuando se hibridan, los cebadores en un conjunto de cebadores se encuentren separados unos de otros en al menos 5 bases. Es más preferible que, cuando se hibridan, los cebadores en un conjunto de cebadores se encuentren separados unos de otros en al menos 10 bases. Es incluso más preferible que, cuando se hibridan, los cebadores en un conjunto de cebadores se encuentren separados unos de otros en al menos 20 bases. Es incluso más preferible que, cuando se hibridan, los cebadores en un conjunto de cebadores se encuentren separados unos de otros en al menos 30 bases. Es incluso más preferible que, cuando se hibridan, los cebadores en un conjunto de cebadores se encuentren separados unos de otros en al menos 40 bases. Es incluso más preferible que, cuando se hibridan, los cebadores en un conjunto de cebadores se encuentren separados unos de otros en al menos 50 bases.

40 Se prefiere que, cuando se hibridan, los cebadores en un conjunto de cebadores se encuentren separados unos de otros en no más de aproximadamente 500 bases. Es más preferible que, cuando se hibridan, los cebadores en un conjunto de cebadores se encuentren separados unos de otros en no más de aproximadamente 400 bases. Es incluso más preferible que, cuando se hibridan, los cebadores en un conjunto de cebadores se encuentren separados unos de otros en no más de aproximadamente 300 bases. Es incluso más preferible que, cuando se hibridan, los cebadores en un conjunto de cebadores se encuentren separados unos de otros en no más de aproximadamente 200 bases. Se contempla específicamente cualquier combinación de los límites inferiores y superiores preferidos de la separación descrita anteriormente, inclusive todos los intervalos intermedios. Cuando se hibridan, no es necesario separar a los cebadores unos de otros en un conjunto de cebadores en la misma cantidad de bases. Se prefiere que, cuando se hibridan, los cebadores en un conjunto de cebadores se encuentren separados unos de otros en aproximadamente la misma cantidad de bases.

50 La distancia de separación óptima entre los cebadores no será la misma para todas las ADN polimerasas, dado que este parámetro depende de la velocidad de polimerización neta. Una ADN polimerasa procesiva tendrá una velocidad de polimerización característica que puede oscilar entre 5 y 300 nucleótidos por segundo y puede verse influenciada por la presencia o ausencia de proteínas de unión al ADN monocatenario y helicasas accesorias. En el caso de una polimerasa no procesiva la velocidad de polimerización neta dependerá de la concentración enzimática dado que a mayores concentraciones hay más eventos de reiniciación y, por lo tanto, la velocidad de polimerización neta aumentará. Un ejemplo de una polimerasa procesiva es la ADN polimerasa  $\Phi 29$ , que sigue a 50 nucleótidos por segundo. Un ejemplo de una polimerasa no procesiva es la ADN polimerasa Vent exo(-) que proporcionará velocidades de polimerización de 4 nucleótidos por segundo a una baja concentración o de 16 nucleótidos por segundo a concentraciones más altas.

Para obtener un rendimiento óptimo en una reacción de MSDA, el espaciado del cebador se ajusta preferiblemente para que se adecúe a la polimerasa que se está utilizando. Se prefiere un espaciado de cebadores prolongado cuando se utiliza una polimerasa con una velocidad de polimerización rápida. Se prefiere un espaciado de cebadores más corto cuando se utiliza una polimerasa con una velocidad de polimerización más lenta. Se puede utilizar el siguiente ensayo para determinar el espaciado óptimo con cualquier polimerasa. El ensayo usa conjuntos de cebadores, es decir, que cada conjunto está conformado por hasta 5 cebadores izquierdos y 5 cebadores derechos. Los conjuntos de cebadores están diseñados para que se hibriden adyacentes a la misma secuencia diana, es decir que cada uno de los diferentes conjuntos de cebadores tiene un espaciado de cebadores distinto. El espaciado varía sistémicamente entre los conjuntos de cebadores en aumentos de 25 nucleótidos dentro del intervalo de 25 nucleótidos a 400 nucleótidos (el espaciado de los cebadores dentro de cada conjunto es el mismo). Se realiza una serie de reacciones en las que se amplifica la misma secuencia diana usando los distintos conjuntos de cebadores. El espaciado que produce el rendimiento experimental más alto del ADN es el espaciado óptimo de cebadores para la ADN polimerasa específica o la ADN polimerasa más la combinación de proteína accesoria que se esté usando.

La replicación del ADN iniciada en los sitios en la secuencia diana donde se hibridan los cebadores extenderá y desplazará las cadenas que se están replicando a partir de los cebadores hibridados en sitios adyacentes. El desplazamiento de una cadena adyacente la pone a disposición para la hibridación con otro cebador y el inicio posterior de otra ronda de replicación. La o las regiones de la secuencia diana con las cuales se hibridan los cebadores se denomina diana de hibridación de la secuencia diana.

Un conjunto de cebadores puede incluir cualquier cantidad deseada de cebadores de una secuencia de nucleótidos diferente. Para la MSDA, se prefiere que un conjunto de cebadores incluya múltiples cebadores. Es más preferible que un conjunto de cebadores incluya 3 o más cebadores. Es incluso más preferible que un conjunto de cebadores incluya 4 o más, 5 o más, 6 o más, o 7 o más cebadores. En general, cuanto más cebadores se utilicen, mayor será el nivel de amplificación que se obtendrá. No existe un límite superior fundamental para la cantidad de cebadores que un conjunto de cebadores puede tener. Sin embargo, para una secuencia diana dada, la cantidad de cebadores en un conjunto de cebadores se limitará, generalmente, a la cantidad de sitios de hibridación disponibles en la secuencia diana. Por ejemplo, si la secuencia diana es una molécula de ADN de 10.000 nucleótidos y se utilizan 20 cebadores de nucleótidos, hay 500 sitios de 20 nucleótidos no superpuestos en la secuencia diana. Incluso, podrían utilizarse más cebadores que estos, si se desean o aceptan sitios de superposición. Se prefiere que un conjunto de cebadores no incluya más de aproximadamente 300 cebadores. Se prefiere que un conjunto de cebadores no incluya más de aproximadamente 200 cebadores. Incluso es más preferible que un conjunto de cebadores no incluya más de aproximadamente 100 cebadores. Es más preferible que un conjunto de cebadores no incluya más de aproximadamente 50 cebadores. Es lo más preferible que un conjunto de cebadores incluya entre 7 y aproximadamente 50 cebadores. Se contempla cualquier combinación de los límites inferiores y superiores preferidos para la cantidad de cebadores en un conjunto de cebadores descrito anteriormente, incluidos todos los intervalos intermedios.

Una forma preferida del conjunto de cebadores para uso en la MSDA incluye dos conjuntos de cebadores, a los cuales se los conoce como conjunto derecho de cebadores y conjunto izquierdo de cebadores. El conjunto derecho de cebadores y el conjunto izquierdo de cebadores están diseñados para que sean complementarios a las cadenas opuestas de una secuencia diana. Se prefiere que las partes complementarias del conjunto derecho de cebadores sean cada una complementaria a la diana de hibridación derecha y que cada una sea complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación derecha. Se prefiere que las partes complementarias del conjunto izquierdo de cebadores sean cada una complementaria a la diana de hibridación izquierda y que cada una sea complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación izquierda. Las dianas de hibridación derecha e izquierda flanquean los extremos opuestos de la diana de amplificación en una secuencia diana. Se prefiere que un conjunto derecho de cebadores y un conjunto izquierdo de cebadores incluyan cada uno una cantidad preferida de cebadores como se describió anteriormente para un conjunto de cebadores. Específicamente, se prefiere que un conjunto derecho o izquierdo de cebadores incluya múltiples cebadores. Es más preferible que un conjunto derecho o izquierdo de cebadores incluya 3 o más cebadores. Es incluso más preferible que un conjunto derecho o izquierdo de cebadores incluya 4 o más, 5 o más, 6 o más, o 7 o más cebadores. Se prefiere que un conjunto derecho o izquierdo de cebadores incluya no más de aproximadamente 200 cebadores. Es más preferible que un conjunto derecho o izquierdo de cebadores incluya no más de aproximadamente 100 cebadores. Es lo más preferible que un conjunto derecho o izquierdo de cebadores incluya entre 7 y aproximadamente 100 cebadores. Se contempla cualquier combinación de los límites inferiores y superiores preferidos para la cantidad de cebadores en un conjunto de cebadores descrito anteriormente, incluidos todos los intervalos intermedios. Además, se prefiere que, para una secuencia diana dada, el conjunto derecho de cebadores y el conjunto izquierdo de cebadores incluyan la misma cantidad de cebadores. Se prefiere también que, para una secuencia diana dada, el conjunto derecho de cebadores y el conjunto izquierdo de cebadores estén compuestos por cebadores de longitud y/o características de hibridación similares.

Cuando la o las secuencias diana se encuentran presentes en una muestra mezclada, por ejemplo, una muestra hospitalaria que contiene tanto ácidos nucleicos humanos como no humanos, los cebadores utilizados pueden ser específicos para los ácidos nucleicos de interés. Por lo tanto, para detectar ácidos nucleicos patógenos (es decir, no humanos) en una muestra del paciente, se pueden utilizar cebadores específicos para los ácidos nucleicos

patógenos. Si se detectan ácidos nucleicos humanos, entonces se pueden utilizar cebadores específicos para los ácidos nucleicos humanos. En este contexto, los cebadores específicos para los ácidos nucleicos diana o las secuencias diana particulares o una clase particular de ácidos nucleicos diana o secuencias diana hacen referencia a cebadores que respaldan la amplificación de los ácidos nucleicos diana y las secuencias diana, pero no respaldan la amplificación sustancial de los ácidos nucleicos no diana o secuencias que se encuentran en la muestra pertinente.

### 3. Etiquetas de detección

La parte no complementaria de un cebador puede incluir secuencias que se van a utilizar para manipular o analizar adicionalmente las secuencias amplificadas. Un ejemplo de dicha secuencia es una etiqueta de detección, que es una secuencia de nucleótidos específica presente en la parte no complementaria de un cebador. Las etiquetas de detección tienen secuencias complementarias a las sondas de detección. Las etiquetas de detección pueden detectarse usando sus sondas de detección análogas. Las etiquetas de detección se incorporan en los extremos de las cadenas amplificadas. El resultado es ADN amplificado con secuencias de etiquetas de detección que son complementarias a la parte complementaria de las sondas de detección. Si están presente, puede haber una, dos, tres o más de tres etiquetas de detección en un cebador. Se prefiere que un cebador tenga una, dos, tres o cuatro etiquetas de detección. Lo más preferiblemente, un cebador tendrá una etiqueta de detección. Generalmente, se prefiere que un cebador tenga 10 etiquetas de detección o menos. No hay un límite fundamental para la cantidad de etiquetas de detección que pueden estar presentes en un cebador salvo el tamaño del cebador. Cuando hay múltiples etiquetas de detección, estas pueden tener la misma secuencia o pueden tener distintas secuencias, es decir que cada secuencia diferente es complementaria a una sonda de detección diferente. Se prefiere que un cebador contenga etiquetas de detección que tengan la misma secuencia de modo que todas sean complementarias a una única sonda de detección. Para algunos métodos de detección múltiple, es preferible que los cebadores contengan hasta seis etiquetas de detección y que las partes de la etiqueta de detección tengan diferentes secuencias de forma tal que cada una de las partes de la etiqueta de detección sea complementaria a una sonda de detección diferente. Se puede lograr un efecto similar utilizando un conjunto de cebadores donde cada uno tenga una única etiqueta de detección diferente. Las etiquetas de detección pueden tener, cada una, cualquier longitud que respalde la hibridación específica y estable entre la etiqueta de detección y la sonda de detección. Con esta finalidad, se prefiere una longitud de 10 a 35 nucleótidos, siendo una parte de la etiqueta de detección de 15 a 20 nucleótidos de longitud la más preferida.

### 4. Etiqueta de dirección

Otro ejemplo de una secuencia que puede incluirse en la parte no complementaria de un cebador es una etiqueta de dirección. Una etiqueta de dirección tiene una secuencia complementaria a una sonda de dirección. Las etiquetas de dirección se incorporan en los extremos de las cadenas amplificadas. El resultado es ADN amplificado con secuencias de etiquetas de dirección que son complementarias a la parte complementaria de las sondas de dirección. Si están presente, puede haber una o más de una etiqueta de dirección en un cebador. Se prefiere que un cebador tenga una o dos etiquetas de dirección. Lo más preferiblemente, un cebador tendrá una etiqueta de dirección. Generalmente, se prefiere que un cebador tenga 10 etiquetas de dirección o menos. No hay un límite fundamental para la cantidad de etiquetas de dirección que pueden estar presentes en un cebador salvo el tamaño del cebador. Cuando hay múltiples etiquetas de dirección, estas pueden tener la misma secuencia o pueden tener distintas secuencias, es decir que cada secuencia diferente es complementaria a una sonda de dirección diferente. Se prefiere que un cebador contenga etiquetas de dirección que tengan la misma secuencia de modo que todas sean complementarias a una única sonda de dirección. La parte de etiqueta de dirección puede tener cualquier longitud que respalde la hibridación específica y estable entre la etiqueta de dirección y la sonda de dirección. Con esta finalidad, se prefiere una longitud de 10 a 35 nucleótidos, siendo una parte de la etiqueta de dirección de 15 a 20 nucleótidos de longitud la más preferida.

### C. Solución de lisis

En el método descrito, las células pueden exponerse a condiciones alcalinas mezclando las células con una solución de lisis. Generalmente, una solución de lisis es una solución que puede elevar el pH de una solución celular de forma suficiente para provocar una lisis celular. Se pueden utilizar soluciones de desnaturalización como soluciones de lisis siempre que la solución de desnaturalización pueda tener los efectos necesarios de las soluciones de lisis. En algunas realizaciones, la solución de lisis puede comprender una base, tal como una base acuosa. Las bases útiles incluyen hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, acetato de potasio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de calcio, amoníaco, anilina, bencilamina, n-butilamina, dietilamina, dimetilamina, difenilamina, etilamina, etilendiamina, metilamina, N-metilnilina, morfolina, piridina, trietilamina, trimetilamina, hidróxido de aluminio, hidróxido de rubidio, hidróxido de cesio, hidróxido de estroncio, hidróxido de bario y DBU (1,8-diazobicyclo[5,4,0]undec-7-eno). Las formulaciones útiles de la solución de lisis incluyen solución de lisis que comprende 400 mM de KOH, solución de lisis que comprende 400 mM de KOH, 100 mM de ditiotreitól y 10 mM de EDTA, y solución de lisis que consiste en 400 mM de KOH, 100 mM de ditiotreitól y 10 mM de EDTA.

En algunas realizaciones, la solución de lisis puede comprender múltiples agentes básicos. Tal como se utiliza en la

5 presente, un agente básico es un compuesto, composición o solución que provoca condiciones alcalinas. En algunas realizaciones, la solución de lisis puede comprender un tampón. Los tampones útiles incluyen tampones de fosfato, tampones «Good» (tales como BES, BICINE, CAPS, EPPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, TAPS, TES y TRICINE), cacodilato de sodio, citrato de sodio, acetato de trietilamonio, bicarbonato de trietilamonio, Tris, Bis-tris y Bis-tris propano. La solución de lisis puede comprender múltiples agentes amortiguadores. Tal como se utiliza en la presente, un agente amortiguador es un compuesto, composición o solución que actúa como un tampón. Un agente amortiguador alcalino es un agente amortiguador que provoca condiciones alcalinas. En algunas realizaciones, la solución de lisis puede comprender una combinación de una o más bases, agentes básicos, tampones y agentes amortiguadores.

10 La cantidad de solución de lisis mezclada con las células puede ser esa cantidad que hace que se lise una cantidad sustancial de células o aquella que hace que se lise una cantidad suficiente de células. Generalmente, este volumen estará directamente determinado por el pH de la mezcla de células/solución de lisis. Por lo tanto, es posible determinar generalmente la cantidad de solución de lisis que se mezcla con células a partir del volumen de las células y la concentración alcalina del tampón de lisis. Por ejemplo, se necesitaría un volumen más pequeño de una solución de lisis con una base más fuerte y/o mayor concentración de base para crear condiciones alcalinas suficientes que el volumen que se necesita de una solución de lisis con una base más débil y/o menor concentración de base. La solución de lisis puede formularse de forma tal que las células se mezclen con un volumen igual de la solución de lisis (para producir las condiciones alcalinas deseadas).

20 Por ejemplo, las soluciones de lisis pueden ser soluciones que tienen un pH de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 11,0 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 11,5 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 12,0 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 12,0, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 12,0, de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 12,0, de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 12,0, de aproximadamente 11,0 a aproximadamente 12,0 de aproximadamente 11,5 a aproximadamente 12,0, de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 11,5, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 11,5, de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 11,5, de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 11,5, de aproximadamente 11,0 a aproximadamente 11,5, de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 11,0, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 11,0, de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 11,0, de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 11,0, de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 10,5, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 10,5, de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 10,5, de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 10,0 de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 10,0, de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 9,5, aproximadamente 9,0, aproximadamente 9,5, aproximadamente 10,0, aproximadamente 10,5, aproximadamente 11,0, aproximadamente 11,5, aproximadamente 12,0, aproximadamente 12,5 o aproximadamente 13,0.

40 Las soluciones de lisis pueden tener, por ejemplo, concentraciones de componentes de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 900 mM, de



aproximadamente 900 mM o aproximadamente 1 M.

La solución de lisis puede estar compuesta por múltiples soluciones y/o componentes que pueden agregarse a células de forma separada o combinada en diferentes combinaciones antes de la adición a las células. Por lo tanto, por ejemplo, puede agregarse una solución de 400 mM de KOH y 10 mM de EDTA y una solución de 100 mM de ditiotreitól a las células de forma separada. De manera similar, los kits descritos pueden estar compuestos por múltiples soluciones y/o componentes que se combinarán a efectos de formar una solución de lisis antes de la adición a las células o para una adición separada a las células.

#### D. Solución de estabilización

En el método descrito, el pH del lisado celular puede reducirse para formar un lisado celular estabilizado. Una solución de estabilización es generalmente una solución que reduce el pH de un lisado celular expuesto a condiciones alcalinas como se describe en otra parte en la presente. En algunas realizaciones, la solución de estabilización puede comprender un ácido. Los ácidos útiles incluyen ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido nítrico, ácido perclórico, HF, HBr, HI, H<sub>2</sub>S, HCN, HSCN, HClO, ácido monocloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético y cualquier ácido carboxílico (etanoico, propanoico, butanoico, etc., que incluye ambos ácidos carboxílicos de cadena lineal o ramificada). En algunas realizaciones, la solución de estabilización puede comprender un tampón. Los tampones útiles incluyen Tris-HCl, HEPES, tampones «Good» (tales como BES, BICINE, CAPS, EPPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, TAPS, TES y TRICINE), cacodilato de sodio, citrato de sodio, acetato de trietilamonio, bicarbonato de trietilamonio, Tris, Bis-tris y Bis-tris propano. Las formulaciones de soluciones de estabilización útiles incluyen solución de estabilización que comprende 800 mM de Tris-HCl; solución de estabilización que comprende 800 mM de Tris-HCl a pH 4,1, y solución de estabilización que consiste en 800 mM de Tris-HCl, pH 4,1.

En algunas realizaciones, la solución de estabilización puede comprender múltiples agentes ácidos. Tal como se utiliza en la presente, un agente ácido es un compuesto, composición o solución que forma un ácido en solución. En algunas realizaciones, la solución de estabilización puede comprender múltiples agentes amortiguadores. Un agente amortiguador ácido es un agente amortiguador que forma un ácido en solución. En algunas realizaciones, la solución de estabilización puede comprender una combinación de uno o más ácidos, agentes ácidos, tampones y agentes amortiguadores.

Un lisado celular estabilizado es un lisado celular cuyo pH se encuentra en el intervalo neutro (de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 9,0). Los lisados celulares estabilizados útiles tienen un pH que permite la replicación de los ácidos nucleicos en el lisado celular. Por ejemplo, el pH del lisado celular estabilizado es útil a un pH en el que puede funcionar la ADN polimerasa. El pH del lisado celular puede reducirse mezclando el lisado celular con una solución de estabilización.

La cantidad de solución de estabilización mezclada con el lisado celular puede ser la cantidad que provoca una reducción en el pH hasta el intervalo neutro (u otro valor de pH deseado). Generalmente, este volumen estará directamente determinado por el pH de la mezcla de solución de estabilización/lisado celular. Por lo tanto, puede determinarse generalmente la cantidad de solución de estabilización que se mezcla con el lisado celular a partir del volumen del lisado celular, su pH y capacidad amortiguadora y la concentración ácida de la solución amortiguadora. Por ejemplo, se necesitaría un volumen más pequeño de una solución de estabilización con un ácido más fuerte y/o mayor concentración de ácido para reducir el pH de forma suficiente que el volumen que se necesita de una solución de estabilización con un ácido más débil y/o menor concentración de ácido. La solución de estabilización puede formularse de modo que el lisado celular se mezcle con un volumen igual de la solución de estabilización (para producir el pH deseado).

Por ejemplo, las soluciones de estabilización pueden ser soluciones que tienen un pH de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,0, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,5, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 5,5, de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 5,5, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 5,5, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,5, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 5,0, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 5,0, de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 5,0, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 5,0, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0, de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,0, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,5, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,5, de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 4,5, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,5, de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 4,5, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 4,0, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 4,0, de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 4,0, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 4,0, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,5, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 3,5, de aproximadamente 3,0 a

aproximadamente 3,5, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 3,0, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,5, de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 2,5, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0, aproximadamente 1,0, aproximadamente 2,0, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,5 o aproximadamente 6,0.

Las soluciones de estabilización pueden tener, por ejemplo, concentraciones de componentes de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 700 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 700 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 700 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 800 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 800 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 900 mM a aproximadamente 1 M, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 500 mM, aproximadamente 600 mM, aproximadamente 700 mM, aproximadamente 800 mM, aproximadamente 900 mM, o aproximadamente 1 M.

La solución de estabilización puede estar compuesta por múltiples soluciones y/o componentes que pueden agregarse a los lisados celulares de forma separada o combinada en diferentes combinaciones antes de la adición a los lisados celulares. Por lo tanto, por ejemplo, puede agregarse un tampón y una solución de un ácido a las células de forma separada. De manera similar, los kits descritos pueden estar compuestos por múltiples soluciones y/o componentes que se combinarán a efectos de formar una solución de estabilización antes de la adición a los lisados celulares o para una adición separada a los lisados celulares.

#### E. Solución de desnaturalización

En algunas formas del método descrito, las muestras de ADN pueden exponerse a condiciones de desnaturalización al mezclar la muestra con una solución de desnaturalización. Una solución de desnaturalización es generalmente una solución que puede elevar el pH de una muestra de forma suficiente para provocar, en combinación con otras condiciones tales como calentamiento, la desnaturalización sustancial del ADN en la muestra de ADN. La desnaturalización sustancial hace referencia a la desnaturalización del 90 % o más de los nucleótidos en el 90 % o más de las moléculas de ADN en una muestra. En este contexto, la desnaturalización de nucleótidos hace referencia a nucleótidos no apareados ya sea desnaturalizados físicamente mediante tratamiento o que ya se encuentren no apareados en la muestra. Se pueden utilizar soluciones de lisis como soluciones de desnaturalización siempre que la solución de lisis tenga los efectos necesarios de las soluciones de desnaturalización.

En algunas realizaciones, la solución de desnaturalización puede comprender una base, tal como una base acuosa. Las bases útiles incluyen hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, acetato de potasio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de calcio, amoníaco, anilina, bencilamina, n-butilamina, dietilamina, dimetilamina, difenilamina, etilamina, etilendiamina, metilamina, N-metilnilina, morfolina, piridina, trietilamina, trimetilamina, hidróxido de aluminio, hidróxido de rubidio, hidróxido de cesio, hidróxido de estroncio, hidróxido de bario y DBU (1,8-diazobicyclo[5,4,0]undec-7-eno). Las formulaciones útiles de la solución de desnaturalización incluyen solución de desnaturalización que comprende aproximadamente 150 nM a aproximadamente 500 mM de NaOH, solución de desnaturalización que comprende aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 mM de NaOH y solución de desnaturalización que consiste en aproximadamente 150 mM a aproximadamente 500 nM de NaOH.

En algunas realizaciones, la solución de desnaturalización puede comprender múltiples agentes básicos. Tal como se utiliza en la presente, un agente básico es un compuesto, composición o solución que provoca condiciones de

desnaturalización. En algunas realizaciones, la solución de desnaturalización puede comprender un tampón. Los tampones útiles incluyen tampones de fosfato, tampones «Good» (tales como BES, BICINE, CAPS, EPPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, TAPS, TES y TRICINE), cacodilato de sodio, citrato de sodio, acetato de trietilamonio, bicarbonato de trietilamonio, Tris, Bis-tris y Bis-tris propano. La solución de desnaturalización puede comprender múltiples agentes amortiguadores. Tal como se utiliza en la presente, un agente amortiguador es un compuesto, composición o solución que actúa como un tampón. Un agente amortiguador alcalino es agente amortiguador que provoca condiciones alcalinas. En algunas realizaciones, la solución de desnaturalización puede comprender una combinación de una o más bases, agentes básicos, tampones y agentes amortiguadores.

La cantidad de solución de desnaturalización mezclada con las muestras de ADN puede ser esa cantidad que provoca, en combinación con otras condiciones tales como calentamiento, la desnaturalización sustancial del ADN en la muestra de ADN. Generalmente, este volumen estará directamente determinado por el pH, la fuerza iónica y la temperatura de la muestra/ mezcla de solución de desnaturalización.

Por lo tanto, la cantidad de solución de desnaturalización para mezclar con las muestras de ADN puede determinarse generalmente a partir del volumen de la muestra de ADN, la concentración alcalina del amortiguador de desnaturalización y la temperatura a la que se calentará la mezcla resultante. Por ejemplo, a una temperatura determinada, se necesitaría un volumen más pequeño de una solución de desnaturalización con una base más fuerte y/o mayor concentración de base para crear condiciones de desnaturalización suficientes que el volumen que se necesita de una solución de desnaturalización con una base más débil y/o menor concentración de base. La solución de desnaturalización puede formularse de modo que las muestras de ADN se mezclen, por ejemplo, con una décima parte del volumen de la solución de desnaturalización (para producir las condiciones desnaturalización deseadas).

Por ejemplo, las soluciones de desnaturalización pueden tener un pH de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 11,0 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 11,5 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 12,0 a aproximadamente 13,0, de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 12,0, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 12,0 de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 12,0, de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 12,0, de aproximadamente 11,0 a aproximadamente 12,0, de aproximadamente 11,5 a aproximadamente 12,0, de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 11,5, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 11,5, de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 11,5, de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 11,5, de aproximadamente 11,0 a aproximadamente 11,5, de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 11,0, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 11,0, de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 11,0, de aproximadamente 10,5 a aproximadamente 11,0, de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 10,5, de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 10,5, de aproximadamente 10,0 a aproximadamente 10,5, de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 10,0 de aproximadamente 9,5 a aproximadamente 10,0, de aproximadamente 9,0 a aproximadamente 9,5, aproximadamente 9,0, aproximadamente 9,5, aproximadamente 10,0, aproximadamente 10,5, aproximadamente 11,0, aproximadamente 11,5, aproximadamente 12,0, aproximadamente 12,5 o aproximadamente 13,0,

Las soluciones de desnaturalización pueden tener, por ejemplo, concentraciones de componentes de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 90 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 70 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 30 mM a



aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 300 mM, aproximadamente 400 mM, aproximadamente 500 mM, aproximadamente 600 mM, aproximadamente 700 mM, aproximadamente 800 mM, aproximadamente 900 mM o aproximadamente 1 M.

La solución de estabilización puede estar compuesta por múltiples soluciones y/o componentes que pueden agregarse a las muestras de ADN de forma separada o combinada en diferentes combinaciones antes de la adición a las muestras de ADN. Por lo tanto, por ejemplo, puede agregarse una solución de un tampón y una solución de una base a las muestras de forma separada. De manera similar, los kits descritos pueden estar compuestos por múltiples soluciones y/o componentes que se combinarán a efectos de formar una solución de desnaturalización antes de la adición a las muestras de ADN o para una adición separada a las muestras.

#### F. Huellas dactilares de ácido nucleico

El método descrito puede utilizarse para producir cadenas replicadas que sirven como huella dactilar de ácido nucleico de una muestra compleja de ácido nucleico. Dicha huella dactilar de ácido nucleico puede ser comparada con otras huellas dactilares de ácido nucleico preparadas de forma similar de otras muestras de ácido nucleico para permitir la detección conveniente de diferencias entre las muestras. Las huellas dactilares de ácido nucleico se pueden utilizar tanto para detectar muestras de ácido nucleico relacionadas como para comparar muestras de ácido nucleico. Por ejemplo, la presencia o identidad de organismos específicos puede detectarse produciendo una huella dactilar de ácido nucleico del organismo de prueba y comparando la huella dactilar de ácido nucleico resultante con huellas dactilares de ácido nucleico de referencia preparadas a partir de organismos conocidos. También se pueden detectar cambios y diferencias en los patrones de expresión génica al preparar huellas dactilares de ácido nucleico del ARNm a partir de diferentes muestras celulares y comparando las huellas dactilares de ácido nucleico. Las cadenas replicadas se pueden utilizar también para producir un conjunto de sondas o cebadores que es específico para la fuente de una muestra de ácido nucleico. Las cadenas replicadas se pueden utilizar también como una biblioteca de secuencias de ácido nucleico presente en una muestra. Las huellas dactilares de ácido nucleico pueden formarse o resultar de la amplificación del genoma completo de una muestra, de modo que se representa sustancialmente todo el contenido de ácido nucleico pertinente de la muestra o de la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple de secuencias diana seleccionadas dentro de una muestra.

Las huellas dactilares de ácido nucleico pueden almacenarse o guardarse para su uso posterior. Por ejemplo, las cadenas replicadas producidas en el método descrito pueden almacenarse físicamente, ya sea en solución, congelarse, o acoplarse, o adherirse a un sustrato de estado sólido tal como una matriz. El almacenamiento en una matriz es útil para proporcionar un conjunto de sondas almacenadas que provienen de los ácidos nucleicos en cualquier muestra de interés. Como ejemplo adicional, se puede almacenar también el contenido informativo procedente de las huellas dactilares de ácido nucleico. Dicha información se puede almacenar, por ejemplo, en un medio legible por ordenador. Los ejemplos de contenido informativo de huellas dactilares de ácido nucleico incluyen información (completa o parcial) sobre secuencias de ácido nucleico; información sobre secuencias de ácido nucleico diferenciales tales como las secuencias presentes en una muestra, pero no otra; patrones de hibridación de cadenas replicadas, por ejemplo, matrices de ácido nucleico, conjuntos, chips u otras cadenas replicadas. Muchos otros datos que derivan o pueden derivarse de las huellas dactilares de ácido nucleico y las cadenas replicadas producidas en el método descrito pueden también recolectarse, utilizarse, conservarse, almacenarse y/o guardarse.

Las huellas dactilares de ácido nucleico pueden contener también o estar formadas por otra información derivada de la información generada en el método descrito, y puede combinarse con la información obtenida o generada a partir de cualquier otra fuente. La naturaleza informativa de las huellas dactilares de ácido nucleico producidas usando el método descrito se presta para la combinación y/o el análisis mediante el uso de sistemas y métodos bioinformáticos conocidos.

Las huellas dactilares de ácido nucleico de las muestras de ácido nucleico se pueden comparar con una huella dactilar de ácido nucleico similar derivada de cualquier otra muestra para detectar similitudes y diferencias en las muestras (lo cual indica las similitudes y diferencias en los ácidos nucleicos en las muestras). Por ejemplo, se puede comparar una huella dactilar de ácido nucleico de una primera muestra de ácido nucleico con una huella dactilar de ácido nucleico de una muestra del mismo tipo de organismo que la primera muestra de ácido nucleico, una muestra del mismo tipo de tejido que la primera muestra de ácido nucleico, una muestra del mismo organismo que la primera muestra de ácido nucleico, una muestra obtenida de la misma fuente pero en un momento diferente al de la primera muestra de ácido nucleico, una muestra de un organismo diferente al de la primera muestra de ácido nucleico, una muestra de un tipo de tejido diferente al de la primera muestra de ácido nucleico, una muestra de una cadena de organismo diferente al de la primera muestra de ácido nucleico, una muestra de una especie de organismo diferente al de la primera muestra de ácido nucleico o una muestra de un tipo de organismo diferente al de la primera muestra de ácido nucleico

El mismo tipo de tejido es tejido del mismo tipo tal como tejido hepático, tejido muscular, o piel (que puede ser del mismo organismo o un organismo o tipo de organismo diferente). El mismo organismo hace referencia al mismo individuo, animal o célula. Por ejemplo, dos muestras tomadas de un paciente son del mismo organismo. La misma

fuerza es similar pero más amplia, lo que se refiere a muestras del mismo organismo, por ejemplo, el mismo tejido del mismo organismo, la misma molécula de ADN o la misma biblioteca de ADN. Las muestras de la misma fuente que se compararán pueden recolectarse en momentos diferentes (permitiendo así que se detecten posibles cambios con el paso del tiempo). Esto es especialmente útil cuando se debe evaluar el efecto de un tratamiento o cambio en la afección. Las muestras de la misma fuente que han sido sometidas a distintos tratamientos se pueden recolectar y comparar también usando el método descrito. Un organismo diferente hace referencia a un organismo individual diferente, tal como un paciente diferente, un animal individual diferente. El organismo diferente incluye un organismo diferente del mismo tipo u organismos de distintos tipos. Un tipo diferente de organismo hace referencia a organismos de distintos tipos tales como un perro y un gato, un ser humano y un ratón, o *E. coli* y *Salmonella*. Un tipo diferente de tejido hace referencia a tejidos de distintos tipos tales como hígado y riñón, o piel y cerebro. Una cepa o especie diferente del organismo hace referencia a organismos que difieren en su designación de la cepa o especie según se entienden esos términos en la técnica.

#### G. Detectores de estado sólido

Los detectores de estado sólido son sustratos o soportes de estado sólido a los cuales se han acoplado sondas de dirección o moléculas de detección. Una forma preferida de detector de estado sólido es un detector de matriz. Un detector de matriz es un detector de estado sólido al cual se han acoplado múltiples sondas de dirección o moléculas de detección diferentes en una matriz, red u otro patrón organizado.

Los sustratos de estado sólido para uso en detectores de estado sólido pueden incluir cualquier material sólido al cual pueden acoplarse oligonucleótidos. Esto incluye materiales tales como acrilamida, celulosa, nitrocelulosa, vidrio, oro, poliestireno, acetato de vinilo de polietileno, polipropileno, polimetacrilato, polietileno, óxido de polietileno, vidrio, polisilicatos, policarbonatos, teflón, fluorocarburos, nailon, goma siliconada, polianhídridos, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, poliortoésteres, silano funcionalizado, polipropilfumerato, colágeno, glucosaminoglicanos y ácidos poliamino.

Los sustratos de estado sólido pueden tener cualquier forma útil que incluye películas o membranas delgadas, perlas, botellas, platos, fibras, fibras ópticas, fibras tejidas, chips, discos compactos, polímeros modelados, películas y micropartículas. Un chip es un pequeño fragmento de material cuadrado o rectangular. Las formas preferidas para los sustratos de estado sólido son películas delgadas, perlas o chips.

Las sondas de dirección inmovilizadas en un sustrato de estado sólido permiten la captura de los productos del método de amplificación descrito en un detector de estado sólido. Dicha captura proporciona un medio conveniente para lavar los componentes de la reacción que puedan interferir con las etapas de detección posteriores. Al acoplar diferentes sondas de dirección a distintas regiones de un detector de estado sólido, pueden capturarse distintos productos de amplificación en distintas ubicaciones, y por lo tanto de diagnóstico, en el detector de estado sólido. Por ejemplo, en un ensayo múltiplex, las sondas de dirección específicas para numerosos ácidos nucleicos amplificados diferentes (cada uno representa una secuencia diana diferente amplificada a través de un conjunto distinto de cebadores) pueden inmovilizarse en una matriz, cada una en una ubicación diferente. La captura y detección se producirá solamente en esas ubicaciones de matriz que corresponden a ácidos nucleicos amplificados para los cuales se encontraban presentes las secuencias diana correspondientes en una muestra.

Están bien establecidos los métodos para la inmovilización de oligonucleótidos en sustratos de estado sólido. Los oligonucleótidos, que incluyen sondas de dirección y sondas de detección pueden acoplarse a los sustratos mediante el uso de métodos de acoplamiento establecidos. Por ejemplo, se describen métodos de acoplamiento adecuados según Pease *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **91**(11):5022-5026 (1994), y Khrapko *et al.*, *Mol Biol (Mosk) (URSS)* **25**:718-730 (1991). Se describe un método para la inmovilización de oligonucleótidos 3'-amina sobre portaobjetos recubiertos con caseína según Stimpson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **92**:6379-6383 (1995). Se describe un método preferido para acoplar oligonucleótidos a sustratos de estado sólido según Guo *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **22**:5456-5465 (1994). Los ejemplos de chips y matrices de ácido nucleico, que incluye métodos para realizar y usar dichos chips y matrices, se describen en la patente estadounidense N.º 6,287,768, la patente estadounidense N.º 6,288,220, la patente estadounidense N.º 6,287,776, la patente estadounidense N.º 6,297,006 y la patente estadounidense N.º 6,291,193.

#### H. Muestras de estado sólido

Las muestras de estado sólido son sustratos o soportes de estado sólido a los cuales se han acoplado o adherido las secuencias diana o productos MDA (es decir, cadenas replicadas). Las secuencias diana se suministran preferiblemente en una muestra objetivo o muestra de ensayo. Una forma preferida de muestra de estado sólido es una muestra de ensayo. Una muestra de ensayo es una muestra de estado sólido a la cual se han acoplado o adherido múltiples secuencias diana diferentes en una matriz, red u otro patrón organizado.

Los sustratos de estado sólido para uso en muestras de estado sólido pueden incluir cualquier material sólido al cual pueden acoplarse o adherirse las secuencias diana. Esto incluye materiales tales como acrilamida, celulosa, nitrocelulosa, vidrio, oro, poliestireno, acetato de vinilo de polietileno, polipropileno, polimetacrilato, polietileno, óxido de polietileno, vidrio, polisilicatos, policarbonatos, teflón, fluorocarburos, nailon, goma siliconada, polianhídridos,

ácido poliglicólico, ácido poliláctico, poliortoésteres, silano funcionalizado, polipropilfumerato, colágeno, glucosaminoglicanos y ácidos poliamino. Los sustratos de estado sólido pueden tener cualquier forma útil que incluye películas o membranas delgadas, perlas, botellas, platos, portaobjetos, fibras, fibras ópticas, fibras tejidas, chips, discos compactos, polímeros modelados, películas y micropartículas. Un chip es un pequeño fragmento de material cuadrado o rectangular. Las formas preferidas para los sustratos de estado sólido son películas delgadas, perlas o chips.

Las secuencias diana inmovilizadas en un sustrato de estado sólido permiten la formación de ácido nucleico amplificado específico para la diana localizado en el sustrato de estado sólido. Dicha localización proporciona un medio conveniente para lavar los componentes de la reacción que puedan interferir con las etapas de detección posteriores y una manera conveniente de probar las múltiples muestras diferentes de forma simultánea. El ácido nucleico amplificado puede formarse independientemente en cada sitio donde se adhiere una muestra diferente. Para la inmovilización de las secuencias diana u otras moléculas de oligonucleótidos para formar una muestra de estado sólido, se pueden utilizar los métodos descritos anteriormente. Los ácidos nucleicos producidos en el método descrito pueden acoplarse o adherirse a un sustrato de estado sólido en cualquier forma adecuada. Por ejemplo, se pueden acoplar los ácidos nucleicos generados mediante el desplazamiento de cadena múltiple agregando nucleótidos modificados a los extremos 3' de los ácidos nucleicos producidos mediante la replicación por desplazamiento de cadena usando la desoxinucleotidil transferasa terminal y haciendo reaccionar los nucleótidos modificados con un sustrato o soporte de estado sólido acoplado así los ácidos nucleicos al sustrato o soporte de estado sólido.

Una forma preferida de sustrato de estado sólido es un trozo de vidrio al cual se han adherido hasta 256 muestras diana separadas como un conjunto de puntos pequeños. Cada punto tiene preferiblemente un diámetro de 0,1 a 2,5 mm y lo más preferiblemente alrededor de 2,5 mm de diámetro. Dichas micromatrices pueden fabricarse, por ejemplo, usando el método descrito por Schena *et al.*, *Science* 270:487-470 (1995). Brevemente, las micromatrices se pueden fabricar en portaobjetos de microscopio recubiertos con poli-L-lisina (Sigma) con una máquina formadora de matrices provista de una punta de impresión. La punta se carga con 1 µg de una muestra de ADN (0,5 mg/ml) de, por ejemplo, placas de microtitulación de 96 pocillos y se depositan ~0,005 µl por portaobjeto en múltiples portaobjetos en un espaciado deseado. Los portaobjetos impresos se pueden volver a hidratar durante 2 horas en una cámara húmeda, se secan a 100 °C durante 1 minuto, se enjuagan en SDS al 0,1 % y se tratan con anhídrido succínico al 0,05 % preparado en tampón que consiste en 1-metil-2-pirrolidiona al 50 % y ácido bórico al 50 %. El ADN de los portaobjetos se puede desnaturalizar, por ejemplo, en agua destilada durante 2 minutos a 90 °C inmediatamente antes de usar. Las muestras de estado sólido de la micromatriz se pueden escanear, por ejemplo, con un escáner láser fluorescente con una etapa XY controlada por ordenador y un objetivo de microscopio. Un láser multilínea de gas compuesto permite la excitación secuencial de múltiples fluoróforos.

#### I. Etiquetas de detección

Para ayudar a detectar y cuantificar ácidos nucleicos amplificados usando el método descrito, pueden incorporarse etiquetas de detección directamente en los ácidos nucleicos amplificados o pueden acoplarse a moléculas de detección. Tal como se utiliza en la presente, una etiqueta de detección es cualquier molécula que puede asociarse con el ácido nucleico amplificado, directa o indirectamente, y que dar lugar a una señal detectable, medible, ya sea directa o indirectamente. Los expertos en la técnica conocen bien muchas de dichas etiquetas para la incorporación en ácidos nucleicos o acoplar a sondas de ácido nucleico. Los ejemplos de etiquetas de detección adecuadas para usar en el método descrito son isótopos radioactivos, moléculas fluorescentes, moléculas fosforescentes, enzimas, anticuerpos y ligandos.

Los ejemplos de etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés), 5,6-carboximetil fluoresceína, rojo Texas, nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-ilo (NBD), cumarina, cloruro de dansilo, rodamina, amino-metil cumarina (AMCA, por sus siglas en inglés), Eosina, Eritrosina, BODIPY®, Cascade Blue®, Oregon Green®, pireno, lisamina, xatenos, acridinas, oxazinas, ficoeritrina, quelatos macrocíclicos de iones lantánidos tales como quantum dye™, tintes de transferencia de energía fluorescentes, tales como naranja de tiazol-heterodímero de etidio, y los tintes de cianina Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5 y Cy7.

Los ejemplos de otras etiquetas fluorescentes específicas incluyen ácido 3-Hidroxipireno 5,8,10-Tri sulfónico, 5-Hidroxi Triptamina (5-HT), Fucsina ácida, Complejo de Alizarina, Rojo de Alizarina, Aloficocianina, Aminocumarina, Estearato de antroilo, Rojo Brillante Astrazon 4G, Naranja Astrazon R, Rojo Astrazon 6B, Amarillo Astrazon 7 GLL, Atabrina, Auramina, Aurofosfina, Aurofosfina G, BAO 9 (Bisaminofeniloxadiazol), BCECF, sulfato de berberina, Bisbenzamida, Solución Blancophor FFG, Blancofor SV, Bodipy F1, Sulfoflavina Brillante FF, Calcien Blue, Verde de calcio, Solución Calcofluor RW, Calcofluor Blanco, solución ABT blanca Calcofor, solución estándar blanco Calcofor, Carboستيرilo, Cascade Yellow, Catecolamina, quinacrina, Corifosfina O, Cumarina-faloídina, CY3,1 8, CY5,1 8, CY7, Dans (ácido 1-Dimetil Amino Nafalina 5 sulfónico), Dansa (ácido diamino naftil sulfónico), Dansilo NH-CH<sub>3</sub>, Diamino Fenil Oxidiazol (DAO), ácido dimetilamino-5-sulfónico, difluoruro de dipirrometenos de boro, Flavina brillante difenilo 7GFF, Dopamina, EritrosinaITC, Eucrisina, FIF (Fluorescencia inducida por formaldehído), Naranja Flazo, Fluo 3, Fluorescamina, Fura-2, Genacril Rojo Brillante B, Genacril Amarillo Brillante 10GF, Genacril Rosa 3G, Genacril Amarillo 5GF, ácido gloxálico, Azul Granular, Hematoporfirina, Indo-1, Intrawhite Cf Líquido, Leucofor PAF, Leucofor SF, Leucofor WS, Lisamina Rodamina B200 (RD200), Amarillo Lucifer CH, Amarillo Lucifer VS, Rojo Magdala, Azul

Marino, Flavina Brillante Maxilon 10 GFF, Flavina Brillante Maxilon 8 GFF, MPS (estilbeno de pironina verde de metilo), Mitramicina, NBD Amina, Nitrobenzoxadidol, Noradrenalina, Rojo Rápido Nuclear, Amarillo Nuclear, Flavina Brillante Nilosan E8G, Oxadiazol, Pacific Blue, Pararosanilina (Feulgen), Solución Phorwite AR, Phorwite BKL, Phorwite Rev, Phorwite RPA, Fosfina 3R, Ftalocianina, Ficoeritrina R, Poliazaindaceno Pontochrome Blue Black, Porfirina, Primulina, Procion Yellow, Pironina, Pironina B, Flavina Brillante Pyrozal 7GF, Mostaza de Quinacrina, Rodamina 123, Rodamina 5 GLD, Rodamina 6G, Rodamina B, Rodamina B 200, Rodamina B Extra, Rodamina BB, Rodamina BG, Rodamina WT, Serotonina, Rojo Brillante Sevron 2B, Rojo Brillante Sevron 4G, Rojo Brillante Sevron B, Naranja Sevron, Amarillo Sevron L, SITS (Primulina), SITS (ácido isotiosulfónico de estilbeno), Estilbeno, Snarf 1, Sulforodamina B Can C, Sulforodamina G Extra, Tetraciclina, Rojo de Tiazina R, Tioflavina S, Tioflavina TCN, Tioflavina 5, Tiolita, Naranja de tiozol, Tinopol CBS, True Blue, Ultralite, Uranina B, Uvitex SFC, Naranja de xileno y XRITC.

Las etiquetas fluorescentes preferidas son la fluoresceína (5-carboxifluoresceína-N- hidroxisuccinimida éster), la rodamina (5,6-tetrametil rodamina) y los tintes de cianina Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5 y Cy7. La absorción y emisión máxima, respectivamente, para estas fluoresceínas son: FITC (490 nm; 520 nm), Cy3 (554 nm; 568 nm), Cy3,5 (581 nm; 588 nm), Cy5 (652 nm; 672 nm), Cy5,5 (682 nm; 703 nm) y Cy7 (755 nm; 778 nm), por lo tanto, permite su detección simultánea. Otros ejemplos de tintes de fluoresceína incluyen 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',4',1,4,-tetraclorofluoresceína (TET), 2',4',5',7',1,4-hexaclorofluoresceína (HEX), 2',7'-dimetoxi-4', 5'-dicloro-6-carboxirodamina (JOE), 2'-cloro-5'-fluoro-7',8'-fusionado fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína (NED) y 2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína (VIC). Las etiquetas fluorescentes se pueden obtener de una variedad de fuentes comerciales, que incluyen Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; Molecular Probes, Eugene, OR; y Research Organics, Cleveland, Ohio.

Las etiquetas adicionales de interés incluyen aquellas que proporcionan señal solamente cuando la sonda con la cual se asocian se une específicamente a una molécula diana, donde dichas etiquetas incluyen: «balizas moleculares» como se describe en Tyagi & Kramer, *Nature Biotechnology* (1996) 14:303 y EP 0 070 685 B1. Otras etiquetas de interés incluyen aquellas descritas en las patentes estadounidenses N.º 5,563,037, WO 97/17471 y WO 97/17076.

Los nucleótidos etiquetados son una forma de etiqueta de detección preferida dado que pueden incorporarse directamente en los productos de amplificación durante la síntesis. Los ejemplos de etiquetas de detección que se pueden incorporar en ácidos nucleicos amplificados incluyen análogos de nucleótidos tales como BrdUrd (5-bromodeoxiuridina, Hoy y Schimlce, *Mutation Research* **290**:217-230 (1993)), aminoalildesoxiuridina (Henegariu *et al.*, *Nature Biotechnology* **18**:345-348 (2000)), 5-metilcitosina (Sano *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **951**:157- 165 (1988)), bromouridina (Wansick *et al.*, *J. Cell Biology* **122**:283-293 (1993)) y nucleótidos modificados con biotina (Langer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **78**:6633 (1981)) o con haptenos adecuados tales como digoxigenina (Kerkhof, *Anal. Biochem.* **205**:359-364 (1992)). Los nucleótidos etiquetados por fluorescencia adecuados son Fluoresceína- isotiocianato-dUTP, Cianina-3-dUTP y Cianina-5-dUTP (Yu *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **22**:3226-3232 (1994)). Una etiqueta de detección análoga de nucleótidos preferida para el ADN es la BrdUrd (bromodeoxiuridina, BrdUrd, BrdU, BUdR, Sigma-Aldrich Co). Otros análogos de nucleótidos preferidos para incorporar la etiqueta de detección en el ADN son AA-dUTP (aminoalil-desoxiuridina trifosfato, Sigma-Aldrich Co.) y 5-metil-dCTP (Roche Molecular Biochemicals). Un análogo de nucleótidos preferido para la incorporación de la etiqueta de detección en el ARN es la biotina-16-UTP (biotina-16-uridina-5'-trifosfato, Roche Molecular Biochemicals). La fluoresceína, Cy3 y Cy5 pueden unirse a dUTP para su etiquetado directo. Cy3,5 y Cy7 están disponibles como conjugados anti-digoxigenina o avidina para la detección secundaria de sondas etiquetadas con digoxigenina o biotina.

Las etiquetas de detección que se incorporan en el ácido nucleico amplificado tales como la biotina, pueden detectarse posteriormente usando métodos sensibles muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la biotina puede ser detectada usando conjugado de fosfavelocidadalcalina-estreptavidina (Tropix, Inc.), que se une a la biotina y se detecta posteriormente mediante quimioluminiscencia de sustratos adecuados (por ejemplo, sustrato quimioluminiscente CSPD: disodio, 3-(4-metoxispiro-[1,2,-dioxetano-3-2'-(5'-cloro)tricyclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]-4-il) fenil fosfato; Tropix, Inc.). Las etiquetas pueden ser también enzimas, tales como la fosfavelocidadalcalina, la peroxidasa de soja, la peroxidasa de rábano picante y polimerasas, que pueden detectarse, por ejemplo, con amplificación de señales químicas o mediante el uso de un sustrato para la enzima que produce luz (por ejemplo, un sustrato 1,2-dioxetano quimioluminiscente) o señal fluorescente.

Las moléculas que combinan dos o más de estas etiquetas de detección se consideran también etiquetas de detección. Se puede utilizar cualquiera de las etiquetas de detección conocidas con las sondas, etiquetas y método descrito para etiquetar y detectar ácido nucleico amplificado usando el método descrito. Los métodos para detectar y medir las señales generadas por las etiquetas de detección son conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, es posible detectar isótopos radioactivos mediante recuento por centelleo o visualización directa; se pueden detectar moléculas fluorescentes con espectrofotómetros fluorescentes; se pueden detectar moléculas con un espectrofotómetro o visualizarlas directamente con una cámara; se pueden detectar enzimas mediante detección o visualización del producto de una reacción catalizada por la enzima; se pueden detectar anticuerpos detectando una etiqueta de detección secundaria acoplada al anticuerpo. Tal como se utiliza en la presente, las moléculas de detección son moléculas que interactúan con el ácido nucleico amplificado y a las cuales se acoplan una o más

etiquetas de detección.

#### J. Sondas de detección

Las sondas de detección son oligonucleótidos etiquetados que tienen una secuencia complementaria a las etiquetas de detección en ácidos nucleicos amplificados. La parte complementaria de una sonda de detección puede tener cualquier longitud que respalde la hibridación específica y estable entre la sonda de detección y la etiqueta de detección. Con esta finalidad, se prefiere una longitud de 10 a 35 nucleótidos, siendo una parte complementaria de la sonda de detección de 16 a 20 nucleótidos de longitud la más preferida. Las sondas de detección pueden contener cualquiera de las etiquetas de detección descritas anteriormente. Las etiquetas preferidas son moléculas fluorescentes y biotina. Una sonda de detección particularmente preferida es una baliza molecular. Las balizas moleculares son sondas de detección etiquetadas con restos fluorescentes donde los restos fluorescentes tienen fluorescencia solamente cuando se hibrida la sonda de detección (Tyagi y Kramer, *Nature Biotechnol.* **14**:303- 309 (1995)). El uso de dichas sondas elimina la necesidad de quitar las sondas no hibridadas antes de la detección de etiquetas porque las sondas de detección no hibridadas no producirán una señal. Esto es especialmente útil en ensayos múltiplex.

#### K. Sondas de dirección

Una sonda de dirección es un oligonucleótido que tiene una secuencia complementaria a las etiquetas de dirección en los cebadores. La parte complementaria de una sonda de dirección puede tener cualquier longitud que respalde la hibridación específica y estable entre la sonda de dirección y la etiqueta de dirección. Con esta finalidad, se prefiere una longitud de 10 a 35 nucleótidos, siendo una parte complementaria de la sonda de dirección de 12 a 18 nucleótidos de longitud la más preferida. Una sonda de dirección puede contener una sola parte complementaria o múltiples partes complementarias. Preferiblemente, las sondas de dirección se acoplan, ya sea directamente o por medio de una molécula espaciadora, a un soporte de estado sólido. Dicha combinación de sonda de dirección y soporte de estado sólido es una forma preferida de detector de estado sólido.

#### L. Síntesis de oligonucleótidos

Se puede sintetizar cebadores, sondas de detección, sondas de dirección y cualquier otro oligonucleótido mediante métodos de síntesis de oligonucleótidos establecidos. En la técnica se conocen muy bien los métodos para producir o sintetizar oligonucleótidos. Dichos métodos pueden abarcar desde la digestión enzimática estándar seguida del aislamiento de fragmentos de nucleótidos (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) Capítulos 5, 6) hasta métodos puramente sintéticos, por ejemplo, mediante el método de cianoetil fosforamidita. La síntesis química de fase sólida de fragmentos de ADN se realiza habitualmente usando cianoetil fosforamiditas de nucleósido protegido (S. L. Beaucage *et al.* (1981) *Tetrahedron Lett.* **22**:1859). En este enfoque, el grupo 3'-hidroxilo de un nucleósido protegido en 5' inicial, se une primero de forma covalente al soporte del polímero (R. C. Pless *et al.* (1975) *Nucleic Acids Res.* **2**:773 (1975)). Luego, la síntesis del oligonucleótido sigue con la desprotección del grupo 5'-hidroxilo del nucleósido unido, seguido por el acoplamiento de un nucleósido-3'-fosforamidita que ingresa al grupo hidroxilo desprotegido (M. D. Matteucci *et al.* (1981) *J. Am. Chem. Soc.* **103**:3185). Finalmente, el triéster de fosfito se oxida con un fosfortriéster para completar el enlace internucleótido (R. L. Letsinger *et al.* (1976) *J. Am. Chem. Soc.* **9**:3655). De manera alternativa, se puede llevar a cabo la síntesis de enlaces de fosforotioato mediante sulfuración del triéster de fosfito. Para realizar dicha reacción se pueden utilizar varios químicos, entre ellos 3H-1,2-benzoditio-3-ona, 1,1-dióxido (R.P. Iyer, W. Egan, J.B. Regan y S.L. Beaucage, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**,1253-1254). Se repiten las etapas de desprotección, acoplamiento y oxidación hasta que se obtenga un oligonucleótido de longitud y secuencia deseadas. Existen otros métodos para generar oligonucleótidos tales como el método H-fosfonato (Hall *et al.*, (1957) *J. Chem. Soc.*, 3291-3296) o el método de fosfortriéster tal como lo describieron Ikuta *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* **53**:323-356 (1984), (métodos con fosfortriéster y triéster de fosfito), y Narang *et al.*, *Methods Enzymol.*, **65**:610-620 (1980), (método de fosfortriéster). Se pueden elaborar moléculas de proteínas de ácido nucleico mediante métodos conocidos tales como los que describieron Nielsen *et al.*, *Bioconj. Chem.* **5**:3-7 (1994). En la patente estadounidense N.º 6,294,664 y en la patente estadounidense N.º 6,291,669 se describen otras formas de síntesis de oligonucleótidos.

Generalmente, la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido se determina por el orden secuencial en el que se agregan subunidades de bloques de subunidades a la cadena de oligonucleótidos durante la síntesis. Cada ronda de adición puede implicar un precursor de nucleótidos específico diferente o una mezcla de uno o más precursores de nucleótidos distintos. En general, se pueden producir posiciones degeneradas o aleatorias en un oligonucleótido mediante el uso de precursores de nucleótidos que representan la variedad de nucleótidos que pueden estar presentes en esa posición. Por lo tanto, los precursores para A y T pueden incluirse en la reacción para una posición particular en un oligonucleótido si esa posición se debe generar para A y T. Los precursores para los cuatro nucleótidos pueden incluirse para una posición completamente degenerada o aleatoria. Se pueden elaborar oligonucleótidos completamente aleatorios al incluir los cuatro precursores de nucleótidos en cada ronda de la síntesis. Los oligonucleótidos degenerados pueden elaborarse también con distintas proporciones de diferentes nucleótidos. Dichos oligonucleótidos pueden elaborarse, por ejemplo, usando diferentes precursores de nucleótidos en las proporciones deseadas en la reacción.

Muchos de los oligonucleótidos que se describieron en la presente están diseñados para ser complementarios de determinadas partes de otros oligonucleótidos o ácidos nucleicos de manera que entre ellos puedan formarse híbridos estables. Se puede calcular la estabilidad de dichos híbridos mediante métodos conocidos tales como los que se describen en Lesnick y Freier, *Biochemistry* **34**:10807-10815 (1995), McGraw *et al.*, *Biotechniques* **8**:674-678 (1990), y Rychlik *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **18**:6409-6412 (1990).

Los oligonucleótidos hexámeros se sintetizaron en un sistema de síntesis de ácidos nucleicos expedito Perseptive Biosystems 8909 usando química de acoplamiento de  $\beta$ -cianoetil fosforamidita estándar en columnas de síntesis dA+dC+dG+dT mezcladas (Glen Research, Sterling, VA). Las cuatro fosforamiditas se mezclaron en proporciones iguales para aleatorizar las bases en cada posición en el oligonucleótido. La oxidación de las fosfitas recién formadas se realizó usando el reactivo de sulfuración 3H-1,2-benzotiol-3-ona-1,1-idóxido (Glen Research) en vez del reactivo de oxidación estándar luego de la primera y segunda etapa de adición de fosforamidita. Los oligonucleótidos tio-fosfitilados se desprotegeron usando hidróxido de amonio al 30 % (3,0 ml) en agua a 55 °C durante 16 horas, se concentraron en una unidad de desprotección Savant Oligo Prep OP 120 durante 2 horas y se desalaron con columnas Sephadex PD10 usando el protocolo proporcionado por el fabricante.

#### M. ADN polimerasas

Las ADN polimerasas útiles en la amplificación por desplazamiento múltiple deben ser capaces de desplazar, ya sea solas o en combinación con un factor de desplazamiento de cadena compatible, una cadena hibridada que se encuentra durante la replicación. Dichas polimerasas se denominan en la presente ADN polimerasas con desplazamiento de cadena. Se prefiere que una ADN polimerasa con desplazamiento de cadena carezca de una actividad de exonucleasas 5' a 3'. El desplazamiento de cadena es necesario para provocar la síntesis de múltiples copias de una secuencia diana. Una actividad de exonucleasas 5' a 3', si se encuentra presente, puede provocar la destrucción de una cadena sintetizada. Se prefiere también que las ADN polimerasas para usar en el método descrito sean sumamente procesivas. La adecuación de una ADN polimerasa para usar en el método descrito puede determinarse fácilmente evaluando su capacidad para realizar la replicación por desplazamiento de cadena. Las ADN polimerasas con desplazamiento de cadena preferidas son la ADN polimerasa del bacteriófago  $\Phi$ 29 (patentes estadounidenses N.º 5,198,543 y 5,001,050 para Blanco *et al.*), la ADN polimerasa de fragmento grande Bst (Exo(-) Bst; Aliotta *et al.*, *Genet. Anal. (Países Bajos)* **12**:185-195 (1996)) y la ADN polimerasa exo(-)Bca (Walker y Linn, *Clinical Chemistry* **42**:1604-1608 (1996)). Otras polimerasas útiles incluyen la ADN polimerasa del fago M2 (Matsumoto *et al.*, *Gene* **84**:247 (1989)), la ADN polimerasa del fago  $\Phi$ PRD1 (Jung *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **84**:8287 (1987)), la ADN polimerasa exo(-)VENT® (Kong *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**:1965-1975 (1993)), fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I (Jacobsen *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **45**:623-627 (1974)), la ADN polimerasa T5 (Chatterjee *et al.*, *Gene* **97**:13-19 (1991)), Sequenase (U.S. Biochemicals), la ADN polimerasa PRD1 (Zhu y Ito, *Biochim. Biophys. Acta.* **1219**:267-276 (1994)), y la holoenzima de ADN polimerasa T4 (Kaboord y Benlcovic, *Curr. Biol.* **5**:149-157 (1995)), la ADN polimerasa  $\Phi$ 29 es la más preferida.

El desplazamiento de cadena puede facilitarse a través del uso de un factor de desplazamiento de cadena, tal como la helicasa. Se considera que cualquier ADN polimerasa que pueda realizar la replicación por desplazamiento de cadena en presencia de un factor de desplazamiento de cadena es adecuada para uso en el método descrito, incluso si la ADN polimerasa no realiza la replicación por desplazamiento de cadena en ausencia de dicho factor. Los factores de desplazamiento de cadena útiles en la replicación por desplazamiento de cadena incluyen la subunidad accesoria de la BMRF1 polimerasa (Tsurumi *et al.*, *J. Virology* **67**(12):7648-7653 (1993)), la proteína de unión al ADN adenovirus (Zijderveld y van der Yliet, *J. Virology* **68**(2): 1158-1164 (1994)), la proteína viral del herpes simple ICP8 (Boehmer y Lehman, *J. Virology* **67**(2):711-715 (1993); Skaliter y Lehman, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **91**(22): 10665-10669 (1994)); proteínas de unión al ADN monocatenario (SSB; Rigler y Romano, *J. Biol. Chem.* **270**:8910-8919 (1995)); proteína 32 génica de fago T4 (Villemain y Giedroc, *Biochemistry* **35**:14395-14404 (1996)); y helicasa del timo de ternera (Siegel *et al.*, *J. Biol. Chem.* **267**:13629-13635 (1992)).

La capacidad de una polimerasa de realizar la replicación por desplazamiento de cadena puede determinarse usando la polimerasa en un ensayo de replicación por desplazamiento de cadena tal como los que se describen en los Ejemplos 1 y 5. El ensayo en los ejemplos puede modificarse según sea apropiado. Por ejemplo, se puede usar una helicasa en vez de SSB. Dichos ensayos deben llevarse a cabo a una temperatura adecuada para que la enzima que se está usando tenga una actividad óptima, por ejemplo, 32 °C para la ADN polimerasa  $\Phi$ 29, de 46 °C a 64 °C para la ADN polimerasa exo(-) Bst o de aproximadamente 60 °C a 70 °C para una enzima de un organismo hipertermófilo. Para los ensayos de 60°C a 70°C, se puede aumentar la longitud de los cebadores para proporcionar una temperatura de fusión adecuada para la temperatura del ensayo. Otro ensayo útil para seleccionar una polimerasa es el ensayo de bloque de cebadores descrito en Kong *et al.*, *J. Biol. Chem.* **268**:1965-1975 (1993). El ensayo consiste en un ensayo de extensión de cebadores que usa una plantilla del ADN monocatenario M13 en presencia o ausencia de un oligonucleótido que se hibrida antes del cebador de extensión para bloquear su avance. Se espera que las enzimas capaces de desplazar el cebador de bloqueo en este ensayo sean útiles para el método descrito.

#### N. Kits

Los materiales que se describieron anteriormente pueden ser envasados juntos en cualquier combinación adecuada

como un kit útil para llevar a cabo el método descrito. Los componentes del kit en un kit dado están diseñados y adaptados para su uso conjunto en el método descrito. Por ejemplo, se describen kits para amplificar el ADN genómico, tal kit comprende una solución de lisis, una solución de estabilización, un conjunto de cebadores y una ADN polimerasa. Se describen en otra parte de la presente los componentes de dicho kit. En algunas formas del kit, la solución de lisis puede comprender hidróxido de potasio, por ejemplo, 400 mM de KOH. Algunas formas útiles de la solución de lisis pueden comprender 400 mM de KOH, 100 mM de ditiotreitol y 10 mM de EDTA. En algunas formas del kit, la solución de estabilización puede comprender Tris-HCl a pH 4,1. Algunas formas útiles de la solución de estabilización pueden comprender 800 mM de Tris-HCl, pH 4,1. En algunas formas del kit, el conjunto de cebadores puede comprender cebadores hexámeros aleatorios. En algunas formas del kit, la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi$ 29. En algunas formas del kit, el kit puede comprender además desoxinucleótidos trifosfatos. En algunas formas del kit, el kit puede comprender una o más sondas de detección. Las sondas de detección se describen en otra parte en la presente. En algunas formas del kit, las sondas de detección pueden comprender cada una parte complementaria, donde la parte complementaria es complementaria a una secuencia de ácido nucleico de interés. En algunas formas del kit, el kit puede comprender además una solución de desnaturalización. En algunas formas del kit, el kit puede comprender además una mezcla de reacción.

Algunos kits útiles pueden comprender una solución de lisis, una solución de estabilización, un conjunto de cebadores, una ADN polimerasa  $\Phi$ 29, 1M ditiotreitol, 1X solución salina tamponada con fosfato, pH 7,5, y plantilla de ADN de control; donde la solución de lisis comprende 400 mM de KOH y 10 mM de EDTA, la solución de estabilización comprende 800 mM de Tris-HCl, pH 4, y el conjunto de cebadores comprende una mezcla de reacción; donde la mezcla de reacción comprende 150 mM de Tris-HCl, 200 mM de HCl, 40 mM de  $MgCl_2$ , 20 mM de  $(NH_4)_2SO_4$ , mM de desoxinucleótidos trifosfatos, y 0,2 mM de cebadores hexámeros aleatorios.

Cualquiera de los componentes que pueden estar presentes en un kit, que pueden utilizarse juntos, se pueden combinar en un único componente del kit. Por lo tanto, una mezcla de reacción puede incluir, por ejemplo, tampones, desoxinucleótidos trifosfatos y cebadores. De manera similar, los componentes y soluciones pueden dividirse en partes constituyentes o subsoluciones. Los kits pueden utilizarse para cualquier propósito, generalmente, para la amplificación de ácidos nucleicos. En algunas formas, el kit puede diseñarse para detectar las secuencias de ácido nucleico de interés en un genoma u otras muestras de ácido nucleico. En algunas formas, el kit puede diseñarse para evaluar una enfermedad, afección o predisposición de un individuo de acuerdo con una secuencia de ácido nucleico de interés.

#### O. Mezclas

Se describen mezclas que se forman realizando cualquier forma del método descrito o que se forman durante la realización de este. Por ejemplo, se describen mezclas que comprenden, por ejemplo, células y solución de lisis; lisado celular y solución de estabilización; lisado celular estabilizado y uno o más cebadores; lisado celular estabilizado y ADN polimerasa; lisado celular estabilizado, uno o más cebadores y ADN polimerasa; lisado celular estabilizado y cadenas replicadas; lisado celular estabilizado; uno o más cebadores y cadenas replicadas; lisado celular estabilizado, ADN polimerasa y cadenas replicadas; lisado celular estabilizado, uno o más cebadores, ADN polimerasa y cadenas replicadas; lisado celular estabilizado y una o más sondas de detección; lisado celular estabilizado, uno o más cebadores, una o más sondas de detección y cadenas replicadas; lisado celular estabilizado, ADN polimerasa; una o más sondas de detección y cadenas replicadas; y lisado celular estabilizado, uno o más cebadores, ADN polimerasa, una o más sondas de detección y cadenas replicadas.

Cuando el método implica mezclar o poner en contacto, por ejemplo, composiciones o componentes o reactivos, la realización del método crea una cantidad de mezclas diferentes. Por ejemplo, si el método incluye tres etapas de mezclado, después de cada una de estas etapas se forma una única mezcla si las etapas se llevan a cabo en forma secuencial.

Además, se forma una mezcla al término de todas las etapas independientemente de cómo se llevaron a cabo las etapas. La presente descripción contempla estas mezclas obtenidas al llevar a cabo el método descrito, así como también mezclas que contienen cualquier reactivo, composición o componente descrito, por ejemplo, descrito en la presente.

#### Usos

El método y las composiciones descritas son aplicables en varias áreas que incluyen, pero no se limitan al análisis de ácidos nucleicos presentes en las células (por ejemplo, análisis de ADN genómico en las células), detección de enfermedades, detección de mutaciones, descubrimiento de genes, mapeo de genes (haplotipos moleculares) e investigación agrícola. La amplificación genómica es particularmente útil. Otros usos incluyen, por ejemplo, la detección de ácidos nucleicos en células y en matrices de ADN genómico; haplotipos moleculares; detección de mutaciones, detección de enfermedades hereditarias tales como fibrosis quística, distrofia muscular, diabetes, hemofilia, anemia de células falciformes; evaluación de la predisposición a cánceres como el cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de páncreas.

#### Método

El método descrito se basa en la replicación por desplazamiento de cadena de secuencias de ácido nucleico por parte de múltiples cebadores. El método puede utilizarse para amplificar una o más secuencias específicas (amplificación por desplazamiento de cadena múltiple), un genoma completo u otro ADN de alta complejidad (amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo) o ADN concatenado (amplificación por desplazamiento de cadena múltiple del ADN concatenado). El método descrito implica, por lo general, la hibridación de los cebadores con una secuencia de ácido nucleico diana y la replicación de la secuencia diana cebada por medio de los cebadores hibridados de modo que la replicación de la secuencia diana da como resultado cadenas replicadas complementarias a la secuencia diana. Durante la replicación, las crecientes cadenas replicadas desplazan a otras cadenas replicadas de la secuencia diana (o de otra cadena replicada) a través de la replicación por desplazamiento de cadena. Tal como se utiliza en la presente, una cadena replicada es una cadena de ácido nucleico que resulta del alargamiento de un cebador hibridado con una secuencia diana o con otra cadena replicada. La replicación por desplazamiento de cadena hace referencia a la replicación del ADN donde un extremo creciente de una cadena replicada encuentra y desplaza otra cadena de la cadena de plantilla (o de otra cadena replicada). El desplazamiento de las cadenas replicadas por otras cadenas replicadas es un distintivo del método descrito que permite que se realicen múltiples copias de una secuencia diana en una única reacción isotérmica.

Los ácidos nucleicos para la amplificación se obtienen con frecuencia de muestras celulares. Esto exige generalmente la alteración de la célula (para tener fácil acceso al ácido nucleico) y la purificación de los ácidos nucleicos antes de la amplificación. También exige generalmente la inactivación de factores proteicos tales como las nucleasas que podrían degradar el ADN o de factores tales como las histonas que podrían unirse a las cadenas de ADN e impedir su uso como plantilla para la síntesis del ADN por medio de una polimerasa. Existe una gama de técnicas que se utilizan para liberar las células, tal como la sonicación, la digestión enzimática de paredes celulares, el calentamiento y la exposición a condiciones líticas. Las condiciones líticas implican generalmente el uso de pH no fisiológico y/o solventes. Muchas técnicas líticas pueden provocar daño a los ácidos nucleicos en las células, lo que incluye la ruptura del ADN genómico. En particular, el uso de calor para lisar células puede dañar el ADN genómico y reduce la cantidad y calidad de productos de amplificación del ADN genómico. Se ha descubierto que la lisis alcalina puede provocar menos daño al ADN genómico y puede dar lugar, por lo tanto, a resultados de amplificación de mayor calidad. La lisis alcalina también inactiva factores proteicos tales como nucleasas, histonas u otros factores que podrían impedir la amplificación del ADN dentro de la muestra. Además, una propiedad útil de la lisis alcalina es que la reducción del pH no reactiva los factores proteicos, pero que dichos factores proteicos permanecen inactivados cuando se restablece el pH de la solución dentro de un intervalo neutro.

En algunas formas del método descrito, se prepara una muestra genómica exponiendo las células a condiciones alcalinas, lisando así las células y provocando un lisado celular; reduciendo el pH del lisado celular para hacer que el pH del lisado celular sea compatible con la replicación del ADN; e incubando el lisado celular en condiciones que promueven la replicación del genoma de las células mediante amplificación por desplazamiento múltiple. Las condiciones alcalinas son condiciones donde el pH es superior a 9,0. Las condiciones alcalinas particularmente útiles para el método descrito son las condiciones donde el pH es superior a 10,0. Las condiciones alcalinas pueden ser, por ejemplo, aquellas que provocan que se lise una cantidad sustancial de células, aquellas que provocan que se lise una cantidad significativa de células o aquellas que provocan que se lise una cantidad suficiente de células. La cantidad de células lisadas puede considerarse suficiente si el genoma puede amplificarse suficientemente en el método descrito. La amplificación es suficiente si se produce suficiente producto de amplificación para permitir algún uso del producto de amplificación, tal como la detección de secuencias u otros análisis. La reducción en el pH se encuentra generalmente en el intervalo neutro de pH 9,0 a pH 6,0.

Las células pueden exponerse a condiciones alcalinas mezclando las células con una solución de lisis. La cantidad de solución de lisis mezclada con las células puede ser esa cantidad que provoca que se lise una cantidad sustancial de células o aquella que provoca que se lise una cantidad suficiente de células. Generalmente, este volumen estará directamente determinado por el pH de la mezcla celular/solución de lisis. Por lo tanto, es posible determinar generalmente la cantidad de solución de lisis que se mezcla con células a partir del volumen de las células y la concentración alcalina del tampón de lisis. Por ejemplo, se necesitaría un volumen más pequeño de una solución de lisis con una base más fuerte y/o mayor concentración de base para crear condiciones alcalinas suficientes que el volumen que se necesita de una solución de lisis con una base más débil y/o menor concentración de base. La solución de lisis puede formularse de modo que las células se mezclen con un volumen igual de la solución de lisis (para producir las condiciones alílicas deseadas).

En algunas realizaciones, la solución de lisis puede comprender una base, tal como una base acuosa. Las bases útiles incluyen hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, acetato de potasio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de calcio, amoníaco, anilina, bencilamina, n-butilamina, dietilamina, dimetilamina, difenilamina, etilamina, etilendiamina, metilamina, N-metilnilina, morfolina, piridina, trietilamina, trimetilamina, hidróxido de aluminio, hidróxido de rubidio, hidróxido de cesio, hidróxido de estroncio, hidróxido de bario y DBU (1,8-diazobicyclo[5,4,0]undec-7-eno). Las formulaciones útiles de la solución de lisis incluyen solución de lisis que comprende 400 mM de KOH, solución de lisis que comprende 400 mM de KOH, 100 mM de ditiotreitól y 10 mM de EDTA, y solución de lisis que consiste en 400 mM de KOH, 100 mM de ditiotreitól y 10 mM de EDTA.

En algunas realizaciones, la solución de lisis puede comprender múltiples agentes básicos. Tal como se utiliza en la presente, un agente básico es un compuesto, composición o solución que provoca condiciones de desnaturalización. En algunas realizaciones, la solución de lisis puede comprender un tampón. Los tampones útiles incluyen tampones de fosfato, tampones «Good» (tales como BES, BICINE, CAPS, EPPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, TAPS, TES y TRICINE), cacodilato de sodio, citrato de sodio, acetato de trietilamonio, bicarbonato de trietilamonio, Tris, Bis-tris y Bis-tris propano. La solución de lisis puede comprender múltiples agentes amortiguadores. Tal como se utiliza en la presente, un agente amortiguador es un compuesto, composición o solución que actúa como un tampón. Un agente amortiguador alcalino es un agente amortiguador que provoca condiciones alcalinas. En algunas realizaciones, la solución de lisis puede comprender una combinación de una o más bases, agentes básicos, tampones y agentes amortiguadores.

El pH del lisado celular puede reducirse para formar un lisado celular estabilizado. Un lisado celular estabilizado es un lisado celular cuyo pH se encuentra en el intervalo neutro (de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 9,0). Los lisados celulares estabilizados útiles tienen un pH que permite la replicación de los ácidos nucleicos en el lisado celular. Por ejemplo, el pH del lisado celular estabilizado es útil en un pH en el que puede funcionar la ADN polimerasa. El pH del lisado celular puede reducirse mezclando el lisado celular con una solución de estabilización. La solución de estabilización comprende una solución que puede reducir el pH de un lisado celular expuesto a condiciones alcalinas como se describe en otra parte en la presente.

La cantidad de solución de estabilización mezclada con el lisado celular puede ser la cantidad que provoca una reducción en el pH para el intervalo neutro (u otro valor de pH deseado). Generalmente, este volumen estará directamente determinado por el pH de la mezcla de solución de estabilización/lisado celular. Por lo tanto, es posible determinar generalmente la cantidad de solución de estabilización que se mezcla con el lisado celular a partir del volumen del lisado celular, su pH y capacidad amortiguadora, y la concentración ácida del tampón de estabilización. Por ejemplo, se necesitaría un volumen más pequeño de una solución de estabilización con un ácido más fuerte y/o mayor concentración de ácido para reducir el pH en el grado necesario que el volumen que se necesita de una solución de estabilización con un ácido más débil y/o menor concentración de ácido. La solución de estabilización puede formularse de modo que el lisado celular se mezcle con un volumen igual de la solución de estabilización (para producir el pH deseado).

En algunas realizaciones, la solución de estabilización puede comprender un ácido. Los ácidos útiles incluyen ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido nítrico, ácido perclórico, HF, HBr, HI, H<sub>2</sub>S, HCN, HSCN, HClO, ácido monocloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético y cualquier ácido carboxílico (etanoico, propanoico, butanoico, etc., que incluye ambos ácidos carboxílicos de cadena lineal o ramificada). En algunas realizaciones, la solución de estabilización puede comprender un tampón. Los tampones útiles incluyen Tris-HCl, HEPES, tampones «Good» (tales como BES, BICINE, CAPS, EPPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, TAPS, TES y TRICINE), cacodilato de sodio, citrato de sodio, acetato de trietilamonio, bicarbonato de trietilamonio, Tris, Bis-tris y Bis-tris propano. Las formulaciones útiles de soluciones de estabilización incluyen solución de estabilización que comprende 800 mM de Tris-HCl; solución de estabilización que comprende 800 mM de Tris-HCl a pH 4,1, y solución de estabilización que consiste en 800 mM de Tris-HCl, pH 4,1.

En algunas realizaciones, la solución de estabilización puede comprender múltiples agentes ácidos. Tal como se utiliza en la presente, un agente ácido es un compuesto, composición o solución que forma un ácido en solución. En algunas realizaciones, la solución de estabilización puede comprender múltiples agentes amortiguadores. Un agente amortiguador ácido es un agente amortiguador que forma un ácido en solución. En algunas realizaciones, la solución de estabilización puede comprender una combinación de uno o más ácidos, agentes ácidos, tampones y agentes amortiguadores.

En algunas realizaciones, el pH del lisado celular puede reducirse a aproximadamente pH 9,0 o menos, a aproximadamente pH 8,5 o menos, a aproximadamente pH 8,0 o menos, a aproximadamente pH 7,5 o menos, a aproximadamente pH 7,2 o menos o a aproximadamente pH 7,0 o menos. En algunas realizaciones, el pH del lisado celular puede reducirse hasta el intervalo de aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 6,0 hasta el intervalo de aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 6,5, hasta el intervalo de aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 7,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 7,2 hasta el intervalo de aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 7,5 hasta el intervalo de aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 8,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente 8,5 de pH, hasta el intervalo de aproximadamente pH 8,5 a aproximadamente pH 6,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 8,5 a aproximadamente pH 6,5, hasta el intervalo de aproximadamente pH 8,5 a aproximadamente pH 6,8 hasta el intervalo de aproximadamente pH 8,5 a aproximadamente pH 7,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 8,5 a aproximadamente pH 7,2, hasta el intervalo de aproximadamente pH 8,5 a aproximadamente pH 7,5, hasta el intervalo de aproximadamente pH 8,5 a aproximadamente pH 8,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 8,0 a aproximadamente pH 6,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 8,0 a aproximadamente pH 6,5, hasta el intervalo de aproximadamente pH 8,0 a aproximadamente pH 7,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 8,0 a aproximadamente pH 7,2, hasta el intervalo de aproximadamente pH 8,0 a

aproximadamente 7,5 de pH, hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,5 a aproximadamente pH 6,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,5 a aproximadamente pH 6,5, hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,5 a aproximadamente pH 6,8 hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,5 a aproximadamente pH 7,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,5 a aproximadamente pH 7,2 hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,2 a aproximadamente pH 6,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,2 a aproximadamente pH 6,5, hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,2 a aproximadamente pH 6,8 hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,2 a aproximadamente pH 7,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 6,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 6,5, hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 6,8 hasta el intervalo de aproximadamente pH 6,8 a aproximadamente pH 6,0, hasta el intervalo de aproximadamente pH 6,8 a aproximadamente pH 6,5, o hasta el intervalo de aproximadamente pH 6,5 a aproximadamente pH 6,0. En algunas realizaciones, el pH del lisado celular puede reducirse a cualquier intervalo que tenga cualquier combinación de criterios de valoración de aproximadamente pH 6,0 a aproximadamente pH 9,0. Todos los criterios de valoración e intervalos se contemplan de forma específica y separada.

En algunas realizaciones, las células no se lisan mediante calor. Los expertos en la técnica entenderán que las diferentes células en distintas condiciones se lisarán a distintas temperaturas y así se pueden determinar las temperaturas y los tiempos en los que las células no se lisarán mediante calor. En general, las células no se someten a un calentamiento por encima de una temperatura y durante un tiempo eso causaría una lisis celular sustancial en ausencia de las condiciones alcalinas utilizadas. Tal como se utiliza en la presente, la lisis celular sustancial hace referencia al 90 % o más de las células expuestas a condiciones alcalinas. La lisis celular significativa hace referencia a la lisis del 50 % o más de las células expuestas a condiciones alcalinas. La lisis celular suficiente hace referencia a la lisis de suficientes células expuestas a condiciones alcalinas para permitir la síntesis de una cantidad detectable de productos de amplificación mediante la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple. En general, las condiciones alcalinas usadas en el método descrito solamente necesitan provocar lisis celular suficiente. Debería entenderse que no es necesario que las condiciones alcalinas que podrían provocar lisis celular significativa o sustancial provoquen lisis celular significativa o sustancial cuando se realiza el método.

En algunas realizaciones, las células no se someten a un calentamiento sustancial o considerablemente por encima de la temperatura en la que crecen las células. Tal como se utiliza en la presente, la temperatura en la que crecen las células hace referencia a la temperatura estándar o las distintas temperaturas estándar más elevadas en las que se cultivan las células del mismo tipo. En el caso de las células de animales, la temperatura en la que crecen las células hace referencia a la temperatura corporal del animal. En otras realizaciones, las células no se someten a un calentamiento sustancial o considerablemente por encima de la temperatura de la reacción de amplificación (donde se replica el genoma).

En algunas realizaciones, el lisado celular no se somete a purificación antes de la reacción de amplificación. En el contexto del método descrito, purificación hace referencia, generalmente, a la separación de los ácidos nucleicos de otro material en el lisado celular. Se ha descubierto que la amplificación por desplazamiento múltiple puede realizarse en muestras no purificadas y parcialmente purificadas. Se cree comúnmente que las reacciones de amplificación no se pueden llevar a cabo de forma eficiente usando ácido nucleico no purificado. En particular, la PCR es muy sensible a los contaminantes.

Las formas de purificación incluyen centrifugación, extracción, cromatografía, precipitación, filtración y diálisis. El lisado celular parcialmente purificado incluye lisados celulares sometidos a centrifugación, extracción, cromatografía, precipitación, filtración y diálisis. El lisado celular parcialmente purificado no incluye lisados celulares sometidos a precipitación o diálisis de ácidos nucleicos. Tal como se utiliza en la presente, la separación del ácido nucleico de otro material hace referencia a una separación física, de modo que el ácido nucleico que se debe simplificar se encuentre en un recipiente o recipiente diferente del material. La purificación no exige la separación de todo el ácido nucleico de todos los demás materiales. En vez de eso, lo que se exige es la separación de algún ácido nucleico de algún otro material. Tal como se utiliza en el contexto de los ácidos nucleicos que se deben amplificar, la purificación hace referencia a la separación del ácido nucleico de otro material. En el contexto de los lisados celulares, la purificación hace referencia a la separación de los ácidos nucleicos de otro material en el lisado celular. Tal como se utiliza en la presente, la purificación parcial hace referencia a la separación del ácido nucleico de algo, aunque no todo, del otro material con el cual se mezcla el ácido nucleico. En el contexto de los lisados celulares, la purificación parcial hace referencia a la separación del ácido nucleico de algo, aunque no todo, del otro material en el lisado celular.

A menos que el contexto indique claramente de otro modo, la referencia en la presente a una falta de purificación, falta de uno o más tipos de purificación u operaciones o técnicas de separación, o exclusión de purificación o uno o más tipos de purificación u operaciones o técnicas de separación no abarca la exposición de las células a condiciones alcalinas (o sus resultados), la reducción del pH de un lisado celular (o sus resultados). Es decir, en la medida que las condiciones alcalinas y la reducción de pH del método descrito produzcan un efecto que podría considerarse de «purificación» o «separación», dichos efectos se excluyen de la definición de purificación y separación cuando esos términos se utilizan en el contexto de procesamiento y manipulación de lisados celulares y lisados celulares estabilizados (a menos que el contexto indique claramente de otro modo).

Tal como se utiliza en la presente, la purificación sustancial hace referencia a la separación del ácido nucleico de al

menos una parte sustancial de otro material con el cual se mezcla el ácido nucleico. En el contexto de los lisados celulares, la purificación sustancial hace referencia a la separación del ácido nucleico de al menos una parte sustancial de otro material en el lisado celular. Una parte sustancial hace referencia al 90 % del otro material implicado. A los niveles específicos de purificación se los conoce como porcentaje de purificación (tal como 95 % de purificación y 70 % de purificación). Un porcentaje de purificación hace referencia a la purificación que provoca la separación del ácido nucleico de al menos el porcentaje designado del otro material con el cual se mezcla el ácido nucleico.

La desnaturalización de las moléculas de ácido nucleico que se deben amplificar es común en las técnicas de amplificación. Esto es especialmente cierto cuando se amplifica el ADN genómico. En particular, la PCR utiliza múltiples ciclos de desnaturalización. La desnaturalización se utiliza, generalmente, para elaborar cadenas de ácido nucleico accesibles para los cebadores. Se descubrió que no es necesario que los ácidos nucleicos diana, el ADN genómico, por ejemplo, estén desnaturalizados para una amplificación por desplazamiento múltiple eficiente. Se descubrió también que la eliminación de una etapa de desnaturalización y las condiciones de desnaturalización tiene ventajas adicionales tal como reducir el sesgo de secuencia en los productos amplificados. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos en el lisado celular no se desnaturalizan mediante calentamiento. En algunas realizaciones, el lisado celular no se somete a un calentamiento sustancial o considerablemente por encima de la temperatura en la que crecen las células. En otras realizaciones, el lisado celular no se somete a un calentamiento sustancial o considerablemente por encima de la temperatura de la reacción de amplificación (donde se replica el genoma). La reacción de amplificación por desplazamiento múltiple descrita se lleva a cabo generalmente a una temperatura sustancialmente constante (es decir, la reacción de amplificación es sustancialmente isotérmica) y esta temperatura se encuentra, generalmente, por debajo de la temperatura en la que los ácidos nucleicos se desnaturalizarían especialmente. Tal como se utiliza en la presente, la desnaturalización destacada hace referencia a la desnaturalización del 10 % o más de los pares de bases.

En formas preferidas del método descrito, la muestra de ácido nucleico o ácido nucleico plantilla no se somete a condiciones de desnaturalización y/o no se utiliza ninguna etapa de desnaturalización. En algunas formas del método descrito, la muestra de ácido nucleico o ácido nucleico de plantilla no se somete a condiciones de desnaturalización térmica y/o no se utiliza ninguna etapa de desnaturalización térmica. Debería entenderse que si bien la preparación de muestras (por ejemplo, la lisis celular y el procesamiento de extractos celulares) puede implicar condiciones que pueden considerarse de desnaturalización (por ejemplo, tratamiento con álcali), las condiciones o etapa de desnaturalización eliminadas en algunas formas del método descrito hacen referencia a las etapas o condiciones de desnaturalización previstas y utilizadas para elaborar cadenas de ácido nucleico accesibles para los cebadores. Dicha desnaturalización es comúnmente una desnaturalización térmica, pero también puede haber otras formas de desnaturalización tal como la desnaturalización química. Debería entenderse que en el método descrito donde la muestra de ácido nucleico o ácido nucleico de plantilla no se somete a las condiciones de desnaturalización, las cadenas de plantilla son accesibles para los cebadores (dado que se produce la amplificación). Sin embargo, las cadenas de plantilla no se ponen a disposición a través de la desnaturalización general de la muestra o ácidos nucleicos de plantilla.

La eficiencia de un procedimiento de amplificación de ADN puede describirse para loci individuales como el porcentaje de representación, donde el porcentaje de representación es 100 % para un locus en el ADN genómico según se purifica a partir de las células. Para una proporción de amplificación de 10.000 veces, la frecuencia de representación promedio fue del 141 % para 8 loci en ADN amplificado sin desnaturalización térmica de la plantilla, y 37 % para los 8 loci en ADN amplificado con desnaturalización térmica de la plantilla. La omisión de una etapa de desnaturalización térmica provoca una proporción de aumento de 3,8 veces en la frecuencia de representación para loci amplificados. Se puede calcular el sesgo de amplificación entre dos muestras de ADN amplificado o entre una muestra de ADN amplificado y el ADN de plantilla del que se amplificó. El sesgo es la relación entre los valores para el porcentaje de representación para un locus particular. El sesgo máximo es la relación del locus más representado con respecto al locus menos representado. Para la proporción de amplificación de 10.000 veces, el sesgo de amplificación máxima fue de 2,8 para el ADN amplificado sin desnaturalización térmica de la plantilla, y 50,7 para el ADN amplificado con desnaturalización térmica de la plantilla. La omisión de una etapa de desnaturalización térmica provoca una proporción de aumento de 18 veces en el sesgo máximo para los loci amplificados.

En otra forma del método, los cebadores pueden ser cebadores hexámeros. Se descubrió que dichos cebadores de 6 nucleótidos cortos pueden aún cebar la replicación por desplazamiento de cadena múltiple de forma eficaz. Dichos cebadores cortos son más fáciles de producir como un conjunto completo de cebadores de secuencia aleatoria (cebadores aleatorios) que los cebadores más largos porque hay menos para elaborar. En otra forma del método, los cebadores pueden incluir cada uno al menos un nucleótido modificado, de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa. En otra forma del método, los cebadores pueden contener cada uno al menos un nucleótido modificado, de modo que la temperatura de fusión del cebador se altera con respecto a un cebador de la misma secuencia sin el o los nucleótidos modificados. En otra forma del método, la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi$ 29. Se descubrió que la ADN polimerasa  $\Phi$ 29 produce mayor amplificación en la amplificación por desplazamiento múltiple. La combinación de dos o más de estas características produce también mejores resultados en la amplificación por desplazamiento múltiple. En una realización preferida, por ejemplo, la muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, los cebadores son cebadores hexámeros y contienen

nucleótidos modificados de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi$ 29. Las características anteriores son especialmente útiles en la amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo (WGSDA).

5 En otra forma del método descrito, el método incluye etiquetar las cadenas replicadas (es decir, las cadenas producidas en la amplificación por desplazamiento múltiple) usando la desoxinucleotidil transferasa terminal. Las cadenas replicadas pueden etiquetarse, por ejemplo, por medio de la adición de nucleótidos modificados, tales como nucleótidos biotinilados, nucleótidos fluorescentes, 5 metil dCTP, BrdUTP, o 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos, a los extremos 3' de las cadenas replicadas.

10 Algunas formas del método descrito proporcionan ADN amplificado de mayor calidad con respecto a los métodos descritos debido a la falta de un tratamiento de desnaturalización térmica del ADN que es la diana para la amplificación. Por lo tanto, el ADN de plantilla no experimenta los eventos de ruptura de cadena provocados por el tratamiento térmico y la amplificación que se logra por medio de una única ADN polimerasa se extiende mucho más a lo largo de las cadenas de plantilla de mayor longitud.

15 En una forma del método descrito, se puede mezclar una pequeña cantidad de ADN genómico humano de cadena doble y purificado (1 ng, por ejemplo) con cebadores hexámeros resistentes a la exonucleasa y ADN polimerasa  $\Phi$ 29 en condiciones que favorecen la síntesis del ADN. Por ejemplo, la mezcla puede incubarse simplemente a 30 °C y se producirá la amplificación por desplazamiento múltiple. Por lo tanto, se puede utilizar cualquier ADN monocatenario o dúplex sin ningún tratamiento adicional, haciendo del método descrito un procedimiento simple de una sola etapa. Dado que se necesita muy poca plantilla de ADN, una ventaja importante del método descrito es que  
20 se puede obtener la plantilla de ADN a partir de preparaciones que contienen niveles de contaminantes que inhibirían otros procedimientos de amplificación de ADN tal como la PCR. Para la MDA, la muestra puede diluirse de forma tal que los contaminantes disminuyan por debajo de la concentración en la cual estos interferirían con la reacción. El método descrito puede llevarse a cabo (y lograrse las ventajas anteriores) usando cualquier tipo de muestra, incluidos, por ejemplo, fluidos corporales tales como orina, semen, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico.  
25

La necesidad de pequeñas cantidades de plantilla de ADN solamente en el método descrito significa que el método es útil para la amplificación de ADN a partir de muestras muy pequeñas. En particular, el método descrito se puede utilizar para amplificar el ADN a partir de una única célula. La capacidad de obtener cantidades analizables de ácido nucleico a partir de una única célula (o de una pequeña muestra de forma similar) tiene muchas aplicaciones en  
30 procedimientos preparativos, analíticos y de diagnóstico tal como el diagnóstico prenatal. Otros ejemplos de muestras biológicas que contienen solamente pequeñas cantidades de ADN para las cuales sería útil la amplificación mediante el método descrito son el material extirpado de tumores u otras muestras médicas archivadas, biopsias por aspiración con agujas, muestras clínicas procedentes de infecciones tales como infecciones hospitalarias, muestras forenses o muestras de museo de especies extinguidas.

35 En un ámbito más general, el método descrito es útil para aplicaciones en las cuales las cantidades de ADN necesarias son mayores que el suministro. Por ejemplo, los procedimientos que analizan el ADN mediante técnicas de hibridación con chip están limitados por las cantidades de ADN que se pueden purificar a partir de muestras de sangre de tamaño típico. Como resultado, muchos procedimientos de hibridación con chip utilizan la PCR para generar un suministro suficiente de material para los procedimientos de alto rendimiento. El método descrito  
40 presenta una técnica útil para la generación de numerosas cantidades de ADN amplificado que reproduce fielmente las frecuencias de representación de locus del material de partida.

La amplificación del genoma completo mediante MDA se puede realizar directamente a partir de la sangre o células evitando la necesidad de aislar el ADN puro. Por ejemplo, la sangre o las células se pueden lisar mediante dilución con un volumen igual de 2X de tampón de lisis alcalina (400 mM de KOH, 100 mM de ditiotretol y 10 mM de EDTA),  
45 un ejemplo de una solución de lisis y se incuban 10 minutos en hielo. Las células lisadas pueden neutralizarse con el mismo volumen de tampón de neutralización (800 mM de Tris-HCl, pH 4,1), un ejemplo de una solución de estabilización. Las preparaciones de sangre o células lisadas (por ejemplo, 1 ml) se pueden utilizar directamente como plantilla en las reacciones de MDA (por ejemplo, 100 ml). Si se desea, antes de la lisis, la sangre se puede diluir 3 veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) y las células del cultivo tisular  
50 pueden diluirse a 30.000 células/ml en PBS.

Una realización específica del método descrito se describe en el Ejemplo 1, en donde la amplificación del genoma completo se lleva a cabo mediante MDA sin tratar térmicamente el ADN de plantilla humano. Como se muestra en el ejemplo, el método descrito produce un producto de amplificación de ADN con un mejor rendimiento en ensayos genéticos en comparación con la amplificación llevada a cabo con tratamiento térmico del ADN de plantilla. Los  
55 productos de ADN más largos producidos sin tratar térmicamente la plantilla producen fragmentos de ADN más grandes en la transferencia de Southern y análisis genético usando RFLP.

La ruptura de cadenas de ADN mediante tratamiento térmico se demuestra directamente en el Ejemplo 2, mientras que la disminución de la velocidad y el rendimiento de la amplificación de ADN a partir del ADN tratado con calor se ilustra en el Ejemplo 3. La disminución en la longitud de la cadena del producto de ADN que resulta del tratamiento

térmico de la plantilla de ADN se demuestra en el Ejemplo 4.

Una forma específica del método descrito se describe en el Ejemplo 5, en donde el ADN genómico humano purificado se amplifica mediante MDA sin tratar térmicamente a la plantilla. Como se muestra en el ejemplo, el método descrito produce un producto de amplificación de ADN sin ninguna pérdida de representación de locus cuando se usa como un sustrato en ensayos de PCR cuantitativa en comparación con el ADN amplificado con tratamiento térmico de la plantilla.

Otra forma específica del método descrito se describe en el Ejemplo 6, en donde el ADN genómico humano purificado se amplifica mediante MDA sin tratar térmicamente a la plantilla. Como se muestra en el ejemplo, el método descrito produce un producto de amplificación de ADN con un sesgo de amplificación baja, es decir, que la variación en la representación entre ocho loci diferentes varía en menos de 3,0. En cambio, el sesgo de amplificación de los productos de ADN amplificados mediante dos métodos de amplificación basados en PCR, PEP y DOP-PCR, varía entre dos y seis órdenes de magnitud.

Otra forma específica del método descrito se describe en el Ejemplo 7, en donde se mejora la amplificación de secuencias c-jun usando cebadores anidados específicos de una plantilla de ADN genómico humano mediante la omisión de una etapa de desnaturalización térmica de la plantilla de ADN.

Otra forma específica del método descrito se describe en el Ejemplo 8, en donde el ADN genómico humano se amplifica en ausencia de una etapa de tratamiento térmico directamente a partir de la sangre completa o de las células de cultivo tisular con la misma eficacia que del ADN purificado. El ADN amplificado directamente a partir de la sangre o las células tiene sustancialmente los mismos valores de representación del locus que el ADN amplificado a partir de la plantilla de ADN humano purificado. Esto representa una ventaja con respecto a otros procedimientos de amplificación, por ejemplo, la PCR, dado que componentes tales como hemo en la sangre completa inhiben la PCR y necesitan de una etapa de purificación antes que el ADN de la sangre pueda usarse como plantilla de PCR.

Otra forma específica del método descrito se describe en el Ejemplo 9, en donde el ADN genómico humano purificado se amplifica mediante MDA sin tratamiento térmico de la plantilla, en presencia de AA-dUTP al 70 % / dTTP al 30 %. Como se muestra en el ejemplo, el método descrito proporciona un producto de amplificación de ADN con el mismo sesgo de amplificación baja que el ADN amplificado en presencia de dTTP al 100 %.

Se describe también un método para amplificar y reparar el ADN dañado. Este método es útil, por ejemplo, para amplificar el ADN genómico degradado. El método implica desnaturalizar sustancialmente una muestra de ADN dañado (generalmente mediante exposición al calor y condiciones alcalinas), quitar o reducir las condiciones de desnaturalización (por ejemplo, a través de la reducción del pH y la temperatura de la muestra de ADN desnaturalizada) y replicar el ADN. El ADN dañado se repara durante la replicación y aumenta la longitud promedio de los fragmentos de ADN. Por ejemplo, la longitud promedio de los fragmentos de ADN puede aumentar, por ejemplo, de 2 kb en la muestra de ADN dañado hasta, por ejemplo, 10 kb o más para el ADN replicado. El ADN amplificado y reparado se encuentra en mejor condición para su análisis y ensayo que la muestra de ADN dañado. Por ejemplo, esta técnica puede proporcionar mejoras consistentes en la representación alélica de las muestras de ADN dañado. Este método de reparación puede provocar una mejora general en la amplificación del ADN dañado aumentando la longitud promedio del producto, aumentando la calidad de los productos de amplificación 3 veces (por ejemplo, aumentando la representación de marcadores en la muestra), y mejorando el genotipo de los productos amplificados al disminuir la frecuencia de la disminución alélica; todo en comparación con los resultados cuando se amplifica el ADN dañado por medio de otros métodos. La replicación puede ser la amplificación por desplazamiento múltiple. Generalmente, la desnaturalización de la muestra de ADN se realiza de modo tal que el ADN no se dañe más. Este método puede combinarse o utilizarse generalmente con cualquiera de los métodos de amplificación descritos. Otra forma de este método puede implicar desnaturalizar sustancialmente una muestra de ADN dañado (generalmente mediante la exposición a condiciones alcalinas y al calor), reducir el pH de la muestra de ADN desnaturalizado, mezclar la muestra de ADN desnaturalizado con una muestra de ADN no desnaturalizado a partir de la misma fuente, de modo que los extremos del ADN en la muestra de ADN desnaturalizado se desnaturalicen temporalmente, enfriar lentamente la mezcla de las muestras de ADN para permitir que los extremos desnaturalizados temporalmente se hibriden con el ADN desnaturalizado y replicar el ADN hibridado.

#### A. Amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo

En una forma del método, denominada amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo (WGSDA), se utiliza un conjunto aleatorio o parcialmente aleatorio de cebadores para cebar aleatoriamente una muestra de ácido nucleico genómico (u otra muestra de ácido nucleico de alta complejidad). Al elegir un conjunto de cebadores suficientemente grande de secuencia aleatoria o mayormente aleatoria, los cebadores en el conjunto serán de forma conjunta y aleatoria, complementarios a las secuencias de ácido nucleico distribuidas en todo el ácido nucleico en la muestra. La amplificación sigue mediante replicación con una polimerasa procesiva que se inicia en cada cebador y que continúa hasta la terminación espontánea. Una característica fundamental de este método es el desplazamiento de cebadores intervinientes durante la replicación mediante la polimerasa. De esta manera, pueden sintetizarse múltiples copias coincidentes del genoma completo en poco tiempo.

La amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo se puede realizar (a) mezclando un conjunto de cebadores aleatorios o parcialmente aleatorios con una muestra genómica (u otra muestra de ácido nucleico de alta complejidad) para producir una mezcla de muestra objetivo/cebador e incubar la mezcla de muestra objetivo/cebador en condiciones que promueven la hibridación entre los cebadores y el ADN genómico en la mezcla de muestra objetivo/cebador y (b) mezclando la ADN polimerasa con la mezcla de muestra objetivo/cebador para producir una mezcla de muestra objetivo/polimerasa e incubar la mezcla de muestra objetivo/polimerasa en condiciones que promueven la replicación del ADN genómico. La replicación por desplazamiento de cadena se logra preferiblemente mediante el uso de una ADN polimerasa que desplaza cadenas o una ADN polimerasa en combinación con un factor de desplazamiento de cadena compatible.

El método tiene ventajas con respecto a la reacción en cadena de la polimerasa dado que este puede llevarse a cabo en condiciones isotérmicas. Otras ventajas de la amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo incluyen un mayor nivel de amplificación que la PCR de genoma completo, la amplificación es menos dependiente de la secuencia que la PCR, una falta de artefactos de realineación o artefactos de transposición génica como puede ocurrir con la PCR (dado que no hay ningún ciclo de desnaturalización y realineación) y un sesgo de amplificación inferior que la amplificación del genoma basada en PCR (sesgo de 3 veces para la WGSDA en comparación con 20 a 60 veces para la amplificación de genomas basada en PCR).

Después de la amplificación, las secuencias amplificadas se pueden utilizar con cualquier propósito, tal como para usos cocidos y establecidos para las secuencias amplificadas por PCR. Por ejemplo, las secuencias amplificadas pueden detectarse usando cualquiera de los sistemas de detección convencionales para ácidos nucleicos, por ejemplo, la detección de etiquetas fluorescentes, sistemas de detección ligada a enzimas, detección de etiquetas mediada por anticuerpos y detección de etiquetas radioactivas. Una característica fundamental del método descrito es que la amplificación no se produce en círculos, sino en una replicación isotérmica continua. Esto hace que la amplificación sea menos complicada y mucho más consistente en la producción. El desplazamiento de cadena permite la rápida generación de múltiples copias de una secuencia de ácido nucleico o muestra en una reacción isotérmica, continua y única.

Se prefiere que el conjunto de cebadores utilizado para la WGSDA sea usado en concentraciones que permitan que los cebadores se hibriden en intervalos deseados dentro de la muestra de ácido nucleico. Por ejemplo, al usar un conjunto de cebadores a una concentración que permita que estos se hibriden, en promedio, cada 4000 a 8000 bases, la replicación de ADN iniciada en estos sitios extenderá y desplazará las cadenas que se están replicando a partir de sitios adyacentes. Cabe señalar que no se espera que los cebadores se hibriden con una secuencia diana a intervalos regulares. En vez de eso, el intervalo promedio será una función general de la concentración de cebadores. Los cebadores para la WGSDA se pueden formar también a partir del ARN presente en la muestra. Al degradar el ARN endógeno con la ribonucleasa para generar un conjunto de oligómeros aleatorios, los oligómeros aleatorios pueden ser usados luego por la polimerasa para la amplificación del ADN. Esto elimina toda necesidad de agregar cebadores a la reacción. De manera alternativa, la digestión de la DNasa de muestras biológicas puede generar un conjunto de oligocebadores de ADN para la amplificación de ADN dependiente del ARN.

Como en la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple, el desplazamiento de una cadena adyacente la pone a disposición para la hibridación con otro cebador y el inicio posterior de otra ronda de replicación. El intervalo en el cual los cebadores en el conjunto de cebadores se hibridan con la secuencia diana determina el nivel de amplificación. Por ejemplo, si el intervalo promedio es corto, las cadenas adyacentes se desplazarán rápidamente y con frecuencia. Si el intervalo promedio es largo, las cadenas adyacentes se desplazarán solamente después de prologadas ejecuciones de replicación.

En el método descrito, la ADN polimerasa cataliza la extensión de cebadores y el desplazamiento de cadena en una reacción de polimerización de desplazamiento de cadena procesiva que procede tanto como se desee. Las ADN polimerasas con desplazamiento de cadena preferidas son la ADN polimerasa del bacteriófago  $\Phi 29$  (patentes estadounidenses N.º 5,198,543 y 5,001,050 para Blanco et al.), la ADN polimerasa Bst de fragmento grande (Exo(-) Bst), la ADN polimerasa exo(-)Bca y secuenasa. Durante la replicación por desplazamiento de cadena se pueden incluir además nucleótidos modificados o radioactivos tales como trifosfato de bromodeosoxiuridina para etiquetar el ADN generado en la reacción. De manera alternativa, se pueden incluir precursores adecuados que proporcionan un resto de unión tales como los nucleótidos biotinilados (Langer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **78**:6633 (1981)).

La amplificación de genomas mediante el uso de PCR y los usos para el ADN amplificado se describen en Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **89**:5847-5851 (1992), Telenius et al., *Genomics* **13**:718-725 (1992), Cheung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **93**:14676- 14679 (1996) y Kukasjaarvi et al., *Genes, Chromosomes and Cancer* **18**:94-101 (1997). Los usos del ADN amplificado descritos en estas publicaciones son también aplicables generalmente al ADN amplificado mediante el uso de los métodos descritos. La amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo, a diferencia de la amplificación del genoma completo basada en PCR, es adecuada para el análisis de haplotipos ya que la WGSDA proporciona fragmentos más largos que la amplificación por desplazamiento de cadena del genoma completo basada en PCR. Además, la amplificación del genoma completo basada en PCR es menos adecuada para el análisis de haplotipos ya que cada ciclo en la PCR crea una oportunidad para eventos de cebado que provocan que la asociación de secuencias distantes (en el genoma) se elaboren en el mismo fragmento.

## B. Amplificación por desplazamiento de cadena múltiple

En una forma preferida del método, denominada amplificación por desplazamiento de cadena múltiple (MSDA), se utilizan dos conjuntos de cebadores, un conjunto derecho y un conjunto izquierdo. Los cebadores en el conjunto derecho pueden tener cada uno una parte complementaria a las secuencias de nucleótidos que flanquean un lado de una secuencia de nucleótidos diana y los cebadores en el conjunto izquierdo de cebadores pueden tener cada uno una parte complementaria a las secuencias de nucleótidos que flanquean el otro lado de la secuencia de nucleótidos diana. Los cebadores en el conjunto derecho son complementarios a una cadena de la molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos diana y los cebadores en el conjunto izquierdo son complementarios a la cadena opuesta. El extremo 5' de los cebadores en ambos conjuntos se encuentra distal con respecto a la secuencia de ácido nucleico de interés cuando los cebadores se hibridan con las secuencias flanqueantes en la molécula de ácido nucleico. Preferiblemente, cada miembro de cada conjunto tiene una parte complementaria con respecto a una secuencia de nucleótidos no superpuesta y separada que flanquea la secuencia de nucleótidos diana. La amplificación sigue mediante replicación iniciada en cada cebador y que continúa a través de la secuencia de ácido nucleico diana. Una característica fundamental de este método es el desplazamiento de cebadores intervinientes durante la replicación. Una vez que las cadenas de ácido nucleico alargadas desde el conjunto derecho de cebadores alcanza la región de la molécula de ácido nucleico con la cual se hibrida el conjunto izquierdo de cebadores, y viceversa, se produce otra ronda de cebado y replicación. Esto permite que se sinteticen múltiples copias de un conjunto anidado de la secuencia de ácido nucleico en un período de tiempo corto.

La amplificación por desplazamiento de cadena múltiple se puede realizar (a) mezclando un conjunto de cebadores con una muestra diana para producir una mezcla de muestra objetivo/cebador e incubar la mezcla de muestra objetivo/cebador en condiciones que promueven la hibridación entre los cebadores y la secuencia diana en la mezcla de muestra objetivo/cebador y (b) mezclando la ADN polimerasa con la mezcla de muestra objetivo/cebador para producir una mezcla de muestra objetivo/polimerasa e incubar la mezcla de muestra objetivo/polimerasa en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación por desplazamiento de cadena se logra preferiblemente mediante el uso de una ADN polimerasa que desplaza cadenas o una ADN polimerasa en combinación con un factor de desplazamiento de cadena compatible.

Al utilizar una cantidad suficiente de cebadores en los conjuntos derecho e izquierdo, se requieren solamente unas pocas rondas de replicación para producir cientos de miles de copias de la secuencia de ácido nucleico de interés. Por ejemplo, puede estimarse que, al usar los conjuntos de cebadores derecho e izquierdo de 26 cebadores cada uno, se pueden producir 200.000 copias de una diana de amplificación de 5000 nucleótidos en 10 minutos (lo que representa apenas cuatro rondas de cebado y replicación). Puede estimarse también que, al usar los conjuntos de cebadores derecho e izquierdo de 26 cebadores cada uno, se pueden producir 200.000 copias de una diana de amplificación de 47.000 nucleótidos en 60 minutos (lo que representa de nuevo cuatro rondas de cebado y replicación). Estos cálculos se basan en una velocidad de extensión de polimerasas de 50 nucleótidos por segundo. Cabe subrayar que esas reacciones son continuas e isotérmicas. No es necesario ningún ciclado.

El método descrito tiene ventajas con respecto a la reacción en cadena de la polimerasa dado que este puede llevarse a cabo en condiciones isotérmicas. No es necesario ningún ciclo térmico porque la polimerasa en el inicio de una cadena alargada (o factor de desplazamiento de cadena compatible) se desplazará, y, por lo tanto, pone a disposición la cadena por delante de esta para su hibridación. Otras ventajas de la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple incluyen la capacidad de amplificar segmentos de ácido nucleico muy largos (en el orden de los 50 kilobases) y la amplificación rápida de segmentos más cortos (10 kilobases o menos). Los segmentos de ácido nucleico largos pueden amplificarse en el método descrito ya que no hay ningún ciclado que pudiera interrumpir la síntesis continua o que permita la formación de artefactos debido a la rehibridación de las cadenas replicadas. En la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple, los eventos de cebado únicos en sitios no deseados no conducirá a una amplificación hecha por el hombre en estos sitios (dado que la amplificación en el sitio deseado sobrepasará rápidamente la replicación de cadena simple en el sitio no deseado).

En otra forma del método, denominada amplificación por desplazamiento de cadena específico para el gen (GS-MSDA, por sus siglas en inglés), el ADN diana es digerido primero con una endonucleasa de restricción. Los fragmentos digeridos se ligan luego de extremo a extremo para formar círculos de ADN. Estos círculos pueden ser monómeros o concatémicos. Se utilizan dos conjuntos de cebadores para la amplificación, un conjunto derecho y un conjunto izquierdo. Los cebadores en el conjunto derecho de cebadores pueden tener cada uno una parte complementaria a las secuencias de nucleótidos que flanquean un lado de una secuencia de nucleótidos diana y los cebadores en el conjunto izquierdo de cebadores pueden tener cada uno una parte complementaria a las secuencias de nucleótidos que flanquean el otro lado de la secuencia de nucleótidos diana. Los cebadores en el conjunto derecho son complementarios a una cadena de la molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos diana y los cebadores en el conjunto izquierdo son complementarios a la cadena opuesta. Los cebadores están diseñados para cubrir toda la secuencia que se necesita amplificar o una parte de esta. Preferiblemente, cada miembro de cada conjunto tiene una parte complementaria a una secuencia de nucleótidos no superpuesta y separada que flanquea la secuencia de nucleótidos diana. La amplificación sigue mediante replicación iniciada en cada cebador y continúa a través de la secuencia de ácido nucleico diana. En una forma de GS-MSDA, denominada GS-MSDA lineal, la amplificación se realiza con un conjunto de cebadores complementarios

a una sola cadena, amplificando así solamente una de las cadenas. En otra forma de GS-MSDA, las secuencias de ADNc se pueden circularizar para formar círculos de ADN monocatenario. La amplificación se realiza luego con un conjunto de cebadores complementarios a un ADNc circular monocatenario.

C. Amplificación por desplazamiento de cadena múltiple del ADN concatenado

5 En otra forma del método, denominada amplificación por desplazamiento de cadena múltiple del ADN concatenado (MSDA-CD, por sus siglas en inglés), se amplifica el ADN concatenado. Una forma preferida de ADN concatenado para la amplificación es el ADNc concatenado. El ADN concatenado puede ampliarse usando un conjunto de cebadores aleatorios o parcialmente aleatorios, como en la WGSDA, o usando cebadores específicos complementarios a las dianas de hibridación específicas en el ADN concatenado. La MSDA-CD es preferida para la amplificación de una mezcla o muestra compleja de muestras de ácido nucleico relativamente cortas (es decir, fragmentos que se encuentran generalmente en el intervalo de 100 a 6,000 nucleótidos). El ARN mensajero es el ejemplo más importante de dicha mezcla compleja. La MSDA-CD proporciona un medio para amplificar todos los ADNc en una célula de igual manera. Dado que el ADNc concatenado puede amplificarse hasta 5.000 veces, la MSDA-CD permitirá el análisis de la descripción del ARN de acuerdo con unas pocas células apenas. Para llevar a cabo la MSDA-CD, en primer lugar, el ADN debe ser sometido a una etapa de concatenación. Si se debe amplificar una muestra de ARN (tal como el ARNm), el ARN se transforma primero en un ADNc de cadena doble mediante el uso de métodos estándar. El ADNc o cualquier otro conjunto de fragmentos de ADN a amplificar, se transforma luego en una concatenación del ADN, preferiblemente con la incorporación de enlazadores.

D. Amplificación por desplazamiento de cadena múltiple del ADN dañado

20 Otras formas del método descrito pueden implicar la amplificación y reparación del ADN dañado. La amplificación del ADN dañado puede resultar difícil y proporcionar resultados no confiables. Por ejemplo, la amplificación del ADN degradado o fragmentado producirá productos truncados y puede provocar una reducción de alelos. La preparación de muestras de ADN genómico puede provocar daño al ADN genómico (por ejemplo, degradación y fragmentación). El ADN dañado y las muestras de ADN dañado pueden amplificarse y repararse en el método descrito para amplificar el ADN dañado. El método funciona generalmente al hibridar los extremos de algunas moléculas de ADN en una muestra de ADN dañado con secuencias complementarias en la muestra. Debido a que las moléculas de ADN que proporcionan los extremos recién asociados tendrán daños en distintas ubicaciones, el cebado desde los extremos hibridados puede dar lugar a la replicación de más fragmentos completos y puede mediar la reparación del ADN dañado (en forma de cadenas replicadas no dañadas o menos dañadas). La replicación de las cadenas replicadas no dañadas mediante amplificación por desplazamiento múltiple continuado produce ácidos nucleicos amplificados no dañados o menos dañados.

Por lo general, el método implica desnaturalizar sustancialmente una muestra de ADN dañado (generalmente mediante exposición al calor y condiciones alcalinas), quitar o reducir las condiciones de desnaturalización (tales como a través de la reducción del pH y la temperatura de la muestra de ADN desnaturalizada) y replicar el ADN. El ADN dañado se repara durante la replicación y aumenta la longitud promedio de los fragmentos de ADN. Por ejemplo, la longitud promedio de los fragmentos de ADN puede aumentar, por ejemplo, de 2 kb en la muestra de ADN dañado hasta, por ejemplo, 10 kb o más para el ADN replicado. El ADN amplificado y reparado se encuentra en mejor condición para su análisis y ensayo que la muestra de ADN dañado. Por ejemplo, esta técnica puede proporcionar mejoras consistentes en la representación alélica de las muestras de ADN dañado. Este método de reparación puede provocar una mejora general en la amplificación del ADN dañado al aumentar la longitud promedio del producto, aumentando la calidad de los productos de amplificación 3 veces (por ejemplo, al aumentar la representación de marcadores en la muestra), y mejorando el genotipo de los productos amplificados al disminuir la frecuencia de la disminución alélica; todo en comparación con los resultados cuando se amplifica el ADN dañado por medio de otros métodos. La replicación puede ser la amplificación por desplazamiento múltiple. Generalmente, la desnaturalización de la muestra de ADN se realiza de modo tal que el ADN no se dañe más. Este método puede combinarse o utilizarse generalmente con cualquiera de los métodos de amplificación descritos.

En algunas realizaciones, el método para amplificar el ADN dañado puede implicar exponer una muestra de ADN dañado a condiciones que promueven la desnaturalización sustancial del ADN dañado en la muestra de ADN dañado, formando de este modo una muestra de ADN dañado; alterar las condiciones a condiciones que no promueven la desnaturalización sustancial del ADN dañado en la muestra de ADN dañado para formar una muestra de ADN dañado, desnaturalizado, estabilizado; e incubar el ADN dañado hibridado en condiciones que promueven la replicación del ADN dañado. Los extremos hibridados de la replicación de cebadores de ADN dañado y la replicación del ADN dañado da como resultado la reparación de las cadenas replicadas. Las condiciones que promueven la desnaturalización sustancial del ADN dañado en la muestra de ADN dañado pueden ser, por ejemplo, elevar el pH de la muestra de ADN dañado y calentar la muestra de ADN dañado. Las condiciones modificadoras pueden ser, por ejemplo, reducir el pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado y enfriar la muestra de ADN dañado. El aumento del pH se puede lograr exponiendo la muestra de ADN dañado a condiciones alcalinas. En general, las condiciones modificadoras pueden ser condiciones que promueven la hibridación de los extremos del ADN dañado y desnaturalizado temporalmente con el ADN dañado y desnaturalizado sustancialmente. La muestra de ADN dañado, la muestra de ADN dañado desnaturalizado o ambas pueden exponerse también a condiciones iónicas, por ejemplo, mezclando la muestra de ADN dañado o la muestra de ADN dañado desnaturalizado con

solución iónica o inclusive sal/es u otros iones en la solución de desnaturalización, la solución de estabilización o ambas.

En el método, la muestra de ADN dañado puede ser expuesta a condiciones que promueven la desnaturalización sustancial, por ejemplo, mezclando la muestra de ADN dañado con una solución de desnaturalización y calentando la muestra de ADN dañado a una temperatura y durante un período de tiempo que desnaturaliza sustancialmente el ADN dañado en la muestra de ADN dañado. La temperatura puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 50 °C y el período de tiempo puede ser, por ejemplo, aproximadamente 5 minutos o más. Es posible reducir el pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado, por ejemplo, mezclando la muestra de ADN dañado desnaturalizado con una solución de estabilización. Las muestras de ADN dañado pueden ser, por ejemplo, fragmentos de ADN degradado del ADN genómico. La replicación y reparación del ADN dañado puede lograrse incubando el ADN dañado en presencia de una ADN polimerasa, por ejemplo, la ADN polimerasa  $\Phi 29$ .

Generalmente, es posible enfriar lentamente la muestra de ADN dañado a efectos de lograr la hibridación necesaria. Por ejemplo, la muestra de ADN dañado pueden enfriarse a una velocidadde, por ejemplo, aproximadamente 0,1 °C por minuto o menos, aproximadamente 0,2 °C por minuto o menos, aproximadamente 0,3 °C por minuto o menos, aproximadamente 0,4 °C por minuto o menos, aproximadamente 0,5 °C por minuto o menos, aproximadamente 0,6 °C por minuto o menos, aproximadamente 0,7 °C por minuto o menos, aproximadamente 0,8 °C por minuto o menos, aproximadamente 0,9 °C por minuto o menos, aproximadamente 1 °C por minuto o menos, aproximadamente 1,0 °C por minuto o menos, aproximadamente 1,1 °C por minuto o menos, aproximadamente 1,2 °C por minuto o menos, aproximadamente 1,3 °C por minuto o menos, aproximadamente 1,4 °C por minuto o menos, aproximadamente 1,5 °C por minuto o menos, aproximadamente 1,6 °C por minuto o menos, aproximadamente 1,8 °C por minuto o menos, aproximadamente 2 °C por minuto o menos, aproximadamente 2,0 °C por minuto o menos, aproximadamente 2,2 °C por minuto o menos, aproximadamente 2,4 °C por minuto o menos, aproximadamente 2,6 °C por minuto o menos, aproximadamente 2,8 °C por minuto o menos, aproximadamente 3 °C por minuto o menos, aproximadamente 3,0 °C por minuto o menos, aproximadamente 3,5 °C por minuto o menos, aproximadamente 4 °C por minuto o menos, aproximadamente 4,0 °C por minuto o menos, aproximadamente 5,0 °C por minuto o menos, aproximadamente 0,1 °C por minuto, aproximadamente 0,2 °C por minuto, aproximadamente 0,3 °C por minuto, aproximadamente 0,4 °C por minuto, aproximadamente 0,5 °C por minuto, aproximadamente 0,6 °C por minuto, aproximadamente 0,7 °C por minuto, aproximadamente 0,8 °C por minuto, aproximadamente 0,9 °C por minuto, aproximadamente 1 °C por minuto, aproximadamente 1,0 °C por minuto, aproximadamente 1,1 °C por minuto, aproximadamente 1,2 °C por minuto, aproximadamente 1,3 °C por minuto, aproximadamente 1,4 °C por minuto, aproximadamente 1,5 °C por minuto, aproximadamente 1,6 °C por minuto, aproximadamente 1,8 °C por minuto, aproximadamente 2 °C por minuto, aproximadamente 2,0 °C por minuto, aproximadamente 2,2 °C por minuto, aproximadamente 2,4 °C por minuto, aproximadamente 2,6 °C por minuto, aproximadamente 2,8 °C por minuto, aproximadamente 3 °C por minuto, aproximadamente 3,0 °C por minuto, aproximadamente 3,5 °C por minuto, aproximadamente 4 °C por minuto, aproximadamente 4,0 °C por minuto, aproximadamente 5,0 °C por minuto, 0,1 °C por minuto, 0,2 °C por minuto, 0,3 °C por minuto, 0,4 °C por minuto, 0,5 °C por minuto, 0,6 °C por minuto, 0,7 °C por minuto, 0,8 °C por minuto, 0,9 °C por minuto, 1 °C por minuto, 1,0 °C por minuto, 1,1 °C por minuto, 1,2 °C por minuto, 1,3 °C por minuto, 1,4 °C por minuto, 1,5 °C por minuto, 1,6 °C por minuto, 1,8 °C por minuto, 2 °C por minuto, 2,0 °C por minuto, 2,2 °C por minuto, 2,4 °C por minuto, 2,6 °C por minuto, 2,8 °C por minuto, 3 °C por minuto, 3,0 °C por minuto, 3,5 °C por minuto, 4 °C por minuto, 4,0 °C por minuto o 5,0 °C por minuto.

La velocidadde enfriamiento de la muestra de ADN dañado puede describirse también en términos del porcentaje de reducción en la temperatura. Por lo tanto, una muestra de ADN dañado que comienza a 70 °C a una velocidadde 1 % por minuto o menos se enfriaría a 0,7 °C (o menos) en el primer minuto y 1 % (o menos) de la temperatura resultante en el próximo minuto. La muestra de ADN dañado puede enfriarse a una velocidadde, por ejemplo, aproximadamente 0,1 % por minuto o menos, aproximadamente 0,2 % por minuto o menos, aproximadamente 0,3 % por minuto o menos, aproximadamente 0,4 % por minuto o menos, aproximadamente 0,5 % por minuto o menos, aproximadamente 0,6 % por minuto o menos, aproximadamente 0,7 % por minuto o menos, aproximadamente 0,8 % por minuto o menos, aproximadamente 0,9 % por minuto o menos, aproximadamente 1 % por minuto o menos, aproximadamente 1,0 % por minuto o menos, aproximadamente 1,1 % por minuto o menos, aproximadamente 1,2 % por minuto o menos, aproximadamente 1,3 % por minuto o menos, aproximadamente 1,4 % por minuto o menos, aproximadamente 1,5 % por minuto o menos, aproximadamente 1,6 % por minuto o menos, aproximadamente 1,8 % por minuto o menos, aproximadamente 2 % por minuto o menos, aproximadamente 2,0 % por minuto o menos, aproximadamente 2,2 % por minuto o menos, aproximadamente 2,4 % por minuto o menos, aproximadamente 2,6 % por minuto o menos, aproximadamente 2,8 % por minuto o menos, aproximadamente 3 % por minuto o menos, aproximadamente 3,0 % por minuto o menos, aproximadamente 3,5 % por minuto o menos, aproximadamente 4 % por minuto o menos, aproximadamente 4,0 % por minuto o menos, aproximadamente 5,0 % por minuto o menos, aproximadamente 0,1 % por minuto, aproximadamente 0,2 % por minuto, aproximadamente 0,3 % por minuto, aproximadamente 0,4 % por minuto, aproximadamente 0,5 % por minuto, aproximadamente 0,6 % por minuto, aproximadamente 0,7 % por minuto, aproximadamente 0,8 % por minuto, aproximadamente 0,9 % por minuto, aproximadamente 1 % por minuto, aproximadamente 1,0 % por minuto, aproximadamente 1,1 % por minuto, aproximadamente 1,2 % por minuto, aproximadamente 1,3 % por minuto, aproximadamente 1,4 % por minuto, aproximadamente 1,5 % por minuto, aproximadamente 1,6 % por minuto, aproximadamente 1,8 %, por minuto, aproximadamente 2 % por minuto, aproximadamente 2,0 % por minuto, aproximadamente 2,2 % por minuto,

aproximadamente 2,4 % por minuto, aproximadamente 2,6 % por minuto, aproximadamente 2,8 % por minuto, aproximadamente 3 % por minuto, aproximadamente 3,0 % por minuto, aproximadamente 3,5 % por minuto, aproximadamente 4 % por minuto, aproximadamente 4,0 % por minuto, aproximadamente 5,0 % por minuto, 0,1 % por minuto, 0,2 % por minuto, 0,3 % por minuto, 0,4 % por minuto, 0,5 % por minuto, 0,6 % por minuto, 0,7 % por minuto, 0,8 % por minuto, 0,9 % por minuto, 1 % por minuto, 1,0 % por minuto, 1,1 % por minuto, 1,2 % por minuto, 1,3 % por minuto, 1,4 % por minuto, 1,5 % por minuto, 1,6 % por minuto, 1,8 % por minuto, 2 % por minuto, 2,0 % por minuto, 2,2 % por minuto, 2,4 % por minuto, 2,6 % por minuto, 2,8 % por minuto, 3 % por minuto, 3,0 % por minuto, 3,5 % por minuto, 4 % por minuto, 4,0 % por minuto o 5,0 % por minuto.

La muestra de ADN dañado, la muestra de ADN dañado desnaturalizado o ambas pueden exponerse también a condiciones iónicas, por ejemplo, mezclando la muestra de ADN dañado o la muestra de ADN dañado desnaturalizado con solución iónica o inclusive sal/es u otros iones en la solución de desnaturalización, la solución de estabilización o ambas. Tal como se utiliza en la presente, las condiciones iónicas hacen referencia a un estado de mayor fuerza iónica. Por lo tanto, la exposición a condiciones iónicas hace referencia a la exposición a una mayor fuerza iónica que la que existía en la muestra o solución antes de la exposición. Este será el resultado cuando, por ejemplo, se agrega un tampón o sal. A una solución utilizada para realizar dicha adición se la conoce como solución iónica. La solución iónica puede ser una solución salina y puede comprender una o más sales u otros iones. Se puede utilizar cualquier sal o ion adecuado. La sal puede ser, por ejemplo, Tris-HCl, Tris-EDTA, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de magnesio o una combinación. El Tris-HCl puede tener, por ejemplo, un pH 7,0 a 8,0. La sal puede ser Tris-EDTA. La solución iónica puede diluirse, por ejemplo, 2 a 5 veces cuando se mezcla con la muestra de ADN dañado. La solución iónica puede mezclarse con la muestra de ADN dañado desnaturalizado antes o durante la modificación de las condiciones.

Es posible especificar las condiciones iónicas y la composición de soluciones iónicas, generalmente, al especificar una concentración de un tampón, sal u otro compuesto de formación de iones. Se puede utilizar una combinación de compuestos en una solución iónica o para crear condiciones iónicas. La solución salina puede comprender, por ejemplo, aproximadamente 50 nM a aproximadamente 500 mM de Tris y aproximadamente 1nM a aproximadamente 5 mM de EDTA. Las soluciones iónicas pueden tener una sal, tampón o concentración iónica de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 2 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM,



mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 250 mM, de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 250 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 300 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 400 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 500 mM a aproximadamente 600 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 2 M, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 1 M, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 900 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 800 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 700 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 500 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 400 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 200 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 150 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 80 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 60 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 30 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 20 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 9 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 8 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 7 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 6 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 4 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 3 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 2 mM, de aproximadamente 600 mM a aproximadamente 1 mM, 2 M, 1 M, 900 mM, 800 mM, 700 mM, 600 mM, 500 mM, 400 mM, 300 mM, 250 mM, 200 mM, 150 mM, 100 mM, 80 mM, 60 mM, 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM, 9 mM, 8 mM, 7 mM, 6 mM, 5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM o 1 mM.

El método descrito para reparar y amplificar el ADN puede dar lugar a un aumento en la longitud promedio del fragmento de ADN en una muestra de ADN. Puede hacerse referencia a este aumento en cualquier término adecuado. Por ejemplo, puede hacerse referencia al aumento en la longitud promedio del fragmento mediante la longitud promedio del fragmento de los fragmentos de ADN replicado, el aumento en la longitud promedio del fragmento a partir de la longitud promedio del fragmento de la muestra de ADN dañado y el porcentaje de aumento en la longitud promedio del fragmento. El aumento en la longitud de fragmento promedio puede ser, por ejemplo, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 180 %, 200 %, 220 %, 240 %, 260 %, 280 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1.000 %, 5 % o más, 10 % o más, 15 % o más, 20 % o más, 25 % o más, 30 % o más, 40 % o más, 50 % o más, 60 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 100 % o más, 110 % o más, 120 % o más, 130 %) o más, 140 % o más, 150 % o más, 160 % o más, 180 %) o más, 200 % o más, 220 %) o más, 240 % o más, 260 % o más, 280 %) o más, 300 % o más, 350 % o más, 400 % o más, 450 % o más, 500 % o más, 600 % o más, 700 % o más, 800 % o más, 900 % o más, 1.000 % o más, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 100 %, aproximadamente 110 %, aproximadamente 120 %, aproximadamente 130 %, aproximadamente 140 %, aproximadamente 150 %, aproximadamente 160 %, aproximadamente 180 %, aproximadamente 200 %, aproximadamente 220 %, aproximadamente 240 %, aproximadamente 260 %, aproximadamente 280 %, aproximadamente 300 %, aproximadamente 350 %, aproximadamente 400 %, aproximadamente 450 %, aproximadamente 500 %, aproximadamente 600 %, aproximadamente 700 %, aproximadamente 800 %, aproximadamente 900 %, aproximadamente 1.000 %, aproximadamente 5 % o más, aproximadamente 10 % o más, aproximadamente 15 % o más, aproximadamente 20 % o más, aproximadamente 25 % o más, aproximadamente 30 % o más, aproximadamente 40 % o más, aproximadamente 50 % o más, aproximadamente 60 % o más, aproximadamente 70 % o más, aproximadamente 80 % o más, aproximadamente 90 % o más, aproximadamente 100 % o más, aproximadamente 110 % o más, aproximadamente 120 % o más, aproximadamente 130 % o más, aproximadamente 140 % o más, aproximadamente 150 % o más, aproximadamente 160 % o más, aproximadamente 180 % o más, aproximadamente 200 % o más, aproximadamente 220 % o más, aproximadamente 240 % o más, aproximadamente 260 % o más, aproximadamente 280 % o más, aproximadamente 300 % o más, aproximadamente 350 % o más, aproximadamente 400 % o más, aproximadamente 450 % o más, aproximadamente 500 % o más, aproximadamente 600 % o más, aproximadamente 700 % o más, aproximadamente 800 % o más, aproximadamente 900 % o más, aproximadamente 1.000 % o más.

aproximadamente 450 % o más, aproximadamente 500 % o más, aproximadamente 600 % o más, aproximadamente 700 % o más, aproximadamente 800 % o más, aproximadamente 900 % o más, o aproximadamente 1.000 % o más con respecto a la longitud de fragmento promedio de la muestra de ADN dañado antes del método.

- 5 Después del método de reparación, la longitud promedio del fragmento puede ser, por ejemplo, de 2 kilobases (kb), 2,5 kb, 3 kb, 3,5 kb, 4 kb, 4,5 kb, 5 kb, 5,5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb, 10 kb, 11 kb, 12 kb, 13 kb, 14 kb, 15 kb, 16 kb, 18 kb, 20 kb, 22 kb, 24 kb, 26 kb, 28 kb, 30 kb, 2 kb o más, 2,5 kb o más, 3 kb o más, 3,5 kb o más, 4 kb o más, 4,5 kb o más, 5 kb o más, 5,5 kb o más, 6 kb o más, 7 kb o más, 8 kb o más, 9 kb o más, 10 kb o más, 11 kb o más, 12 kb o más, 13 kb o más, 14 kb o más, 15 kb o más, 16 kb o más, 18 kb o más, 20 kb o más, 22 kb o más, 24 kb o más, 26 kb o más, 28 kb o más, 30 kb o más, aproximadamente 2 kb, aproximadamente 2,5 kb, aproximadamente 3 kb, aproximadamente 3,5 kb, aproximadamente 4 kb, aproximadamente 4,5 kb, aproximadamente 5 kb, aproximadamente 5,5 kb, aproximadamente 6 kb, aproximadamente 7 kb, aproximadamente 8 kb, aproximadamente 9 kb, aproximadamente 10 kb, aproximadamente 11 kb, aproximadamente 12 kb, aproximadamente 13 kb, aproximadamente 14 kb, aproximadamente 15 kb, aproximadamente 16 kb, aproximadamente 18 kb, aproximadamente 20 kb, aproximadamente 22 kb, aproximadamente 24 kb, aproximadamente 26 kb, aproximadamente 28 kb, aproximadamente 30 kb, aproximadamente 2 kb o más, aproximadamente 2,5 kb o más, aproximadamente 3 kb o más, aproximadamente 3,5 kb o más, aproximadamente 4 kb o más, aproximadamente 4,5 kb o más, aproximadamente 5 kb o más, aproximadamente 5,5 kb o más, aproximadamente 6 kb o más, aproximadamente 7 kb o más, aproximadamente 8 kb o más, aproximadamente 9 kb o más, aproximadamente 10 kb o más, aproximadamente 11 kb o más, aproximadamente 12 kb o más, aproximadamente 13 kb o más, aproximadamente 14 kb o más, aproximadamente 15 kb o más, aproximadamente 16 kb o más, aproximadamente 18 kb o más, aproximadamente 20 kb o más, aproximadamente 22 kb o más, aproximadamente 24 kb o más, aproximadamente 26 kb o más, aproximadamente 28 kb o más o aproximadamente 30 kb o más.

- 25 El método descrito para amplificar el ADN dañado puede combinarse con la amplificación descrita de lisados celulares. Por ende, por ejemplo, las muestras de ADN dañado pueden ser un lisado celular, donde el lisado celular se produce exponiendo las células a condiciones alcalinas. Algunas formas del método pueden incluir exponer las células a condiciones alcalinas para formar un lisado celular; exponer el lisado celular a condiciones que promueven la desnaturalización sustancial del ADN dañado en el lisado celular; reducir el pH del lisado celular para formar un lisado celular estabilizado; enfriar el lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la hibridación de los extremos del ADN dañado desnaturalizado; y encubar el lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la replicación del ADN dañado. Durante la replicación, los extremos hibridados de la replicación de cebadores de ADN dañado y la replicación del ADN dañado da como resultado la reparación de las cadenas replicadas y un aumento en la longitud promedio del fragmento de ADN. El lisado celular puede ser un genoma completo. La replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas, donde durante la replicación al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

- 30 En otra forma, el método funciona al hibridar los extremos de algunas moléculas de ADN en una muestra con secuencias complementarias en una muestra de ADN dañado. Generalmente, la muestra de ADN dañado y la muestra de ADN que proporcionan los extremos hibridados son de la misma fuente o incluso la misma muestra. Debido a que las moléculas de ADN que proporcionan los extremos recién asociados y las moléculas de ADN dañado tendrán daños en distintas ubicaciones, el cebado desde los extremos hibridados puede dar lugar a la replicación de más fragmentos completos y puede mediar la reparación del ADN dañado (en forma de cadenas replicadas no dañadas o menos dañadas). La replicación de las cadenas replicadas no dañadas mediante amplificación por desplazamiento múltiple continuado produce ácidos nucleicos amplificados no dañados o menos dañados.

- 45 En general, el método implica desnaturalizar sustancialmente una muestra de ADN dañado (generalmente mediante la exposición a condiciones alcalinas y al calor), reducir el pH de la muestra de ADN desnaturalizado, mezclar la muestra de ADN desnaturalizado con una muestra de ADN no desnaturalizado a partir de la misma fuente, de modo que los extremos del ADN en la muestra de ADN desnaturalizado se desnaturalicen temporalmente, enfriar lentamente la mezcla de las muestras de ADN para permitir que los extremos temporalmente desnaturalizados se hibriden con el ADN desnaturalizado y replicar el ADN hibridado. El ADN dañado se repara durante la reparación. La replicación puede la amplificación por desplazamiento múltiple. Generalmente, la desnaturalización sustancial y la desnaturalización temporal de las muestras de ADN se realiza de modo tal que el ADN no se dañe aún más. Este método puede combinarse o utilizarse generalmente con cualquiera de los métodos de amplificación descritos.

- 55 En algunas realizaciones, el método para amplificar el ADN puede implicar exponer una primera muestra de ADN dañado a condiciones que promueven la desnaturalización sustancial del ADN dañado en la primera muestra de ADN dañado, formando así una muestra de ADN dañado desnaturalizado; reducir el pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado para formar una muestra de ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado; mezclar una segunda muestra de ADN dañado con la muestra de ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado en condiciones que promueven la desnaturalización temporal de los extremos del ADN dañado en la segunda muestra y que mantiene la desnaturalización sustancial del ADN dañado en la muestra de ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado; formando así una mezcla de ADN dañado; enfriar la mezcla de ADN dañado en condiciones que

promueven la hibridación de los extremos del ADN dañado y desnaturalizado temporalmente con el ADN dañado y desnaturalizado sustancialmente; e incubar el ADN dañado e hibridado en condiciones que promueven la replicación del ADN dañado. Los extremos hibridados de la replicación de cebadores de ADN dañado y la replicación del ADN dañado da como resultado la reparación de las cadenas replicadas.

- 5 En el método, la primera muestra de ADN dañado puede ser expuesta a condiciones que promueven la desnaturalización sustancial, por ejemplo, mezclando la primera muestra de ADN dañado con una solución de desnaturalización y calentando la primera muestra de ADN dañado a una temperatura y durante un período de tiempo que desnaturaliza sustancialmente el ADN dañado en la primera muestra de ADN dañado. La temperatura puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 50 °C y el período de tiempo puede ser, por ejemplo, aproximadamente 5 minutos o más. Es posible reducir el pH de la muestra de ADN dañado y desnaturalizado, por ejemplo, mezclando la muestra de ADN dañado y desnaturalizado con una solución de estabilización. Las muestras de ADN dañado pueden ser, por ejemplo, fragmentos de ADN degradado del ADN genómico. La primera y segunda muestra de ADN dañado pueden ser de la misma fuente y, en particular, pueden ser una parte de la misma muestra de ADN dañado. La segunda muestra de ADN dañado puede mezclarse con la muestra de ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado a una temperatura y durante un período de tiempo que desnaturaliza temporalmente el ADN dañado en la segunda muestra de ADN dañado. Por ejemplo, la temperatura puede ser de aproximadamente 70 °C o menos y el período de tiempo puede ser aproximadamente 30 segundos o menos. El efecto deseado puede lograrse también manteniendo la mezcla a la temperatura a la que se expone la primera muestra de ADN dañado para su desnaturalización. La replicación y reparación del ADN dañado puede lograrse incubando el ADN dañado hibridado en presencia de una ADN polimerasa, por ejemplo, la ADN polimerasa  $\Phi$ 29.

El método descrito para amplificar el ADN dañado puede combinarse con la amplificación descrita de lisados celulares. Por ende, por ejemplo, la primera y segunda muestra de ADN dañado pueden ser partes de un lisado celular, donde el lisado celular se produce exponiendo las células a condiciones alcalinas. Puede reducirse el pH de la segunda muestra de ADN dañado antes de mezclarse con el ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado. Algunas formas del método pueden incluir exponer las células a condiciones alcalinas para formar un lisado celular; exponer una primera parte del lisado celular a condiciones que promueven la desnaturalización sustancial del ADN dañado en la primera parte del lisado celular; reducir el pH de la primera parte del lisado celular para formar un primer lisado celular estabilizado y reducir el pH de una segunda parte del lisado celular para formar un segundo lisado celular estabilizado; mezclar el segundo lisado celular estabilizado con el primer lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la desnaturalización temporal de los extremos del ADN dañado en el segundo lisado celular estabilizado y que mantienen la desnaturalización sustancial del ADN dañado en el primer lisado celular estabilizado, formando así una mezcla de lisado celular estabilizado; enfriar la mezcla de lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la hibridación de los extremos del ADN dañado, temporalmente desnaturalizado con el ADN dañado, sustancialmente desnaturalizado; e incubar la mezcla de lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la replicación del ADN dañado. Durante la replicación, los extremos hibridados de la replicación de cebadores de ADN dañado y la replicación del ADN dañado da como resultado la reparación de las cadenas replicadas. El lisado celular puede ser un genoma completo. La replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas, donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

#### E. Modificaciones y operaciones adicionales

##### 1. Detección de productos de amplificación

Los productos de amplificación pueden detectarse directamente, por ejemplo, mediante etiquetado primario o etiquetado secundario, como se describirá a continuación.

##### 50 i. Etiquetado primario

El etiquetado primario consiste en incorporar restos etiquetados, tales como nucleótidos fluorescentes, nucleótidos biotinilados, nucleótidos que contienen digoxigenina o bromodesoxiuridina, durante la replicación por desplazamiento de cadena. Por ejemplo, es posible incorporar análogos de desoxiuridina con tinte de cianina (Yu *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **22**:3226- 3232 (1994)) a una frecuencia de 4 análogos por cada 100 nucleótidos. Un método preferido para detectar ácido nucleico amplificado *in situ* es etiquetar el ADN durante la amplificación con BrdUrd, seguido de la unión del BrdUrd incorporado con un anticuerpo anti-BrdU biotinilado (Zymed Labs, San Francisco, CA), seguido por la unión de los restos de biotina con estreptavidina-peroxidasa (Life Sciences, Inc.), y finalmente el desarrollo de la fluorescencia con fluoresceína-tiramida (DuPont de Nemours & Co., departamento de productos médicos). Otros métodos para detectar ácido nucleico amplificado *in situ* incluyen etiquetar el ADN durante la amplificación con 5-metilcitosina, seguido por la unión de la 5-metilcitosina incorporada con un anticuerpo (Sano *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **951**:157-165 (1988)), o etiquetar el ADN durante la amplificación con aminoalil-desoxiuridina seguido por la unión de la aminoalil-desoxiuridina incorporada con un tinte Oregon Green® (Molecular Probes, Eugene, OR) (Henegariu *et al.*, *Nature Biotechnology* **18**:345-348 (2000)).

Otro método para etiquetar ácidos nucleicos amplificados es incorporar 5-(3- aminoalil)-dUTP (AAAdUTP) en el ácido

nucleico amplificado durante la amplificación seguido por el etiquetado químico en los nucleótidos incorporados. La 5-(3-aminoalil)-desoxiuridina (AAdU) incorporada puede acoplarse a las etiquetas que tienen grupos reactivos que son capaces de reaccionar con grupos amina. La AAdUTP puede prepararse de acuerdo con Langer et al. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. 78: 6633-37. Se pueden utilizar otros nucleótidos modificados en formas análogas. Es decir, otros nucleótidos modificados con modificación mínima pueden incorporarse durante la replicación y se etiquetan luego de su incorporación.

Los ejemplos de etiquetas adecuadas para la adición de AAdUTP son isótopos radioactivos, moléculas fluorescentes, moléculas fosforescentes, enzimas, anticuerpos y ligandos.

Los ejemplos de etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen isotiocianato de fluoresceína (FITC), 5,6-carboximetil fluoresceína, rojo Texas, nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD), cumarina, cloruro de dansilo, rodamina, amino-metil cumarina (AMCA), Eosina, Eritrosina, BODIPY®, Cascade Blue®, Oregon Green®, pireno, lisamina, xantenos, acridinas, oxazinas, ficoeritrina, quelantes macrocíclicos de iones lantánidos tales como quantum dye™, tintes de transferencia de energía fluorescente, tal como heterodímero de etidio-naranja de tiazol, y los tintes de cianina Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5 y Cy7. Los ejemplos de otras etiquetas fluorescentes específicas incluyen ácido 3-Hidroxipireno 5,8,10-Tri sulfónico, 5-Hidroxi Triptamina (5-HT), Fucsina ácida, Complejo de Alizarina, Rojo de Alizarina, Alofocianina, Aminocumarina, Estearato de antroilo, Rojo Brillante Astrazon 4G, Naranja Astrazon R, Rojo Astrazon 6B, Amarillo Astrazon 7 GLL, Atabrina, Auramina, Aurofosfina, Aurofosfina G, BAO 9 (Bisaminofeniloxadiazol), BCECF, sulfato de berberina, Bisbenzamida, Solución Blancophor FFG, Blancofor SV, Bodipy F1, Sulfoflavina Brillante FF, Calcien Blue, Verde de calcio, Solución Calcofluor RW, Calcofluor Blanco, solución ABT blanca Blancofor, solución estándar blanco Blancofor, Carboestirilo, Cascade Yellow, Catecolamina, Quinacrina, Corifosfina O, Cumarina-faloidina, CY3,1 8, CY5,1 8, CY7, Dans (ácido 1-Dimetil Amino Nafalina 5 sulfónico), Dansa (ácido diamino naftil sulfónico), Dansilo NH-CH<sub>3</sub>, Diamino Fenil Oxidiazol (DAO), ácido dimetilamino-5-sulfónico, Difluoruro de dipirrometenos de boro, Flavina brillante difenilo 7GFF, Dopamina, Eritrosina ITC, Eucricina, FIF (Fluorescencia inducida por formaldehído), Naranja Flazo, Fluo 3, Fluorescamina, Fura-2, Genacril Rojo Brillante B, Genacril Amarillo Brillante 10GF, Genacril Rosa 3G, Genacril Amarillo 5GF, Ácido Gloxálico, Azul Granular, Hematoporfirina, Indo-1, Intrawhite Cf Líquido, Leucofor PAF, Leucofor SF, Leucofor WS, Lisamina Rodamina B200 (RD200), Amarillo Lucifer CH, Amarillo Lucifer VS, Rojo Magdala, Azul Marino, Flavina Brillante Maxilon 10 GFF, Flavina Brillante Maxilon 8 GFF, MPS (estilbeno de pironina verde de metilo), Mitramicina, NBD Amina, Nitrobenzoxadidol, Noradrenalina, Rojo Rápido Nuclear, Amarillo Nuclear, Flavina Brillante Nilosan E8G, Oxadiazol, Pacific Blue, Pararosanilina (Feulgen), Solución Phorwite AR, Phorwite BKL, Phorwite Rev, Phorwite RPA, Fosfina 3R, Ftalocianina, Ficoeritrina R, Poliazaindaceno Ptochrome Blue Black, Porfirina, Primulina, Procion Yellow, Pironina, Pironina B, Flavina Brillante Pirozal 7GF, Mostaza de Quinacrina, Rodamina 123, Rodamina 5 GLD, Rodamina 6G, Rodamina B, Rodamina B 200, Rodamina B Extra, Rodamina BB, Rodamina BG, Rodamina WT, Serotonina, Rojo Brillante Sevron 2B, Rojo Brillante Sevron 4G, Rojo Brillante Sevron B, Naranja Sevron, Amarillo Sevron L, SITS (Primulina), SITS (Ácido Isotiosulfónico de Estilbeno), Estilbeno, Snarf 1, Sulforodamina B Can C, Sulforodamina G Extra, Tetraciclina, Rojo de Tiazina R, Tioflavina S, Tioflavina TCN, Tioflavina 5, Tiolita, Naranja de tiozol, Tinopol CBS, True Blue, Ultralite, Uranina B, Uvitex SFC, Naranja de xileno y XRITC.

Las etiquetas fluorescentes preferidas son fluoresceína (5-carboxifluoresceína-N-hidroxisuccinimida éster) rodamina (5,6-tetrametil rodamina) y tintes de cianina Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5 y Cy7. La absorción y emisión máxima, respectivamente, para estos flúores son: FITC (490 nm; 520 nm), Cy3 (554 nm; 568 nm), Cy3,5 (581 nm; 588 nm), Cy5 (652 nm; 672 nm), Cy5,5 (682 nm; 703 nm) y Cy7 (755 nm; 778 nm), permitiendo así su detección simultánea. Otros ejemplos de tintes de fluoresceína incluyen 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',4', 1,4,- tetraclorofluoresceína (TET), 2',4',5',7',1,4-hexaclorofluoresceína (HEX), 2',7'- dimetoxi-4', 5'-dicloro-6-carboxirodamina (JOE), 2'-cloro-5'-fluoro-7',8'-fusionado-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína (NED) y 2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína (VIC). Las etiquetas fluorescentes pueden obtenerse de una variedad de fuentes comerciales, que incluyen Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; Molecular Probes, Eugene, OR; y Research Organics, Cleveland, Ohio.

#### ii. Etiquetado secundario con sondas de detección

El etiquetado secundario consiste en usar sondas moleculares adecuadas, denominadas sondas de detección, para detectar ácidos nucleicos amplificados. Por ejemplo, se puede diseñar un cebador para que contenga, en su parte no complementaria, una secuencia arbitraria conocida, denominada etiqueta de detección. Puede utilizarse una etapa de hibridación secundaria para unir las sondas de detección a estas etiquetas de detección. Las sondas de detección pueden etiquetarse como se describió anteriormente, por ejemplo, una enzima, una enzima fluorescente o isótopos radiactivos. Al usar tres etiquetas de detección por cebador y cuatro restos fluorescentes por cada sonda de detección, se puede obtener un total de doce señales fluorescentes para cada cadena replicada.

#### iii. Detección de matrices de hibridación y multiplexación

La detección de ácidos nucleicos amplificados puede multiplexarse usando conjuntos de distintos cebadores, cada conjunto está diseñado para amplificar secuencias diana diferentes. Solamente aquellos cebadores que son capaces de encontrar sus dianas generarán productos amplificados. Hay dos alternativas para capturar un ácido

nucleico amplificado dado para una posición fija en un detector de estado sólido. Una es incluir, dentro de la parte no complementaria de los cebadores, una única secuencia de etiqueta de dirección para cada conjunto único de cebadores. El ácido nucleico amplificado que usa un conjunto de cebadores dado contendrá luego secuencias que corresponden a una secuencia de etiqueta de dirección específica. Una segunda alternativa preferida es usar una secuencia presente en la secuencia diana como una etiqueta de dirección.

iv. Detección ligada a enzimas

El ácido nucleico amplificado etiquetado mediante incorporación de nucleótidos etiquetados puede detectarse con sistemas de detección ligado a enzimas. Por ejemplo, el ácido nucleico amplificado etiquetado mediante incorporación de biotina usando biotina-16-UTP (Roche Molecular Biochemicals) puede detectarse como sigue a continuación. El ácido nucleico se inmoviliza en una superficie de vidrio sólido mediante hibridación con un oligonucleótido de ADN complementario (sonda de dirección), complementario a la secuencia diana (o su complemento) presente en el ácido nucleico amplificado. Luego de la hibridación, el portaobjetos de vidrio se lava y se pone en contacto con el conjugado de estreptavidina-fosfavelocidadalcalina (Tropix, Inc., Bedford, MA). Este conjugado de enzima-estreptavidina se une a los restos de biotina en el ácido nucleico amplificado. El portaobjetos se lava nuevamente para quitar el exceso de conjugado enzimático y se agrega el sustrato quimioluminiscente CSPD (Tropix, Inc.) y se cubre con un cubreobjetos de vidrio. El portaobjetos se puede visualizar luego en un Biorad Fluorimager.

2. Amplificación por desplazamiento de cadena lineal

Se puede llevar a cabo una forma modificada de la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple que da lugar a una amplificación lineal de una secuencia diana. Este método modificado se denomina amplificación por desplazamiento de cadena lineal (LSDA, por sus siglas en inglés) y se logra usando un conjunto de cebadores donde todos los cebadores son complementarios a la misma cadena de la secuencia diana. En la LSDA, como en la MSDA, el conjunto de cebadores se hibrida con la secuencia diana y se produce la amplificación por desplazamiento de cadena. Sin embargo, solamente se replica una de las cadenas de la secuencia diana. La LSDA requiere de un ciclo térmico entre cada ronda de replicación para permitir que un nuevo conjunto de cebadores se hibride con la secuencia diana. Dicho ciclo térmico es similar al que se utiliza en la PCR. A diferencia de la PCR lineal o de un solo cebador, sin embargo, cada ronda de replicación en la LSDA da lugar a múltiples copias de la secuencia diana. Una copia está hecha para cada cebador utilizado. Por lo tanto, si se utilizan 20 cebadores en la LSDA, se realizarán 20 copias de la secuencia diana en cada ciclo de replicación.

El ADN amplificado que usa MSDA y WGSDA puede amplificarse adicionalmente mediante transcripción. Con esta finalidad, las secuencias promotoras pueden incluirse en la parte no complementaria de los cebadores utilizados para la amplificación por desplazamiento de cadena o en secuencias enlazadoras utilizadas para concatenar el ADN para la MSDA-CD.

3. Amplificación por desplazamiento múltiple de transcripción inversa

Se puede llevar a cabo la amplificación por desplazamiento múltiple en el ARN o en cadenas de ADN sometidas a transcripción inversa a partir del ARN. Una forma útil del método descrito, denominada amplificación por desplazamiento múltiple de transcripción inversa (RT-MDA, por sus siglas en inglés) implica someter el ARN a transcripción inversa, quitar el ARN (preferiblemente mediante digestión de la nucleasa usando una nucleasa específica para el ARN tal como la RNasa H) y amplificar por desplazamiento múltiple el ADN sometido a transcripción inversa. La RT-MDA se puede llevar a cabo usando ya sea el ADNc de cadena doble o usando solo la primera cadena de ADNc. En este último caso, no es necesario, y preferiblemente no lo es, sintetizar la segunda cadena de ADNc. La RT-MDA es útil para el análisis cuantitativo del ARNm o la amplificación general de secuencias de ARNm para cualquier otro propósito.

4. Repetición de amplificación por desplazamiento múltiple

Las operaciones de amplificación por desplazamiento múltiple descritas se pueden combinar también de forma secuencial. Por ejemplo, el producto de la MDA puede amplificarse en sí mismo en otra amplificación por desplazamiento múltiple. En la presente a esto se lo conoce como repetición de amplificación por desplazamiento múltiple (RMDA, por sus siglas en inglés). Esto se puede lograr, por ejemplo, diluyendo las cadenas replicadas luego de la MDA y sometiéndolas a una nueva MDA. Esto puede repetirse uno o más veces. Cada ronda de MDA aumentará la amplificación. Se pueden combinar diferentes formas de MDA, tal como WGSDA y MSDA, en secuencias diana particulares. En general, la repetición de la MDA puede lograrse, en primer lugar, poniendo en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo e incubando la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana provoca cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada; y luego diluyendo las cadenas replicadas, poniendo en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y las cadenas replicadas diluidas e incubando las cadenas replicadas en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas adicionales en donde, durante la replicación, al

menos una de las cadenas replicadas adicionales se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada adicional. Esta forma del método puede extenderse realizando la siguiente operación una o más veces: diluyendo las cadenas replicadas adicionales, poniendo en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y las cadenas replicadas diluidas e incubando las cadenas replicadas en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas adicionales en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas adicionales se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada adicional.

#### 5. Utilización de productos de amplificación por desplazamiento múltiple

Los ácidos nucleicos producidos mediante el uso del método descrito pueden utilizarse para cualquier propósito. Por ejemplo, los ácidos nucleicos amplificados pueden analizarse (por ejemplo, mediante secuenciación o hibridación de sondas) para determinar las características de las secuencias amplificadas o la presencia o ausencia de determinadas secuencias. Los ácidos nucleicos amplificados pueden utilizarse también como reactivos para ensayos u otros métodos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos producidos en el método descrito pueden acoplarse o adherirse a un sustrato de estado sólido. Los ácidos nucleicos inmovilizados resultantes pueden utilizarse como sondas o índices de secuencias en una muestra. Los ácidos nucleicos producidos en el método descrito pueden acoplarse o adherirse a un sustrato de estado sólido de cualquier forma adecuada. Por ejemplo, los ácidos nucleicos generados mediante desplazamiento de cadena múltiple pueden acoplarse agregando nucleótidos modificados a los extremos 3' de los ácidos nucleicos producidos mediante la replicación por desplazamiento de cadena mediante el uso de la desoxinucleotidil transferasa terminal y haciendo reaccionar los nucleótidos modificados con un sustrato o soporte de estado sólido, acoplado así los ácidos nucleicos al sustrato o soporte de estado sólido.

Los ácidos nucleicos producidos en el método descrito se pueden utilizar también como sondas o patrones de hibridación. Por ejemplo, las secuencias de interés pueden amplificarse en el método descrito y proporcionan una fuente disponible de sondas. Las cadenas replicadas (producidas en el método descrito) pueden escindirse antes de usarse como sondas de hibridación. Por ejemplo, las cadenas replicadas pueden escindirse con la DNasa I. Las sondas de hibridación pueden etiquetarse como se describe en otra parte en la presente con respecto al etiquetado de ácidos nucleicos producidos en el método descrito.

Los ácidos nucleicos producidos en el método descrito pueden utilizarse también para la hibridación sustractiva a efectos de identificar secuencias que están presentes solamente en uno de un par o conjunto de muestras. Por ejemplo, el ADNc amplificado de distintas muestras puede hibridarse y el material de cadena doble resultante puede separarse del material monocatenario. Las secuencias no hibridadas serían un signo de secuencias expresadas en una de las muestras, pero no otras.

#### Realizaciones específicas

Se describe un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método puede comprender poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. El método puede comprender además etiquetar las cadenas replicadas usando la desoxinucleotidil transferasa terminal.

El método puede comprender además diluir las cadenas replicadas, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y las cadenas replicadas diluidas e incubar las cadenas replicadas en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas adicionales donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas adicionales se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada adicional. Este método puede comprender además realizar la siguiente operación una o más veces: diluir las cadenas replicadas adicionales, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y las cadenas replicadas diluidas e incubar las cadenas replicadas en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas adicionales, donde durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas adicionales se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada adicional. El método puede comprender además incubar la mezcla de muestra objetivo/polimerasa en condiciones que promueven el desplazamiento de cadena. El método puede comprender además poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una segunda muestra objetivo e incubar la segunda muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La segunda muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

Los cebadores pueden tener una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de

5, 6, 7 u 8 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 6, 7 u 8 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 6 nucleótidos. Los cebadores pueden tener cada uno al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la exonucleasa 3'-5'. La ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa del bacteriófago  $\Phi$ 29, la ADN polimerasa Tts, la ADN polimerasa del fago M2, la ADN polimerasa VENT™, el fragmento Klenow de ADN polimerasa I, la ADN polimerasa T5, la ADN polimerasa PRD1, la holoenzima ADN polimerasa T4, Sequenase® T7 de la polimerasa natural T7 o la ADN polimerasa Bst. La ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi$ 29.

Los cebadores pueden tener una longitud de 6 nucleótidos, donde cada uno de los cebadores puede contener al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi$ 29. Las cadenas replicadas pueden etiquetarse mediante la adición de nucleótidos modificados a las cadenas replicadas. Los nucleótidos modificados pueden ser nucleótidos biotinilados, nucleótidos fluorescentes, 5 metil dCTP, BrdUTP, o 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos. Los nucleótidos modificados pueden incorporarse en las cadenas replicadas durante la replicación. Los nucleótidos modificados pueden ser nucleótidos biotinilados, nucleótidos fluorescentes, 5 metil dCTP, BrdUTP, o 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos. Los nucleótidos modificados pueden ser 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos y las cadenas replicadas pueden etiquetarse haciendo reaccionar las etiquetas con las 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridinas incorporadas. Las etiquetas pueden ser isotiocianato de fluoresceína, 5,6-carboximetil fluoresceína, rojo Texas, nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il, cumarina, cloruro de dansilo, rodamina, amino metil cumarina, Eosina, Eritrosina, BODIPY®, Cascade Blue®, Oregon Green®, pireno, lisamina\_xanteno, acridina, oxazinas, ficoeritrina, Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5, Cy7 o una combinación de estos.

La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La secuencia diana puede comprender dos cadenas y un conjunto de cebadores puede tener 3 o más cebadores complementarios a una de las cadenas de la secuencia diana y al menos un cebador complementario a la otra cadena de la secuencia diana. El conjunto de cebadores puede tener 3 o más cebadores complementarios a la misma cadena de la secuencia diana. El conjunto de cebadores puede tener 4 o más cebadores complementarios a la misma cadena de la secuencia diana. El conjunto de cebadores puede tener 4 o más cebadores. El conjunto de cebadores puede tener 5 o más cebadores. Las condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana pueden ser sustancialmente isotérmicas. Las condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana no tienen por qué involucrar ciclado térmico. Las condiciones no necesitan incluir ciclado térmico. La secuencia diana puede comprender una diana de amplificación y una diana de hibridación, tal diana de hibridación puede flanquear la diana de amplificación, el conjunto de cebadores puede comprender múltiples cebadores, cada cebador puede comprender una parte complementaria, donde las partes complementarias de los cebadores pueden ser cada una complementarias a una parte diferente de la diana de hibridación.

El conjunto de cebadores puede comprender un conjunto derecho de cebadores y un conjunto izquierdo de cebadores, la secuencia diana puede ser de cadena doble, con una primera y segunda cadena, la diana de hibridación puede comprender una diana de hibridación derecha e izquierda, donde la diana de hibridación derecha puede flanquear la diana de amplificación en un extremo y la diana de hibridación izquierda puede flanquear la diana de amplificación en el otro extremo. Las partes complementarias de los cebadores del conjunto derecho pueden ser (i) todas complementarias a la primera cadena de la secuencia diana y (ii) cada una complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación derecha y las partes complementarias de los cebadores del conjunto izquierdo pueden ser (i) todas complementarias a la segunda cadena de la secuencia diana y (ii) cada una complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación izquierda.

El conjunto derecho e izquierdo de cebadores pueden tener, cada uno, 3 o más cebadores. El conjunto derecho e izquierdo de cebadores pueden tener, cada uno, 4 o más cebadores. El conjunto derecho e izquierdo de cebadores pueden tener, cada uno, 5 o más cebadores. El conjunto derecho e izquierdo de cebadores pueden tener, cada uno, la misma cantidad de cebadores. La secuencia diana puede ser una muestra de ácido nucleico de complejidad considerable y el conjunto de cebadores puede comprender cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias. La secuencia diana puede ser una muestra de ácido nucleico genómico. Los cebadores pueden tener una longitud de 5 a 20 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 5 a 10 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 6, 7 u 8 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 6 nucleótidos. Todos los cebadores pueden tener la misma longitud. Cada cebador puede comprender una parte constante y una parte aleatoria, donde la parte constante de cada cebador puede tener la misma secuencia de nucleótidos y la parte aleatoria de cada cebador puede tener una secuencia de nucleótidos aleatoria.

La secuencia diana puede ser ADN concatenado. El ADN concatenado puede ser concatenado con enlazadores. Cada enlazador puede comprender una parte complementaria de cebadores, cada cebador puede comprender una parte complementaria y la parte complementaria de cada cebador puede ser complementaria a la parte complementaria de los enlazadores. Los conjuntos de cebadores pueden comprender cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias. Cada cebador puede comprender una parte constante y una parte aleatoria, donde la parte constante de cada cebador puede tener la misma secuencia de nucleótidos y la parte aleatoria de cada cebador puede tener una secuencia de nucleótidos aleatoria. El ADN concatenado puede formarse mediante ligación de fragmentos de ADN juntos. Los fragmentos de ADN pueden ser ADNc elaborados del ARNm. El ARNm

puede comprender una mezcla de ARNm aislado de células. La secuencia diana no necesita ser una molécula de ácido nucleico hecha de múltiples repeticiones en tándem de una única secuencia que se sintetizó mediante replicación en círculo rodante.

5 Los cebadores pueden comprender nucleótidos, donde uno o más de los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos. Entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 50 % de los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos. Aproximadamente 50 % o más de los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos. Todos los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos. Los cebadores pueden comprender nucleótidos, donde uno o más de los nucleótidos pueden ser 2'-O-metil ribonucleótidos. Entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 50 % de los nucleótidos pueden ser 2'-O-metil ribonucleótidos. Aproximadamente 50 % o más de los nucleótidos pueden ser 2'-O-metil ribonucleótidos. Todos los nucleótidos pueden ser 2'-O-metil ribonucleótidos. Los cebadores pueden comprender nucleótidos y los nucleótidos pueden ser una mezcla de ribonucleótidos y 2'-O-metil ribonucleótidos. Los cebadores pueden comprender nucleótidos, tales nucleótidos pueden comprender bases y una o más de las bases pueden ser bases universales. Al menos una de las bases universales puede ser 3-nitropirrol. La base universal puede ser 5-nitroindol. Entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 50 % de las bases pueden ser bases universales. Aproximadamente 50 % o más de las bases pueden ser bases universales. Todas las bases pueden ser bases universales.

La muestra objetivo puede ser una muestra para biopsia, una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra celular o una muestra de tejido. La muestra objetivo es una muestra para biopsia de aspiración con agujas. Los ácidos nucleicos en la muestra objetivo no necesitan ser separados de otro material en la muestra objetivo. La muestra objetivo puede ser un lisado celular en bruto. No es necesario procesar la muestra objetivo más allá de la lisis celular. Se pueden analizar las cadenas replicadas. Las cadenas replicadas se pueden analizar usando uno o más chips de ADN. Las cadenas replicadas se pueden analizar mediante hibridación. Las cadenas replicadas se pueden analizar mediante secuenciación de ácidos nucleicos. Las cadenas replicadas se pueden almacenar ante o después, o tanto antes como después de su análisis. La muestra objetivo puede ser una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de semen, una muestra de líquido linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de líquido amniótico, una muestra para biopsia, una muestra para biopsia aspirativa con aguja, una muestra de cáncer, una muestra tumoral, una muestra de tejidos, una muestra de células, una muestra de lisado celular, una muestra de lisado celular en bruto, una muestra forense, una muestra arqueológica, una muestra de infección, una muestra de infección hospitalaria, una muestra de producción, una muestra de preparación de fármacos, una muestra de producción de moléculas biológicas, una muestra de preparación de proteínas, muestras de preparación de lípidos, una muestra de preparación de carbohidratos o una combinación de estas.

La muestra objetivo puede ser una muestra de sangre. La muestra objetivo puede ser una muestra para biopsia de aspiración con agujas. La muestra objetivo puede ser una muestra de lisado celular en bruto. La muestra objetivo puede ser una muestra de infección hospitalaria. La muestra puede provenir de un paciente. La muestra objetivo puede ser una muestra de producción de moléculas biológicas. La producción de cadenas replicadas puede indicar la presencia de ácidos nucleicos en la muestra. La cantidad de cadenas replicadas producidas puede indicar la cantidad de ácidos nucleicos en la muestra. La muestra objetivo puede ser una muestra de preparación de fármacos. La muestra objetivo puede ser una muestra tumoral. La muestra objetivo puede ser una muestra de líquido amniótico. Las cadenas replicadas producidas a partir de la muestra objetivo pueden representar una huella dactilar de ácido nucleico de la muestra.

La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo tipo de organismo que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo tipo de tejido que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo organismo que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede obtenerse en un tiempo diferente al de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un organismo diferente al de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un tipo diferente de tejido que la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de una especie diferente de organismo que la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de una cepa diferente del organismo que la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un compartimiento celular diferente a la de la primera muestra objetivo.

Una molécula de ácido nucleico circular puede comprender la secuencia diana. La molécula de ácido nucleico circular puede elaborarse digiriendo el ADN genómico con una endonucleasa de restricción y tornando circular el ADN digerido. El ADN digerido puede tornarse circular con ADN o ARN ligasa. El ADN digerido puede tornarse circular con un férula o adaptador. La secuencia diana puede comprender una diana de amplificación y una diana de hibridación, tal diana de hibridación puede flanquear la diana de amplificación, el conjunto de cebadores puede comprender múltiples cebadores, donde cada cebador puede comprender una parte complementaria y las partes complementarias de los cebadores pueden ser cada una complementarias a una parte diferente de la diana de hibridación.

El conjunto de cebadores puede comprender un conjunto derecho de cebadores y un conjunto izquierdo de cebadores, la secuencia diana puede ser de cadena doble con una primera y segunda cadena, la diana de hibridación puede comprender una diana de hibridación derecha e izquierda, y la diana de hibridación derecha

puede flanquear la diana de amplificación en un extremo y la diana de hibridación izquierda puede flanquear la diana de amplificación en el otro extremo. Las partes complementarias de los cebadores del conjunto derecho pueden ser (i) todas complementarias a la primera cadena de la secuencia diana y (ii) cada una complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación derecha y las partes complementarias de los cebadores del conjunto izquierdo pueden ser (i) todas complementarias a la segunda cadena de la secuencia diana (ii) cada una complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación izquierda.

La molécula de ácido nucleico circular puede elaborarse tomando circular el ADNc. La molécula de ácido nucleico circular se elabora tomando circular el híbrido de ARNm/ADNc. El híbrido de ARNm/ADNc puede tornarse circular con ADN o ARN ligasa. El híbrido de ARNm/ADNc puede tornarse circular con una férula o adaptador.

Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. Los ácidos nucleicos en la muestra objetivo no necesitan ser separados de otro material en la muestra objetivo. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

El método puede comprender también poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una segunda muestra objetivo e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La segunda muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

La muestra objetivo puede ser un lisado celular en bruto. No es necesario procesar la muestra objetivo más allá de la lisis celular. La muestra objetivo puede ser una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de semen, una muestra de líquido linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de líquido amniótico, una muestra para biopsia, una muestra para biopsia aspirativa con aguja, una muestra de cáncer, una muestra tumoral, una muestra de tejidos, una muestra de células, una muestra de lisado celular, una muestra de lisado celular en bruto, una muestra forense, una muestra arqueológica, una muestra de infección, una muestra de infección hospitalaria, una muestra de producción, una muestra de preparación de fármacos, una muestra de producción de moléculas biológicas, una muestra de preparación de proteínas, muestras de preparación de lípidos, una muestra de preparación de carbohidratos o una combinación de estas. La muestra objetivo puede ser una muestra de sangre. La muestra objetivo puede ser una muestra para biopsia de aspiración con agujas. La muestra objetivo puede ser una muestra de lisado celular en bruto. La muestra objetivo puede ser una muestra de infección hospitalaria. La muestra puede provenir de un paciente. La muestra objetivo puede ser una muestra de producción de moléculas biológicas.

La producción de cadenas replicadas puede indicar la presencia de ácidos nucleicos en la muestra. La cantidad de cadenas replicadas producidas puede indicar la cantidad de ácidos nucleicos en la muestra. La muestra objetivo puede ser una muestra de preparación de fármacos. La muestra objetivo puede ser una muestra tumoral. La muestra objetivo puede ser una muestra de líquido amniótico. Las cadenas replicadas producidas a partir de la muestra objetivo pueden representar una huella dactilar de ácido nucleico de la muestra.

La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo tipo de organismo que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo tipo de tejido que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo organismo que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede obtenerse en un tiempo diferente al de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un organismo diferente a la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un tipo diferente de tejido a la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de una especie diferente de organismo a la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de una cepa diferente del organismo a la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un compartimento celular diferente a la de la primera muestra objetivo.

Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo es un lisado celular en bruto. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. Los cebadores tienen una longitud de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la

replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

5 Se describe además un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. Los cebadores contienen cada uno al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

10 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. El cebador-muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, los cebadores tienen una longitud de 6 nucleótidos, donde los cebadores contienen, cada uno, al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa, y la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi 29$ . La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

20 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. El método comprende además diluir las cadenas replicadas, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y las cadenas replicadas diluidas, e incubar las cadenas replicadas en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas adicionales donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas adicionales se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada adicional.

30 Este método puede comprender además realizar la siguiente operación una o más veces: diluir las cadenas replicadas adicionales, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y las cadenas replicadas diluidas e incubar las cadenas replicadas en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas adicionales donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas adicionales se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada adicional.

35 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende,

(a) mezclar un conjunto de cebadores con una muestra objetivo para producir una mezcla de cebador-muestra objetivo e incubar la mezcla de cebador-muestra objetivo en condiciones que promueven la hibridación entre los cebadores y la secuencia diana en la mezcla de cebadores- muestra objetivo, donde el cebador-muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, y

40 (b) mezclar la ADN polimerasa con la mezcla de cebador-muestra objetivo para producir una mezcla de polimerasa-muestra objetivo e incubar la mezcla de polimerasa-muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana.

45 El conjunto de cebadores comprende un conjunto derecho de cebadores y un conjunto izquierdo de cebadores, la secuencia diana es de cadena doble, con una primera y una segunda cadena, donde los cebadores del conjunto derecho son todos complementarios a la primera cadena de la secuencia diana y los cebadores del conjunto izquierdo son todos complementarios a la segunda cadena de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. El conjunto derecho de cebadores puede tener 4 o más cebadores y el conjunto izquierdo de cebadores tiene 4 o más cebadores.

50 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende,

(a) mezclar un conjunto de cebadores con una muestra objetivo para producir una mezcla de cebador-muestra objetivo e incubar la mezcla de cebador-muestra objetivo en condiciones que promueven la hibridación entre los cebadores y la secuencia diana en la mezcla de cebador-muestra objetivo, donde el cebador-muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, y

(b) mezclar la ADN polimerasa con la mezcla de cebador-muestra objetivo para producir una mezcla

de polimerasa-muestra objetivo e incubar la mezcla de polimerasa-muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana.

5 La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. La secuencia diana es una muestra de ácido nucleico de complejidad considerable, y el conjunto de cebadores comprende cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias.

Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tal método comprende,

10 (a) mezclar un conjunto de cebadores con una muestra objetivo para producir una mezcla de cebador-muestra objetivo e incubar la mezcla de cebador-muestra objetivo en condiciones que promueven la hibridación entre los cebadores y la secuencia diana en la mezcla de cebador-muestra objetivo, donde el cebador-muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, y

(b) mezclar la ADN polimerasa con la mezcla de cebador-muestra objetivo para producir una mezcla de polimerasa-muestra objetivo e incubar la mezcla de polimerasa-muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana.

15 Todos los cebadores en el conjunto de cebadores son complementarios a la misma cadena en la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. El conjunto de cebadores puede tener 3 o más cebadores.

20 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende,

(a) mezclar un conjunto de cebadores con una muestra objetivo para producir una mezcla de cebador-muestra objetivo e incubar la mezcla de cebador-muestra objetivo en condiciones que promueven la hibridación entre los cebadores y la secuencia diana en la mezcla de cebadores-muestra objetivo, donde el cebador-muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, y

25 (b) mezclar la ADN polimerasa con la mezcla de cebador-muestra objetivo para producir una mezcla de polimerasa-muestra objetivo e incubar la mezcla de polimerasa-muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana.

30 La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. La secuencia diana es una muestra de ácido nucleico de complejidad considerable y el conjunto de cebadores comprende cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias. Cada cebador comprende una parte constante y una parte aleatoria, donde la parte constante de cada cebador tiene la misma secuencia de nucleótidos y la parte aleatoria de cada cebador tiene una secuencia de nucleótidos aleatoria.

35 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende,

(a) mezclar un conjunto de cebadores con una muestra objetivo para producir una mezcla de cebador-muestra objetivo e incubar la mezcla de cebador-muestra objetivo en condiciones que promueven la hibridación entre los cebadores y la secuencia diana en la mezcla de cebador-muestra objetivo, donde el cebador-muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, y

40 (b) mezclar la ADN polimerasa con la mezcla de cebador-muestra objetivo para producir una mezcla de polimerasa-muestra objetivo e incubar la mezcla de polimerasa-muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana.

45 La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. Las condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana no involucran ciclado térmico y la secuencia diana es ADN concatenado.

50 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. El conjunto de cebadores puede tener 3 o más cebadores complementarios a la misma cadena de la secuencia diana.

5 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. La secuencia diana es una muestra de ácido nucleico de complejidad considerable y el conjunto de cebadores comprende cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias.

10 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. Todos los cebadores en el conjunto de cebadores son complementarios a la misma cadena en la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. El conjunto de cebadores puede tener 3 o más cebadores.

20 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. La secuencia diana es una muestra de ácido nucleico de complejidad considerable y el conjunto de cebadores comprende cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias. Cada cebador comprende una parte constante y una parte aleatoria, donde la parte constante de cada cebador tiene la misma secuencia de nucleótidos y la parte aleatoria de cada cebador tiene una secuencia de nucleótidos aleatoria.

30 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. Las condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana no implican ciclado térmico y la secuencia diana es ADN concatenado.

35 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización térmica. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

40 Se describe también un método para etiquetar ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena, donde el método comprende etiquetar ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena usando la desoxinucleotidil transferasa terminal. Las cadenas replicadas pueden etiquetarse mediante la adición de nucleótidos modificados a los extremos 3' de los ácidos nucleicos. Los nucleótidos modificados pueden ser nucleótidos biotinilados, nucleótidos fluorescentes, 5 metil dCTP, BrdUTP, o 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos.

45 Se describe también un método para etiquetar ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena, donde el método comprende incorporar nucleótidos modificados en los ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena durante la replicación.

50 Se describe también un método para acoplar los ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena, donde el método comprende agregar nucleótidos modificados a los extremos 3' de los ácidos nucleicos producidos mediante la replicación por desplazamiento de cadena usando la desoxinucleotidil transferasa terminal, y hacer reaccionar los nucleótidos modificados con un soporte de estado sólido, acoplando así los ácidos nucleicos al soporte de estado sólido.

55 Se describe también una micromatriz que comprende los ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena acoplados o adheridos a un sustrato de estado sólido.

Se describe también un método para generar sondas de acuerdo con una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la

secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. Las cadenas replicadas se utilizan como sondas de hibridación. El método puede comprender además etiquetar las sondas de hibridación usando la desoxinucleotidil transferasa terminal.

5 Se describe además un método para amplificar el ARN mensajero, donde el método comprende someter el ARN mensajero a transcripción inversa para producir una primera cadena del ADNc, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa, y la primera cadena de ADNc, e incubar en condiciones que promueven la replicación de la primera cadena de ADNc. La replicación de la primera cadena de ADNc da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la primera cadena de ADNc mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. El método puede comprender, además, antes de la replicación, degradar el ARN mensajero usando la RNAsa H.

10 El método puede comprender además poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La segunda muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

15 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende degradar parcialmente el ARN en una muestra objetivo, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

20 Se describe también un método de hibridación genómica comparativa, donde el método comprende hibridar los ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena de una primera muestra con ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena de una segunda muestra. La hibridación se puede realizar en ausencia de ADN CotI.

25 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. Una molécula de ácido nucleico circular comprende la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

30 El conjunto de cebadores puede comprender cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias. Los cebadores pueden tener una longitud de 5, 6, 7 u 8 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 6, 7 u 8 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 6 nucleótidos. Los nucleótidos modificados pueden ser nucleótidos biotinilados, nucleótidos fluorescentes, 5 metil dCTP, BrdUTP, o 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos. Los nucleótidos modificados pueden ser 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos y las cadenas replicadas pueden etiquetarse haciendo reaccionar las etiquetas con las 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridinas incorporadas. Las etiquetas pueden ser isotiocianato de fluoresceína, 5,6-carboximetil fluoresceína, rojo Texas, nitrobenz2-oxa-1,3-diazol-4-il, cumarina, cloruro de dansilo, rodamina, aminometil cumarina, Eosina, Eritrosina, BODIPY®, Cascade Blue®, Oregon Green®, pireno, lisamina, xanteno, acridina, oxazinas, ficoeritrina, Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5, Cy7 o una combinación de estos.

35 Las cadenas replicadas pueden utilizarse como elementos en una micromatriz. Las cadenas replicadas pueden escindirse antes de usarse como sondas de hibridación. Las cadenas replicadas pueden escindirse con DNAsa I. Las sondas de hibridación pueden etiquetarse mediante la adición de nucleótidos modificados a los extremos 3' de las cadenas replicadas. Los nucleótidos modificados pueden hacerse reaccionar con un soporte de estado sólido, acoplado así las cadenas replicadas al soporte de estado sólido.

40 La muestra objetivo puede ser una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de semen, una muestra de líquido linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de líquido amniótico, una muestra para biopsia, una muestra para biopsia aspirativa con aguja, una muestra de cáncer, una muestra tumoral, una muestra de tejido, una muestra de células, una muestra de lisado celular, una muestra de lisado celular en bruto, una muestra forense, una muestra arqueológica, una muestra de infección, una muestra de infección hospitalaria, una muestra de producción, una muestra de preparación de fármacos, una muestra de producción de moléculas biológicas, una muestra de preparación de proteínas, muestras de preparación de lípidos, una muestra de preparación de carbohidratos o una combinación de estas. La muestra objetivo puede ser una muestra de sangre. La muestra objetivo es una muestra para biopsia de aspiración con agujas. La muestra objetivo puede ser una muestra de lisado celular en bruto. La muestra objetivo puede ser una muestra de infección hospitalaria. La muestra puede contener tanto ácidos nucleicos humanos como no humanos. El ácido nucleico no humano puede amplificarse preferentemente mediante el uso de cebadores específicos para el ácido nucleico no humano. El ácido

nucleico humano puede amplificarse preferentemente mediante el uso de cebadores específicos para el ácido nucleico humano. La muestra puede provenir de un paciente. La muestra objetivo puede ser una muestra de producción de moléculas biológicas. La producción de cadenas replicadas puede indicar la presencia de ácidos nucleicos en la muestra. La cantidad de cadenas replicadas producidas puede indicar la cantidad de ácidos nucleicos en la muestra. La muestra objetivo puede ser una muestra de preparación de fármacos. La muestra objetivo puede ser una muestra tumoral. La muestra objetivo puede ser una muestra de líquido amniótico. Las cadenas replicadas producidas a partir de la muestra objetivo pueden representar una huella dactilar de ácido nucleico de la muestra.

La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo tipo de organismo que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo tipo de tejido que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo organismo que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede obtenerse en un tiempo diferente al de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un organismo diferente a la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un tipo diferente de tejido a la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de una especie diferente de organismo que la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de una cepa diferente del organismo que la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un compartimiento celular diferente a la de la primera muestra objetivo.

La molécula de ácido nucleico circular puede elaborarse digiriendo el ADN genómico con una endonucleasa de restricción y tomando circular el ADN digerido. El ADN digerido puede tornarse circular con ADN o ARN ligasa. El ADN digerido puede tornarse circular con una férula o adaptador. La secuencia diana puede comprender una diana de amplificación y una diana de hibridación, tal diana de hibridación puede flanquear la diana de amplificación, el conjunto de cebadores puede comprender múltiples cebadores, donde cada cebador puede comprender una parte complementaria y las partes complementarias de los cebadores pueden ser cada una complementarias a una parte diferente de la diana de hibridación.

El conjunto de cebadores puede comprender un conjunto derecho de cebadores y un conjunto izquierdo de cebadores, la secuencia diana puede ser de cadena doble, con una primera y segunda cadena, la diana de hibridación puede comprender una diana de hibridación derecha e izquierda, donde la diana de hibridación derecha puede flanquear la diana de amplificación en un extremo y la diana de hibridación izquierda puede flanquear la diana de amplificación en el otro extremo. Las partes complementarias de los cebadores del conjunto derecho pueden ser (i) todas complementarias a la primera cadena de la secuencia diana y (ii) cada una complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación derecha y las partes complementarias de los cebadores del conjunto izquierdo pueden ser (i) todas complementarias a la segunda cadena de la secuencia diana y (ii) cada una complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación izquierda.

La molécula de ácido nucleico circular puede elaborarse tomando circular el ADNc. La molécula de ácido nucleico circular puede elaborarse tomando circular el híbrido de ARNm/ADNc. El híbrido de ARNm/ADNc puede tornarse circular con ADN o ARN ligasa. El híbrido de ARNm/ADNc puede tornarse circular con una férula o adaptador.

Se describe también un método para amplificar un genoma completo, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, donde la muestra objetivo comprende un genoma completo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación del genoma. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante la replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. Los cebadores pueden tener una longitud de 6 nucleótidos, donde cada uno de los cebadores puede contener al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi 29$ . Los cebadores pueden ser de una composición de nucleótidos aleatoria, donde cada uno de los cebadores puede contener al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi 29$ .

Se describe también un método para amplificar un cromosoma, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, donde la muestra objetivo comprende un cromosoma, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación del cromosoma, donde la muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación del cromosoma da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del cromosoma mediante la replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. Los cebadores pueden tener una longitud de 6 nucleótidos, donde cada uno de los cebadores puede contener al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi 29$ . Los cebadores pueden ser de una composición de nucleótidos aleatoria, donde cada uno de los cebadores puede contener al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi 29$ .

Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden, lisar células para formar un

lisado celular, donde el lisado celular comprende un genoma completo, neutralizar el lisado celular para formar un lisado celular neutralizado, e incubar el lisado celular neutralizado en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

#### E. Modificaciones y operaciones adicionales

##### 1. Detección de productos de amplificación

Los productos de amplificación pueden detectarse directamente, por ejemplo, mediante etiquetado primario o etiquetado secundario, como se describirá a continuación.

##### v. Etiquetado primario

El etiquetado primario consiste en incorporar restos etiquetados, tales como nucleótidos fluorescentes, nucleótidos biotinilados, nucleótidos que contienen digoxigenina o bromodesoxiuridina, durante la replicación por desplazamiento de cadena. Por ejemplo, es posible incorporar análogos de desoxiuridina con tinte de cianina (Yu *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **22**:3226- 3232 (1994)) a una frecuencia de 4 análogos por cada 100 nucleótidos. Un método preferido para detectar ácido nucleico amplificado *in situ* es etiquetar el ADN durante la amplificación con BrdUrd, seguido de la unión del BrdUrd incorporado con un anticuerpo anti-BrdU biotinilado (Zymed Labs, San Francisco, CA), seguido por la unión de los restos de biotina con estreptavidina-peroxidasa (Life Sciences, Inc.), y finalmente el desarrollo de la fluorescencia con fluoresceína-tiramida (DuPont de Nemours & Co., departamento de productos médicos). Otros métodos para detectar ácido nucleico amplificado *in situ* incluyen etiquetar el ADN durante la amplificación con 5-metilcitosina, seguido por la unión de la 5-metilcitosina incorporada con un anticuerpo (Sano *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **951**:157-165 (1988)), o etiquetar el ADN durante la amplificación con aminoalil-desoxiuridina seguido por la unión de la aminoalil-desoxiuridina incorporada con un tinte Oregon Green® (Molecular Probes, Eugene, OR) (Henegariu *et al.*, *Nature Biotechnology* **18**:345-348 (2000)).

Otro método para etiquetar ácidos nucleicos amplificados es incorporar 5-(3- aminoalil)-dUTP (AAdUTP) en el ácido nucleico amplificado durante la amplificación seguido por el etiquetado químico en los nucleótidos incorporados. La 5-(3-aminoalil)-desoxiuridina (AAdU) incorporada puede acoplarse a las etiquetas que tienen grupos reactivos que son capaces de reaccionar con grupos amina. La AAdUTP puede prepararse de acuerdo con Langer *et al.* (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. EUA. **78**: 6633-37. Se pueden utilizar otros nucleótidos modificados en formas análogas. Es decir, otros nucleótidos modificados con modificación mínima pueden incorporarse durante la replicación y se etiquetan luego de su incorporación.

Los ejemplos de etiquetas adecuadas para la adición de AAdUTP son isótopos radioactivos, moléculas fluorescentes, moléculas fosforescentes, enzimas, anticuerpos y ligandos.

Los ejemplos de etiquetas fluorescentes adecuadas incluyen isotiocianato de fluoresceína (FITC), 5,6-carboximetil fluoresceína, rojo Texas, nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il (NBD), cumarina, cloruro de dansilo, rodamina, amino-metil cumarina (AMCA), Eosina, Eritrosina, BODIPY®, Cascade Blue®, Oregon Green®, pireno, lisamina, xantenos, acridinas, oxazinas, ficoeritrina, quelantes macrocíclicos de iones lantánidos tales como quantum dye™, tintes de transferencia de energía fluorescente, tal como heterodímero de etidio-naranja de tiazol, y los tintes de cianina Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5 and Cy7. Los ejemplos de otras etiquetas fluorescentes específicas incluyen ácido 3-Hidroxipireno 5,8,10-Tri sulfónico, 5-Hidroxi Triptamina (5-HT), Fucsina ácida, Complejo de Alizarina, Rojo de Alizarina, Alofocianina, Aminocumarina, Estearato de antroilo, Rojo Brillante Astrazon 4G, Naranja Astrazon R, Rojo Astrazon 6B, Amarillo Astrazon 7 GLL, Atabrina, Auramina, Aurofosfina, Aurofosfina G, BAO 9 (Bisaminofeniloxadiazol), BCECF, sulfato de berberina, Bisbenzamida, Solución Blancophor FFG, Blancofor SV, Bodipy F1, Sulfoflavina Brillante FF, Calcien Blue, Verde de calcio, Solución Calcofluor RW, Calcofluor Blanco, solución ABT blanca Calcofor, solución estándar blanco Calcofor, Carbostirilo, Cascade Yellow, Catecolamina, Quinacrina, Corifosfina O, Cumarina-faloidina, CY3,1 8, CY5,1 8, CY7, Dans (ácido 1-Dimetil Amino Nafalina 5 sulfónico), Dansa (ácido diamino naftil sulfónico), Dansilo NH-CH<sub>3</sub>, Diamino Fenil Oxidiazol (DAO), ácido dimetilamino-5-sulfónico, Difluoruro de dipirrometenos de boro, Flavina brillante difenilo 7GFF, Dopamina, Eritrosina ITC, Eucrisina, FIF (Fluorescencia inducida por formaldehído), Naranja Flazo, Fluo 3, Fluorescamina, Fura-2, Genacril Rojo Brillante B, Genacril Amarillo Brillante 10GF, Genacril Rosa 3G, Genacril Amarillo 5GF, Ácido Gloxálico, Azul Granular, Hematoporfirina, Indo-1, Intrawhite Cf Líquido, Leucofor PAF, Leucofor SF, Leucofor WS, Lisamina Rodamina B200 (RD200), Amarillo Lucifer CH, Amarillo Lucifer VS, Rojo Magdala, Azul Marino, Flavina Brillante Maxilon 10 GFF, Flavina Brillante Maxilon 8 GFF, MPS (estilbeno de pironina verde de metilo), Mitramicina, NBD Amina, Nitrobenzoxadidol, Noradrenalina, Rojo Rápido Nuclear, Amarillo Nuclear, Flavina Brillante Nilosan E8G, Oxadiazol, Pacific Blue, Pararosanilina (Feulgen), Solución Phorwite AR, Phorwite BKL, Phorwite Rev, Phorwite RPA, Fosfina 3R, Ftalocianina, Ficoeritrina R, Poliazaindaceno Pontochrome Blue Black, Porfirina, Primulina, Procion Yellow, Pironina, Pironina B, Flavina Brillante Pirozal 7GF, Mostaza de Quinacrina, Rodamina 123, Rodamina 5 GLD, Rodamina 6G, Rodamina B, Rodamina B 200, Rodamina B Extra, Rodamina BB, Rodamina BG, Rodamina WT, Serotonina, Rojo Brillante Sevron 2B, Rojo Brillante Sevron 4G, Rojo Brillante Sevron B, Naranja Sevron, Amarillo Sevron L, SITS (Primulina), SITS (Ácido Isotiosulfónico de Estilbeno), Estilbeno, Snarf 1,

Sulforodamina B Can C, Sulforodamina G Extra, Tetraciclina, Rojo de Tiazina R, Tioflavina S, Tioflavina TCN, Tioflavina 5, Tiolita, Naranja de tiozol, Tinopol CBS, True Blue, Ultralite, Uranina B, Uvitex SFC, Naranja de xileno y XRITC.

5 Las etiquetas fluorescentes preferidas son fluoresceína (5-carboxifluoresceína-N-hidroxisuccinimida éster) rodamina (5,6-tetrametil rodamina) y tintes de cianina Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5 y Cy7. La absorción y emisión máxima, respectivamente, para estos flúores son: FITC (490 nm; 520 nm), Cy3 (554 nm; 568 nm), Cy3,5 (581 nm; 588 nm), Cy5 (652 nm; 672 nm), Cy5,5 (682 nm; 703 nm) y Cy7 (755 nm; 778 nm), permitiendo así su detección simultánea. Otros ejemplos de tintes de fluoresceína incluyen 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',4', 1,4,- tetraclorofluoresceína (TET), 2',4',5',7',1,4-hexaclorofluoresceína (HEX), 2',7'- dimetoxi-4', 5'-dicloro-6-carboxirodamina (JOE), 2'-cloro-5'-fluoro-7',8'-fusionado-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína (NED) y 2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína (VIC). Las etiquetas fluorescentes pueden obtenerse de una variedad de fuentes comerciales, que incluyen Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; Molecular Probes, Eugene, OR; y Research Organics, Cleveland, Ohio.

vi. Etiquetado secundario con sondas de detección

15 El etiquetado secundario consiste en usar sondas moleculares adecuadas, denominadas sondas de detección, para detectar ácidos nucleicos amplificados. Por ejemplo, se puede diseñar un cebador para que contenga, en su parte no complementaria, una secuencia arbitraria conocida, denominada etiqueta de detección. Puede utilizarse una etapa de hibridación secundaria para unir las sondas de detección a estas etiquetas de detección. Las sondas de detección pueden etiquetarse como se describió anteriormente, por ejemplo, una enzima, restos fluorescentes o isótopos radiactivos. Al usar tres etiquetas de detección por cebador y cuatro restos fluorescentes por cada sonda de detección, se puede obtener un total de doce señales fluorescentes para cada cadena replicada.

vii. Detección de matrices de hibridación y multiplexación

25 La detección de ácidos nucleicos amplificados puede multiplexarse usando conjuntos de distintos cebadores, cada conjunto está diseñado para amplificar secuencias diana diferentes. Solamente aquellos cebadores que son capaces de encontrar sus dianas generarán productos amplificados. Hay dos alternativas para capturar un ácido nucleico amplificado dado para una posición fija en un detector de estado sólido. Una es incluir, dentro de la parte no complementaria de los cebadores, una única secuencia de etiqueta de dirección para cada conjunto único de cebadores. El ácido nucleico amplificado que usa un conjunto de cebadores dado contendrá luego secuencias que corresponden a una secuencia de etiqueta de dirección específica. Una segunda alternativa preferida es usar una secuencia presente en la secuencia diana como una etiqueta de dirección.

viii. Detección ligada a enzimas

35 El ácido nucleico amplificado etiquetado mediante incorporación de nucleótidos etiquetados puede detectarse con sistemas de detección ligado a enzimas. Por ejemplo, el ácido nucleico amplificado etiquetado mediante incorporación de biotina usando biotina-16-UTP (Roche Molecular Biochemicals) puede detectarse como sigue a continuación. El ácido nucleico se inmoviliza en una superficie de vidrio mediante hibridación con un oligonucleótido de ADN complementario (sonda de dirección), complementario a la secuencia diana (o su complemento) presente en el ácido nucleico amplificado. Luego de la hibridación, el portaobjetos de vidrio se lava y se pone en contacto con el conjugado de estreptavidina-fosfavelocidadalcalina (Tropix, Inc., Bedford, MA). Este conjugado de enzima-estreptavidina se une a los restos de biotina en el ácido nucleico amplificado. El portaobjetos se lava nuevamente para quitar el exceso de conjugado enzimático y se agrega el sustrato quimioluminiscente CSPD (Tropix, Inc.) y se cubre con un cubreobjetos de vidrio. El portaobjetos se puede visualizar luego en un Biorad Fluorimager.

6. Amplificación por desplazamiento de cadena lineal

45 Se puede llevar a cabo una forma modificada de la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple que da lugar a una amplificación lineal de una secuencia diana. Este método modificado se denomina amplificación por desplazamiento de cadena lineal (LSDA, por sus siglas en inglés) y se logra usando un conjunto de cebadores donde todos los cebadores son complementarios a la misma cadena de la secuencia diana. En la LSDA, como en la MSDA, el conjunto de cebadores se hibrida con la secuencia diana y se produce la amplificación por desplazamiento de cadena. Sin embargo, solamente se replica una de las cadenas de la secuencia diana. La LSDA requiere de un ciclo térmico entre cada ronda de replicación para permitir que un nuevo conjunto de cebadores se hibride con la secuencia diana. Dicho ciclo térmico es similar al que se utiliza en la PCR. A diferencia de la PCR lineal o de un solo cebador, sin embargo, cada ronda de replicación en la LSDA da lugar a múltiples copias de la secuencia diana. Una copia está hecha para cada cebador utilizado. Por lo tanto, si se utilizan 20 cebadores en la LSDA, se realizarán 20 copias de la secuencia diana en cada ciclo de replicación.

55 El ADN amplificado que usa MSDA y WGSDA puede amplificarse adicionalmente mediante transcripción. Con esta finalidad, las secuencias promotoras pueden incluirse en la parte no complementaria de los cebadores utilizados para la amplificación por desplazamiento de cadena o en secuencias enlazadoras utilizadas para concatenar el ADN

para la MSDA-CD.

#### 7. Amplificación por desplazamiento múltiple de transcripción inversa

Se puede llevar a cabo la amplificación por desplazamiento múltiple en el ARN o en cadenas de ADN sometidas a transcripción inversa a partir del ARN. Una forma útil del método descrito, denominada amplificación por desplazamiento múltiple de transcripción inversa (RT-MDA, por sus siglas en inglés) implica someter el ARN a transcripción inversa, quitar el ARN (preferiblemente mediante digestión de la nucleasa usando una nucleasa específica para el ARN tal como la RNasa H) y amplificar por desplazamiento múltiple el ADN sometido a transcripción inversa. La RT-MDA se puede llevar a cabo usando ya sea el ADNc de cadena doble o usando solo la primera cadena de ADNc. En este último caso, no es necesario, y preferiblemente no lo es, sintetizar la segunda cadena de ADNc. La RT-MDA es útil para el análisis cuantitativo del ARNm o la amplificación general de secuencias de ARNm para cualquier otro propósito.

#### 8. Repetición de amplificación por desplazamiento múltiple

Las operaciones de amplificación por desplazamiento múltiple descritas se pueden combinar también de forma secuencial. Por ejemplo, el producto de la MDA puede amplificarse en sí mismo en otra amplificación por desplazamiento múltiple. En la presente a esto se lo conoce como repetición de amplificación por desplazamiento múltiple (RMDA, por sus siglas en inglés). Esto se puede lograr, por ejemplo, diluyendo las cadenas replicadas luego de la MDA y sometiénolas a una nueva MDA. Esto puede repetirse uno o más veces. Cada ronda de MDA aumentará la amplificación. Se pueden combinar diferentes formas de MDA, tal como WGSDA y MSDA, en secuencias diana particulares. En general, la repetición de la MDA puede lograrse, en primer lugar, poniendo en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo e incubando la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana provoca cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada; y luego diluyendo las cadenas replicadas, poniendo en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y las cadenas replicadas diluidas e incubando las cadenas replicadas en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas adicionales en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas adicionales se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada adicional. Esta forma del método puede extenderse realizando la siguiente operación una o más veces: diluyendo las cadenas replicadas adicionales, poniendo en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y las cadenas replicadas diluidas e incubando las cadenas replicadas en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas adicionales en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas adicionales se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada adicional.

#### 9. Utilización de productos de amplificación por desplazamiento múltiple

Los ácidos nucleicos producidos mediante el uso del método descrito pueden utilizarse para cualquier propósito. Por ejemplo, los ácidos nucleicos amplificados pueden analizarse (por ejemplo, mediante secuenciación o hibridación de sondas) para determinar las características de las secuencias amplificadas o la presencia o ausencia de determinadas secuencias. Los ácidos nucleicos amplificados pueden utilizarse también como reactivos para ensayos u otros métodos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos producidos en el método descrito pueden acoplarse o adherirse a un sustrato de estado sólido. Los ácidos nucleicos inmovilizados resultantes pueden utilizarse como sondas o índices de secuencias en una muestra. Los ácidos nucleicos producidos en el método descrito pueden acoplarse o adherirse a un sustrato de estado sólido de cualquier forma adecuada. Por ejemplo, los ácidos nucleicos generados mediante desplazamiento de cadena múltiple pueden acoplarse agregando nucleótidos modificados a los extremos 3' de los ácidos nucleicos producidos mediante la replicación por desplazamiento de cadena mediante el uso de la desoxinucleotidil transferasa terminal y haciendo reaccionar los nucleótidos modificados con un sustrato o soporte de estado sólido, acoplado así los ácidos nucleicos al sustrato o soporte de estado sólido.

Los ácidos nucleicos producidos en el método descrito se pueden utilizar también como sondas o patrones de hibridación. Por ejemplo, las secuencias de interés pueden amplificarse en el método descrito y proporcionan una fuente disponible de sondas. Las cadenas replicadas (producidas en el método descrito) pueden escindirse antes de usarse como sondas de hibridación. Por ejemplo, las cadenas replicadas pueden escindirse con la DNasa I. Las sondas de hibridación pueden etiquetarse como se describe en otra parte en la presente con respecto al etiquetado de ácidos nucleicos producidos en el método descrito.

Los ácidos nucleicos producidos en el método descrito pueden utilizarse también para la hibridación sustractiva a efectos de identificar secuencias que están presentes solamente en uno de un par o conjunto de muestras. Por ejemplo, el ADNc amplificado de distintas muestras puede hibridarse y el material de cadena doble resultante puede separarse del material monocatenario. Las secuencias no hibridadas serían un signo de secuencias expresadas en una de las muestras, pero no otras.

## Realizaciones específicas

Se describe un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método puede comprender poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. El método puede comprender además etiquetar las cadenas replicadas usando la desoxinucleotidil transferasa terminal.

El método puede comprender además diluir las cadenas replicadas, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y las cadenas replicadas diluidas e incubar las cadenas replicadas en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas adicionales donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas adicionales se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada adicional. Este método puede comprender además realizar la siguiente operación una o más veces: diluir las cadenas replicadas adicionales, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y las cadenas replicadas diluidas e incubar las cadenas replicadas en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas adicionales, donde durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas adicionales se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada adicional. El método puede comprender además incubar la mezcla de muestra objetivo/polimerasa en condiciones que promueven el desplazamiento de cadena. El método puede comprender además poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una segunda muestra objetivo e incubar la segunda muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La segunda muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

Los cebadores pueden tener una longitud de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 5, 6, 7 u 8 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 6, 7 u 8 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 6 nucleótidos. Los cebadores pueden tener cada uno al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la exonucleasa 3'-5'. La ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa del bacteriófago  $\Phi$ 29, la ADN polimerasa Tts, la ADN polimerasa del fago M2, la ADN polimerasa VENT™, el fragmento Klenow de ADN polimerasa I, la ADN polimerasa T5, la ADN polimerasa PRD1, la holoenzima ADN polimerasa T4, Sequenase® T7 de la polimerasa natural T7 o la ADN polimerasa Bst. La ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi$ 29.

Los cebadores pueden tener una longitud de 6 nucleótidos, donde cada uno de los cebadores puede contener al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi$ 29. Las cadenas replicadas pueden etiquetarse mediante la adición de nucleótidos modificados a las cadenas replicadas. Los nucleótidos modificados pueden ser nucleótidos biotinilados, nucleótidos fluorescentes, 5 metil dCTP, BrdUTP, o 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos. Los nucleótidos modificados pueden incorporarse en las cadenas replicadas durante la replicación. Los nucleótidos modificados pueden ser nucleótidos biotinilados, nucleótidos fluorescentes, 5 metil dCTP, BrdUTP, o 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos. Los nucleótidos modificados pueden ser 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos y las cadenas replicadas pueden etiquetarse haciendo reaccionar las etiquetas con las 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridinas incorporadas. Las etiquetas pueden ser isotiocianato de fluoresceína, 5,6-carboximetil fluoresceína, rojo Texas, nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il, cumarina, cloruro de dansilo, rodamina, amino metil cumarina, Eosina, Eritrosina, BODIPY®, Cascade Blue®, Oregon Green®, pireno, lisamina, xanteno, acridina, oxazinas, ficoeritrina, Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5, Cy7 o una combinación de estos.

La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La secuencia diana puede comprender dos cadenas y un conjunto de cebadores puede tener 3 o más cebadores complementarios a una de las cadenas de la secuencia diana y al menos un cebador complementario a la otra cadena de la secuencia diana. El conjunto de cebadores puede tener 3 o más cebadores complementarios a la misma cadena de la secuencia diana. El conjunto de cebadores puede tener 4 o más cebadores complementarios a la misma cadena de la secuencia diana. El conjunto de cebadores puede tener 4 o más cebadores. El conjunto de cebadores puede tener 5 o más cebadores. Las condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana pueden ser sustancialmente isotérmicas. Las condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana no tienen por qué involucrar ciclado térmico. Las condiciones no necesitan incluir ciclado térmico. La secuencia diana puede comprender una diana de amplificación y una diana de hibridación, tal diana de hibridación puede flanquear la diana de amplificación, el conjunto de cebadores puede comprender múltiples cebadores, cada cebador puede comprender una parte complementaria, donde las partes complementarias de los cebadores pueden ser cada una complementarias a una parte diferente de la diana de hibridación.

El conjunto de cebadores puede comprender un conjunto derecho de cebadores y un conjunto izquierdo de

cebadores, la secuencia diana puede ser de cadena doble, con una primera y segunda cadena, la diana de hibridación puede comprender una diana de hibridación derecha e izquierda, donde la diana de hibridación derecha puede flanquear la diana de amplificación en un extremo y la diana de hibridación izquierda puede flanquear la diana de amplificación en el otro extremo. Las partes complementarias de los cebadores del conjunto derecho pueden ser

5 (i) todas complementarias a la primera cadena de la secuencia diana y (ii) cada una complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación derecha y las partes complementarias de los cebadores del conjunto izquierdo pueden ser (i) todas complementarias a la segunda cadena de la secuencia diana y (ii) cada una complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación izquierda.

El conjunto derecho e izquierdo de cebadores pueden tener, cada uno, 3 o más cebadores. El conjunto derecho e izquierdo de cebadores pueden tener, cada uno, 4 o más cebadores. El conjunto derecho e izquierdo de cebadores pueden tener, cada uno, 5 o más cebadores. El conjunto derecho e izquierdo de cebadores pueden tener, cada uno, la misma cantidad de cebadores. La secuencia diana puede ser una muestra de ácido nucleico de complejidad considerable y el conjunto de cebadores puede comprender cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias. La secuencia diana puede ser una muestra de ácido nucleico genómico. Los cebadores pueden tener una longitud de 5 a 20 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 5 a 10 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 6, 7 u 8 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 6 nucleótidos. Todos los cebadores pueden tener la misma longitud. Cada cebador puede comprender una parte constante y una parte aleatoria, donde la parte constante de cada cebador puede tener la misma secuencia de nucleótidos y la parte aleatoria de cada cebador puede tener una secuencia de nucleótidos aleatoria.

La secuencia diana puede ser ADN concatenado. El ADN concatenado puede ser concatenado con enlazadores. Cada enlazador puede comprender una parte complementaria de cebadores, cada cebador puede comprender una parte complementaria y la parte complementaria de cada cebador puede ser complementaria a la parte complementaria de los enlazadores. Los conjuntos de cebadores pueden comprender cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias. Cada cebador puede comprender una parte constante y una parte aleatoria, donde la parte constante de cada cebador puede tener la misma secuencia de nucleótidos y la parte aleatoria de cada cebador puede tener una secuencia de nucleótidos aleatoria. El ADN concatenado puede formarse mediante ligación de fragmentos de ADN juntos. Los fragmentos de ADN pueden ser ADNc elaborados del ARNm. El ARNm puede comprender una mezcla de ARNm aislado de células. La secuencia diana no necesita ser una molécula de ácido nucleico hecha de múltiples repeticiones en tándem de una única secuencia que se sintetizó mediante replicación en círculo rodante.

Los cebadores pueden comprender nucleótidos, donde uno o más de los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos. Entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 50 % de los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos. Aproximadamente 50 % o más de los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos. Todos los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos. Los cebadores pueden comprender nucleótidos, donde uno o más de los nucleótidos pueden ser 2'-O-metil ribonucleótidos. Entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 50 % de los nucleótidos pueden ser 2'-O-metil ribonucleótidos. Aproximadamente 50 % o más de los nucleótidos pueden ser 2'-O-metil ribonucleótidos. Todos los nucleótidos pueden ser 2'-O-metil ribonucleótidos. Los cebadores pueden comprender nucleótidos y los nucleótidos pueden ser una mezcla de ribonucleótidos y 2'-O-metil ribonucleótidos. Los cebadores pueden comprender nucleótidos, tales nucleótidos pueden comprender bases y una o más de las bases pueden ser bases universales. Al menos una de las bases universales puede ser 3-nitropirrol. La base universal puede ser 5-nitroindol. Entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 50 % de las bases pueden ser bases universales. Aproximadamente 50 % o más de las bases pueden ser bases universales. Todas las bases pueden ser bases universales.

La muestra objetivo puede ser una muestra para biopsia, una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra celular o una muestra de tejido. La muestra objetivo es una muestra para biopsia de aspiración con agujas. Los ácidos nucleicos en la muestra objetivo no necesitan ser separados de otro material en la muestra objetivo. La muestra objetivo puede ser un lisado celular en bruto. No es necesario procesar la muestra objetivo más allá de la lisis celular. Se pueden analizar las cadenas replicadas. Las cadenas replicadas se pueden analizar usando uno o más chips de ADN. Las cadenas replicadas se pueden analizar mediante hibridación. Las cadenas replicadas se pueden analizar mediante secuenciación de ácidos nucleicos. Las cadenas replicadas se pueden almacenar antes o después, o tanto antes como después de su análisis. La muestra objetivo puede ser una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de semen, una muestra de líquido linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de líquido amniótico, una muestra para biopsia, una muestra para biopsia aspirativa con aguja, una muestra de cáncer, una muestra tumoral, una muestra de tejidos, una muestra de células, una muestra de lisado celular, una muestra de lisado celular en bruto, una muestra forense, una muestra arqueológica, una muestra de infección, una muestra de infección hospitalaria, una muestra de producción, una muestra de preparación de fármacos, una muestra de producción de moléculas biológicas, una muestra de preparación de proteínas, muestras de preparación de lípidos, una muestra de preparación de carbohidratos o una combinación de estas.

La muestra objetivo puede ser una muestra de sangre. La muestra objetivo puede ser una muestra para biopsia de aspiración con agujas. La muestra objetivo puede ser una muestra de lisado celular en bruto. La muestra objetivo puede ser una muestra de infección hospitalaria. La muestra puede provenir de un paciente. La muestra objetivo

puede ser una muestra de producción de moléculas biológicas. La producción de cadenas replicadas puede indicar la presencia de ácidos nucleicos en la muestra. La cantidad de cadenas replicadas producidas puede indicar la cantidad de ácidos nucleicos en la muestra. La muestra objetivo puede ser una muestra de preparación de fármacos. La muestra objetivo puede ser una muestra tumoral. La muestra objetivo puede ser una muestra de líquido amniótico. Las cadenas replicadas producidas a partir de la muestra objetivo pueden representar una huella dactilar de ácido nucleico de la muestra.

La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo tipo de organismo que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo tipo de tejido que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo organismo que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede obtenerse en un tiempo diferente al de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un organismo diferente al de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un tipo diferente de tejido que la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de una especie diferente de organismo que la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de una cepa diferente del organismo que la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un compartimiento celular diferente a la de la primera muestra objetivo.

Una molécula de ácido nucleico circular puede comprender la secuencia diana. La molécula de ácido nucleico circular puede elaborarse digiriendo el ADN genómico con una endonucleasa de restricción y tomando circular el ADN digerido. El ADN digerido puede tornarse circular con ADN o ARN ligasa. El ADN digerido puede tornarse circular con un férula o adaptador. La secuencia diana puede comprender una diana de amplificación y una diana de hibridación, tal diana de hibridación puede flanquear la diana de amplificación, el conjunto de cebadores puede comprender múltiples cebadores, donde cada cebador puede comprender una parte complementaria y las partes complementarias de los cebadores pueden ser cada una complementarias a una parte diferente de la diana de hibridación.

El conjunto de cebadores puede comprender un conjunto derecho de cebadores y un conjunto izquierdo de cebadores, la secuencia diana puede ser de cadena doble con una primera y segunda cadena, la diana de hibridación puede comprender una diana de hibridación derecha e izquierda, y la diana de hibridación derecha puede flanquear la diana de amplificación en un extremo y la diana de hibridación izquierda puede flanquear la diana de amplificación en el otro extremo. Las partes complementarias de los cebadores del conjunto derecho pueden ser (i) todas complementarias a la primera cadena de la secuencia diana y (ii) cada una complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación derecha y las partes complementarias de los cebadores del conjunto izquierdo pueden ser (i) todas complementarias a la segunda cadena de la secuencia diana (ii) cada una complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación izquierda.

La molécula de ácido nucleico circular puede elaborarse tomando circular el ADNc. La molécula de ácido nucleico circular se elabora tomando circular el híbrido de ARNm/ADNc. El híbrido de ARNm/ADNc puede tornarse circular con ADN o ARN ligasa. El híbrido de ARNm/ADNc puede tornarse circular con una férula o adaptador.

Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. Los ácidos nucleicos en la muestra objetivo no necesitan ser separados de otro material en la muestra objetivo. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

El método puede comprender también poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una segunda muestra objetivo e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La segunda muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

La muestra objetivo puede ser un lisado celular en bruto. No es necesario procesar la muestra objetivo más allá de la lisis celular. La muestra objetivo puede ser una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de semen, una muestra de líquido linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de líquido amniótico, una muestra para biopsia, una muestra para biopsia aspirativa con aguja, una muestra de cáncer, una muestra tumoral, una muestra de tejidos, una muestra de células, una muestra de lisado celular, una muestra de lisado celular en bruto, una muestra forense, una muestra arqueológica, una muestra de infección, una muestra de infección hospitalaria, una muestra de producción, una muestra de preparación de fármacos, una muestra de producción de moléculas biológicas, una muestra de preparación de proteínas, muestras de preparación de lípidos, una muestra de preparación de carbohidratos o una combinación de estas. La muestra objetivo puede ser una muestra de sangre. La muestra objetivo puede ser una muestra para biopsia de aspiración con agujas. La muestra objetivo puede ser una muestra de lisado celular en bruto. La muestra objetivo puede ser una muestra de infección hospitalaria. La muestra puede provenir de un paciente. La muestra objetivo puede ser una muestra de producción de moléculas

biológicas.

5 La producción de cadenas replicadas puede indicar la presencia de ácidos nucleicos en la muestra. La cantidad de cadenas replicadas producidas puede indicar la cantidad de ácidos nucleicos en la muestra. La muestra objetivo puede ser una muestra de preparación de fármacos. La muestra objetivo puede ser una muestra tumoral. La muestra objetivo puede ser una muestra de líquido amniótico. Las cadenas replicadas producidas a partir de la muestra objetivo pueden representar una huella dactilar de ácido nucleico de la muestra.

10 La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo tipo de organismo que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo tipo de tejido que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo organismo que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un organismo diferente a la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un tipo diferente de tejido a la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de una especie diferente de organismo a la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de una cepa diferente del organismo a la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un compartimiento celular diferente a la de la primera muestra objetivo.

20 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo es un lisado celular en bruto. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

25 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. Los cebadores tienen una longitud de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

30 Se describe además un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. Los cebadores contienen cada uno al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

40 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. El cebador-muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, los cebadores tienen una longitud de 6 nucleótidos, donde los cebadores contienen, cada uno, al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa, y la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi 29$ . La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

45 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. El método comprende además diluir las cadenas replicadas, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y las cadenas replicadas diluidas, e incubar las cadenas replicadas en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas adicionales donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas adicionales se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada adicional.

55 Este método puede comprender además realizar la siguiente operación una o más veces: diluir las cadenas replicadas adicionales, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y las cadenas replicadas diluidas e incubar las cadenas replicadas en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas adicionales donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas adicionales se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada adicional.

Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende,

5 (c) mezclar un conjunto de cebadores con una muestra objetivo para producir una mezcla de cebador-muestra objetivo e incubar la mezcla de cebador-muestra objetivo en condiciones que promueven la hibridación entre los cebadores y la secuencia diana en la mezcla de cebadores- muestra objetivo, donde el cebador-muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, y

(d) mezclar la ADN polimerasa con la mezcla de cebador-muestra objetivo para producir una mezcla de polimerasa-muestra objetivo e incubar la mezcla de polimerasa-muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana.

10 El conjunto de cebadores comprende un conjunto derecho de cebadores y un conjunto izquierdo de cebadores, la secuencia diana es de cadena doble, con una primera y una segunda cadena, donde los cebadores del conjunto derecho son todos complementarios a la primera cadena de la secuencia diana y los cebadores del conjunto izquierdo son todos complementarios a la segunda cadena de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. El conjunto derecho de cebadores puede tener 4 o más cebadores y el conjunto izquierdo de cebadores tiene 4 o más cebadores.

Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende,

20 (c) mezclar un conjunto de cebadores con una muestra objetivo para producir una mezcla de cebador-muestra objetivo e incubar la mezcla de cebador-muestra objetivo en condiciones que promueven la hibridación entre los cebadores y la secuencia diana en la mezcla de cebador-muestra objetivo, donde el cebador-muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, y

25 (d) mezclar la ADN polimerasa con la mezcla de cebador-muestra objetivo para producir una mezcla de polimerasa-muestra objetivo e incubar la mezcla de polimerasa-muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana.

30 La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. La secuencia diana es una muestra de ácido nucleico de complejidad considerable, y el conjunto de cebadores comprende cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias.

Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tal método comprende,

35 (c) mezclar un conjunto de cebadores con una muestra objetivo para producir una mezcla de cebador-muestra objetivo e incubar la mezcla de cebador-muestra objetivo en condiciones que promueven la hibridación entre los cebadores y la secuencia diana en la mezcla de cebador-muestra objetivo, donde el cebador-muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, y

(d) mezclar la ADN polimerasa con la mezcla de cebador-muestra objetivo para producir una mezcla de polimerasa-muestra objetivo e incubar la mezcla de polimerasa-muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana.

40 Todos los cebadores en el conjunto de cebadores son complementarios a la misma cadena en la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. El conjunto de cebadores puede tener 3 o más cebadores.

Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende,

45 (c) mezclar un conjunto de cebadores con una muestra objetivo para producir una mezcla de cebador-muestra objetivo e incubar la mezcla de cebador-muestra objetivo en condiciones que promueven la hibridación entre los cebadores y la secuencia diana en la mezcla de cebadores-muestra objetivo, donde el cebador-muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, y

50 (d) mezclar la ADN polimerasa con la mezcla de cebador-muestra objetivo para producir una mezcla de polimerasa-muestra objetivo e incubar la mezcla de polimerasa-muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana.

La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de

otra cadena replicada. La secuencia diana es una muestra de ácido nucleico de complejidad considerable y el conjunto de cebadores comprende cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias. Cada cebador comprende una parte constante y una parte aleatoria, donde la parte constante de cada cebador tiene la misma secuencia de nucleótidos y la parte aleatoria de cada cebador tiene una secuencia de nucleótidos aleatoria.

5 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende,

(c) mezclar un conjunto de cebadores con una muestra objetivo para producir una mezcla de cebador-muestra objetivo e incubar la mezcla de cebador-muestra objetivo en condiciones que promueven la hibridación entre los cebadores y la secuencia diana en la mezcla de cebador-muestra objetivo, donde el cebador-muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización, y

(d) mezclar la ADN polimerasa con la mezcla de cebador-muestra objetivo para producir una mezcla de polimerasa-muestra objetivo e incubar la mezcla de polimerasa-muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana.

15 La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. Las condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana no involucran ciclado térmico y la secuencia diana es ADN concatenado.

20 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. El conjunto de cebadores puede tener 3 o más cebadores complementarios a la misma cadena de la secuencia diana.

25 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. La secuencia diana es una muestra de ácido nucleico de complejidad considerable y el conjunto de cebadores comprende cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias.

35 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. Todos los cebadores en el conjunto de cebadores son complementarios a la misma cadena en la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. El conjunto de cebadores puede tener 3 o más cebadores.

45 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. La secuencia diana es una muestra de ácido nucleico de complejidad considerable y el conjunto de cebadores comprende cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias. Cada cebador comprende una parte constante y una parte aleatoria, donde la parte constante de cada cebador tiene la misma secuencia de nucleótidos y la parte aleatoria de cada cebador tiene una secuencia de nucleótidos aleatoria.

55 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. Las condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana no implican ciclado térmico y la secuencia diana es ADN concatenado.

5 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización térmica. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

10 Se describe también un método para etiquetar ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena, donde el método comprende etiquetar ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena usando la desoxinucleotidil transferasa terminal. Las cadenas replicadas pueden etiquetarse mediante la adición de nucleótidos modificados a los extremos 3' de los ácidos nucleicos. Los nucleótidos modificados pueden ser nucleótidos biotinilados, nucleótidos fluorescentes, 5 metil dCTP, BrdUTP, o 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos.

15 Se describe también un método para etiquetar ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena, donde el método comprende incorporar nucleótidos modificados en los ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena durante la replicación.

20 Se describe también un método para acoplar los ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena, donde el método comprende agregar nucleótidos modificados a los extremos 3' de los ácidos nucleicos producidos mediante la replicación por desplazamiento de cadena usando la desoxinucleotidil transferasa terminal, y hacer reaccionar los nucleótidos modificados con un soporte de estado sólido, acoplando así los ácidos nucleicos al soporte de estado sólido.

Se describe también una micromatriz que comprende los ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena acoplados o adheridos a un sustrato de estado sólido.

25 Se describe también un método para generar sondas de acuerdo con una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. Las cadenas replicadas se utilizan como sondas de hibridación. El método puede comprender además etiquetar las sondas de hibridación usando la desoxinucleotidil transferasa terminal.

30 Se describe además un método para amplificar el ARN mensajero, donde el método comprende someter el ARN mensajero a transcripción inversa para producir una primera cadena del ADNc, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa, y la primera cadena de ADNc, e incubar en condiciones que promueven la replicación de la primera cadena de ADNc. La replicación de la primera cadena de ADNc da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la primera cadena de ADNc mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. El método puede comprender, además, antes de la replicación, degradar el ARN mensajero usando la RNasa H.

40 El método puede comprender además poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La segunda muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

45 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende degradar parcialmente el ARN en una muestra objetivo, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

50 Se describe también un método de hibridación genómica comparativa, donde el método comprende hibridar los ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena de una primera muestra con ácidos nucleicos producidos mediante replicación por desplazamiento de cadena de una segunda muestra. La hibridación se puede realizar en ausencia de ADN CotI.

55 Se describe también un método para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación de la secuencia diana. Una molécula de ácido nucleico circular comprende la secuencia diana. La replicación de la secuencia diana da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada.

El conjunto de cebadores puede comprender cebadores que tienen secuencias de nucleótidos aleatorias. Los cebadores pueden tener una longitud de 5, 6, 7 u 8 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 6, 7 u 8 nucleótidos. Los cebadores pueden tener una longitud de 6 nucleótidos. Los nucleótidos modificados pueden ser nucleótidos biotinilados, nucleótidos fluorescentes, 5 metil dCTP, BrdUTP, o 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos. Los nucleótidos modificados pueden ser 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfatos y las cadenas replicadas pueden etiquetarse haciendo reaccionar las etiquetas con las 5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridinas incorporadas. Las etiquetas pueden ser isotiocianato de fluoresceína, 5,6-carboximetil fluoresceína, rojo Texas, nitrobenz2-oxa-1,3-diazol-4-il, cumarina, cloruro de dansilo, rodamina, aminometil cumarina, Eosina, Eritrosina, BODIPY®, Cascade Blue®, Oregon Green®, pireno, lisamina, xanteno, acridina, oxazinas, ficoeritrina, Cy3, Cy3,5, Cy5, Cy5,5, Cy7 o una combinación de estos.

Las cadenas replicadas pueden utilizarse como elementos en una micromatriz. Las cadenas replicadas pueden escindirse antes de usarse como sondas de hibridación. Las cadenas replicadas pueden escindirse con DNAsa I. Las sondas de hibridación pueden etiquetarse mediante la adición de nucleótidos modificados a los extremos 3' de las cadenas replicadas. Los nucleótidos modificados pueden hacerse reaccionar con un soporte de estado sólido, acoplado así las cadenas replicadas al soporte de estado sólido.

La muestra objetivo puede ser una muestra de sangre, una muestra de orina, una muestra de semen, una muestra de líquido linfático, una muestra de líquido cefalorraquídeo, una muestra de líquido amniótico, una muestra para biopsia, una muestra para biopsia aspirativa con aguja, una muestra de cáncer, una muestra tumoral, una muestra de tejido, una muestra de células, una muestra de lisado celular, una muestra de lisado celular en bruto, una muestra forense, una muestra arqueológica, una muestra de infección, una muestra de infección hospitalaria, una muestra de producción, una muestra de preparación de fármacos, una muestra de producción de moléculas biológicas, una muestra de preparación de proteínas, muestras de preparación de lípidos, una muestra de preparación de carbohidratos o una combinación de estas. La muestra objetivo puede ser una muestra de sangre. La muestra objetivo es una muestra para biopsia de aspiración con agujas. La muestra objetivo puede ser una muestra de lisado celular en bruto. La muestra objetivo puede ser una muestra de infección hospitalaria. La muestra puede contener tanto ácidos nucleicos humanos como no humanos. El ácido nucleico no humano puede amplificarse preferentemente mediante el uso de cebadores específicos para el ácido nucleico no humano. El ácido nucleico humano puede amplificarse preferentemente mediante el uso de cebadores específicos para el ácido nucleico humano. La muestra puede provenir de un paciente. La muestra objetivo puede ser una muestra de producción de moléculas biológicas. La producción de cadenas replicadas puede indicar la presencia de ácidos nucleicos en la muestra. La cantidad de cadenas replicadas producidas puede indicar la cantidad de ácidos nucleicos en la muestra. La muestra objetivo puede ser una muestra de preparación de fármacos. La muestra objetivo puede ser una muestra tumoral. La muestra objetivo puede ser una muestra de líquido amniótico. Las cadenas replicadas producidas a partir de la muestra objetivo pueden representar una huella dactilar de ácido nucleico de la muestra.

La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo tipo de organismo que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo tipo de tejido que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra del mismo organismo que la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede obtenerse en un tiempo diferente al de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un organismo diferente a la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un tipo diferente de tejido a la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de una especie diferente de organismo que la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de una cepa diferente del organismo que la de la primera muestra objetivo. La segunda muestra objetivo puede ser una muestra de un compartimiento celular diferente a la de la primera muestra objetivo.

La molécula de ácido nucleico circular puede elaborarse digiriendo el ADN genómico con una endonucleasa de restricción y tomando circular el ADN digerido. El ADN digerido puede tomarse circular con ADN o ARN ligasa. El ADN digerido puede tornarse circular con una férula o adaptador. La secuencia diana puede comprender una diana de amplificación y una diana de hibridación, tal diana de hibridación puede flanquear la diana de amplificación, el conjunto de cebadores puede comprender múltiples cebadores, donde cada cebador puede comprender una parte complementaria y las partes complementarias de los cebadores pueden ser cada una complementarias a una parte diferente de la diana de hibridación.

El conjunto de cebadores puede comprender un conjunto derecho de cebadores y un conjunto izquierdo de cebadores, la secuencia diana puede ser de cadena doble, con una primera y segunda cadena, la diana de hibridación puede comprender una diana de hibridación derecha e izquierda, donde la diana de hibridación derecha puede flanquear la diana de amplificación en un extremo y la diana de hibridación izquierda puede flanquear la diana de amplificación en el otro extremo. Las partes complementarias de los cebadores del conjunto derecho pueden ser (i) todas complementarias a la primera cadena de la secuencia diana y (ii) cada una complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación derecha y las partes complementarias de los cebadores del conjunto izquierdo pueden ser (i) todas complementarias a la segunda cadena de la secuencia diana y (ii) cada una complementaria a una parte diferente de la diana de hibridación izquierda.

La molécula de ácido nucleico circular puede elaborarse tornando circular el ADNc. La molécula de ácido nucleico circular puede elaborarse tornando circular el híbrido de ARNm/ADNc. El híbrido de ARNm/ADNc puede tornarse circular con ADN o ARN ligasa. El híbrido de ARNm/ADNc puede tomarse circular con una férula o adaptador.

5 Se describe también un método para amplificar un genoma completo, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, donde la muestra objetivo comprende un genoma completo, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación del genoma. La muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante la replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. Los cebadores pueden tener una longitud de 6 nucleótidos, donde cada uno de los cebadores puede contener al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi 29$ . Los cebadores pueden ser de una composición de nucleótidos aleatoria, donde cada uno de los cebadores puede contener al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi 29$ .

15 Se describe también un método para amplificar un cromosoma, donde el método comprende poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y una muestra objetivo, donde la muestra objetivo comprende un cromosoma, e incubar la muestra objetivo en condiciones que promueven la replicación del cromosoma, donde la muestra objetivo no se somete a condiciones de desnaturalización. La replicación del cromosoma da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del cromosoma mediante la replicación por desplazamiento de cadena o de otra cadena replicada. Los cebadores pueden tener una longitud de 6 nucleótidos, donde cada uno de los cebadores puede contener al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi 29$ . Los cebadores pueden ser de una composición de nucleótidos aleatoria, donde cada uno de los cebadores puede contener al menos un nucleótido modificado de modo que los cebadores son resistentes a la nucleasa y la ADN polimerasa puede ser la ADN polimerasa  $\Phi 29$ .

20 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, donde el lisado celular comprende un genoma completo, neutralizar el lisado celular para formar un lisado celular neutralizado, e incubar el lisado celular neutralizado en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

25 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, neutralizar el lisado celular, en donde el lisado celular no está purificado, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

30 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, neutralizar el lisado celular, en donde los ácidos nucleicos en el lisado celular no se separan de otro material en el lisado celular, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

35 Asimismo, se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, neutralizar el lisado celular para formar un lisado celular neutralizado e incubar el lisado celular neutralizado en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde el lisado celular neutralizado no se somete a condiciones de desnaturalización, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

40 Se describen también métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, neutralizar el lisado celular para formar un lisado celular neutralizado e incubar el lisado celular neutralizado en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde el lisado celular neutralizado se somete a condiciones de desnaturalización térmica, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

45 Se describen también métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, neutralizar el lisado celular para

5 formar un lisado celular neutralizado, en donde los ácidos nucleicos en el lisado celular neutralizado no se separan de otro material en el lisado celular, e incubar el lisado celular neutralizado en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde el lisado celular neutralizado no se somete a condiciones de desnaturalización, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

10 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, neutralizar el lisado celular para formar un lisado celular neutralizado y poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y el lisado celular neutralizado, en donde el lisado celular neutralizado comprende un genoma completo, e incubar el lisado celular neutralizado en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

15 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, neutralizar el lisado celular, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y el lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, en donde el lisado celular no está purificado, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

20 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, neutralizar el lisado celular, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y el lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, en donde los ácidos nucleicos en el lisado celular no se separan de otro material en el lisado celular, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

25 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, neutralizar el lisado celular para formar un lisado celular neutralizado y poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y el lisado celular neutralizado, en donde el lisado celular neutralizado comprende un genoma completo, e incubar el lisado celular neutralizado en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde el lisado celular neutralizado no se somete a condiciones de desnaturalización, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

30 Se describen también métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, neutralizar el lisado celular para formar un lisado celular neutralizado y poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y el lisado celular neutralizado, en donde el lisado celular neutralizado comprende un genoma completo, e incubar el lisado celular neutralizado en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde el lisado celular neutralizado se somete a condiciones de desnaturalización térmica, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

35 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, neutralizar el lisado celular para formar un lisado celular neutralizado y poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y el lisado celular neutralizado, en donde el lisado celular neutralizado comprende un genoma completo, en donde los ácidos nucleicos en el lisado celular neutralizado no se separan de otro material en el lisado celular neutralizado, e incubar el lisado celular neutralizado en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde el lisado celular neutralizado no se somete a condiciones de desnaturalización, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

40 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, neutralizar el lisado celular para formar un lisado celular neutralizado y poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y el lisado celular neutralizado, en donde el lisado celular neutralizado comprende un genoma completo, e incubar el lisado celular neutralizado en presencia de un conjunto de cebadores y ADN polimerasa, y en condiciones que promueven la replicación de una secuencia diana, en donde la replicación del lisado celular neutralizado da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

45 Se describen métodos para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tales métodos comprenden lisar



neutralizado da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

5 Se describen métodos para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, neutralizar el lisado celular para formar un lisado celular neutralizado y poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y el lisado celular neutralizado, e incubar el lisado celular neutralizado en condiciones que promueven la replicación de una secuencia diana, en donde el lisado celular neutralizado se somete a condiciones de desnaturalización térmica, en donde la replicación del lisado celular neutralizado da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

15 Se describen métodos para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, neutralizar el lisado celular para formar un lisado celular neutralizado y poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y el lisado celular neutralizado, e incubar el lisado celular neutralizado en condiciones que promueven la replicación de una secuencia diana, en donde los ácidos nucleicos en el lisado celular neutralizado no se separan de otro material en el lisado celular neutralizado, en donde el lisado celular neutralizado no se somete a condiciones de desnaturalización, en donde la replicación del lisado celular neutralizado da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

20 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

25 Se describen también métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, en donde el lisado celular no está purificado, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

30 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, en donde los ácidos nucleicos en el lisado celular no se separan de otro material en el lisado celular, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

35 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde el lisado celular no se somete a condiciones de desnaturalización, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

40 Se describen también métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde el lisado celular se somete a condiciones de desnaturalización térmica, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

45 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, en donde los ácidos nucleicos en el lisado celular no se separan de otro material en el lisado celular, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde el lisado celular no se somete a condiciones de desnaturalización, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

50 Se describen también métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y el lisado celular, en



polimerasa, y en condiciones que promueven la replicación de una secuencia diana, en donde el lisado celular no se somete a condiciones de desnaturalización, en donde la replicación del lisado celular da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

5 Se describen también métodos para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, e incubar el lisado celular en presencia de un conjunto de cebadores y ADN polimerasa, y en condiciones que promueven la replicación de una secuencia diana, en donde el lisado celular se somete a condiciones de desnaturalización térmica, en donde la replicación del lisado celular da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

10 Se describen métodos para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, e incubar el lisado celular en presencia de un conjunto de cebadores y ADN polimerasa, y en condiciones que promueven la replicación de una secuencia diana, en donde los ácidos nucleicos en el lisado celular no se separan de otro material en el lisado celular, en donde el lisado celular no se somete a condiciones de desnaturalización, en donde la replicación del lisado celular da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

15 Se describen métodos para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y lisado celular, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación de una secuencia diana, en donde la replicación del lisado celular da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

20 Se describen métodos para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y lisado celular, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación de una secuencia diana, en donde el lisado celular no está purificado, en donde la replicación del lisado celular da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

25 Se describen métodos para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y lisado celular, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación de una secuencia diana, en donde los ácidos nucleicos en el lisado celular no se separan de otro material en el lisado celular, en donde la replicación del lisado celular da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

30 Se describen métodos para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y lisado celular, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación de una secuencia diana, en donde el lisado celular no se somete a condiciones de desnaturalización, en donde la replicación del lisado celular da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

35 Se describen métodos para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y el lisado celular, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación de una secuencia diana, en donde el lisado celular se somete a condiciones de desnaturalización térmica, en donde la replicación del lisado celular da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

40 Se describen métodos para amplificar una secuencia de ácido nucleico diana, tales métodos comprenden lisar células para formar un lisado celular, poner en contacto un conjunto de cebadores, la ADN polimerasa y e lisado celular, e incubar el lisado celular en condiciones que promueven la replicación de una secuencia diana, en donde los ácidos nucleicos en el lisado celular no se separan de otro material en el lisado celular, en donde el lisado celular no se somete a condiciones de desnaturalización, en donde la replicación del lisado celular da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación al menos una de las cadenas replicadas se desplaza de la secuencia diana mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

45 Es posible llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos, en donde el lisado celular neutralizado no se somete a condiciones de desnaturalización o en donde el lisado celular neutralizado se somete a condiciones de desnaturalización térmica.

Se describen kits para amplificar un genoma completo, tales kits comprenden una solución para la lisis, una solución para la neutralización, un conjunto de cebadores y una ADN polimerasa.

Se describen también kits para amplificar un genoma completo, tales kits comprenden una solución para la lisis celular, una solución para la neutralización de un lisado celular, un conjunto de cebadores y una ADN polimerasa.

- 5 Se describen kits para amplificar un genoma completo, tales kits comprenden una solución para lisar células, una solución para neutralizar células lisadas, un conjunto de cebadores y una ADN polimerasa.

Se describen también kits para amplificar un genoma completo, tales kits comprenden una composición para la lisis, una composición para la neutralización, un conjunto de cebadores y una ADN polimerasa.

- 10 Se describen kits para amplificar un genoma completo, tales kits comprenden una composición para la lisis celular, una composición para la neutralización de un lisado celular, un conjunto de cebadores y una ADN polimerasa.

Se describen kits para amplificar un genoma completo, tales kits comprenden una composición para lisar células, una solución para neutralizar células lisadas, un conjunto de cebadores y una ADN polimerasa.

- 15 Se describen kits para amplificar un genoma completo, tales kits comprenden una solución para la lisis, en donde la solución para la lisis es alcalina, una solución para la neutralización, un conjunto de cebadores, en donde los cebadores tienen una longitud de 6 nucleótidos, en donde los cebadores contienen cada uno al menos un nucleótido modificado de tal manera que los cebadores son resistentes a la nucleasa y una ADN polimerasa, en donde la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi 29$ .

- 20 Se describen kits para amplificar un genoma completo, tales kits comprenden una solución para la lisis celular, en donde la solución para la lisis celular es alcalina, una solución para la neutralización de un lisado celular, un conjunto de cebadores, en donde los cebadores tienen una longitud de 6 nucleótidos, en donde los cebadores contienen cada uno al menos un nucleótido modificado de tal manera que los cebadores son resistentes a la nucleasa y una ADN polimerasa, en donde la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi 29$ .

- 25 Se describen también kits para amplificar un genoma completo, tales kits comprenden una solución para lisar células, en donde la solución para lisar células es alcalina, una solución para neutralizar las células lisadas, un conjunto de cebadores, en donde los cebadores tienen una longitud de 6 nucleótidos, en donde los cebadores contienen cada uno al menos un nucleótido modificado de tal manera que los cebadores son resistentes a la nucleasa y una ADN polimerasa, en donde la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi 29$ .

- 30 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden exponer células a condiciones alcalinas para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, reducir el pH del lisado celular para formar un lisado celular estabilizado, e incubar el lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la replicación del genoma completo, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

- 35 Se describen también métodos, en donde las células son expuestas a condiciones alcalinas mezclando las células con una solución de lisis, o en donde la solución de lisis comprende una base o en donde la base es una base acuosa.

- 40 Se describen también métodos, en donde la base es hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, acetato de potasio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de calcio, amoníaco, anilina, bencilamina, n-butilamina, dietilamina, dimetilamina, difenilamina, etilamina, etilendiamina, metilamina, N-metilnilina, morfina, piridina, trietilamina, trimetilamina, hidróxido de aluminio, hidróxido de rubidio, hidróxido de cesio, hidróxido de estroncio, hidróxido de bario o DBU (1,8-diazobicyclo[5,4,0]undec-7-eno).

Se describen métodos, en donde la base es hidróxido de potasio.

- 45 Se describen también métodos, en donde la solución de lisis comprende 400 Mm de KOH y/o en donde la solución de lisis comprende 100 mM de ditiotriitol y 10 mM de EDTA o en donde la solución de lisis consiste en 400 Mm de KOH, 100 mM de ditiotriitol y 10 mM de EDTA.

Se describen métodos, en donde la solución de lisis comprende múltiples agentes básicos y/o en donde las células se mezclan con un volumen igual de solución de lisis.

- 50 Se describen métodos, en donde la solución de lisis comprende un tampón, así como también métodos en donde el tampón es un tampón de fosfato, tampón Good, BES, BICINE, CAPS, EPPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, TAPS, TES, TRICINE, cacodilato de sodio, citrato de sodio, acetato de trietilamonio, bicarbonato de trietilamonio, Tris, Bis-tris o Bis-tris propano. Se describen también métodos, en donde el tampón es Tris-HCl a pH 4,1. Los métodos descritos pueden comprender múltiples agentes amortiguadores.

Se describen también métodos en donde el pH del lisado celular se reduce hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 6,8.

5 Se describen también métodos, en donde el pH del lisado celular se reduce mezclando el lisado celular con una solución de estabilización. Se describen métodos en donde la solución de estabilización comprende 800 mM de Tris-HCl, pH 4,1, así como también métodos, en donde la solución de estabilización comprende múltiples agentes amortiguadores y/o en donde el lisado celular se mezcla con un volumen igual de la solución de estabilización.

10 Se describen métodos en donde la solución de estabilización comprende un ácido, así como también métodos, en donde el ácido es ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido nítrico, ácido perclórico, HF, HBr, HI, H<sub>2</sub>S, HCN, HSCN, HClO, ácido monocloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético o un ácido carboxílico. Se describen métodos en donde el ácido carboxílico es ácido etanoico, propanoico o butanoico. Se describen métodos, en donde la solución de estabilización comprende múltiples agentes ácidos.

Se describen métodos, en donde el pH de lisado celular se reduce a aproximadamente pH 9,0 o menos, aproximadamente pH 8,5 o menos, aproximadamente pH 8,0 o menos, o aproximadamente pH 7,5 o menos.

15 Se describen también métodos en donde el pH del lisado celular se reduce hasta el intervalo de aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 7,0, a aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 7,5, pH 9,0 a aproximadamente pH 8,0, pH 8,5 a aproximadamente pH 6,0, pH 8,5 a aproximadamente pH 7,0, pH 8,5 a aproximadamente pH 7,5, pH 8,5 a aproximadamente pH 8,0, pH 8,0 a aproximadamente pH 6,0, pH 8,0 a aproximadamente pH 6,5, pH 8,0 a aproximadamente pH 7,0, pH 8,0 a aproximadamente pH 7,5, pH 7,5 a aproximadamente pH 6,0 o pH 7,5 a aproximadamente pH 7,0.

20 Se describen métodos, en donde los ácidos nucleicos en el lisado celular y el lisado celular estabilizado no se separan de otro material en el lisado celular, en donde el lisado celular y el lisado celular estabilizado no se someten a purificación antes de la incubación, en donde la purificación comprende la separación de ácidos nucleicos en el lisado celular de otro material en el lisado celular, en donde la purificación comprende centrifugación, extracción, 25 cromatografía, filtración, diálisis o una combinación de estas, en donde la purificación comprende la precipitación que no sea la precipitación provocada por las condiciones alcalinas o por la reducción del pH, en donde la purificación comprende centrifugación, extracción con cloroformo-fenol, cromatografía en columna o una combinación de estas, en donde el lisado celular, el lisado celular estabilizado o ambos se someten a una purificación parcial antes de la incubación, en donde la purificación parcial comprende centrifugación, extracción, 30 cromatografía, precipitación, filtración, diálisis o una combinación de estas, en donde la purificación parcial comprende centrifugación, extracción con cloroformo-fenol, cromatografía en columna o una combinación de estas, en donde el lisado celular y el lisado celular estabilizado no se someten a una purificación sustancial antes de la incubación, en donde la purificación sustancial no incluye centrifugación, extracción, cromatografía, precipitación, 35 filtración o diálisis, en donde la purificación sustancial no incluye centrifugación, extracción con cloroformo-fenol o cromatografía en columna, en donde el lisado celular, el lisado celular estabilizado o ambos se someten a centrifugación, extracción, cromatografía, precipitación, filtración o diálisis antes de la incubación, en donde el lisado celular, el lisado celular estabilizado o ambos se someten a centrifugación, extracción con cloroformo-fenol o cromatografía en columna antes de la incubación, en donde la purificación sustancial comprende centrifugación, extracción, cromatografía, precipitación, filtración, diálisis o una combinación de estas, en donde la purificación 40 sustancial comprende precipitación que no sea la precipitación provocada por las condiciones alcalinas o por la reducción del pH, en donde la purificación sustancial comprende centrifugación, extracción con cloroformo-fenol, cromatografía en columna o una combinación de estas, en donde el lisado celular y el lisado celular estabilizado no se purifican antes de la incubación, en donde el lisado celular, el lisado celular estabilizado o ambos se purifican parcialmente antes de la incubación, en donde la incubación es sustancialmente isotérmica, en donde ni el lisado celular ni el lisado celular estabilizado se calienta sustancialmente por encima de la temperatura de la incubación, en donde ni el lisado celular ni el lisado celular estabilizado se somete a un calentamiento sustancial por encima de la temperatura de la incubación, en donde las células no se calientan sustancialmente por encima de la temperatura de la incubación, en donde las células no se someten al calentamiento sustancial por encima de la temperatura de la incubación, en donde las células no se calientan sustancialmente por encima de la temperatura en la que crecen las células, en donde las células no se someten al calentamiento sustancial por encima de la temperatura en la cual crecen las células, en donde el lisado celular, el lisado celular estabilizado y las células no se calientan sustancialmente por encima de la temperatura de la incubación, en donde el lisado celular, el lisado celular estabilizado y las células no se someten al calentamiento sustancial por encima de la temperatura de la incubación, en donde el lisado celular, el lisado celular estabilizado y las células no se someten, antes o durante la incubación, al calentamiento sustancial por encima de la temperatura en la que crecen las células antes, en donde ni el lisado celular ni el lisado celular estabilizado se calienta por encima de la temperatura y durante un tiempo que provocaría la desnaturalización destacada del genoma, en donde ni el lisado celular ni el lisado celular estabilizado se somete al calentamiento por encima de una temperatura y durante un tiempo que provocaría la desnaturalización destacada del genoma, en donde las células no se lisan mediante calor, en donde las células no se calientan por encima de una temperatura y

durante un tiempo que provocaría lisis celular sustancial en ausencia de las condiciones alcalinas, y/o en donde las células no se someten al calentamiento por encima de una temperatura y durante un tiempo que provocaría lisis celular sustancial en ausencia de las condiciones alcalinas.

5 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden exponer células a condiciones alcalinas para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, en donde las células se exponen a condiciones alcalinas mezclando las células con una solución de lisis, reduciendo el pH del lisado celular para formar un lisado celular estabilizado, en donde el pH del lisado celular se reduce mezclando el lisado celular con una solución de estabilización e incubando el lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

Se describen métodos, en donde la solución de lisis comprende hidróxido de potasio, tal como 400 mM de KOH.

15 Se describen también métodos, en donde la solución de lisis comprende 400 mM de KOH, 100 mM de ditioneol y 10 mM de EDTA o en donde la solución de lisis consiste en 400 mM de KOH, 100 mM de ditioneol y 10 mM de EDTA.

Se describen métodos en donde las células se mezclan con un volumen igual de la solución de lisis y/o un volumen igual de la solución de estabilización.

Se describen métodos en donde la solución de estabilización comprende Tris-HCl a pH 4,1 y en donde la solución de estabilización comprende 800 mM de Tris-HCl, pH 4,1.

20 Se describen también métodos en donde la solución de estabilización consiste en 800 mM de Tris-HCl, pH 4,1.

Se describen métodos, en donde la solución de lisis consiste en 400 mM de KOH y 10 Mm de EDTA, en donde la solución de estabilización consiste en 800 mM de Tris-HCl, pH 4, en donde el lisado celular estabilizado se incuba en presencia de 37,5 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM de desoxinucleótidos trifosfatos, 50 μM de cebadores y ADN polimerasa Φ29.

25 Se describen también métodos, en donde el lisado celular estabilizado se incuba en presencia 37,5 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 Mm de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM de desoxinucleótidos trifosfatos, 50 μM de cebadores y ADN polimerasa Φ29 mezclando el lisado celular estabilizado con un cuarto volumen de mezcla de reacción, y ADN polimerasa Φ29, en donde la mezcla de reacción consiste en 150 mM de Tris-HCl, 200 mM de KCl, 40 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 mM de desoxinucleótidos trifosfatos y 0,2 Mm de cebadores.

30 Se describen métodos para amplificar un genoma completo, tales métodos comprenden exponer células a condiciones alcalinas para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, en donde las células se exponen a condiciones alcalinas mezclando las células con una solución de lisis, en donde la solución de lisis comprende 400 mM de KOH, 100 mM de ditioneol y 10 Mm de EDTA, reduciendo el pH del lisado celular para formar un lisado celular estabilizado, en donde el pH del lisado celular se reduce mezclando el lisado celular con una solución de estabilización, en donde la solución de estabilización comprende 800 mM de Tris-HCl, pH 4,1, e incubando el lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

40 Se describen métodos en donde las células se mezclan con un volumen igual de la solución de lisis y/o el lisado celular se mezcla con un volumen igual de la solución de estabilización.

Se describen kits para amplificar un genoma completo, tales kits comprenden una solución de lisis, una solución de estabilización, un conjunto de cebadores y una ADN polimerasa.

Se describen kits en donde la solución de lisis comprende hidróxido de potasio, tal como 400 mM de KOH.

45 Se describen también kits en donde la solución de lisis comprende 400 mM de KOH, 100 mM de ditioneol y 10 mM de EDTA.

Se describen kits en donde la solución de estabilización comprende Tris-HCl a pH 4,1, en donde la solución de estabilización comprende 800 mM de Tris-HCl, pH 4,1, o en donde la solución de estabilización consiste en 800 mM de Tris-HCl, pH 4,1.

50 Se describen kits que comprenden desoxinucleótidos trifosfatos.

Se describen kits que comprenden ditioneol 1M, 1X solución salina tamponada con fosfato, pH 7,5 y plantilla de ADN de control, en donde la solución de lisis comprende 400 mM de KOH y 10 mM de EDTA, en donde la solución de estabilización comprende 800 mM de Tris- HCl, pH 4, en donde el conjunto de cebadores comprende una mezcla

de reacción, en donde la mezcla de reacción comprende 150 mM de Tris-HCl, 200 mM de KCl, 40 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 mM de desoxinucleótidos trifosfatos y 0,2 mM de cebadores hexámeros aleatorios, en donde la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi$ 29.

5 Se describen kits que comprenden una o más sondas de detección, en donde las sondas de detección comprenden, cada una, una parte complementaria, en donde la parte complementaria es complementaria a una secuencia de ácido nucleico de interés.

Se describen kits, en donde el kit está diseñado para detectar secuencias de ácido nucleico de interés en el genoma y/o kits en donde el kit está diseñado para evaluar una enfermedad, afección o predisposición de un individuo de acuerdo con las secuencias de ácido nucleico de interés.

10 Se describen métodos para amplificar el ADN dañado, tal método comprende exponer una muestra de ADN dañado a condiciones que promueven la desnaturalización sustancial del ADN dañado en la muestra de ADN dañado, formando así una muestra de ADN dañado desnaturalizado, alterar las condiciones a condiciones que no promueven la desnaturalización sustancial del ADN dañado en la muestra de ADN dañado para formar una muestra de ADN dañado estabilizado, incubar el ADN dañado en la muestra de ADN dañado estabilizado en condiciones que promueven la replicación del ADN dañado, en donde la replicación del ADN dañado provoca una longitud promedio del fragmento más larga para el ADN dañado replicado que la longitud promedio del fragmento en la muestra de ADN dañado, en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza mediante desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

20 Se describen métodos, en donde la muestra de ADN dañado, la muestra de ADN dañado desnaturalizado o ambas se exponen a condiciones iónicas, en donde la muestra de ADN dañado y la muestra de ADN dañado desnaturalizado se exponen a condiciones iónicas mezclando una solución iónica con la muestra de ADN dañado, en donde la solución iónica se mezcla con la muestra de ADN dañado antes o durante la exposición de la muestra de ADN dañado a condiciones que promueven la desnaturalización sustancial del ADN dañado, en donde la solución iónica es una solución salina, en donde la solución salina comprende una o más sales, en donde la sal es Tris-HCl, Tris-EDTA, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de magnesio o una combinación, en donde el Tris-HCl es de pH 7,0 a 8,0, en donde la sal es Tris-EDTA, en donde la solución salina comprende aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM de Tris y aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM de EDTA, en donde la solución iónica se diluye 2 a 5 veces cuando se mezcla con la muestra de ADN dañado, en donde la muestra de ADN dañado desnaturalizado se expone a condiciones iónicas mezclando la solución iónica con la muestra de ADN dañado desnaturalizado, en donde la solución iónica se mezcla con la muestra de ADN dañado desnaturalizado antes o durante la alteración de las condiciones, en donde la muestra de ADN dañado se expone a condiciones que promueven la desnaturalización sustancial mezclando la muestra de ADN dañado con una solución de desnaturalización y calentando la muestra de ADN dañado a una temperatura y durante un período de tiempo que desnaturaliza sustancialmente el ADN dañado en la muestra de ADN dañado, en donde la muestra de ADN dañado se mezcla con la solución de desnaturalización luego que se calentó la muestra de ADN, en donde la muestra de ADN dañado se mezcla con la solución de desnaturalización antes de calentar la muestra de ADN, en donde la muestra de ADN dañado se mezcla con la solución de desnaturalización al mismo tiempo que se calienta la muestra de ADN, en donde la muestra de ADN dañado se mezcla con la solución de desnaturalización durante el calentamiento de la muestra de ADN, en donde la muestra de ADN dañado se mezcla con la solución de desnaturalización cuando comienza el calentamiento de la muestra de ADN y/o en donde mezclar la muestra de ADN dañado con una solución de desnaturalización produce condiciones alcalinas en la muestra de ADN dañado.

45 Se describen métodos en donde la solución de desnaturalización comprende una base, en donde la base es una base acuosa, en donde la base es hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, acetato de potasio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de calcio, amoníaco, anilina, bencilamina, n-butilamina, dietilamina, dimetilamina, difenilamina, etilamina, etilendiamina, metilamina, N-metilnilina, morfolina, piridina, trietilamina, trimetilamina, hidróxido de aluminio, hidróxido de rubidio, hidróxido de cesio, hidróxido de estroncio, hidróxido de bario o DBU (1,8-diazobicyclo[5,4,0]undec-7-ena), en donde la base es hidróxido de sodio, en donde la solución de desnaturalización comprende aproximadamente 150 mM a aproximadamente 1 M NaOH.

50 Se describen métodos en donde la solución de desnaturalización es una concentración de 10X, en donde la muestra de ADN dañado se mezcla con la solución de desnaturalización para crear una concentración 1X y/o en donde las condiciones alcalinas comprenden de 15 a 50 mM de NaOH.

55 Se describen métodos, en donde el ADN dañado en la muestra de ADN dañado se desnaturaliza sustancialmente sin dañar adicionalmente el ADN, en donde la muestra de ADN dañado se calienta a una temperatura de aproximadamente 70 °C o menos y durante un período de tiempo de aproximadamente 5 minutos o menos, en donde la temperatura es de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 70 °C, en donde la temperatura es de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C, en donde la temperatura es de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C, en donde la temperatura es de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, en donde la temperatura es de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 70 °C y el período de tiempo es

aproximadamente 3 minutos y/o en donde la temperatura es de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 50 °C y el período de tiempo es de aproximadamente 5 minutos o más.

5 Se describen métodos en donde alterar las condiciones comprende reducir el pH y enfriar la muestra de ADN dañado desnaturalizado, en donde la temperatura a la que se calienta la muestra de ADN dañado se mantiene durante la reducción del pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado, en donde la temperatura a la que se calienta el ADN dañado se reduce antes de la reducción del pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado y/o en donde la temperatura a la que se calienta el ADN dañado se reduce durante la reducción del pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado.

10 Se describen métodos en donde el enfriamiento de la muestra de ADN dañado desnaturalizado se inicia durante la reducción del pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado, en donde el enfriamiento de la muestra de ADN dañado desnaturalizado se inicia cuando se reduce el pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado.

Se describen métodos en donde el pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado se reduce mezclando la muestra de ADN dañado desnaturalizado con una solución de estabilización.

15 Se describen métodos en donde el pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado se reduce hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,5 a aproximadamente pH 8,0.

Se describen métodos en donde el pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado se reduce mezclando la muestra de ADN dañado desnaturalizado con una solución de estabilización.

20 Se describen métodos en donde la solución de estabilización comprende un tampón y/o en donde el tampón es tampón de fosfato, tampón Good, BES, BICINE, CAPS, EPPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, TAPS, TES, TRICINE, cacodilato de sodio, citrato de sodio, acetato de trietilamonio, bicarbonato de trietilamonio, Tris, Bis- tris o Bis-tris propano.

Se describen métodos en donde la solución de estabilización comprende 800 mM de Tris-HCl, pH 4,1.

Se describen métodos en donde la solución de estabilización comprende un ácido.

25 Se describen métodos en donde el ácido es ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido nítrico, ácido perclórico, HF, HBr, HI, H<sub>2</sub>S, HCN, HSCN, HClO, ácido monocloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético o un ácido carboxílico.

Se describen métodos en donde el ácido carboxílico es ácido etanoico, propanoico o butanoico.

Se describen métodos en donde la solución de estabilización comprende múltiples agentes ácidos.

30 Se describen métodos en donde el pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado se reduce hasta el intervalo de aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 6,8, aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 7,5, aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 8,0, aproximadamente pH 8,5 a aproximadamente pH 6,8, aproximadamente pH 8,5 a aproximadamente pH 7,5, aproximadamente pH 8,5 a aproximadamente pH 8,0, aproximadamente pH 8,0 a aproximadamente pH 6,8, aproximadamente pH 8,0 a aproximadamente pH 7,5.

35 Se describen métodos en donde el pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado se reduce a aproximadamente pH 9,0 o menos, aproximadamente pH 8,5 o menos, aproximadamente pH 8,0 o menos, aproximadamente pH 7,5 o menos.

Se describen métodos, en donde la solución de estabilización comprende una o más sales.

40 Se describen métodos, en donde la sal es Tris-HCl, Tris-EDTA, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de magnesio o una combinación.

Se describen métodos en donde el Tris-HCl es de pH 7,0 a 8,0.

Se describen métodos en donde la sal es Tris-EDTA.

Se describen métodos en donde la solución de estabilización comprende aproximadamente 50 nM a aproximadamente 500 mM de Tris y aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM de EDTA.

45 Se describen métodos en donde la mezcla de ADN dañado se enfría a una velocidad de aproximadamente 1 °C por minuto o menos.

Se describen métodos, en donde la mezcla de ADN dañado se enfría a una velocidad de aproximadamente 1 % por minuto o menos.

Se describen métodos en donde la mezcla de ADN dañado se enfría a temperatura ambiente o a menos de 60 °C a 70 °C, 50 a 60 °C, 40 °C a 50 °C, 30 °C a 40 °C, 50 °C a 70 °C.

Se describen métodos en donde la solución de desnaturalización comprende una o más sales.

5 Se describen métodos en donde la sal es Tris-HCl, Tris-EDTA, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de magnesio o una combinación.

Se describen métodos en donde el Tris-HCl es de pH 7,0 a 8,0.

Se describen métodos en donde la sal es Tris-EDTA.

Se describen métodos en donde la solución de desnaturalización comprende aproximadamente 50 nM a aproximadamente 500 mM de Tris y aproximadamente 1 mM a aproximadamente 5 mM de EDTA.

10 Se describen métodos, en donde la muestra de ADN dañado está compuesta por fragmentos de ADN degradado del ADN genómico.

Se describen métodos, en donde la replicación y reparación del ADN dañado se logra incubando el ADN dañado en presencia de una ADN polimerasa.

15 Se describen métodos en donde la polimerasa es una ADN polimerasa que puede extenderse a los extremos 3' del ADN dañado.

Se describen métodos en donde la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi$ 29, la ADN polimerasa BST, la ADN polimerasa Taq, una forma modificada de la ADN polimerasa Taq, una transcripvelocidad inversa, la ADN polimerasa T4, la ADN polimerasa T7, la ADN polimerasa Pol I o una forma modificada de la ADN polimerasa I.

Se describen métodos en donde la ADN polimerasa es la ADN polimerasa  $\Phi$ 29.

20 Se describen métodos en donde el ADN dañado se amplifica usando un kit, en donde el kit comprende una solución de desnaturalización, una solución de estabilización, un conjunto de cebadores y una ADN polimerasa.

Se describen métodos, en donde la muestra de ADN dañado es un lisado celular, en donde el lisado celular se produce exponiendo células a condiciones alcalinas, en donde el lisado celular comprende un genoma completo.

25 Se describen métodos que comprenden luego de la exposición de las células a condiciones alcalinas, exponer una primera parte del lisado celular a condiciones que promueven la desnaturalización sustancial del ADN dañado en la primera parte del lisado celular, en donde reducir el pH del lisado celular comprende reducir el pH de la primera parte del lisado celular para formar un primer lisado celular estabilizado y reducir el pH de una segunda parte del lisado celular para formar un segundo lisado celular estabilizado luego de reducir el pH del lisado celular, mezclar el

30 segundo lisado celular estabilizado con el primer lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la desnaturalización temporal de los extremos del ADN dañado en el segundo lisado celular estabilizado y que mantiene la desnaturalización sustancial del ADN dañado en el primer lisado celular estabilizado, formando así una mezcla de lisado celular estabilizado, y antes de incubar el lisado celular estabilizado, enfriar la mezcla de lisado estabilizado en condiciones que promueven la hibridación de los extremos del ADN dañado desnaturalizado

35 temporalmente con el ADN dañado desnaturalizado sustancialmente, en donde incubar el lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la replicación del genoma también promueve la replicación del ADN dañado, en donde los extremos hibridados del ADN dañado preparan la replicación, en donde la replicación del ADN dañado da lugar a la reparación de las cadenas replicadas.

40 Se describen métodos para amplificar el ADN dañado, tal método comprende exponer una primera muestra de ADN dañado a condiciones que promueven la desnaturalización sustancial del ADN dañado en la primera muestra de ADN dañado, formando así una muestra de ADN dañado desnaturalizado; reducir el pH de la muestra de ADN dañado desnaturalizado para formar una muestra de ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado; mezclar una segunda muestra de ADN dañado con la muestra de ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado en condiciones que promueven la desnaturalización temporal de los extremos del ADN dañado en la segunda muestra y que

45 mantiene la desnaturalización sustancial del ADN dañado en la muestra de ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado, formando así una mezcla de ADN dañado; enfriar la mezcla de ADN dañado en condiciones que promueven la hibridación de los extremos del ADN dañado desnaturalizado temporalmente con el ADN dañado desnaturalizado sustancialmente, incubar el ADN dañado hibridado en condiciones que promueven la replicación del ADN dañado, en donde los extremos hibridados del ADN dañado preparan la replicación, en donde la replicación del ADN dañado da lugar a la reparación de las cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.

50 Se describen métodos en donde la temperatura a la que se calienta la primera muestra de ADN dañado se mantiene durante la mezcla de la segunda muestra de ADN dañado con la muestra de ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado.

Se describen métodos en donde el pH de la muestra de ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado no es lo suficientemente alto ni lo suficientemente bajo para provocar una desnaturalización sustancial adicional tras mezclar la segunda muestra de ADN dañado con la muestra de ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado.

5 Se describen métodos en donde la primera muestra de ADN dañado es una parte de una muestra de ADN dañado, en donde la segunda muestra de ADN dañado es una parte de la misma muestra de ADN dañado.

Se describen métodos en donde la primera muestra de ADN dañado es de la misma fuente que la segunda muestra de ADN dañado.

Se describen métodos en donde la primera muestra de ADN dañado es del mismo organismo que la segunda muestra de ADN dañado.

10 Se describen métodos en donde la primera muestra de ADN dañado es del mismo tejido que la segunda muestra de ADN dañado.

Se describen métodos en donde la segunda muestra de ADN dañado se mezcla con la muestra de ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado a una temperatura y durante un período de tiempo que desnaturaliza temporalmente el ADN dañado en la segunda muestra de ADN dañado.

15 Se describen métodos en donde la temperatura es aproximadamente 70 °C o menos y la duración es de aproximadamente 30 segundos o menos.

Se describen métodos en donde la segunda muestra de ADN dañado se mezcla con la muestra de ADN dañado, desnaturalizado y estabilizado a una temperatura que no daña adicionalmente el ADN.

20 Se describen métodos en donde la temperatura es de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 70 °C, aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C, aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C, aproximadamente 25 °C a aproximadamente 40 °C, aproximadamente 25 °C a aproximadamente 70 °C. Se describen métodos en donde la duración es de aproximadamente 30 segundos.

## Ejemplos

25 A. Ejemplo 1: Amplificación del genoma completo mediante el uso de cebadores hexámeros resistentes a la nucleasa

Este ejemplo describe una demostración de una realización del método descrito y el análisis y la comparación de los resultados. El método ejemplificado es la forma de amplificación por desplazamiento múltiple descrita de la amplificación del genoma completo que utiliza cebadores hexámeros aleatorios resistentes a la nucleasa. Algunas reacciones en este ejemplo se llevaron a cabo sin someter a la muestra a condiciones de desnaturalización, una forma preferida del método descrito. En otras reacciones, el ADN de plantilla fue sometido a desnaturalización antes de la amplificación. La MDA se llevó a cabo con la ADN polimerasa  $\Phi$ 29.

### 1. Materiales y Métodos

#### i. ADN y enzimas.

35 Se obtuvo un panel de muestras de ADN genómico humano, el panel de variación humana-panel caucásico de 100 (número de referencia HD100CAU) de los depósitos de células Coriell. El ADN genómico humano se obtuvo también de Promega Corp. El hexámero aleatorio modificado con tiofosfato (5'-NpNpNpNpsNpsN-3') se sintetizó en Molecular Staging, la ADN polimerasa  $\Phi$ 29 provino de Amersham Pharmacia Biotech y la pirofosfavelocidadde levadura provino de Boehringer-Mannheim. Los marcadores de tamaño de ADN (escalera de ADN de 100 bp, escalera de ADN de 1 kb) provinieron de Gibco BRL.

40 ii. Amplificación del ADN genómico humano.

El ADN genómico humano (300 ng a 0,03 ng, como se indicó) se colocó en tubos de 0,2 ml en un volumen total de 50  $\mu$ l, produciendo concentraciones finales de 25 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 100  $\mu$ M de hexámero resistente a la exonucleasa. Se incluyó u omitió una etapa de tratamiento térmico (es decir, exposición a condiciones de desnaturalización) para aumentar el apareamiento de los cebadores, como se indicó, para experimentos individuales. Las reacciones de apareamiento se calentaron a 95 °C durante 3 minutos y se enfriaron a 4 °C en un termociclador para el sistema de PCR (Perkin Elmer). Las reacciones se llevaron luego hasta un volumen final de 100  $\mu$ l que contiene concentraciones finales de 37 mM de Tris-HC, pH 8,0, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 mM de dNTP, 1 unidad/ml de pirofosfavelocidadde levadura, 50  $\mu$ M de hexámero resistente a la exonucleasa y 800 unidades/ml de ADN polimerasa  $\Phi$ 29. Se agregó como se indicó  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] dCTP marcado radioactivamente, aproximadamente 60 cpm/pmol de los dNTP en total.

Las reacciones de incubaron durante 18 horas a 30 °C. Se determinó la incorporación del producto desoxirribonucleótido radioactivo precipitable con ácido con filtros de fibra de vidrio. Después de finalizar las

reacciones, se escindieron 3  $\mu$ l de alícuotas con endonucleasa de restricción AluI y se analizaron mediante electroforesis a través de un gel de agarosa al 1,0 % en tampón de Tris-borato-EDTA, se tiñeron con GelStar (Molecular Probes) o SYBR Green (Molecular Probes) y se visualizaron con un PhosphorImager [dispositivo por imagen fosforescente] Storm 860 (APB). Se realizó un análisis de gel de desnaturalización mediante electroforesis a través de un gel de agarosa al 1,0 % en 30 mM de NaOH, 1 mM de EDTA. Los productos radioactivos en el gel deshidratado se visualizaron con el PhosphorImager Storm 860.

### iii. Análisis Southern.

Se digirieron 10  $\mu$ l del ADN amplificado de genoma completo o controles de ADN genómico humano con la endonucleasa de restricción EcoRI y se separaron a través de un gel de agarosa al 1 % en 1x tampón TBE. Se realizó el procedimiento de análisis Southern estándar (Southern, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 98:503-517 (1975)) mediante el uso de una membrana Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Una sonda de fragmentos exón de la hormona paratiroidea (p20.36) y sondas de marcadores RFLP para el D13S12 (p9D11) y loci de tiroglobulina (pCHT.16/8) se obtuvieron de la American Type Culture Collection [colección estadounidense de cultivos tipo]. Las sondas se radiomarcaron usando el método de etiquetado de cebadores aleatorios de NEBlot (New England Biolabs, Beverly, MA). La membrana se hibridó previamente durante 1 h y se hibridó con la sonda radiomarcada durante la noche en un tampón de hibridación de membranas (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). La membrana hibridada se lavó en SSC 2x y SDS al 0,1 % dos veces durante 5 minutos a temperatura ambiente, SSC 1x y SDS al 0,1 % durante 15 minutos a 42 °C, y SSC 0,1x dos veces durante 15 minutos a 65 °C. Luego, la membrana se expuso durante la noche y se analizó usando el PhosphorImager Storm 860.

### iv. Análisis por PCR cuantitativa

El análisis TaqMan se realizó usando el ABI 7700 de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) con 1  $\mu$ l de ADN amplificado como plantilla. Se obtuvieron de ABI los reactivos del ensayo TaqMan para los 8 loci sometidos a prueba. Los 8 loci y sus asignaciones cromosómicas fueron la proteína ribosómica ácida (1p36.13); la conexina 40 (1q21.1); el receptor de quimiocina (motivo C-C) 1 (3p21); el receptor de quimiocina (motivo C-C) 6 (6q27); el receptor de quimiocina (C-C) 7 (17q21); el receptor del linfoma de Burkitt CXCR5 1 (chr. 11); c-Jun (1p32-p31); y la fosfavelocidadde especificidad dual 1 MKP1 (5q34). La conexina 40 está ubicada cerca del centrómero y el receptor de quimiocina (motivo C-C) 6 está ubicado cerca del telómero. Se generó una curva estándar para el modelo de entrada para determinar el número de copias de loci en el ADN amplificado con respecto al del ADN genómico. La curva estándar se generó a partir de 0, 0,001, 0,01, 0,1, 0,5 y 1  $\mu$ g de ADN genómico.

### v. Amplificación del ADN genómico humano mediante PCR con oligonucleótidos degenerados (DOP-PCR)

El ADN genómico humano (que oscila entre 300 ng y 0,03 ng) se amplificó según se describió (Telenius et al., *Genomics.* 13:718-725 (1992)). El  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] dCTP marcado radioactivamente, aproximadamente 60 cpm/pmol de los dNTP en total, se agregó a la reacción para la cuantificación del rendimiento del producto de PCR. La ADN polimerasa Taq provino de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA. Las amplificaciones mediante DOP-PCR se realizaron usando un termociclador para el sistema de PCR GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La representación del locus en el producto de DOP-PCR se analizó cuantitativamente usando el ensayo TaqMan (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

### vi. Amplificación del ADN genómico humano mediante preamplificación de la extensión del cebador (PEP)

El ADN genómico humano (que oscila entre 300 ng y 0,03 ng) se colocó en tubos de 0,2 ml en un volumen total de 60  $\mu$ l, produciendo concentraciones finales de 33  $\mu$ M de cebador aleatorio PEP (5'-NNN NNN NNN NNN NNN-3') como se describió (Zhang et al., *Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. Proc Natl Acad Sci EUA.* 89:5847-5851 (1992)). El  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] dCTP marcado radioactivamente, aproximadamente 60 cpm/pmol de los dNTP en total, se agregó a la reacción para la cuantificación del producto de PCR. Las reacciones PEP se realizaron usando un termociclador para el sistema de PCR GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se analizó cuantitativamente la representación del locus en el producto PEP usando el ensayo TaqMan (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA).

### vii. Genotipificación de polimorfismos de un solo nucleótido.

Los SNP que aquí se analizan presentaron las siguientes ubicaciones cromosómicas: 1822, 251 y 221, 13q32; 465, 458 y 474, 19q13; VCAM, 1p31; IL-8, 4q13; PDK2-2, 17p; SNP21, no se conoce. Los ensayos de llevaron a cabo según lo descrito por Faruqi et al., *High-Throughput Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms with Rolling Circle Amplification. BMC Genomics,* 2:4 (2001). En resumen, las reacciones de ligación, apareamiento y desnaturalización del ADN se realizaron en un ciclador maestro de Eppendorf (Eppendorf Scientific, Alemania). Las reacciones RCA exponenciales se realizaron en un detector de secuencias ABI 7700 en tiempo real (Perkin Elmer). Se llevaron a cabo también dos controles que carecen de ligasa para cada SNP, lo que confirma la especificidad de los ensayos. Las muestras de ADN se digirieron con la endonucleasa de restricción AluI antes de utilizarse como

plantilla en la reacción de ligación. Las reacciones de ligación se montaron en placas ópticas MicroAmp de 96 pocillos (Perkin Elmer) en un volumen de reacción de 1 µl que contiene 1 unidad de Ampligase (Epicentre Technologies), 20 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 25 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM de NAD y Triton® X-100 al 0,01 %. Las reacciones estándar contenían 0,5 pM de candado circular abierto y 100 ng de ADN genómico digerido con Alu I. El ADN se desnaturalizó al calentar las reacciones a 95 °C durante 3 minutos seguido del apareamiento y ligación a 60 °C durante 20 minutos. Se agregaron 20 µl de mezcla de ERCA a la reacción de ligación de 10 µl. La mezcla de ERCA contenía oxalato de TMA al 5 %, 400 µM de mezcla de dNTP, 1 µM de cada uno de los dos cebadores, 8 unidades de polimerasa Bst (New England Biolabs, MA), y 1X tampón de reacción ThermoPol II modificado que contiene 20 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 10 mM de KCl, 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y Triton® X-100 al 0,1 %.

#### viii. Hibridación genómica comparativa.

Las preparaciones de ADN genómico fueron sometidas a traslación de mellas para incorporar nucleótidos modificados con biotina para muestras amplificadas o digoxigenina para muestras de control no amplificadas. Las cantidades equimolares de ADN amplificado y no amplificado se cohibridaron en presencia o ausencia de ADN Colt para suprimir la hibridación cruzada del ADN repetitivo. Se detectaron señales de hibridación específicas mediante avidina-FITC y anti-digoxigenina rodamina. Las imágenes capturadas de cromosomas de metafase se analizaron usando el programa informático Applied Imaging CGH y se generaron perfiles de fluorescencia. Como controles, los ADN amplificados o no amplificados marcados de forma diferencial se mezclaron, hibridaron, detectaron o sometieron a análisis de proporciones como se indicó anteriormente.

## 2. Resultados

Mediante el uso de la realización del método descrito, se amplificaron 30 ng (aproximadamente 9 copias genómicas) de ADN genómico humano a aproximadamente 30 µg en un plazo de 4 horas. La longitud promedio del fragmento resultó superior a 10 kb. El ADN humano amplificado mostró representación normal para 10 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). El sesgo máximo entre los 8 loci cromosómicos fue menor a 3 veces en contraposición a las cuatro a seis órdenes de magnitud para los métodos de WGA basados en PCR. El ADN humano amplificado con el método descrito es útil para varios métodos comunes de análisis genético, lo que incluye la genotipificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), la pintura cromosómica, la transferencia de Southern y el análisis RFLP, el subclonaje y la secuenciación del ADN.

Se descubrió que el uso de cebadores hexámeros aleatorios y ADN polimerasa Φ29 en la amplificación por desplazamiento múltiple, una reacción de desplazamiento de cadena en cascada (patente estadounidense N.º 6,124,120 para Lizardi), amplificará fácilmente el ADN genómico humano lineal. La amplificación del ADN genómico mediante la forma descrita de MDA a 30 °C es exponencial durante 4-6 horas. El efecto de la concentración de plantilla en el rendimiento de la amplificación en el método descrito se muestra en la Figura 1. Se desnaturalizaron 100 fg a 10 ng de ADN genómico humano a 95 °C durante 5 minutos y luego se realizó la MDA a 30 °C como se describió anteriormente. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados en la Figura 1 para cuantificar la síntesis de ADN. Las reacciones de amplificación (100 µl) produjeron aproximadamente 25-30 µg de producto de ADN independientemente de la cantidad inicial de ADN genómico a lo largo de un rango logarítmico de 5 (100 fg a 1 ng; Figura 1). Para algunas aplicaciones, esto permite el análisis genético posterior sin necesidad de medir o ajustar la concentración de ADN.

Los productos de la reacción MDA se caracterizaron como sigue a continuación.

Las muestras de amplificación del genoma humano marcado radioactivamente (0,6 µg) se sometieron a electroforesis a través de un gel de agarosa alcalina (1 %, tampón Tris-Borato EDTA), se tiñeron y visualizaron como se describió anteriormente. La longitud promedio del producto superó los 10 kb.

Para examinar la integridad del ADN amplificado, se analizó un fragmento de restricción dentro del gen de la hormona paratiroidea humana (cromosoma 11p15.2-15.1) en transferencias Southern. Se observó un fragmento de enzima de restricción de 1,9 kb para los productos de WGA basados en MDA amplificados a partir de tan solo 10 copias genómicas (o proporción de amplificación 106). Estas reacciones MDA incluyeron una etapa de desnaturalización térmica y la amplificación se llevó a cabo como se describió anteriormente. Los digestos de ADN EcoRI se sometieron a prueba con un fragmento genómico marcado radioactivamente del gen de la hormona paratiroidea (p20.36) que se hibridó con un fragmento de ADN de aproximadamente 1,9 kb. Las preparaciones de ADN escindidas con EcoRI fueron ADN genómico, ADN amplificado mediante MDA a partir de diversas cantidades de ADN genómico inicial o una reacción MDA que carecía de plantilla de ADN genómico inicial. Esto demuestra que los productos de MDA son lo suficientemente largos para producir fragmentos de ADN específicos de varios kb de longitud luego de la escisión mediante endonucleasas de restricción.

Mientras que los métodos de WGA basados en PCR generan típicamente productos de solo varios cientos de nucleótidos de longitud (Telenius et al., *Genomics*. 13:718-725 (1992); Cheung y Nelson, *Proc Natl Acad Sci EUA*. 93:14676-14679 (1996); Zhang et al., *Proc Natl Acad Sci EUA*. 89:5847-5851 (1992)), los productos del método descrito tuvieron una longitud e integridad suficiente para la genotipificación basada en RFLP: 16 individuos

aleatorios se genotiparon correctamente mediante la presencia de un fragmento Pst I de 2,1 kb y 1,1 kb. Específicamente, los digestos de ADN PstI se sometieron a prueba usando un fragmento genómico marcado radioactivamente del locus D13S12 del marcador RFLP (p9D11) que se hibridó con un fragmento de ADN de 3,8 kb invariable y un fragmento de ADN de 2,1 kb (alelo A) o 1,1 kb (alelo B) polimórfico. Las preparaciones de ADN escindido con PstI fueron ADN genómico y 5 ADN de pacientes diferentes amplificados mediante MDA sin ninguna desnaturalización térmica de la plantilla de ADN (10.000x de amplificación)

La omisión de las condiciones de desnaturalización antes de la MDA resultó útil para la detección de fragmentos de restricción superiores a 5 kb de longitud. Las reacciones MDA se realizaron con o sin desnaturalización térmica del ADN diana genómico heterocigótico para dos alelos de tiroglobulina. La amplificación se realizó como se describió anteriormente. Los digestos de ADN TaqI se sometieron a prueba usando un fragmento genómico marcado radioactivamente del gen de la tiroglobulina (pCHT.16/8) que se hibridó con fragmentos de ADN de 1 kb y 3 kb invariables y un fragmento de ADN de 5,8 kb (alelo A) o 5,2 kb (alelo B) polimórfico. Las preparaciones de ADN escindido con TaqI fueron ADN genómico, ADN amplificado mediante reacción MDA (10.000x) con una etapa de precalentamiento de 95 °C y una reacción MDA (10.000x) sin la etapa de precalentamiento. La MDA sin desnaturalización térmica produjo un buen rendimiento de los fragmentos de ADN con un tamaño de 5,2 y 5,8 kb, mientras que ninguno de los fragmentos de ADN de 5,2 u 5,8 kb permanecieron visibles usando MDA con desnaturalización térmica de la plantilla.

Los resultados más útiles de la amplificación del genoma completo se obtienen cuando la amplificación proporciona una cobertura completa de secuencias genómicas y un sesgo de amplificación mínima. Se prefiere también que el producto de amplificación se desarrolle de manera similar al ADN genómico no amplificado durante el análisis genético posterior. Se examinó la cobertura del genoma después de la MDA con desnaturalización térmica de la plantilla para 10 SNP distribuidos aleatoriamente luego de amplificaciones de 100, 10.000 o 100.000 veces. La presencia de todos los loci se confirmó en el ADN amplificado con la excepción de un locus (PDK2- 2) en el ADN amplificado 100.000 veces (Tabla 1). El ADN de la MDA de 72 individuos se genotipó para uno de estos SNP. Luego de la amplificación de 100 veces mediante MDA, la precisión de la genotipificación fue del 97 % (70 de 72 genotipos obtuvieron una calificación correcta, Tabla 1, SNP 1822), un resultado que fue indistinguible del ADN genómico no amplificado que se sometió a genotipificación con el mismo método. La WGA basada en MDA ofrece, por lo tanto, una alternativa atractiva para múltiples preamplificaciones de PCR específicas del locus para estudios de calificación de SNP extensos, especialmente donde la disponibilidad de la muestra está limitada.

Tabla 1

Designación del SNP	Proporción de amplificación del genoma completo		
	100X	10.000X	100.000X
	Llamadas SNP correctas/ensayos totales		
1822	70/72	4/4	3/4
251	8/8	4/4	4/4
221	3/4	3/4	4/4
465	4/4	3/4	3/4
458	4/4	3/4	3/4
474	4/4	3/4	4/4
VCAM	4/4	4/4	4/4
IL-8	4/4	4/4	3/4
SNP21	4/4	4/4	3/4
PDK2-2	4/4	4/4	0/12

El sesgo de secuencias puede ocurrir en métodos de amplificación, y puede ser el resultado de factores tales como eficiencia de cebado, accesibilidad a la plantilla, contenido de GC y proximidad a telómeros y centrómeros. El sesgo de amplificación del método MDA descrito se examinó mediante PCR cuantitativa de TaqMan para 8 genes, lo que

incluye uno cerca del centrómero del cromosoma 1 (conexina 40) y uno adyacente al telómero del cromosoma 6 (receptor de quimiocina (motivo C-C) 6). Para la MDA de 100, 1.000 y 10.000 veces sin desnaturalización térmica, los sesgos de amplificación máxima fueron solamente 2,7, 2,3 y 2,8 respectivamente, expresados como la relación del gen más representado con respecto al gen menos representado. Por el contrario, dos métodos de WGA basados en la PCR, DOP-PCR (Telenius et al., *Genomics*. 13:718-725 (1992); Cheung y Nelson, *Proc Natl Acad Sci EUA*. 93:14676-14679 (1996)) y PEP (Zhang et al., *Proc Natl Acad Sci EUA*. 89:5847- 5851 (1992)), mostraron un sesgo de amplificación de 4-6 órdenes de magnitud. Estos valores fueron consistentes con los valores de la bibliografía para el sesgo de los métodos de WGA mediados por PCR; se informó que PEP genera un sesgo de amplificación de hasta 50 veces incluso entre dos alelos del mismo gen (Paunio et al., *Clin. Chem*. 42:1382-1390 (1996)). De manera significativa, el sesgo de amplificación triplicada de la MDA permaneció casi constante entre una proporción de amplificación de 100 y 100.000 veces. Puede explicarse una ausencia de sesgo de secuencia significativa observada en la WGA basada en MDA mediante la procesividad extraordinaria de la ADN polimerasa  $\Phi$ 29 (Blanco et al., *J. Biol. Chem*. 264:8935-8940 (1989)). La unión firme de la polimerasa a la plantilla asegura la replicación a través de obstáculos provocados por la estructura primaria o secundaria del ADN.

Sorprendentemente, la cuantificación TaqMan indicó que determinados loci genéticos se enriquecieron mediante MDA en el ADN amplificado; la representación del locus fue >100 % de la representación en el ADN genómico. La representación del ADN mitocondrial fue la misma entre el ADNg inicial y el ADN amplificado. Las transferencias Southern y los experimentos de pintura cromosómica indicaron que las secuencias repetitivas fueron poco representadas en el producto de MDA, lo que confiere un enriquecimiento de genes efectivo. Por lo tanto, el ADN amplificado contuvo entre 100-300 % de cantidades de copias de 8 genes relacionados con el ADN genómico. Serán necesarios estudios adicionales para identificar la extensión y el tipo de escasa representación de elementos repetitivos; una hipótesis para esta observación es que los cebadores que corresponden a elementos sumamente repetitivos se agotan durante la MDA. Sin embargo, en contraste con los productos WGA basados en la PCR, que contienen hasta 70 % de artefactos de amplificación (Cheung y Nelson, *Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA*. *Proc Natl Acad Sci EUA*. 93:14676-14679 (1996)), los productos WGA basados en la MDA parecen provenir completamente de secuencias genómicas.

Se probó también la MDA del genoma completo para determinar la uniformidad de la cobertura cromosómica mediante hibridación genómica comparativa. El ADN generado a través de la MDA se cohibridó con cromosomas de metafase con una cantidad equivalente de ADN genómico no amplificado. Las reacciones de amplificación incluyeron una etapa de desnaturalización térmica y la amplificación se realizó como se describió anteriormente. Las muestras de ADN amplificado y no amplificado se sometieron a traslación de mellas para incorporar el nucleótido de biotina y el nucleótido de digoxigenina, respectivamente. Se detectaron señales específicas mediante avidina-FITC y anti-digoxigenina rodamina. Con la supresión de CotI, los patrones de hibridación de las sondas MDA y las sondas no amplificadas resultaron indistinguibles incluso luego de la amplificación de 100.000 veces. Sin la supresión de CotI, sin embargo, la sonda amplificada 100.000 veces proporcionó señales centroméricas reducidas, lo que indica alguna pérdida de secuencias centroméricas repetitivas. La uniformidad de señal a lo largo de la longitud de los brazos del cromosoma resultó otra prueba más de que la WGA basada en MDA no induce un sesgo de amplificación significativa. Estos resultados indicaron que la MDA se compara favorablemente con la DOP PCR para la preparación de sondas de pintura cromosómica (Kim et al., *Whole genome amplification and molecular genetic analysis of DNA from paraffin-embedded prostate adenocarcinoma tumor tissue*. *J Urol*. 162:1512-1518 (1999); Klein et al., *Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells*. *Proc Natl Acad Sci EUA* 96:4494-4499 (1999); Wells et al., *Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genomic hybridization*. *Nucleic Acids Res* 27:1214-1218 (1999)), pero a diferencia de esta última, la hibridación de supresión puede no ser necesaria para la detección de secuencias de copia única. Este método debería ser invaluable para la preparación de sondas de ADN para la hibridación genómica comparativa, la elaboración del cariotipo y el análisis genético basado en chips a partir de fuentes limitadas de ADN de pacientes tales como muestras de amniocentesis o material para biopsia con agujas.

Para el subclonaje y secuenciación de genomas, la MDA parece tener ventajas intrínsecas con respecto a los métodos basados en la PCR. El tamaño del producto de >10 kb es compatible con el subclonaje de genomas. Dado que no se necesita ninguna propagación in vivo del material amplificado, la MDA puede representar un método eficiente para amplificar secuencias genómicas «tóxicas». Además, la ADN polimerasa  $\Phi$ 29 utilizada para la MDA tiene una velocidad de error de 1 en 10<sup>6</sup> - 10<sup>7</sup> (Esteban et al., *Fidelity of Phi29 DNA polymerase. Comparison between protein-primed initiation and DNA polymerization*. *J. Biol. Chem*. 268:2719-2726 (1993)) en contraste con aproximadamente 3 en 10<sup>4</sup> para la PCR con ADN polimerasa Taq (Eckert y Kunlcel, *DNA polymerase fidelity and the polymerase chain reaction*. *PCR Methods and Applications*. 1:17-24 (1991)). Por lo tanto, la PCR acumula aproximadamente una mutación por 900 bases (Saiki et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science* 239:487-491 (1988)) luego de 20 ciclos. Las velocidades de error de secuencia de los productos de la WGA basada en la MDA parecen ser similares a las del ADN genómico clonado. Asimismo, el sesgo de amplificación mínima, los rendimientos uniformes y la simplicidad del ensayo hacen que la MDA sea responsable por formatos de micropocillos de alta densidad automatizados que se utilizan para el subclonaje y secuenciación de genomas.

En resumen, se demostró la utilidad de la WGA basada en la MDA para una variedad de usos que incluyen la PCR cuantitativa, la genotipificación de SNP, el análisis de transferencia Southern de fragmentos de restricción y la pintura cromosómica. Se pueden contemplar varias situaciones donde la MDA puede representar el método de elección para la WGA: en primer lugar, aplicaciones donde es necesaria la replicación fiel durante la WGAA, tal como la clonación molecular o el análisis de única célula; en segundo lugar, aplicaciones donde es fundamental la representación genómica adecuada durante la WGA, tal como estudios de genotipificación de SNP de todo el genoma; y, en tercer lugar, donde es importante la minimización del sesgo durante la WGA, particularmente en pruebas citogenéticas, por ejemplo, el diagnóstico prenatal (Harper y Wells, Recent advances and future developments in PGD. *Prenat Diagn.* 19:1193-1199 (1999)), la hibridación genómica comparativa (Wells y Delhanty, Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod.* 6:1055-1062 (2000)), y la evaluación de pérdida de heterocigosidad (Paulson et al., Loss of heterozygosity analysis using whole genome amplification, cell sorting, and fluorescence-based PCR. *Genome Res.* 9:482-491 (1999)). Situaciones adicionales donde hay una necesidad manifiesta de WGA incluyen la amplificación del ADN a partir de tejidos microdisecados (Kim et al., Whole genome amplification and molecular genetic analysis of DNA from paraffin-embedded prostate adenocarcinoma tumor tissue. *J Urol.* 162:1512-1518 (1999)), frotis bucal (Gillespie et al., HLA class II typing of whole genome amplified mouth swab DNA. *Tissue Antigens.* 56:530-538 (2000)), y muestras antropológicas de archivo (Buchanan et al., Long DOP-PCR of rare archival anthropological samples. *Hum Biol.* 72:911-925 (1999)). Finalmente, se puede utilizar el ADN amplificado a partir de cromosomas individuales, clasificados para la generación de sondas de pintura específica para el cromosoma completo (Guillier-Gencik et al., Generation of whole-chromosome painting probes specific to each chicken macrochromosome. *Cytogenet Cell Genet.* 87:282-285 (1999)).

B. Ejemplo 2: El aumento de tiempo de incubación a 95 °C provoca mayor rotura de cadenas del ADN de plantilla

Este ejemplo demuestra que se genera una rotura significativa de cadenas de ADN de plantilla mediante incubación a 95 °C (lo cual se utiliza en reacciones de amplificación típicas para desnaturizar el ADN) y que la rotura de cadenas se reduce al disminuir la duración del tratamiento térmico. Como con la mayoría de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, la integridad de la plantilla de ADN inicial puede tener un efecto importante en la velocidad y el rendimiento del producto amplificado. En las reacciones donde el ácido nucleico que se debe amplificar se degrada, el rendimiento del producto amplificado puede reducirse tanto en calidad como en cantidad. Este ejemplo demuestra la reducción de la rotura de cadenas del ADN de plantilla al disminuir el tiempo de incubación a 95 °C.

Se realizaron seis reacciones en las condiciones utilizadas para la separación de cadenas de la plantilla de ADN con desnaturación térmica con el fin de ilustrar la degradación del ADN de plantilla. El ADN genómico humano (10 µg) se colocó en tubos de 0,2 ml en un volumen total de 50 µl, proporcionando concentraciones finales de 25 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM de KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Las reacciones se calentaron a 95 °C en un termociclador para el sistema de PCR (Perkin Elmer), y se tomó una alícuota de 8 µl y se la colocó en hielo en los tiempos indicados. Para cada punto de tiempo, se analizó una alícuota de 2 µl mediante electroforesis a través de un gel de agarosa alcalina al 0,8 % (30 mM de NaOH, 1 mM de EDTA). Luego de la electroforesis, el gel se neutralizó con 1X TBE, se tiñó con SYBR Green II (Molecular Probes), y se visualizó con un PhosphorImager Storm 860 (APB). Se determinó la cantidad total de ADN visualizado para cada carril del gel y se determinó el tamaño del fragmento en el cual 50 % del ADN resultó más grande y 50 % más pequeño para las muestras extraídas en cada punto de tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Como se puede observar, la rotura significativa del ADN de plantilla se produce luego de la incubación a 95 °C durante más de tres minutos. Dicha rotura de ADN se reduce sustancialmente cuando la incubación se limita a un minuto.

C. Ejemplo 3: El aumento de tiempo de la incubación de la plantilla de ADN a 95 °C provoca una menor velocidad y rendimiento de la amplificación de ADN.

Este ejemplo demuestra que un mayor tiempo de incubación del ADN de plantilla a 95 °C (que se utiliza en reacciones de amplificación típicas para desnaturizar el ADN) provoca una reducción tanto en la velocidad como en el rendimiento con el cual el ADN se amplifica mediante MDA. La omisión de la incubación de la plantilla de ADN a 95 °C da lugar a la velocidad y el rendimiento más grande de la amplificación de ADN.

Se realizaron seis reacciones MDA usando el ADN de plantilla tratado a 95 °C en las condiciones descritas en el Ejemplo 2. El ADN genómico purificado (3 ng) se colocó en tubos de 0,2 ml en un volumen total de 50 µl, que contiene 25 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM de KCl y 10 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las reacciones se calentaron a 95 °C durante el tiempo indicado y se enfriaron a 4 °C en un termociclador para el sistema de PCR (Perkin Elmer). Estas reacciones se llevaron luego a un volumen final de 100 µl, que contiene concentraciones finales de 37 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 µM de hexámero resistente a la nucleasa, 5 mM de (NH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 mM de dNTP, 1 unidad/ml de pirofosfavelocidadde levadura y 800 unidades/ml de ADN polimerasa Φ29. Se agregó α-[<sup>32</sup>P] dCTP marcado radioactivamente, aproximadamente 60 cpm/pmol de los dNTP en total y las reacciones se incubaron durante 22 horas a 30 °C. Las alícuotas se tomaron en todos los tiempos indicados y se

determinó la incorporación del producto desoxirribonucleótido radioactivo precipitable con ácido con filtros de fibra de vidrio. Los resultados se muestran en la Figura 3.

5 Como se puede observar, la omisión del tratamiento térmico de la plantilla de ADN da lugar a la velocidad y rendimiento óptimo de la síntesis de ADN (véase la curva de 0 min). El aumento de la duración del tratamiento térmico para la plantilla de ADN provocó una velocidad y rendimiento progresivamente reducidos de la síntesis de ADN (véanse las curvas de 1 min, 3 min, 5 min, 10 min y 20 min).

D. Ejemplo 4: El aumento de tiempo de la incubación de plantilla de ADN a 95 °C provoca la disminución del tamaño de cadena del producto de ADN.

10 Este ejemplo demuestra que el aumento de tiempo de la incubación del ADN de plantilla a 95 °C (que se utiliza en reacciones de amplificación típicas para desnaturalizar el ADN) provoca una reducción en la longitud de los productos de ADN amplificados mediante MDA. La omisión de la incubación de la plantilla de ADN a 95 °C da como resultado que los productos de amplificación de ADN tengan el tamaño más grande.

15 Se realizaron seis reacciones MDA usando el ADN de plantilla tratado a 95 °C en las condiciones descritas en el Ejemplo 3. Se agregó  $\alpha$ -[32P] dCTP marcado radioactivamente, aproximadamente 60 cpm/pmol de los dNTP en total. Las reacciones se incubaron durante 22 horas a 30 °C y se tomaron alícuotas en los tiempos indicados. Para cada punto de tiempo, se analizó una alícuota de 2  $\mu$ l mediante electroforesis a través de un gel de agarosa alcalina al 0,8 % (30 mM de NaOH, 1 mM de EDTA). Luego de la electroforesis, el gel se neutralizó y visualizó como se describe en el Ejemplo 2. Se determinó la cantidad total de ADN visualizado para cada carril del gel y se determinó el tamaño del fragmento en el que 50 % del ADN resultó más grande y 50 % más pequeño para las muestras de cada punto de tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Como se puede observar, la omisión del tratamiento térmico de la plantilla de ADN provoca la síntesis de los productos de ADN más grandes. El aumento en la duración del tratamiento térmico de la plantilla de ADN provocó que el tamaño del producto ADN se redujera progresivamente.

25 E. Ejemplo 5: La omisión de la incubación de la plantilla de ADN a 95 °C provoca una mayor representación del locus en los productos de ADN amplificados mediante MDA.

30 Este ejemplo demuestra que la omisión de la incubación del ADN de plantilla a 95 °C (que se utiliza en reacciones de amplificación típicas para desnaturalizar el ADN) no provoca ninguna pérdida en la representación de 8 loci seleccionados aleatoriamente en productos de ADN amplificados mediante MDA. La omisión de la incubación de la plantilla de ADN a 95 °C provoca un aumento en la representación del locus de los productos de amplificación de ADN comparado con el ADN genómico de plantilla.

35 Se llevaron a cabo dos reacciones MDA usando el ADN de plantilla ya sea tratado o no tratado a 95 °C. El ADN genómico humano purificado (3 ng) se colocó en un tubo de 0,2 ml en un volumen total de 50  $\mu$ l que contiene 25 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 100  $\mu$ M de hexámero resistente a la exonucleasa. Las reacciones de apareamiento se calentaron a 95 °C durante 3 minutos y se enfriaron a 4 °C en un termociclador para el sistema de PCR (Perkin Elmer). La reacción se llevó luego a un volumen final de 100  $\mu$ l, que contiene concentraciones finales de 37 mM de Tris-HC, pH 7,5, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M del hexámero resistente a la exonucleasa, 5 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 mM de dNTP, 1 unidad/ml de pirofosfavelocidadde levadura y 800 unidades/ml de ADN polimerasa  $\Phi$ 29. Para la amplificación que carece de la etapa de desnaturalización térmica, la plantilla de ADN (3 ng) se colocó directamente en un tubo de 0,2 ml en un volumen total de 100  $\mu$ l que contiene 37 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 50  $\mu$ M de hexámero resistente de exonucleasa, 5 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 de mM de dNTP, 1 unidad/ml de pirofosfavelocidadde levadura y 800 unidades/ml de ADN polimerasa  $\Phi$ 29. Las reacciones se incubaron durante 18 horas a 30 °C.

45 El análisis por PCR cuantitativa TaqMan® se realizó usando el ABI 7700 de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) con 1  $\mu$ l de ADN amplificado como plantilla. Los reactivos del ensayo TaqMan® para los 8 loci sometidos a prueba se obtuvieron de ABI. Los 8 loci y sus asignaciones cromosómicas fueron la proteína ribosómica ácida (1p36.13); la conexina 40 (1q21.1); c-Jun (1p32-p31); la fosfavelocidadde especificidad dual 1 MKP1 (5q34); el receptor de quimiocina (motivo C-C) 7 (17q21); el receptor de quimiocina (C-C) 1 (3p21); el receptor del linfoma de Burkitt CXCR5 1 (chr. 11); y el receptor de quimiocina (motivo C-C) 6 (6q27). La conexina 40 está ubicada cerca del centrómero y el receptor de quimiocina (motivo C-C) 6 está ubicado cerca del telómero. Se generó una curva estándar para la plantilla de inicio para determinar la cantidad de copias de loci en el ADN amplificado comparado con la del ADN genómico. La curva estándar se generó a partir de 0, 0,001, 0,01, 0,1, 0,5 y 1  $\mu$ g de ADN genómico. La representación del locus se expresó como porcentaje, con respecto a la representación del locus en el ADN genómico inicial y se calculó como el rendimiento del producto de PCR cuantitativa a partir de 1  $\mu$ g de ADN amplificado dividido por el rendimiento a partir del control de ADN genómico de 1  $\mu$ g. Los resultados se muestran en la Figura 5.

55 Como se puede observar, no hay ninguna reducción de la representación del locus en el ADN amplificado a partir del ADN de plantilla sin tratamiento térmico a 95 °C. Sin embargo, se observó la pérdida significativa de la

representación del locus a partir del ADN de plantilla desnaturalizado con calor durante 3 min a 95 °C.

F. Ejemplo 6: El sesgo de amplificación de loci amplificados mediante MDA es considerablemente inferior al sesgo de amplificación del ADN amplificado mediante PEP o DOP-PCR

5 Este ejemplo demuestra que para el ADN amplificado con MDA 100, 1.000 y 10.000 veces, la omisión de la incubación de la plantilla de ADN a 95 °C (que se utiliza en reacciones de amplificación típicas para desnaturalizar el ADN) da lugar a un sesgo bajo en la representación de 8 loci seleccionados aleatoriamente en productos de DNA. Por el contrario, dos métodos de amplificación del genoma completo (WGA) basados en PCR, DOP-PCR y PEP muestran sesgos de amplificación de 2-6 órdenes de magnitud.

10 Se realizaron reacciones MDA usando el ADN de plantilla no tratado a 95 °C como se describe en el Ejemplo 5. Las reacciones (100 µl) incluyeron 300, 30, 3 o 0,3 ng de ADN, lo cual provoca aproximadamente una amplificación de ADN de 100, 1000, 10.000 y 100.000 veces.

15 La amplificación del ADN genómico humano mediante PCR con oligonucleótidos degenerados PCR (DOP-PCR; Telenius et al., *Genomics*. 13:718-725 (1992); Cheung y Nelson, *Proc Natl Acad Sci EUA*. 93:14676-14679 (1996)) se realizó como se muestra a continuación. El ADN genómico humano (que oscila entre 300 ng y 0,03 ng) se colocó en tubos de 0,2 ml en un volumen total de 50 µl, que produce concentraciones finales de 2 µM de cebador DOP (5'-CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G-3' (SEQ ID N0:20); N = A, G, C, o T en proporciones aproximadamente iguales), 200 µM de dNTP, 10 mM de Tris Cl (pH 8,3), 0,005 % (v/v) de BRIJ 35, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 50 mM de KCl. El α-[<sup>32</sup>P] dCTP marcado radioactivamente, aproximadamente 60 cpm/pmol de los dNTP en total, se agregó a la reacción para cuantificar la síntesis de ADN como se describió para la cuantificación del producto de MDA en el  
20 Ejemplo 3. Luego de la desnaturalización inicial de la plantilla a 95 °C durante 5 minutos, se agregaron 2,5 unidades de ADN polimerasa Taq (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) seguido de 5 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 30 °C durante 1,5 minutos, aumentando hasta 72 °C en 3 minutos, y luego 35 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 62 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 2 minutos (+14 segundos/ciclo extra). El alargamiento final se realizó a 72 °C durante 7 minutos. Las reacciones de amplificación se realizaron usando un termociclador para sistemas de PCR GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

25 Se realizó la amplificación del ADN genómico humano mediante preamplificación de extensión de cebadores (PEP; Zhang et al., *Proc Natl Acad Sci EUA*. 89:5847-5851 (1992)) de la forma que sigue a continuación. El ADN genómico humano (que oscila entre 300 ng y 0,03 ng) se colocó en tubos de 0,2 ml en un volumen total de 60 µl, que produce concentraciones finales de 33 µM de cebador aleatorio PEP (5'-NNN NNN NNN NNN NNN-3'), 100 µM de dNTP, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,3 (20°C), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de KCl, y 5 unidades de ADN polimerasa Taq (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). El α-[<sup>32</sup>P] dCTP marcado radioactivamente, aproximadamente 60 cpm/pmol de los dNTP en total, se agregó a la reacción para cuantificar el rendimiento del producto de PCR como se describió para la cuantificación del producto MDA en el Ejemplo 3. La reacción PEP se realizó durante 50 ciclos a 92 °C durante 1 minuto, 37 °C durante 2 minutos, aumentando hasta 55 °C a 10 s/grados y el alargamiento a 55 °C  
30 durante 4 minutos. Las reacciones PEP se realizaron usando un termociclador para sistemas de PCR GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Se llevó a cabo el análisis por PCR cuantitativa TaqMan® como se describe en el Ejemplo 5 y se calculó el sesgo de amplificación máxima entre los loci dividiendo el valor de representación de locus alto por el valor bajo para cada nivel de proporción de amplificación. Los resultados se muestran en la Figura 6.

40 La representación relativa de ocho loci se ilustra en la Figura 6 para reacciones de amplificación realizadas mediante tres procedimientos de WGA diferentes. El eje X representa la proporción de amplificación en el ADN amplificado utilizado como plantilla para la PCR cuantitativa; el eje Y es la representación del locus, expresada como porcentaje, con respecto al ADN genómico inicial, lo cual se calcula como el rendimiento del producto de PCR cuantitativa a partir de 1 µl de ADN amplificado dividido por el rendimiento de 1 µg de control de ADN genómico. Los resultados para los ocho loci se indican de la forma que sigue a continuación; CXCR5, diamantes abiertos; conexina 40, triángulos abiertos; MKP1, cuadrados abiertos; CCR6, círculos abiertos; proteína ribosómica ácida, diamantes rellenos; CCR1, triángulos rellenos; cJUN, cuadrados rellenos; CCR7, círculos rellenos. La Figura 6A ilustra el porcentaje de representación para ocho loci derivados del ADN amplificado mediante MDA. La Figura 6B ilustra el porcentaje de representación para ocho loci presentes en el ADN amplificado usando DOP-PCR. La Figura 6C  
45 ilustra el porcentaje de representación para ocho loci presentes en el ADN amplificado mediante PEP.

50 Como se puede observar, para la MDA amplificada 100, 1.000 y 10.000 veces, los sesgos de amplificación máxima fueron solamente 2,7, 2,3 y 2,8 respectivamente, expresados como la relación del gen más representado con respecto al gen menos representado. De manera significativa, el sesgo de amplificación triplicada de la MDA permaneció casi constante entre una amplificación de 100 y 100.000 veces (Figura 6A). Por el contrario, la amplificación mediante el método DOP-PCR mostró un sesgo de amplificación entre 4 y 6 órdenes de magnitud (Figura 6B). Además, el método PEP mostró un sesgo de amplificación que abarca 2-4 órdenes de magnitud (Figura 6C).

G. Ejemplo 7: La amplificación mediante el uso de cebadores anidados produce amplificación específica de

secuencias c-jun.

Este ejemplo demuestra la amplificación de una región de ADN específica de una mezcla compleja de secuencias de ADN mediante el uso de la ADN polimerasa  $\Phi$ 29 con cebadores anidados específicos para la secuencia.

- 5 Las reacciones de amplificación se realizaron con o sin una etapa de desnaturalización/apareamiento mediante el uso de hexámeros resistentes a la exonucleasa o un conjunto anidado de 19 cebadores específicos para la secuencia resistentes a la exonucleasa. Los cebadores anidados utilizados en este ejemplo se enumeran en la Tabla 2. La presencia de un asterisco en la secuencia de nucleótidos indica la presencia de un enlace de fosforotioato. Los cebadores anidados están diseñados para hibridarse con cadenas opuestas en cada lado del gen c-jun humano, y los cebadores derechos e izquierdos más cercanos abarcan un fragmento de 3420 bp que contiene el gen c-jun. Sobre cada lado del gen c-jun, estos cebadores anidados tienen una separación de 150-400 nucleótidos entre sí. La región del ADN humano que abarca los sitios de reconocimiento para estos cebadores puede accederse desde Genbank usando el número de acceso AL136985 y abarca las posiciones 65001 a 73010 de la secuencia de nucleótidos.

Tabla 2

15 Cebadores izquierdos (5' a 3')

c-Jun L9	TCC ATC ACG AGT TAT GC*A* C	(SEQ ID NO:1)
c-Jun L8	TGG AGT TAG TAA GGG AA*G* C	(SEQ ID NO:2)
c-Jun L7	ACT GAG TTC ATG AAC CC*T* C	(SEQ ID NO:3)
c-Jun L6	ATT AAC TCA TTG AAG GC*C* C	(SEQ ID NO:4)
c-Jun L5	TCT GTG CTG TAC TGT TG*T* C	(SEQ ID NO:5)
c-Jun L4	AGT TTG GCA AAC TGG GOT* C	(SEQ ID NO:6)
c-Jun L3	TGG CTC TTG GTA TGA AA*A* G	(SEQ ID NO:7)
c-Jun L2	ACT GTT AGT TTC CAT AG*G* C	(SEQ ID NO:8)
c-Jun L1	TGA ATA CAT TTA TTG TG* A* C	(SEQ ID NO:9)

Cebadores derechos (5' to 3')

c-Jun R1	CGA CTG TAG GAG GGC AG*C* G	(SEQ ID NO: 10)
c-Jun R2	CGT CAG CCC ACA ATG CA*C* C	(SEQ ID NO: 11)
c-Jun R3	GTA CTT GGA TTC TCA GC*C* T	(SEQ ID NO:12)
c-Jun R4	CAA ATC TCT CGG CTT CT*A* C	(SEQ ID NO: 13)
c-Jun R5	CGT GTT GTG TTA AGC GT*G* T	(SEQ ID NO: 14)
c-Jun R6	CCG CGG AAA AGG AAC CA*C* T	(SEQ ID NO: 15)
c-Jun R7	CTC CTG GCA GCC CAG TG*A* G	(SEQ ID NO: 16)
c-Jun R8	CTC CTC CCC TCG ATG CT*T* C	(SEQ ID NO: 17)
c-Jun R9	CAG TTA CCC TCT GCA GA*T* C	(SEQ ID NO: 18)
c-Jun R10	CTA TTT CCT CTG CAG AT*A* A	(SEQ ID NO: 19)

Se llevaron a cabo cuatro reacciones en las siguientes condiciones. El ADN genómico humano (50 ng) se colocó en

un tubo de 0,2 ml en un volumen total de 50  $\mu$ l, que produce concentraciones finales de 25 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM de KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, y 100  $\mu$ M de hexámero resistente a la exonucleasa o 1  $\mu$ M de cada uno de los cebadores anidados resistentes a la exonucleasa. Se incluyó u omitió una etapa de tratamiento térmico para aumentar el apareamiento de los cebadores, como se indica, para reacciones individuales. Las reacciones de apareamiento se calentaron a 95 °C durante 3 minutos y se enfriaron lentamente a 37 °C en un termociclador para el sistema de PCR (Perkin Elmer). Las reacciones se dividieron en dos, cada una tuvo 25  $\mu$ l y luego se llevaron a un volumen final de 50  $\mu$ l, que contiene concentraciones finales de 37 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 mM de dNTP, 1 unidad/ml de pirofosfavelocidadde levadura, 50  $\mu$ M de hexámero resistente a la exonucleasa o 0,5  $\mu$ M de cebadores anidados resistentes a la exonucleasa, y 800 unidades/ml de ADN polimerasa  $\Phi$ 29. El  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] dCTP marcado radioactivamente, aproximadamente 60 cpm/pmol de los dNTP en total, se agregó a una de las dos reacciones paralelas para cuantificar la síntesis de ADN. Las reacciones de incubaron durante 18 horas a 37°C. Se determinó la incorporación del producto desoxirribonucleótido radioactivo precipitable con ácido con filtros de fibra de vidrio. Las reacciones que no contenían  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P] dCTP se analizaron mediante análisis por PCR cuantitativa TaqMan® como se describe en el Ejemplo 5. Se generó una curva estándar para la plantilla inicial a efectos de determinar la cantidad de copias del locus de la muestra de ADN amplificado con respecto a la del ADN genómico. La curva estándar se generó a partir de 0, 0,001, 0,01, 0,1, 0,5 y 1  $\mu$ g de ADN genómico. Los resultados se muestran en la Figura 7.

El eje Y es la representación del locus con respecto al ADN genómico inicial. Se calcula que el rendimiento del producto de PCR cuantitativa de 1  $\mu$ g de ADN amplificado dividido por el rendimiento de 1  $\mu$ g de control de ADN genómico, se expresa como porcentaje.

Como se puede observar, la representación de secuencias c-jun amplificadas con hexámeros aleatorios del ADN calentado a 95 °C fue del 69 % (véase la barra (térmica) RH). La representación de secuencias c-jun amplificadas con cebadores anidados del ADN calentado a 95 °C fue de solo 3% (véase la barra (térmica) NP). La representación de secuencias c-jun en el ADN amplificado con hexámeros aleatorios sin tratamiento térmico del ADN de plantilla fue de 211 % (véase la barra (no térmica) RH). La representación de secuencias c-jun en el ADN amplificado con cebadores anidados sin tratamiento térmico del ADN de plantilla fue de 2828 % (véase la barra (no térmica) NP).

H. Ejemplo 8: Sesgo de amplificación de loci amplificados mediante MDA a partir de sangre completa

Este ejemplo demuestra que el ADN genómico puede amplificarse usando MDA directamente de la sangre completa o de células de cultivo tisular y que la representación del locus es sustancialmente la misma que para el ADN amplificado a partir de la plantilla de ADN genómico purificado. Este ejemplo ilustra lisis al someter las células a condiciones alcalinas (mediante la adición de una solución de lisis) sin ninguna lisis por calentamiento, estabilización del lisado celular (mediante la adición de una solución de estabilización) y amplificación por desplazamiento múltiple del ADN genómico en el lisado celular estabilizado. El lisado celular estabilizado se utiliza para la amplificación sin purificación del ADN genómico. Como control, se sometió a prueba el ADN amplificado en ausencia de la plantilla agregada y no contiene ninguna representación de secuencia detectable para estos loci.

El ADN se preparó a partir de la sangre o de una línea celular de cultivo tisular como sigue a continuación. Las muestras de sangre humana se obtuvieron del laboratorio Grove Hill. U266, una línea celular de mieloma, se obtuvo de la ATCC y se transfirió según el protocolo anexo. Las células se lisaron en una solución de lisis alcalina mediante una modificación de Zhang et al. (Zhang, L. et al. Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. Proc Natl Acad Sci EUA. 89, 5847-5851 (1992)). La sangre se diluyó 3 veces en PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 9,5 mM de Na, KP0<sub>4</sub>, pH 7,4) mientras que las células de cultivo tisular se diluyeron a 30.000 células/ml en PBS. La sangre o las células se lisaron mediante dilución con un volumen igual de tampón de lisis alcalina (400 Mm de KOH, 100 mM de ditiotreitil y 10 mM de EDTA) y se incubaron 10 minutos en hielo. Las células lisadas se neutralizaron con el mismo volumen de tampón de neutralización (400 mM de HCl, 600 mM de Tris-HCl, pH 7,5). Las preparaciones de sangre o células lisadas (1  $\mu$ l) se utilizaron directamente como plantilla en las reacciones MDA (100  $\mu$ l) como se describió.

Las reacciones MDA (100  $\mu$ l) se realizaron sin desnaturalización a 95 °C como se describe en el Ejemplo 5. Las reacciones con plantilla de ADN genómico humano purificado contuvieron 300 o 30 ng de ADN, lo que provoca aproximadamente una amplificación de ADN genómico de 100 o 1000 veces. Las reacciones que utilizan ADN de la sangre o células lisadas contenían 1  $\mu$ l de lisados celulares estabilizados como plantilla. Las reacciones de amplificación de control no contenían ningún ADN de plantilla agregado.

El análisis por PCR cuantitativa TaqMan® se realizó en muestras de ADN amplificado como se describe en el Ejemplo 5 y los resultados se muestran en la Figura 8. La representación relativa de ocho loci para el ADN a partir de cinco reacciones de amplificación diferentes se ilustra en la Figura 8. El eje Y es la representación del locus, expresada como porcentaje, con respecto al ADN genómico inicial, lo cual se calcula como el rendimiento del producto de PCR cuantitativa a partir 1  $\mu$ l de ADN amplificado dividido por el rendimiento de 1  $\mu$ g del control de ADN genómico. Las barras con diagonales decrecientes ilustran la representación del locus para el ADN amplificado a partir de la sangre completa. Las barras grises sólidas ilustran la representación del locus para el ADN amplificado a

partir de 30 ng de ADN genómico purificado (9.000 copias de genomas). Las barras blancas sólidas ilustran la representación del locus para el ADN amplificado a partir de 300 ng de ADN genómico purificado (90.000 copias de genomas). Las barras con diagonales crecientes ilustran la representación del locus para el ADN amplificado de células de cultivo tisular (10 equivalentes celulares de ADN). Las barras negras sólidas ilustran la representación del locus para el ADN amplificado a partir de reacciones sin ninguna plantilla agregada (los valores para los datos representados por las barras negras son tan pequeños que las barras no son visibles en la gráfica).

Como se puede observar, el ADN amplificado directamente de la sangre completa o de células de cultivo tisular sin purificación tiene sustancialmente los mismos valores para la representación del locus que el ADN amplificado a partir de la plantilla de ADN genómico purificado.

I. Ejemplo 9: El sesgo de amplificación de loci amplificados mediante MDA en reacciones que contienen AAdUTP es el mismo que el sesgo de amplificación del ADN amplificado en reacciones que contienen 100 % de dTTP.

Este ejemplo demuestra que el ADN genómico puede amplificarse usando MDA en reacciones que contienen AAdUTP (5-(3-aminoalil)-2'-desoxiuridina 5'-trifosfato, Sigma-Aldrich Co.) y que la representación del locus es sustancialmente la misma que para el ADN amplificado en reacciones que contienen solamente dTTP.

Las reacciones MDA (100 µl) que contienen 100 % dTTP se realizaron sin desnaturalización a 95 °C como se describe en el Ejemplo 5. Las reacciones que contienen 70 % de AAdUTP se realizaron en las mismas condiciones que las reacciones que contienen 100 % dTTP, con la excepción de que estas contenían 0,7 mM de AAdUTP y 0,3 mM de dTTP, en vez de 1,0 mM de dTTP estándar. Las reacciones contenían 1 ng de plantilla de ADN genómico humano, lo que provoca aproximadamente una amplificación de ADN de 30.000 veces.

El análisis por PCR cuantitativa TaqMan® se llevó a cabo en muestras de ADN amplificado como se describe en el Ejemplo 5 y la representación relativa de ocho loci para el ADN a partir de dos reacciones de amplificación se ilustra en la Figura 9. El eje Y es la representación del locus, expresada como porcentaje, con respecto al ADN genómico inicial, lo cual se calcula como el rendimiento del producto de PCR cuantitativa a partir de 1 µl de ADN amplificado dividido por el rendimiento de 1 µg de control de ADN genómico. Las barras negras ilustran la representación del locus para el ADN amplificado en una reacción que contiene 100 % de dTTP. Las barras blancas ilustran la representación del locus para el ADN amplificado en una reacción que contiene 30 % de dTTP/ 70 % de AAdUTP.

Como se puede observar, el ADN amplificado en reacciones que contienen 30 % de dTTP/70 % de AAdUTP tiene sustancialmente los mismos valores para la representación del locus que el ADN amplificado en reacciones que contienen 100 % de dTTP.

J. Ejemplo 10: Amplificación de secuencias c-jun a partir del ADN genómico humano mediante el uso de cebadores específicos para la secuencia y circularización de la diana.

Este ejemplo describe una realización del método descrito y el análisis de los productos de ADN resultantes. El método ejemplificado es la forma de amplificación por desplazamiento múltiple específica para el gen descrito de la amplificación por desplazamiento de cadena múltiple que usa cebadores específicos para la secuencia resistentes a la nucleasa y plantilla de ADN circularizada.

Las reacciones de amplificación se realizaron sin una etapa de desnaturalización térmica/apareamiento en las condiciones descritas en el Ejemplo 5, usando cebadores específicos para la secuencia, resistentes a la exonucleasa que se hibridan con las secuencias dentro de un fragmento EcoRI de 5,5 kb que contiene la secuencia c-jun. Los cebadores específicos para la secuencia utilizados en este ejemplo se enumeran en la Tabla 3. Un asterisco en la secuencia de nucleótidos indica la presencia de un enlace de fosforotioato. Los cebadores específicos para la secuencia están diseñados para hibridarse con cadenas opuestas en cada lado de la secuencia del gen c-jun, y los cebadores abarcan un fragmento de 2025 bp que contiene la secuencia del gen c-jun. Los cebadores tienen una separación de 150-400 nucleótidos entre sí en cada lado de la secuencia del gen c-jun. La región del ADN humano que abarca los sitios de reconocimiento para estos cebadores puede accederse desde Genbank usando el número de acceso AL136985 y abarca las posiciones 66962 a 68987 de la secuencia de nucleótidos.

Tabla 3

Cebadores izquierdos (5' a 3')

c-Jun D1	CTG AAA CAT CGC ACT AT*C *C	(SEQ ID NO:21)
c-Jun D2	CCA AAC TTT GAA ATG TT*T *G	(SEQ ID NO:22)
c-Jun D3	CTG CCA CCA ATT CCT GC*T *T	(SEQ ID NO:23)
c-Jun D4	CAT AAG CAA AGG CCA TC*T *T	(SEQ ID NO:24)

## ES 2 622 733 T3

c-Jun D5	GGA AGC AAT TCA AGA TC*T *G	(SEQ ID NO:25)
c-Jun D6	CTT CAG ATT GCA GCA AT*G *T	(SEQ ID NO:26)
c-Jun D7	GAA TTA ATG AAA TTG GG*A *G	(SEQ ID NO:27)
c-Jun D8	ACT GTT AGT TTC CAT AG*G *C	(SEQ ID NO:28)
c-Jun D9	CAA GGT TGA TTA TTT TA*G *A	(SEQ ID NO:29)
c-Jun D10	AGT ACT AGT TCA TGT TT*T *C	(SEQ ID NO:30)

Cebadores derechos (5' to 3')

c-Jun U1	TAG TAC TCC TTA AGA AC*A *C	(SEQ ID NO:31)
c-Jun U2	CTA ACA TTC GAT CTC AT*T *C	(SEQ ID NO:32)
c-Jun U3	GCG GAC GGG CTG TCC CC*G *C	(SEQ ID NO:33)
c-Jun U4	GGA AGG ACT TGG CGC GC*C *C	(SEQ ID NO:34)
c-Jun U5	AAC TAA AGC CAA GGG TA*T *C	(SEQ ID NO:35)
c-Jun U6	ATA ACA CAG AGA GAC A*G *A	(SEQ ID NO:36)
c-Jun U7	CAA CTC ATG CTA ACG CA*G *C	(SEQ ID NO:37)
c-Jun U8	GGA AGC TGG AGA GAA TC*G *C	(SEQ ID NO:38)
c-Jun U9	GAC ATG GAG TCC CAG GA*G *C	(SEQ ID NO:39)
c-Jun U10	AGG CCC TGA AGG AGG AG*C *C	(SEQ ID NO:40)

5 Se realizaron cuatro reacciones en las siguientes condiciones. El ADN humano (5 µg, depósitos de células Coriell) se digirió con 100 unidades de EcoRI durante 3 horas en 50 µl según las condiciones del fabricante. La endonucleasa EcoRI se inactivó mediante incubación a 65 °C durante 30 minutos. Los fragmentos de ADN digeridos (0,5 µg) se circularizaron en un volumen de 840 µl usando 1,7 de unidades (unidades Weiss) de la ligasa de ADN T4. La reacción se incubó durante 16 horas a 4 °C. Se realizó una ligación de simulacro en condiciones idénticas excepto por la omisión de la ADN ligasa. Se llevaron a cabo dos reacciones de amplificación que utilizan una parte de la mezcla ligada como plantilla (16.8 µl; 10 ng de ADN), una con cebadores específicos para la secuencia a una concentración de 2,5 µM cada uno y la otra con los demás cebadores a una concentración de 0,5 µM cada uno. Se obtuvieron dos reacciones de amplificación más que utilizan el ADN ligado mediante simulacro como plantilla con concentraciones de cebadores específicos para la secuencia de 2,5 µM y 0,5 µM. El α-[32P] dCTP marcado radioactivamente, aproximadamente 60 cpm/pmol de los dNTP en total, se agregó a las reacciones paralelas para cuantificar la síntesis de ADN. Las reacciones se incubaron durante 18 horas a 37 °C. Las reacciones que no contenían α-[32P] dCTP se analizaron mediante análisis por PCR cuantitativa TaqMan® como se describe en el Ejemplo 5. Se generó una curva estándar para la plantilla inicial a efectos de determinar la cantidad de copias del locus de la muestra de ADN amplificado con respecto a la del ADN genómico. La curva estándar se generó a partir de 0, 0,001, 0,01, 0,1, 0,5 y 1 µg de ADN genómico. Los resultados se muestran en la Figura 10. El eje Y es la representación del locus con respecto al ADN genómico inicial. Este se calcula como el rendimiento del producto de PCR cuantitativa a partir de 1 µg de ADN amplificado dividido por el rendimiento a partir de 1 µg de control de ADN genómico, expresado como porcentaje.

25 Como se puede observar, no se pudo detectar la representación de secuencias c-jun amplificadas con 2,5 µM de cebadores específicos para el gen a partir del ADN ligado (véase GS 2,5 + barra L). Tampoco se pudo detectar la representación de secuencias c-jun amplificadas con 2,5 µM de cebadores específicos para el gen a partir del ADN ligado mediante simulacro (véase GS 2,5 - barra L). La representación de secuencias c-jun en el ADN amplificado con 0,5 µM de cebadores específicos para el gen a partir del ADN ligado fue de 32000 % (véase GS 0,5 + barra L).

Además, tampoco se detectó la representación de secuencias c-jun en el ADN amplificado con 0,5  $\mu$ M de cebadores específicos para el gen a partir del ADN ligado mediante simulacro (véase GS 0,5 + barra L). Estos resultados demuestran una proporción de amplificación de 320 de las secuencias c-jun mediante el uso de cebadores específicos para el gen y ADN de plantilla circularizado. El ADN digerido que no se ligó no mostró ninguna amplificación apreciable. Solamente el ADN ligado que se amplificó con 0,5  $\mu$ M de cebadores se amplificó, mientras que el 2,5  $\mu$ M de cebadores no produjo ninguna amplificación.

La especificidad de la reacción de amplificación de ADN se realizó con 2,5  $\mu$ M de cebadores específicos para el gen y se probó la plantilla de ADN circularizado comparándola con la cantidad de amplificación de ADN observada en otros siete loci. El análisis por PCR cuantitativa TaqMan® se realizó como se describe en el Ejemplo 5 y los resultados se muestran en la Figura 11. Se ilustra la representación relativa del locus c-jun y otros siete loci y los siete loci mostraron solamente niveles bajos de amplificación, lo que indica que las secuencias c-jun se amplificaron específicamente usando los cebadores específicos para c-jun.

K. Ejemplo 11: Aumento de la calidad de la amplificación por desplazamiento múltiple del ADN genómico degradado mediante la reparación de la muestra dañada

Este ejemplo demuestra que la calidad del ADN amplificado en WGA aumenta cuando el ADN genómico dañado es tratado previamente con un método de reparación mediante desnaturalizado con 70 °C de calor en presencia de 15 mM de NaOH, reincorporando Tris-HCl, pH 4,0 y la muestra original a la muestra desnaturalizada, luego se enfría lentamente para hibridar el ADN dañado. El ADN<sub>g</sub> dañado se creó mediante la sonicación del ADN genómico intacto hasta una longitud promedio de 1 kb. Luego, esta muestra degradada se trató previamente con el método de reparación y se colocó en una reacción de amplificación por desplazamiento múltiple. La calidad de los productos de amplificación se evaluó a través de un ensayo Taqman que compara la representación de un locus particular en un cromosoma de 1  $\mu$ g del producto de amplificación con un ADN genómico estándar de 1  $\mu$ g que no ha sido amplificado. Este ejemplo demuestra que el ADN genómico dañado con el tratamiento de reparación tiene una mejora de 3 veces en la representación del locus de los productos amplificados en comparación con los productos amplificados del ADN genómico dañado sin el método de reparación.

El ADN genómico dañado se creó como se indica a continuación. La muestra de ADN genómico de Promega se diluyó a 100 ngs/ $\mu$ l en dH<sub>2</sub>O. La muestra se sometió a sonicación con un desmembrador sónico 550 mediante una configuración de Fisher Scientific de 40 % durante 9 segundos. La muestra se diluyó adicionalmente a 5 ng/ $\mu$ l y se utilizó un total de 25 ngs para desnaturalizar con 15 mM de NaOH final y se calentó a 70 °C durante 5 minutos. A los 70 °C, se agregó Tris-HCl, pH 4,0 para crear un pH final de 8,0 y se agregaron también 25 ng de muestras desnaturalizadas originales y naturales. La amplificación mediante síntesis por desplazamiento múltiple se realizó en el ADN dañado reparado y el ADN dañado, y un ADN intacto de control. Los resultados en la Figura 12 muestran que la reparación del ADN dañado mejoró considerablemente la amplificación de la muestra dañada en comparación con la amplificación del ADN dañado sin reparación.

L. Ejemplo 12: Aumento de la calidad de la amplificación por desplazamiento múltiple de muestras de ADN genómico real dañadas por almacenamiento prolongado mediante la reparación de la muestra dañada.

Este ejemplo demuestra que la calidad del producto amplificado mediante amplificación por desplazamiento múltiple de muestras de ADN genómico dañadas por almacenamiento prolongado mejoró con el método de reparación.

Las muestras de ADN genómico dañadas fueron tratadas previamente con un método de reparación mediante desnaturalización con 70 °C de calor en presencia de 15 mM de NaOH, reincorporando Tris-HCl, pH 4,0 y la muestra original a la muestra desnaturalizada, enfriándolas lentamente para hibridar el ADN dañado, luego colocándolas en una reacción de amplificación por desplazamiento múltiple. Se evaluó la calidad de los productos de amplificación a través de un ensayo Taqman como se describe en el Ejemplo 11.

Como se observa en la Figura 13, la calidad de los productos de amplificación de las muestras de ADN genómico dañado una vez reparadas mejora considerablemente. En promedio, se observó una mejora de 3 veces en la calidad de los productos de amplificación.

M. Ejemplo 13: Optimización de la etapa de desnaturalización: fuerza iónica, calor y NaOH provocan una mejor reparación

Este ejemplo demuestra que la fuerza iónica, el calor y NaOH son útiles para la etapa de desnaturalización en el método descrito para reparar y amplificar el ADN dañado. Las muestras de ADN dañado se prepararon como se indica a continuación: las muestras de ADN se diluyeron en dH<sub>2</sub>O a 5 ng/ $\mu$ l y se calentaron a 70 °C durante 5 minutos lo cual degrada las muestras en fragmentos más pequeños. Las muestras de ADN calentadas se enfriaron lentamente y se llevó a cabo la amplificación por desplazamiento múltiple en estas muestras. Un análisis Taqman de los productos de amplificación a partir del sustrato de ADN calentado mostró que el uso de una solución iónica condujo a más degradación del ADN, lo cual conduce en última instancia a una insuficiente amplificación de estas muestras.

Para determinar si al calentar el ADN dañado en presencia de sal puede mejorar la amplificación de este sustrato, el

- ADN dañado (25 ngs) se calentó a 70 °C en presencia de una sal (Tris-EDTA (10 mM de Tris pH 8,0 y 1 mM de EDTA)) durante 3 minutos, se reincorporaron 25 ngs de la muestra dañada natural y luego se enfrió la muestra. Este método mostró alguna mejora en la reparación del ADN dañado. Cuando se agregaron 25 mM finales de NaOH a la reacción antes de la etapa de calentamiento, esto mejoró el método de reparación brindando reparación consistente del ADN dañado. Esto se realizó diluyendo el ADN dañado en Tris-EDTA (TE) a 5 ng/μl, se agregaron 25 ngs de DNA a una concentración final de NaOH de 25 mM, la muestra se calentó a 70 °C durante 3 minutos, se agregó Tris-HCl, pH 4,0 para reducir el pH a 8,0, se reincorporaron 25 ngs de la muestra de ADN dañado natural original y la mezcla se enfrió a temperatura ambiente. La reparación con calor, Tris y NaOH proporcionó una mejor representación del locus que la no reparación y reparación con tratamientos de calor y Tris solamente.
- 5
- 10 N. Ejemplo 14: La etapa de neutralización del método de reparación mejora la amplificación de la muestra de ADN dañado.
- Este ejemplo demuestra que la neutralización del método de reparación es importante para una mejor calidad de los productos de amplificación. La muestra de ADN dañado se preparó de la siguiente manera: una muestra de ADN se diluyó en dH<sub>2</sub>O a 10 ng/μl y se calentó a 70 °C durante 5 minutos para crear muestras de ADN dañado. La muestra de ADN calentada se diluyó a 5 ngs/μl en TE, se agregaron 25 ngs de ADN dañado a los 25 mM de NaOH finales, se calentó a 70 °C durante 3 minutos y se neutralizó con Tris-HCl, pH 4,0 a un pH de 8,0 y se enfrió lentamente o se enfrió lentamente sin neutralización. Se llevaron a cabo las reacciones de amplificación de estas muestras y se analizó la calidad de los productos a través del análisis Taqman. La reparación con neutralización proporcionó una mejor reparación del locus que la no reparación y reparación sin tratamientos de neutralización.
- 15
- 20 Se entiende que la invención descrita no se encuentra limitada a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente tiene el fin de describir las realizaciones particulares solamente y no pretende limitar el alcance de la presente invención que estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.
- 25 Debe observarse que tal como se utilizan en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una» y «el» o «la», incluyen las referencias plurales salvo que en el contexto se indique claramente de otro modo. Por consiguiente, por ejemplo, la referencia a «una célula hospedadora» incluye una pluralidad de dichas células hospedadoras, la referencia al «anticuerpo» incluye la referencia a uno o más anticuerpos y equivalentes de ellos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.
- 30 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen los mismos significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece la invención descrita. Si bien en la práctica o prueba de la presente invención se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen en la presente. Las publicaciones citadas en la presente y el material con respecto a los que fueron citadas se incorporan específicamente por referencia. Ningún contenido de la presente debe interpretarse como una admisión de que la
- 35 invención no tiene derecho a preceder a dicha descripción en virtud de la invención anterior.
- Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar a través de experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente. Se pretende que dichos equivalentes se encuentren comprendidos en las reivindicaciones que figuran a continuación.

**Listado de secuencias**

- <110> Molecular Staging, Inc.  
 Frank B. Dean  
 Roger S. Lasken  
 5 Linhua Fang  
 A. Fawad Faruqi  
 Osama A. Alsmadi  
 Mark D. Driscoll  
 Seiyu Hosono  
 10 Michele Wisniewski  
 Wanmin Song
- <120> AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS
- <130> 13172.0012P1
- <150> 09/997,868  
 15 <151> 2001-10-15
- <160> 40
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1  
 <211> 19  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética
- 25 <400> 1  
 tccatcacga gttatgcac 19
- <210> 2  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética
- 35 <400> 2  
 tggagtact aaggaagc 19
- <210> 3  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
- 40 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética
- <400> 3  
 actgagtca tgaaccctc 19
- 45 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
 50 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética

<400> 4  
 attaactcat tgaaggccc 19  
  
 <210> 5  
 <211> 19  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética  
  
 10 <400> 5  
 tctgtgctgt actgttgc 19  
  
 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética  
  
 20 <400> 6  
 agtttgcaa actgggctc 19  
  
 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 25 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética  
  
 <400> 7  
 tggctcttgg tatgaaaag 19  
  
 30 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 35 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética  
  
 <400> 8  
 actgttagtt tccatagc 19  
  
 <210> 9  
 40 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética  
  
 45 <400> 9  
 tgaatacatt tatttgac 19  
  
 <210> 10  
 <211> 19  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>

- <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética
- <400> 10  
cgactgtagg agggcagcg 19
- 5 <210> 11  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
10 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética
- <400> 11  
cgtcagccca caatgcacc 19
- 15 <210> 12  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
20 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética
- <400> 12  
gtacttgat tctcagcct 19
- 25 <210> 13  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
30 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética
- <400> 13  
caaatctctc ggcttctac 19
- 35 <210> 14  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
40 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética
- <400> 14  
cgtgtgtgt taagcgtgt 19
- 45 <210> 15  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
45 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética
- <400> 15  
ccgcgaaaa ggaaccact 19
- 50 <210> 16  
<211> 19  
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética

5 <400> 16  
ctcctggcag cccagtgag 19

<210> 17  
<211> 19  
<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética

<400> 17

15 ctcctcccct cgatgcttc 19

<210> 18  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética

<400> 18  
cagttaccct ctgcagatc 19

25 <210> 19  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética

<400> 19  
ctatttcctc tgcagataa 19

<210> 20

35 <211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética

<221> misc\_feature  
<222> 11-16  
<223> N = a, g, c, or t (u)

<400> 20

45 ccgactogag nnnnnnatgt gg 22

<210> 21  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

50 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética

<400> 21  
 ctgaaacatc gcactatcc 19

<210> 22  
 <211> 19  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética

10 <400> 22  
 ccaaactttg aaatgttg 19

<210> 23  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética

20 <400> 23  
 ctgccaccaa ttctgctt 19

<210> 24  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética

<400> 24  
 cataagcaaa ggccatctt 19

30 <210> 25  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 35 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética

<400> 25  
 ggaagcaatt caagatctg 19

40 <210> 26  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 45 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética

<400> 26  
 cttcagattg cagcaatgt 19

<210> 27  
 <211> 19  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

- <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética
- <400> 27  
gaattaatga aattgggag 19
- 5 <210> 28  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
10 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética
- <400> 28  
actgtagtt tccataggc 19
- 15 <210> 29  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
20 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética
- <400> 29  
caaggtgat tattttaga 19
- <210> 30  
<211> 19  
25 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- <220>  
30 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética
- <400> 30  
agtactagtt catgttttc 19
- <210> 31  
<211> 19  
<212> ADN  
35 <213> Secuencia Artificial
- <220>  
40 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética
- <400> 31  
tagtactcct taagaacac 19
- <210> 32  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 45 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética
- <400> 32  
ctaacattcg atctcattc 19
- 50 <210> 33  
<211> 19  
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética  
 5 <400> 33  
 gcggacgggc tgtccccg 19  
 <210> 34  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética  
 <400> 34  
 15 ggaaggactt ggcgcgcc 19  
 <210> 35  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220> >  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética  
 <400> 35  
 aactaaagcc aaggatc 19  
 25 <210> 36  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 30 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética  
 <400> 36  
 ataacacaga gagacaga 18  
 <210> 37  
 35 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética  
 <400> 37  
 caactcatgc taacgcgc 19  
 <210> 38  
 <211> 19  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
 construcción sintética  
 50 <400> 38  
 ggaagctgga gagaatcg 19

<210> 39  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

5 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética

<400> 39  
gacatggagt cccaggagc 19

10 <210> 40  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
15 <223> Descripción de Secuencia Artificial; Nota =  
construcción sintética

<400> 40  
aggcctgaa ggaggagcc 19

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para amplificar un genoma completo, cuyo método comprende,
  - 5 exponer células a condiciones alcalinas para formar un lisado celular, en donde el lisado celular comprende un genoma completo, reducir el pH del lisado celular para formar el lisado celular estabilizado, e incubar el lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la replicación del genoma, en donde la replicación del genoma da lugar a cadenas replicadas en donde, durante la replicación, al menos una de las cadenas replicadas se desplaza del genoma mediante replicación por desplazamiento de cadena de otra cadena replicada.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde las células son expuestas a condiciones alcalinas mezclando las células con una solución de lisis.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la solución de lisis comprende una base.
- 15 4. El método de la reivindicación 3, en donde la base es hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, acetato de potasio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, hidróxido de magnesio, carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, carbonato de calcio, amoníaco, anilina, bencilamina, n-butilamina, dietilamina, dimetilamina, difenilamina, etilamina, etilendiamina, metilamina, N-metilánilina, morfina, piridina, trietilamina, trimetilamina, hidróxido de aluminio, hidróxido de rubidio, hidróxido de cesio, hidróxido de estroncio, hidróxido de bario o DBU (1,8-diazobicyclo[5,4,0]undec-7-eno).
5. El método de la reivindicación 3 en donde la solución de lisis comprende múltiples agentes básicos.
6. El método de la reivindicación 2 en donde la solución de lisis comprende 400 Mm de KOH, 100 mM de ditiotreitól
  - 20 y 10 mM de EDTA.
7. El método de la reivindicación 2 en donde la solución de lisis comprende un tampón.
8. El método de la reivindicación 7 en donde el tampón es un tampón de fosfato, tampón Good, BES, BICINE, CAPS, EPPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, TAPS, TES, TRICINE, cacodilato de sodio, citrato de sodio, acetato de trietilamonio, bicarbonato de trietilamonio, Tris, Bis- tris o Bis-tris propano.
- 25 9. El método de la reivindicación 8 en donde la solución de lisis comprende múltiples agentes amortiguadores.
10. El método de la reivindicación 1 en donde el pH del lisado celular se reduce hasta el intervalo de aproximadamente pH 7,0 a aproximadamente pH 6,8.
11. El método de la reivindicación 1 en donde el pH del lisado celular se reduce mezclando el lisado celular con una solución de estabilización.
- 30 12. El método de la reivindicación 11 en donde la solución de estabilización comprende un tampón.
13. El método de la reivindicación 12 en donde el tampón es un tampón de fosfato, tampón Good, BES, BICINE, CAPS, EPPS, HEPES, MES, MOPS, PIPES, TAPS, TES, TRICINE, cacodilato de sodio, citrato de sodio, acetato de trietilamonio, bicarbonato de trietilamonio, Tris, Bis- tris o Bis-tris propano.
14. El método de la reivindicación 13 en donde el tampón es Tris-HCl a pH 4,1.
- 35 15. El método de la reivindicación 12 en donde la solución de estabilización comprende múltiples agentes amortiguadores.
16. El método de la reivindicación 11 en donde la solución de estabilización comprende un ácido.
17. El método de la reivindicación 16 en donde el ácido es ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido acetilsalicílico, ácido ascórbico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido perclórico, HF, HBr, HI, H<sub>2</sub>S, HCN, HSCN, HClO, ácido monocloroacético, ácido dicloroacético, ácido tricloroacético o un ácido carboxílico.
- 40 18. El método de la reivindicación 11 en donde la solución de estabilización comprende múltiples agentes ácidos.
19. El método de la reivindicación 1 en donde el pH del lisado celular se reduce a aproximadamente pH 9,0 o menos.
- 45 20. El método de la reivindicación 1 en donde el pH del lisado celular se reduce hasta el intervalo de aproximadamente pH 9,0 a aproximadamente pH 6,0.
21. El método de la reivindicación 1 en donde la incubación es isotérmica.

22. El método de la reivindicación 1 en donde el lisado celular, el lisado celular estabilizado y las células no se calientan sustancialmente por encima de la temperatura de la incubación.
23. El método de la reivindicación 1 en donde ni el lisado celular ni el lisado celular estabilizado se calienta por encima de una temperatura y durante un tiempo que provocaría la desnaturalización del genoma.
- 5 24. El método de la reivindicación 2 en donde el pH del lisado celular se reduce mezclando el lisado celular con una solución de estabilización, en donde la solución de lisis consiste 400 mM de KOH y 10 mM de EDTA, en donde la solución de estabilización consiste en 800 mM de Tris-HCl, pH 4, en donde el lisado celular estabilizado se incuba en presencia de 37,5 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM de desoxinucleótidos trifosfatos, 50 μM de cebadores y ADN polimerasa Φ29 .
- 10 25. El método de la reivindicación 24 en donde el lisado celular estabilizado se incuba en presencia de 37,5 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM de desoxinucleótidos trifosfatos, 50 μM de cebadores y ADN polimerasa Φ29 mezclando el lisado celular estabilizado con un cuarto volumen de mezcla de reacción, y ADN polimerasa Φ29, en donde la mezcla de reacción consiste en 150 mM de Tris-HCl, 200 mM de KCl, 40 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 mM de desoxinucleótidos trifosfatos y 0,2 mM de cebadores.
- 15 26. El método de la reivindicación 1 que comprende además luego de la exposición de las células a condiciones alcalinas, exponer una primera parte del lisado celular a condiciones que promueven la desnaturalización sustancial del ADN en la primera parte del lisado celular, en donde reducir el pH de lisado celular comprende reducir el pH de la primera parte del lisado celular para formar un primer lisado celular estabilizado y reducir el pH de una segunda parte del lisado celular para formar un segundo lisado celular estabilizado, luego de la reducción del pH del lisado celular, mezclar el segundo lisado celular estabilizado con el primer lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la desnaturalización temporal de los extremos del ADN en el segundo lisado celular estabilizado y que mantiene la desnaturalización sustancial del ADN en el primer lisado celular estabilizado, formando así una mezcla de lisado celular estabilizado, y antes de incubar el lisado celular estabilizado, enfriar la mezcla de lisado celular estabilizado en condiciones que promueven el apareamiento de los extremos del ADN desnaturalizado temporalmente con el ADN desnaturalizado sustancialmente, en donde incubar el lisado celular estabilizado en condiciones que promueven la replicación del genoma promueve también la replicación del ADN, en donde los extremos apareados del ADN preparan la replicación, en donde la replicación del ADN da lugar a la reparación de las cadenas replicadas.
- 20
- 25

Figura 1

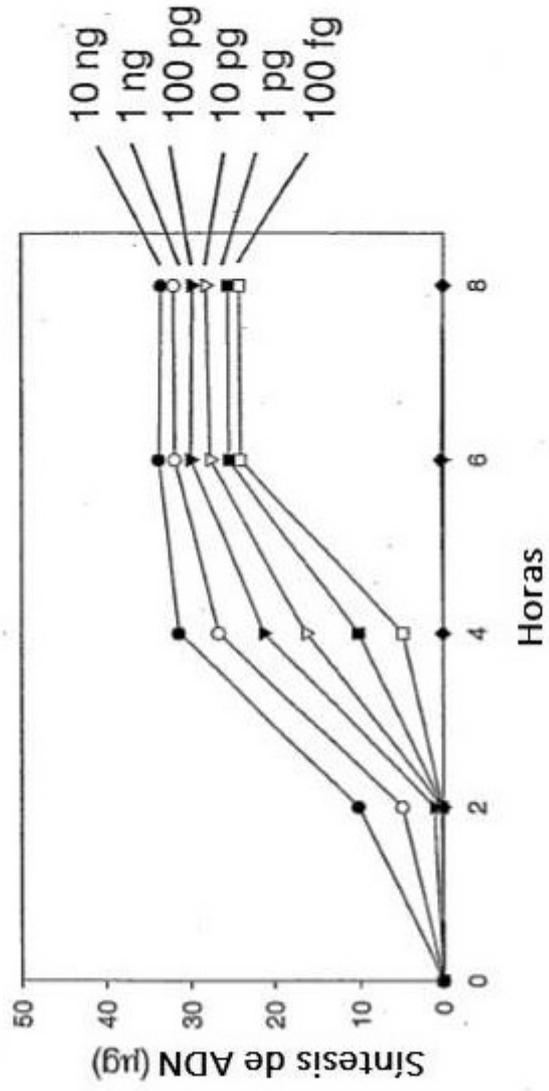


Figura 2

Efecto del tiempo a 95 grados en la longitud promedio del ADN de plantilla

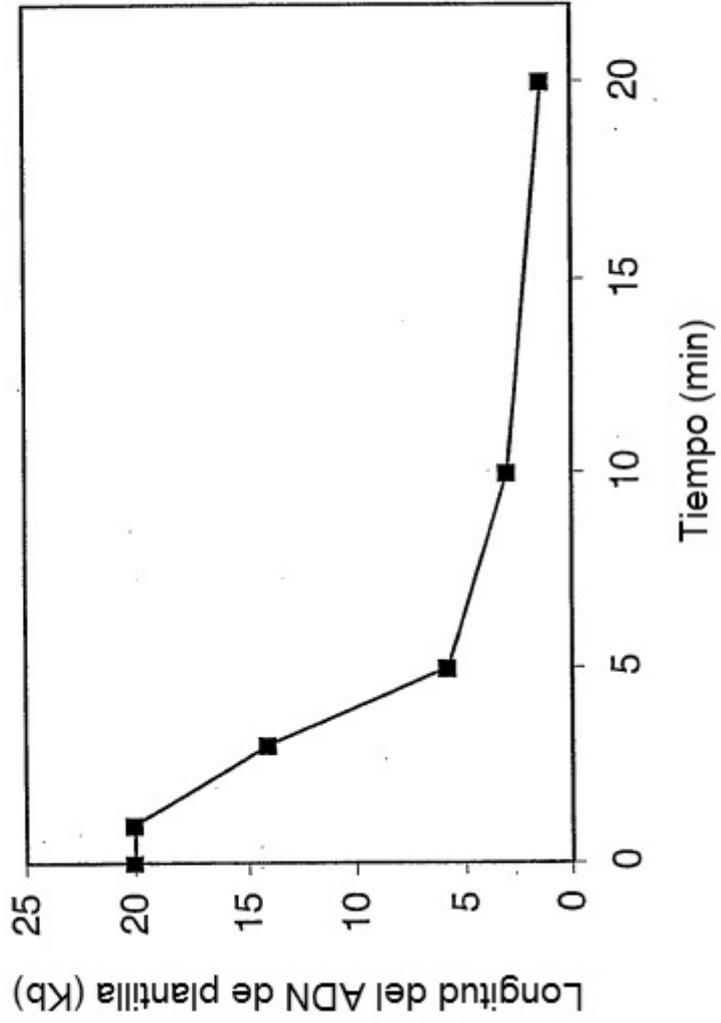


Figura 3

Efecto del tiempo a 95 grados sobre la velocidad y el rendimiento de la MDA

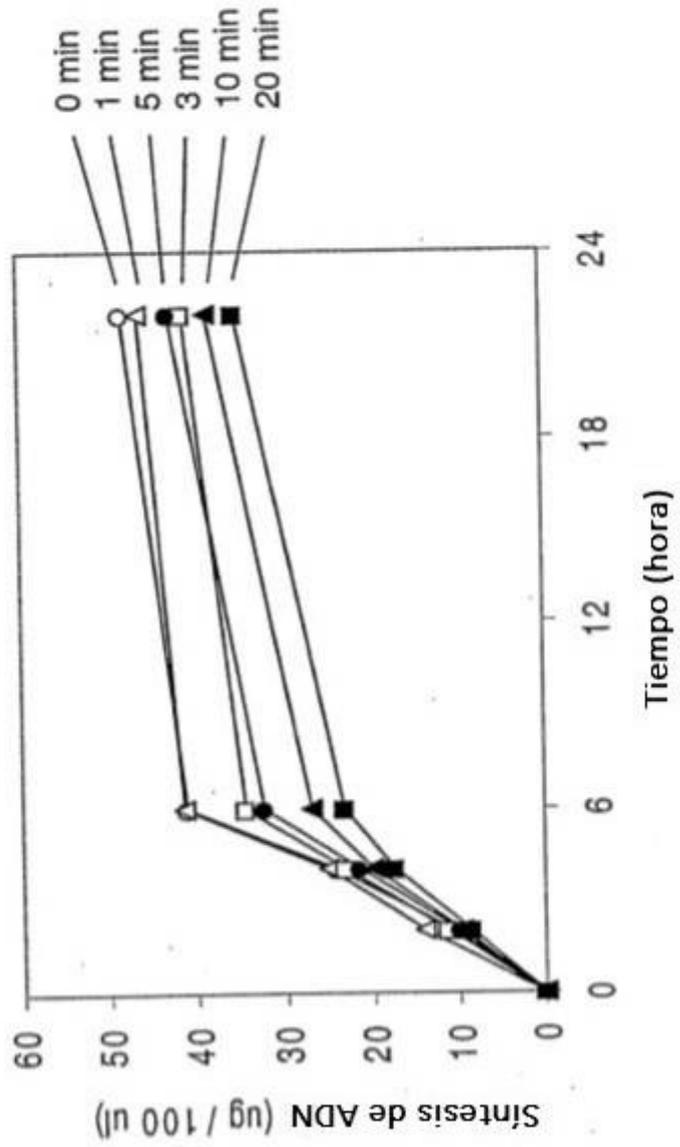
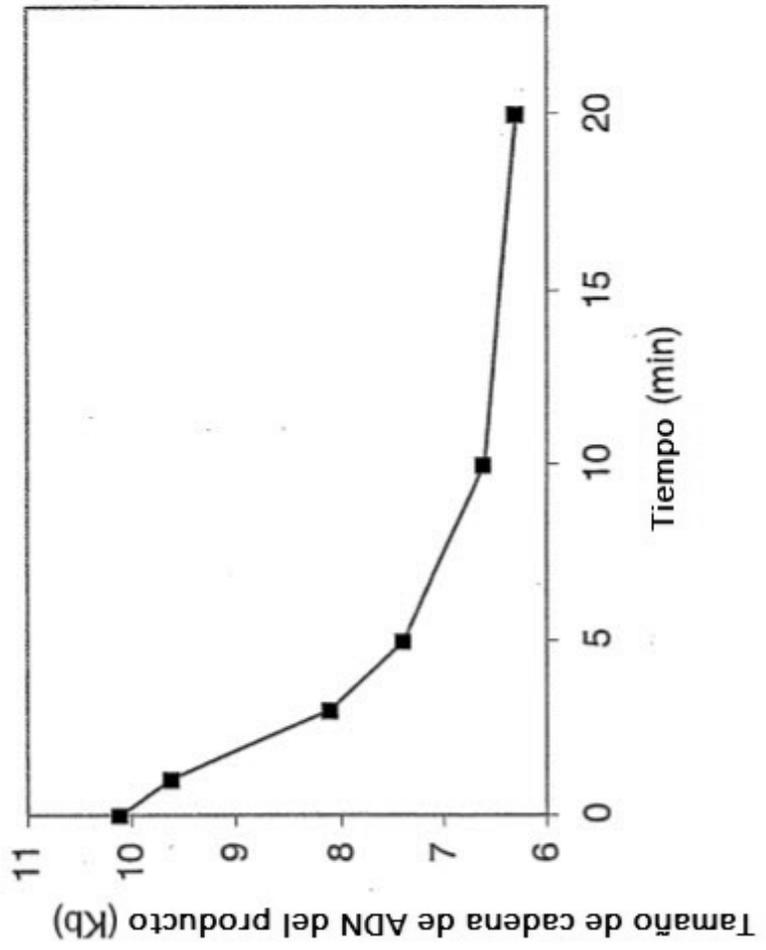


Figura 4

Efecto del tiempo a 95 grados sobre tamaño promedio de la cadena de ADN del producto



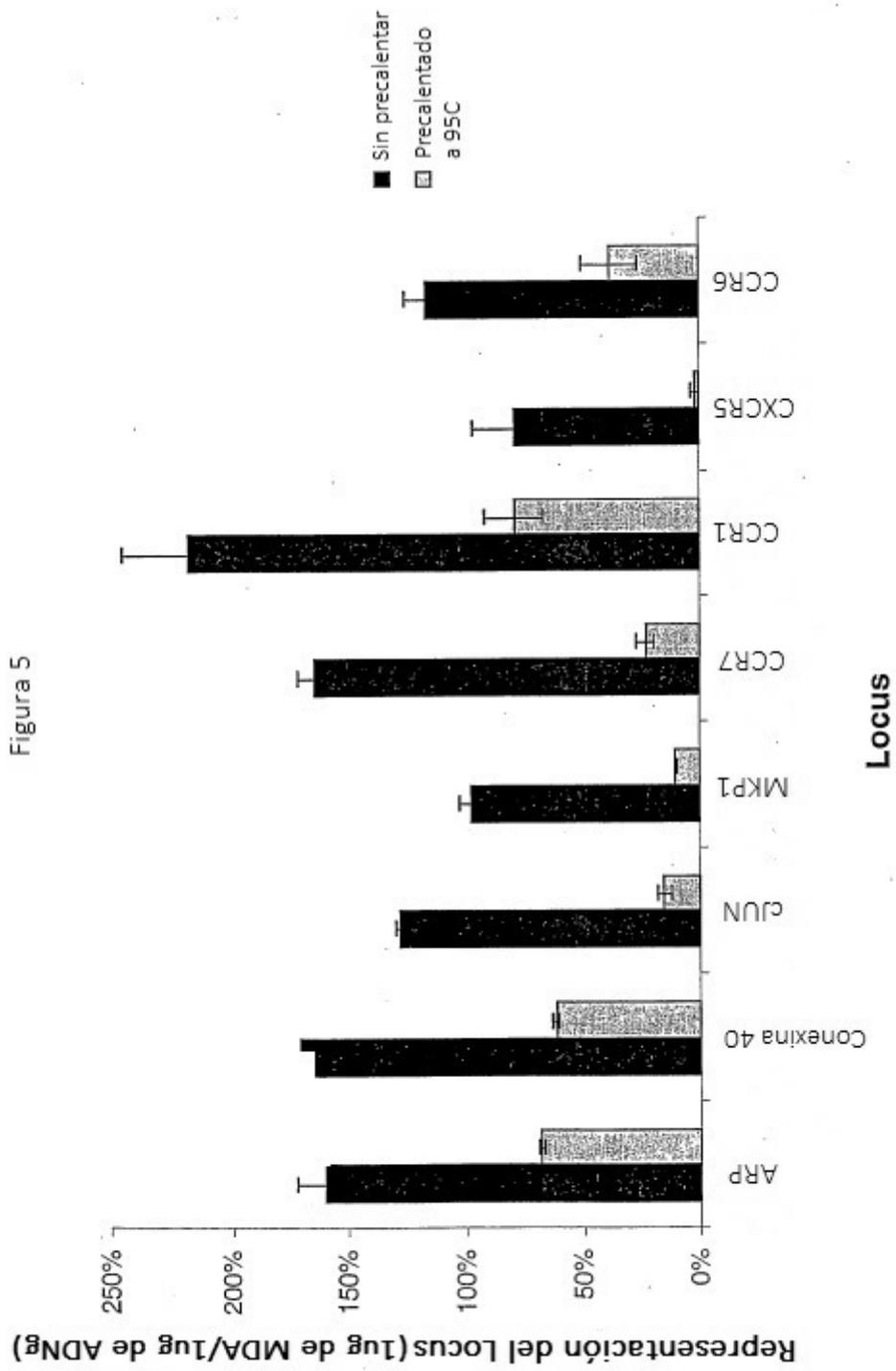


Figura 6

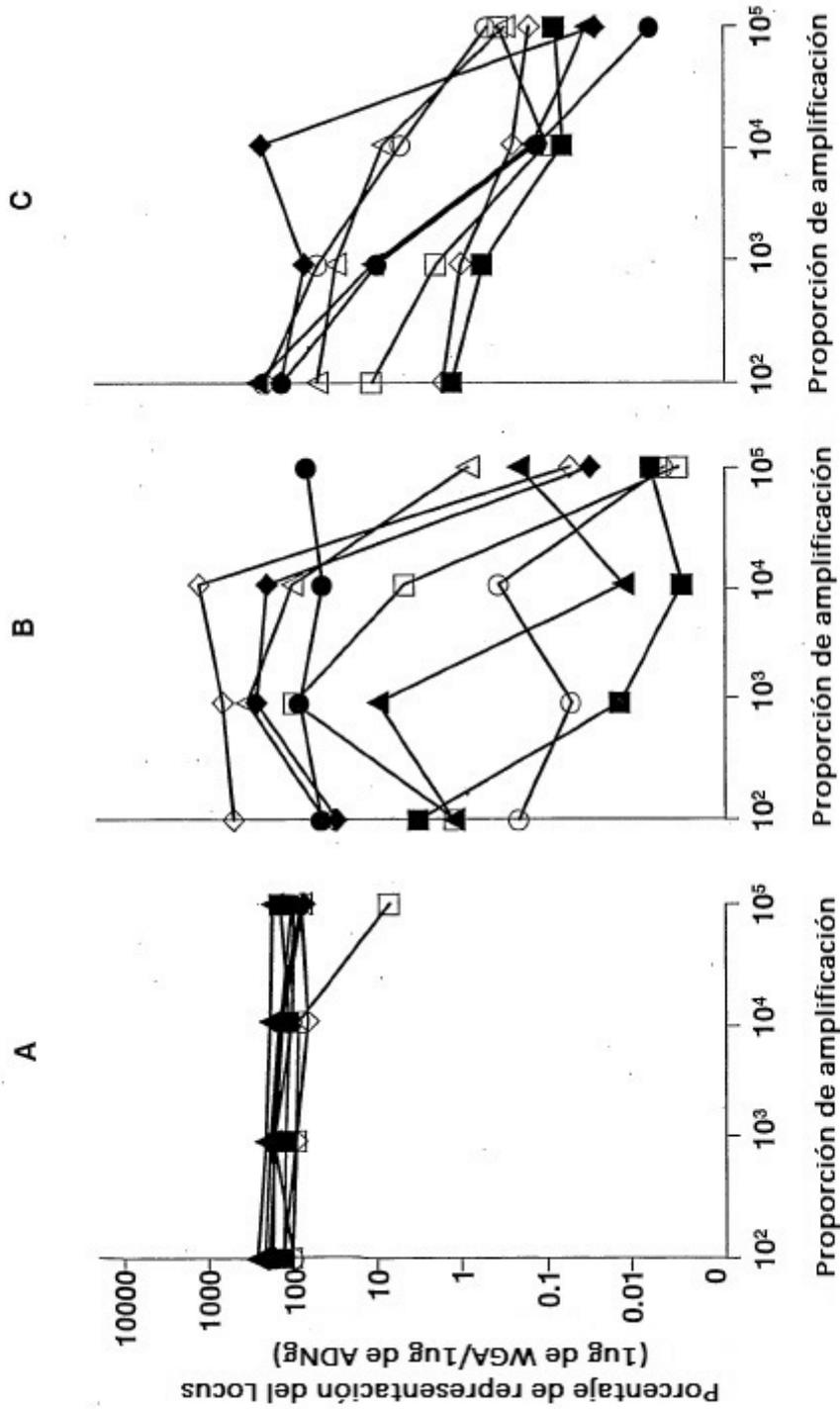


Figura 7

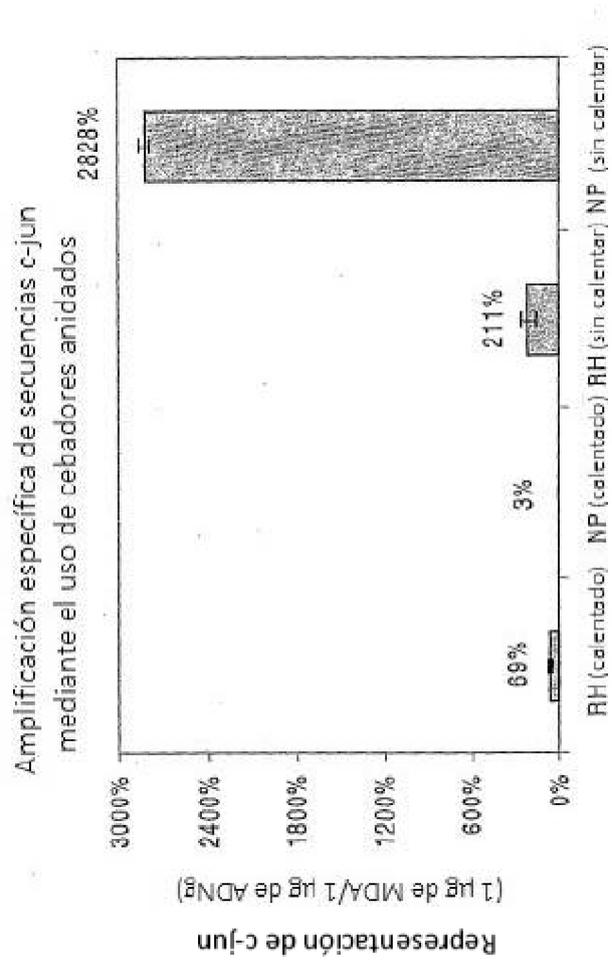


Figura 8

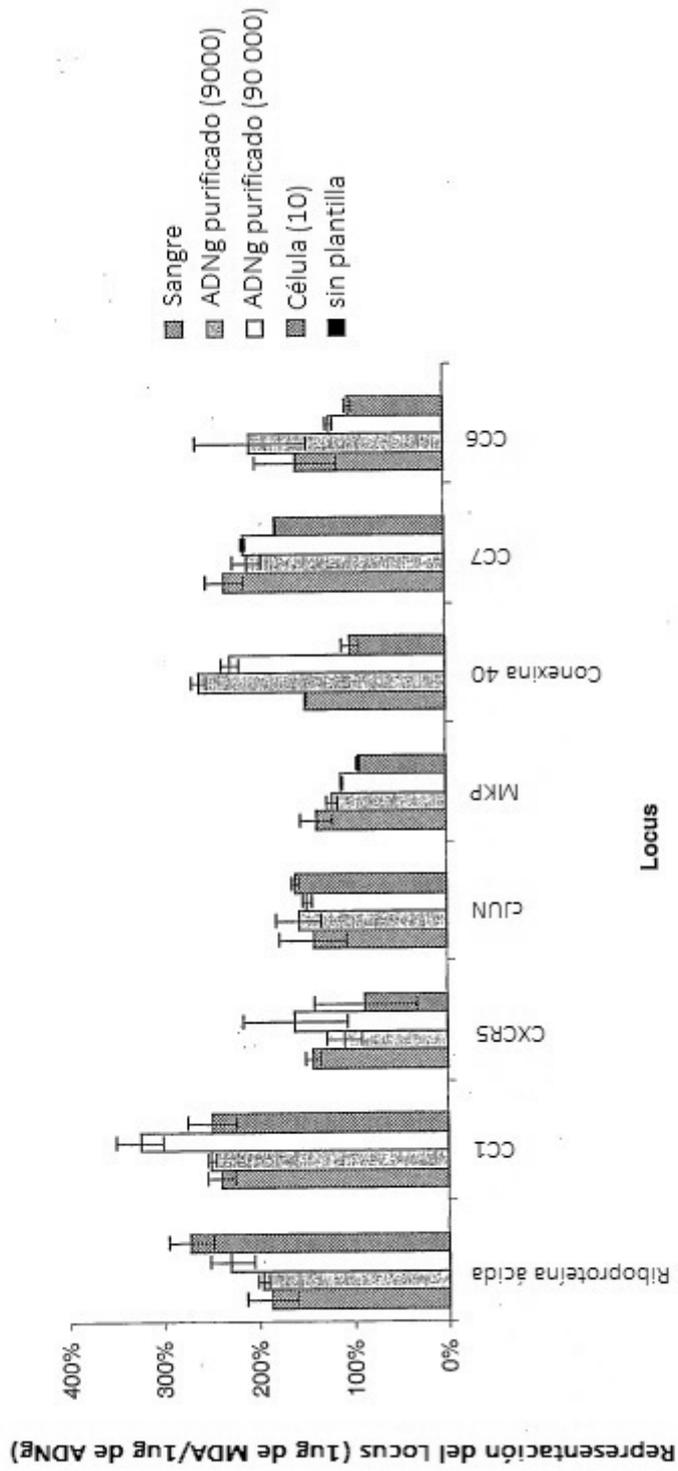
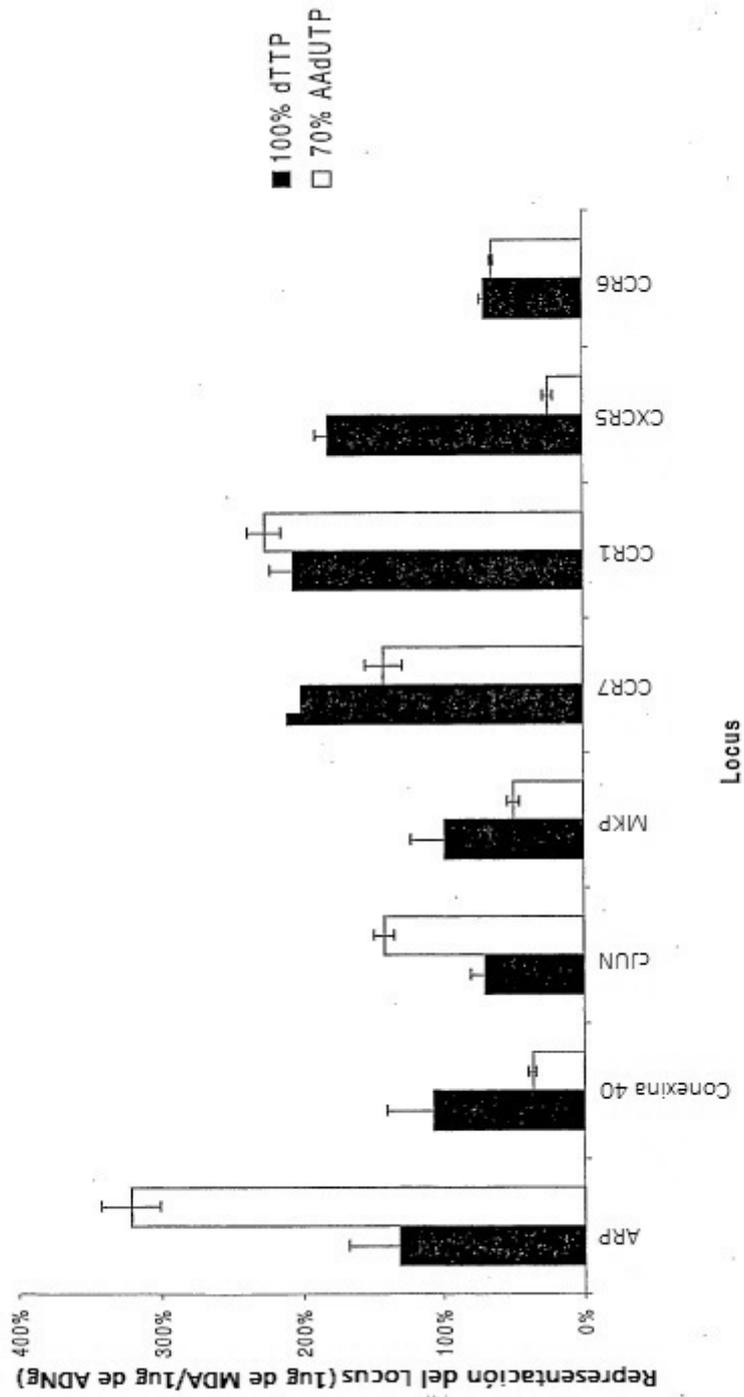
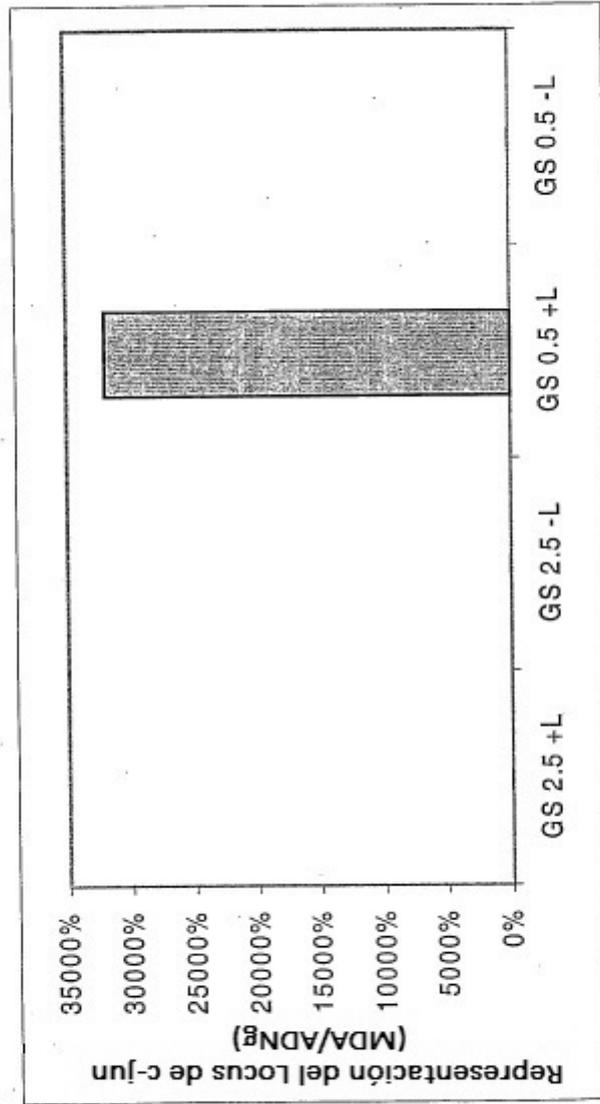


Figura 9

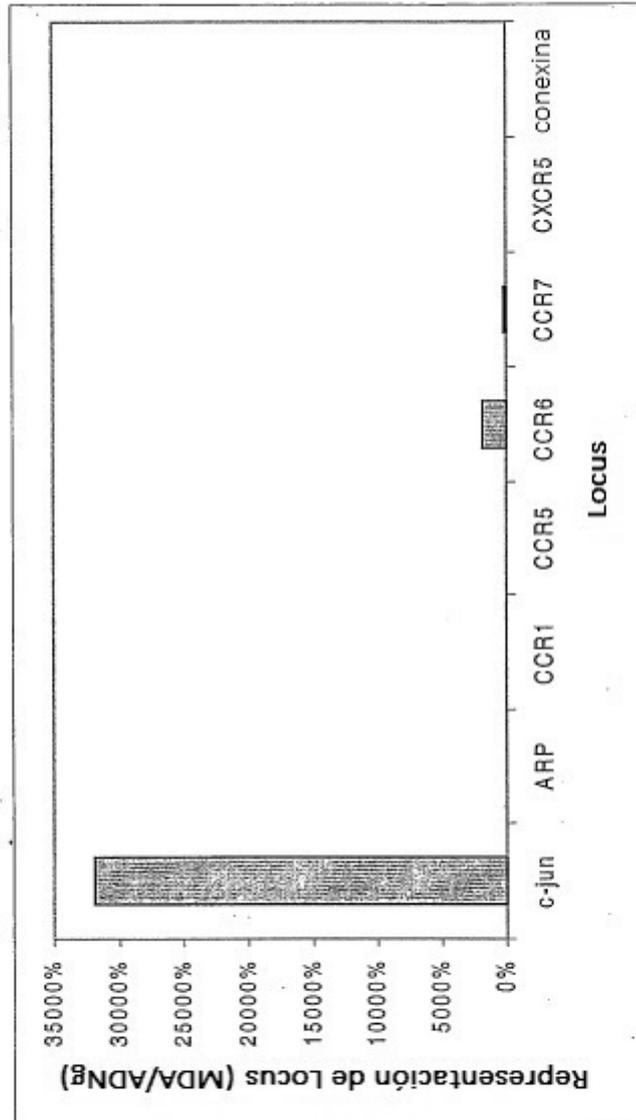


**Figura 10**

Amplificación de secuencia c-jun mediante el uso de MDA específica del gen



**Figura 11**  
**Amplificación específica de secuencias c-jun**  
**de ADN genómico humano**



Método de reparación mejora las muestras de ADNg  
sonicado en la reacción WGA

Comparación de Amplificación por Desplazamiento Múltiple (MDA)  
con o sin el Método de Reparación

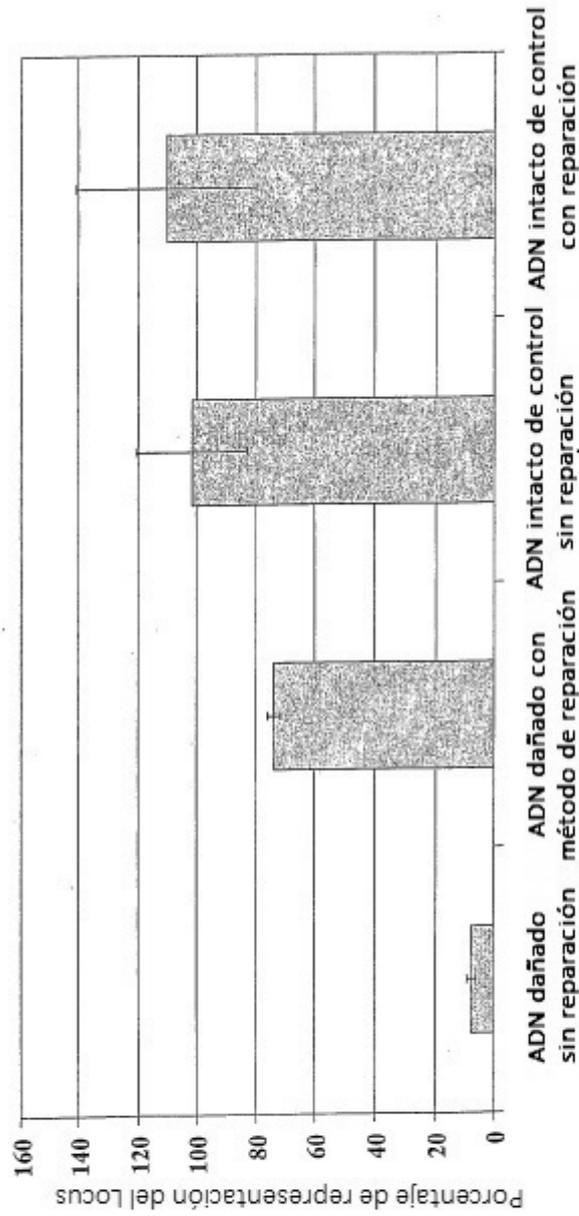


FIG. 12

Recuperación de muestras de ADNg dañado en  
Reacción de Amplificación de Genoma Completo

Análisis Taqman de Amplificación por Desplazamiento  
Múltiple de 40 muestras con o sin el  
tratamiento de recuperación

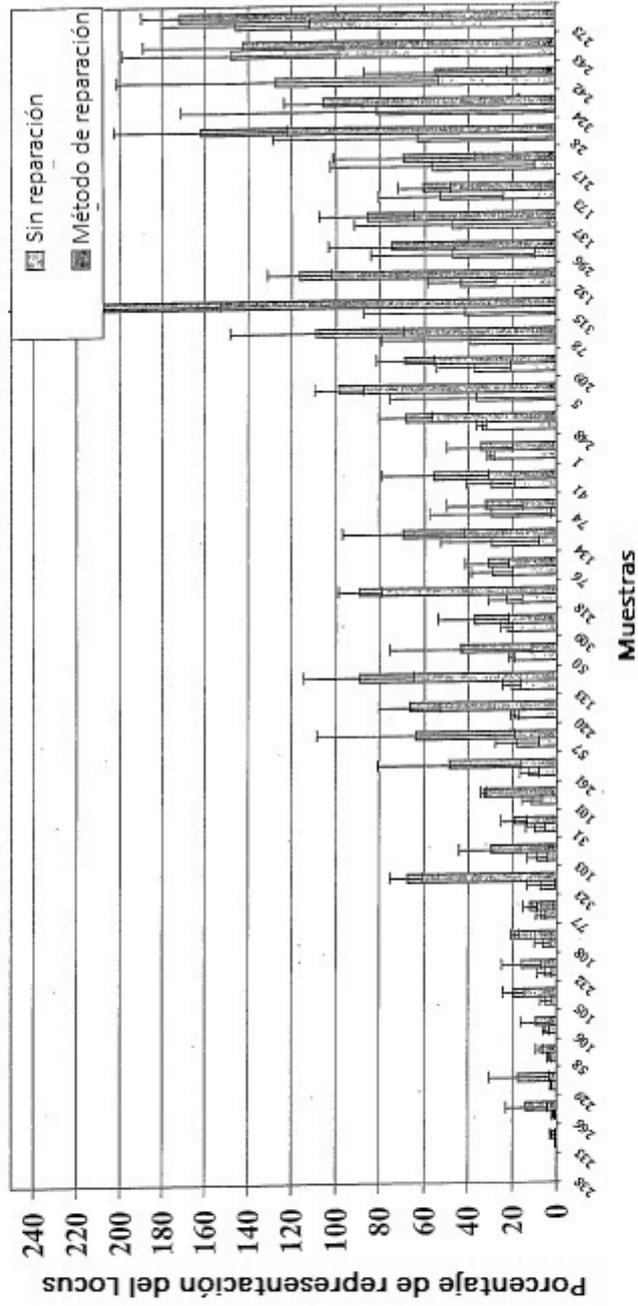


FIG. 13