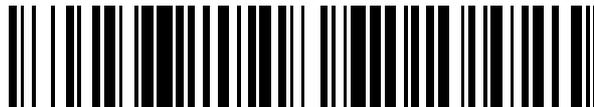


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 739**

51 Int. Cl.:

C12P 19/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010** **E 15167348 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017** **EP 2957641**

54 Título: **Amplificación por desplazamiento múltiple**

30 Prioridad:

15.10.2009 US 252065 P

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

03.08.2017

73 Titular/es:

**IBIS BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
2251 Faraday Avenue Suite 150
Carlsbad, CA 92008, US**

72 Inventor/es:

**ESHOO, MARK W.;
PICURI, JOHN y
PHILLIPSON, CURTIS**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 628 739 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 por desplazamiento múltiple**CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención está relacionada con el campo de la amplificación de ácidos nucleicos y, más particularmente, con los métodos para realizar reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 En la investigación y el diagnóstico genéticos, y en las investigaciones forenses, la escasez de ADN genómico puede ser un factor que limita gravemente el tipo y la cantidad de pruebas genéticas que pueden realizarse con una muestra. Un enfoque diseñado para superar este problema es la amplificación del genoma completo. El objetivo es amplificar una muestra limitada de ADN de forma no específica para producir una nueva muestra que no se puede distinguir de la original, pero que tiene una mayor concentración de ADN. El objetivo de una técnica habitual de amplificación del genoma completo es amplificar una muestra hasta llegar a un nivel suficiente para realizar múltiples pruebas y procedimientos de almacenamiento o archivado, a la vez que se conserva una representación exacta de la secuencia original.

20 Los primeros métodos de amplificación del genoma completo se describieron en 1992 y se basaban en los principios de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Zhang y sus colaboradores (Zhang et al. Proc. Natl. Acad. Sci., EE UU, 1992, 89, 5847-5851) desarrollaron la primera técnica de amplificación de la PCR mediante partidores (PEP, por sus siglas en inglés) y Telenius y sus colaboradores (Telenius et al., Genomics, 1992, 13, 718-725) diseñaron el método de la PCR que utiliza iniciadores de oligonucleótidos degenerados (DOP-PCR).

25 La PEP requiere de un número elevado de ciclos de PCR que usan la polimerasa Taq y 15 cebadores o partidores de referencia al azar que se hibridan o alinean a temperaturas no muy severas. A pesar de que el protocolo de la PEP se ha mejorado en diversos aspectos, todavía ofrece una cobertura incompleta del genoma, y falla a la hora de amplificar ciertas secuencias como las repetidas. El fracaso a la hora de preparar -o cebar- y amplificar regiones que contienen repeticiones puede dar como resultado una representación incompleta de un genoma entero, ya que la cobertura constante con partidores a lo largo de la longitud del genoma es necesaria para obtener una representación completa del genoma. Este método también tiene una eficacia limitada con muestras muy pequeñas (como células únicas). Además, el uso de la polimerasa Taq se optimiza para obtener un producto con una longitud máxima de alrededor de 3 kb. El DOP-PCR es un método que usa la polimerasa Taq y oligonucleótidos semidegenerados que se unen a una baja temperatura de hibridación en, aproximadamente, un millón de sitios del genoma humano. Después de los primeros ciclos, hay un gran número de ciclos con una temperatura de hibridación mayor, lo que solo permite la amplificación de los fragmentos que se habían marcado o identificado en el primer paso. Esto da como resultado una representación incompleta de un genoma completo. Al igual que la PEP, el DOP-PCR produce fragmentos que tienen de media 400-500 pares de bases ('bp', por sus siglas en inglés), con un tamaño máximo de 3 kb, pero también se conocen fragmentos de hasta 10 kb. Por otra parte, al igual que con la PEP, un aporte bajo de ADN genómico (menos de 1 ng) disminuye la exactitud y la cobertura genómica (Kittler et al., Anal. Biochem., 2002, 300, 237-244).

45 La amplificación por desplazamiento múltiple ('Multiple displacement amplification' o 'MDA', en inglés) es un método isotérmico que no se basa en la PCR y que se basa en la hibridación de hexámeros aleatorios con ADN desnaturalizado, seguida de una síntesis de desplazamiento de cadena a una temperatura constante (Blanco et al., J. Biol. Chem., 1989, 264, 8935-8940). Se ha aplicado a pequeñas muestras con pequeñas cantidades de ADN genómico, lo que da como resultado la síntesis de ADN con un elevado peso molecular y con un margen de error limitado en lo referente a la representación de la secuencia (Lizardi et al., Nature Genetics, 1998, 19, 225-232; Dean et al., Pro. Natl. Acad. Sci., EE UU, 2002, 99, 5261-5266). A medida que se sintetiza ADN mediante desplazamiento de cadena (o desplazamiento de hebra), tiene lugar un número cada vez más elevado de eventos o actividades de cebado, de manera que se crea una red de estructuras de ADN con múltiples ramas. La reacción puede catalizarse con enzimas como ADN polimerasa Phi29 o grandes fragmentos de ADN polimerasa Bst. La ADN polimerasa Phi29 tiene una capacidad correctora que da como resultado una tasa de errores 100 veces menor que la de la polimerasa Taq (Lasken et al., Trends Biotech., 2003, 21, 531-535).

55 Normalmente, los métodos que se han descrito previamente no amplifican satisfactoriamente las muestras de ADN cuando la cantidad de ADN molde que se está amplificando está por debajo de un nivel de 1 nanogramo (ng). Los problemas que surgen durante estos intentos de amplificación incluyen, por ejemplo, una mala representación del ADN molde original en el producto amplificado (Dean et al., Proc. Natl. Acad. Sci., EE UU, 2002, 99, 5261-5266) y una amplificación alternativa del ADN no molde (Lage et al., Genome Research, 2003, 13, 294-307).

65 Se ha descubierto que un problema que surge cuando se amplifican pequeñas cantidades de molde usando ADN polimerasa Phi29 es que normalmente se produce una síntesis de ADN 'de fondo' cuando se omite el molde (también llamado 'patrón' o 'plantilla'), o si las concentraciones del molde son bajas. Al disminuir el volumen de la reacción mientras se mantiene fija la cantidad del molde, se aumenta la concentración del molde, lo que provoca la

supresión de la síntesis de fondo (Hutchinson, C. A. III et al., Proc. Natl. Acad. Sci., EE UU, 2005, 102, 17332-17336). Otra cuestión relacionada es la mala representación y el mal equilibrio del ADN de interés después de una amplificación del genoma completo (WGA, por sus siglas en inglés).

5 Mazutis et al. (Anal. Chem., 2009, 81, 4813-4821) muestran un método para la amplificación isotérmica de alto rendimiento de moléculas de ADN simple en un sistema de microfluidos basado en gotitas.

Así pues, todavía existe una antigua necesidad de contar con métodos y equipos para llevar a cabo reacciones de amplificación del genoma completo con cantidades pequeñas de ADN y que son capaces de mantener el equilibrio genético y la representación de la muestra original. La presente invención da respuesta a esta necesidad.

RESUMEN DE LA INVENCION

15 El desarrollo de procedimientos mejorados para la amplificación por desplazamiento múltiple de ácidos nucleicos presentes a niveles de traza en una muestra eliminaría la necesidad de cultivar células y solo requiere una pocas células no viables para obtener el suficiente ADN para la reacción. Tal proceso mejorado aumentaría la sensibilidad de varios métodos de análisis de ADN e incluso produciría el ácido nucleico suficiente para la secuenciación del genoma completo. Resulta ventajoso que se mantengan la representación y el equilibrio alélico, además de obtener producciones eficientes de ácido nucleico amplificado.

Se ha descubierto que llevar a cabo reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple en una mezcla reactiva que contiene un detergente o en una emulsión da como resultado una mejor representación de la secuencia molde original, y también proporciona un mejor equilibrio alélico en las pruebas de perfilado genético de 'aguas abajo' (o de 'secuencia abajo'). Sin estar sujetos a ninguna teoría en particular, se cree que realizar las reacciones de amplificación en una emulsión (o formato de emulsión) da como resultado la captura de las moléculas individuales de ácido nucleico molde en las microgotitas de la emulsión. Esto proporciona una amplificación del ácido nucleico molde, a la vez que se minimiza la interferencia de las moléculas de ácido nucleico de fondo. También se cree que el formato de emulsión proporciona una amplificación más eficiente de los fragmentos del genoma diana que son más pequeños o tienen un número de copias reducido.

En un aspecto, se proporciona un método para amplificar ácidos nucleicos. El método incluye los pasos o etapas de poner en contacto una muestra de ácido nucleico con una mezcla de reacción que comprende una serie de partidores o cebadores de oligonucleótidos, una o más enzimas polimerasas y un componente que forma emulsiones, de manera que la mezcla de reacción comprende tanto betaína como trehalosa; y someter la mezcla de reacción a unas condiciones en las que la secuencia de ácido nucleico se amplifica para producir un producto amplificado en una reacción de desplazamientos múltiples, de manera que la reacción de amplificación se realiza en un formato de emulsión. Además, el método comprende el paso de romper la emulsión, después de completar la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple, añadiendo a la reacción un 'compuesto que rompe emulsiones' para separar la emulsión en fases acuosas e hidrofóbicas.

En algunas realizaciones, el componente que forma emulsiones es un detergente no iónico como Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton x 100 o Triton x 102. En algunas realizaciones preferidas, el detergente no iónico está presente en la mezcla de reacción en unos niveles de entre alrededor de un 0,05% y alrededor de un 3% (p/v).

En los métodos de la invención, resulta ventajoso incluir la betaína y la trehalosa como agentes estabilizadores. De forma ventajosa, la betaína está presente en la mezcla de reacción en una concentración de entre alrededor de 0,2 M y alrededor de 1,6 M y la trehalosa está presente en la mezcla de reacción en una concentración de entre alrededor de 0,1 M y alrededor de 1,0 M.

En algunas realizaciones, las polimerasas en la mezcla de reacción comprenden una actividad de ADN polimerasa 5' → 3', una actividad exonucleasa 3' → 5' y una actividad de reparación por escisión 5' → 3'. De forma ventajosa, las polimerasas incluyen polimerasa Phi29, ADN polimerasa Bst, polimerasa Pol I y/o un compuesto de estos productos. En algunas realizaciones, la polimerasa Phi29 se incluye en la mezcla de reacción en una concentración de entre alrededor de 0,2 unidades/μL y alrededor de 0,6 unidades/μL. En algunas realizaciones, la polimerasa Pol I se incluye en la mezcla de reacción en una concentración de entre alrededor de 0,005 unidades/μL y alrededor de 0,015 unidades/μL.

En algunas realizaciones, se emplea dimetilsulfóxido (DMSO) como un agente estabilizador adicional que aumenta la separación de cadenas para la reacción de amplificación y puede incluirse en una concentración de entre alrededor de un 1% y alrededor de un 5%.

En algunas realizaciones del método se incluye albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés). Sin estar sujetos a ninguna teoría en particular, se cree que la BSA evita la pérdida de actividad polimerasa durante la unión no específica de las enzimas polimerasas con las paredes de plástico o cristal del recipiente durante el proceso de amplificación. Se ha descubierto que, normalmente, la BSA que se adquiere comercialmente está

considerablemente contaminada con otras biomoléculas, particularmente ácido nucleico. Resulta ventajoso tratar la BSA y otros reactivos/agentes estabilizadores para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes antes de realizar las reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple.

5 En algunas realizaciones, la mezcla de reacción además incluye activadores enzimáticos y agentes reactivos de solubilización como iones de magnesio (por ejemplo, de un compuesto iónico, como cloruro de magnesio o similares), sulfato de amonio y ditiotreitól. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción incluye cloruro de magnesio en una concentración de entre alrededor de 2 mM y alrededor de 20 mM. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción incluye sulfato de amonio en una concentración de entre alrededor de 2 mM y alrededor de 15 mM. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción incluye ditiotreitól en una concentración de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 8mM.

15 En algunas realizaciones, la mezcla de reacción además incluye pirofosfatasa para eliminar el pirofosfato producido a partir de los desoxinucleósidos trifosfatos usados en la reacción de amplificación. De forma ventajosa, la pirofosfatasa está presente en la mezcla de reacción en una concentración de entre alrededor de 3×10^{-5} unidades/ μ L y alrededor de 1×10^{-4} unidades/ μ L.

20 En algunas realizaciones, la mezcla de reacción se amortigua, en un pH de entre alrededor de 7,1 y alrededor de 7,8, con TRIS o con otro agente amortiguador que conocen las personas versadas en la materia.

En algunas realizaciones, el componente que forma emulsiones es un polímero hidrofóbico como polidimetilsiloxano o aceite mineral, por ejemplo. De forma ventajosa, el polidimetilsiloxano está presente en la mezcla de reacción en un ratio de 4:1 de polidimetilsiloxano y solución acuosa.

25 Tras completar la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple, la emulsión debe romperse (o deshacerse) mediante un compuesto que rompe emulsiones para hacer posible la extracción de ácidos nucleicos para posteriores análisis. De forma ventajosa, el componente que rompe emulsiones es cloroformo o etanol.

30 Una vez que se ha obtenido el ácido nucleico amplificado, puede analizarse aún más. El ácido nucleico amplificado puede representar el genoma entero de un organismo. Puede ser ventajoso preparar uno o más productos de amplificación adicionales que representan las regiones diana del genoma para realizar análisis posteriores. En algunas realizaciones, se amplifica un segmento diana mediante una reacción en cadena de la polimerasa convencional para obtener un segundo producto de amplificación. Este segundo producto de amplificación puede analizarse mediante un análisis de composición de bases utilizando una espectrometría de masas, por ejemplo. En esta realización, la secuenciación de la amplificación no está necesariamente en orden para determinar la composición de las bases.

40 En otras realizaciones, el segundo producto de amplificación se analiza determinando su secuencia. Esto puede realizarse utilizando métodos de secuenciación de Sanger convencionales o cualquiera de los métodos de secuenciación rápida 'de próxima generación', que resultan conocidos para aquellas personas versadas en la materia, y que incluyen -pero no se limitan a- la pirosecuenciación, la secuenciación con SOLiD™, la secuenciación de una sola molécula en tiempo real, la nanosecuenciación, la secuenciación con el método tSMS™, la secuenciación de una sola molécula mediante síntesis y la secuenciación con nanoporos.

45 Otro aspecto de la invención incluye un kit o equipo para realizar una amplificación por desplazamiento múltiple de un ácido nucleico, de manera que el kit comprende:

50 una o más polimerasas;
una serie de cebadores de oligonucleótidos;
uno o más componentes que forman emulsiones;
un compuesto que rompe emulsiones y que separa la emulsión en fases acuosas e hidrofóbicas después de que se haya completado la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple;
betaína; y
trehalosa.

55 En algunas realizaciones del kit, los componentes que forman emulsiones son un detergente y un polímero hidrofóbico. En esta realización, el detergente es, preferiblemente, un detergente no iónico. El detergente no iónico puede seleccionarse de un grupo que comprende Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X 100 y Triton X 102. Tween 40 es el detergente no iónico preferido. En algunas realizaciones en las que se usa un polímero hidrofóbico, el polímero hidrofóbico es, preferiblemente, polidimetilsiloxano.

60 En algunas realizaciones del kit, las polimerasas tienen una actividad de ADN polimerasa $5' \rightarrow 3'$, y, opcionalmente, una actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ y/o una actividad de reparación por escisión $5' \rightarrow 3'$. En algunas realizaciones, por ejemplo, las polimerasas incluyen pol I, ADN polimerasa Bst y/o Phi29.

65 En algunas realizaciones, el kit puede incluir además cualquier combinación de reactivos estabilizadores de la reacción de amplificación seleccionados entre un grupo que se compone de: albúmina de suero bovino,

dimetilsulfóxido, ditiotreitól, sulfato de amonio, cloruro de magnesio, pirofosfatasa y ácido poliadenílico. Preferiblemente, los reactivos del kit son tratados para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes antes de su inclusión en el mencionado kit.

5 En algunas realizaciones, el kit incluye instrucciones para llevar a cabo una reacción de amplificación por desplazamiento múltiple en una muestra de ácido nucleico.

10 También se desvela un sistema para analizar ácidos nucleicos. El sistema incluye un termociclador, un recipiente para la mezcla de reacción y uno o más manipuladores de líquidos configurados para liberar en el recipiente una muestra de ácido nucleico y también para liberar en el recipiente un compuesto que rompe emulsiones. El recipiente está configurado para introducirse en el termociclador y es químicamente compatible con uno o más detergentes o disolventes hidrofóbicos utilizados para formar una emulsión de la mezcla de reacción en el recipiente. En algunos ejemplos, el recipiente es un tubo, una placa de 96 pocillos, una placa de 384 pocillos o un dispositivo de microfluidos que es compatible con los compuestos del kit previamente descritos.

15 En algunos ejemplos, el sistema incluye además un equipo para el análisis de ácido nucleico 'de aguas abajo' ('downstream apparatus', en inglés), que está configurado para recibir o alojar el ácido nucleico amplificado proveniente del recipiente. El equipo incluye un segundo termociclador configurado para realizar una segunda amplificación dirigida ('targeted amplification', en inglés) del ácido nucleico amplificado producido por el sistema. En este equipo también se incluye una unidad de purificación. La unidad de purificación está configurada para depurar o purificar un producto de la segunda amplificación dirigida. También se incluye una unidad de análisis de ácido nucleico para determinar la secuencia o composición de las bases del producto de la mencionada segunda amplificación dirigida. En algunos ejemplos, la unidad de purificación incluye una resina de intercambio de aniones unida a una bola o cuenta magnética.

20 En algunos ejemplos, la unidad de análisis de ácido nucleico comprende un espectrómetro de masas o un secuenciador de ácido nucleico. El espectrómetro de masas puede ser un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con electrospray o un espectrómetro de masas de resonancia ciclotrónica de iones por transformada de Fourier con electrospray. Junto con el espectrómetro de masas, puede usarse una base de datos de masas moleculares conocidas y/o composiciones de bases conocidas de productos de amplificación de bioagentes conocidos. En este caso, hay un mando o control que está conectado operativamente con el espectrómetro de masas y la base de datos. El control está configurado para combinar las masas moleculares del producto de amplificación con una masa molecular medida o calculada de un producto de amplificación correspondiente de un bioagente. En este sistema, los productos de amplificación de los bioagentes conocidos tienen preferiblemente una longitud de entre alrededor de 29 y alrededor de 200 nucleobases o bases nucleicas.

25 En otros ejemplos del sistema, el equipo de análisis de ácido nucleico incluye un secuenciador de ácido nucleico configurado para llevar a cabo un método de secuenciación. El método de secuenciación puede ser secuenciación de Sanger, pirosecuenciación, secuenciación con SOLiD™, secuenciación de una sola molécula en tiempo real, nanosecuenciación, secuenciación con el método tSMS™, secuenciación de una sola molécula mediante síntesis, secuenciación con nanoporos u otros métodos.

30 En otros ejemplos del sistema, el equipo de análisis de ácido nucleico incluye un biochip o micromatriz de ADN.

35 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES**

40 La **Figura 1** es un gráfico del número de asignaciones alélicas ('allele calls', en inglés) realizadas en el análisis de una muestra de ADN humano utilizando tres mezclas de amplificación diferentes y una mezcla de control no amplificada.

45 La **Figura 2** es un gráfico del ratio alélico promedio (log base 2) para las asignaciones alélicas realizadas en el análisis de una muestra de ADN humano utilizando tres mezclas de amplificación diferentes y una mezcla de control no amplificada.

50 La **Figura 3** es un gráfico que indica la cantidad del producto de amplificación obtenido utilizando tres mezclas de amplificación diferentes.

55 La **Figura 4** es un gráfico de la producción o cosecha total del producto de amplificación obtenido con detergentes en la mezcla de amplificación (entre 0,05% y 0,1%).

60 La **Figura 5** es un gráfico de la producción total del producto de amplificación obtenido con detergentes en la mezcla de amplificación (entre 0,1% y 1,0%).

65 La **Figura 6** muestra los resultados del locus FGA en un ensayo con Identifiler®, indicando el efecto que tiene Tween 40 sobre el equilibrio alélico.

La **Figura 7** muestra los resultados de un análisis del equilibrio alélico obtenidos mediante la amplificación de una muestra de ADN de 150 pg utilizando una amplificación por desplazamiento múltiple -mediante emulsión- con DMSO, en comparación con una amplificación del genoma completo que se ha realizado utilizando un kit comercial, y en comparación con un análisis del equilibrio alélico de una muestra de ADN sin amplificar.

La **Figura 8** es un gráfico que muestra una comparación de los datos de amplificación progresiva obtenidos

de una muestra de ADN humano obtenida con un proceso de amplificación basado en la emulsión, tal y como se ha explicado en el presente texto.

La **Figura 9** es un gráfico que muestra la relación entre los rendimientos del producto de amplificación obtenidos con diferentes concentraciones de ADN de una muestra de ADN de *Bacillus anthracis*.

La **Figura 10** es un gráfico de las cuentas de las micromatrices de ADN vs un ratio de log2 de las intensidades de las manchas en relación con el producto de la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple basada en la emulsión, en comparación con una muestra de control sin amplificar.

La **Figura 11** es una representación esquemática de un sistema de reacción de amplificación por desplazamiento múltiple basada en la emulsión combinado con un equipo de análisis de ácido nucleico 'de aguas abajo'.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

DEFINICIONES

Para facilitar la comprensión de los métodos desvelados en el presente texto, a continuación se definen diversos términos y expresiones:

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'alelo' hace referencia a cualquier número de secuencias de ADN viable que ocupan un determinado locus (posición) en un cromosoma. Normalmente, los alelos son secuencias de ADN (ácido desoxirribonucleico) que codifican un gen, pero, en ocasiones, el término se utiliza para referirse a una secuencia no génica. El genotipo de un individuo en relación con ese gen es el conjunto de alelos que posee. En un organismo diploide, uno que tiene dos copias de cada cromosoma, son dos los alelos que constituyen el genotipo de un individuo.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'equilibrio alélico' hace referencia al ratio o proporción de la cantidad del alelo menor con respecto a la cantidad del alelo mayor.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'asignación alélica' ('allele call', en inglés) hace referencia a la caracterización exitosa de un alelo mediante un método de análisis determinado. Si el análisis proporciona una caracterización exitosa de los dos alelos del locus de un gen de una muestra de ADN, se dice que se han realizado dos asignaciones alélicas. Si se caracteriza un alelo, pero el otro alelo no se caracteriza, se dice que se ha realizado una asignación alélica. Si no se caracteriza satisfactoriamente ningún alelo, no se realiza ninguna asignación alélica.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'amplificación' (también llamado 'ampliación') hace referencia a un proceso para multiplicar una cantidad previa de una plantilla o patrón de ADN con una determinada secuencia con el objetivo de obtener mayores cantidades de ácido nucleico con la misma secuencia.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'soluto compatible' hace referencia a un tipo de compuestos que estabilizan las células y los componentes celulares. Los solutos compatibles incluyen, por ejemplo, los aminoácidos y sus derivados, y los carbohidratos.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'genoma' hace referencia, en general, al set completo de información genética que tiene la forma de una o más secuencias de ácido nucleico, incluyendo sus versiones escritas o 'in silico' (informáticas). Un genoma puede incluir tanto ADN como ARN, dependiendo de su organismo de origen. La mayoría de organismos tienen genomas de ADN, pero algunos virus tienen genomas de ARN. Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'genoma' no comprende necesariamente el set completo de información genética.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'hexámero' hace referencia a un polímero compuesto de seis unidades. Más específicamente, el término 'hexámero' se utiliza para describir un partidador o cebador de oligonucleótidos que tiene seis residuos de nucleótidos.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'heptámero' hace referencia a un polímero compuesto de siete unidades. Más específicamente, el término 'heptámero' se utiliza para describir un partidador o cebador de oligonucleótidos que tiene siete residuos de nucleótidos.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'hibridación' hace referencia al proceso de unir dos cadenas de ADN complementarias o una de ADN y otra de ARN para formar una molécula bicatenaria o de cadena doble mediante el emparejamiento de bases de Watson y Crick o el emparejamiento de una base nucleica con una de las cuatro bases nucleicas del ADN (adenina, guanina, timina y citosina).

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'ácido nucleico bloqueado' (ANB o LNA, por sus siglas en inglés) hace referencia a un nucleótido de ARN modificado. La fracción o parte de ribosa de un nucleótido bloqueado se modifica con un puente extra que conecta los carbonos 2' y 4'. La estructura de ribosa con este puente

es una estructura bicíclica. El puente 'bloquea' la ribosa en una conformación estructural 3'-endo, que se encuentra a menudo en la forma A del ADN o el ARN. Los nucleótidos del LNA pueden mezclarse con las bases de ADN o ARN en un oligonucleótido. La conformación o estructura de ribosa bloqueada mejora el apilamiento de las bases y la preorganización del esqueleto y tiene el efecto de aumentar considerablemente la estabilidad térmica (temperatura de fusión) de un dúplex de ADN. Dos ejemplos de LNAs son el clásico LNA que tiene un único puente de carbono (metileno) entre los carbonos 2' y 4' de la ribosa, y otro tipo de LNA se conoce como ENA y tiene un puente de etileno entre los carbonos 2' y 4' de la ribosa. Se considera que un nucleótido de LNA individual es un ejemplo de un nucleótido modificado que puede incorporarse a los cebadores de oligonucleótidos y ADN.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'amplificación por desplazamiento múltiple' hace referencia a un método isotérmico que no se basa en la PCR y que se basa en la hibridación o fijado ('annealing', en inglés) de hexámeros aleatorios a un ADN desnaturalizado, seguida de una síntesis de desplazamiento de cadena a una temperatura constante. Se ha aplicado a pequeñas muestras de ADN genómico, dando como resultado la síntesis de ADN con alto peso molecular y con un sesgo limitado de representación de secuencias. A medida que se sintetiza ADN mediante desplazamiento de cadena, tiene lugar un número cada vez más elevado de eventos o actividades de cebado, de manera que se crea una red de estructuras de ADN con múltiples ramas. Esta reacción puede catalizarse usando enzimas como ADN polimerasa Phi29 o los grandes fragmentos de ADN polimerasa Bst.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'ácido nucleico' hace referencia a una macromolécula de alto peso molecular que se compone de cadenas de nucleótidos que transportan información genética. Los ácidos nucleicos más comunes son el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Los monómeros que constituyen los ácidos nucleicos se llaman nucleótidos. Cada nucleótido se compone de tres componentes: una base nitrogenada heterocíclica, ya sea una purina o una pirimidina (también llamada 'base nucleica'); un azúcar pentosa y un fosfato. Los diferentes tipos de ácido nucleico difieren en la estructura del azúcar de sus nucleótidos; el ADN contiene 2-desoxirribosa, mientras que el ARN contiene ribosa.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'base nucleica' hace referencia a una base nitrogenada heterocíclica, ya sea una purina o una pirimidina, en un residuo de nucleótidos o en un ácido nucleico. En el presente texto, el término 'base nucleica' se usa para describir la longitud de un determinado cebador de oligonucleótidos según el número de residuos de nucleótidos incluidos en el cebador de oligonucleótidos.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'octámero' hace referencia a un polímero compuesto de ocho unidades. Más específicamente, el término 'octámero' se utiliza para describir un cebador que tiene ocho residuos de nucleótidos.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'polimerasa' hace referencia a una enzima que cataliza el proceso de replicación de los ácidos nucleicos. Más específicamente, la ADN polimerasa cataliza la polimerización de los desoxirribonucleótidos a lo largo de una cadena de ADN, de manera que la ADN polimerasa la 'lee' y la utiliza como plantilla o patrón. La molécula recién polimerizada es complementaria a la cadena molde y es idéntica a la cadena que acompaña a la plantilla.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'cebador' (también llamado 'partidor' o 'primer') hace referencia a un oligonucleótido que es capaz de funcionar como el punto de inicio de la síntesis cuando es sometido a unas condiciones en las que se provoca la síntesis de un producto de la extensión del cebador que es complementario a una cadena de ácido nucleico (es decir, en presencia de nucleótidos y un agente inductor como la ADN polimerasa, y con una temperatura y un pH adecuados). Preferiblemente, el cebador tiene una sola cadena (es monocatenario) para obtener la máxima eficiencia en la amplificación, pero, alternativamente, puede ser de doble cadena. Si es de doble cadena (o bicatenario), primero se trata el cebador para separar sus cadenas antes de usarlo para preparar los productos de la extensión. Preferiblemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo como para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente inductor. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo la temperatura, la composición del cebador, el uso del método y los parámetros utilizados para el diseño del cebador, tal y como se desvela en el presente texto.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'procesividad' hace referencia a la capacidad de una enzima para proseguir repetidamente con su función catalítica sin disociarse de su sustrato. Por ejemplo, la polimerasa Phi29 es una polimerasa altamente procesiva debido a su firme unión con el sustrato del ADN molde.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'perfilador' (o 'Profiler') es un término general que hace referencia a un ensayo usado para caracterizar un grupo de loci genéticos. Puede analizarse cualquier grupo de loci genéticos. Uno de los grupos más habituales de loci incluye normalmente un grupo central de alrededor de 13 loci marcadores STR que se conoce como el grupo CODIS ('Combined DNA Index System', en inglés, o Sistemas de Índice Combinado de ADN). En un determinado ensayo de perfilado, los STRs son caracterizados mediante un método de electroforesis capilar que detecta los productos de amplificación de STR marcados fluorescentemente. Los ejemplos de ensayos de perfilado específicos incluyen el ensayo AmpFLSTR® Profiler Plus™ y el ensayo AmpFLSTR® Identifier® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE UU), que tiene 3 loci marcadores STR adicionales.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'calidad de amplificación' hace referencia, de forma general, al rendimiento o producción (o amplificación progresiva) del ácido nucleico amplificado, la especificidad de amplificación con respecto a los ácidos nucleicos no molde y el rendimiento o desempeño de los productos amplificados resultantes en los ensayos de perfilado.

5 Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'mezcla de reacción' hace referencia a una mezcla que contiene los componentes suficientes para llevar a cabo una reacción de amplificación.

10 Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'representación' hace referencia a una medida para conservar las características originales del ADN molde que se amplifica en la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple. Por ejemplo, si el ADN molde en una muestra obtenida de un individuo tiene un equilibrio alélico de 1,5 a 1,0 en un locus genético particular, y el ADN amplificado indica que el equilibrio alélico es de 2,0 a 1,0 en el mismo locus, puede concluirse que la reacción de amplificación ha dado como resultado una mala representación respecto a una reacción de amplificación diferente que ha obtenido un equilibrio alélico de 1,6 a 1,0 utilizando la misma muestra de ADN molde.

20 Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'sensibilidad' hace referencia a una medida de la capacidad que tiene una mezcla de reacción determinada para amplificar cantidades muy pequeñas de ADN, como las cantidades en un rango de picogramos. Por ejemplo, una determinada mezcla de reacción que produce una cantidad útil de ADN amplificado en una reacción de amplificación a partir de una cantidad dada de ADN molde es más sensible que otra determinada mezcla de reacción que no puede producir una cantidad útil de ADN a partir de la misma cantidad de ADN.

25 Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'conjunto de cebadores de oligonucleótidos' hace referencia a varios cebadores de oligonucleótidos cuyos miembros no se emparejan en pares delanteros e inversos como lo hacen normalmente en una reacción en cadena de la polimerasa. Tal y como se utiliza en el presente texto, un 'conjunto de cebadores de oligonucleótidos' hace referencia a diversos cebadores de oligonucleótidos que normalmente tienen secuencias aleatorias y cuya longitud varía entre alrededor de seis y alrededor de ocho bases nucleicas.

30 Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'repetición(es) corta(s) en tándem' o STR ('Short tandem repeat(s)', en inglés) hace referencia a un tipo de polimorfismo que sucede cuando un patrón o estructura de dos o más nucleótidos se repite y las secuencias repetidas están una directamente al lado de la otra. El patrón puede tener una longitud de entre 2 y 10 pares de bases (bp) (por ejemplo, (CATG)ⁿ en una región genómica) y, normalmente, se encuentra en la región de intrones no codificantes. Examinando diversos loci STR y contando cuántas repeticiones hay de una secuencia STR específica en un determinado locus, es posible crear un perfil genético único de un individuo.

40 Tal y como se utilizan en el presente texto, los términos 'ácido nucleico molde' y 'ADN molde' hacen referencia a la cadena o cadenas de ADN que se duplican en una reacción de amplificación catalizada por una enzima polimerasa. Más específicamente, un ácido nucleico molde es el ácido nucleico diana que se añade a la reacción de amplificación. El término 'ácido nucleico diana' hace referencia al objeto de análisis. Una muestra que contiene el ácido nucleico molde puede contener otros contaminantes de ácido nucleico que no se consideran de igual manera ácidos nucleicos molde. Por ejemplo, si el objetivo del análisis es identificar a un individuo a partir de su ADN, se obtendrá y amplificará una muestra que contiene dicho ADN. Este ADN es el objetivo del análisis y representa el molde o plantilla. Los ácidos nucleicos contaminantes pueden estar presentes, pero no se consideran ADN molde porque no son el objeto de análisis.

50 Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'base nucleica universal' hace referencia a una base nucleica que es capaz de formar un par de bases con cualquiera de las cuatro bases nucleicas naturales del ADN: adenina, guanina, timina o citosina.

55 Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'amplificación del genoma completo' ('AGC' o 'WGA', por sus siglas en inglés) normalmente hace referencia a un método para la amplificación de una muestra de ADN de una forma no específica, con el objetivo de producir una muestra nueva que es indistinguible de la original pero tiene una mayor concentración de ADN. La técnica ideal de amplificación del genoma completo amplificaría una muestra hasta un nivel suficiente como para poder realizar numerosas pruebas y procedimientos de almacenamiento, manteniendo al mismo tiempo la representación de la secuencia original. El ADN de la muestra puede incluir un genoma entero o una porción o fragmento de este. La PCR que utiliza iniciadores de oligonucleótidos degenerados (DOP), la técnica de amplificación de la PCR mediante partidores (PEP) y la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) son ejemplos de métodos para la amplificación del genoma completo.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

65 **Resumen general**

En el presente texto se desvelan métodos, mezclas de reacción, kits y sistemas y composiciones de cebadores que se usan para las reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple y que son útiles para amplificar cantidades pequeñas de ADN. El ADN amplificado es particularmente útil para llevar a cabo pruebas forenses relacionadas con humanos y también es útil para las pruebas clínicas o para la identificación de patógenos en muestras ambientales. Los sistemas que se describen en el presente texto se pueden adaptar convenientemente para usarse como una unidad de preparación de ácido nucleico como 'componente frontal' para análisis de ácido nucleico adicionales, por ejemplo, los análisis sobre la composición de las bases de los productos de amplificación seleccionados -que se corresponden con los amplicones que identifican bioagentes- o cualquier número de procesos 'de próxima generación' de secuenciación rápida de ácido nucleico, como la pirosecuenciación, la secuenciación con SOLiD™, la secuenciación de una sola molécula en tiempo real, la nanosecuenciación, la secuenciación con el método tSMS™, la secuenciación de una sola molécula mediante síntesis y la secuenciación con nanoporos, u otros métodos que resultan conocidos para las personas versadas en la materia.

Métodos y mezclas de reacción

Los métodos para la amplificación por desplazamiento múltiple comprenden los pasos o etapas de preparar una mezcla de reacción que aumenta la sensibilidad, el equilibrio alélico y la calidad del ADN molde que se va a amplificar.

La sensibilidad es una medida de la capacidad de una mezcla de reacción para amplificar las cantidades más pequeñas de ADN.

El equilibrio alélico hace referencia al ratio o proporción de las cantidades de dos formas de un determinado alelo. Si la representación del ADN original se mantiene en una determinada reacción de amplificación por desplazamiento múltiple, el equilibrio alélico también debería mantenerse. La mala representación del ADN molde original en el producto amplificado es un problema habitual que se asocia con los métodos de amplificación del genoma completo (Dean et al., Proc. Natl. Acad. Sci., EE UU, 2002, 99, 5261-5266).

La calidad es una medida general del grado o alcance de la amplificación obtenida y del porcentaje de los productos de la amplificación obtenida a partir del ADN molde (o ADN 'diana'). Una medida adicional de la calidad es el rendimiento o desempeño del producto de amplificación en un ensayo de ADN con 'Profiler™' en el que se miden los marcadores específicos de ADN humano con el propósito de identificar a individuos humanos.

En algunas realizaciones, las mezclas de reacción empleadas en las reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple incluyen compuestos que se conocen como estabilizadores o solutos compatibles. Estos compuestos estabilizan las células y los componentes celulares cuando se exponen a condiciones extremas. En las bacterias, la absorción o la síntesis de solutos compatibles hace que las células y su maquinaria enzimática sean más resistentes frente a las condiciones ambientales estresantes como la alta osmolaridad o las altas temperaturas. Estos efectos protectores pueden extenderse a las reacciones de amplificación mediante su inclusión como componentes de una mezcla de reacción de amplificación.

El soluto compatible denominado betaína (N,N,N-trimetilglicina) es un aminoácido que funciona como un osmoprotector que aumenta la resistencia de las enzimas polimerasas frente a la desnaturalización y también permite que las reacciones de amplificación superen los bajos niveles de contaminantes que a menudo dan como resultado unas reacciones de amplificación de baja calidad (Weissensteiner et al., Biotechniques, 1996, 21, 1102-1108). El soluto compatible denominado trehalosa es un disacárido no reductor en el que dos unidades de D-glucosa están unidas mediante un enlace alfa-alfa-1,1-glicosídico.

Se ha descubierto que la trehalosa mejora la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de manera que ayuda a disminuir la temperatura de fusión del ADN y aumenta la estabilidad térmica de la polimerasa Taq (Speiss et al., Clin. Chem., 2004, 50, 1256-1259).

El dimetilsulfóxido (DMSO) es otro ejemplo de estabilizador. Este compuesto es un disolvente polar aprótico que disuelve tanto los compuestos polares como los compuestos no polares, y puede mezclarse con una gran variedad de disolventes orgánicos, así como con agua. El DMSO se usa en las reacciones de amplificación para inhibir las estructuras secundarias en la plantilla de ADN o en los cebadores de ADN. Se añade a la mezcla de reacción antes de la amplificación y afecta a la autocomplementariedad del ADN, minimizando las reacciones interferentes. En algunas realizaciones, el DMSO se incluye en la mezcla de la reacción de amplificación en una concentración de entre alrededor de un 1% y alrededor de un 5%, preferiblemente alrededor de un 2,5%.

En algunas realizaciones, la concentración de la betaína incluida en las mezclas de reacción está en un intervalo de entre alrededor de 0,2 M y alrededor de 1,6 M o cualquier fracción de concentración situada entre estos valores. Preferiblemente, la concentración de betaína es de alrededor de 0,6 M.

En algunas realizaciones, la concentración de la trehalosa incluida en las mezclas de reacción está en un intervalo de entre alrededor de 0,1 M y alrededor de 1,0 M o cualquier fracción de concentración situada entre estos

valores. Preferiblemente, la concentración de trehalosa es de alrededor de 0,6 M.

Las mezclas de reacción empleadas para la amplificación por desplazamiento múltiple incluyen una o más enzimas polimerasas. En algunas realizaciones, las actividades catalíticas incluyen una actividad de ADN polimerasa 5' → 3', y, opcionalmente, una actividad exonucleasa correctora 3' → 5' y/o una actividad de reparación de ADN, como, por ejemplo, una actividad de reparación por escisión 5' → 3'. Los ejemplos de las diversas enzimas polimerasas incluyen -pero no se limitan a- los siguientes: polimerasa Phi29, fragmento Klenow, polimerasa T4, polimerasa T7, polimerasa BstE, E. coli Pol I, polimerasa Vent, polimerasa Deep Vent, exopolimerasa Vent, exopolimerasa Deep Vent, KOD HiFi, Pfu ultra, Pfu turbo, Pfu nativa, exopolimerasa Pfu, exopolimerasa Pfu Cx, Pfu clonada, Proofstart (Qiagen), rTth y Tfu Qbio. La mayoría de estas polimerasas están disponibles comercialmente. En una realización ejemplar, las polimerasas son Phi29 y al menos una enzima polimerasa más. En algunas realizaciones, las polimerasas son Phi29 y al menos una polimerasa Pol I. Para mayor información, en algunas realizaciones las polimerasas son Phi29 y E. coli.

En las realizaciones en las que las polimerasas en la mezcla de reacción incluyen la polimerasa Phi29 y la polimerasa I de E. coli (también conocida como Pol I), las enzimas comprenden una actividad de ADN polimerasa 5' → 3', una actividad exonucleasa correctora 3' → 5' y una actividad de reparación por escisión 5' → 3'.

En algunas realizaciones, la polimerasa principal es Phi29, mientras que la ADN polimerasa I de E. coli (Pol I) está presente con unos niveles de actividad menores. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción contiene entre alrededor de 0,2 unidades/μL y alrededor de 0,6 unidades/μL de polimerasa Phi29, o cualquier concentración intermedia. Preferiblemente, la mezcla de reacción contiene alrededor de 0,43 unidades/μL de polimerasa Phi29.

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción contiene entre alrededor de 0,005 unidades/μL y alrededor de 0,015 unidades/μL de polimerasa Pol I, o cualquier concentración intermedia. Preferiblemente, la mezcla de reacción contiene alrededor de 0,01 unidades/μL de polimerasa Pol I.

En otras realizaciones, en las mezclas de reacción se incluyen otras enzimas no polimerasas o proteínas accesorias como, por ejemplo, helicasa, girasa, T4G32 y SSPB. La mayoría de estas proteínas accesorias están disponibles comercialmente.

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción además incluye pirofosfatasa, que sirve para convertir el pirofosfato en fosfato. El pirofosfato se acumula en la mezcla de reacción como resultado de la reacción de amplificación (se genera un equivalente del pirofosfato a partir de cada desoxinucleótido trifosfato que se añade y se sabe que inhibe la reacción de amplificación). En algunas realizaciones, la mezcla de reacción contiene entre alrededor de 3×10^{-5} unidades/μL y alrededor de 1×10^{-4} unidades/μL de pirofosfatasa. Preferiblemente, la mezcla de reacción contiene alrededor de 7×10^{-5} unidades/μL de pirofosfatasa.

En algunas realizaciones, es preferible no incluir albúmina de suero bovino (BSA) en la mezcla de reacción, ya que, a menudo, los lotes de BSA obtenidos comercialmente están contaminados con ADN bovino, que es un importante contaminante que puede coamplificarse con el ADN molde en la reacción de amplificación. Alternativamente, la BSA puede incluirse si puede purificarse satisfactoriamente para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes. Los métodos para la eliminación o destrucción de los ácidos nucleicos en las muestras de proteínas, como la irradiación y la cromatografía de intercambio aniónico, resultan conocidos para las personas versadas en la materia.

En algunas realizaciones, la reacción de amplificación es una reacción de amplificación isotérmica, lo que significa que se realiza a una temperatura constante. En algunas realizaciones, las condiciones de la reacción incluyen un termociclado o ciclado térmico, en el que la temperatura de la mezcla de reacción se aumenta y disminuye sucesivamente a temperaturas predeterminadas con el objetivo de fundir y emparejar las dos cadenas de ADN. En algunas realizaciones, puede ser adecuado realizar una amplificación isotérmica si, por ejemplo, la representación se mantiene mediante una amplificación con polimerasa Phi29. En otras realizaciones, puede resultar ventajosa una mayor contribución de actividad enzimática que tiene su origen en diferentes polimerasas (como Pol I, por ejemplo), en cuyo caso puede incluirse el ciclado térmico en las condiciones de la reacción.

En algunas realizaciones, la reacción de amplificación da como resultado la amplificación de ADN molde, que comprende un genoma completo o una parte sustancial de este.

En algunas realizaciones, la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple produce un producto de amplificación, a partir de un ADN molde, a un intervalo constante en relación con la producción de los productos de amplificación de otros ADNs exógenos en una determinada muestra. Esto preserva la representación del ADN molde original.

En algunas realizaciones, la cantidad total del ADN molde añadido a la mezcla de reacción para su amplificación es de al menos alrededor de 2 picogramos.

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción se prepara con un detergente que puede ser un detergente

no iónico como Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X-100, Triton X-102, Span 80 o una combinación de estos compuestos. El detergente puede estar presente en la mezcla de reacción en unos niveles de entre alrededor de un 0,05% y alrededor de un 3% (p/v). Preferiblemente, el detergente no iónico es Tween 40 en una concentración de entre alrededor de un 0,05% y alrededor de un 3% (p/v), preferiblemente en una concentración de alrededor de un 1% (p/v).

Sin estar sujetos a ninguna teoría en particular, se cree que realizar las reacciones de amplificación en un formato de emulsión da como resultado que se capturen las moléculas individuales del ácido nucleico molde dentro de las microgotitas de la emulsión. Esto proporciona una amplificación del ácido nucleico molde, a la vez que se minimiza la interferencia de las moléculas de ácido nucleico de fondo. También se cree que el formato de emulsión proporciona una amplificación más eficaz de los fragmentos más pequeños del genoma diana.

El método para amplificar un ácido nucleico en forma de emulsión se lleva a cabo poniendo en contacto dicho ácido nucleico con la mezcla de reacción, que está en forma de emulsión, que se puede preparar usando un detergente y un polímero hidrofóbico. Un polímero hidrofóbico preferido es el polidimetilsiloxano, que puede estar presente en la mezcla de reacción en un ratio de alrededor de 4:1 de polidimetilsiloxano y solución acuosa. En otras realizaciones, el polímero hidrofóbico es aceite mineral.

En algunas realizaciones, la mezcla de reacción contiene otros aditivos para mejorar la actividad de una o más de las polimerasas. El cloruro de magnesio es uno de estos aditivos que aumentan la actividad polimerasa. El cloruro de magnesio puede incluirse en la mezcla de reacción en una concentración de entre alrededor de 2 mM y alrededor de 20 mM, preferiblemente alrededor de 9 mM.

Puede añadirse sulfato de amonio para mejorar la solubilidad de las proteínas (polimerasas, pirofosfatasa y BSA) en la mezcla de reacción. De manera ventajosa, la concentración de sulfato de amonio es de entre alrededor de 2 mM y alrededor de 15 mM, preferiblemente alrededor de 7,5 mM.

También puede añadirse ditiotreitol a la mezcla de reacción para mantener las condiciones de reducción y evitar el entrecruzamiento o reticulación de las proteínas. De forma ventajosa, la concentración de ditiotreitol es de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 8 mM, preferiblemente alrededor de 4 mM.

El pH de la mezcla de reacción puede mantenerse mediante conocidos agentes amortiguadores como Tris y otros agentes amortiguadores que resultan conocidos para las personas versadas en la materia. De forma ventajosa, el pH de la mezcla de reacción se mantiene entre alrededor de 7,1 y 7,8, preferiblemente alrededor de 7,5.

Sets de cebadores

Los sets de cebadores que se usan en las reacciones de amplificación que se desvelan en el presente texto se definen de forma general como un grupo de diversos cebadores o partidores de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, los cebadores tienen secuencias aleatorias que se hibridan aleatoriamente con el ácido nucleico molde en posiciones del molde o plantilla en las que las bases se emparejan considerablemente con los cebadores. Los miembros de los sets de cebadores pueden ser hexámeros aleatorios (cebadores con seis residuos de nucleótidos), heptámeros aleatorios (cebadores con siete residuos de nucleótidos) u octámeros aleatorios (cebadores con ocho residuos de nucleótidos). Las síntesis de estos hexámeros, heptámeros y octámeros con secuencias aleatorias se consiguen por medio de procedimientos conocidos.

En algunas realizaciones, los cebadores incluyen modificaciones que aumentan su afinidad con el ácido nucleico molde. En ciertas realizaciones, las modificaciones incluyen sustituyentes en el anillo de ribosa de un determinado residuo de nucleótidos de un determinado cebador, que estabilizan o bloquean el anillo de ribosa en la conformación 3'-endo, lo que proporciona una mayor afinidad al residuo de nucleótidos con respecto a un residuo de nucleótidos correspondiente del ácido nucleico molde.

La conformación del azúcar ribosa de un residuo de nucleótidos que contiene un azúcar pentofuranosil en el cebador se ve influida por diversos factores, incluyendo la sustitución en las posiciones 2'-, 3'- o 4'- del azúcar pentafuranosil. Normalmente, los sustituyentes electronegativos prefieren las posiciones axiales, mientras que los sustituyentes estéricamente exigentes prefieren normalmente las posiciones ecuatoriales ('Principles of Nucleic Acid Structure', Wolfgang Sanger, 1984, Springer-Verlag). La modificación de la posición 2' para favorecer la conformación 3'-endo puede obtenerse manteniendo el 2'-OH como elemento de reconocimiento (Gallo et al., Tetrahedron, 2001, 57, 5707-5713; Harry-O'Kuru et al., J. Org. Chem., 1997, 62, 1754-1759; y Tang et al., J. Org. Chem., 1999, 64, 747-754). Alternativamente, la preferencia por la conformación 3'-endo puede materializarse mediante la eliminación o supresión del 2'-OH, como demuestran los 2'-desoxi-2'-F-nucleósidos (Kawasaki et al., J. Med. Chem., 1993, 36, 831-841), que adoptan la conformación 3'-endo posicionando el átomo de fluorina electronegativo en la posición axial. Otras modificaciones del anillo de ribosa, por ejemplo la sustitución en la posición 4'- para obtener nucleósidos 4'-F modificados (Guillerm et al., Bioorg. Medicinal Chem. Lett., 1995, 5, 1455-1460; y Owen et al., J. Org. Chem., 1976, 41, 3010-3017), o, por ejemplo, la modificación para producir análogos de metanocarbo nucleósidos (Jacobson et al., J. Med. Chem. Lett., 2000, 43, 2196-2203 y Lee et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2001, 11, 1333-

1337) también provocan una preferencia por una conformación 3'-endo.

La modificación más habitual del ácido nucleico bloqueado es un puente de metileno de 2' a 4' que bloquea el anillo de ribosa en la conformación 3'-endo. Esta modificación se abrevia a menudo como 'ANB' ('Ácido nucleico bloqueado') o 'LNA' ('Locked nucleic acid', en inglés). Otro tipo de ácido nucleico bloqueado se denomina ENA, por sus siglas en inglés, y hace referencia al ácido nucleico con un puente de etileno. Esta modificación incluye un puente de etileno de 2' a 4'. La síntesis y preparación de los monómeros adenina, citosina, guanina, 5-metil-citosina, timina y uracilo con puentes de 2' a 4', junto con su oligomerización, y las propiedades de reconocimiento del ácido nucleico han sido descritas (Koshkin et al., *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630). Los monómeros con puentes de 2' a 4' y los métodos para prepararlos también se describen en WO 98/39352 y WO 99/14226. Los primeros análogos de los ácidos nucleicos con puentes de 2' a 4', fosforotioato-LNA y 2'-thio-LNA, también se han preparado y publicado (Kumar et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito la preparación de dúplex de oligodesoxirribonucleótidos con análogos de nucleósidos -con puentes de 2' a 4'- como sustratos para polimerasas de ácido nucleico (WO 99/14226). Además, la síntesis de 2'-amino-LNA -un nuevo análogo de oligonucleótidos de alta afinidad y limitado conformacionalmente- por medio de un manipulador también se ha descrito en la literatura de este campo (Singh et al., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado 2'-amino- y 2'-metilamino-LNAs y se ha informado sobre la estabilidad térmica de sus dúplex con las cadenas de ARN y ADN complementarias (ver, por ejemplo, WO/2005/044976).

En algunas realizaciones, al menos algunos de los cebadores contienen al menos un residuo de nucleótidos con un puente de 2' a 4' o al menos dos residuos de nucleótidos con un puente de 2' a 4'. En otras realizaciones, los residuos de nucleótidos con un puente de 2' a 4' se localizan en las posiciones 2ª y 5ª de los cebadores de oligonucleótidos. Estas realizaciones de los sets de cebadores son hexámeros, heptámeros u octámeros, o cualquier combinación de estos.

En algunas realizaciones, los cebadores tienen secuencias aleatorias, con la excepción de que tienen bases nucleicas universales situadas específicamente, como la inosina. Las localizaciones específicas de las bases nucleicas de inosina se encuentran, preferiblemente, en las dos bases nucleicas terminales finales de un determinado cebador que contiene inosina.

En algunas realizaciones, uno o más ligamientos o enlaces de fosforotioato se incorporan a los cebadores en el extremo 3' de un determinado cebador con el objetivo de hacer que el cebador sea más resistente a la actividad nucleasa.

Kits de cebadores

En el presente texto también se desvelan kits (o equipos) que contienen cebadores.

En algunos ejemplos, los kits contienen una cantidad suficiente de una enzima polimerasa que tiene una alta procesividad. En algunas realizaciones, la polimerasa con una alta procesividad es polimerasa Phi29 o polimerasa Taq. En otras realizaciones, la polimerasa con una alta procesividad es una polimerasa obtenida mediante ingeniería genética cuya procesividad se ve aumentada en relación con la polimerasa nativa a partir de la cual se ha fabricado.

En algunos ejemplos, los kits contienen una cantidad suficiente de una polimerasa adicional, además de la polimerasa de alta procesividad, para mejorar las características de la reacción de amplificación. En algunos ejemplos, la polimerasa adicional es polimerasa Pol I de *E. coli*.

En algunos ejemplos, los kits contienen una cantidad suficiente de pirofosfatasa que cataliza la conversión de pirofosfatasa en dos equivalentes de fosfato. Se sabe que el pirofosfato inhibe las reacciones polimerasas.

En algunos ejemplos, los kits contienen, además, desoxinucleótidos trifosfatos, amortiguadores (o tampones) y aditivos de amortiguadores, como solutos compatibles, incluyendo trehalosa y betaína, en concentraciones optimizadas para una amplificación por desplazamiento múltiple.

El kit puede incluir componentes para preparar mezclas de reacción de PCR con emulsión. Estos componentes que forman emulsiones pueden incluir un detergente o una combinación de un detergente y un polímero hidrofóbico.

En algunos ejemplos, el detergente que se proporciona con el kit es un detergente no iónico. El detergente no iónico puede ser Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X-100 o Triton X-102, o cualquier combinación de estos compuestos. El detergente puede estar presente en la mezcla de reacción en unos niveles de entre alrededor de un 0,05% y alrededor de un 3% (p/v). Un polímero hidrofóbico que se prefiere para su inclusión en el kit es el polidimetilsiloxano. Este polímero se incluye en el kit en una cantidad suficiente como para preparar unas mezclas de reacción que tienen un ratio de alrededor de 4:1 de polidimetilsiloxano y solución acuosa. Pueden proporcionarse otros polímeros hidrofóbicos con el kit, como aceite mineral, por ejemplo.

Los kits también pueden contener una solución tamponada que contiene cualesquiera componentes de las mezclas de reacción descritos previamente, siempre y cuando sean químicamente estables en condiciones adecuadas de transporte y almacenamiento. Los componentes también pueden proporcionarse individualmente junto con el kit en recipientes separados en soluciones o polvos liofilizados, con instrucciones para la preparación de soluciones para administrarse a las mezclas de reacción.

En algunos ejemplos, los kits contienen, además, instrucciones para llevar a cabo reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple.

10 **Sistemas de Amplificación de Ácido Nucleico**

También se desvela un sistema para analizar ácidos nucleicos. El sistema incluye un termociclador. El termociclador (también llamado 'ciclador térmico', 'máquina de PCR' o 'amplificador de ácido nucleico') es un equipo de laboratorio que funciona en ciclos rápidos de temperatura y se usa habitualmente para amplificar ácidos nucleicos. Normalmente, el dispositivo tiene un bloque térmico con agujeros en los que se pueden introducir los tubos que portan las mezclas de reacción de PCR. Así, el ciclador sube y baja la temperatura del bloque en etapas o pasos separados y preprogramados. La flexibilidad que proporciona el termociclador programable hace que se pueda adaptar con facilidad a las reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple.

Además, el sistema incluye un recipiente para portar una mezcla de reacción para una reacción de amplificación por desplazamiento múltiple. Este recipiente está diseñado para introducirse en el termociclador y es compatible con uno o más detergentes o disolventes hidrofóbicos que se usan para desarrollar una emulsión en la mezcla de reacción. El recipiente puede ser un tubo, o una placa microtituladora de 96 o de 384 pocillos hechos de poliestireno, polipropileno o policarbonato, o cualquier otro polímero compatible con los detergentes y los disolventes hidrofóbicos usados para el desarrollo de la emulsión. También pueden usarse tarjetas microfluidicas o chips fabricados a partir de materiales compatibles, siempre y cuando estén diseñados para colocarse de forma funcional en el termociclador.

El sistema también incluye uno o más manipuladores -o portadores- de líquidos diseñados para verter en el recipiente una muestra de ácido nucleico y para verter en el recipiente un compuesto que rompe o deshace emulsiones.

El sistema puede combinarse con un equipo de análisis de ácido nucleico de 'aguas abajo', de manera que el sistema previamente descrito funciona como una unidad de preparación de ácido nucleico para aumentar el nivel del ácido nucleico de interés y que este pueda analizarse después en su conjunto, o en parte, mediante el equipo 'de aguas abajo'. El equipo de análisis de ácido nucleico 'de aguas abajo' puede incluir un segundo termociclador configurado para realizar una segunda amplificación dirigida de un ácido nucleico amplificado producido por medio del sistema. Una unidad de purificación, como un sistema magnético que incluye una resina de intercambio aniónico unida a una bolita o cuenta magnética, puede resultar útil y puede usarse para depurar o purificar un producto de la segunda amplificación dirigida. Estas unidades de purificación se describen en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes de EE UU n^{os} 20050164215 y 20050130196. También puede usarse una unidad de ácido nucleico para determinar la composición de las bases del producto de la segunda amplificación dirigida utilizando una espectrometría de masas y una base de datos sobre la masa molecular/composición de las bases con el propósito de analizar los ácidos nucleicos. Las realizaciones particulares de los métodos de detección basados en el espectro de masas se describen en las siguientes patentes, solicitudes de patentes y publicaciones científicas: Patentes de EE UU n^{os} 7 108 974; 7 217 510; 7 226 739; 7 255 992; 7 312 036; 7 339 051; Publicaciones de Patentes de EE UU n^{os} 2003/0027135; 2003/0167133; 2003/0167134; 2003/0175695; 2003/0175696; 2003/0175697; 2003/0187588; 2003/0187593; 2003/0190605; 2003/0225529; 2003/0228571; 2004/0110169; 2004/0117129; 2004/0121309; 2004/0121310; 2004/0121311; 2004/0121312; 2004/0121313; 2004/0121314; 2004/0121315; 2004/0121329; 2004/0121335; 2004/0121340; 2004/0122598; 2004/0122857; 2004/0161770; 2004/0185438; 2004/0202997; 2004/0209260; 2004/0219517; 2004/0253583; 2004/0253619; 2005/0027459; 2005/0123952; 2005/0130196; 2005/0142581; 2005/0164215; 2005/0266397; 2005/0270191; 2006/0014154; 2006/0121520; 2006/0205040; 2006/0240412; 2006/0259249; 2006/0275749; 2006/0275788; 2007/0087336; 2007/0087337; 2007/0087338; 2007/0087339; 2007/0087340; 2007/0087341; 2007/0184434; 2007/0218467; 2007/0218467; 2007/0218489; 2007/0224614; 2007/0238116; 2007/0243544; 2007/0248969; 2007/0264661; 2008/0160512; 2008/0311558; 2009/0004643; 2009/0047665; 2009/0125245; WO2002/070664; WO2003/001976; WO2003/100035; WO2004/009849; WO2004/052175; WO2004/053076; WO2004/053141; WO2004/053164; WO2004/060278; WO2004/093644; WO2004/101809; WO2004/111187; WO2005/023083; WO2005/023986; WO2005/024046; WO2005/033271; WO2005/036369; WO2005/086634; WO2005/089128; WO2005/091971; WO2005/092059; WO2005/094421; WO2005/098047; WO2005/116263; WO2005/117270; WO2006/019784; WO2006/034294; WO2006/071241; WO2006/094238; WO2006/116127; WO2006/135400; WO2007/014045; WO2007/047778; WO2007/086904; WO2007/100397; WO2007/118222; WO2008/104002; WO2008/116182; WO2008/118809; WO2008/127839; WO2008/143627; WO2008/151023; WO2009/017902; WO2009/023358; WO2009/038840; Ecker et al., 'Ibis T500: a universal biosensor approach for microbiology', Nat. Rev. Microbiol., 3 de junio de 2008; Ecker et al., 'The Microbial Rosetta Stone Database: A compilation of global and emerging infectious microorganisms and bioterrorist threat agents', BMC Microbiology, 2005, 5(1): 19; Ecker et al., 'The Ibis T5000 Universal Biosensor: An

Automated Platform for Pathogen Identification and Strain Typing', JALA, 2006, 6(11): 341-351; Ecker et al., 'The Microbial Rosetta Stone Database: A common structure for microbial biosecurity threat agents', J. Forensic Sci., 2005, 50(6): 1380-5; Ecker et al., 'Identification of Acinetobacter species and genotyping of Acinetobacter baumannii by multilocus PCR and mass spectrometry', J Clin Microbiol., agosto de 2006, 44(8):2921-32; Ecker et al., 'Rapid identification and strain-typing of respiratory pathogens for epidemic surveillance', Proc Natl Acad Sci., EE UU, mayo de 2005, 31, 102(22):8012-7, Epub, 23 de mayo de 2005; Wortmann et al., 'Genotypic evolution of Acinetobacter baumannii strains in an outbreak associated with war trauma', Infect Control Hosp Epidemiol, junio de 2008; 29(6):553-555; Hannis et al., 'High Resolution genotyping of Campylobacter species by use of PCR and high-throughput mass spectrometry', J Clin Microbiol., abril de 2008, 46(4):1220-5; Blyn et al., 'Rapid detection and molecular serotyping of adenovirus by use of PCR followed by electrospray ionization mass spectrometry', J Clin Microbiol., febrero de 2008; 46(2):644-51; Eshoo et al., 'Direct broad-range detection of alphaviruses in mosquito extracts', Virology, 25 de noviembre de 2007, 368(2):286-95; Sampath et al., 'Global surveillance of emerging Influenza virus genotypes by mass spectrometry', PLoS ONE., 30 de mayo de 2007; 2(5):e489; Sampath et al., 'Rapid identification of emerging infectious agents using PCR and electrospray ionization mass spectrometry', Ann N Y Acad Sci., abril de 2007, 1102:109-20; Hujer et al., 'Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant Acinetobacter sp. Isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center', Antimicrob Agents Chemother, diciembre de 2006, 50(12):4114-23; Hall et al., 'Base composition analysis of human mitochondrial DNA using electrospray ionization mass spectrometry: a novel tool for the identification and differentiation of humans', Anal Biochem, 1 de septiembre de 2005, 344(1):53-69; Sampath et al., 'Rapid identification of emerging pathogens: coronavirus', Emerg Infect Dis, marzo de 2005, 11(3):373-9; Jiang Y, Hofstadler SA, 'A highly efficient and automated method of purifying and desalting PCR products for analysis by electrospray ionization mass spectrometry', Anal Biochem., 2003, 316: 50-57; Jiang et al., 'Mitochondrial DNA mutation detection by electrospray mass spectrometry', Clin Chem., 2006, 53(2): 195-203, Epub 7 de diciembre; Russell et al., 'Transmission dynamics and prospective environmental sampling of adenovirus in a military recruit setting', J Infect Dis, 2006, 194(7): 877-85, Epub 25 de agosto de 2006; Hofstadler et al., 'Detection of microbial agents using broad-range PCR with detection by mass spectrometry: The TIGER concept', capítulo en la 'Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods', 2006; Hofstadler et al., 'Selective ion filtering by digital thresholding: A method to unwind complex ESI-mass spectra and eliminate signals from low molecular weight chemical noise', Anal Chem., 2006, 78(2): 372-378; Hofstadler et al., 'TIGER: The Universal Biosensor', Int J Mass Spectrom., 2005, 242(1): 23-41; Van Ert et al., 'Mass spectrometry provides accurate characterization of two genetic marker types in Bacillus anthracis', Biotechniques, 2004, 37(4): 642-4, 646, 648; Sampath et al., 'Forum on Microbial Threats: Learning from SARS: Preparing for the Next Disease Outbreak – Workshop Summary', (ed. Knobler SE, Mahmoud A, Lemon S.), The National Academies Press, Washington, D.C., EE UU, 2004, 181-185.

Como alternativa al sistema de análisis de espectrometría de masas / composición de las bases, puede realizarse una secuenciación del producto de la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple, o del producto de una segunda amplificación dirigida de este, utilizando un secuenciador configurado para funcionar con un método de secuenciación seleccionado de un grupo que comprende la secuenciación de Sanger, la pirosecuenciación, la secuenciación con SOLiD™, la secuenciación de una sola molécula en tiempo real, la nanosecuenciación, la secuenciación con el método tSMS™, la secuenciación de una sola molécula mediante síntesis, la secuenciación con nanoporos u otra técnica. Normalmente, las personas versadas en la materia conocen estos métodos, que se describen en las Patentes de EE UU n^{os} 7 211 390; 7 211 414; 7 329 492; 7 482 120; 7 282 337; 7 220 549; 7 351 532; 7 232 656; 7 115 400; 6 833 246; 6 787 308.

Si bien la presente invención se ha descrito de forma específica y de acuerdo con algunas de las realizaciones, los siguientes ejemplos sirven solamente para ilustrar la invención, y no pretenden limitarla. Para que la invención desvelada en el presente texto pueda entenderse más eficazmente, se proporcionan algunos ejemplos a continuación. Debe entenderse que estos ejemplos solo tienen un propósito ilustrativo y no debe interpretarse que limitan la invención en modo alguno.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Efectos de los Solutos Compatibles sobre la Sensibilidad de la Reacción de Amplificación

El propósito de esta serie de experimentos era investigar los efectos de los solutos compatibles trehalosa y betaína a la hora de aumentar la sensibilidad de la reacción de amplificación, entendiéndose por 'sensibilidad' la capacidad para amplificar satisfactoriamente el ADN diana en bajas concentraciones, por debajo de un nivel de 1 nanogramo.

Las investigaciones iniciales mostraron que la concentración de trehalosa que proporciona un aumento óptimo de la sensibilidad de la reacción de amplificación era de aproximadamente 0,8 M, tal y como se descubrió en una reacción de amplificación de 50 picogramos de ADN humano, seguida de un cálculo del porcentaje de alelos detectado en el análisis del ADN amplificado obtenido en la reacción. Asimismo, se descubrió que la concentración óptima de betaína era de aproximadamente 0,8 M.

Para investigar los efectos que tienen los solutos compatibles sobre la sensibilidad de la reacción de amplificación, se desarrollaron mezclas de reacción de amplificación, tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1 – Mezclas de Amplificación

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Mezcla 1	Concentración Final
5 µL de ADN molde de disolución hasta la extinción, como se explica más adelante	Variable
Tris HCl	0,04025 M
Tris Base	0,00975 M
Cloruro de Magnesio	0,012 M
Sulfato de Amonio	0,01 M
100 mM de preparación de dNTP (25 mM cada uno/a)	2 mM cada uno/a
DTT	0,004 M
Preparación con un par de Cebadores	0,05 mM
Enzima diluida en tampón	0,5 unidades/ µL

Mezcla 2 (0,8 M de Trehalosa)	Concentración Final
5 µL de ADN molde de disolución hasta la extinción, como se explica más adelante	Variable
Tris HCl	0,04025 M
Tris Base	0,00975 M
Cloruro de Magnesio	0,012 M
Sulfato de Amonio	0,01 M
Trehalosa	0,6 M
100 mM de preparación de dNTP (25 mM cada uno/a)	2 mM cada uno/a
DTT	0,004 M
Preparación con un par de Cebadores	0,05 mM
Enzima diluida en tampón	0,5 unidades/ µL

	Mezcla 3 (0,8 M de Trehalosa + 0,8 M de Betaína)	Concentración Final
5	5 µL de ADN molde de disolución hasta la extinción, como se explica más adelante	Variable
	Tris HCl	0,04025 M
	Tris Base	0,00975 M
10	Cloruro de Magnesio	0,012 M
	Sulfato de Amonio	0,01 M
15	Betaína	0,6 M
	Trehalosa	0,6 M
	100 mM de preparación de dNTP (25 mM cada uno/a)	2 mM cada uno/a
20	DTT	0,004 M
	Preparación con un par de Cebadores	0,05 mM
25	Enzima diluida en tampón	0,5 unidades/ µL

Preparación A8 / Preparación B5		
30	Tris, pH 7,5	50,00 mM
	MgCl ₂	9,00 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	7,50 mM
35	Betaína	0,60 M
	Ácido poliadenílico tratado con ultrasonidos	1,00 Ng/ul
	Trehalosa	0,60 M
40	100 mM de preparación de dNTP (25 mM cada uno/a)	2,00 mM
	DTT	4,00 mM
	Cebadores	15,00 uM
45	Phi29	0,43 u/ul
	Pol1	0,01 u/ul
	Pirofosfatasa	0,00007 u/ul
50	BSA	0,23 ug/ul
	DMSO	2,50%
55	Tween-40	1,00%

La Figura 1 muestra los resultados de un experimento de 'disolución hasta la extinción' en el que 1 nanogramo de la muestra SC35495 de ADN humano se diluyó sucesivamente y se añadió a las mezclas de reacción que se muestran en la Tabla 1 para una amplificación previa a un análisis de alelos mediante métodos conocidos. Las reacciones de amplificación se realizaron de la siguiente manera: las mezclas de reacción de la Tabla 1 (1, 2 y 3) se prepararon y se sometieron a las siguientes condiciones de amplificación durante un período de 6 horas en un termociclador:

- 1) 30° C durante 4 minutos;
- 2) 15° C durante 15 segundos;
- 3) repetir pasos 1 y 2 un total de 150 veces;
- 4) 90° C durante 3 minutos; y
- 5) conservar a 4° C.

El ADN amplificado resultante se analizó para obtener una identificación de alelos usando un método de análisis basado en la espectrometría de masas en el que los pares de cebadores específicos se usan después para obtener productos de amplificación específicos adicionales mediante una PCR de loci. Estos productos de amplificación específicos tienen longitudes de hasta alrededor de 140 bases nucleicas que son adecuadas para realizar un análisis de composición de bases mediante espectrometría de masas, de una manera similar a la que se desvela en Jiang et al. (Clin Chem., 2007, 53, 195-203). La Figura 1 muestra claramente que las mezclas de reacción 2 y 3 producen ADN amplificado cuyas asignaciones alélicas ('allele calls', en inglés) pueden realizarse con niveles de concentración tan bajos como 2 picogramos.

En otro experimento, el ADN amplificado resultante se analizó utilizando un procedimiento de fluorescencia con el Profiler™ con el objetivo de determinar una serie de alelos STR ('repetición(es) corta(s) en tándem') que se conoce como el grupo CODIS ('Combined DNA Index System', en inglés, o Sistemas de Índice Combinado de ADN). Los pares de cebadores específicos se usaron después para obtener productos de amplificación específicos adicionales mediante una PCR de los loci de interés. Estos productos de amplificación se sometieron después al procedimiento de fluorescencia con el 'Profiler'. En las tablas 2 y 3 se incluyen diez de los trece loci STR centrales del CODIS (las abreviaturas de los marcadores de la columna de los loci son las siguientes: D3S = D3S1358; D8S = D8S1179; D21S = D21S11; D18S = D18S51; D5S = D5S8181; D13S = D13S317; y D7S = D7S820, mientras que vWA indica el gen del factor de Von Willebrand; TPOX indica el gen de la peroxidasa del tiroides; FGA indica el gen de la cadena alfa del fibrinógeno; y AMEL indica el gen de la amelogenina). La columna situada más a la izquierda indica la cantidad de ADN utilizada en las reacciones de amplificación. Los números que aparecen debajo de los loci indican el número de asignaciones alélicas realizadas en el análisis de acuerdo con el método con el Profiler™. El objetivo es realizar dos asignaciones alélicas para tantos loci como sea posible con la menor cantidad posible de ADN antes de llevar a cabo la amplificación, ya que la capacidad de hacer esto proporcionaría la capacidad de obtener muestras forenses útiles de ADN a partir de cantidades pequeñas de tejidos.

Tabla 2: Sensibilidad de la Mezcla de Reacción 1

Cantidad de ADN (pg)	D3S	vWA	FGA	AMEL	D8S	D21S	D18S	D5S	D13(H)	D7S
1000	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
500	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
250	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2
125	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1
63	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
31	1	1	2	1	0	2	0	0	0	1
16	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
8	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0
4	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

Tabla 3: Sensibilidad de la Mezcla de Reacción 3

	Cantidad de ADN (pg)	D3S	vWA	FGA	AMEL	D8S	D21S	D18S	D5S	D13(H)	D7S
5	1000	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10	500	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	250	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
15	125	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	63	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2
20	31	2	2	1	2	1	2	2	1	2	2
	16	2	0	2	1	1	1	1	1	0	0
25	8	2	2	0	0	0	0	1	0	0	0
	4	2	0	0	0	1	0	0	1	0	1
30	2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0

Las tablas 2 y 3 muestran claramente que la mezcla 3, que contiene solutos añadidos, mejora considerablemente la sensibilidad respecto a la obtenida utilizando la mezcla 1, que no tiene solutos. Por lo tanto, la mezcla 3 genera más producto a partir de muestras de trazas de ácido nucleico tan pequeñas como 2 picogramos y proporciona 5 o más asignaciones de alelos para muestras de trazas tan pequeñas como 4 picogramos.

Ejemplo 2: Efectos de los Solutos Compatibles a la hora de mantener el Equilibrio Alélico en la Reacción de Amplificación

El equilibrio alélico es una medida que indica el ratio de cantidad de detección del alelo menor (también llamado 'alelo menos común') vs. el alelo mayor (también llamado 'alelo más común'). Es deseable mantener el equilibrio alélico de una determinada muestra de ADN, cuando esta se amplifica, para obtener una representación precisa del equilibrio alélico de la muestra original.

Se amplificó una muestra de ADN humano, denominada SC35495, de acuerdo con las condiciones descritas en el Ejemplo 1. En este ejemplo, las cantidades de los alelos detectados se cuantificaron utilizando el kit Quantifier™ (Applied Biosystems), que está disponible comercialmente. Los valores de estas cantidades se convirtieron a Log2 para proporcionar una medida más intuitiva del equilibrio. Estos valores se muestran en la Figura 2, en la que se puede ver que la mezcla 3 (A4) es la mejor mezcla para conservar la mejor representación del equilibrio alélico. Esto indica que la inclusión de los solutos compatibles betaína y trehalosa a la mezcla de reacción mejora el equilibrio alélico / representación de la reacción de amplificación en comparación con las mezclas de reacción sin solutos o únicamente con trehalosa.

Ejemplo 3: Efectos de los Solutos Compatibles a la hora de mantener la Calidad de la Reacción de Amplificación

La calidad de la reacción de amplificación puede describirse desde un punto de vista para proporcionar una medida combinada de una óptima amplificación progresiva ('x' veces), un alto porcentaje de amplificación del ácido nucleico diana analizado y un rendimiento óptimo en el ensayo con el Profiler™.

En la Figura 3 se muestran los resultados de las determinaciones de cantidad del ADN molde amplificado mediante tres mezclas de reacción, de acuerdo con las condiciones descritas en el ejemplo 1, usando 0,1 nanogramos de ADN molde (panel A) y 1 nanogramo de ADN molde (panel B). Queda claro que la mezcla 3 (A4) produce el ADN más amplificado. Además, se descubrió que la mezcla 3 (A4) produce menos picos o máximos externos de compuestos 'no molde' detectados en el ensayo con Quantifier™ (no se muestra) y en los geles de agarosa al 1% (no se muestra) que los observados con las otras dos mezclas. Así, la inclusión de betaína y

trehalosa en la mezcla de reacción mejora considerablemente la calidad de una reacción de amplificación en comparación con la de las mezclas que no tienen solutos o que únicamente tienen trehalosa.

Ejemplo 4: Efectos de la Inclusión de una Polimerasa de ADN adicional sobre la Reacción de Amplificación

Para evaluar los efectos de aumentar la acción de la polimerasa Phi29, se añadieron individualmente enzimas polimerasas adicionales a la mezcla de amplificación 3 junto con 15 picogramos de ADN molde de la muestra humana SC35495. Las muestras se amplificaron como se indica en el Ejemplo 1. El ADN amplificado resultante se analizó en el ensayo del Profiler™ y se realizaron y calcularon las asignaciones alélicas. La Tabla 4 muestra los resultados e indica que la adición de polimerasa Pol I da como resultado una media de cuatro asignaciones alélicas adicionales en el experimento, además de indicar que la adición de polimerasa Pol I es una modificación positiva de la mezcla de amplificación.

Tabla 4: Efectos de una Enzima Polimerasa Adicional sobre la Amplificación del Genoma Completo según la Medición de las asignaciones alélicas de Mezclas Amplificadas

Enzima Adicional Incluida en la Muestra	Asignaciones Alélicas Experimento 1	Asignaciones Alélicas Experimento 2	Promedio de Asignaciones Alélicas
Ninguna	13	12	12,5
Fragmento Klenow	11	7	9
Polimerasa T4	11	9	10
Polimerasa T7	14	13	13,5
Polimerasa BstE	14	9	11,5
Polimerasa Pol I	18	15	16,5

La adición de la Polimerasa Pol I aumenta todavía más la producción o cosecha del ADN amplificado y también mejora el genotipado de las cantidades muy pequeñas de ADN. La adición de una enzima adicional, pirofosfatasa, resulta útil porque se sabe que la acumulación de pirofosfatasa durante el proceso de amplificación inhibe las reacciones de las polimerasas.

Ejemplo 5: Diseño y Estudio de las Modificaciones Individuales de Cebadores de Oligonucleótidos

Se diseñó una serie de unidades o motivos de cebadores para mejorar la calidad, la sensibilidad y el equilibrio de la reacción de amplificación. Las modificaciones incluían la inclusión de bases nucleicas de inosina en posiciones específicas de los cebadores de hexámeros, heptámeros y octámeros. Se incorporaron ligamientos de fosforotioato modificado a estos cebadores en los dos ligamientos terminales más -hacia- 3'. Se descubrió que la colocación más efectiva de las bases nucleicas de inosina se daba en las posiciones quinta y sexta de los cebadores de hexámeros, en las posiciones sexta y séptima de los cebadores de heptámeros y en las posiciones séptima y octava de los cebadores de octámeros. Estos cebadores que contenían bases nucleicas de inosina produjeron un producto menos amplificado que los cebadores correspondientes que no contenían inosina. Sin embargo, se descubrió que el producto total amplificado presentaba una mayor proporción del ADN molde, lo cual indicaba que la inclusión de inosinas en los cebadores mejora la calidad de la amplificación.

La posición de los residuos de nucleótidos modificados de LNA de los cebadores de heptámeros se examinó al detalle cambiando sistemáticamente la posición de una o dos modificaciones de LNA (L) en heptámeros aleatorios, tal y como se muestra en la Tabla 5. Los símbolos de la Tabla 5 son los siguientes: N = A, T, C o G; I = inosina; NI = nitroindol; L = LNA (versiones bloqueadas de A, C, T o G). En este experimento, las mejoras en la amplificación progresiva o escalonada se obtienen con los cebadores que tienen LNA sustituido en la posición 2, la posición 4, la posición 5, las posiciones 1 y 4, y las posiciones 2 y 5. Las sustituciones del LNA se toleraron bien en todas las posiciones, de manera que solamente la posición más 3' mostró un ligero efecto negativo (LNA-7). Los cebadores que tienen residuos sustituidos de LNA en dos posiciones muestran un mayor aumento de amplificación escalonada en comparación con aquellos que solo tienen un único residuo sustituido de LNA. Además, al sustituir los residuos de inosina en las posiciones más 3' de un cebador de LNA sustituido en las posiciones 2 y 5, mejoró aún más la amplificación escalonada (LNA-11 y LNA-12). En algunas realizaciones, se usan NLNNLIN o N de 7 partes con un fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 6 y 7.

Tabla 5: Determinación del Posicionamiento Óptimo de los Residuos de LNA en los Cebadores

	5' Posición del Residuo de Nucleótidos del (los) Cebador(es) 3'							Número de Amplificaciones con respecto al Control
	1	2	3	4	5	6	7	
5	Cebador							
	Control	N	N	N	N	N	N	1
10	LNA-1	L	N	N	N	N	N	0,9
	LNA-2	N	L	N	N	N	N	1
15	LNA-3	N	N	L	N	N	N	0.9
	LNA-4	N	N	N	L	N	N	1,1
20	LNA-5	N	N	N	N	L	N	1,4
	LNA-6	N	N	N	N	N	L	1
25	LNA-7	N	N	N	N	N	L	0,7
	LNA-8	L	N	N	L	N	N	7,6
30	LNA-9	L	N	N	L	N	L	0,2
	LNA-10	L	N	N	L	N	I	4,8
35	LNA-11	N	L	N	N	L	I	9,3
	LNA-12	N	L	N	N	L	N	4,1
40	LNA-13	L	N	N	L	N	NI	No hay

Ejemplo 6: Investigación Preliminar de los Detergentes en la Producción Obtenida en las Reacciones de Amplificación por Desplazamiento Múltiple

El desarrollo de una formulación de una emulsión para una reacción de amplificación por desplazamiento múltiple requiere investigar los efectos de la presencia de detergentes y aceites en la formación de la emulsión y confirmar que estos componentes no tienen efectos negativos en las producciones de la reacción. Las reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple se llevaron a cabo usando 10 pg de un genoma estándar de *Klebsiella pneumoniae* en un volumen de reacción de 50 µL utilizando un set estandarizado de cebadores, 2 mM de dNTPs, 3,7 unidades por reacción de Polimerasa Pol I y 18,3 unidades por reacción de polimerasa Phi29. En las reacciones se incluyeron concentraciones variables de diferentes detergentes. Una prueba se llevó a cabo usando polidimetilsiloxano sin detergentes. Las producciones de las reacciones se determinaron usando una PCR cuantitativa (QPCR). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Producciones de las Mezclas de las Reacciones de Amplificación por Desplazamiento Múltiple que contienen Detergentes y Polidimetilsiloxano

60

65

	Componente de Emulsión Añadido	Cantidad	Concentración de la Producción (ng/μL)
5	Polidimetilsiloxano	80 μL	15,3
	Tween 20	0,1%	99,8
10	Tween 40	0,1%	113,0
	Tween 80	0,1%	64,7
15	Triton-X 100	0,1%	95,4
	Triton-X 102	0,1%	112,4
20	Tween 20	0,05%	74,8
	Tween 40	0,05%	59,8
25	Tween 80	0,05%	64,3
	Triton-X 100	0,05%	62,4
30	Triton-X 102	0,05%	67,2

Se descubrió que la adición de polidimetilsiloxano reducía la producción total agitando durante 5-10 segundos. La adición de un 0,05% de detergentes no afectaba a la producción de forma apreciable, pero las concentraciones de un 0,1% aumentaban la producción con todos los detergentes, excepto Tween 80.

Se realizó un segundo experimento similar con detergentes con concentraciones de entre un 0,1% y un 1,0%. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Producciones de las Mezclas de las Reacciones de Amplificación por Desplazamiento Múltiple que contienen Detergentes

	Componente de Emulsión Añadido	Concentración	Concentración de la Producción (μg/μL)
45	Tween 20	0,5%	57,9
	Tween 40	0,1%	54,6
	Triton-X 100	0,1%	47,2
50	Triton-X 102	0,1%	48,4
	Tween 20	0,5%	61,9
	Tween 40	0,5%	78,7
55	Triton-X 100	0,5%	52,0
	Triton-X 102	0,5%	63,0
	Tween 20	1,0%	65,3
60	Tween 40	1,0%	60,5
	Triton-X 100	1,0%	44,1
	Triton-X 102	1,0%	45,7

65

En estos experimentos se identificó a Tween 40 como el mejor reactivo.

Ejemplo 7: Efectos de los Detergentes sobre el Equilibrio en las Reacciones de Amplificación por Desplazamiento Múltiple

Se investigaron los efectos de Tween 20, Tween 40, Tween 80 (#P9416-50ML, P1504-500ML y P5188-50ML, respectivamente, en el catálogo Sigma), Triton X-100 y Triton X-102 (#T8787-50ML y X102-500ML en el catálogo Sigma) en relación con la amplificación de las muestras de prueba de ADN. Tras completar la reacción de amplificación, se rompió la emulsión añadiendo una cantidad excesiva de cloroformo. Las producciones de la amplificación se evaluaron en presencia de detergentes de entre un 0,05% y un 1% (p/v). Los resultados se muestran en las Figuras 4 y 5. Se determinó que Tween 40 tiene los efectos más favorables sobre la producción.

El ADN amplificado que se obtuvo -tal y como se ha descrito previamente- en presencia y ausencia de Tween 40 se usó como ADN molde para un ensayo en el que se utilizó el kit de amplificación de PCR AmpFLSTR® Identifiler® siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosciences, Foster City, CA, EE UU). En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos en el análisis del locus FGA utilizando ADN amplificado de una reacción de amplificación por desplazamiento múltiple en ausencia de detergente y en presencia de un 0,5% y un 1% de Tween 40. Queda claro que el equilibrio entre los dos alelos del locus (19 y 23) mejora enormemente en presencia de un 1% de Tween 40.

El equilibrio mejorado de la detección de alelos también provocó menos casos de alelos no detectados ('abandonos') en el análisis. La Tabla 8 muestra la relación entre los 'abandonos' de alelos y la presencia de Tween 40 en la mezcla de reacción.

Tabla 8: Efectos de Tween 40 en una Mezcla de Amplificación inicial sobre los 'Abandonos' de Alelos en el Ensayo con Identifiler®

Concentración de Tween 40 (% p/v)	Asignaciones Alélicas	Abandonos
0,0	20	11
0,5	24	7
1,0	25	6

Ejemplo 8: Reacciones de Amplificación por Desplazamiento Múltiple en Emulsiones de Agua en Aceite

Sin estar sujetos a ninguna teoría en particular, se cree que llevar a cabo las reacciones de amplificación en soluciones que contienen un detergente en forma de emulsión da como resultado la captura de moléculas individuales de ácido nucleico molde en las microgotitas de la emulsión. Esto contribuye a la amplificación del ácido nucleico molde, a la vez que se minimiza la interferencia de las moléculas de ácido nucleico de fondo y la competencia entre las moléculas individuales de la plantilla de ADN. También se cree que el formato de emulsión proporciona una amplificación más eficiente de los fragmentos más pequeños, o con pocas copias, del genoma diana.

Se descubrió que las soluciones acuosas con un 0,5-1% de detergente (Tween 20, 40, 80; Triton-X 100, 102) mezcladas con un volumen 4 veces excesivo de polidimetilsiloxano en un homogeneizador tipo 'Bead Beater' (Biospec Products Inc., Bartlesville, OK, EE UU) durante 15 segundos formaban emulsiones que eran estables en el ciclo de amplificación elegido que se describe en el Ejemplo 6. Esto indica que la emulsión de Tween 40 / polidimetilsiloxano es compatible con la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple.

Se descubrió que las reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple en emulsiones basadas en polidimetilsiloxano que contienen un 0,5% de Tween 40 y un 1% de Triton X-100 producen productos con una amplificación considerable, tal y como lo demuestran los geles de electroforesis (no se muestra).

Las muestras de ADN amplificado obtenidas de las emulsiones de polidimetilsiloxano que contienen un 0,5% y un 1% de Tween 40 se analizaron con el ensayo de Identifiler® para determinar si los 'abandonos' de alelos se podían reducir. Este sería un resultado particularmente deseable, ya que, en el caso del ensayo de Identifiler®, es poco probable que un individuo pueda ser identificado en una investigación forense si en el ensayo se obtiene un perfil alélico incompleto debido a los abandonos causados por una mala representación y/o equilibrio en una reacción inicial de amplificación por desplazamiento múltiple.

Los resultados que se muestran en la Tabla 9 indican que una concentración de Tween 40 de un 1% (p/v) en una emulsión de polidimetilsiloxano proporciona una buena representación y equilibrio en las reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple. En el caso del Tween 40 de un 1%, los abandonos se eliminaron por completo. Por lo tanto, la emulsión de Tween 40 / polidimetilsiloxano supone una mejora muy útil para la amplificación por desplazamiento múltiple. Las personas versadas en la materia sabrán reconocer que, a pesar de que la representación y el equilibrio se evaluaron utilizando un kit de ensayo de STR humano disponible comercialmente, el ADN que se obtiene utilizando las reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple descritas en el presente texto también es útil para otras aplicaciones, como, por ejemplo, la identificación de virus o bacterias de muestras que contienen cantidades ínfimas del ADN de esos virus o bacterias.

Tabla 9: Efectos del Tween 40 en una Mezcla inicial de Amplificación de Emulsión sobre los Abandonos de Alelos en un Ensayo con Identifiler®

Concentración de Tween 40 (% p/v)	Asignaciones Alélicas	Abandonos
0,0	20	11
0,5	28	3
1,0	31	0

Los ejemplos precedentes ilustran que el uso de polimerasas, la inclusión de solutos, detergentes y polímeros hidrofóbicos compatibles y las modificaciones de cebadores mejoran individual y colectivamente la sensibilidad de la amplificación, a la vez que preservan la representación de la muestra de ácido nucleico original y producen productos de amplificación de alta calidad.

Ejemplo 9: Estudio sobre los Efectos de la Concentración de DMSO y el Tiempo de Desnaturalización sobre el Equilibrio Alélico

Para analizar los efectos que tienen la concentración de DMSO y el tiempo de desnaturalización sobre el equilibrio alélico de la amplificación por desplazamiento múltiple, se amplificaron tres muestras de ADN de 62,5 pg (SC3) utilizando un protocolo estándar que se denomina WGA_4 y que incluye un ciclo de desnaturalización de 10 minutos. También se sometió una cuarta muestra de ADN de 62,5 pg al mismo protocolo, con la excepción de que se utilizó un periodo de desnaturalización de 3 minutos con una temperatura de 95° C. Se llevó a cabo una reacción de amplificación -utilizando el WGA_5- que contenía DMSO en una concentración de un 5% y otra que contenía DMSO en un 10%. El ADN amplificado se analizó usando un ensayo de Identifiler® y se determinó el equilibrio alélico de cada muestra. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10: Efectos de la Concentración de DMSO y el Tiempo de Desnaturalización sobre el Equilibrio Alélico en Muestras Amplificadas

Muestra	Tiempo de Desnaturalización (minutos)	Concentración de DMSO (%)	Equilibrio Alélico
1	10	0	1,90
2	10	5	1,44
3	10	10	1,77
4	3	0	2,55

Los datos que se muestran en la Tabla 10 señalan que con un periodo de tiempo de 10 minutos para la desnaturalización de la muestra de ADN y con una concentración de DMSO de un 5% en la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple se obtiene un equilibrio alélico de 1,44. En algunas realizaciones, se usa un tiempo de desnaturalización de un minuto a 95° C.

Ejemplo 10: Estudios adicionales sobre los Efectos de la Concentración de DMSO y el Tiempo de Desnaturalización sobre el Equilibrio Alélico

El experimento que se describe en el Ejemplo 9 se perfeccionó con periodos adicionales de tiempo de desnaturalización de entre cero y diez minutos y con concentraciones de DMSO de entre un 1% y un 5% utilizando un protocolo estandarizado de amplificación por desplazamiento múltiple denominado WGA_1. Este protocolo comprende el paso de añadir 400 µL de polidimetilsiloxano y agitar la mezcla de reacción durante dos periodos de 30 segundos para obtener una emulsión. Tras completar la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple, la emulsión se rompió añadiendo 250 µL de cloroformo, mezclándola en el vórtex y centrifugándola. El equilibrio alélico de los productos de reacción se analizó utilizando el ensayo de Identifier™.

Tabla 11: Investigación adicional sobre los Efectos de la Concentración de DMSO y el Tiempo de Desnaturalización sobre el Equilibrio Alélico en Muestras Amplificadas

Muestra	Tiempo de Desnaturalización (minutos)	Concentración de DMSO (%)	Equilibrio Alélico
1	0	0	2,06
2	1	0	1,37
3	3	0	1,93
4	5	0	1,60
5	10	0	2,23
6	3	1	1,67
7	3	2,5	1,23
8	3	5	1,33

Los datos que se muestran en la Tabla 11 indican que un periodo de tiempo de 3 minutos para la desnaturalización de la muestra de ADN y una concentración de un 2,5% de DMSO en la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple dan como resultado un mejor balance alélico de 1,23.

Ejemplo 11: Experimento de Disolución hasta la Extinción: Amplificación de Muestras diluidas de ADN mediante Amplificación por Desplazamiento Múltiple con un 2,5% de DMSO

Este experimento analiza la capacidad que tienen las condiciones de la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple para producir un producto de amplificación con un buen equilibrio alélico y una buena cosecha. Las muestras de ADN que se habían diluido desde 500 pg hasta 7,8 pg se amplificaron en mezclas de reacción que contenían DMSO en un 2,5%. Los resultados que indican la cosecha y el equilibrio de la amplificación se muestran en la Tabla 10.

Tabla 12: Efectos de la Concentración de la Muestra de ADN inicial sobre la Cosecha y el Equilibrio Alélico

Cantidad Inicial de ADN (pg)	Número de Amplificaciones (Promedio)	Promedio de Abandonos	Promedio de Equilibrio Alélico
500	$2,69 \times 10^3$	0	0,56
250	$4,90 \times 10^3$	0	0,78
125	$8,46 \times 10^3$	0	1,01
62,5	$1,60 \times 10^4$	0,67	1,67
31,3	$2,39 \times 10^4$	4,33	4,74
16,6	$4,05 \times 10^4$	11,00	8,14
7,8	$6,99 \times 10^4$	13,67	8,73

Los resultados que se muestran en la Tabla 12 indican que con el método de amplificación por desplazamiento múltiple se obtienen de promedio una amplificación escalonada y un equilibrio alélico satisfactorios con cantidades iniciales de ADN de hasta 125 pg.

Ejemplo 12: Comparación del Equilibrio Alélico de la Amplificación con Emulsión que incluye DMSO con un Kit de Amplificación del Genoma completo disponible comercialmente

El equilibrio alélico obtenido mediante reacciones de amplificación por desplazamiento múltiple con emulsión de 150 pg de ADN con un 2,5% y un 5% de DMSO se comparó con el equilibrio alélico de la misma muestra de ADN de 150 pg amplificada con Genomiphi™, un kit de amplificación del genoma completo que está disponible comercialmente. Los resultados se muestran en la Tabla 13 y en la Figura 7. En la Tabla 13, en la columna de 'Condiciones', A, B y C representan tres pruebas con condiciones de reacción idénticas. El gráfico de barras de la Figura 7 muestra los datos correspondientes a la media de las tres pruebas.

Tabla 13: Resultados de la Comparación de la Reacción de Amplificación con Emulsión -que contiene DMSO- con la Reacción con Genomiphi

Muestra	Condiciones	Concentración de DMSO (%)	Número de Amplificaciones	Abandonos	Equilibrio Promedio
1	eWGA A	2,5	$1,31 \times 10^4$	0	0,64
2	eWGA B	2,5	$1,40 \times 10^4$	0	0,67
3	eWGA C	2,5	$1,26 \times 10^4$	0	0,43
4	eWGA A	5,0	$8,84 \times 10^3$	0	1,16
5	eWGA B	5,0	$9,33 \times 10^3$	0	0,65
6	eWGA C	5,0	$7,41 \times 10^3$	0	0,59
7	Genomiphi A	0	$6,58 \times 10^3$	0	1,28
8	Genomiphi B	0	$6,31 \times 10^3$	3	1,21
9	Genomiphi C	0	$6,55 \times 10^3$	0	1,34
10	Sin alterar A	0	-	1	0,51
11	Sin alterar B	0	-	4	0,52
12	Sin alterar C	0	-	0	0,40

Los resultados que se muestran en la Tabla 13 y en la Figura 7 indican que el método de amplificación con emulsión desarrollado con DMSO con una concentración de un 2,5% da como resultado un equilibrio alélico que es similar al de la muestra de ADN no amplificada y que es un equilibrio alélico mucho mejor que el que se obtiene utilizando el kit Genomiphi™, que está disponible comercialmente.

Ejemplo 13: Estudio sobre la Reacción de Amplificación por Desplazamiento Múltiple -basada en la Emulsión- con ADN humano

Se amplificó ADN genómico humano en una mezcla de reacción que contenía 50 mM de Tris (pH de 7,5), 9 mM de cloruro de magnesio, 7,5 mM de sulfato de amonio, 0,6 M de betaína, 1,00 ng/μL de ácido poliadenílico tratado con ultrasonidos, 0,6 M de trehalosa, 2 mM de dNTPs de Boline, 4 mM de ditioneitol, 15 mM de cebadores, 0,43 unidades/μL de polimerasa Phi29, 0,01 unidades/μL de polimerasa Pol I, 7×10^{-5} unidades/μL de pirofosfatasa, 0,23 ug/μL de albúmina de suero bovino, 2,50% de DMSO y 1,00% de Tween 40. Se ha descubierto que estas condiciones provocan un efecto sinérgico, mejorando la producción de la amplificación, tal y como se muestra en la Figura 8, donde se indica que la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple basada en la emulsión produce un aumento de unas 100 veces en la producción o cosecha del producto en comparación con el procedimiento publicado por Dean et al. (Dean et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 99(8):5261-5266).

Ejemplo 14: Cosechas de la Reacción de Amplificación por Desplazamiento Múltiple -basada en la Emulsión- con ADN bacteriano

Se amplificaron muestras de cuatro cantidades iniciales de ADN de *Bacillus anthracis* -que tenían entre 100 fg y 100 pg- en volúmenes de reacción de 120 μL utilizando la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple basada en la emulsión que se ha descrito en el Ejemplo 13. Los productos se cuantificaron usando una PCR cuantitativa. Las cosechas que se obtuvieron de la reacción se muestran en la Figura 9. Con la cantidad más baja de ADN molde inicial (100 fg), se obtuvo una amplificación de $2,3 \times 10^7$ veces. Estos resultados indican que la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple basada en la emulsión produce buenas cosechas de amplificación a partir de muestras pequeñas de ácidos nucleicos.

Ejemplo 15: Prueba de ADN de Teclados de Ordenador

Se humedeció un disco de filtrado Whatman Grade 50 con un tampón de reacción y se utilizó para recoger una muestra de una tecla de un teclado de ordenador. El ácido nucleico se extrajo usando métodos estándar y la muestra resultante de ácido nucleico se sometió a la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple -basada en la emulsión- que se describe en el Ejemplo 13. La muestra amplificada se analizó usando un ensayo de STR con ABI Identifiler. Los loci humanos analizados incluían: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, THO1, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, AMEL, D5S818 y FGA. Los alelos identificados coincidieron con los datos de verdad en todos los casos, a excepción del locus FGA, en el que no se identificó el alelo 22. Este ejemplo pone de manifiesto la utilidad de usar la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple basada en la emulsión como pretratamiento para el análisis genético de cantidades ínfimas de ADN.

Ejemplo 16: Análisis de Micromatriz de una Reacción de Amplificación por Desplazamiento Múltiple -basada en la Emulsión- de ADN bacteriano

Se sometió una muestra de ADN de una cepa Sterne de *Bacillus anthracis* a la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple basada en la emulsión bajo las condiciones que se describen en el Ejemplo 13, y se analizó usando una micromatriz (o biochip) para determinar las intensidades de las manchas ('spot intensities', en inglés); después, se hizo una comparación con un control que contenía el mismo ADN genómico sin amplificar. Los resultados se muestran en la Figura 10, donde se indica que el perfil del gráfico de las cuentas de la micromatriz vs el ratio de log2 de las intensidades de las manchas para el producto de la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple basada en la emulsión es similar al gráfico de control. Estos resultados indican que la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple basada en la emulsión no ha modificado de forma perceptible la representación de la muestra original.

Ejemplo 17: Preparación y Análisis de una Muestra de ADN de una Bacteria no cultivable

Se descubrió una nueva bacteria metanotrófica. A pesar de los ingentes esfuerzos de los microbiólogos, se descubrió que el organismo no es cultivable, pero supone un foco de gran interés debido a su posible uso como agente de biorremediación. Resulta deseable un análisis genético, pero normalmente solo pueden aislarse unas pocas células. Se aislaron un total de 8 células usando citometría de flujo y de ahí se aislaron ácidos nucleicos usando métodos conocidos. Después, la muestra de ácido nucleico se sometió a una reacción de amplificación por desplazamiento múltiple basada en la emulsión bajo las condiciones que se describen en el Ejemplo 13, de manera que se produjo una amplificación -mayor que 1×10^4 veces- del ADN de la muestra de ácido nucleico. Después, se purificaron los componentes superfluos de la muestra usando métodos conocidos, de manera que la muestra quedó lista para realizar una caracterización genética utilizando técnicas de secuenciación rápida o análisis de la composición de las bases mediante espectrometría de masas. De este modo, la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple basada en la emulsión es capaz de superar los problemas relacionados con el hecho de disponer solamente de una pequeña cantidad del ácido nucleico deseado para realizar un análisis del mismo.

Ejemplo 18: Funcionamiento de un Sistema de Reacción de Amplificación por Desplazamiento Múltiple -

basada en la Emulsión- con un Equipo de Análisis de Ácido Nucleico 'de Aguas Abajo'

Este ejemplo describe el funcionamiento y el manejo de un sistema de amplificación basado en la emulsión en combinación con un equipo para determinar la composición de las bases de los productos de amplificación escogidos. En la Figura 11 se muestra esquemáticamente el sistema de combinación. El sistema de amplificación basado en la emulsión 100 está diseñado para una reacción de amplificación por desplazamiento múltiple, e incluye un termociclador 102 con el que se pueden programar diferentes temperaturas para desnaturalizar el ácido nucleico y mejorar la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple debida a la polimerasa. La reacción se lleva a cabo en un recipiente 104 que puede ser un pocillo individual de una placa microtituladora de 96 pocillos o de 384 pocillos o un chip de microfluidos, por ejemplo. El recipiente está diseñado para ser compatible con el termociclador 102 y para encajar en el mismo y controlar la temperatura. Se proporciona un manipulador de líquidos 106 que está diseñado para trasladar las muestras de ácido nucleico a y desde el recipiente y que también está diseñado para transferir al recipiente un compuesto que rompe emulsiones. El termociclador 102 y el manipulador de líquidos 106 pueden estar controlados por un ordenador 108. El manipulador de líquidos 106 también puede estar diseñado para -estando controlado por el ordenador 108- preparar la mezcla final de la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple -basada en la emulsión- a partir de una composición inicial 'tipo kit', que está compuesta de solutos compatibles, estabilizadores y otros componentes, añadiendo a la composición diversos componentes de reacción justo antes del comienzo de la reacción.

El equipo de análisis de ácido nucleico 'de aguas abajo' ('downstream apparatus', en inglés) 200 puede comprender un segundo termociclador 202 diseñado para realizar una reacción convencional de amplificación con PCR utilizando uno o más pares de cebadores que marcan las zonas o regiones conservadas del ácido nucleico amplificado en la reacción de amplificación basada en la emulsión, produciendo así un producto de una segunda amplificación dirigida. Para manipular líquidos en el equipo 'de aguas abajo' 200 se utiliza un segundo manipulador de líquidos 203. El equipo 'de aguas abajo' 200 también puede incluir una unidad de purificación que contiene un separador magnético 204 que se usa junto con partículas magnéticas conjugadas con una resina de intercambio aniónico. El separador magnético 204 depura o purifica el producto de amplificación eliminando los reactivos utilizados en el proceso de amplificación dirigida. El equipo 'de aguas abajo' también incluye un espectrómetro de masas 206 para medir la masa molecular del producto de la segunda amplificación dirigida de acuerdo con los métodos descritos previamente. De forma ventajosa, un segundo ordenador 208 controla la manipulación de los componentes en el equipo 'de aguas abajo', e incluye una base de datos sobre la composición de las bases para realizar un proceso de deconvolución con las medidas de las masas moleculares de los productos de amplificación y convertirlas a las composiciones de las bases, y para identificar las coincidencias o correspondencias entre las composiciones de las bases de los productos de amplificación y las composiciones de las bases guardadas en una base de datos de composición de bases.

REIVINDICACIONES**1. Un método que comprende:**

5 poner en contacto una muestra de ácido nucleico con una reacción de mezcla que contiene una serie de cebadores de oligonucleótidos, una o más enzimas polimerasas y uno o más componentes que forman emulsiones, de manera que la mencionada mezcla de reacción contiene betaína y trehalosa; someter la mencionada mezcla de reacción a unas condiciones en las que el mencionado ácido nucleico se amplifica, para producir un producto amplificado, en una reacción de amplificación por desplazamiento múltiple, de manera que la reacción de amplificación por desplazamiento múltiple se lleva a cabo en forma de emulsión; y
 10 romper la mencionada emulsión, tras completar la mencionada reacción de amplificación por desplazamiento múltiple, añadiendo un compuesto que rompe emulsiones a la mencionada reacción para convertir la mencionada emulsión y separarla en fases acuosas e hidrofóbicas.

15 **2. El método de la reivindicación 1; el método se utiliza para llevar a cabo una reacción de amplificación del genoma completo utilizando una pequeña cantidad de ácido desoxirribonucleico (ADN), de manera que, opcionalmente:**

20 (i) la cantidad total del ADN molde añadido a la mezcla de reacción para su amplificación es inferior a 1 nanogramo;
 (ii) la cantidad total del ADN molde añadido a la mezcla de reacción para su amplificación se sitúa en el rango de los picogramos; o
 (iii) la cantidad total del ADN molde añadido a la mezcla de reacción para su amplificación es de al menos alrededor de 2 picogramos.

25 **3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que:**

30 (i) la mencionada betaína está presente en la mencionada mezcla de reacción en una concentración de entre alrededor de 0,2 M y alrededor de 1,6 M; y/o
 (ii) la mencionada trehalosa está presente en la mencionada mezcla de reacción en una concentración de entre alrededor de 0,1 M y alrededor de 1,0 M.

35 **4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las mencionadas enzimas polimerasas (una o más) comprenden una actividad de ADN polimerasa 5' → 3', una actividad exonucleasa 3' → 5' y/o una actividad de reparación por escisión 5' → 3'.**

5. El método de la reivindicación 4, en el que las mencionadas enzimas polimerasas (una o más) comprenden la polimerasa Phi29, la ADN polimerasa Bst y/o la polimerasa Pol I, y en el que, opcionalmente:

40 (i) la mencionada mezcla de reacción comprende, adicionalmente, entre alrededor de 0,2 unidades/μL y alrededor de 0,6 unidades/μL de polimerasa Phi29;
 (ii) la mencionada mezcla de reacción comprende, adicionalmente, entre alrededor de 0,005 unidades/μL y alrededor de 0,015 unidades/μL de polimerasa Pol I.

45 **6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los mencionados componentes que forman emulsiones:**

50 (a) comprenden un detergente no iónico y un polímero hidrofóbico, de manera que, opcionalmente, el mencionado polímero hidrofóbico comprende polidimetilsiloxano o aceite mineral; o
 (b) comprenden un detergente no iónico y un aceite.

7. El método de la reivindicación 6, en el que:

55 (i) el mencionado detergente no iónico se selecciona de un grupo que se compone de Tween 20, Tween 40, Tween 80, Triton X 100 y Triton X 102;
 (ii) el mencionado detergente no iónico está presente en la mencionada mezcla de reacción en unos niveles de entre alrededor de un 0,05% y alrededor de un 3% (p/v);
 (iii) el mencionado detergente no iónico es Tween 40; y/o
 (iv) la mencionada mezcla de reacción tiene un ratio de 4:1 de polidimetilsiloxano y solución acuosa.

60 **8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:**

65 (i) la mencionada mezcla de reacción comprende, adicionalmente, dimetilsulfóxido, y en el que, opcionalmente, el mencionado dimetilsulfóxido está presente en la mencionada mezcla de reacción en una concentración de entre alrededor de un 1% y alrededor de un 5%;
 (ii) la mencionada mezcla de reacción comprende, adicionalmente, albúmina de suero bovino, y en el que,

opcionalmente, la mencionada albúmina de suero bovino se trata para eliminar los ácidos nucleicos antes de añadirla a la mencionada mezcla de reacción;

(iii) la mencionada mezcla de reacción comprende, adicionalmente, iones de magnesio en una concentración de entre alrededor de 2 mM y alrededor de 20 mM;

(iv) la mencionada mezcla de reacción comprende, adicionalmente, sulfato de amonio en una concentración de entre alrededor de 2 mM y alrededor de 15 mM;

(v) la mencionada mezcla de reacción comprende, adicionalmente, ditiotreitol en una concentración de entre alrededor de 1 mM y alrededor de 8 mM;

(vi) la mencionada mezcla de reacción comprende, adicionalmente, entre alrededor de 3×10^{-5} unidades/ μL y alrededor de 1×10^{-4} unidades/ μL de pirofosfatasa; y/o

(vii) la mencionada mezcla de reacción se amortigua o tampona a un pH de entre alrededor de 7,1 y alrededor de 7,8.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el mencionado compuesto que rompe emulsiones es cloroformo o etanol.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende amplificar un segmento escogido del mencionado producto amplificado para obtener un producto de una segunda amplificación.

11. El método de la reivindicación 10, que además comprende:

(i) determinar la composición de las bases del mencionado producto de la segunda amplificación, con la condición de que la secuenciación del mencionado producto de la segunda amplificación no se realice para determinar la mencionada composición de las bases, y de manera que, opcionalmente, la mencionada composición de las bases del mencionado producto de la segunda amplificación se determina mediante espectrometría de masas; o

(ii) determinar la secuencia del mencionado producto de la segunda amplificación, de manera que, opcionalmente, el mencionado paso de determinar la secuencia del mencionado producto de la segunda amplificación se realiza utilizando un método que se selecciona de un grupo que comprende la secuenciación de Sanger, la pirosecuenciación, la secuenciación con SOLiD™, la secuenciación de una sola molécula en tiempo real, la nanosecuenciación, la secuenciación con el método tSMS™, la secuenciación de una sola molécula mediante síntesis y la secuenciación con nanoporos.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:

(i) la muestra de ácido nucleico comprende ADN humano;

(ii) la muestra de ácido nucleico comprende ADN bacteriano y, opcionalmente, ADN de una bacteria no cultivable; o

(iii) la muestra de ácido nucleico comprende ADN viral.

13. Un kit para realizar una amplificación por desplazamiento múltiple de un ácido nucleico de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, de manera que el mencionado kit comprende:

una o más enzimas polimerasas;

una serie de cebadores de oligonucleótidos;

uno o más componentes que forman emulsiones;

un compuesto que rompe emulsiones, el cual se usa para convertir la mencionada emulsión, separándola en fases acuosas e hidrofóbicas, tras completar la mencionada reacción de amplificación por desplazamiento múltiple;

betaína; y

trehalosa.

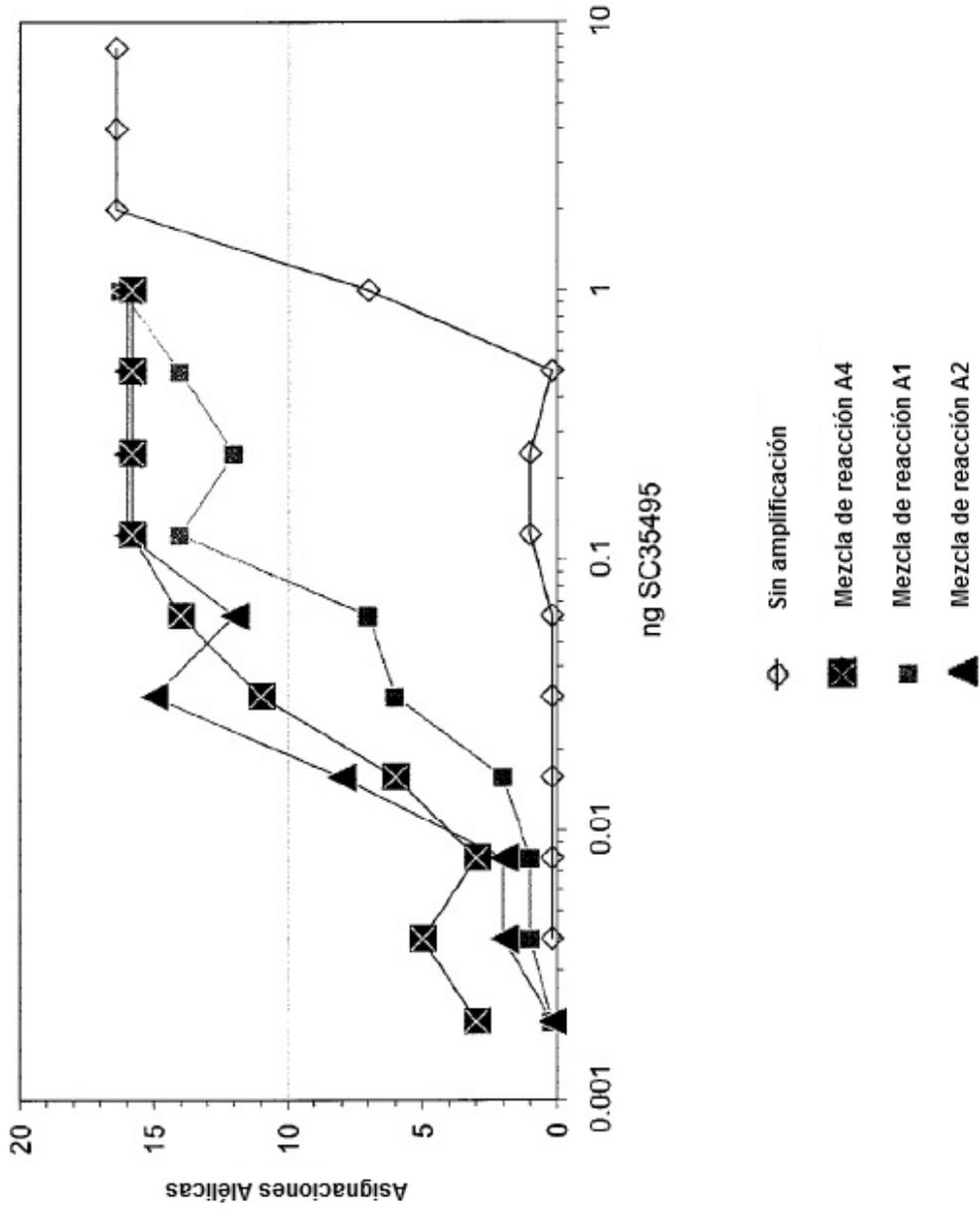


Fig. 1

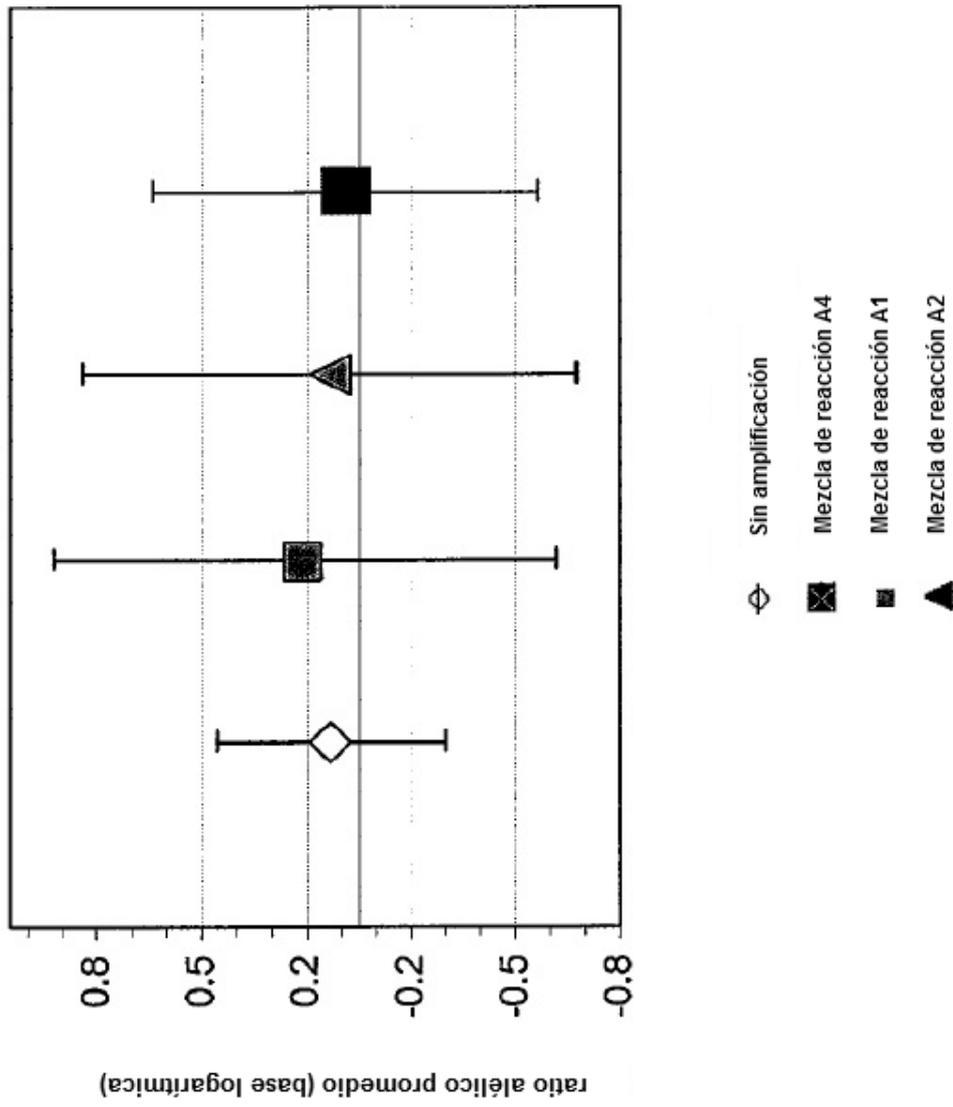


Fig. 2

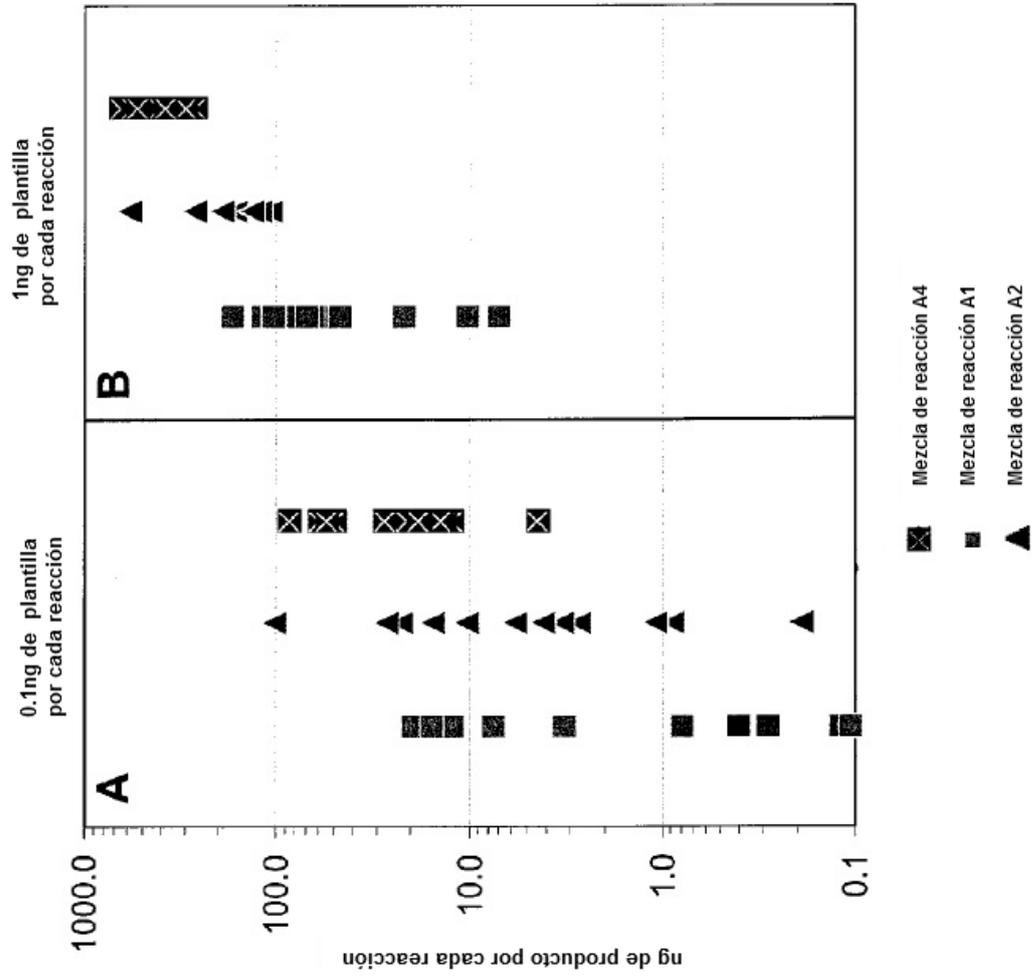


Fig. 3

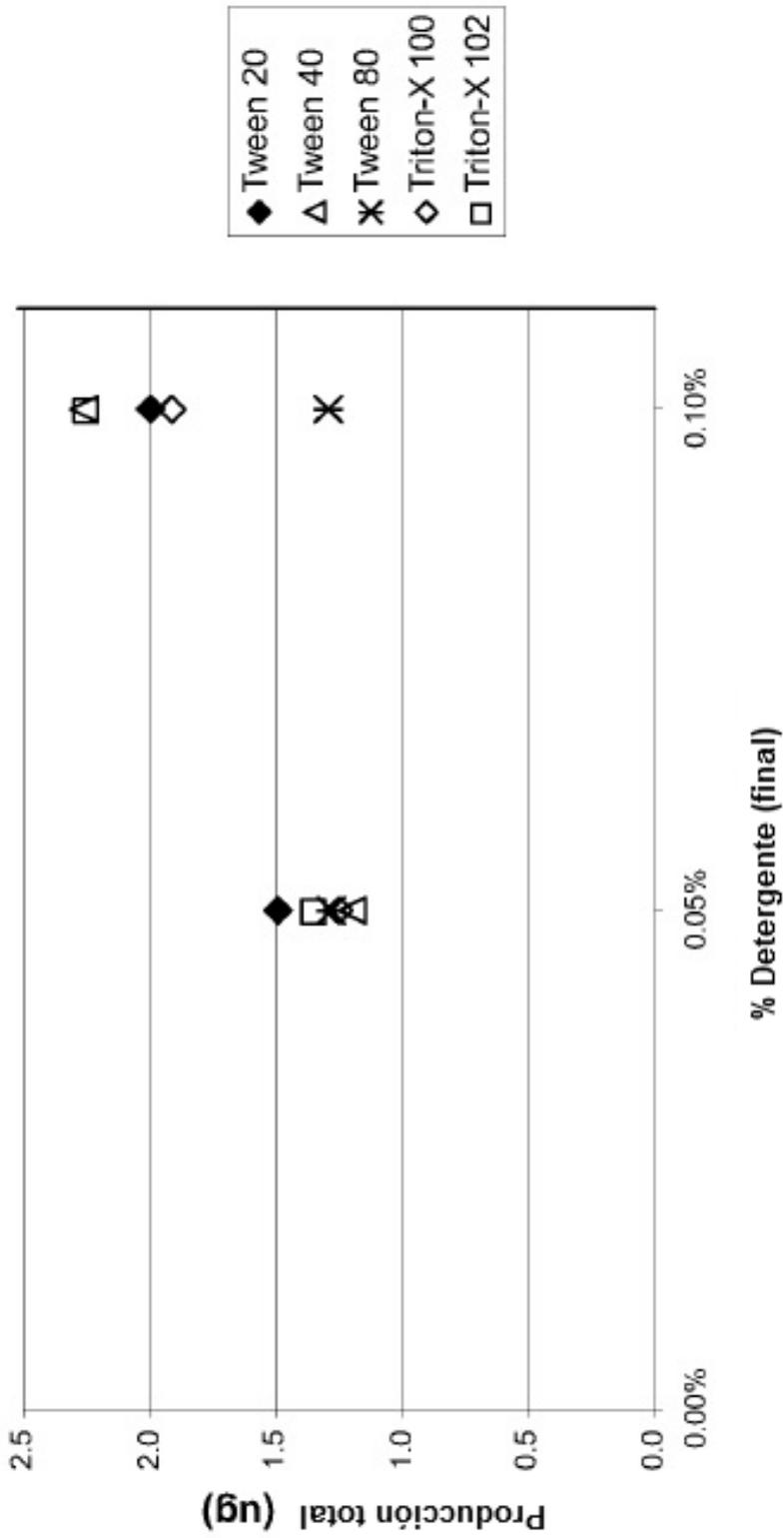


Fig. 4

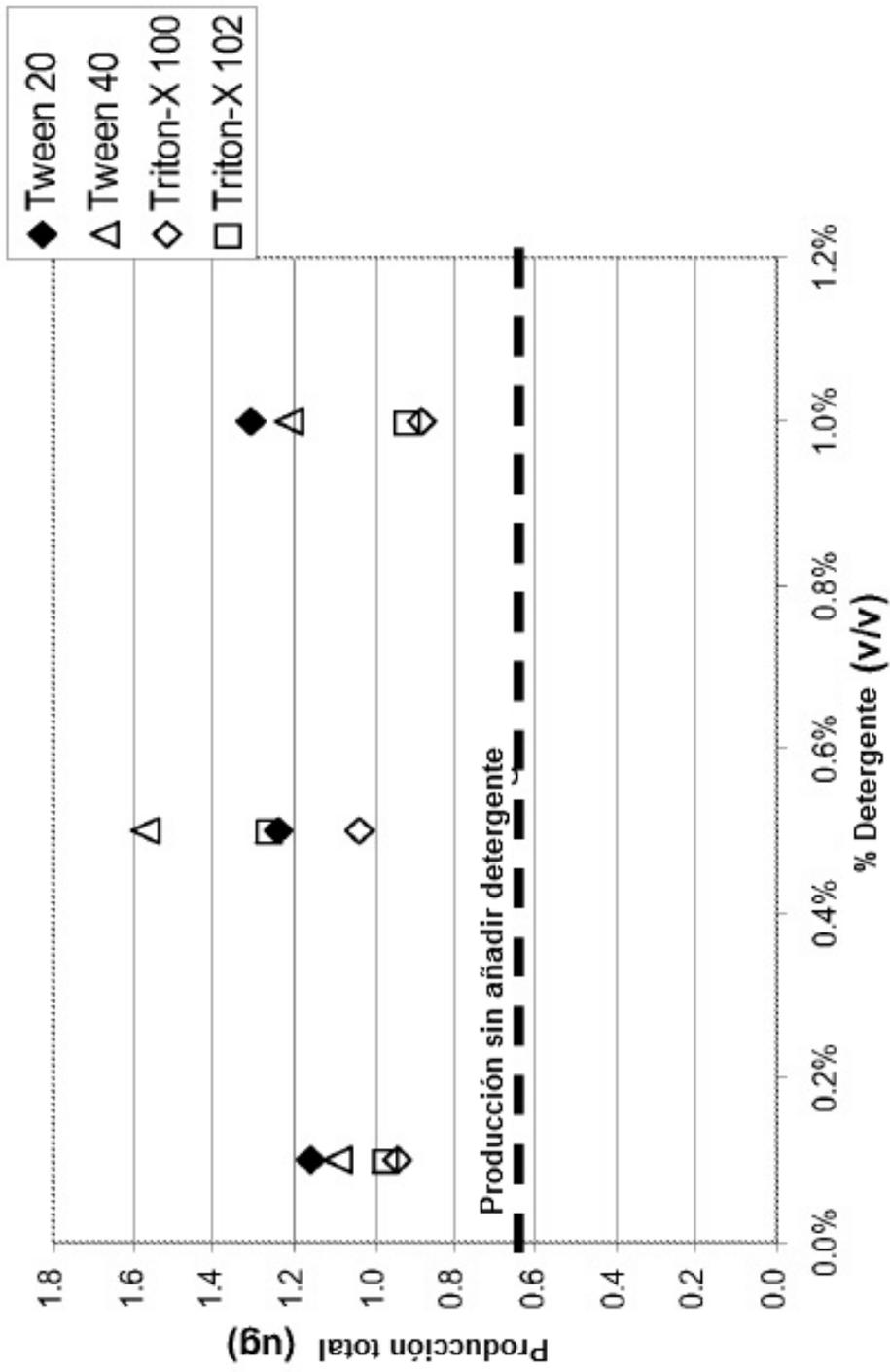


Fig. 5

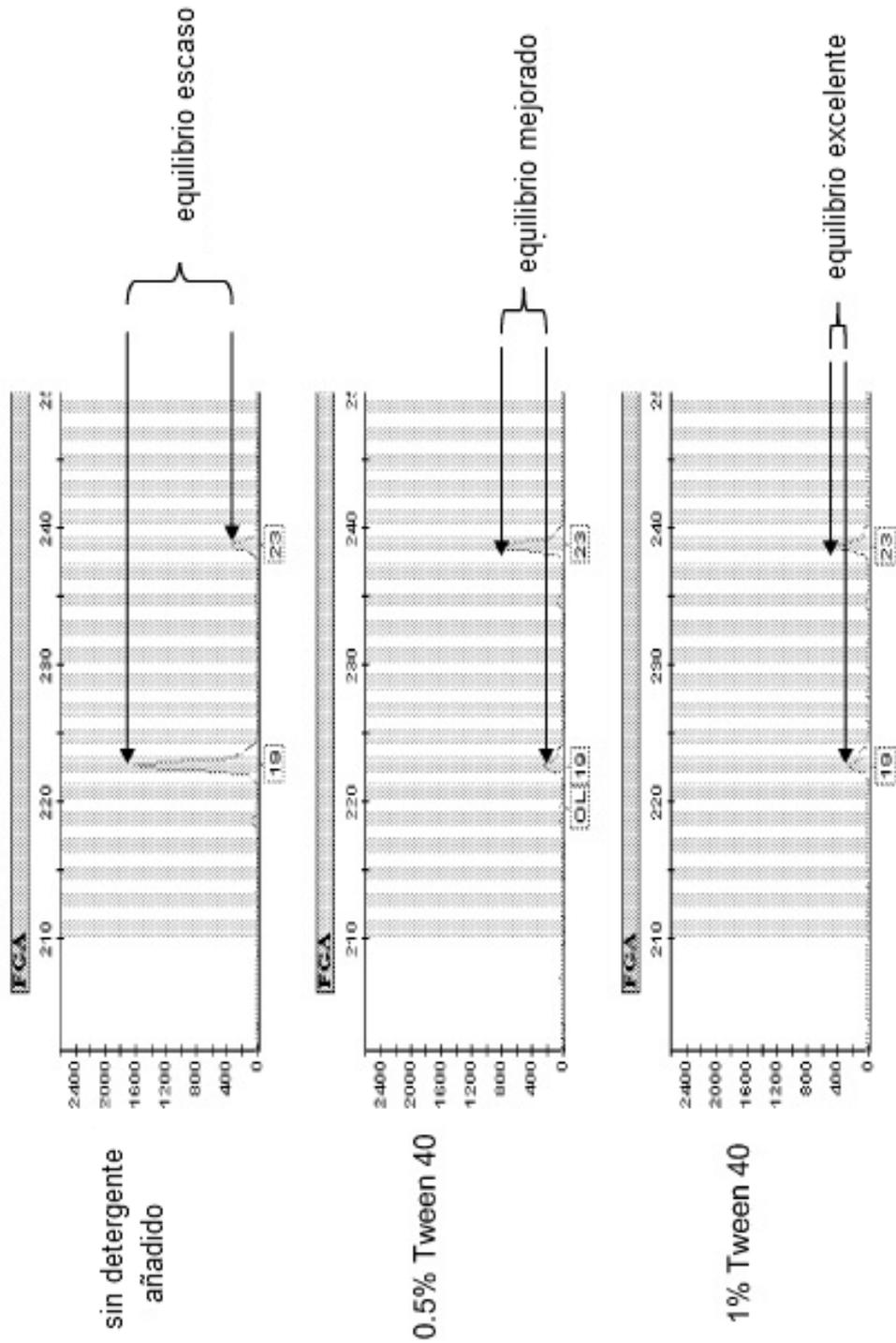


Fig. 6

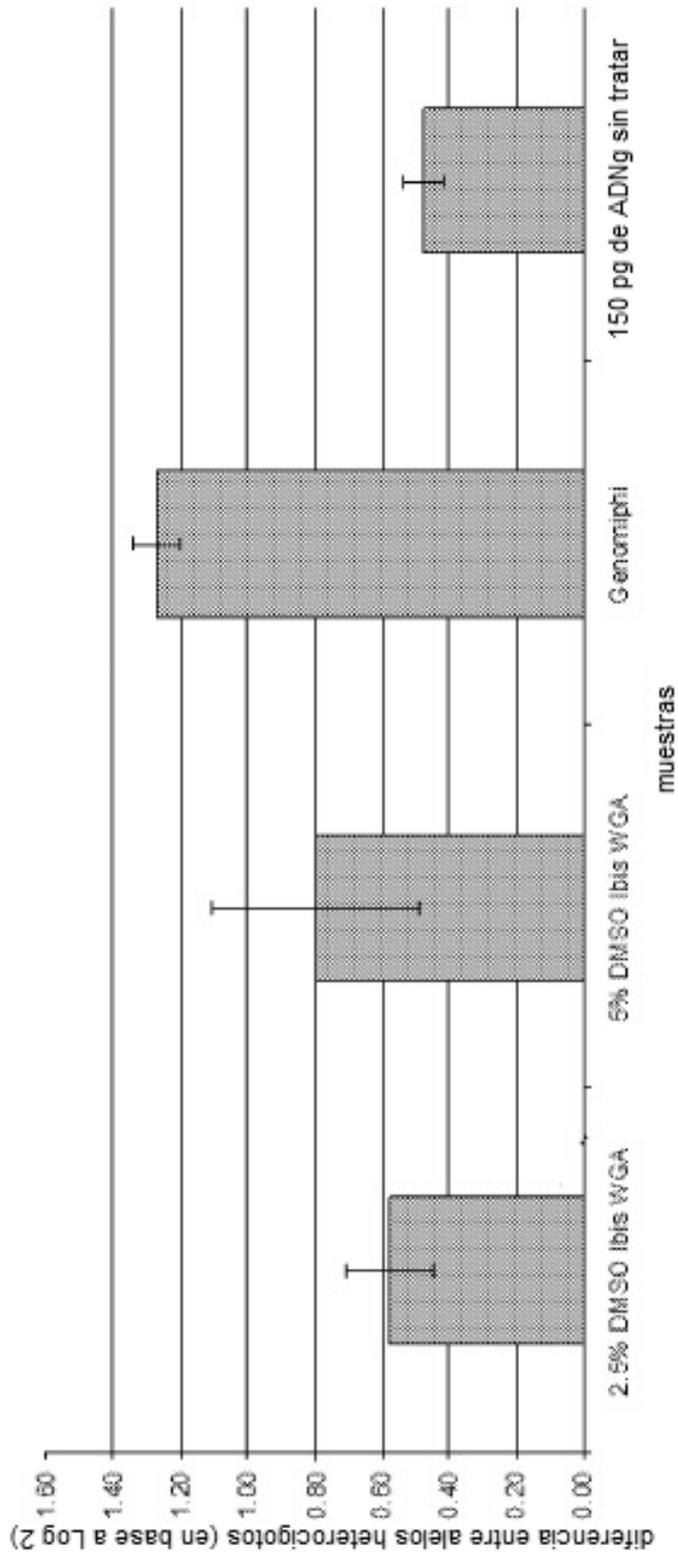


Fig. 7

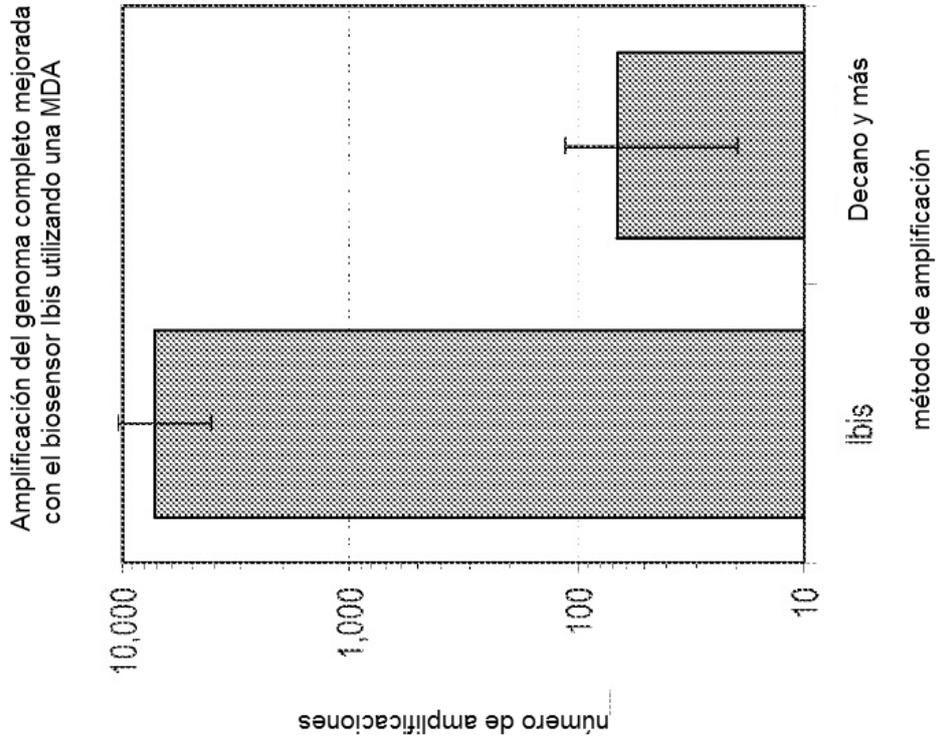


Fig. 8

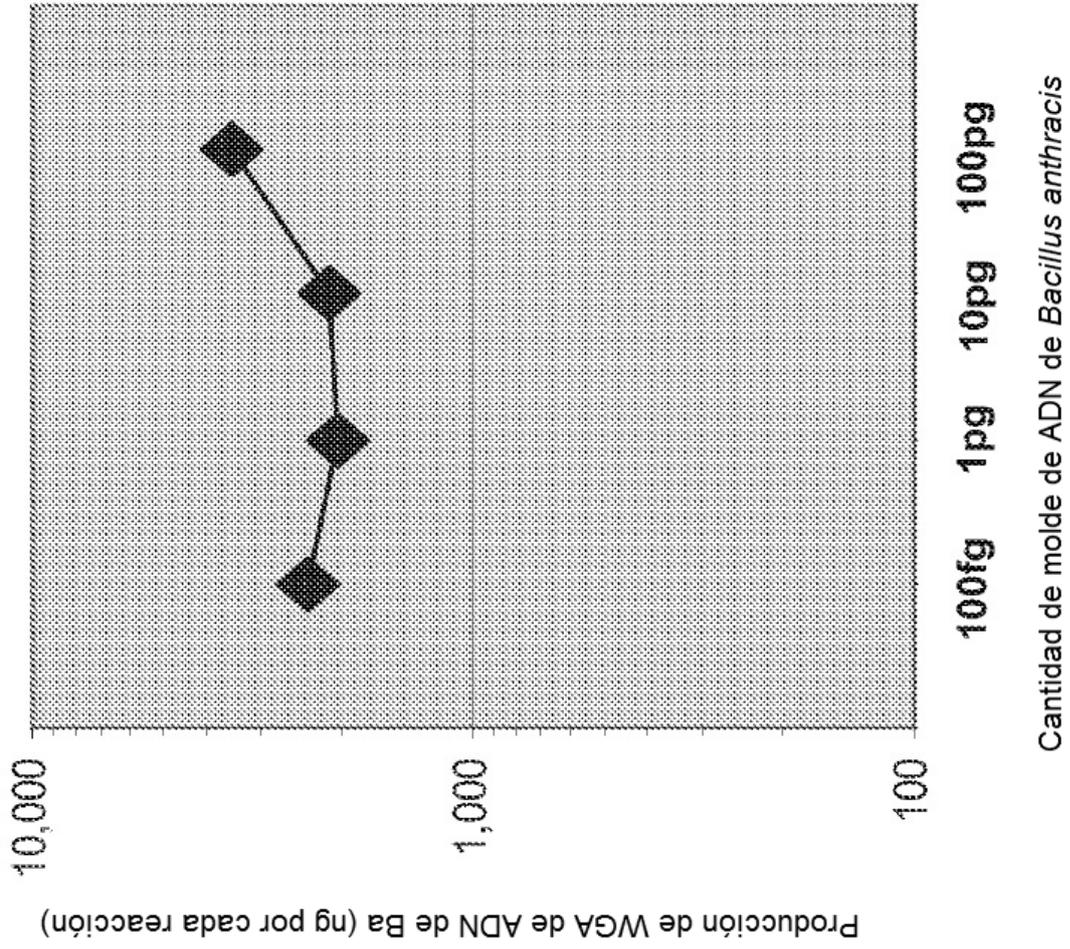


Fig. 9

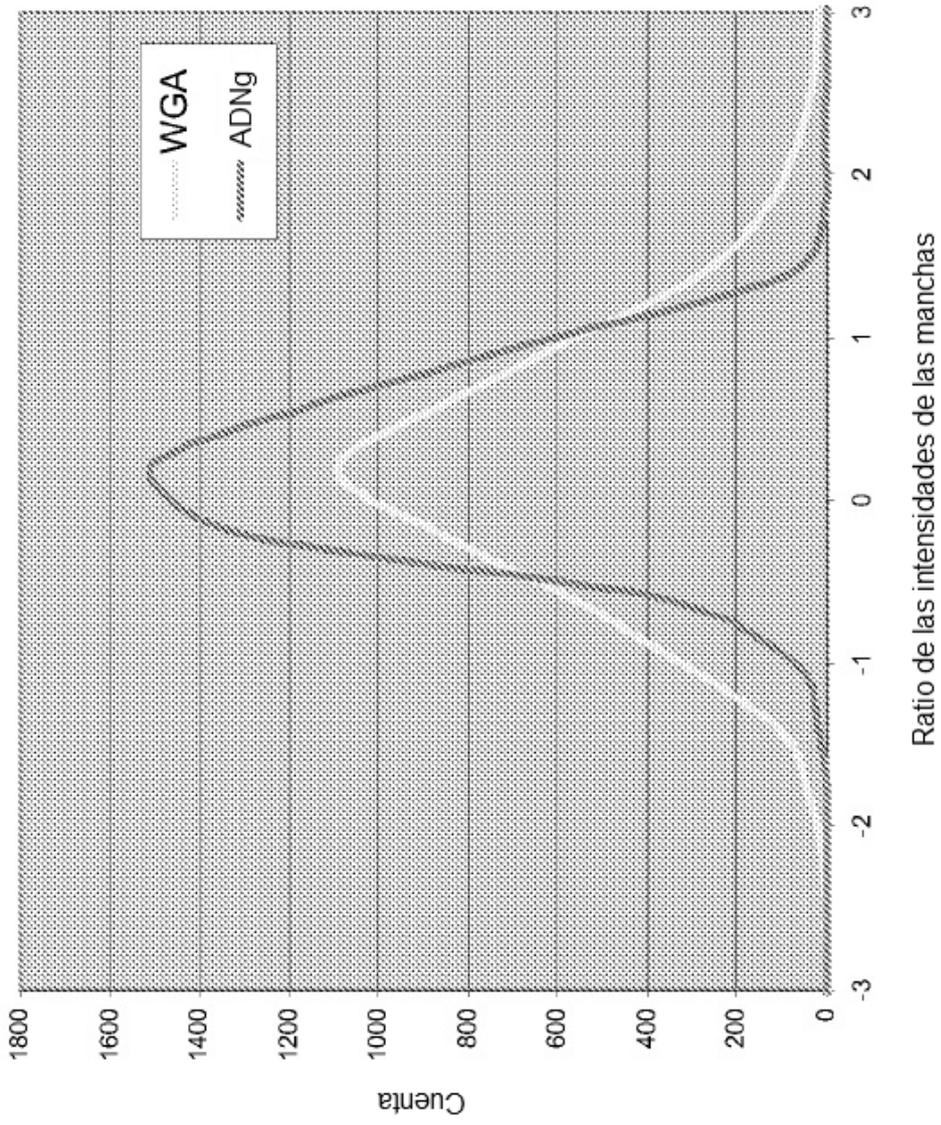


Fig. 10

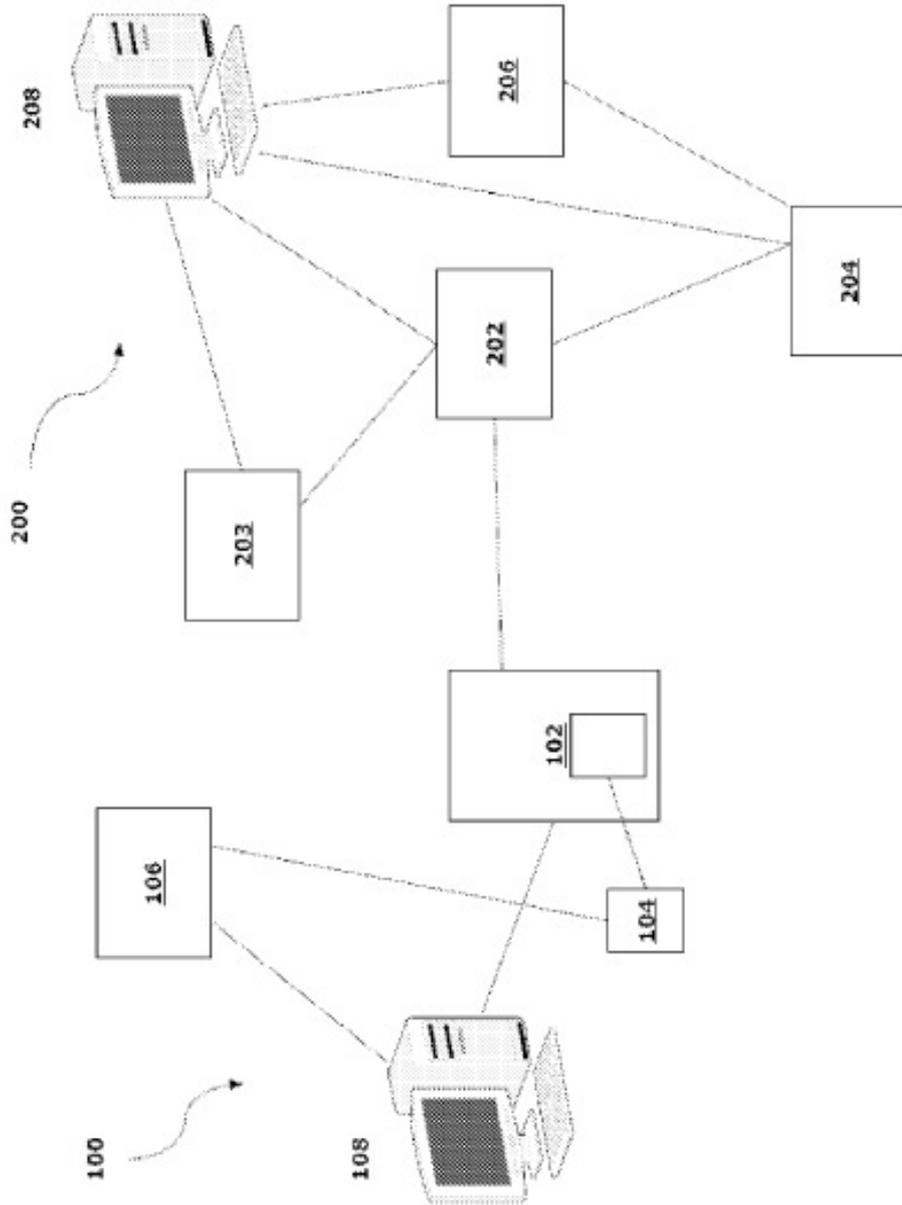


Fig. 11