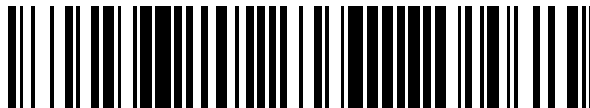


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 377**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/EP2013/077844**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.06.2014 WO14096421**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13811247 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2935617**

54 Título: **Aislamiento de secuencias nucleotídicas dirigido por probabilidad (PINS)**

30 Prioridad:

**21.12.2012 DK 201270822**

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

**21.08.2017**

73 Titular/es:

**SAMPLIX S.A.R.L. (100.0%)  
58 Rue Charles Martel  
2134 Luxembourg, LU**

72 Inventor/es:

**KVIST, THOMAS y  
MIKKELSEN, MARIE JUST**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 630 377 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

Aislamiento de secuencias nucleotídicas dirigido por probabilidad (PINS)

### Campo técnico

5 La invención se refiere a un método para aislar un fragmento nucleotídico complejo que comprende un elemento de secuencia nucleotídica conocida, concretamente una secuencia codificante de un sitio o dominio activo conservado, siendo aplicable el método, concretamente, al cribado de alta productividad de fragmentos de ADN que contienen un elemento de secuencia conocida.

### Antecedentes de la invención

#### *Introducción general*

10 Los diagnósticos moleculares y otros enfoques basados en ADN han ganado una atención creciente en sectores tales como el descubrimiento, I+D y en diversas ramas de diagnóstico. Sin embargo, se esté analizando una diana por ensayos o por cribado, todos los enfoques basados en ADN se enfrentan al mismo reto, a saber, generar suficientes cantidades de diana disponibles respecto al ADN de fondo.

15 Al aumentar la presencia de ADN diana de baja abundancia, a costa del ADN de fondo indeseable en una muestra compleja de ADN mixto, se posibilitan los métodos moleculares tradicionales, tales como construcciones de colecciones de clones, descubrimiento de productos naturales, diagnóstico por PCR, hibridaciones, secuenciaciones, metagenómica y una variedad de otros enfoques moleculares.

A continuación se describen métodos usados actualmente y los retos de las muestras de ADN mixto de baja abundancia.

#### 20 *Diagnóstico por PCR*

En los últimos años, se han desarrollado extensamente pruebas de PCR para el diagnóstico rutinario de enfermedades infecciosas en microbiología clínica. La PCR es adecuada para una detección rápida de bacterias directamente en especímenes clínicos, permitiendo una confirmación de laboratorio temprana, sensible y específica de enfermedades relacionadas [1]. Además, permite una valoración rápida de la presencia de genes de resistencia a antibióticos o mutaciones génicas. Un enfoque que combine la detección de patógenos, sus mecanismos de resistencia a antibióticos, sus factores de virulencia y la carga bacteriana en muestras clínicas podría conducir a cambios profundos en el cuidado de estos pacientes infectados. Por lo tanto, se están actualmente desarrollando ensayos de PCR complejos y múltiples para potenciar el campo del diagnóstico molecular.

30 Sin embargo, los diagnósticos por PCR a partir de mezclas mixtas están a menudo asociados a retos, ya que puede surgir la presencia de productos de PCR de más de una fuente de ADN en muestras complejas mixtas. La presencia de un gen de antibiótico específico combinada con la presencia de una cepa bacteriana específica no significa necesariamente que estuviera presente una cepa bacteriana resistente en la muestra original. Solo indica que estaban presentes tanto un gen de resistencia como la cepa bacteriana en la muestra, no necesariamente que surjan de la misma célula. Se han sugerido enfoques para eludir este problema en que el sitio de integración del gen de resistencia a antibiótico era diana de cebadores específicos también conocidos por orientarse a una cepa bacteriana específica. Sin embargo, el sitio de integración exacto tendrá que ser conocido entonces y esto limita el uso del método.

#### *Secuenciación de ADN*

40 El conocimiento de las secuencias de ADN se ha vuelto indispensable para la investigación biológica básica, y en numerosos campos aplicados tales como diagnóstico, biotecnología, biología forense y sistemática biológica. La rápida velocidad de secuenciación y la reducción de costes alcanzada con la tecnología de secuenciación de ADN moderna han sido fundamentales en la secuenciación de secuencias de ADN y la cantidad total de ADN secuenciado en el mundo aumenta rápidamente.

45 Aunque la secuenciación de muestras puras es ahora un procedimiento estándar, la secuenciación de muestras mixtas de ADN sigue siendo un reto costoso y que lleva tiempo. Cuando el fragmento diana está presente a baja frecuencia en una muestra nucleotídica mixta, por ejemplo en una muestra de torunda, heces o sangre, primero se debe elaborar una colección de clones o fragmentos y entonces o bien secuenciar la colección completa o bien elaborar fragmentos de PCR menores y secuenciar estos. La secuenciación de la colección completa es cara y lleva tiempo y la secuenciación de fragmentos de PCR es solo posible si la secuencia es ya conocida en gran medida y devolverá fragmentos relativamente cortos que no pueden asignarse a la misma molécula u organismo. Si solo es conocida parte de la secuencia diana, la PCR no será posible y se necesita secuenciación metagenómica.

50 Existe por lo tanto la necesidad de un método para aumentar la frecuencia de moléculas nucleotídicas raras en una muestra mixta de moléculas nucleotídicas para disminuir el coste y el tiempo de secuenciar muestras mixtas.

*Metagenómica*

La metagenómica hace referencia a un enfoque de secuenciación general, donde se diferencia una mezcla compleja de ADN en fracciones pequeñas y se secuencian individualmente. El sistema no se basa en la cultivabilidad y, por tanto, es aplicable tanto para muestras que pueden como que no pueden cultivarse en un laboratorio.

- 5 Aunque la metagenómica puede aplicarse en algunos casos para describir muestras complejas, se da frecuentemente el caso de que los investigadores prefieran un subconjunto específico del genoma o mezcla de genomas, en lugar de la secuencia entera de una muestra o muestra mixta de genomas [2]. Por tanto, existe una fuerte necesidad de métodos de orientación flexibles que coincidan con los requisitos individuales de las diversas técnicas y estudios. Aunque existen tales técnicas, a menudo están basadas en ensayos de hibridación y tienen el
- 10 prerequisite de un conocimiento extenso de la secuencia o tienen baja sensibilidad.

Por lo tanto, está presente una fuerte demanda de un enriquecimiento específico de una subfracción predefinida de una mezcla compleja si se va a aplicar la metagenómica para analizar fragmentos o dianas de ADN de abundancia rara/baja.

*Descubrimiento*

- 15 Diferentes industrias tienen diferentes motivaciones para explorar los vastos recursos que yacen dentro de la diversidad microbiana no cultivada. Actualmente la biotecnología blanca (industrial) parece desempeñar un papel clave en el establecimiento de una sociedad moderna sostenible. Es una suposición comúnmente aceptada que solo está disponible para cribado una pequeña subfracción de la biodiversidad microbiana natural. En 1990, Torsvijk *et al.* [3] estimaron que como máximo podría cultivarse solo un 1 % de la diversidad microbiana de origen natural de una
- 20 muestra de suelo en condiciones de laboratorio. Por ello, yace un enorme potencial dentro del descubrimiento de productos naturales aún desconocidos, y también en técnicas biotecnológicas que posibiliten el acceso a la mayoría desconocida del ADN presente en muestras naturales y ambientales.

Desgraciadamente, se requieren inmensas cantidades de secuenciación si se va a recuperar la información de otro modo no disponible.

- 25 El enriquecimiento diana de fragmentos de ADN que codifican proteínas o enzimas industrialmente relevantes disminuiría sustancialmente la cantidad requerida de secuenciación.

- Lukyanov *et al.* [13] describe un método para enriquecer un ácido nucleico diana en una mezcla de ADN compleja para posibilitar una etapa de secuenciación posterior. El documento WO 2004058987 [14] describe el uso secuencial de etapas de amplificación del genoma completo para enriquecer ácidos nucleicos diana. Erlandsson *et al.* [15]
- 30 describe el uso de etapas de amplificación del genoma completo seguidas de PCR.

**Compendio de la invención**

La presente invención proporciona un método *in vitro* para enriquecer y/o aislar una molécula de ADN diana de una muestra polinucleotídica mixta que comprende las etapas de:

- 35 a) proporcionar una muestra polinucleotídica mixta que contiene dicha molécula de ADN diana, en la que dicha molécula de ADN diana comprende una o más secuencias consecutivas únicas de al menos 10 nucleótidos,
- b) diluir en serie dicha muestra polinucleotídica mixta hasta que la probabilidad de detectar dicha molécula de ADN diana en una muestra diluida sea menor de 0,75, preferiblemente menor de 0,50 o incluso más preferiblemente menor de 0,25, y
- 40 c) duplicar en un número suficiente la muestra diluida hasta que la probabilidad de detectar dicha molécula de ADN diana en al menos una de las muestras de dilución duplicadas sea de al menos 0,75, preferiblemente de 0,80 a 0,95;
- d) amplificar el ADN en dichas muestras diluidas duplicadas para aumentar la abundancia de ADN en cada muestra;
- 45 e) detectar la presencia o ausencia de dicha molécula de ADN en dichas muestras de dilución duplicadas amplificadas en la etapa (d), en la que la frecuencia de dicha molécula de ADN diana en dicha muestra de dilución duplicada aumenta en comparación con la muestra polinucleotídica mixta en la etapa (a);
- f) diluir en serie al menos una muestra de dilución duplicada que contiene dicha molécula de ADN hasta que la probabilidad de detectar dicha molécula de ADN en una muestra diluida sea menor de 0,75, y repetir las
- 50 etapas (c) a (e) o (f) al menos una vez.

**Leyendas de las figuras**

**Figura 1:**

La figura muestra un gel de agarosa al 2 % de nueve reacciones de PCR negativas de la mezcla inicial. El área recuadrada indica donde estaría presente un producto de PCR positivo en el gel. Los productos de PCR fuera del recuadro son productos no específicos y se desestiman en este contexto.

**Figura 2:**

La figura muestra un gel de agarosa al 2 % de diez muestras de PCR después de la primera ronda de PINS. Cinco muestras (A, B, C, D e I) contienen productos de PCR del tamaño esperado, mientras que las cinco muestras restantes no. El tamaño de producto correcto se señala en el gel (izquierda). Los productos de PCR en otras localizaciones (no señaladas) son productos inespecíficos y se desestiman en este contexto.

**Figura 3:**

La figura muestra un gel de agarosa al 2 % de diez muestras de PCR después de la reamplificación de la muestra nº 10. Seis muestras (A, C, E, F, I y J) contienen productos de PCR del tamaño esperado, mientras que las cuatro muestras restantes no. El tamaño de producto correcto se señala en el gel (izquierda). Los productos de PCR en otras localizaciones (no señaladas) son productos inespecíficos y se desestiman en este contexto.

**Figura 4:**

La figura muestra un gel de agarosa al 2 % de diez muestras de PCR después de la segunda ronda de PINS usando una dilución de 2E-1 antes de la PCR. Cinco muestras (C, D, E, G e I) contienen productos de PCR del tamaño esperado, mientras que las cuatro muestras restantes no. El tamaño de producto correcto se señala en el gel (izquierda). Los productos de PCR en otras localizaciones (no señaladas) son productos inespecíficos y se desestiman en este contexto.

**Figura 5:**

La figura muestra una ilustración esquemática de dos rondas de PINS con los siguientes parámetros:

- A: La muestra inicial- con 0,028 ng/µl.
- 25 B: 10 muestras de Phi, creadas a partir de A usando 3,5 µl de "A" como molde.
- C: Una muestra en que todos los 3 (de tres) productos de PCR eran positivos.
- D: Muestra "C" reamplificada usando 3,5 µl de muestra nº 10 en un volumen de reacción total de 50.
- E: 10 muestras de Phi, creadas a partir de "D" usando 1,0 µl como molde en cada reacción.
- F y G: Dos muestras en que todos los 3 (de tres) productos de PCR eran positivos.
- 30 H: Conjunto de muestras "F" y "G"
- I: Ganancia calculada desde la concentración inicial hasta el resultado después de la primera ronda de PINS.
- J: Ganancia calculada desde la primera ronda de PINS a la segunda ronda de PINS, usando comparación directa a diluciones idénticas.
- 35 K: Ganancia calculada desde la primera ronda de PINS a la segunda ronda de PINS, usando comparación a diferentes diluciones.
- L: Ganancia calculada desde la muestra inicial al término (dianas/ng).

**Figura 6:**

La figura muestra un gel de agarosa al 2 % de diez reacciones de PCR negativas generadas a partir de una muestra polinucleotídica mixta inicial que comprende la molécula de ADN de HPV18 diana. El área recuadrada indica donde estaría presente un producto de PCR positivo en el gel. Los productos de PCR fuera del recuadro son producto inespecíficos y se desestiman en este contexto.

**Figura 7:**

La figura muestra un gel de agarosa al 2 % de los productos de tres PCR diseñadas para detectar la presencia de la molécula de ADN de HPV18 diana. El carril nº 1 es una reacción de PCR de control positivo; el carril nº 2 es el producto de PCR de una muestra polinucleotídica mixta enriquecida por PINS (mediado por MDA) que contiene 2,5

copias diana/ $\mu$ l y el carril nº 3 es un control de PCR negativo. La flecha indica la movilidad relativa de una molécula de ADN de ~667 pb en el gel de agarosa.

**Figura 8:**

5 La figura muestra un gel de agarosa al 2 % del producto de PCR obtenido mediante reamplificación de la molécula de ADN de HPV18 diana mostrada en la Figura 7. La flecha indica la movilidad relativa de una molécula de ADN de ~667 pb en el gel de agarosa.

**Figura 9:**

10 Alineamiento de las secuencias recuperadas de la molécula de ADN de HPV18 diana enriquecida por PINS con secuencia de HPV18 (HPU89349), mostrando que la secuencia está perfectamente alineada con cero desapareamientos.

**Figura 10:**

Cebadores y alineamientos parciales de las secuencias de genes microbianos recuperados que codifican endoglucanasa.

**Figura 11:**

15 La figura ilustra la secuencia nucleotídica de un gen que codifica endoglucanasa enriquecida por PINS. Los sitios de restricción (*Mbol*, *EcoRI* y *HindIII*) usados para RGW se insertan en recuadros. -35 y -10 ilustran la posición de la localización del presunto promotor y SD es la posición de ShineDalgarno.

EndoGlu-dir y EndoGlu-inv son los cebadores usados durante el PINS. ORF indica la posición del marco abierto de lectura.

20 **Descripción detallada de la invención**

25 La presente invención atañe a un método *in vitro* en que se aumenta por etapas la frecuencia de la secuencia nucleotídica diana que contiene el fragmento de ADN de interés mediante varias rondas de 1) dilución de una muestra que contiene el fragmento de ADN de interés en varias duplicaciones (separación), 2) amplificación aleatoria de ADN en las duplicaciones (concentración), 3) detección del fragmento de ADN de interés en al menos una de las duplicaciones diluidas y amplificadas (selección) y repetición de las etapas 1) a 3) hasta que el fragmento de interés de ADN pueda secuenciarse mediante técnicas de secuenciación estándares.

30 La invención está basada en el principio de que si un fragmento de ADN de interés seleccionado, presente en una muestra mixta, está localizado a una dilución en que la probabilidad de encontrarlo es pequeña, la frecuencia del fragmento de ADN será mayor a esa dilución que en la muestra mixta, y su frecuencia puede aumentarse adicionalmente por rondas de selección (como anteriormente) hasta que pueda secuenciarse por procedimientos estándares tales como secuenciación de Sanger o pirosecuenciación o detección similar de la secuencia de ADN o por PCR, hibridación u otros ensayos de detección.

35 El método de la invención es sorprendentemente eficaz, con lo que la extensión del cribado puede reducirse desde el cribado de cientos de miles de clones en una colección de clones según los métodos de cribado tradicionales [17], a cribar menos de unos pocos cientos de muestras de ADN (Tabla 1).

**Tabla 1. Eficacia del PINS**

Prevalencia	PINS (nº de pruebas)	Tradicional (nº de pruebas)	Mejora de cribado
1/10 <sup>4</sup>	88	10.000	114x
1/10 <sup>5</sup>	108	100.000	909x
1/10 <sup>6</sup>	128	1.000.000	7.692x
1/10 <sup>7</sup>	148	10.000.000	66.667x
1/10 <sup>8</sup>	168	100.000.000	588.235x
1/10 <sup>9</sup>	188	1.000.000.000	5.263.158x

40 Cada ciclo de PINS proporciona un aumento estimado de 10x de la prevalencia del elemento genético de interés. El número de pruebas requerido para aumentar la prevalencia desde el nivel de partida al nivel de terminación deseado puede calcularse, concretamente se requieren 78 pruebas para aumentar la prevalencia de 1/10<sup>6</sup> a 1/10<sup>2</sup> (basado en

la estimación de 10x/ciclo)

## I: PINS

Las etapas esenciales del método de PINS *in vitro* se describen adicionalmente a continuación:

### a) Muestra de polinucleótidos mixtos que comprende una molécula de ADN diana

5 Se selecciona una muestra de polinucleótidos mixtos conocida por comprender una molécula de ADN diana para efectuar el PINS. Se seleccionan una o más secuencias nucleotídicas de al menos 10 (o 15) nucleótidos únicos localizada en la molécula de ADN diana para cribado y detección de la molécula de ADN diana mediante un método deseado, tal como detección por PCR, detección de ADN con sondas de hibridación o similar. Típicamente, la frecuencia de la muestra de molécula de ADN diana de los polinucleótidos mixtos es menor de  $10^{-2}$ , puede encontrarse por ejemplo entre  $10^{-3}$  y  $10^{-7}$ .

### b) Dilución primaria de la muestra polinucleotídica mixta

15 Se diluye en serie la muestra polinucleotídica mixta el número deseado de diluciones hasta que la probabilidad de detectar la molécula de ADN diana en una muestra diluida sea menor de 0,75 (esta muestra se designa dilución (N)). Las diluciones en serie tienen preferiblemente un factor de dilución de más de 1:1, preferiblemente entre 1:2 y 1:20, p.ej. 1:10. Cada muestra diluida se coloca en un envase separado, tal como en un pocillo de una placa de microvaloración, un tubo de plástico o similar.

20 Pueden usarse diversos métodos para identificar la muestra (N) en la serie de dilución en que la probabilidad de detectar la molécula de ADN diana sea menor de 0,75. Por ejemplo, pueden amplificarse las diluciones en serie de la muestra polinucleotídica mixta para aumentar la abundancia del ADN en cada muestra, seguido de la etapa de detectar la presencia o ausencia de dicha molécula de ADN diana en cada muestra amplificada. La muestra más diluida en la serie de dilución en que puede detectarse la molécula de ADN diana se designa "P". La siguiente dilución en la serie de dilución, designada "N", es la muestra menos diluida en la serie de dilución en que la molécula de ADN diana no puede detectarse. El factor de dilución de "N" respecto a la muestra de ADN en a) se designa  $D_t$ , y el factor de dilución entre P y N se designa D.

25 Como alternativa, puede determinarse la frecuencia y abundancia de la molécula de ADN diana en la muestra polinucleotídica mixta mediante PCR instantánea, a partir de la cual puede calcularse la dilución requerida para preparar la muestra (N) (véase el ejemplo 1).

Como alternativa, puede detectarse la molécula de ADN diana mediante ensayos basados en hibridación o ensayos que detectan un ARN o producto de proteína de la secuencia diana.

### 30 c) Creación de muestras de dilución duplicadas que tienen la dilución N

35 Se generan un número suficiente de duplicados de la muestra diluida (N) hasta que la probabilidad de detectar la molécula de ADN diana en al menos una de las muestras de dilución duplicadas es uno. El número adecuado de duplicados se encuentra entre 2 y 500, preferiblemente al menos 10-20 duplicados. Típicamente, el número adecuado de duplicados corresponderá al factor de dilución usado para crear la serie de dilución, concretamente, si el factor de dilución es 1:10, entonces deberían ser suficientes aproximadamente 10 duplicados. Cada muestra diluida se coloca en un envase separado, tal como un pocillo en una placa de microvaloración, un tubo de plástico o similar.

### d) Amplificación de ADN genómico

40 Se amplifica el ADN en cada muestra diluida duplicada usando cualquier método de amplificación de ADN total para aumentar la abundancia del ADN en cada muestra. Los métodos de amplificación adecuados incluyen PCR cebada por oligonucleótidos degenerados (DOP-PCR), amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) [4], PCR cebada aleatoriamente o similar.

### e) Cribado de la muestra de dilución duplicada (+/-) del ADN diana

45 Se criba en las muestras duplicadas (N) después de la amplificación genómica de la etapa d) la presencia de la molécula de ADN diana usando la técnica de detección deseada. En al menos una o más muestras cribadas que se muestra que contienen la molécula de ADN diana (muestra<sup>+</sup>), aumentará la frecuencia de la molécula de ADN diana en comparación con su frecuencia en la muestra polinucleotídica mixta en la etapa (a).

50 Una o más de estas muestras<sup>+</sup> se diluyen entonces en serie hasta que la probabilidad de detectar la molécula de ADN diana en una muestra diluida es menor de 0,75. Típicamente, la dilución total de esta muestra es  $D_t$  aumentado por un factor D. Usando esta muestra, se repiten las etapas (c) a (e) al menos una vez, preferiblemente hasta que la molécula de ADN diana se haya amplificado en una medida en que la secuencia nucleotídica de la molécula de ADN diana o partes de la misma pueda secuenciarse fácilmente, como se describe a continuación en f). El número de

repeticiones de las etapas (c) a (e) es generalmente de al menos 1, pero es más probable que requiera 2, 3, 4, 5 o 6 o más repeticiones, con lo que la frecuencia eventual alcanzada de la molécula de ADN diana es mayor de  $10^{-3}$ , preferiblemente mayor de  $10^{-1}$ .

f) Caracterización de la molécula de ADN diana enriquecida

5 Una vez se aumenta suficientemente la frecuencia de la molécula de ADN diana, el ADN puede someterse a secuenciación de ADN directa. La secuenciación de la molécula de ADN diana, tanto del fragmento de ADN diana amplificado por PCR usado para la detección como de las secuencias nucleotídicas flanqueantes en dirección 5' y 3' del fragmento de ADN diana, se ejecuta usando el método de secuenciación de ADN deseado, tal como secuenciación de Sanger, pirosecuenciación o métodos similares.

10 Se expone en la Tabla 2 un ejemplo de cómo puede ejecutarse el método de PINS.

**Esquema para efectuar el PINS**

La muestra de ADN original se designaba muestra N0

Se hacen diluciones de 10 veces de la muestra N0 en los pocillos A1-A8 de una placa de microvaloración.

15 Se efectúa la MDA (opcionalmente); N0 → N0<sup>MDA</sup>. Se transfieren alícuotas de N0 → N0<sup>MDA</sup> a una placa de PCR y se efectúa la PCR para detectar la molécula de ADN diana.

**Tabla 2**

Placa de dilución	PCR	Placa de PCR	Placa de dilución	PCR	Placa de PCR
N0 x 10-0 <sup>A1</sup>	→	P	N0 <sup>MDA</sup> x 10-0 <sup>A1</sup>	→	P
N0 x 10-1 <sup>A2</sup>		P	N0 <sup>MDA</sup> x 10-1 <sup>A2</sup>		P
N0 x 10-2 <sup>A3</sup>		P	N0 <sup>MDA</sup> x 10-2 <sup>A3</sup>		P
N0 x 10-3 <sup>A4</sup>		P	N0 <sup>MDA</sup> x 10-3 <sup>A4</sup>		P
N0 x 10-4 <sup>A5</sup>		N	N0 <sup>MDA</sup> x 10-4 <sup>A5</sup>		N
N0 x 10-5 <sup>A6</sup>		N	N0 <sup>MDA</sup> x 10-5 <sup>A6</sup>		N
N0 x 10-6 <sup>A7</sup>		N	N0 <sup>MDA</sup> x 10-6 <sup>A7</sup>		N
N0 x 10-7 <sup>A8</sup>		N	N0 <sup>MDA</sup> x 10-7 <sup>A8</sup>		N

Se selecciona N0 x 10-4<sup>A5</sup> o N0<sup>MDA</sup> x 10-4<sup>A5</sup> = Muestra N1

20 Se hacen 20 alícuotas duplicadas de la muestra N1 y se añaden a la placa de dilución A1-C4 (Tabla 3). Se efectúa la MDA en todas las duplicaciones para amplificar el ADN total en cada duplicación, seguido de PCR para detectar la molécula de ADN diana en el ADN amplificado.

**Tabla 3**

Ciclo 1

Placa de dilución			MDA	Placa de MDA			PCR	Placa de PCR		
N1 <sup>A1</sup>	N1 <sup>B1</sup>	N1 <sup>C1</sup>	→	N1 <sup>A1+MDA</sup>	N1 <sup>B1+MDA</sup>	N1 <sup>C1+MDA</sup>	→	N	N	N
N1 <sup>A2</sup>	N1 <sup>B2</sup>	N1 <sup>C2</sup>		N1 <sup>A2+MDA</sup>	N1 <sup>B2+MDA</sup>	N1 <sup>C2+MDA</sup>		N	N	P
N1 <sup>A3</sup>	N1 <sup>B3</sup>	N1 <sup>C3</sup>		N1 <sup>A3+MDA</sup>	N1 <sup>B3+MDA</sup>	N1 <sup>C3+MDA</sup>		P	N	N
N1 <sup>A4</sup>	N1 <sup>B4</sup>	N1 <sup>C4</sup>		N1 <sup>A4+MDA</sup>	N1 <sup>B4+MDA</sup>	N1 <sup>C4+MDA</sup>		N	N	N
N1 <sup>A5</sup>	N1 <sup>B5</sup>			N1 <sup>A5+MDA</sup>	N1 <sup>B5+MDA</sup>			N	N	
N1 <sup>A6</sup>	N1 <sup>B6</sup>			N1 <sup>A6+MDA</sup>	N1 <sup>B6+MDA</sup>			N	P	

ES 2 630 377 T3

N1 <sup>A7</sup>	N1 <sup>B7</sup>			N1 <sup>A7+MDA</sup>	N1 <sup>B7+MDA</sup>			N	N	
N1 <sup>A8</sup>	N1 <sup>B8</sup>			N1 <sup>A8+MDA</sup>	N1 <sup>B8+MDA</sup>			N	N	

Se seleccionan (N1<sup>A3+MDA</sup> + N1<sup>B6+MDA</sup> + N1<sup>C2+MDA</sup>) y se diluyen 10<sup>-5</sup> = Muestra N2

Se hacen 20 alícuotas de la muestra N2 y se añaden a la placa de dilución A1-C4 (Tabla 4).

- 5 Se efectúa la MDA en todas las duplicaciones para amplificar el ADN total en cada duplicación, seguido por PCR para detectar la molécula de ADN diana en la ADN amplificada.

**Tabla 4**

Ciclo 2

Placa de dilución			MDA	Placa de MDA			PCR	Placa de PCR		
N2 <sup>A1</sup>	N2 <sup>B1</sup>	N2 <sup>C1</sup>	→	N2 <sup>A1+MDA</sup>	N2 <sup>B1+MDA</sup>	N2 <sup>C1+MDA</sup>	→	N	N	N
N2 <sup>A2</sup>	N2 <sup>B2</sup>	N2 <sup>C2</sup>		N2 <sup>A2+MDA</sup>	N2 <sup>B2+MDA</sup>	N2 <sup>C2+MDA</sup>		N	P	N
N2 <sup>A3</sup>	N2 <sup>B3</sup>	N2 <sup>C3</sup>		N2 <sup>A3+MDA</sup>	N2 <sup>B3+MDA</sup>	N2 <sup>C3+MDA</sup>		N	N	N
N2 <sup>A4</sup>	N2 <sup>B4</sup>	N2 <sup>C4</sup>		N2 <sup>A4+MDA</sup>	N2 <sup>B4+MDA</sup>	N2 <sup>C4+MDA</sup>		N	N	N
N2 <sup>A5</sup>	N2 <sup>B5</sup>			N2 <sup>A5+MDA</sup>	N2 <sup>B5+MDA</sup>			P	N	
N2 <sup>A6</sup>	N2 <sup>B6</sup>			N2 <sup>A6+MDA</sup>	N2 <sup>B6+MDA</sup>			N	N	
N2 <sup>A7</sup>	N2 <sup>B7</sup>			N2 <sup>A7+MDA</sup>	N2 <sup>B7+MDA</sup>			N	N	
N2 <sup>A8</sup>	N2 <sup>B8</sup>			N2 <sup>A8+MDA</sup>	N2 <sup>B8+MDA</sup>			N	N	

Se selecciona (N2<sup>A5+MDA</sup> + N2<sup>B2+MDA</sup>) y se diluye 10<sup>-6</sup> = Muestra N3

- 10 Se hacen 20 alícuotas de la muestra N2 y se añaden a la placa de dilución A1-C4 (Tabla 5).

Se efectúa la MDA en todas las duplicaciones para amplificar el ADN total en cada duplicación, seguido de PCR para detectar la molécula de ADN diana en el ADN amplificado.

**Tabla 5**

Ciclo 3

Placa de dilución			MDA	Placa de MDA			PCR	Placa de PCR		
N3 <sup>A1</sup>	N3 <sup>B1</sup>	N3 <sup>C1</sup>	→	N3 <sup>A1+MDA</sup>	N3 <sup>B1+MDA</sup>	N3 <sup>C1+MDA</sup>	→	N	N	P
N3 <sup>A2</sup>	N3 <sup>B2</sup>	N3 <sup>C2</sup>		N3 <sup>A2+MDA</sup>	N3 <sup>B2+MDA</sup>	N3 <sup>C2+MDA</sup>		N	N	N
N3 <sup>A3</sup>	N3 <sup>B3</sup>	N3 <sup>C3</sup>		N3 <sup>A3+MDA</sup>	N3 <sup>B3+MDA</sup>	N3 <sup>C3+MDA</sup>		N	P	N
N3 <sup>A4</sup>	N3 <sup>B4</sup>	N3 <sup>C4</sup>		N3 <sup>A4+MDA</sup>	N3 <sup>B4+MDA</sup>	N3 <sup>C4+MDA</sup>		N	N	N
N3 <sup>A5</sup>	N3 <sup>B5</sup>			N3 <sup>A5+MDA</sup>	N3 <sup>B5+MDA</sup>			N	P	
N3 <sup>A6</sup>	N3 <sup>B6</sup>			N3 <sup>A6+MDA</sup>	N3 <sup>B6+MDA</sup>			N	N	
N3 <sup>A7</sup>	N3 <sup>B7</sup>			N3 <sup>A7+MDA</sup>	N3 <sup>B7+MDA</sup>			N	N	
N3 <sup>A8</sup>	N3 <sup>B8</sup>			N3 <sup>A8+MDA</sup>	N3 <sup>B8+MDA</sup>			N	N	

- 15 Se seleccionan (N3<sup>B3+MDA</sup> + N3<sup>B5+MDA</sup> + N3<sup>C1+MDA</sup>) y se determina la abundancia de la molécula de ADN diana. Si esta es suficiente para un análisis tal como secuenciación, la muestra seleccionada puede usarse directamente; de otro modo, pueden aplicarse ciclos adicionales de PINS.



**II: PINS múltiple**

El PINS puede adaptarse para efectuar PINS múltiple. El PINS múltiple emplea rasgos adicionales que se diseñan para detectar una 2ª secuencia consecutiva de al menos 10 (o 15) nucleótidos en la muestra de polinucleótidos mixtos analizada mediante la amplificación de esta 2ª secuencia consecutiva con cebadores específicos de secuencia para generar un 2ª fragmento de ADN diana. Si se copurifican la 1ª y 2ª secuencias consecutivas en cada ciclo de PINS, entonces deben localizarse en la misma molécula de ADN diana amplificada por MDA.

**III: Muestras analizadas por PINS y PINS múltiple**III.i Muestra de polinucleótidos mixtos

Puede aplicarse PINS a una muestra de polinucleótidos mixtos conocida por comprender una molécula de ADN diana. Una muestra de polinucleótidos mixtos comprende una población de moléculas de ADN (p.ej., moléculas de ADN cromosómico o moléculas de ADN de plásmido) donde las moléculas de ADN individuales en la población difieren con respecto a una secuencia consecutiva de al menos 10 (o 15) pares de bases de ácido nucleico en su ADN, de tal modo que la molécula diana que comprende la secuencia consecutiva conocida difiere y puede distinguirse de las moléculas no diana en la muestra. La mezcla de polinucleótidos mixtos puede comprender adicionalmente polinucleótidos de ARN o ADN monocatenarios. La población de moléculas de ADN en la muestra de polinucleótidos mixtos comprende la molécula de ADN diana.

Una molécula de ADN diana comprende una o más secuencias consecutivas de al menos 10 (o al menos 15) pares de bases de ácido nucleico únicas (o nucleótidos). Una molécula de ADN diana puede seleccionarse de una muestra de polinucleótidos mixtos seleccionando una molécula de ADN diana que comprenda esta secuencia consecutiva de al menos 10 pares de bases de ácido nucleico (o nucleótidos). La molécula de ADN diana puede seleccionarse también de la muestra de polinucleótidos mixtos seleccionando una molécula de ADN diana que comprenda al menos dos secuencias consecutivas de al menos 10 (o 15) pares de bases de ácido nucleico (o nucleótidos), en la que las dos secuencias consecutivas están comprendidas en una molécula de ADN de 50 a 100.000 pares de bases de ácido nucleico, preferiblemente de 150 a 3.000 pares de bases de ácido nucleico, más preferiblemente de 150 a 1.500 pares de bases de ácido nucleico.

El método de la invención es particularmente adecuado cuando la frecuencia de la molécula de ADN diana en la muestra de polinucleótidos mixtos es menor de  $10^{-3}$ . El método de la invención es también adecuado cuando la frecuencia de la molécula de ADN diana en la muestra de polinucleótidos mixtos es de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  o menor. En muchos casos, la muestra de polinucleótidos mixtos derivará de una población celular que comprende ADN genómico, mientras que en otros casos la muestra puede derivar de muestras donde los polinucleótidos son de origen diverso, tal como muestras recogidas de la naturaleza. Independientemente de su fuente, se define la frecuencia de la molécula de ADN diana como el número de genomas o equivalentes de genoma que contienen el ADN diana dividido entre el número de equivalentes de genoma totales. La frecuencia de la molécula de ADN diana en la muestra de polinucleótidos mixtos se determina haciendo una serie de dilución por triplicado, detectando la presencia o ausencia de diana y determinando el número de dianas usando, por ejemplo, los métodos numéricos más probables. Se mide la concentración de ADN y se determina el número de equivalentes de genoma totales dividiendo esta concentración entre el peso molecular medio del genoma.

III.ii Fuente de la muestra de polinucleótidos mixtos

Según una realización de la presente invención, la molécula de ADN diana deriva del genoma de una célula, donde el genoma puede ser o bien ADN cromosómico o bien extracromosómico. Además, la molécula de ADN diana puede derivar de una célula, donde la célula se selecciona de entre una célula microbiana, una célula de planta, una célula animal o una célula de mamífero. La célula de mamífero puede ser una célula humana. La célula microbiana puede ser una célula bacteriana, una célula de levadura o una célula fúngica.

Además, la molécula de ADN diana puede derivar de un micelio fúngico o esporas fúngicas.

45 Cuando la molécula de ADN diana deriva de una o más células, la célula o células pueden ser parte de un tejido multicelular u organismo multicelular.

Además, la molécula de ADN diana puede derivar de una o más partículas víricas, donde el virus tiene un genoma de ARN o ADN. Como alternativa, la molécula de ADN diana puede derivar de un genoma hospedador que comprende ADN integrado derivado de un virus. La molécula de ADN diana puede derivar también de un bacteriófago.

Independientemente de la derivación de la molécula de ADN o ARN diana, la molécula de ADN o ARN diana está presente en una muestra de polinucleótidos mixtos, donde los polinucleótidos mixtos pueden derivar de una muestra recogida de la naturaleza, por ejemplo una muestra de suelo, agua o aire. Como alternativa, la muestra puede derivar de un organismo multicelular, tal como un mamífero, por ejemplo un animal o un sujeto humano. Cuando la muestra deriva de un mamífero, la muestra (por ejemplo una biopsia) puede derivar de un fluido corporal (p.ej., sangre, plasma, suero, linfa y orina), de heces o de un tejido u órgano corporal. El organismo multicelular del que

deriva la muestra puede ser un organismo vivo o puede estar muerto.

### III.iii Preparación de la muestra de polinucleótidos mixtos

La muestra de polinucleótidos mixtos que comprende la molécula de ADN diana puede prepararse a partir de una muestra recogida de la naturaleza o de un organismo (p.ej., una biopsia). Los métodos para la extracción selectiva de polinucleótidos que comprenden ADN o ARN son conocidos en la materia [5]. Cuando la molécula de ADN diana deriva de una célula, se requiere normalmente la etapa de rotura celular o permeabilización celular para liberar las moléculas de ácido nucleico totales (incluyendo ADN o ARN) de una célula, precediendo esta etapa a la etapa posterior de extracción selectiva de polinucleótidos que comprenden ADN o ARN.

Cuando la molécula de ADN deriva de un genoma de ARN, en primer lugar se transcribe de forma inversa el genoma de ARN o partes del mismo proporcionando una molécula de ADNc, donde la secuencia nucleotídica del ADNc corresponde a (es un transcrito inverso de) el genoma de ARN.

## IV Métodos de amplificación aleatoria de ADN adecuados para PINS

Se han sugerido una serie de diferentes enfoques para la amplificación general de ADN, tales como PCR cebada degenerada aleatoriamente, PCR por ligación de ligador o PCR cebada por oligonucleótido generado (DOP) y amplificación de desplazamiento múltiple (MDA). La MDA se ha probado eficaz en la práctica de la amplificación de genoma completo (WGA) de incluso cantidades muy pequeñas de ADN [6]. En comparación con métodos de WGA basados en PCR más tradicionales, la MDA genera moléculas de ADN con un mayor peso molecular, que tienen mejor cobertura genómica. La MDA emplea una polimerasa de desplazamiento de hebra que posee dos actividades enzimáticas: síntesis de ADN (polimerasa) y una actividad exonucleolítica que degrada el ADN monocatenario en la dirección 3' a 5', como se ejemplifica por la ADN polimerasa del bacteriófago phi29, que pertenece a las ADN polimerasas de tipo B eucarióticas (UniProtKB/TrEMBL: Q38545). Otras polimerasas útiles incluyen la polimerasa BstI.

## V Determinación de secuencia de la molécula de ADN diana

El aislamiento de la molécula de ADN diana por PINS está basado en la detección de una o más secuencias consecutivas únicas de al menos 15 nucleótidos en dicha molécula de ADN. Cuando la detección está basada en PCR, donde se amplifican la una o más secuencias consecutivas únicas para generar un fragmento de ADN diana, puede determinarse la secuencia nucleotídica de este fragmento. Además, pueden determinarse las secuencias nucleotídicas que flanquean el fragmento de ADN diana en la dirección 5' y 3' mediante paseo genómico rápido (RGW) [7]. El RGW es un método sencillo basado en la PCR para determinar las secuencias en dirección aguas arriba o aguas abajo en una molécula de ADN mayor partiendo de una secuencia conocida, tal como un fragmento de ADN diana. La RGW posibilita la amplificación individual de hasta 6 kb en una molécula de ADN grande usando PCR. Las secuencias pueden extenderse simplemente realizando múltiples ciclos de RGW, usando cebadores nuevos basados en la secuencia obtenida en los ciclos anteriores. Típicamente, se construyen las colecciones a partir de una muestra purificada de la molécula de ADN diana grande digiriendo el ADN separadamente con cuatro enzimas de restricción diferentes y ligando los productos con un adaptador especialmente diseñado. Se secuencia entonces el ADN ligado con cebadores que se aparean con los adaptadores o con secuencias conocidas en el ADN, usando el método de secuenciación de ADN deseado tal como secuenciación de Sanger, pirosecuenciación, secuenciación por síntesis, ligación o secuenciación por codificación de dos bases o métodos similares [8].

## VI Aplicación de PINS y PINS múltiple

### 40 VI. i Aplicaciones de investigación y desarrollo de PINS y PINS múltiple

El uso de PINS para aislar o enriquecer ADN diana en muestras polinucleotídicas mixtas extraídas de muestras recogidas de la naturaleza proporciona acceso directo al genoma, o partes del mismo, de microorganismos que existen en la naturaleza y que frecuentemente no pueden obtenerse como cultivos axénicos. El PINS es particularmente útil para aislar o enriquecer ADN que codifica enzimas implicadas en la producción de bloques de construcción químicos o agentes activos tales como:

- ácidos (tales como ácido maleico, aspártico, malónico, propiónico, succínico, fumárico, cítrico, acético, glutámico, itacónico, levulínico, acotínico, glucárico, glucónico y láctico),
- aminoácidos (tales como serina, lisina, treonina),
- alcoholes (etanol, butanol, propanodiol, butanodiol, arabitol) y
- otros productos de alto valor (tales como acetoina, furfural y levoglucosano)
- antibióticos y compuestos anticancerosos (p.ej., péptido-policétidos; análogos lactámicos).

Por tanto, el PINS es particularmente útil para el aislamiento o enriquecimiento de ADN diana que codifica enzimas

seleccionadas entre una oxidoreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa, isomerasa o ligasa. El PINS múltiple es particularmente útil para el aislamiento o enriquecimiento de ADN diana que comprende un operón de dos o más marcos abiertos de lectura que codifica dos o más enzimas, donde las enzimas pueden ser parte de un complejo enzimático multifuncional, ya que la técnica puede aprovechar la alta fidelidad de las polimerasas (como Phi29) en la amplificación por MDA para generar grandes fragmentos de ADN de hasta 100.000 pb.

#### VI. ii Aplicaciones de diagnóstico de PINS y PINS múltiple

Puede usarse PINS o PINS múltiple para analizar ADN diana en muestras derivadas de organismos multicelulares, tales como biopsia o fluido corporal o heces obtenidos de un sujeto (p.ej., sujeto humano o animal), para el diagnóstico o monitorización de la progresión de una indicación médica o enfermedad.

- 10 Puede ayudarse al diagnóstico de un amplio intervalo de indicaciones médicas en un sujeto, tales como una enfermedad causada por un agente infeccioso (p.ej., microorganismo o virus) mediante el aislamiento o enriquecimiento y detección de una molécula de ADN o ARN diana que deriva del genoma del agente infeccioso por PINS o PINS múltiple, donde se detecta la molécula de ADN diana en una muestra de polinucleótidos mixtos derivada de una biopsia o muestra de fluido corporal obtenida de un paciente.
- 15 El uso de PINS múltiple en el aislamiento de molécula de ADN diana proporciona el rasgo adicional de que puedan determinarse rasgos diagnósticos adicionales de la enfermedad. Por ejemplo, cuando el genoma del agente infeccioso comprende genes de resistencia que confieren resistencia a ciertos agentes terapéuticos, el coenriquecimiento de un gen de resistencia y una secuencia que describa el agente infeccioso en el procedimiento de PINS indicará que el agente infeccioso porta el gen de resistencia.
- 20 Puede usarse también PINS o PINS múltiple para ayudar al diagnóstico de una enfermedad causada por, u originada por, la presencia de un agente vírico en un sujeto. La presencia y/o integración cromosómica de ADN que deriva de un genoma vírico en una biopsia o muestra de fluido corporal obtenida de un paciente puede detectarse por PINS secuenciando el fragmento de ADN entero que comprende la secuencia de ADN vírico. Usando PINS múltiple, puede determinarse la presencia o ausencia de ADN vírico en un sitio de integración conocido rastreando el coenriquecimiento del ADN vírico y la secuencia de ADN del sitio de integración.
- 25

#### VII PINS y sesgo en la amplificación

El PINS está basado en seleccionar específicamente muestras donde ha ocurrido la amplificación de una región de ADN deseada a partir de una muestra de ADN mixta compleja. Aunque se ha descrito repetidamente la amplificación basada en Phi29 (MDA) como la amplificación genómica más fiable actualmente disponible, es conocido que introduce un sesgo significativo. Pan *et al.* [18] afirma en términos generales que sigue siendo un reto una amplificación de genoma completo altamente específica (WGA) de conjuntos de ADN complejos que evite sesgos de amplificación. Además, se ven observaciones similares con métodos de amplificación alternativos tales como DOP-PCR y PCR de cebado aleatorio. Estos dos métodos de amplificación se describe que son mucho menos eficaces en la reproducción de la representación del locus [19], dando como resultado productos de amplificación aún más sesgados. Aunque el sesgo es aparentemente inevitable independientemente de la cantidad de molde de reacción presente [20], la cantidad de producto independiente de molde (TIP) o el sesgo introducido durante la amplificación está aparentemente correlacionado negativamente con la cantidad de molde de ADN en la reacción y, en algunos estudios, se ha documentado que representa un 70-75 % del rendimiento total [18]. Se aplica la amplificación del genoma completo para amplificar ADN en el proceso de PINS, y por lo tanto se esperaría que estos retos genéricos relativos al sesgo en amplificaciones genómicas se aplicarían también a PINS. Como procedimiento que incluye múltiples etapas de WGA, se esperaría por tanto que se observara un sesgo significativo contra la molécula de ADN diana. Por ello, un procedimiento tal como PINS que emplea varias etapas de WGA no habría sido considerado como un método capaz de enriquecer una región específica de ADN en una muestra mixta. Sorprendentemente, no se ve el reto de TIP/sesgo cuando se aplica la técnica de PINS aunque la concentración inicial de la molécula de ADN diana sea muy baja. El TIP/sesgo negativo mínimo observado en el sistema de PINS es significativamente menor que la ganancia global obtenida en el proceso de amplificación y por lo tanto el resultado neto es un enriquecimiento sustancial de la molécula de ADN diana con cada ciclo.

El método no requiere un molde de ADN inicial diluido, ya que las altas concentraciones de ADN pueden someterse eficazmente también a PINS. En este caso, se necesita solo una amplificación de pocas veces por el método de WGA.

#### EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos ilustran por qué el PINS es superior o complementario a otros métodos, tales como clonación por pistola génica y metagenómica, para el enriquecimiento y/o aislamiento de una molécula de ADN diana. Emplear metagenómica tradicional, en lugar del PINS usado en el ejemplo 1, requeriría la secuenciación de  $2 \times 10^6$  genomas con un tamaño medio de  $3 \times 10^9$  bases. Por tanto, se requerirían un total de al menos  $6 \times 10^{15}$  pares de bases para obtener la secuencia de HPV18. Después de dos rondas de PINS, se aumentaba la frecuencia de la diana de HPV18 por un factor de 79 y por lo tanto se necesitaría secuenciar solo  $4,47 \times 10^{13}$  pares de bases. Rondas

adicionales de PINS podrían disminuir adicionalmente la cantidad requerida de secuenciación.

Materiales y métodos generales

Se aplicaron los siguientes materiales y métodos en los ejemplos siguientes:

5 **Enzimas y reactivos:** Si no se señala otra cosa, las enzimas se suministraron por MBI Fermentas (Alemania) y se usaron según las recomendaciones de los suministradores.

**Métodos de amplificación y detección:** Si no se señala otra cosa, se emplearon los siguientes procedimientos y condiciones para amplificación de fragmentos de ADN por PCR; amplificación de genoma por MDA y extensión de fragmento de ADN en regiones flanqueantes usando RGW. Se detectó el fragmento de ADN diana por electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

10 **Amplificación por PCR:**

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en reacciones de 20 µl por mezclado de agua libre de nucleasa (7 µl), 10 µl de 2x SSO Advance Sybr TR-Mixture (BioRad), cebador directo 5 µM (1 µl), cebador inverso 6 µM (1 µl) con 1 µl de molde de ADN. La composición de 2x SSO Advance Sybr TR-Mixture es: dNTP, polimerasa de fusión Sso7d, MgCl<sub>2</sub>, SYBR® Green I y estabilizadores.

15 Las condiciones de amplificación por PCR eran (15 s/15 s/15 s)<sub>x25</sub> a las temperaturas (94 °C/65,8 °C/72 °C). Las reacciones de PCR se efectuaron en una máquina de RT-PCR BioRad Connect.

**Amplificación por MDA:**

Se llevó a cabo la MDA según el protocolo descrito a continuación:

Mezcla I: Desnaturalización y reapareamiento

20 2,5 µl de 2 x tampón de apareamiento (Tris-acetato 33 mM (pH 7,9 a 37 °C), acetato de Mg 10 mM, acetato de K 66 mM, BSA 0,1 mg/ml)

0,5 µl de agua

1 µl de cebadores hexaméricos aleatorios exorresistentes (Thermo Scientific)

(1 µl de molde de ADN)\*

25 Mezcla II - Amplificación

7,5 µl de agua

4 µl de dNTP 2 mM

2 µl de tampón Phi29 (Thermo Scientific)

1 µl de pirofosfatasa 0,01 U/µl (Thermo Scientific)

30 0,5 µl de polimerasa Phi29 (Thermo Scientific)

Protocolo

35 1. Se preparó inicialmente la mezcla 1 sin la adición de molde de ADN\* y se añadieron 4 µl de mezcla 1 a cada tubo de microcentrífuga. Se añadió entonces molde de ADN a la mezcla colocando 1 µl dentro de la tapa del tubo de microcentrífuga. Se centrifugaron los tubos y se transfirieron entonces a hielo inmediatamente después de la centrifugación.

2. Se transfirió entonces la mezcla 1 (de la etapa 1) de hielo a 94 ° C (máquina de PCR precalentada), se mantuvo a 94 °C durante tres minutos y se transfirió entonces de vuelta al hielo.

3. Se añadieron entonces 15 µl de la mezcla 2 a la mezcla 1 (de la etapa 2).

40 4. Se incubó la mezcla final (mezcla 1 + mezcla 2) a 30 °C durante 16 horas (máquina de PCR). Al final de la incubación, se elevó la temperatura de la mezcla final a 65 °C durante 10 minutos para inactivar la polimerasa.

**Cuantificación de ADN:**

Se cuantificó el ADN usando el fluorómetro Quantus™ (Promega) como se describe por el fabricante.

**Electroforesis en gel:**

Se evaluaron los resultados de PCR basándose en electroforesis en gel de agarosa al 2 % usando el equipo BioRad SubCell. Se hicieron circular los geles a 80 V en agarosa al 1 % durante 20-30 minutos. Se realizó la visualización vertiendo bromuro de etidio (0,5 µg/ml) en los geles.

- 5 Se verificó la amplificación por MDA cargando 2 µl sobre un gel de agarosa al 0,7 %. Se hicieron circular todos los geles de MDA a 80 V en agarosa al 0,7 % durante aproximadamente 30 minutos.

El marcador molecular en todos los geles de agarosa era la escala Fermentas 1bk+, con tamaños de banda de (75, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 7000, 10.000, 20.000).

**Cálculo de probabilidades**

- 10 Se calculó la probabilidad de detectar una molécula de ADN diana en una muestra usando distribución hipergeométrica, donde la población es el volumen de muestra original de líquido en que la diana está presente (positivo) o no presente y la muestra de prueba es el volumen de líquido extraído de la muestra original. Debido a que las moléculas de ácido nucleico contribuyen solo a una parte minoritaria del volumen, se multiplican tanto el volumen de la población como los volúmenes de muestra de prueba por 1000 en los cálculos.

- 15 Para una muestra de 100 µl, el tamaño de población es de 100.000. Si una muestra de 100 µl contiene cuatro moléculas de ADN diana, la probabilidad de detectar una molécula de ADN diana en una muestra diluida que contiene 3,5 µl (muestra de prueba= 3500) de la muestra de 100 µl original es:

$$P = 1 - \text{dist. hiperg.}(0;3500;4;100000) = 0,133$$

- 20 Si se analizan 10 muestras de prueba de dilución duplicadas de cada 3,5 µl de la misma muestra original, la probabilidad de detectar la molécula de ADN diana en al menos una de las muestras de dilución duplicadas es de:

$$P = 1 - \text{dist. hiperg.}(0;35000;4;100000) = 0,821$$

La ecuación de la distribución hipergeométrica es:

$$P(X = x) = h(x, n, M, N) = \frac{\binom{M}{x} \binom{N-M}{n-x}}{\binom{N}{n}}$$

donde

- 25 x= número de positivos en la muestra de prueba (diluida)

n= volumen de la muestra de prueba (diluida) x 1000

M= número de moléculas de ADN diana en la muestra original (población)

N= volumen de la muestra original (población) x 1000

- 30 **Ejemplo 1: Método de enriquecimiento de un polinucleótido que codifica el virus HPV-18 de una muestra mixta de ADN humano**

1.0 Creación de la mezcla para enriquecimiento.

- 35 Se preparó una muestra polinucleotídica mixta a partir de ADN de referencia que se adicionó con ADN derivado de células HeLa. Se obtuvo el ADN de HeLa de New England Biolabs (100 µg/ml) como una muestra de ADN purificado. Se extrajo el ADN de referencia de células derivadas de un voluntario humano. La molécula de ADN diana humano en el ADN de HeLa se amplificaba eficazmente por los cebadores de PCR diana seleccionados [SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2], mientras que el ADN de referencia humano no procuraba un producto de amplificación con este primer cebador. Se amplificaron separadamente ambos tipos de ADN usando el protocolo de MDA antes de establecer la mezcla. Después de la amplificación por MDA, se determinó que la cantidad de copias de ADN diana en ADN de HeLa amplificado por MDA era de 71750 copias/µl usando el cálculo del número más probable (MPN) en diluciones de 10 veces por triplicado de ADN de HeLa. Se diluyó el ADN diana por un factor de 1:2.500.000 en ADN de referencia amplificado por MDA no diluido (empleando dilución en serie) creando la mezcla adicionada final que  
40 contiene 0,029 copias de diana/µl y tiene una concentración de ADN total de 0,187 µg/µl. Por tanto, se calculó que la cantidad inicial de copias de ADN diana en la muestra polinucleotídica mixta inicial era de: (0,029 copias de

diana/ $\mu\text{l}$ ):  $(0,187 \mu\text{g}/\mu\text{l}) = 0,153$  copias de diana/ $\mu\text{g}$  de ADN. El volumen total de muestra de ADN mixto era de  $45 \mu\text{l}$ . La probabilidad de detectar la molécula de ADN diana en  $3,5 \mu\text{l}$  de muestra polinucleotídica mixta es de  $0,078(1\text{-hiperg.}(0;3500;1;45000))$ ; concretamente menos de  $0,75$ .  $3,5 \mu\text{l}$  es el volumen de muestra usado en la primera ronda de PINS.

5 1.1 Definición de los cebadores para selección de la molécula de ADN diana que codifica HPV18:

Se obtuvo la secuencia de ADN de HPV18 de GenBank (GQ180790), y se diseñaron los siguientes 2 cebadores manualmente para orientar a un fragmento de ADN de  $96 \text{ pb}$  en el genoma de HPV18 (nº de acceso a GenBank GQ180790):

Cebador directo: **GTTTAGTGTGGGCCTGTGC [SEQ ID NO: 1]**

10 Cebador inverso: **GGCATGGGAACTTTCAGTGT [SEQ ID NO: 2]**

1.2 Mezcla inicial- inferior al límite de detección:

15 Se llevó a cabo el análisis por PCR para verificar que el número de moléculas de ADN diana fuera inferior al límite de detección de PCR en la mezcla polinucleotídica inicial. Se usaron nueve muestras de mezcla polinucleotídica (cada una con  $1 \mu\text{l}$  de mezcla inicial) como molde de ADN para amplificación por PCR con el par cebador [SEQ ID NO: 1 y 2], pero no se encontraron productos de PCR de las  $96 \text{ pb}$  esperadas en ninguna de las muestras. Puede encontrarse en la Figura 1 un gel de agarosa que muestra las muestras de PCR negativas individuales a partir de la mezcla inicial.

1.3 Primera ronda de PINS

20 Se eligieron diez muestras de  $3,5 \mu\text{l}$  individuales de la muestra polinucleotídica mixta, preparada en la etapa 1, para amplificación por MDA en un volumen de  $20 \mu\text{l}$ , como se describe anteriormente, donde la probabilidad de detectar la molécula de ADN diana en la muestra polinucleotídica mixta de  $3,5 \mu\text{l}$  antes de la amplificación es de  $0,078(1\text{-hiperg.}(0;3500;1;45000))$ ; concretamente menos de  $0,75$ . Se cribó en alícuotas por triplicado de  $1 \mu\text{l}$  de cada muestra amplificada por MDA (nº1-nº 10) la presencia de la molécula de ADN diana por amplificación por PCR, como se describe anteriormente, usando el par cebador de PCR específico de diana en 1.1, seguido de electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos de PCR (Figura 2). Debido a que se analizaron diez muestras duplicadas, la probabilidad de detectar la molécula de ADN diana en al menos una de las diez muestras de dilución duplicadas era de  $0,778(1\text{-hiperg.}(0;35000;1;45000))$ , concretamente mayor de  $0,75$ . La nº 10 era la única muestra que se encontró que daba como resultado productos de PCR positivos del tamaño correcto en los tres duplicados. Se analizaron 10 muestras adicionales (cada una con  $1 \mu\text{l}$  de molde) de la nº 10 por PCR usando condiciones idénticas, y 5 (de 10) daban como resultado el producto de PCR correcto. Al combinar los resultados del primer cribado, 3 (de 3) y el siguiente cribado, donde 5 (de 10) eran positivas, se observaron un total de 8 (de 13) como positivas, todas originarias de la nº 10. Se cuantificó que la concentración de ADN total en la muestra nº 10 era de  $0,222 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Puede encontrarse en la Figura 2 un gel de agarosa que muestra 10 productos de PCR del segundo cribado.

35 Se calculó que la abundancia de la molécula de ADN diana después de la amplificación por MDA era de:  $(8/13 \text{ copias de ADN diana}/\mu\text{l}): (0,208 \mu\text{g}/\mu\text{l}) = 2,96$  copias de ADN diana/ $\mu\text{g}$ . En consecuencia, el aumento de frecuencia obtenido por PINS en la primera ronda de amplificación es:  $(2,96 \text{ dianas}/\mu\text{g}): (0,153 \text{ dianas}/\mu\text{g}) = 19,36$  veces.

Reamplificación de la nº 10

40 Para generar suficiente cantidad de molde antes de avanzar a la 2ª ronda de PINS, se amplificaron  $3,5 \mu\text{l}$  de molde de la nº 10 usando una mezcla de reacción de MDA de  $50 \mu\text{l}$ . Se verificó el resultado de la reamplificación de la nº 10 analizando diez alícuotas de  $1 \mu\text{l}$  por PCR donde, en 6 de 10 reacciones de PCR, se detectó la molécula de ADN diana ( $0,60$  copias de ADN diana/ $\mu\text{l}$ ). Este resultado corresponde bien a la frecuencia inicial de la molécula de ADN diana en la nº 10 que era de  $8/13(0,62)$ . Dividiendo la frecuencia de las copias diana/ $\mu\text{l}$  de muestra entre la concentración de ADN total, se calcula que la abundancia relativa de la molécula de ADN diana es de:  $(0,6 \text{ dianas}/\mu\text{l}): (0,222 \mu\text{g}/\mu\text{l}) = 2,70$  dianas/ $\mu\text{g}$ .

Sorprendentemente, había ocurrido un sesgo de amplificación aparentemente solo en un grado limitado durante la reamplificación. Puede encontrarse en la Figura 3 un gel de agarosa que muestra los diez productos de reacción por PCR a partir de la reamplificación.

1.4 Segunda ronda de PINS

50 Se diluyeron diez alícuotas de  $1 \mu\text{l}$  de muestra de reamplificación de la nº 10, derivada de la 1ª ronda de PINS, 20 veces en la mezcla de reacción de MDA, diluyendo así la molécula de ADN diana a una frecuencia de  $0,03$  moléculas de ADN diana/ $\mu\text{l}$ . La probabilidad de detectar la molécula de ADN diana (HPV18) en una alícuota de  $1 \mu\text{l}$

de la muestra diluida era de 1-hiperg.(0;1000;30;50000)= 0,455, concretamente inferior a 0,75. Se amplificó cada alícuota usando el protocolo de MDA descrito anteriormente. De las diez reacciones de MDA, se detectó la molécula de ADN diana en dos muestras de reacción, la nº 8 y la nº 10, donde 3 (de 3) reacciones de PCR duplicadas eran positivas de diana. La probabilidad de detectar la diana en al menos una de las diez muestras duplicadas era de 1-hiperg.(0;10000;30;50000)= 0,9988, concretamente superior a 0,75.

Se agruparon las muestras nº 8 y nº 10 en una muestra y se diluyeron  $2 \times 10^{-1}$  (5 veces). El análisis de las alícuotas de 1 µl de esta dilución por PCR detectaba la molécula de ADN diana en 5 (de 10) reacciones PCR, como se ve en el gel de la (Figura 4). Puesto que la muestra agrupada se diluyó a  $2 \times 10^{-1}$  (5 veces), se calcula que la cantidad de dianas es de: 5 dianas/10 µl de volumen de muestra de prueba  $\times 5 = 2,5$  dianas/µl. Puesto que el contenido de ADN total de la muestra agrupada se midió que era de 0,207 µg/µl, se calcula que la frecuencia de la molécula de ADN diana es de 2,5 dianas/µl dividida entre 0,207 µg de ADN total/µl; que corresponde a 12,08 dianas/µg de ADN.

Se expone en la Figura 5 una revisión del protocolo seguido a lo largo de las dos rondas de PINS.

### 1.5 Enriquecimiento calculado de ADN de molécula diana por dos rondas de PINS

Al calcular desde la mezcla inicial (0,153 dianas/µg) a la muestra final (12,08 dianas/µg), se ha alcanzado una ganancia total de 79,05 después de dos rondas consecutivas de amplificación por PINS.

La abundancia de la diana de HPV18 antes de la primera ronda de PINS era de  $1 / 1,97 \times 10^6$  equivalentes de genoma de HPV18 positivos/equivalentes de genoma totales. La abundancia correspondiente después de la primera y segunda rondas de PINS era de  $1,02 \times 10^5$  y  $2,49 \times 10^4$ , respectivamente. Este enriquecimiento se consiguió usando 21 pruebas y se disminuyó el requisito del número requerido de pruebas tradicionales tales como secuenciación por un factor de 79, como puede verse en la Tabla 1.

### Ejemplo 2

Se demuestra en este ejemplo el uso de PINS para facilitar la secuenciación de una molécula de ADN diana presente en una muestra polinucleotídica diana, donde la cantidad de ADN diana es menor que el límite de detección por PCR. La molécula de ADN diana seleccionada era un polinucleótido localizado en el genoma de HPV18. La cantidad de esta molécula de ADN diana en la muestra mixta correspondía a 0,0286 copias/µl. Se preparó la mezcla mixta como se describe en el Ejemplo 1. Usando protocolos de PCR estándares, la cantidad de solución de molde añadida a la reacción de PCR es normalmente de 1 µl, y la concentración de ADN diana mínima requerida para su detección positiva por PCR es de 1 copia/µl. Por consiguiente, la cantidad de molécula de ADN diana en la muestra polinucleotídica mixta era aproximadamente 35 veces menor que la requerida para amplificación por PCR y posterior secuenciación. El ejemplo demuestra cómo puede usarse PINS para determinar la secuencia del ADN diana en una muestra mixta, que de otro modo ha sido inalcanzable por procedimientos basados en PCR estándares conocidos.

#### 2.1 La molécula de ADN de HPV18 diana en la muestra polinucleotídica mixta no es detectable por PCR

Para verificar que el número de copias de la molécula de ADN diana por µl de la muestra polinucleotídica mixta (correspondiente a la muestra polinucleotídica mixta del Ejemplo 1, antes de amplificación por MDA) era inferior al límite de detección por PCR, se amplificó por PCR una serie de diez muestras duplicadas (según el protocolo dado en Materiales y métodos generales), con la modificación de usar 50 ciclos y usar los parámetros de amplificación optimizados: 94 °C/65,8 °C/72 °C, donde cada temperatura se mantenía durante 15 segundos. Los cebadores específicos de HPV usados durante la amplificación fueron:

HPV-264f: 5'-GTGGTGTATAGAGACAGTATAACC-3' [SEQ ID NO: 3]

HPV-911f: 5'- CCTTCTGGATCAGCCATTGT [SEQ ID NO: 4]

La amplificación positiva de la molécula de ADN diana en el genoma de HPV18 generaría un producto de PCR de 667 pb (recuadrado en la Figura 6). Como se esperaba, debido a la baja abundancia, ninguna (de las diez) reacciones daba como resultado la amplificación del tamaño correcto, verificando la baja cantidad de molécula de ADN diana en la muestra polinucleotídica mixta (Figura 6).

#### 2.2 El PINS facilita el enriquecimiento de la molécula de ADN de HPV18 diana en la muestra polinucleotídica mixta para permitir la detección por PCR

Se aumentó el número inicial de copias de la molécula de ADN diana en la muestra polinucleotídica mixta (0,0286 copias de diana/µl) hasta una cantidad final de 2,5 copias de diana/µl mediante la ejecución de PINS como se describe en el Ejemplo 1. Los productos de amplificación de MDA, generados efectuando la primera ronda de PINS en la muestra polinucleotídica mixta inicial, se analizaron por PCR como se describe anteriormente usando 1 µl de la muestra amplificada por MDA. Se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado (667 pb) como se muestra en la Figura 7. Los bajos niveles de amplificación no específica de la muestra polinucleotídica mixta inicial generaban un

fondo bajo detectable como una mancha en el carril nº 2 de la Figura 7. Se aisló el producto detectable de ~667 pb en el carril nº 2 por extracción de gel (kit de extracción de gel de GeneJet, Thermo Fischer Scientific) y se reamplificó por PCR para aumentar la cantidad de la molécula de ADN diana para permitir la secuenciación posterior (carril nº A, Figura 8).

5 2.3 Verificación de la molécula de ADN de HPV18 diana obtenida por PINS

Se secuenció de forma directa e inversa el producto purificado aislado del carril nº A (Figura 8) usando ambos cebadores [SEQ ID NO: 3 y 4]. Se alinearon las secuencias recuperadas con la secuencia de HPV18 (HPU89349), dando como resultado un alineamiento perfecto con cero desapareamientos (Figura 9). El ejemplo confirma la eficacia de PINS para enriquecer en secuencias raras a un nivel en que pueda determinarse su secuencia.

10 **Ejemplo 3: Método de aislamiento de un fragmento nucleotídico que codifica una enzima endoglucanasa a partir de una muestra de suelo**

3.1 Definición de los cebadores para la selección de la molécula de ADN diana que codifica una endoglucanasa:

15 Se recuperan múltiples genes microbianos que codifican endoglucanasas y presuntas endoglucanasas de GenBank y se alinean sus secuencias nucleotídicas usando el alineamiento ClustalW para secuencias múltiples [9]. A partir del alineamiento, se identifican las regiones de secuencia de ácido nucleico conservada y se diseña un conjunto de cebadores para orientar a una molécula de ADN que tiene una de estas secuencias de ADN conservadas. Los cebadores y alineamientos parciales de las secuencias de genes recuperados que codifican endoglucanasa se muestran en la Figura 10.

20 Se estima que los cebadores seleccionados dan como resultado un producto de amplificación por PCR de 481 pb. Sin embargo, como el origen y secuencia de los moldes en una muestra natural son desconocidos, los tamaños de los productos de PCR pueden desviarse del tamaño esperado.

3.2 Extracción del ADN de la muestra de suelo:

25 Se recogen muestras (8) de suelos de bosque como fuente de diversos microorganismos de suelo. Se extrae ADN de las 8 muestras diferentes usando agitación con perlas, como se describe por Kvist *et. al.* [10]. Cada extracción se amplifica usando el kit MDA Repli-g Mini, usando condiciones de amplificación por MDA como se definen anteriormente (Materiales y métodos generales). Se verifica la calidad del ADN amplificado mediante visualización en geles de agarosa al 0,7 %.

3.3 Determinación de la presencia y abundancia de la molécula de ADN diana:

30 Se lleva a cabo el análisis de PCR inicial para evaluar si podía observarse la secuencia de ADN diana usando los cebadores seleccionados [SEQ ID NO: 5 y 6] usando las condiciones de PCR seleccionadas: 94 °C (30 s) + 60 °C (30 s) + 72 °C (30 s) y 30 ciclos.

35 Una (de las ocho) muestras amplificadas por MDA da como resultado una amplificación por PCR positiva, mientras que las 7 restantes no muestran signo de amplificación. Se evalúa que el producto de PCR tenga aproximadamente el tamaño predicho correcto en un gel de agarosa. Al efectuar la PCR instantánea (RT-PCR), se determina la abundancia de la molécula de ADN diana (que codifica una presunta endoglucanasa) usando cebadores [SEQ ID NO: 5 y 6] y se compara con la abundancia de los genes de ARNr de 16S usando cebadores [SEQ ID NO: 7 y 8] (donde el gen de ARNr de 16S se usa como medida de la abundancia de ADN bacteriano total). Se encuentra que los genes de ARNr de 16S son aproximadamente 550.000 mayores en cantidad en comparación con la presunta endoglucanasa. La cuantificación revela que los genes de ARNr de 16S están presentes en 9,4E6 copias, mientras que la endoglucanasa se detectaba solo en 17 copias. Por tanto, se requería una dilución de 10<sup>-2</sup> para generar las muestras (N), ya que cada muestra alícuota contendría entonces de media 0,17 moldes.

3.4 Aplicación del procedimiento de PINS para enriquecer y aislar la molécula de ADN diana y sus regiones flanqueantes:

45 Se someten a PINS las muestras de ADN que se encontraba que contenían la molécula de ADN diana como sigue:

3.4.1: PINS de 1ª ronda

50 Basándose en la cuantificación detectada anteriormente, se crea una serie de diluciones usando un factor de dilución (D) de 1:10, que apunta a establecer entonces múltiples diluciones duplicadas de (N), 10<sup>-2</sup>. Se preparan veinte muestras idénticas de dilución 10<sup>-2</sup> y se someten a amplificación genómica usando el kit Repli-g Mini (Qiagen). Se analiza individualmente cada muestra amplificada usando los cebadores de PCR [SEQ ID NO: 5 y 6] y las condiciones de RT-PCR descritas anteriormente en 1.3. Tres de las 20 muestras dan como resultado una amplificación por PCR positiva, con un producto de ADN del tamaño predicho. Se enumeran a continuación los datos de salida del análisis de PINS asociados.



Datos de PINS nº 1

Nº cuant. PINS: 24,3

Factor de dilución: 10

Siguiente dilución:  $10^{-3}$

5 Muestras en la siguiente repetición: 20

3.4.2: PINS de 2ª ronda

10 Basándose en el análisis por software de PINS de la ronda anterior (PINS nº 1), se estima un total de al menos 20 muestras duplicadas para la siguiente ronda de replicación. Por tanto, se preparan 20 muestras de dilución  $10^{-3}$  (concretamente, un aumento de dilución (D) de 10 veces frente a la dilución total anterior de la muestra (Dt)), y cada una de las muestras individuales se amplifica usando el kit Repli-g MDA. Se analiza posteriormente cada muestra por RT-PCR usando cebadores [SEQ ID NO: 5 y 6], lo que muestra que una (de 20) muestras procuraba un producto de ADN del tamaño predicho. Se selecciona esta muestra para avance adicional. Se enumeran a continuación los datos de salida del análisis de PINS.

Datos de PINS nº 2

15 Nº cuant. de PINS: 230

Factor de dilución: 9,6

Siguiente dilución:  $10^{-4}$

Muestras en la siguiente repetición: 20

3.4.3: PINS de 3ª ronda

20 Basándose en los valores calculados en el PINS nº 2, se estima que se requieren de nuevo al menos 20 muestras para la siguiente ronda de enriquecimiento. La dilución propuesta por el software es de  $10^{-4}$  y se preparan 20 muestras. Se amplifican las 20 muestras usando el kit Repli-g Mini y se someten posteriormente a amplificación por RT-PCR usando cebadores [SEQ ID NO: 5 y 6], donde cuatro muestras procuraban un producto de ADN del tamaño predicho. Se agrupan estas cuatro muestras y se usan para la siguiente ronda de repetición. Se enumeran a continuación los datos de salida del análisis de PINS.

Datos de PINS nº 3

Nº de cuant. de PINS: 2840

Factor de dilución: 12

Siguiente dilución:  $8,4 \times 10^{-6}$

30 Muestras en la siguiente repetición: 25

3.4.4: PINS DE 4ª ronda

35 Basándose en los valores calculados en el PINS nº 3, se crean ahora un total de 25 muestras que tienen la dilución  $8,4 \times 10^{-6}$ . Se amplifica cada una de las muestras de dilución duplicadas individuales usando el kit Repli-g Mini. El análisis de RT-PCR usando cebadores [SEQ ID NO: 5 y 6] muestra que dos muestras procuran un producto de ADN del tamaño predicho. Se enumeran a continuación los datos de salida del análisis de PINS.

Datos de PINS nº 4

Nº de cuant. de PINS: 27200

Factor de dilución: 12

Siguiente dilución:  $8,8 \times 10^{-7}$

40 Muestras en la siguiente repetición: 25

3.4.5: PINS de 5ª ronda

Basándose en los valores calculados del PINS nº 4, se crean ahora un total de 25 muestras a dilución  $8,8 \times 10^{-7}$ . Y se amplifica cada una de las muestras individuales usando el kit Repli-g Mini. El análisis de RT-PCR usando cebadores [SEQ ID NO: 6 y 6] muestra que dos muestras procuran un producto de ADN del tamaño. Se enumeran a

continuación los resultados del software de PINS.

Datos de PINS nº 5

Nº de cuant. de PINS: 365000

5 Se agrupan las dos muestras positivas de esta ronda de análisis en una muestra y se lleva a cabo la RT-PCR en el gen diana usando cebadores [SEQ ID NO: 5 y 6] y en genes de ARNr de 16S usando cebadores [SEQ ID NO: 7 y 8] en la misma muestra. Los niveles de ADN total (medidos por genes de ARNr) después de las 5 rondas de amplificación por MDA no han cambiado notablemente en comparación con las observaciones iniciales, pero la relación de ADN diana a ADN total se calcula ahora que es de 365000/9200000= aproximadamente 1/25. Estudios anteriores han mostrado que es suficiente una relación 1:100 para obtener datos genómicos por RGW. Se combina cada uno de los cebadores de amplificación con los cebadores de ligación de ligador de la RGW.

3.4.6: Secuenciación de la molécula de ADN diana enriquecida por PINS

15 Los 5 ciclos de PINS sirven para potenciar la presencia de la molécula de ADN diana en tal medida que el gen completo y un operación potencial que comprende la molécula de ADN diana puedan secuenciarse por métodos de secuenciación tradicionales. En consecuencia, se ejecuta la técnica de RGW [7] en que se generan 3 colecciones aleatorias de la muestra de ADN, enriquecidas con la molécula de ADN diana, preparando 3 digestiones de restricción (EcoRI, HindIII y BglII/MboI) y apareando entonces las digestiones cada una con cebadores de RGW que comprenden superposiciones 5' compatibles, por ejemplo el par cebador [SEQ ID NO: 5] y [SEQ ID NO: 6], formando un oligomódulo. Los cebadores específicos de molécula de ADN diana usados para cribar [SEQ ID NO: 5 y 6] se usan en combinación con el cebador RGW [SEQ ID NO: 5] en una amplificación por PCR para generar productos de PCR mayores que cubran la molécula de ADN diana y sus regiones flanqueantes.

Secuencia nucleotídica de cebador	Descripción
>WalkID: GCG CTG CAG GCA TGC GAG CTC [SEQ ID NO: 9]	Usada como cebador de PCR junto con el cebador específico
>WALKOL_EcoRI_I: GCGCTGCAGGCATGCGAGCTCCCAAGCTTGATCG [SEQ ID NO: 10] >WALKOL_EcoRI_II: AATTCGATCAAGCTTGGGAGCTCGCATGCCTGCAGCGC [SEQ ID NO: 11]	Ligadores usados para ADN digerido con EcoRI
>WALKOL_HindIII: GCGCTGCAGGCATGCGAGCTCCCA [SEQ ID NO: 12] >WALKOL_HindIII_II: AGCTTGGGAGCTCGCATGCCTGCAGCGC [SEQ ID NO: 13]	Ligadores usados para ADN digerido con HindIII
>WALKOL_BglII: GATCTGGGAGCTCGCATGCCTGCAGCGC [SEQ ID NO: 14] >WALKOL_BglII_II: GCGCTGCAGGCATGCGAGCTCCCAAGCTTGATCG [SEQ ID NO: 15]	Ligadores usados para ADN digerido con BglII/MboI

25 Inicialmente, se generan dos secuencias de ADN usando el procedimiento, y el diseño adicional de los cebadores basado en la secuencia adquirida da como resultado un ensamblaje completo de un ORF constituido por un gen de 3996 pb (Figura 11). El gen tiene un código de inicio ATG colocado 196 pb aguas arriba del extremo EndoGlu-dir (5'). Una secuencia de ShineDalgarno y secuencias asociadas a -10 y -35 están localizadas en la dirección 5' del código de inicio ATG. Además, no se encontraron ligamientos aparentes con genes en la dirección 3', ilustrando que el gen probablemente no es parte de un operón mayor.

**Ejemplo 4: Uso de PINS para ligar múltiples elementos genéticos de origen genómico común**

30 Este ejemplo ilustra el uso de PINS para detectar la presencia del gen *mecA* en una muestra mixta (p.ej., tomada de un paciente) y para determinar si el gen se origina en el genoma de *Staphylococci* presentes en la muestra. Este análisis se basa en el uso de PINS para monitorizar la coamplificación simultánea de un gen de *Staphylococcus* localizado aproximadamente a 13000 pares de bases en dirección aguas arriba del gen *mecA*. El experimento se diseña para usar la alta fidelidad de la polimerasa phi29 para amplificación de desplazamiento múltiple (MDA), permitiendo generar fragmentos genómicos de hasta +70000 pb durante la amplificación. Si, después de ejecutar el PINS, los niveles de productos de PCR generados usando cebadores específicos del gen *mecA* y de *Staphylococcus aureus* (SA) alcanzan cantidades comparables, esto indica que los productos de PCR se originan en el mismo genoma, a saber MRSA, ya que se han coamplificado dentro del intervalo de MDA. Se usa el ensamblaje de productos de PCR secuenciados después de PINS para confirmar que la *mecA* se originaba a partir de un

genoma de *Staphylococcus*.

#### 4.1 Diseño de cebador

5 Se recuperan múltiples secuencias de genes microbianos que codifican *mecA* de la base de datos de GenBank y se alinean estas secuencias usando ClustalW para alineamiento de secuencia múltiple [9]. Las regiones del alineamiento con 100 % de identidad de secuencia se localizan y usan para diseño de cebadores. Los cebadores resultantes orientados a *mecA* son:

MR-dir: 5'-CAAACACTACGGTAACATTGATCGCAAC-3' [SEQ ID NO: 16]

MR-inv: 5' - CAATATGTATGCTTTGGTCTTTCTGC-3' [SEQ ID NO: 17],

y que se predice que generan un producto de PCR de 126 pb.

10 Se diseñan cebadores específicos de cepa usados para orientarse a *Staphylococcus aureus* de aproximadamente 13.000 pb en dirección 5' del sitio de integración SCCmec de resistencia (OrfX) [14]. Las secuencias cebadoras son:

SA-dir: 5' - CGTGAAGAAACAGAACGAATGATTC - 3' [SEQ ID NO: 18],

SA-inv: 5'- GCCTCTAGAATATTTTCATCGCATTTG - 3' [SEQ ID NO: 19],

y que se predice que generan un producto de PCR de 267 pb.

#### 15 4.2 Recogida de muestras biológicas primarias y extracción y cuantificación de ADN

Se somete una muestra sospechosa de contener MRSA a análisis de PINS. Se recoge la muestra de un paciente mediante el uso de un "bastoncillo para los oídos". Se extrae el ADN total de la torunda usando el kit de extracción de ADN de torunda de A&A Biotechnology (Polonia).

20 Se usa el ADN extraído como molde para una dilución en serie de 10 veces. Se analiza directamente cada uno de los tubos diluidos por PCR instantánea (RT) usando 1 µl de molde en una mezcla de reacción de RT de 25 µl con cada uno de los dos conjuntos de cebadores de MR (MR-dir y MR-inv) y SA (SA-dir y SA-inv).

25 A partir del análisis de RT-PCR orientado a MR (*mecA*), se mide el valor de Ct y se convierte en números/copias absolutos en comparación con patrones internos circulados en muestras paralelas en el mismo programa de ciclo. Se calcula que la cantidad de MR (*mecA*) es de  $1,70 \times 10^2$ , mientras que se calcula que SA (*Staphylococcus aureus*) está presente en una cantidad de  $1,34 \times 10^3$ . A partir del análisis de RT, resulta evidente que la muestra contiene más dianas de *Staphylococcus* que dianas de *mecA*. La relación de los dos productos es cercana a 1/8 (MR/SA).

#### 4.3 Aplicación del procedimiento de PINS para el enriquecimiento y el diagnóstico de moléculas de ADN diana de *mecA* y *Staphylococcus*

##### 4.3.1: PINS nº 1 de 1ª ronda

30 Basándose en los niveles detectados de moléculas de ADN diana en la muestra inicial, se preparan 10 duplicados de la muestra N (dilución  $1,7 \times 10^{-3}$ ). Al aplicar Repli-g Ultra-fast a cada una de las diez muestras duplicadas y efectuar posteriormente un análisis de RT-PCR para detectar la molécula de ADN diana de MR, se encuentra que una muestra de las 10 muestras ("muestra E") procura una gran cantidad de producto de MR-PCR, mientras que las otras 9 muestras no comprenden niveles detectables de producto de MR-PCR. En esta muestra positiva de MR, la cuantificación por RT-PCR muestra que la abundancia del producto de MR-PCR es de  $1,27 \times 10^3$  y la abundancia del producto de SA-PCR en la muestra es de  $1,31 \times 10^3$ . La relación se ha desplazado ahora hacia niveles comparables de las dos moléculas de ADN diana, desde una relación inicial de aproximadamente 1:8 hasta una relación cercana a 1:1.

##### 4.3.2: PINS nº 2 de 2ª ronda

40 Basándose en la muestra "E" positiva, que tiene una dilución de  $1,27 \times 10^{-3}$  (2.3.1), se establece otra serie de dilución y, de nuevo, se preparan 10 muestras duplicadas de N (dilución  $1,27 \times 10^{-4}$ ). Se amplifica cada una de las muestras usando el kit Repli-g Ultra-fast MDA. A partir de la RT-PCR del análisis, resulta evidente que puede detectarse MR en 9 de las 10 muestras, y que la abundancia de MR en las muestras positivas es de  $1,32 \times 10^4$ . El análisis comparable revela que el nivel de producto SA-PCR no ha aumentado, ya que la abundancia de SA permanece idéntica:  $1,31 \times 10^4$ . La relación de los dos productos es, de nuevo, muy cercana a 1:1. Al haber empleado el PINS para obtener un factor de amplificación adicional de x10 sin obtener un cambio visible de la abundancia de la diana, se concluye que la cantidad no puede aumentar adicionalmente, indicando la presencia de una muestra (casi) pura. Por tanto, las rondas adicionales de PINS no darán como resultado un mayor nivel de purificación. Por tanto, la siguiente etapa es secuenciar el molde amplificado para evaluar la identidad del gen de

resistencia *mecA* y los genes adyacentes, y verificar la presencia de MRSA en lugar de MR y SA como moléculas de ADN independientes localizadas en la misma muestra.

#### 4.3.3: Secuenciación de *mecA* y genes adyacentes en la molécula de ADN diana de MR

Se usan cebadores diseñados para orientarse a MRSA conocidos (GenBank, NCBI) para generar productos de PCR superpuestos usados para secuenciación y ensamblaje. Se generan 24 productos de PCR de diversas longitudes y se producen dos secuencias continuas de 2475 pb y 19186 pb por PCR, secuenciación y ensamblaje. Se obtienen 789 pb adicionales por RGW [7] y se establece suficiente superposición para combinar los dos ensamblajes en un gran ensamblaje de 22450 pb. La BLAST de nucleótidos [11] muestra una coincidencia casi idéntica (>99,9 %) con cepas de MRSA múltiples en la base de datos.

Resumen:

Se evaluó que la abundancia de MR había aumentado por un factor de 8 por la primera ronda de PINS. Al efectuar análisis sobre el fondo no diana, resulta evidente que la relación entre MR y SA estaba claramente sesgada durante la primera tanda (PINS nº 1), mientras que esta relación se mantenía en la siguiente ronda de amplificación (PINS nº 2). Por tanto, se concluye que ambas moléculas de ADN diana se originan en el mismo fragmento de ADN, puesto que la SA no diana está presente en igual cantidad aunque solo se ha usado la molécula de ADN diana de MR durante las rondas de selección por PINS. Resulta evidente por el análisis que, aunque están también presuntamente presentes estafilococos no resistentes en la mezcla inicial, puede concluirse que la resistencia MR se originaba en un *Staphylococcus aureus* y no en otras bacterias que contienen *mecA* tales como estafilococos negativos de coagulasa [12]. Aunque la MR puede estar presente en cepas bacterianas no estafilocócicas, se amplificaba evidentemente junto con SA, debido a la coamplificación de ambas moléculas de ADN diana durante la amplificación por MDA. Por tanto, aunque las secuencias cebadas están separadas por 13.000 kb en el genoma, es posible asignar ambas propiedades a la misma fracción del genoma, suficiente para diagnosticar la presencia de MRSA. Además, la secuenciación verifica esta observación, y era evidente que el ADN era casi idéntico (+99,9 %) a las secuencias genómicas de MRSA conocidas.

## REFERENCIAS

1. Maurin, M., "Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases". Expert Rev Mol Diagn, 2012. 12(7): pág. 731-54.
2. Shendure, J. y H. Ji, "Next-generation DNA sequencing". Nat Biotechnol, 2008. 26(10): pág. 1135-45.
3. Torsvik, V., J. Goksoyr y F.L. Daae, "High diversity in DNA of soil bacteria". Appl Environ.Microbiol, 1990. 56(3): pag. 782-787.
4. Lasken, R.S. y S. Huges, "Multiple displacement amplification of genomic DNA, in *Whole Genome Amplification*", S. Huges, Editor 2005, Scion Publishing Ltd. 2005: Oxfordshire. pág. 99-118.
5. Sambrook, J. y D.W. Russell, "Molecular Cloning a laboratory manual" 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
6. Raghunathan, A., et al., "Genomic DNA amplification from a single bacterium". Applied and Environmental Microbiology, 2005. 71(6): pág. 3342-3347.
7. Kilstrup, M. y K.N. Kristiansen, "Rapid genome walking: a simplified oligo-cassette mediated polymerase chain reaction using a single genome-specific primer". Nucleic Acids Res, 2000. 28(11): p. e55.
8. Liu, L., et al., "Comparison of next-generation sequencing systems". J Biomed Biotechnol, 2012. 2012: pág. 251364.
9. Chenna, R., et al., "Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs". Nucleic Acids Res., 2003. 31(13): pág. 3497-3500.
10. Kvist, T., et al., "Diversity of thermophilic and non-thermophilic crenarchaeota at 80 degrees C". FEMS Microbiol.Lett., 2005. 244(1): pag. 61-68.
11. Altschul, S.F., et al., "Basic local alignment search tool". J.Mol.Biol., 1990. 215(3): pág. 403-410.
12. Huletsky, A., et al., "Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in less than 1 hour during a hospital surveillance program. Clin Infect Dis, 2005. 40(7): pág. 976-81,
13. Lukyanov, K., et al., "Molecule by molecule PCR amplification of complex DNA mixtures for direct sequencing: an approach to in vitro cloning", Nucleic Acids Research, 1996. 24(11): pág. 2194-2195.

14. WO2004058987 (MOLECULAR STAGING INC [US] QIAGEN GMBH [DE]) 15 de julio de 2004).
15. Erlandsson, L., *et al.*, "Amp-PCR: Combining a Random Unbiased Phi29 Amplification with a Specific Real-Time PCR, Performed in One Tube to Increase PCR Sensitivity". PLOS ONE, 2010. 5(12): p. e15719

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Samplix S.a.r.l  
Kvist, Thomas  
Mikkelsen, Marie J
- <120> Aislamiento de secuencias nucleotídicas dirigido por probabilidad (PINS)
- <130> P1384PC00
- 10 <150> PA 2012 70822  
<151> 21-12-2012
- <160> 19
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1  
<211> 19  
<212> ADN
- 20 <213> Virus del papiloma humano tipo 18
- <220>  
<221> cebador\_unión  
<222> (1)..(19)
- 25 <223> cebador directo HPV18
- <400> 1  
gttttagtgg gcctgtgc 19
- 30 <210> 2  
<211> 20  
<212> ADN
- <213> Virus del papiloma humano tipo 18
- 35 <220>  
<221> cebador\_unión  
<222> (1)..(20)
- <223> cebador inverso HPV18
- 40 <400> 2  
ggcatgggaa ctttcagtgt 20
- <210> 3  
<211> 23
- 45 <212> ADN  
<213> Virus del papiloma humano tipo 18
- <220>  
<221> cebador\_unión  
<222> (1)..(23)
- 50 <223> cebador HPV-264f
- <400> 3  
gtgggtata gagacagtat acc 23
- 55 <210> 4  
<211> 20  
<212> ADN
- <213> Virus del papiloma humano tipo 18
- 60 <220>  
<221> cebador\_unión

<222> (1)..(20)  
 <223> cebador HPV-911f

<400> 4  
 5 ccttctggat cagccattgt 20

<210> 5  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 10 <213> Bacillus acidopullulyticus

<220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(22)  
 15 <223> cebador directo EndoGlu

<400> 5  
 gcacattgct ggtacagaga ta 22

20 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus acidopullulyticus

25 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(22)  
 <223> cebador inverso EndoGlu

30 <400> 6  
 gatctgcttc cattatgctc tg 22

<210> 7  
 <211> 19  
 35 <212> ADN  
 <213> Bacterium

<220>  
 <221> cebador\_unión  
 40 <222> (1)..(19)  
 <223> B-all-27f – cebador directo de ARNr de 16S bacteriano

<400> 7  
 45 gagtttgatc ctggctcag 19

<210> 8  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Bacteria

50 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(18)  
 <223> Eub338r – cebador inverso de ARNr de 16S rARN bacteriano

55 <400> 8  
 gctgcctccc gtaggagt 18

<210> 9  
 60 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Virus del papiloma humano tipo 18

<220>  
 65 <221> cebador\_unión

<222> (1)..(21)  
 <223> cebador WalkID  
  
 <400> 9  
 5 gcgctgcagg catgcgagct c 21  
  
 <210> 10  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 10 <213> Virus del papiloma humano tipo 18  
  
 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(34)  
 15 <223> cebador WALKOL\_EcoRI\_I  
  
 <400> 10  
 gcgctgcagg catgcgagct cccaagcttg atcg 34  
  
 20 <210> 11  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Virus del papiloma humano tipo 18  
  
 25 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(38)  
 <223> cebador WALKOL\_EcoRI\_II  
  
 30 <400> 11  
 aatcgatca agcttgggag ctgcatgcc tgcagcgc 38  
  
 <210> 12  
 <211> 24  
 35 <212> ADN  
 <213> Virus del papiloma humano tipo 18  
  
 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 40 <222> (1)..(24)  
 <223> WALKOL\_HindIII primer  
  
 <400> 12  
 45 gcgctgcagg catgcgagct ccca 24  
  
 <210> 13  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Virus del papiloma humano tipo 18  
 50  
 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(28)  
 <223> cebador WALKOL\_HindIII\_II  
 55  
 <400> 13  
 agcttgggag ctgcatgcc tgcagcgc 28  
  
 <210> 14  
 60 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Virus del papiloma humano tipo 18  
  
 <220>  
 65 <221> cebador\_unión



<222> (1)..(28)  
 <223> cebador WALKOL\_BgIII  
  
 <400> 14  
 5 agcttgggag ctcgcatgcc tgcagcgc 28  
  
 <210> 15  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 10 <213> Virus del papiloma humano tipo 18  
  
 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(34)  
 15 <223> cebador WALKOL\_BgIII\_II  
  
 <400> 15  
 gcgctgcagg catgcgagct cccaagcttg atcg 34  
  
 20 <210> 16  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Bacterium  
  
 25 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1) .. (26)  
 <223> cebador MR-fw (gen multiresistencia)  
  
 30 <400> 16  
 caaactacgg taacattgat cgcaac 26  
  
 <210> 17  
 <211> 26  
 35 <212> ADN  
 <213> Bacterium  
  
 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 40 <222> (1) .. (26)  
 <223> cebador MR-Re (gen multi resistencia)  
  
 <400> 17  
 caatatgat gcttggctct ttctgc 26  
 45  
 <210> 18  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Staphylococcus aureus  
 50  
 <220>  
 <221> cebador\_unión  
 <222> (1)..(25)  
 <223> cebador SA-fw  
 55  
 <400> 18  
 cgtgaagaaa cagaacgaat gattc 25  
  
 60 <210> 19  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Staphylococcus aureus  
  
 <220>  
 65 <221> cebador\_unión

ES 2 630 377 T3

<222> (1) .. (26)  
<223> cebador SA-Re

<400> 19  
5 gcctctagaa tatttcatcg catttg 26

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para enriquecer una molécula de ADN diana a partir de una muestra polinucleotídica mixta que comprende las etapas de:
  - 5 a) proporcionar una muestra polinucleotídica mixta que contiene dicha molécula de ADN diana, en la que dicha molécula de ADN diana comprende una o más secuencias consecutivas únicas de al menos 10 nucleótidos,
  - b) diluir en serie dicha muestra polinucleotídica mixta hasta que la probabilidad de detectar dicha molécula de ADN diana en una muestra diluida de polinucleótidos mixtos sea menor de 0,75, preferiblemente menor de 0,50 o incluso más preferiblemente menor de 0,25, y
  - 10 c) producir un número suficiente de duplicaciones de la muestra diluida de polinucleótidos mixtos hasta que la probabilidad de detectar dicha molécula de ADN diana en al menos una de las muestras de dilución duplicadas sea de al menos 0,75, preferiblemente de 0,80 a 0,95;
  - d) amplificar el ADN en dichas muestras diluidas duplicadas para aumentar la abundancia de ADN en cada muestra;
  - 15 e) detectar la presencia o ausencia de dicha molécula de ADN diana en dichas muestras de dilución duplicadas en la etapa (d), en la que la frecuencia de dicha molécula de ADN diana en dicha muestra de dilución duplicada aumenta en comparación con la muestra polinucleotídica mixta en la etapa (a);
  - f) diluir en serie al menos una muestra de dilución duplicada detectada en la etapa e) que contiene dicha molécula de ADN hasta que la probabilidad de detectar dicha molécula de ADN en una muestra diluida sea menor de 0,75, y repetir las etapas (c) a (e) o (f) al menos una vez.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la frecuencia de dicha molécula de ADN diana respecto a ADN no diana en una muestra polinucleotídica mixta de la etapa a) es de entre  $10^{-2}$  y  $10^{-7}$ , preferiblemente entre  $10^{-4}$  y  $10^{-7}$ .
- 25 3. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que las diluciones en serie de dicha muestra polinucleotídica mixta en la etapa (b) se amplifican para aumentar la abundancia de ADN en cada muestra, seguido de la etapa de detección de la presencia o ausencia de dicha molécula de ADN en cada muestra amplificada, y determinar por tanto el número de diluciones en serie requerido para obtener una muestra diluida en que la probabilidad de detectar dicha molécula de ADN diana sea menor de 0,75.
- 30 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ADN se amplifica en la etapa (d) mediante una técnica seleccionada de entre PCR cebada degenerada aleatoriamente, PCR por ligación de ligador, PCR cebada por oligonucleótido degenerado (DOP) y amplificación por desplazamiento múltiple.
5. El método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de g) efectuar un análisis de secuencia de ácido nucleico de dicha molécula de ADN para determinar al menos parte de la secuencia nucleotídica de la molécula de ADN.
- 35 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que se detecta por PCR la presencia de dichas una o más secuencias consecutivas únicas de al menos 10 nucleótidos en dicha molécula de ADN.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que se detecta la presencia de dichas una o más secuencias consecutivas únicas de al menos 10 nucleótidos en dicha molécula de ADN mediante hibridación con dicha molécula de ADN.
- 40 8. El método según la reivindicación 1, en el que dicha molécula de ADN comprende al menos dos secuencias consecutivas únicas de al menos 10 nucleótidos, y en el que dicha molécula de ADN comprende de 50 a 100.000 pares de bases de ácido nucleico, preferiblemente de 150 a 3.000 pares de bases de ácido nucleico, más preferiblemente de 150 a 1.500 pares de bases de ácido nucleico.
9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la dilución total de la muestra diluida de la etapa (f) aumenta por un factor de 2 a 20 para cada repetición de las etapas (c) a (e).
- 45 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el número de muestras de dilución duplicadas preparadas en la etapa (c) es de 2 a 500.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la molécula de ADN diana deriva del genoma de una célula.
- 50 12. El método según la reivindicación 11, en el que la célula se selecciona de una célula bacteriana, una célula fúngica y una célula de mamífero.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la molécula de ADN diana deriva de un genoma vírico o un genoma de mamífero o una combinación de los mismos.

Figura 1

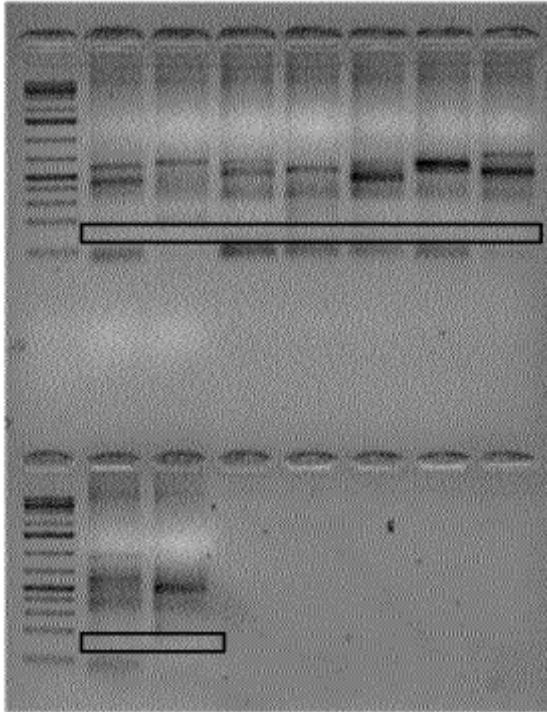


Figura 2

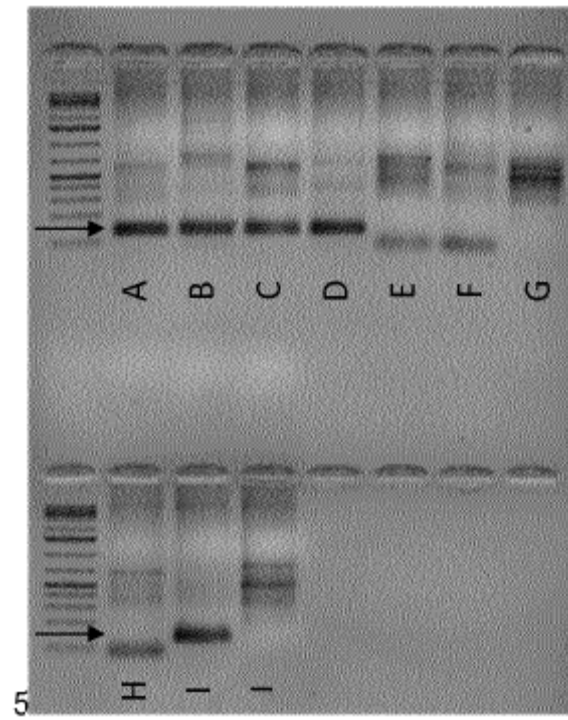


Figura 3

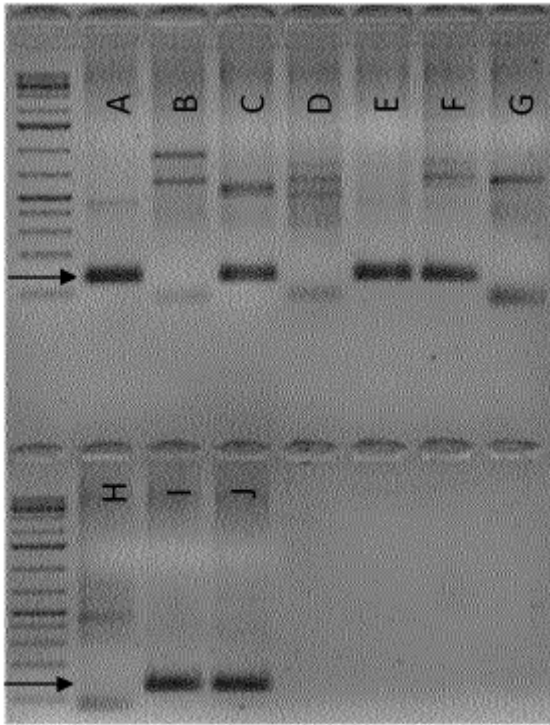


Figura 4

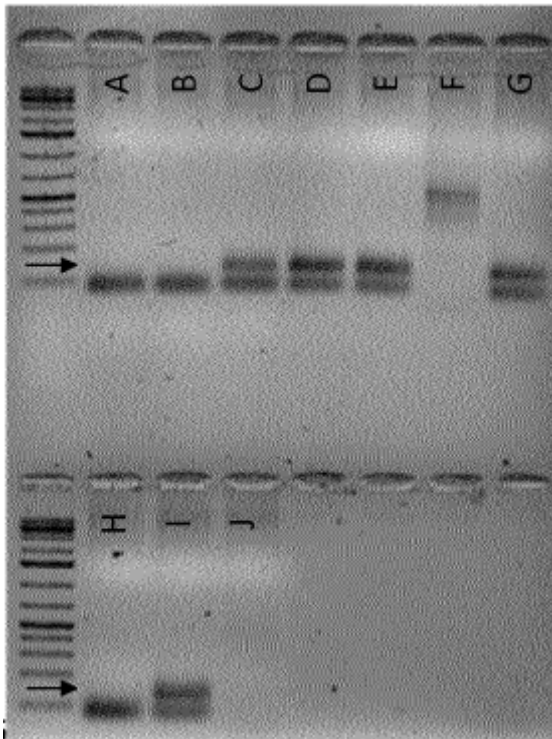


Figura 5

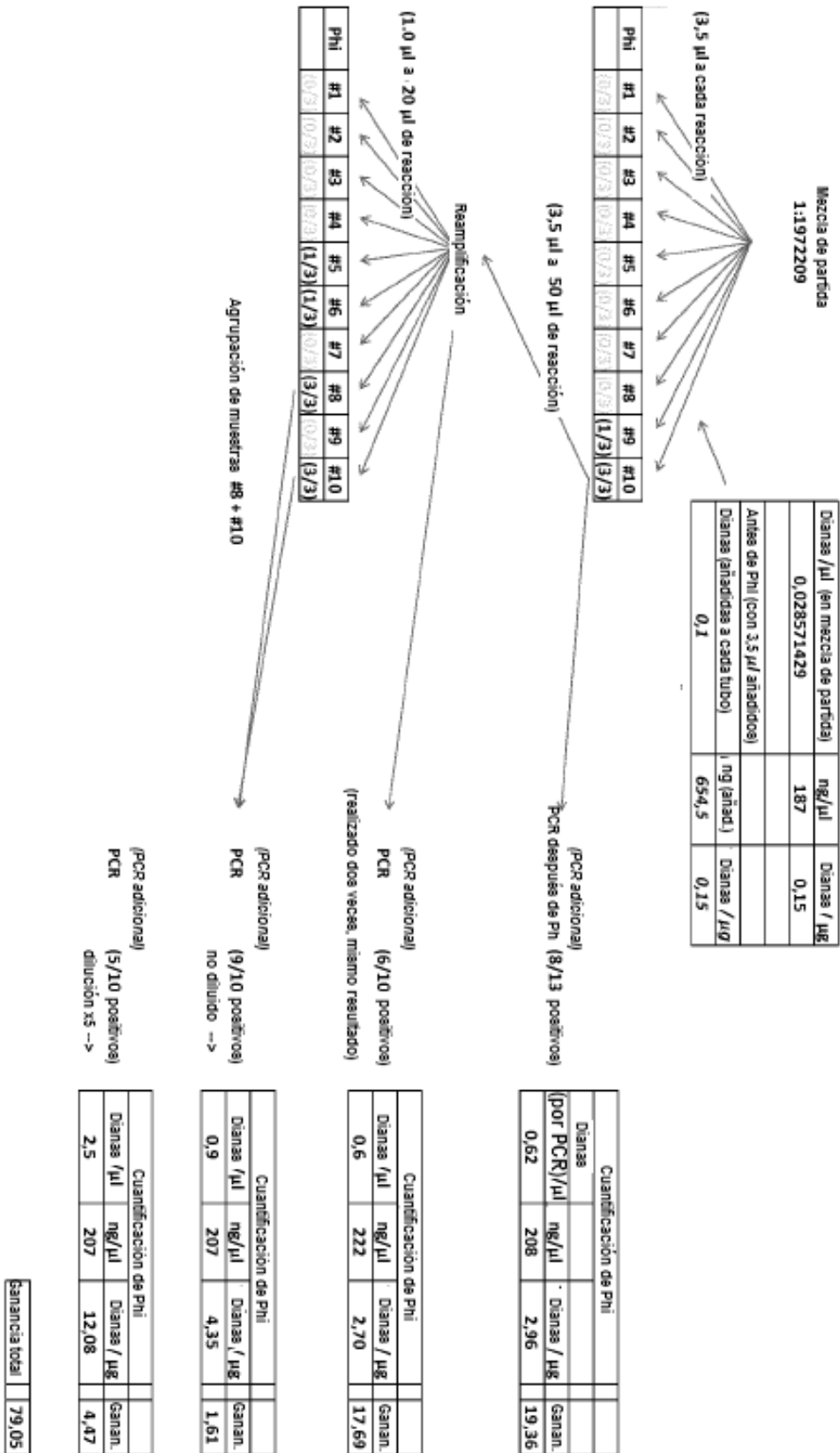


Figura 6

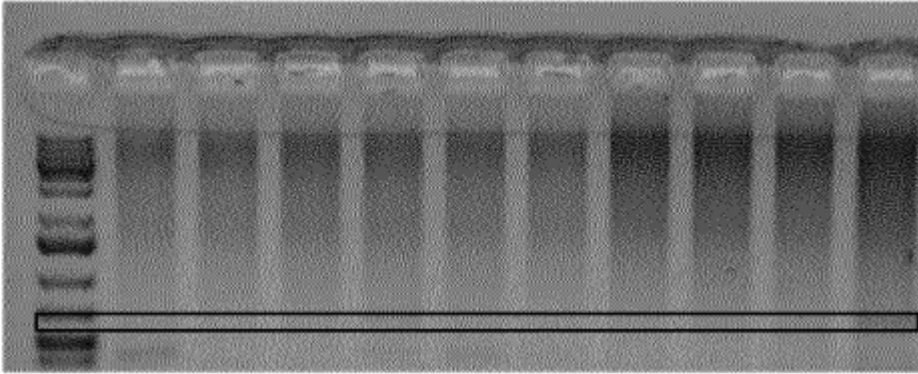


Figura 7

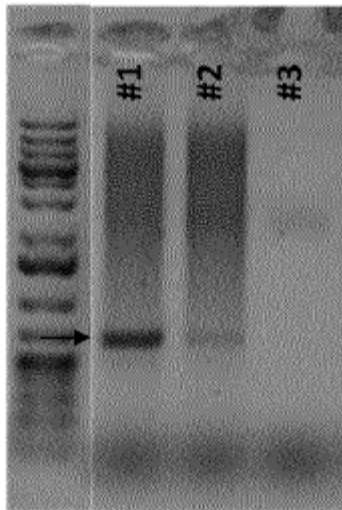




Figura 8

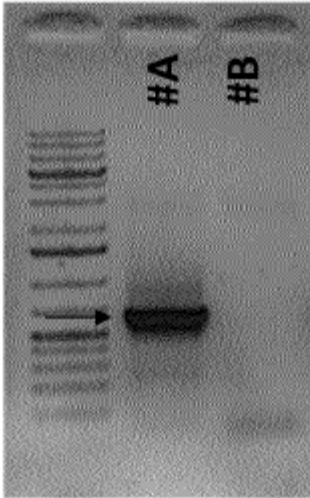


Figura 9

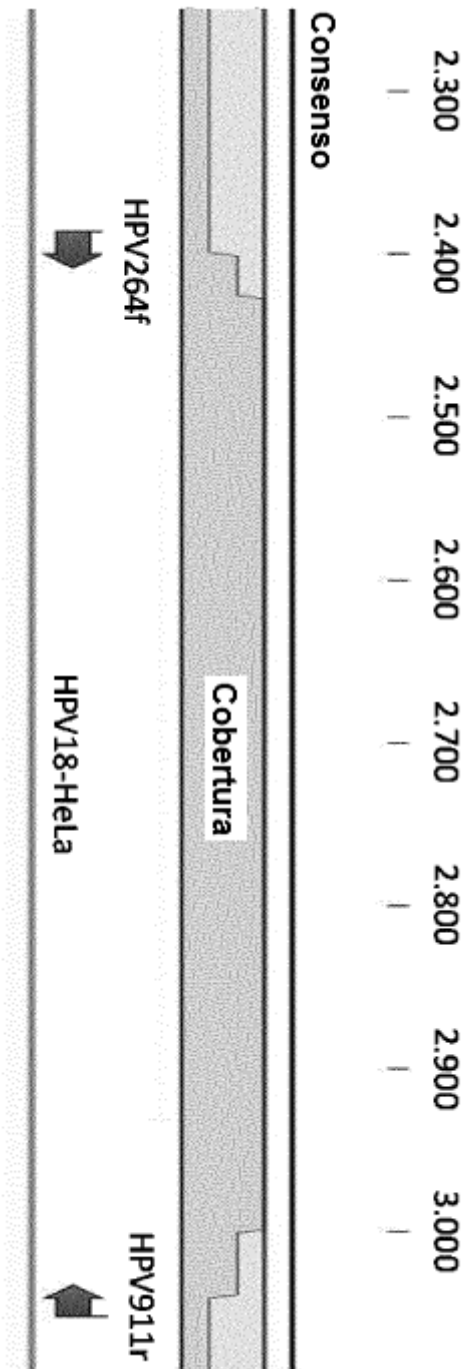


Figura 10

<p>EndoGlu - dir 5' - GCACATTGCTGGTACAGAGATA - 3' [SEQ ID NO: 5]</p>	<p>EndoGlu - inv 5' - GATCTGCTTCCATTATGCTCTG - 3' [SEQ ID NO: 6] (complemento inverso a la ilustración)</p>
<p>B-all-27f - cebador directo de ARNr de 16S bacteriano</p>	<p>Eub338r - cebador inverso de ARNr de 16S bacteriano</p>
<p>5' - GAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3' [SEQ ID NO: 7]</p>	<p>5' - GCTGCCTCCCGTAGGAGT - 3' [SEQ ID NO: 8]</p>

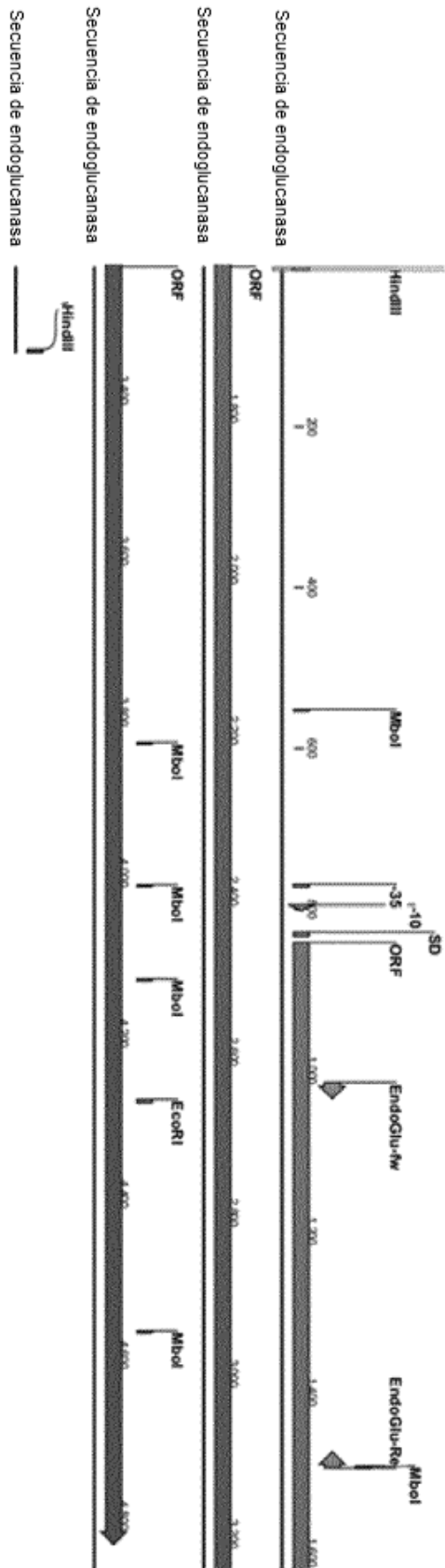


Figura 11