

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 498**

51 Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.09.2011 PCT/US2011/050326**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2012 WO12033714**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2011 E 11823989 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2614137**

54 Título: **Células para inmunoprecipitación de cromatina y procedimiento de fabricación de las mismas**

30 Prioridad:

07.09.2010 US 380570 P

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

27.02.2018

73 Titular/es:

**SIGMA-ALDRICH CO. LLC (100.0%)
3050 Spruce Street
St Louis MO 63103, US**

72 Inventor/es:

**PALHAN, VIKAS, B.;
KREADER, CAROL y
MUELLER, ERNIE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 656 498 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

Células para inmunoprecipitación de cromatina y procedimiento de fabricación de las mismas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a células bacterianas que comprenden una pluralidad de enlaces cruzados de ácido nucleico, a procedimientos para fabricar dichas células y a procedimientos para usar dichas células para aislar complejos de ADN-proteína.

Antecedentes de la invención

10 La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) es una herramienta de investigación que se utiliza para identificar sitios de unión de ADN en el genoma para una proteína concreta de interés. Para ello, las proteínas de unión al ADN en las células vivas se entrecruzan de manera reversible con el ADN al que están unidas. A continuación, los complejos de cromatina-proteína son capturados usando un anticuerpo contra la proteína de interés. Los complejos de cromatina-proteína-anticuerpo generalmente se aíslan por contacto con una proteína inmovilizada que se une a los anticuerpos. Por ejemplo, la proteína A de *Staphylococcus* se une al dominio Fc de los anticuerpos. Por lo tanto, la proteína A aislada puede inmovilizarse sobre un soporte sólido y usarse para capturar complejos de cromatina-proteína-anticuerpo. Como alternativa, las células de *Staphylococcus* inactivadas por calor en las que se han fijado proteína A y otras proteínas de la pared celular en su lugar (es decir, células Staph A) se pueden usar para aislar los complejos cromatina-proteína-anticuerpo. Las células Staph A no solo son mucho más baratas, sino que también son más adecuadas para aislar el ADN unido a proteínas de baja abundancia debido a su alto contenido de proteína A.

20 Sin embargo, un problema derivado del uso de células Staph A es que los complejos ADN-proteína aislados con células Staph A pueden estar contaminados con ADN de *Staphylococcus*. En aplicaciones basadas en PCR o hibridación (por ejemplo, ChIP-on-chip) usando cebadores o sondas específicos de secuencia, el ADN de *Staphylococcus* contaminante no interfiere con el análisis del ADN de interés aislado. En las aplicaciones de secuenciación de ADN (por ejemplo, ChIP-Seq) u otros procedimientos independientes de la secuencia, sin embargo, el ADN de *Staphylococcus* contaminante sí interfiere con el análisis. Si bien se han desarrollado procedimientos de bloqueo del ADN, como la incubación de células Staph A con agentes como el ADN de esperma de arenque y seroalbúmina bovina, y Nocker y Camper (Appl. Environ. Microbiol. 2006, 72 (3): 1997-2004) describen el uso de monoazida de etidio para eliminar selectivamente el ADN de células muertas en una población mixta de células bacterianas, todavía existe la necesidad de procedimientos más efectivos para inactivar el ADN cromosómico de células de *Staphylococcus* de modo que no interfieran con los procedimientos independientes de la secuencia (es decir, los que requieren separación de cadenas).

Sumario de la invención

35 Entre los diversos aspectos de la presente divulgación se encuentra la provisión de una célula bacteriana aislada, destruida con calor, que comprende una pluralidad de reticulaciones de ácido nucleico, para su uso en el aislamiento de complejos de ADN-proteína.

40 Otro aspecto de la divulgación abarca un procedimiento para preparar una célula que comprende una pluralidad de entrecruzamientos de ácidos nucleicos. El procedimiento comprende poner en contacto una célula bacteriana aislada, destruida con calor, con un compuesto de furocumarina para formar una célula que contiene furocumarina. El procedimiento comprende además poner en contacto la célula que contiene furocumarina con una fuente de luz ultravioleta para formar la célula que comprende la pluralidad de entrecruzamientos de ácido nucleico.

En el presente documento también se desvelan kits para la inmunoprecipitación de la cromatina. El kit comprende una pluralidad de células bacterianas no viables que comprenden una pluralidad de entrecruzamientos de proteínas de la pared celular y una pluralidad de entrecruzamientos de ácidos nucleicos, pudiendo las células unirse a complejos de ADN-proteína-anticuerpo de forma tal que se aíslan los complejos ADN-proteína.

45 Todavía otro aspecto de la divulgación abarca un procedimiento para aislar una pluralidad de complejos de ADN-proteína. El procedimiento comprende poner en contacto una pluralidad de complejos de ADN-proteína-anticuerpo con una pluralidad de células bacterianas destruidas por calor que comprenden una pluralidad de entrecruzamientos de proteínas de la pared celular y una pluralidad de entrecruzamientos de ácidos nucleicos de forma tal que las células bacterianas se unen a los complejos de ADN-proteína-anticuerpo para formar una pluralidad de complejos de ADN-proteína-anticuerpo unidos a células bacterianas. El procedimiento comprende además poner en contacto los complejos ADN-proteína-anticuerpo unidos a células bacterianas con un tampón de elución para formar la pluralidad de complejos de ADN-proteína aislados, en el que los complejos ADN-proteína están sustancialmente desprovistos de ácidos nucleicos derivados de las células bacterianas que son detectables mediante una técnica que requiere separación de cadenas.

55 Otras características y repeticiones de la divulgación se describen con más detalle más adelante.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 ilustra la reducción de ADN de *Staphylococcus* contaminante en células tratadas con aminometil trioxsalen (AMT). Se representa la cantidad de reducción del ADN de *Staphylococcus* en reacciones de PCRc usando cebadores específicos de las secuencias de codificación de ARN de *Staphylococcus* en las fracciones eluidas de CHIP preparadas usando células Staph A (no tratadas) y células Staph-Seq (tratadas con AMT).

La figura 2 muestra el reclutamiento de la proteína de unión a ADN EZH2 en los genes diana, GPR101 y SHH. Los genes no diana son actina y GAPDH. Se representa el % de entrada para PCRc usando los complejos inmunoprecipitados con anticuerpos contra EZH2 o IgG de conejo control (es decir, sin información). C: control, células Staph A no tratadas. T: células Staph-Seq tratadas con AMT.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona una célula bacteriana aislada para su uso en el aislamiento de complejos de ADN-proteína, estando la célula destruida con calor y comprendiendo una pluralidad de entrecruzamientos de ácidos nucleicos, en la que cada entrecruzamiento de ácido nucleico comprende una furocumarina unida covalentemente y en la que los complejos de ADN-proteína aislados están sustancialmente desprovistos de ácidos nucleicos derivados de células bacterianas que son detectables mediante un procedimiento que requiere separación de cadenas, y en el que la célula bacteriana es una célula de *Staphylococcus* positiva para la proteína A, una célula de *Streptococcus* positiva para la proteína G o una célula de *Peptostreptococcus* positiva para la proteína L. También se proporcionan procedimientos para fabricar las células bacterianas que comprenden los entrecruzamientos de ácido nucleico. Brevemente, el procedimiento comprende poner en contacto células bacterianas con el agente de entrecruzamiento activable por la luz ultravioleta furocumarina, en el que los ácidos nucleicos de la célula están entrecruzados de manera que no pueden sufrir separación de cadenas. La divulgación también proporciona procedimientos para usar células bacterianas que comprenden los entrecruzamientos de ácidos nucleicos para aislar complejos de ADN-proteína, en los que los complejos de ADN-proteína aislados carecen sustancialmente de ácidos nucleicos derivados de células bacterianas que son detectables mediante un procedimiento que requiere separación de cadenas.

(I) Célula bacteriana no viable aislada que comprende entrecruzamientos de ácidos nucleicos

Un aspecto de la divulgación abarca una célula bacteriana no viable aislada que comprende una pluralidad de entrecruzamientos de ácidos nucleicos. La célula bacteriana no viable aislada puede comprender además una pluralidad de entrecruzamientos de proteínas de la pared celular.

(a) Células bacterianas

Como se ha indicado anteriormente, la célula bacteriana es una célula de *Staphylococcus* positiva para la proteína A, una célula de *Streptococcus* positiva para la proteína G o una célula de *Peptostreptococcus* positiva para la proteína L. En una realización de ejemplo, la célula bacteriana puede ser una célula de la cepa de Cowan 1 de *Staphylococcus aureus*.

La célula bacteriana puede comprender además proteínas de la pared celular que están entrecruzadas. En algunas realizaciones, las proteínas de la pared celular pueden entrecruzarse mediante un agente de entrecruzamiento de molécula pequeña. Los agentes de entrecruzamiento de molécula pequeña adecuados incluyen agentes de entrecruzamiento de imidoésteres (por ejemplo, adipimidato de dimetilo, pimelimidato de dimetilo, suberimidato de dimetilo, 3,3'-ditiobispropionimidato de dimetilo, y similares), agentes de entrecruzamiento de éster de NHS (por ejemplo, suberato de bis(sulfosuccinimidilo), glutarato de disuccinimidilo, propionato de ditiobis(succinimidilo), suberato de disuccinimidilo, tartrato de disuccinimidilo, y otros), o un aldehído fijador (por ejemplo, formaldehído, paraformaldehído, glutaraldehído y similares). En otras realizaciones, las proteínas de la pared celular pueden entrecruzarse mediante análogos de aminoácidos fotoreactivos, tales como análogos de diazirina. En una realización, las proteínas de la pared celular pueden entrecruzarse o fijarse por contacto con un fijador de aldehído. Un fijador de aldehído preferido es el formaldehído.

La célula bacteriana se elimina mediante tratamiento con calor. Los expertos en la materia están familiarizados con diversos tratamientos térmicos que se utilizaron para inactivar o destruir la célula bacteriana. Como ejemplo, la celda bacteriana se puede calentar a una temperatura de aproximadamente 75-80 °C durante aproximadamente cinco minutos.

(b) Entrecruzamientos de ácidos nucleicos

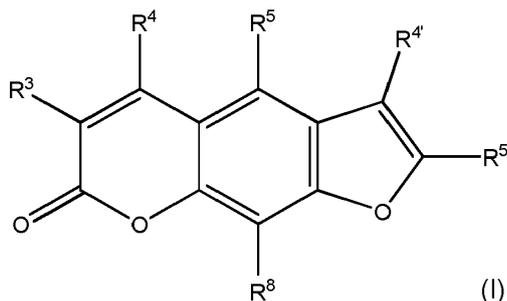
El ácido nucleico que se entrecruza en la célula bacteriana destruida por calor puede ser ADN, ARN o combinaciones de los mismos. El ADN puede ser cromosómico o extracromosómico. El ARN puede ser ARN mensajero (ARNm), microARN (miARN), ARN no codificante (ARNnc) u otro ARN pequeño. El ácido nucleico puede ser de doble cadena, tal como, por ejemplo, un híbrido ADN-ADN, híbrido ADN-ARN, híbrido ARNm/miARN, y así sucesivamente. El ácido nucleico puede ser monocatenario y puede comprender una estructura secundaria (es decir, horquillas, tallos, bucles y similares). En general, los entrecruzamientos de ácidos nucleicos son entrecruzamientos intercatenarios de modo que las dos cadenas pueden no separarse o desnaturalizarse. Dicho de otra manera, el ácido nucleico entrecruzado no experimenta separación de cadenas. En una realización preferida, el

ácido nucleico entrecruzado puede comprender entrecruzamientos intercatenarios de ADN cromosómico.

Como se ha indicado anteriormente, cada entrecruzamiento de ácido nucleico comprende una molécula de furocumarina unida covalentemente. Las furocumarinas son compuestos que se activan por la luz ultravioleta para formar aductos covalentes con pirimidinas. El aducto covalente puede ser un monoadducto (es decir, un aducto intramolecular) o un diadducto (es decir, un aducto intermolecular). Por lo tanto, los entrecruzamientos de ácido nucleico en la célula se forman por contacto con una furocumarina y luz ultravioleta.

(c) Furocumarinas

En una realización, la furocumarina puede ser un compuesto que comprende la Fórmula (I) o un isómero de la misma:



en la que:

R^3 , R^4 , R^5 , R^4 , R^5 y R^8 eligen independientemente de entre hidrógeno, amino, halógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alquiloxi sustituido, alcoxialquilo, alcoxialquilo sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, haloalquilo, haloalquilo sustituido, hidroxialquilo, hidroxialquilo sustituido, alquenoilo, alquenoilo sustituido, arilo y arilo sustituido.

En una iteración, cada uno de R^3 y R^5 puede ser hidrógeno, cada uno de R^4 , R^5 y R^8 puede ser metilo y R^4 puede ser alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alquiloxi sustituido, alcoxialquilo, alcoxialquilo sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, haloalquilo, haloalquilo sustituido, hidroxialquilo o hidroxialquilo sustituido. En aún otra repetición, cada uno de R^3 y R^5 puede ser hidrógeno, cada uno de R^4 , R^5 y R^8 puede ser metilo y R^4 puede ser aminometilo, de modo que el compuesto de furocumarina puede ser 4'-aminometil trioxsalen.

(II) Procedimientos para preparar células que comprenden entrecruzamientos de ácido nucleico

Otro aspecto de la divulgación abarca procedimientos para preparar las células de la invención, que se han detallado anteriormente en la sección (I). En general, el procedimiento comprende poner en contacto una célula bacteriana aislada, no viable con (a) un compuesto de furocumarina y (b) una fuente de luz ultravioleta (UV).

(a) Contacto con un compuesto de furocumarina

La primera etapa del procedimiento comprende poner en contacto células bacterianas aisladas con un compuesto de furocumarina para formar células que contienen furocumarina. Las células bacterianas adecuadas se han detallado anteriormente en la sección (I)(a). Las células bacterianas pueden ser vivas o no vivas (es decir, muertas) en el momento del contacto con el compuesto de furocumarina. Típicamente, las células bacterianas comprenden además proteínas de pared celular entrecruzadas, como se ha detallado anteriormente en la sección (I) (a). Las células son células de *Staphylococcus* positivas para la proteína A, de *Streptococcus* positivas para la proteína G y, de *Peptostreptococcus* positivas para la proteína L. En una realización de ejemplo, las células bacterianas pueden ser células de la cepa de Cowan 1 de *Staphylococcus aureus*. Además, las células de la cepa de Cowan 1 de *Staphylococcus* pueden estar fijadas con formaldehído, tratadas térmicamente.

Típicamente, las células bacterianas vivas se suspenden en un medio de cultivo adecuado y las células bacterianas no vivas se resuspenden en un tampón de reacción adecuado. Los ejemplos no limitantes de tampones de reacción adecuados incluyen Tris, fosfato y soluciones salinas tamponadas con fosfato. tampón puede comprender además un quelante, tal como EDTA. La densidad de las células bacterianas en el tampón o medio de cultivo puede variar y variará. Típicamente, la densidad celular puede variar de aproximadamente 0,01 g/ml a aproximadamente 0,05 g/ml, de aproximadamente 0,05 g/ml a aproximadamente 0,25 g/ml, o de aproximadamente 0,25 g/ml a aproximadamente 1 g/ml. En realizaciones preferidas, la densidad celular puede variar de aproximadamente 0,1 g/ml a aproximadamente 0,3 g/ml. En una realización de ejemplo, la densidad celular puede ser de aproximadamente 0,2 g/ml.

Los compuestos de furocumarina adecuados se han detallado anteriormente en la sección (I) (c). La cantidad de compuesto de furocumarina que se contacta con las células bacterianas puede variar y variará. En general, la

concentración final del compuesto de furocumarina puede variar de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml. En diversas realizaciones, la concentración final de la furocumarina puede variar de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 0,05 mg/ml, de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 0,25 mg/ml, de aproximadamente 0,25 mg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, o de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml. En realizaciones preferidas, la concentración final de furocumarina puede variar de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 0,7 mg/ml. En una realización de ejemplo, la concentración final de furocumarina puede ser de aproximadamente 0,5 mg/ml.

El período de tiempo en que las células bacterianas se ponen en contacto con el compuesto de furocumarina para formar las células que contienen furocumarina puede variar. Típicamente, la duración del contacto entre la célula bacteriana y el compuesto de furocumarina puede variar de aproximadamente 1 minuto a 2 horas. Sin embargo, el contacto con el compuesto de furocumarina puede continuar durante más de 2 horas sin afectar el alcance de la invención. En ciertas realizaciones, la duración del contacto puede variar de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 minutos, de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 30 minutos, o de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas. En realizaciones preferidas, la duración del contacto entre la célula bacteriana y el compuesto de furocumarina puede variar de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 30 minutos. En una realización de ejemplo, la duración del contacto puede ser de aproximadamente 15 minutos.

El contacto con el compuesto de furocumarina puede producirse a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 40 °C. En diversas realizaciones, la temperatura puede variar de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 10 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, o de 30 °C a aproximadamente 40 °C. En realizaciones preferidas, la temperatura puede variar de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C. En una realización de ejemplo, el contacto con el compuesto de furocumarina puede producirse a aproximadamente temperatura ambiente (es decir, aproximadamente 23 °C a aproximadamente 25 °C).

El contacto entre las células bacterianas y el compuesto de furocumarina generalmente se produce con agitación. La agitación puede ser rotación orbital, rotación de balanceo, rotación de agitación, rotación rodante, rotación de extremo a extremo, agitación vorticial y otros medios que son bien conocidos en la técnica. Adicionalmente, el contacto entre la célula bacteriana y el compuesto de furocumarina puede producirse en la oscuridad (es decir, en ausencia de luz del día).

(b) Contacto con luz UV

El procedimiento comprende además poner en contacto las células que contienen furocumarina con una fuente de luz UV, de modo que el compuesto de furocumarina se active y se formen entrecruzamientos de ácido nucleico en las células. Los tipos de entrecruzamientos de ácidos nucleicos se han descrito anteriormente en la sección (I) (b).

La longitud de onda de la luz UV que se usa en el procedimiento de la invención puede variar. En general, la longitud de onda de la luz UV puede oscilar de entre aproximadamente 200 nm y aproximadamente 400 nm. En una realización, la luz UV puede ser luz UV media (MUV) y varía desde aproximadamente 200 nm hasta aproximadamente 300 nm. En otra realización, la luz UV puede ser luz UV cercana (MUV) y varía desde aproximadamente 300 nm hasta aproximadamente 400 nm. En realizaciones preferidas, la luz UV puede ser luz UV de onda larga (UVA) y varía desde aproximadamente 315 nm hasta aproximadamente 400 nm. En diversas realizaciones, la longitud de onda de la luz UV puede ser de aproximadamente 300 nm, aproximadamente 302 nm, aproximadamente 312 nm, o aproximadamente 365 nm. En una realización de ejemplo, la longitud de onda de la luz UV puede ser de aproximadamente 365 nm.

La dosis de luz UV que se pone en contacto con las células bacterianas puede variar y variará. En general, la dosis de luz ultravioleta puede oscilar entre aproximadamente 1 J/cm² a aproximadamente 10 J/cm². En ciertas realizaciones, la dosis de luz UV que se pone en contacto con las células bacterianas puede variar de entre aproximadamente 1-2 J/cm², 2-3 J/cm², 3-4 J/cm², 4-5 J/cm², 5-6 J/cm², 6-7 J/cm², 7-8 J/cm², 8-9 J/cm², o 9-10 J/cm². En realizaciones preferidas, la dosis de luz ultravioleta puede oscilar entre aproximadamente 2 J/cm² a aproximadamente 6 J/cm². En una realización de ejemplo, la dosis de luz UV que se pone en contacto con las células bacterianas puede ser de aproximadamente 4,6 J/cm².

La intensidad de la luz ultravioleta también puede variar. En general, la intensidad de la luz UV puede variar desde 0.5 mW/cm² a aproximadamente 5 mW/cm². En algunas realizaciones, la intensidad de la luz UV puede variar desde aproximadamente 0,5 mW/cm² a aproximadamente 1 mW/cm², desde aproximadamente 1 mW/cm² a aproximadamente 2 mW/cm², o desde aproximadamente 2 mW/cm² a aproximadamente 5 mW/cm². Preferentemente, la intensidad de la luz UV puede variar de aproximadamente 1 mW/cm² a aproximadamente 3 mW/cm². En una realización de ejemplo, la intensidad de la luz UV puede ser de aproximadamente 1,7 mW/cm².

La luz ultravioleta puede proceder de diversas fuentes. Las fuentes no limitantes de luz UV incluyen transiluminadores UV, aparatos de reticulación UV, lámparas UV, diodos láser UV, láseres de estado sólido UV, LED de UV, y así sucesivamente. En una realización de ejemplo, la fuente de luz UV puede ser un transiluminador UV.

El período de tiempo en que las células que contienen furocumarina se ponen en contacto con la luz ultravioleta puede variar. En general, la duración del contacto con la luz UV puede oscilar de entre aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 3 horas. En ciertas realizaciones, la célula que contiene furocumarina se puede poner en contacto con luz UV durante aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 120 minutos, o aproximadamente 180 minutos. En realizaciones preferidas, la duración del contacto puede variar de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 60 minutos. En una realización de ejemplo, las células que contienen furocumarina pueden ponerse en contacto con luz UV durante 45 minutos.

El contacto entre las células que contienen furocumarina y la luz UV puede producirse a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 30 °C. En diversas realizaciones, la temperatura puede variar de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 10 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 20 °C, o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C. En una realización preferida, el contacto con la luz UV puede producirse a una temperatura que varía de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 10 °C. En una realización de ejemplo, el contacto con la luz UV puede producirse a aproximadamente 4 °C.

Típicamente, las células que contienen furocumarina se dispersan como una capa fina en un recipiente adecuado de manera que se optimiza la exposición a la luz UV. La cantidad de suspensión celular por área de exposición puede variar y variará. En general, la cantidad de suspensión celular por unidad de área puede variar desde aproximadamente 0,01 ml/cm² a aproximadamente 0.5 ml/cm². En diversas realizaciones, la cantidad de suspensión celular por unidad de área puede variar de aproximadamente 0,01 ml/cm² a aproximadamente 0,05 ml/cm², de aproximadamente 0,05 ml/cm² a aproximadamente 0,2 ml/cm², o de aproximadamente 0,2 ml/cm² a aproximadamente 0,5 ml/cm². En realizaciones preferidas, la cantidad de suspensión celular por unidad de área puede variar desde aproximadamente 0,05 ml/cm² a aproximadamente 0,2 ml/cm². En una realización de ejemplo, la cantidad de suspensión celular por unidad de área puede ser de aproximadamente 0,1 ml/cm².

Además, las células pueden agitarse durante el contacto con la luz UV. La agitación puede ser rotación orbital, rotación de balanceo, rotación de agitación u otro movimiento adecuado.

(c) Pretratamiento de las células antes del contacto con el compuesto de furocumarina

Antes del contacto con el compuesto de furocumarina (véase la sección (II) (a), anteriormente), las células bacterianas pueden ponerse en contacto con un agente tensioactivo y un agente reductor.

Los ejemplos no limitantes de tensioactivos adecuados incluyen sulfatos de alquilo (tales como dodecilsulfato de sodio, laurilsulfato de amonio y similares); sulfatos de alquiléter (tales como laureth sulfato de sodio, miterthisulfato de sodio, y otros); sulfonatos de alquilo; sulfonatos de alquilarilo; alquilariléter fosfatos; sililéter fosfatos; carboxilatos de sililo; y fluorotensioactivos de carboxilato. En una realización de ejemplo, el tensioactivo puede ser dodecilsulfato de sodio.

La concentración del tensioactivo puede variar y variará. Típicamente, la concentración del tensioactivo puede variar de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 %. En diversas realizaciones, la concentración del tensioactivo puede ser de aproximadamente 11 %, 1.5 %, 2 %, 2.5 %, 3 %, 3.5 %, 4 %, 4.5 %, 5 %, 5.5 %, 6 %, 6.5 %, 7 %, 7.5 %, 8 %, 8.5 %, 9 %, 9.5 % o 10 %. En una realización de ejemplo, concentración del tensioactivo puede ser de aproximadamente 3%.

Los agentes reductores adecuados incluyen, sin límite, beta-mercaptoetanol y ditiotreitól. En una realización de ejemplo, el agente reductor puede ser beta-mercaptoetanol.

La concentración del agente reductor puede variar. En general, la concentración del agente reductor puede variar de aproximadamente 1 % a aproximadamente 30 %. En cierta realización, la concentración del tensioactivo puede ser de aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 18 %, 20 %, 22 %, 24 %, 26 %, 28 % o 30 %. En una realización de ejemplo, concentración del agente reductor puede ser aproximadamente 10 %.

El contacto con el tensioactivo y el agente reductor puede realizarse a una temperatura que oscila entre aproximadamente 80 °C y aproximadamente 120 °C. En algunas realizaciones, la temperatura de la etapa de contacto puede ser de aproximadamente 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C, 100 °C, 105 °C, 110 °C, 115 °C o 120 °C. En una realización a modo de ejemplo, el contacto con el tensioactivo y el agente reductor se puede llevar a cabo a aproximadamente 100 °C.

El período de tiempo en que las células se ponen en contacto con el tensioactivo y el agente reductor puede variar y variará. En general, la duración del tiempo puede variar de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 3 horas. En ciertas realizaciones, el contacto con el tensioactivo y el agente reductor puede continuar durante aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 90 minutos, aproximadamente 120 minutos, o aproximadamente 180 minutos. En realizaciones

preferidas, la duración del contacto puede variar de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 60 minutos. En una realización de ejemplo, el contacto con el tensioactivo y el agente reductor puede continuar durante aproximadamente 30 minutos.

(d) Postratamiento

5 Después del contacto con la luz UV (como se detalla en la sección (II) (b) anterior), las células que comprenden los entrecruzamientos de ácido nucleico pueden lavarse con un tampón adecuado (véanse los tampones enumerados en la sección (II) (a) anterior). Es decir, las células se pueden sedimentar por centrifugación, se puede eliminar la solución de sobrenadante, las células se resuspenden en un tampón de lavado adecuado y el ciclo se repite varias veces. La resuspensión final de las células se puede dividir en alícuotas en volúmenes más pequeños y se pueden usar frescas o congeladas rápidamente en nitrógeno líquido antes del almacenamiento a largo plazo a -70 °C. Las células pueden liofilizarse para un almacenamiento a largo plazo a temperatura ambiente. Un protocolo de liofilización adecuado se detalla en los Ejemplos. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden usar otros procedimientos de liofilización.

(III) Kit para inmunoprecipitación de cromatina

15 Otro aspecto de la divulgación proporciona kits de inmunoprecipitación de cromatina que comprenden las células de la invención, que son células bacterianas no viables que comprenden una pluralidad de entrecruzamientos de ácidos nucleicos y una pluralidad de entrecruzamientos de proteínas de la pared celular. Por lo tanto, las células pueden unirse a los anticuerpos de los complejos de ADN-proteína-anticuerpo y aislar los complejos de ADN-proteína de las mezclas celulares. Ventajosamente, debido a que las células de la invención comprenden entrecruzamientos de ácidos nucleicos, los ácidos nucleicos derivados de las células de la invención son incapaces de experimentar separación de cadenas y, por consiguiente, no pueden participar en reacciones de amplificación de ácidos nucleicos enzimáticas basadas en separación de cadenas, tales como por ejemplo, reacciones de PCR y reacciones de secuenciación de AND. De acuerdo con esto, los ácidos nucleicos derivados de las células bacterianas de la invención que están asociados con los complejos aislados de ADN-proteína no interferirán con el análisis del ADN en los complejos aislados de ADN-proteína.

El kit de la invención, por lo tanto, comprende al menos un recipiente que contiene una parte alícuota de las células bacterianas de la invención. El kit puede incluir uno o más reactivos adicionales útiles para procedimientos de inmunoprecipitación de la cromatina. Los reactivos adecuados pueden incluir, sin límite, tampones de resuspensión celular, tampones de dilución, tampones de unión, tampones de lavado, tampones de elución, soluciones salinas e inhibidores de proteasa. Los tampones adecuados son bien conocidos en la técnica. El kit generalmente también incluye instrucciones para practicar la inmunoprecipitación de cromatina usando las células de la invención.

(IV) Procedimientos para aislar complejos de ADN-proteína

Un aspecto adicional de la divulgación abarca procedimientos para aislar complejos de ADN-proteína usando las células bacterianas de la invención, en el que los complejos aislados de ADN-proteína están sustancialmente desprovistos de ácidos nucleicos derivados de células bacterianas que son detectables mediante un procedimiento que requiere separación de cadenas. El procedimiento comprende poner en contacto una pluralidad de complejos de ADN-proteína-anticuerpo con las células de la invención, en el que las células se unen a los anticuerpos de los complejos de ADN-proteína-anticuerpo para formar una pluralidad de complejos de ADN-proteína-anticuerpo unidos a células bacterianas. El procedimiento comprende además poner en contacto los complejos ADN-proteína-anticuerpo unidos a células bacterianas con un tampón de elución para formar la pluralidad de complejos de ADN-proteína aislados que están sustancialmente desprovistos de ácidos nucleicos derivados de las células bacterianas que son detectables mediante una técnica que requiere separación de cadenas. Enunciado de forma simple, sustancialmente todos los ácidos nucleicos derivados de células bacterianas asociados con los complejos de ADN-proteína aislados son incapaces de someterse a separación de cadenas debido a los entrecruzamientos de ácido nucleico y, en consecuencia, no pueden detectarse mediante un procedimiento que requiera separación de cadenas.

Los expertos en la técnica están familiarizados con las técnicas para formar los complejos ADN-proteína-anticuerpo. El contacto entre las células bacterianas de la invención y los complejos de ADN-proteína-anticuerpo para formar los complejos de ADN-proteína-anticuerpo unidos a células bacterianas se realiza típicamente en presencia de un tampón de unión. Los tampones de unión adecuados son bien conocidos en la técnica. El procedimiento puede comprender además una serie de etapas de lavado, durante las cuales los materiales no unidos se eliminan de las células bacterianas. Los tampones de lavado y los protocolos de lavado adecuados son bien conocidos en la técnica. La etapa final del procedimiento comprende poner en contacto los complejos de ADN-proteína-anticuerpo unidos a células bacterianas con un tampón de elución para formar los complejos aislados de ADN-proteína. De nuevo, los ejemplos de tampones de elución adecuados son bien conocidos en la técnica.

55 Típicamente, los complejos de ADN-proteína aislados se tratan con calor para invertir los entrecruzamientos de ADN-proteína de manera que el ADN se aísla y puede analizarse. Diversas técnicas son adecuadas para analizar el ADN aislado. En realizaciones preferidas, el ADN aislado puede analizarse mediante técnicas de secuenciación de ADN masivamente paralelas utilizando un secuenciador de genoma. Los ejemplos no limitantes de técnicas de

secuenciación adecuadas incluyen técnicas de secuenciación por síntesis (por ejemplo, secuenciación de Solexa, Illumina, Inc); secuenciación por ligamiento (por ejemplo, SOLiDT™, secuenciación por ligamiento y detección de oligonucleótidos, Applied Biosystems, Inc.); 454 pirosecuenciación; secuenciación por detección de protones de Ion Torrent, secuenciación de marcadores de extremo emparejado (PET), procedimientos de amplificación de clúster y procedimientos de amplificación de puentes. El ADN aislado también se puede analizar mediante procedimientos basados en PCR, procedimientos basados en hibridación o procedimientos basados en micromatrices. Como se ha detallado anteriormente, sustancialmente todos los ácidos nucleicos derivados de células bacterianas asociados con los complejos de ADN-proteína aislados comprenden entrecruzamientos intercatenarios de ácidos nucleicos y no interferirán con el análisis del ADN aislado de los complejos de ADN-proteína.

10 **Definiciones**

Para facilitar la comprensión de la invención, a continuación se definen los términos siguientes.

El término "acilo", como se usa en el presente documento solo o como parte de otro grupo, indica el resto formado mediante la eliminación del grupo hidroxilo del grupo COOH de un ácido carboxílico orgánico, por ejemplo RC(O)-, n el que R es R¹, R¹O-, R¹R²N-, o R¹S-, R¹ es hidrocarbilo, hidrocarbilo heterosustituido o heterociclo, y R² es hidrógeno, hidrocarbilo o hidrocarbilo sustituido.

El término "aciloxi", como se usa en el presente documento solo o como parte de otro grupo, indica un grupo acilo como se ha descrito anteriormente unido a través de un enlace de oxígeno (O), por ejemplo RC(O)O-, en el que R es como se define en relación con el término "acilo".

El término "alquilo" como se usa en el presente documento describe grupos que son, preferentemente, alquilo inferior que contiene de uno a ocho átomos de carbono en la cadena principal y hasta 20 átomos de carbono. Pueden ser de cadena lineal o ramificada o cíclico e incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, hexilo y similares.

El término "alqueno" como se usa en el presente documento describe grupos que son, preferentemente, alqueno inferior que contiene de dos a ocho átomos de carbono en la cadena principal y hasta 20 átomos de carbono. Pueden ser de cadena lineal o ramificada o cíclico e incluyen etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, isobutenilo, hexenilo y similares. El término "alquino" como se usa en el presente documento describe grupos que son, preferentemente, alquino inferior que contiene de dos a ocho átomos de carbono en la cadena principal y hasta 20 átomos de carbono. Pueden ser de cadena lineal o ramificada e incluyen etinilo, propinilo, butinilo, isobutinilo, hexinilo y similares.

El término "aromático" como se usa en el presente documento, solo o como parte de otro grupo, indica un anillo o sistema de anillo plano conjugado homocíclico o heterocíclico opcionalmente constituido que comprende electrones deslocalizados. Estos grupos aromáticos son, preferentemente, grupos monocíclicos (por ejemplo, furano o benceno), bicíclicos o tricíclicos que contienen de 5 a 14 átomos en la porción de anillo. El término "aromático" abarca los grupos "arilo" definidos a continuación.

Los términos "arilo" o "Ar" como se usan en el presente documento, solos o como parte de otro grupo, indican grupos aromáticos homocíclicos opcionalmente sustituidos, preferentemente grupos monocíclicos o bicíclicos que contienen de 6 a 10 átomos de carbono en la porción del anillo, tales como fenilo, bifenilo, naftilo, fenilo sustituido, bifenilo sustituido o naftilo sustituido.

Los términos "carbociclo" o "carbocíclico", tal como se usan en el presente documento, solos o como parte de otro grupo indican un anillo o sistema de anillo homocíclico opcionalmente sustituido, aromático o no aromático en el que todos los átomos en el anillo son carbono, con, preferentemente, 5 o 6 átomos de carbono en cada anillo. Las sustituyentes de ejemplo incluyen uno o más de los grupos siguientes: hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, alquilo, alcoxi, acilo, aciloxi, alqueno, alquenoxi, arilo, ariloxi, amino, amido, acetal, carbamilo, carbociclo, ciano, éster, éter, halógeno, heterociclo, hidroxilo, ceto, cetil, fosfo, nitro y tio.

Como se usa en el presente documento, el término "entrecruzamiento" se refiere a un enlace que une un polímero biológico con otro polímero biológico. Los polímeros biológicos pueden ser ácidos nucleicos, proteínas o combinaciones de los mismos. El enlace puede ser covalente o no covalente. En consecuencia, tanto los entrecruzamientos covalentes como no covalentes pueden ser reversibles.

Los términos "halógeno" o "halo", como se usa en el presente documento solo o como parte de otro grupo, hacen referencia a cloro, bromo, flúor y yodo.

El término "heteroátomo" se refiere a átomos distintos de carbono e hidrógeno.

El término "heteroaromático", como se usa en el presente documento solo o como parte de otro grupo indica grupos aromáticos opcionalmente sustituidos que tiene al menos un heteroátomo en al menos un anillo y, preferentemente, 5 o 6 átomos en cada anillo. El grupo heteroaromático tiene, preferentemente, 1 o 2 átomos de oxígeno y/o de 1 a 4 átomos de nitrógeno en el anillo y está unido al resto de la molécula a través de un carbono. Los grupos de ejemplo

5 incluyen furilo, benzofurilo, oxazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, benzoxazolilo, benzoxadiazolilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, triazolilo, tetrazolilo, piridilo, pirimidilo, pirazinilo, piridazinilo, indolilo, isoindolilo, indolizino, bencimidazolilo, indazolilo, benzotriazolilo, tetrazolopiridazinilo, carbazolilo, purinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, imidazopiridilo y similares. Las sustituyentes de ejemplo incluyen uno o más de los grupos siguientes: hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, alquilo, alcoxi, acilo, aciloxi, alquenilo, alquenoxi, arilo, ariloxi, amino, amido, acetal, carbamilo, carbociclo, ciano, éster, éter, halógeno, heterociclo, hidroxilo, ceto, cetal, fosfo, nitro y tio.

10 Los términos "heterociclo" o "heterocíclico" como se usa en el presente documento solo o como parte de otro grupo, indican grupos aromáticos o no aromáticos, monocíclicos o bicíclicos, completamente saturados o insaturados opcionalmente sustituidos que tienen al menos un heteroátomo en al menos un anillo y, preferentemente, 5 o 6 átomos en cada anillo. El grupo heterociclo tiene, preferentemente, 1 o 2 átomos de oxígeno y/o de 1 a 4 átomos de nitrógeno en el anillo y está unido al resto de la molécula a través de un carbono o heteroátomo. Los grupos heterociclo de ejemplo incluyen heteroaromáticos como se ha descrito anteriormente. Las sustituyentes de ejemplo incluyen uno o más de los grupos siguientes: hidrocarbilo, hidrocarbilo sustituido, alquilo, alcoxi, acilo, aciloxi, alquenilo, alquenoxi, arilo, ariloxi, amino, amido, acetal, carbamilo, carbociclo, ciano, éster, éter, halógeno, heterociclo, hidroxilo, ceto, cetal, fosfo, nitro y tio.

15 Los términos "hidrocarburo" e "hidrocarbilo" como se usan en el presente documento describen compuestos orgánicos o radicales que consisten exclusivamente en los elementos carbono e hidrógeno. Estos restos incluyen restos alquilo, alquenilo, alquinilo y arilo. Estos restos también incluyen restos alquilo, alquenilo, alquinilo y arilo sustituidos con otros grupos hidrocarburo alifático o cíclicos, tales como alcarilo, alquenarilo y alquinarilo. A menos que se indique lo contrario, estos restos comprenden, preferentemente, de 1 a 20 átomos de carbono.

20 Los restos "hidrocarbilo sustituidos" descritos en el presente documento son restos de hidrocarbilo que están sustituidos con al menos un átomo distinto de carbono, incluyendo restos en los que un átomo de carbono de la cadena está sustituido con un heteroátomo tal como nitrógeno, oxígeno, silicio, fósforo, boro, o un átomo de halógeno, y restos en los que el átomo de carbono comprende sustituyentes adicionales. alquilo, alcoxi, acilo, aciloxi, alquenilo, alquenoxi, arilo, ariloxi, amino, amido, acetal, carbamilo, carbociclo, ciano, éster, éter, halógeno, heterociclo, hidroxilo, ceto, cetal, fosfo, nitro y tio.

25 Al introducir elementos de la presente invención o la o las realizaciones preferidas de los mismos, se entiende que los artículos "un", "uno/a", "el/la" y "dicho/a" significan que hay uno o más de los elementos. Con los términos "que comprende", "que incluye" y "que tiene" se pretende que sean inclusivos y que signifiquen que puede haber elementos adicionales distintos de los elementos enumerados.

Habiendo descrito la invención con detalle, será evidente que son posibles modificaciones y variaciones sin apartarse del alcance de la invención definida en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

35 Los ejemplos siguientes se han incluido para demostrar las formas de realización preferidas de la invención. Los expertos en la técnica apreciarán que las técnicas divulgadas en los ejemplos representan técnicas descubiertas por los inventores que funcionan bien en la práctica de la invención. Sin embargo, a la luz de la presente divulgación, los expertos en la materia apreciarán que se pueden hacer muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y aún obtener un resultado similar o parecido sin apartarse del alcance de la invención, por lo tanto, toda la materia presentada debe interpretarse como ilustrativa y no en un sentido limitante.

40 Ejemplo 1: Tratamiento con aminometiltrioxaleno de células de *Staphylococcus aureus*

45 El siguiente ejemplo detalla el entrecruzamiento del ADN cromosómico de las células de *Staphylococcus aureus* que contienen proteína A (Staph A) tratadas térmicamente y fijadas con formaldehído mediante contacto con 4'-aminometil trioxsalen (AMT) y luz UVA. El material de partida fue dos botellas de 10 g de células Staph A. Cada sedimento blanco de Staph A (sedimentado en el fondo del frasco suministrado) se resuspendió en 50 ml de tampón de diálisis (EDTA 2 mM, Trizma-HCl 50 mM, pH 8) pipeteando repetidamente con una pipeta de 25 ml. Cada suspensión de Staph A se transfirió a un tubo de centrifugación cónico de plástico de 50 ml y se centrifugó a 5645 x g durante 5 minutos a 4 °C (por ejemplo, con un rotor de ángulo fijo JA25.5 en una centrífuga Beckman J2-HS a 6000 rpm).

50 Los sobrenadantes se eliminaron y cada sedimento celular se resuspendió en 20 ml de tampón de diálisis usando una varilla de vidrio y pipeteando repetidamente con una pipeta de 25 ml. A continuación, el volumen en cada tubo se llevó a 40 ml con tampón de diálisis y las células se centrifugaron a 5645 x g durante 5 minutos a 4 °C (como se ha indicado anteriormente).

55 Los sobrenadantes se eliminaron y cada sedimento de Staph A se resuspendió en 15 ml (x2) de tampón de ebullición (1X PBS, 3 % de SDS y 10 % de β-mercaptoetanol en una campana extractora. Los sedimentos se resuspendieron usando una varilla de vidrio, seguida de repetición del pipeteado. Cada suspensión de células Staph A se transfirió a un tubo cónico nuevo de 50 ml.

Los dos tubos cónicos (con tapas ligeramente sueltas) se sumergieron en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos. El baño de agua hirviendo se dispuso en un vaso de precipitados de vidrio de 500 ml con 300 ml de agua desionizada, 10-15 perlas de vidrio y un agitador magnético en agitación caliente. Durante la etapa de ebullición de 30 minutos, cada tubo de células se agitó manualmente cinco veces cada 10 minutos. Los tubos permanecieron sumergidos en agua hirviendo durante la etapa de ebullición.

Después de 30 minutos, los tubos se retiraron del agua hirviendo y se dejaron enfriar. Cada suspensión se transfirió a un tubo cónico nuevo de 50 ml y se centrifugó a 5645 x g (véase anteriormente) durante 5 minutos a temperatura ambiente (~25 °C).

Cada sobrenadante se eliminó (en el receptáculo de desechos químicos en una campana extractora) y cada sedimento celular se lavó con 40 ml de tampón de diálisis. Primero, cada sedimento se resuspendió en 20 ml de tampón de diálisis utilizando una varilla de vidrio y se pipeteó repetidamente con una pipeta de 25 ml hasta que los grumos ya no eran visibles y el volumen en cada tubo se completó hasta 40 ml con tampón de diálisis. Los tubos se centrifugaron a 5645 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se desecharon los sobrenadantes. Cada sedimento celular se lavó con otros 40 ml de tampón de diálisis como se ha detallado anteriormente.

Cada sedimento de Staph A llevado a ebullición se resuspendió en 20 ml de tampón de diálisis que contenía 0,5 mg/ml de 4'-aminometiltrióxaleno (AMT) usando una varilla de vidrio limpia. Cada suspensión se pipeteó repetidamente usando una pipeta de 10 ml hasta que no se observaron grumos celulares. Las dos resuspensiones se juntaron en un tubo, que se cubrió con una tapa hermética y se cubrió con papel de aluminio. El tubo se rotó de extremo a extremo durante 15 minutos a temperatura ambiente para formar células Staph A unidas a AMT.

La suspensión celular Staph A unida a AMT (aproximadamente 50 ml) se transfirió a una placa Nunc preempanada de 245 mm x 245 mm, que se encontraba sobre hielo en una bandeja. La bandeja que contiene la placa de células se colocó en un oscilador de perfil bajo dentro del reticulador de UVA (UltraLum CEX-1500, UltraLum Inc., Claremont, CA). La placa de las células se balanceó a la velocidad más lenta posible y se tuvo cuidado de asegurar que la suspensión celular se mezclara completamente sin que rebosara del borde de la placa. Se retiró la tapa de la placa y las células se expusieron a luz UVA (365 nm, 4,6 J/cm² y 1,7 mW/cm²) durante 45 minutos mientras se balanceaba de forma continua.

La suspensión celular se transfirió a tubos cónicos de 50 ml, se centrifugó como se ha indicado anteriormente y se lavó dos veces con 40 ml de tampón de diálisis. Cada sedimento celular se resuspendió en 40 ml de tampón de diálisis como se ha detallado anteriormente. Se tuvo cuidado de asegurar que las células se resuspendieran de forma uniforme sin ningún grumo visible de células. Se transfirieron alícuotas (0,2 ml) de las células a crioviales con tapa de rosca de 1,8 ml (las tapas se mantuvieron ligeramente sueltas para permitir el intercambio de gases durante la liofilización) y las células se congelaron rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido. Los viales se colocaron en un liofilizador fijado a -35 °C y los tubos se dejaron equilibrar a -35 °C durante 15 minutos. La temperatura se elevó de -35 °C a 0 °C durante 90 minutos. La temperatura se mantuvo a 0 °C durante 12 horas. La temperatura se elevó a 25 °C durante 15 minutos y se mantuvo durante 1 hora. Los tubos se retiraron, se taparon herméticamente y se almacenaron a temperatura ambiente. Las células Staph A tratadas con AMT se llaman células "Staph-Seq".

Ejemplo 2: Reducción de ADN de *Staphylococcus* amplificable en fracciones eluidas de CHIP

Las células Staph-Seq preparadas en el Ejemplo 1 se usaron para aislar complejos de ADN-proteína usando procedimientos estándar (es decir, ChIP). Las células Staph A no tratadas (control) también se usaron para aislar complejos de ADN-proteína. La cantidad de ADN de *Staphylococcus* contaminante amplificable en cada preparación se estimó mediante PCRc usando cebadores específicos de las secuencias de codificación de ARN de *Staphylococcus*. Los resultados se presentan a continuación en la TABLA 1.

TABLE 1. ADN contaminante en complejos CHIP preparados con células no tratadas y tratadas con AMT

Muestra	Ct	ΔCt	Cantidad de reducción
Staph A (control)	21,3	0	1
Staph-Seq (tratadas con AMT)	35	-13,7	13,308

La cantidad de ADN de *Staphylococcus* contaminante se redujo más de 13,000 veces (también véase la Figura 1), lo que indica que el ADN cromosómico amplificable de *Staphylococcus* en las células tratadas con AMT se redujo sustancialmente.

Ejemplo 3: CHIP-Seq mejorado utilizando células Staph-Seq para ChIP

Se realizaron ensayos de ChIP usando aproximadamente 200 millones de células DU145 para aislar los sitios de unión a ADN de EZH2, que es un factor de transcripción poco frecuente y de baja abundancia. Los complejos de

5 ADN-EZH2 se inmunoprecipitaron usando un anticuerpo contra EZH2 y los complejos de ADN-EZH2-anticuerpo se aislaron usando células Staph A no tratadas o células Staph-Seq tratadas con AMT (preparadas como se detalla en el Ejemplo 1). GPR101 y SHH son dianas conocidas de EZH2 en las células DU145. Por el contrario, actina y GAPDH no son dianas de EZH2. La especificidad del ensayo ChIP se validó mediante PCRc usando cebadores específicos para las dianas y las no dianas conocidas. Como se muestra en la figura 2, ambos tipos de complejos aislados de células que comprenden las dianas de EZH2 conocidas y que carecen de las no dianas.

Ambas preparaciones se usaron para preparar bibliotecas, que luego se sometieron a la secuenciación de tipo Solexa. Como se muestra en la TABLA 2, el uso de células Staph-Seq dio una mejora del 23 % en la cantidad de secuencia útil (es decir, mapeable) generada en el experimento ChIP-Seq.

TABLA 2. Experimento ChIP-Seq de cromatina aislada con el uso de células no tratadas y tratadas con AMT

	Staph A (control)	Staph-Seq (tratadas con AMT)
Lecturas totales	45,368,364	34,942,887
Lecturas mapeadas (HG19)	29,878,289 (65.9%)	31,074,058 (88.9%)
Única	17,171,199	22,200,188

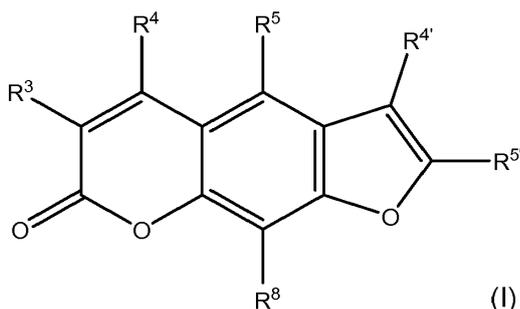
10

Este ejemplo demuestra que las células de *Staphylococcus* que comprenden ADN entrecruzado con AMT retienen su funcionalidad de inmunoprecipitación pero están sustancialmente desprovistas de ADN de *Staphylococcus* contaminante que puede detectarse mediante técnicas basadas en la separación de cadenas.

REIVINDICACIONES

1. Una célula bacteriana aislada para su uso en el aislamiento de complejos de ADN-proteína, estando la célula destruida con calor y comprendiendo una pluralidad de entrecruzamientos de ácidos nucleicos, en la que cada entrecruzamiento de ácido nucleico comprende una furocumarina unida covalentemente y en la que los complejos de AND-proteína aislados están sustancialmente desprovistos de ácidos nucleicos derivados de células bacterianas que son detectables mediante un procedimiento que requiere separación de cadenas, y en el que la célula bacteriana es una célula de *Staphylococcus* positiva para la proteína A, una célula de *Streptococcus* positiva para la proteína G o una célula de *Peptostreptococcus* positiva para la proteína L.

2. La célula bacteriana aislada de la reivindicación 1, en la que la furocumarina comprende la Fórmula (I) o un isómero de la misma:



en la que:

R^3 , R^4 , R^5 , R^4' , R^5' y R^8 eligen independientemente de entre hidrógeno, amino, halógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alquiloxi sustituido, alcoxialquilo, alcoxialquilo sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, haloalquilo, haloalquilo sustituido, hidroxialquilo, hidroxialquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, arilo y arilo sustituido.

3. La célula bacteriana aislada de la reivindicación 2, en la que R^3 y R^5 son hidrógeno; R^4 , R^5' y R^8 son metilo; y R^4' se elige de entre alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alcoxialquilo, alcoxialquilo sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, haloalquilo, haloalquilo sustituido, hidroxialquilo e hidroxialquilo sustituido.

4. La célula bacteriana aislada de cualquier reivindicación precedente, que comprende además una pluralidad de entrecruzamientos de proteínas de la pared celular.

5. La célula bacteriana aislada de cualquier reivindicación precedente, en la que la célula es una célula de la cepa Cowan 1 de *Staphylococcus aureus* y la furocumarina es 4'-aminometil trioxsalen.

6. Un procedimiento de preparación de una célula según la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento:

a) poner en contacto una célula bacteriana aislada, destruida con calor, con un compuesto de furocumarina para formar una célula que contiene furocumarina; y
b) poner en contacto la célula que contiene furocumarina con una fuente de luz ultravioleta para formar la célula que comprende la pluralidad de entrecruzamientos de ácido nucleico.

7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la etapa (a) transcurre durante un período de tiempo de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 horas a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 40 °C y la etapa (b) continúa durante un período de tiempo desde de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 3 horas a una temperatura de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 30 °C.

8. El procedimiento de la reivindicación 6 o 7, en el que la célula bacteriana comprende además una pluralidad de entrecruzamientos de proteínas de la pared celular.

9. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la célula bacteriana es una célula de la cepa de Cowan 1 de *Staphylococcus aureus*; la furocumarina es 4'-aminometil trioxsalen y se usa a una concentración final de aproximadamente 0,5 mg/ml; el contacto de la etapa (a) se realiza a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos, la luz ultravioleta tiene una longitud de onda de 365 nm, una energía de aproximadamente 4,6 J/cm², y una intensidad de aproximadamente 1,7 mW/cm²; y el contacto de la etapa (b) se realiza a aproximadamente 4 °C durante aproximadamente 45 minutos.

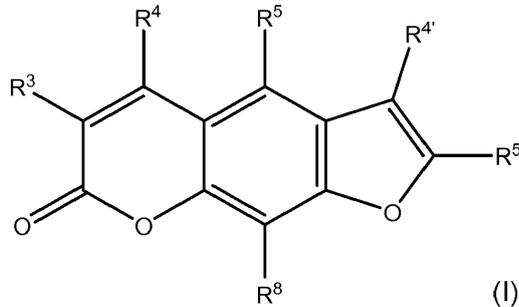
10. Un procedimiento para aislar una pluralidad de complejos de ADN-proteína, comprendiendo el procedimiento:

a) poner en contacto una pluralidad de complejos de ADN-proteína-anticuerpo con una pluralidad de células bacterianas según la reivindicación 4 de manera que la pluralidad de células bacterianas se une a los complejos ADN-proteína-anticuerpo para formar una pluralidad de complejos de AND-proteína-anticuerpo unidos a células

bacterianas; y

b) poner en contacto los complejos ADN-proteína-anticuerpo unidos a células bacterianas con un tampón de elución para aislar la pluralidad de complejos de ADN-proteína, en el que los complejos ADN-proteína están sustancialmente desprovistos de ácidos nucleicos derivados de las células bacterianas que son detectables mediante una técnica que requiere separación de cadenas.

- 5
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que la furocumarina comprende la Fórmula (I) o un isómero de la misma:



en la que:

- 10 R³, R⁴, R⁵, R^{4'}, R^{5'} y R⁸ eligen independientemente de entre hidrógeno, amino, halógeno, hidroxilo, alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alquiloxi sustituido, alcoxialquilo, alcoxialquilo sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, haloalquilo, haloalquilo sustituido, hidroxialquilo, hidroxialquilo sustituido, alqueno, alqueno sustituido, arilo y arilo sustituido.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que R³ y R⁵ son hidrógeno; R⁴, R^{5'} y R⁸ son metilo; y R^{4'} se elige de entre alquilo, alquilo sustituido, alcoxi, alcoxi sustituido, alcoxialquilo, alcoxialquilo sustituido, aminoalquilo, aminoalquilo sustituido, haloalquilo, haloalquilo sustituido, hidroxialquilo e hidroxialquilo sustituido.
13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el ADN en los complejos de ADN-proteína aislados se analiza mediante un proceso elegido de secuenciación de ADN masivamente paralela, secuenciación por síntesis, secuenciación por ligamiento, 454 pirosecuenciación, secuenciación con marcadores de extremo emparejado, amplificación por grupos, amplificación por puente y amplificación por PCR.
14. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que las células bacterianas son una célula de la cepa Cowan 1 de *Staphylococcus aureus* y la furocumarina es 4'-aminometil trioxsalen.

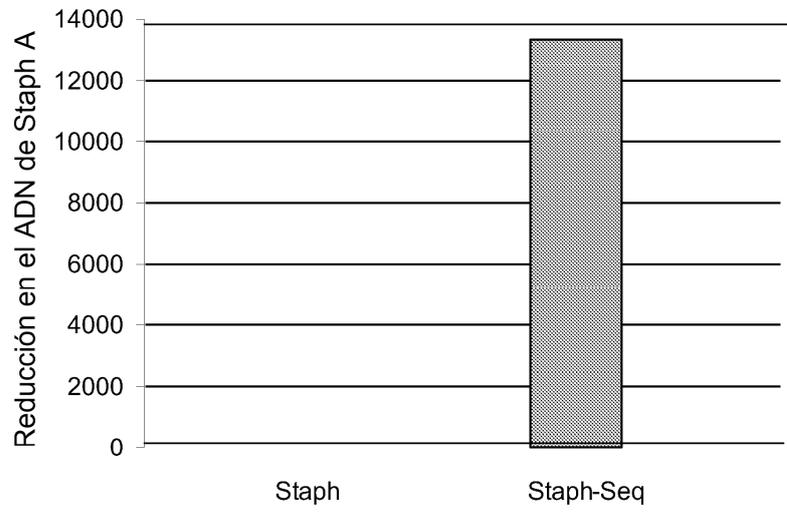


FIG. 1

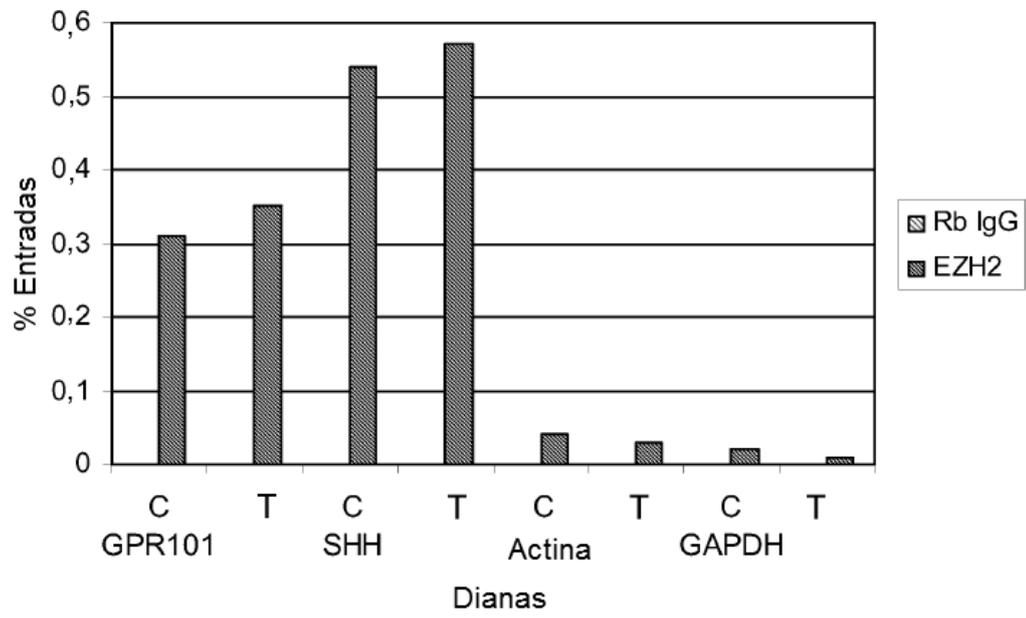


FIG. 2