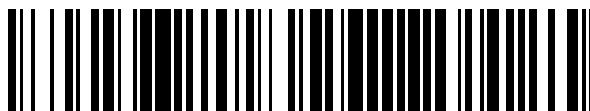


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 167**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2008** **E 16154383 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018** **EP 3050976**

54 Título: **Ensayos de ganancia y pérdida genómica multiplexados**

30 Prioridad:

05.12.2007 US 992489 P
26.03.2008 US 55919

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
03.05.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ADLER, KARL EDWIN, JR. y
SCHERMER, MACK J.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 666 167 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

Ensayos de ganancia y pérdida genómica multiplexados

5 CAMPO TÉCNICO

La tecnología descrita en el presente documento se refiere en general a procedimientos y composiciones para la detección de ácidos nucleicos. Más específicamente, se describen procedimientos y composiciones para ensayos multiplex de ADN genómico.

10

ANTECEDENTES

Los ensayos para la detección de la pérdida y la ganancia genómica permiten la detección y el diagnóstico de anomalías genéticas que pueden ser subyacentes a una enfermedad, afecciones conductuales y cognitivas, y otras patologías basadas en la genética. Se requiere un ensayo multiplex de perlas codificadas para las ganancias y las pérdidas cromosómicas que proporcione los beneficios de ADN BAC como el material de sonda sin formación de redes de perlas u otros problemas de rendimiento del ensayo.

15

Brenner y col. (2000, Nat. Biotech. vol. 18 n.º 6, págs. 630-634) describen un procedimiento de secuenciación que implica la unión de una molécula de ADNc que se va a secuenciar con microperlas, seguida de la digestión de enzimas de restricción e incubación en condiciones de hibridación con una mezcla compleja de moléculas de ADN amplificadas marcadas con fluorescencia, donde cada molécula de ADN amplificada tiene una "protuberancia" corta posiblemente complementaria con una protuberancia correspondiente en la molécula de ADNc. Una vez que la protuberancia del amplicón se hibrida con la protuberancia del ADNc, se utiliza una ligasa para producir una molécula de ADN fluorescente unida a una microperla. La detección de la señal fluorescente proporciona información sobre la secuencia específica en la región de la protuberancia del ADNc.

20

25

Xu y col. (2003, Nucl. Acids Res., vol. 31 n.º 8, página e43) describe una tecnología de perlas codificadas nanocristalinas para genotipado de SNP. Cada conjunto de perlas codificadas nanocristalinas tiene oligonucleótidos de 17-25 mer específicos del alelo unidos a la superficie; estos no representan juntos un ADN plantilla completo, sino que representan variaciones de alelos posibles cortas (SNP). Cada una de las perlas codificadas nanocristalinas se obtiene mediante la mezcla de una cantidad de un oligonucleótido específico del alelo correspondiente con un SNP de interés con perlas codificadas nanocristalinas desnudas.

30

35 RESUMEN DE LA INVENCION

La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

La presente descripción se refiere a un procedimiento para analizar una muestra de ADN que incluye proporcionar un primer conjunto de partículas codificadas que incluye partículas codificadas que tienen amplicones unidos. Los amplicones contienen secuencias de ácido nucleico aleatorias que juntas representan sustancialmente una primera secuencia de ADN plantilla completa. Los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas se hibridan con ADN de muestra marcado de forma detectable y con ADN de referencia marcado de forma detectable. Se detecta una primera señal que indica hibridación específica de los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra marcado de forma detectable. Se detecta una segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de referencia marcado de forma detectable. Se comparan la primera y la segunda señal para detectar diferencias entre la primera y la segunda señal, y las diferencias entre la primera y la segunda señal indican las diferencias entre el ADN de muestra y el ADN de referencia.

45

50

Opcionalmente, los amplicones unidos tienen una longitud en el intervalo de aproximadamente 500-1200 nucleótidos, inclusive.

El ADN de muestra marcado de forma detectable puede ser ADN obtenido de un sujeto individual, como ADN genómico. El sujeto es un ser humano en realizaciones específicas de los procedimientos descritos en el presente documento.

55

Las realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento incluyen además proporcionar un segundo conjunto de partículas codificadas que incluye partículas codificadas que tienen amplicones unidos. Los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas incluyen secuencias de ADN que juntas representan

60

- sustancialmente una segunda secuencia de ADN plantilla completa. Los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas se hibridan con ADN de muestra marcado de forma detectable y con ADN de referencia marcado de forma detectable. Se detecta una primera señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra marcado de forma detectable. Se detecta una
- 5 segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de referencia marcado de forma detectable. Se comparan la primera y la segunda señal para detectar diferencias entre la primera y la segunda señal, y las diferencias entre la primera y la segunda señal indican las diferencias entre el ADN de muestra y el ADN de referencia.
- 10 En realizaciones específicas de la presente descripción, el primer y el segundo conjunto de partículas codificadas se proporcionan en una mezcla. Las realizaciones de los procedimientos de la presente descripción del uso de una mezcla de los conjuntos de partículas codificadas además incluye asociar la codificación de los conjuntos de partículas individuales con las señales detectadas para asociar las señales relacionadas con el ADN plantilla específico con las diferencias entre el ADN de muestra y el ADN de referencia.
- 15 Los amplicones unidos a cada conjunto de partículas codificadas incluyen secuencias de ácido nucleico aleatorias que juntas representan sustancialmente una secuencia de ADN plantilla completa. En realizaciones específicas de la presente descripción, la secuencia de ADN plantilla completa es más grande que cada amplicón unido individual. En un ejemplo específico, la secuencia de ADN plantilla completa tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente
- 20 20-300 kilobases, inclusive y cada amplicón unido individual incluye una secuencia de ácido nucleico idéntica a una parte de la secuencia de ADN plantilla que tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 500-1200 nucleótidos, inclusive.
- Se describe un procedimiento para preparar un conjunto de perlas codificadas para analizar el ADN que incluye a)
- 25 realizar una primera reacción de amplificación utilizando un ADN plantilla y los cebadores de oligonucleótidos de primera reacción. En esta reacción, cada uno de los múltiples cebadores de la primera reacción incluye una secuencia de ADN redundante no específica variable y una secuencia de ADN constante contigua. Un producto de reacción de esta primera reacción incluye primeros amplicones, donde cada primer amplicón individual incluye una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria del ADN plantilla y una secuencia de ADN idéntica a la secuencia
- 30 de ADN constante de los cebadores de la primera reacción. Además se incluye en un procedimiento b) realizar una segunda reacción de amplificación utilizando al menos una parte de los primeros amplicones como ADN plantilla y utilizando los cebadores de oligonucleótidos de la segunda reacción. Los cebadores de oligonucleótidos de la segunda reacción incluyen la secuencia de ADN constante de los cebadores de la primera reacción y la segunda reacción de amplificación produce un segundo producto de reacción que incluye los segundos amplicones. Cada
- 35 segundo amplicón individual incluye una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria del ADN plantilla y una secuencia de ADN idéntica a la secuencia de ADN constante de los cebadores de la primera reacción. Además se incluye c) unir los segundos amplicones a la primera pluralidad de partículas codificadas, mediante lo cual se produce un conjunto de partículas codificadas para analizar el ADN.
- 40 Opcionalmente, los cebadores de oligonucleótidos de la segunda reacción además incluyen un grupo funcional para la reacción con una partícula codificada. Por ejemplo, se puede incluir una amina terminal 5'.
- En otras realizaciones de la presente descripción, se repiten a)-c) utilizando un segundo ADN plantilla y uniendo los segundos amplicones obtenidos de ese modo con una segunda pluralidad de partículas codificadas que son
- 45 diferentes de forma detectable de la primera pluralidad de partículas codificadas. Se genera un segundo conjunto de partículas codificadas para analizar el ADN mediante este procedimiento. En otras realizaciones de la presente descripción, se repiten a)-c) utilizando un tercer, cuarto, quinto o posterior ADN plantilla genómico y uniendo los terceros, cuartos, quintos o posteriores amplicones producidos de ese modo con una tercera, cuarta, quinta o posterior pluralidad de partículas codificadas, donde cada una de la tercera, cuarta, quinta o posterior pluralidad de
- 50 partículas codificadas es diferente de forma detectable de cada una de las otras pluralidades de partículas codificadas, lo que produce un tercer, cuarto, quinto o posterior conjunto de partículas codificadas para analizar el ADN. No se pretende limitar la cantidad de conjuntos de partículas codificadas que se pueden generar utilizando diferentes plantillas de ADN. Se puede generar cualquier cantidad de conjuntos de partículas codificadas. Además, se puede mezclar cualquier cantidad adecuada de conjuntos de partículas codificadas para producir un reactivo de
- 55 ensayo de ADN multiplex.
- Se describe un reactivo para analizar el ADN en el presente documento que incluye una pluralidad de partículas codificadas que tienen amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla. Cada amplicón unido individual incluye una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla,
- 60 donde los amplicones juntos representan sustancialmente el ADN plantilla completo y donde la secuencia de ADN

idéntica a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla de cada amplicón individual es más corta que el ADN plantilla completo. Por ejemplo, en realizaciones específicas de la presente descripción, la secuencia de ADN plantilla completa puede tener una longitud en el intervalo de aproximadamente 20-300 kilobases, inclusive y cada amplicón unido individual comprende una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria de la secuencia de ADN
5 plantilla que tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 500-1200 nucleótidos, inclusive.

- Se describe en el presente documento un reactivo multiplex para analizar el ADN que incluye una mezcla de dos o más pluralidades de partículas codificadas de modo que las partículas de cada pluralidad de partículas se puedan distinguir de forma detectable de las partículas de cada una de las otras pluralidades de partículas. Las partículas
10 codificadas tienen amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla, y cada pluralidad de partículas codificadas tiene amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla diferente en comparación con cada una de las otras pluralidades de partículas codificadas. Además, cada amplicón unido individual incluye una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla.
- 15 Se proporciona un kit para analizar el ADN que incluye un conjunto de partículas codificadas y/o una mezcla de dos o más conjuntos de partículas codificadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 20 La figura 1 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de la presente descripción que incluye preparar amplicones a partir de un ADN plantilla utilizando dos reacciones de amplificación e inmovilizar los amplicones como sondas en un conjunto de perlas codificadas, donde las perlas en el conjunto tienen el mismo código de ID;
La figura 1A es un diagrama de flujo que ilustra una realización de la presente descripción que incluye preparar amplicones BAC a partir de un clon BAC único e inmovilizar los amplicones como sondas en un conjunto de perlas
25 codificadas, lo que genera un conjunto de perlas donde las perlas en el conjunto tienen el mismo código de ID;
La figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de la presente descripción que incluye mezclar m diferentes conjuntos de perlas codificadas, cada una con su ADN de sonda de amplicón BAC inmovilizada respectiva, para hacer un conjunto de perlas codificadas multiplexado;
La figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de la presente descripción que incluye ejecutar un
30 ensayo de ganancia y pérdida genómica multiplexado en n muestras utilizando un conjunto de perlas codificadas multiplexado;
La figura 3A es un diagrama de flujo que ilustra una realización de la presente descripción que incluye ejecutar un ensayo de ganancia y pérdida genómica multiplexado en n muestras utilizando un conjunto de perlas codificadas multiplexado;
35 La figura 4 es un diagrama esquemático de una microplaca estándar SBS de 96 pocillos, que muestra ubicaciones ejemplares de referencias duplicadas y muestras duplicadas para ejecutar un ensayo en 46 muestras en paralelo;
La figura 5 es un ejemplo de los datos generados utilizando una muestra de ADN Coriell que tiene una trisomía en el cromosoma 13, sexo masculino;
La figura 6 es un ejemplo de los datos generados utilizando una muestra de ADN Coriell que tiene una trisomía en el
40 cromosoma 18, sexo masculino;
La figura 7 es un ejemplo de los datos generados utilizando una muestra de ADN Coriell que tiene una trisomía en el cromosoma 21, sexo femenino;
La figura 8 es un ejemplo de los datos generados utilizando una muestra de ADN Coriell que tiene una amplificación de 5 copias del cromosoma X; y
45 La figura 9 es una tabla que muestra los clones BAC utilizados para generar amplicones inmovilizados en perlas codificadas en los ensayos ejemplares, las ubicaciones en la citobanda y el cromosoma, la secuencia del oligonucleótido de control negativo y el ID de la perla (región de la perla Luminex) para el conjunto de perlas en el cual cada sonda de amplicones está inmovilizada.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Se proporcionan en el presente documento los procedimientos y las composiciones relacionadas con los ensayos multiplex de partículas codificadas para las ganancias y las pérdidas cromosómicas.

- 55 Los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen los significados que entienden comúnmente los expertos en la técnica. Dichos términos se encuentran definidos y se utilizan en el contexto en diversas referencias estándar que incluyen de forma ilustrativa J. Sambrook y D.W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3.^a ed., 2001; F.M. Ausubel, Ed., Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 5.^a ed., 2002; B. Alberts y col., Molecular Biology of the Cell, 4.^a ed., Garland,
60 2002; D.L. Nelson y M.M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 4.^a ed., W.H. Freeman & Company, 2004;

yHerdewijn, P. (Ed.), *Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004.

La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de ARN o ADN que tienen más de un nucleótido en cualquier forma, incluida una cadena simple, una cadena doble, un oligonucleótido o un polinucleótido.

Composiciones de reactivos

10 Se proporciona un reactivo para analizar el ADN genómico que incluye múltiples partículas codificadas que tienen amplicones unidos como sondas. Los amplicones unidos a las múltiples partículas codificadas incluyen, cada uno una secuencia de ácido nucleico idéntica o completamente complementaria a una parte de un ácido nucleico genómico plantilla y juntos, los amplicones representan sustancialmente el ácido nucleico genómico plantilla completo.

15 La figura 1 ilustra una realización de un procedimiento de la presente descripción para producir un reactivo para analizar el ADN genómico. Como se indica en la figura 1, se proporciona una plantilla de ácido nucleico (1). Se amplifica la plantilla (2) en una primera reacción de amplificación utilizando cebadores de oligonucleótidos redundantes (DOP) para producir un primer producto de amplificación.

20 La plantilla de ácido nucleico puede ser cualquier ácido nucleico capaz de ser copiado utilizando un procedimiento de amplificación de ácido nucleico.

El ADN plantilla para esta primera reacción de amplificación es opcionalmente ADN genómico, típicamente de un tamaño en el intervalo de aproximadamente 20-300 kb, aunque la plantilla puede ser más pequeña o más grande. El término "genómico" se refiere a ADN del genoma de una célula u organismo e incluye ADN aislado directamente de una célula u organismo, como ADN cromosómico microdisecionado, así como ADN copiado de ADN del genoma de una célula u organismo, como ADN clonado. El ADN plantilla puede abarcar la totalidad o parte de un genoma de una célula u organismo. El ADN plantilla puede abarcar ADN que representa uno o más cromosomas, una parte de un cromosoma, un locus genético, un gen o una parte de un gen. El ADN plantilla puede estar en cualquier forma, como un inserto en un vector que incluye de forma ilustrativa un cromosoma artificial bacteriano, un cromosoma artificial de levadura, un cromosoma artificial humano, un cósmido, un plásmido, un fagémido, un ADN de fago o un fásmid. El ADN plantilla puede estar en forma de ADN cromosómico microdisecionado. Por lo tanto, aunque los ejemplos específicos descritos en el presente documento se refieren a los BAC como fuentes de ADN plantilla, se pueden utilizar otros tipos de clones como los PAC, YAC, cósmidos, fásmidos, ADNc y similares.

El ADN genómico plantilla se obtiene a través de los procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describen en J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3.^a ed., 2001 o F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5.^a ed., 2002. El ADN plantilla también se puede obtener en el mercado y/o utilizando kits comerciales para el aislamiento de ADN genómico.

La amplificación del ADN plantilla se logra utilizando un procedimiento de amplificación in vitro. La expresión "procedimiento de amplificación" se refiere a un procedimiento o técnica para copiar un ácido nucleico plantilla y producir de este modo ácidos nucleicos que incluyen copias de la totalidad o parte del ácido nucleico plantilla, los ácidos nucleicos producidos también se denominan amplicones.

Los amplicones contienen opcionalmente las secuencias de ácido nucleico presentes en los cebadores y no presentes en el ADN plantilla original. Dichos ácidos nucleicos derivados de cebadores agregan funcionalidad, como sitios de unión al cebador para las reacciones de amplificación adicionales y/o un grupo funcional para el enlace químico a un sustrato.

Los procedimientos de amplificación incluyen de forma ilustrativa PCR, PCR mediada por ligación (LM-PCR), phi-29 PCR y otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, como se describe en C.W. Dieffenbach y col., *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003; y V. Demidov y col., *DNA Amplification: Current Technologies and Applications*, Taylor & Francis, 2004.

Se pueden utilizar muchas combinaciones de fuentes de ADN plantilla particulares y procedimientos de amplificación de ácido nucleico.

La expresión "cebador de oligonucleótidos" se refiere a un ácido nucleico que es capaz de actuar como un sitio de inicio de síntesis de un producto de extensión de cebadores en condiciones de reacción adecuadas. Un cebador de oligonucleótidos típicamente tiene alrededor de 10-30 nucleótidos contiguos de longitud. Un cebador de oligonucleótidos es completa o sustancialmente complementario a una región de un ácido nucleico plantilla de modo que, en condiciones de hibridación, el cebador de oligonucleótidos se hibrida con la región complementaria del ácido nucleico plantilla. Las condiciones de reacción adecuadas para la síntesis de un producto de extensión de cebadores incluyen la presencia de componentes de reacción adecuados que incluyen, entre otros, una polimerasa y trifosfatos de nucleótidos. El diseño de los cebadores de oligonucleótidos adecuados para uso en las reacciones de amplificación es conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en A. Yuryev y col., PCR Primer Design, Humana Press, 2007.

La expresión "cebador de oligonucleótidos redundante" se refiere a un cebador que incluye un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos aleatoria o semialeatoria. El diseño de los cebadores de oligonucleótidos redundantes adecuados para las reacciones de amplificación de ácido nucleico específicas es conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en A. Yuryev y col., PCR Primer Design, Humana Press, 2007. Se pueden utilizar secuencias de nucleótidos aleatorias o semialeatorias que tienen aproximadamente 5-8 nucleótidos. En otras realizaciones de la presente descripción, se incluyen hexámeros de nucleótidos aleatorios o semialeatorios en los cebadores de oligonucleótidos redundantes que se utilizan en la primera amplificación.

Los cebadores de oligonucleótidos redundantes que se utilizan en las realizaciones específicas de la presente descripción incluyen cada uno un segmento de ADN constante 5', un segmento de ADN aleatorio intermedio y un segmento de anclaje 3', por ejemplo, como se describe en Fiegler y col., Genes Chromosomes Cancer, 36(4):361-74, 2003; y Telenius y col., Genomics 13:718-25, 1992. El segmento de ADN constante 5' tiene opcionalmente la misma secuencia de nucleótidos en todos los DOP. El segmento de anclaje 3' tiene opcionalmente una secuencia de nucleótidos que se determina que tiene una frecuencia deseada de aparición en el ácido nucleico plantilla. El análisis de la frecuencia de aparición de una secuencia de ácido nucleico específica se conoce en la técnica, por ejemplo, como se describe en Milosavljevic, A. y Jurka, J., 1993, Comput. Applic. Biosci., 9:407-411; Pesole, G. y col., 1992, Nucleic Acids, Res., 20 :2871-2875; y Hutchinson, G. B., 1996, Comput. Appl. Biosci., 12 :391-398.

En realizaciones específicas de la presente descripción, los DOP incluyen aproximadamente 17-25 nucleótidos contiguos, de los cuales aproximadamente 7-12 nucleótidos contiguos se incluyen en el segmento de ADN constante 5', aproximadamente 5-8 nucleótidos contiguos se incluyen en el segmento de ADN aleatorio y aproximadamente 5-8 nucleótidos contiguos se incluyen en el segmento de anclaje 3'.

La primera reacción de amplificación produce un primer producto de reacción que contiene múltiples amplicones. Cada amplicón individual en el primer producto de reacción incluye una secuencia de ADN idéntica o completamente complementaria a una parte aleatoria del ADN plantilla y una secuencia de ADN idéntica a la secuencia de ADN constante 5' de los cebadores de la primera reacción.

El término "complementario", como se usa en el presente documento, se refiere al apareamiento de bases de Watson-Crick entre los nucleótidos y se refiere específicamente a los nucleótidos enlazados por hidrógeno entre sí con residuos de timina o uracilo unidos a residuos de adenina por dos enlaces hidrógeno y residuos de citosina y guanina unidos por tres enlaces hidrógeno. En general, un ácido nucleico incluye una secuencia de nucleótidos que se describe que tiene un "porcentaje de complementariedad" con una segunda secuencia de nucleótidos especificada. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos puede tener el 80 %, el 90 % o el 100 % de complementariedad con una segunda secuencia de nucleótidos especificada, lo que indica que 8 de 10, 9 de 10 o 10 de 10 nucleótidos de una secuencia son complementarios a la segunda secuencia de nucleótidos especificada. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos 3'-TCGA-5' es el 100 % complementaria a la secuencia de nucleótidos 5'-AGCT-3'. Además, la secuencia de nucleótidos 3'-TCGA- es el 100 %, o completamente, complementaria a una región de la secuencia de nucleótidos 5'-TTAGCTGG-3'.

Con referencia a la figura 1, una segunda reacción de amplificación (3), se realiza utilizando los amplicones del primer producto de reacción como ADN plantilla. La segunda reacción de amplificación (3), incluye un cebador de oligonucleótidos "universal", se denomina así porque el cebador universal es idéntico o completamente complementario al segmento de ADN constante 5' de DOP utilizado en la primera reacción de amplificación. Un cebador de oligonucleótidos universal incluye el segmento de ADN constante 5' de DOP utilizado en la primera reacción de amplificación ubicado en el extremo 3' del cebador universal. Un cebador de oligonucleótidos universal incluye opcionalmente nucleótidos contiguos adicionales en el extremo 5' del cebador.

En una opción específica, un cebador de oligonucleótidos universal incluye un grupo funcional en el extremo 5' del

cebador para la unión de los amplicones producto de la segunda reacción de amplificación con un sustrato sólido o semisólido codificado, como partículas codificadas. Por ejemplo, los cebadores de oligonucleótidos universales incluyen un grupo amina en el extremo 5' del cebador. En otra opción, los amplicones producto de la segunda reacción de amplificación se pueden modificar para incluir un grupo funcional para el enlace a un sustrato sólido o semisólido. La modificación de un ácido nucleico para incluir un grupo funcional capaz de enlazarse a un sustrato sólido o semisólido es conocida en la técnica.

En realizaciones específicas de la presente descripción, cada amplicón individual unido a una partícula incluye un segmento de ADN idéntico a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla. Cada amplicón individual también contiene un segmento de ADN constante contiguo con el segmento de ADN idéntico a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla. El segmento de ADN constante del amplicón incluye opcionalmente un grupo funcional terminal para la unión del amplicón a una partícula codificada. En una realización específica de la presente descripción, el segmento de ADN constante del amplicón incluye un grupo amina terminal 5' para la unión del amplicón a una partícula codificada.

Como se muestra en la figura 1, los amplicones del segundo producto de reacción están inmovilizados (4), en una primera pluralidad de partículas codificadas. La unión de los amplicones de la segunda reacción de amplificación de las partículas codificadas se logra mediante cualquiera de diversos procedimientos efectivos para unir un ácido nucleico con un sustrato sólido o semisólido, que incluye de forma ilustrativa absorción y enlace químico. Los amplicones se pueden enlazar directamente con el material de las partículas codificadas o enlazar indirectamente con las partículas codificadas, por ejemplo, mediante enlace con un recubrimiento o un enlazador dispuesto en las partículas. Los amplicones se pueden sintetizar, y/o modificar una vez sintetizados, para incluir un grupo funcional para utilizar en el enlace de los amplicones a las partículas. Por ejemplo, los amplicones pueden incluir grupos funcionales carboxilo, amina, amino, carboxilato, haluro, éster, alcohol, carbamida, aldehído, clorometilo, óxido sulfúrico, óxido de nitrógeno, epoxi y/o tosilo.

Las partículas a las cuales se unen los amplicones pueden ser cualquier partícula sólida o semisólida a la cual se puedan unir los amplicones, que son adecuadas para un ensayo multiplex y que son estables e insolubles en condiciones de hibridación y detección. Las partículas pueden ser de cualquier forma, como cilíndrica, esférica, etc., tamaño, composición o características fisicoquímicas. El tamaño o la composición de la partícula se pueden elegir de modo que la partícula se pueda separar del fluido, p. ej., en un filtro con un tamaño de poro particular o mediante alguna otra propiedad física, p. ej., una propiedad magnética.

Las micropartículas, como las microperlas, utilizadas pueden tener un diámetro de menos de un milímetro, por ejemplo, un tamaño que oscile entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1.000 micrómetros de diámetro, inclusive, como aproximadamente 3-25 micrones de diámetro, inclusive, o aproximadamente 5-10 micrones de diámetro, inclusive. Las nanopartículas, como las nanoperlas utilizadas pueden tener un diámetro de entre aproximadamente 1 nanómetro (nm) y aproximadamente 100.000 nm de diámetro, inclusive, por ejemplo, un tamaño que oscile entre aproximadamente 10-1.000 nm, inclusive, o por ejemplo, un tamaño que oscile entre 200-500 nm, inclusive. En determinadas realizaciones de la presente descripción, las partículas utilizadas son perlas, particularmente microperlas y nanoperlas.

Las partículas son, de forma ilustrativa, partículas orgánicas o inorgánicas, como de vidrio o metal, y pueden ser partículas de un polímero sintético o de origen natural, como poliestireno, policarbonato, silicio, nylon, celulosa, agarosa, dextrano y poliacrilamida. Las partículas son perlas de látex en realizaciones específicas de la presente descripción.

Las partículas utilizadas incluyen grupos funcionales para la unión a amplicones en realizaciones específicas de la presente descripción. Por ejemplo, las partículas pueden incluir grupos funcionales carboxilo, amina, amino, carboxilato, haluro, éster, alcohol, carbamida, aldehído, clorometilo, óxido sulfúrico, óxido de nitrógeno, epoxi y/o tosilo. Los grupos funcionales de las partículas, la modificación de los mismos y la unión de un resto químico a estas, como un ácido nucleico, son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Fitch, R. M., Polymer Colloids: A Comprehensive Introduction, Academic Press, 1997. La patente estadounidense n.º 6.048.695 describe un procedimiento ejemplar para unir sondas de ácido nucleico, tales como amplicones, a un sustrato, por ejemplo, partículas. En otro ejemplo específico, clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida, EDC o química EDAC, se puede utilizar para unir los amplicones a las partículas codificadas.

Las partículas codificadas son partículas que se pueden distinguir de otras partículas basándose en una característica que incluye de forma ilustrativa una propiedad óptica como el color, el índice de reflexión y/o un patrón impreso u ópticamente detectable de otro modo. Por ejemplo, las partículas se pueden codificar utilizando

marcadores ópticos, químicos, físicos o electrónicos. Las partículas codificadas pueden contener o estar unidas a uno o más fluoróforos, que se pueden distinguir, por ejemplo, mediante longitud de onda de excitación y/o emisión, intensidad de emisión, duración del estado de excitación o una combinación de estas u otras características ópticas. Los códigos de barra ópticos se pueden utilizar para codificar las partículas.

5

En realizaciones específicas de la presente descripción, cada partícula de un conjunto de partículas se codifica con el mismo código de modo que cada partícula de un conjunto de partículas se pueda distinguir de cada partícula de otro conjunto de partículas. En otras realizaciones de la presente descripción, se pueden utilizar dos o más códigos para un conjunto de partículas único. Por ejemplo, cada partícula puede incluir un código exclusivo. En determinadas

10 realizaciones de la presente descripción, la codificación de partículas incluye un código diferente o adicional, la asociación de una partícula y una sonda de ácido nucleico específica para el ADN genómico.

En realizaciones específicas de la presente descripción, el código está integrado, por ejemplo, dentro del interior de la partícula, o unido de otro modo a la partícula de una forma que es estable durante la hibridación y el análisis. El

15 código se puede proporcionar mediante cualquier medio detectable, como mediante codificación holográfica, mediante una propiedad de fluorescencia, color, forma, tamaño, emisión de luz, emisión de punto cuántico y similares para identificar la partícula y por ende las sondas de captación inmovilizadas allí. En algunas realizaciones de la presente descripción, el código es diferente de uno proporcionado por un ácido nucleico.

20 Una plataforma ejemplar utiliza mezclas de tintes fluorescentes impregnadas en partículas de polímero como medio para identificar cada miembro de un conjunto de partículas en el cual se ha inmovilizado una sonda de captación específica. Otra plataforma ejemplar utiliza códigos de barras holográficos para identificar partículas de vidrio cilíndricas. Por ejemplo, Chandler y col. (patente estadounidense n.º 5.981.180) describen un sistema basado en partículas en el cual diferentes tipos de partículas son codificadas por mezclas de diversas proporciones de dos o

25 más tintes fluorescentes impregnados en partículas de polímeros. Soini (patente estadounidense n.º 5.028.545) describe un sistema de ensayo multiplexado basado en partículas que emplea fluorescencia resuelta en el tiempo para la identificación de partículas. Fulwyler (patente estadounidense n.º 4.499.052) describe un procedimiento ejemplar para utilizar una partícula que se distingue por color y/o tamaño. Las publicaciones de solicitudes de patentes estadounidenses 20040179267, 20040132205, 20040130786, 20040130761, 20040126875, 20040125424, and 20040075907 describen partículas ejemplares codificadas por códigos de barras holográficos. La patente n.º 6.916.661 describe micropartículas poliméricas que están asociadas con nanopartículas que tienen tintes que proporcionan un código para las partículas.

Aunque una realización de la presente descripción descrita en detalle en el presente documento utiliza la plataforma de perlas codificadas Luminex, se pueden utilizar otros tipos de plataformas de ensayo de partículas codificadas, como las perlas VeraCode y el sistema BeadXpress (Illumina Inc., San Diego CA), xMAP 3D (Luminex) y similares. Se pueden utilizar perlas magnéticas Luminex que permiten la realización de etapas de lavado con imanes de placas y pipeteado en lugar de con placas de filtro y un colector de vacío. Cada una de estas plataformas se proporciona típicamente como perlas de carboxilo, pero también pueden estar configuradas para incluir una química de

40 acoplamiento diferente, como amino-silano.

En general, los amplicones que son producto de la segunda reacción de amplificación tienen cadena doble y los amplicones de cadena doble se unen a las partículas. Por ende, ambas cadenas de los amplicones de cadena doble están representadas en cada partícula. Los amplicones se desnaturalizan y se vuelven de cadena simple después

45 de la inmovilización a las partículas para la preparación para utilizar en realizaciones específicas de la presente descripción de los procedimientos de ensayo. Opcionalmente, los amplicones de cadena doble se desnaturalizan antes de la inmovilización y los amplicones de cadena simple después se unen a las partículas.

Como se describe, cada amplicón individual de la primera y la segunda reacción de amplificación contiene una secuencia de ácido nucleico idéntica a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla, de modo que los amplicones producidos mediante la primera reacción de amplificación juntos representan sustancialmente la secuencia de ADN plantilla completa y los amplicones producidos mediante la segunda reacción de amplificación juntos representan sustancialmente la secuencia de ADN plantilla completa.

50

55 Las partículas codificadas que tienen amplicones unidos que son producto de una segunda reacción de amplificación y que juntos representan sustancialmente la secuencia de ADN genómica completa utilizada como plantilla en la primera reacción de amplificación son un primer conjunto de partículas y un primer reactivo para analizar el ADN genómico.

60 En realizaciones específicas de la presente descripción, cada amplicón individual unido a una partícula tiene una

longitud en el intervalo de aproximadamente 500-1200 nucleótidos, inclusive. Por ende, un ácido nucleico plantilla relativamente grande se representa de forma sustancialmente completa en un conjunto de partículas codificadas por los amplicones relativamente más pequeños unidos amplificados a partir de la plantilla.

- 5 Como se ha indicado anteriormente, cada conjunto de partículas incluye partículas codificadas que tienen amplicones unidos que son producto de una segunda reacción de amplificación y que juntos representan sustancialmente la secuencia de ADN genómico completa utilizada como plantilla en una primera reacción de amplificación. La cantidad de partículas que incluyen amplicones que es suficiente para representar juntas sustancialmente la secuencia de ADN genómico completa utilizada como plantilla en la primera reacción de
- 10 amplificación depende de una serie de factores como el tamaño de la plantilla, el tamaño de los amplicones y la cantidad de sitios de unión disponibles para unir un amplicón en una partícula. En general, la cantidad de partículas suficiente para representar juntas sustancialmente la secuencia de ADN genómico completa utilizada como plantilla en la primera reacción de amplificación se encuentra en el intervalo de aproximadamente 1-10.000, inclusive.
- 15 Los conjuntos de partículas adicionales son generados mediante amplificación utilizando un segundo ADN plantilla genómico y uniendo los amplicones que son el producto de reacción de una segunda reacción de amplificación como se describió arriba a una segunda pluralidad de partículas codificadas. La segunda pluralidad de partículas codificadas es diferente de forma detectable de la primera pluralidad de partículas codificadas, generando así un segundo conjunto de partículas codificadas y un segundo reactivo para analizar el ADN genómico.
- 20 De forma similar, se utiliza un tercero o posterior ADN plantilla genómico para generar el producto de reacción de una reacción de amplificación y el producto de reacción se une a una tercera o posterior pluralidad de partículas codificadas. Cada una de la tercera o posterior pluralidad de partículas codificadas es diferente de forma detectable de las otras pluralidades de partículas codificadas, lo que produce un tercer o posterior conjunto de partículas
- 25 codificadas y un tercer o posterior reactivo para analizar el ADN genómico.

Reactivo multiplex

- Se proporciona un reactivo multiplex para analizar el ADN genómico de acuerdo con determinadas realizaciones de la presente descripción que incluye una mezcla de dos o más conjuntos de partículas. Las partículas codificadas individuales de cada conjunto de partículas codificadas se pueden distinguir de forma detectable de las partículas codificadas individuales de cada uno de los otros conjuntos de partículas codificadas en realizaciones específicas de la presente descripción. Cada conjunto de partículas codificadas tiene amplicones unidos que son producto de una
- 30 segunda reacción de amplificación como se describe en la presente y que juntos representan sustancialmente la secuencia de ADN genómico completa utilizada como una plantilla en una primera reacción de amplificación, donde una plantilla genómica diferente se representa por amplicones unidos a cada uno de los otros conjuntos de partículas codificadas.
 - 35

- Un reactivo multiplex de acuerdo con una realización específica de la presente descripción incluye un primer conjunto de partículas codificadas que tiene amplicones unidos que juntos representan sustancialmente una secuencia de ADN plantilla completa insertada en el primer cromosoma artificial bacteriano y un segundo conjunto de partículas codificadas que tiene amplicones unidos que juntos representan sustancialmente una secuencia de ADN plantilla completa insertada en el segundo cromosoma artificial bacteriano.
- 40

- Por ejemplo, un primer conjunto de partículas codificadas tiene amplicones unidos que incluyen secuencias de ácido nucleico idénticas a una parte del ADN del cromosoma humano 13 y un segundo conjunto de partículas codificadas tiene amplicones unidos que incluyen secuencias de ácido nucleico idénticas a una parte del ADN del cromosoma humano 18. Un tercer o posterior conjunto de partículas codificadas tiene amplicones unidos que incluyen secuencias de ácido nucleico idénticas al ADN humano de otro cromosoma u otra región no solapante de un
- 45
 - 50 cromosoma.

Un reactivo multiplex descrito en el presente documento permite el ensayo simultáneo de múltiples dianas, como múltiples loci genómicos, en un único ensayo.

- 55 Un reactivo multiplex para analizar el ADN genómico se genera mediante la mezcla de al menos un primer conjunto de partículas codificadas y un segundo conjunto de partículas codificadas.

- La figura 2 ilustra una realización de la presente descripción de un procedimiento para generar un reactivo multiplex. Como se indica en la figura, cualquier cantidad "m" de conjuntos de partículas codificadas se puede incluir en el
- 60 reactivo multiplex. Por ende, por ejemplo, "m" puede ser al menos 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55,

60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o 200 conjuntos de partículas codificadas diferentes. Un conjunto de partículas codificadas que tiene amplicones unidos se combina con uno o más conjuntos adicionales de partículas codificadas que tienen amplicones unidos para generar un reactivo multiplex para el ensayo de ganancia y pérdida genómica en una muestra.

5

Procedimientos de ensayo

Un procedimiento para analizar ADN genómico incluye proporcionar partículas codificadas que tienen amplicones unidos que juntos representan sustancialmente un ácido nucleico genómico plantilla completo. En realizaciones específicas de la presente descripción, se proporcionan partículas codificadas que tienen amplicones unidos que juntas representan más de una copia de sustancialmente un ácido nucleico genómico plantilla completo.

Una muestra de ADN genómico que se va a analizar en cuanto a la ganancia y/o pérdida genómica se marca con un marcador detectable. El ADN de referencia también se marca con un marcador detectable para la comparación con el ADN de muestra. El ADN de muestra y de referencia se pueden marcar con el mismo marcador detectable o uno diferente según la configuración de ensayo utilizada. Por ejemplo, el ADN de muestra y de referencia marcados con marcadores detectables diferentes se pueden utilizar juntos en el mismo recipiente para la hibridación con amplicones unidos a las partículas codificadas en realizaciones específicas de la presente descripción. En otras realizaciones de la presente descripción, el ADN de muestra y de referencia marcados con los mismos marcadores detectables se pueden utilizar en recipientes separados para la hibridación con amplicones unidos a las partículas.

La expresión "marcador detectable" se refiere a cualquier átomo o resto que pueda proporcionar una señal detectable y que pueda estar unido a un ácido nucleico. Algunos ejemplos de dichos marcadores detectables incluyen restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, restos bioluminiscentes, ligandos, partículas magnéticas, enzimas, sustratos enzimáticos, radioisótopos y cromóforos.

Se puede utilizar cualquiera de diversos procedimientos para marcar ADN de muestra y de referencia en el ensayo, como traslación de mellas o marcaje químico del ADN. Por ejemplo, se puede introducir un marcador detectable mediante polimerización utilizando nucleótidos que incluyen al menos algunos nucleótidos modificados, como nucleótidos modificados para incluir biotina, digoxigenina, fluoresceína o cianina. En algunas realizaciones de la presente descripción, el marcador detectable se introduce mediante cebado aleatorio y polimerización. Otros ejemplos incluyen traslación de mellas (Roche Applied Science, Indianapolis Ind.; Invitrogen, Carlsbad Calif.) y marcaje químico (Kreatech ULS, Ámsterdam NL). El marcaje detectable de ácidos nucleicos es conocido en la técnica y se puede utilizar cualquier procedimiento de marcaje adecuado para marcar ADN genómico.

35

En otra realización de la presente descripción, se evita el marcaje covalente de ADN de muestra y de referencia individualmente con un marcador detectable. Por ejemplo, se hibridan muestras de ADN genómico no marcadas a los amplicones inmovilizados en las partículas codificadas. Las secuencias indicadoras premarcadas también se hibridan a los complejos de amplicón-ADN de muestra y los complejos de amplicón-ADN de referencia en secuencias adyacentes, pero no solapadas, a las secuencias de las sondas de captación de los amplicones. Estas secuencias indicadoras marcadas se pueden hibridar en la misma reacción de hibridación o en una diferente. De este modo, las secuencias indicadoras marcadas se pueden producir a granel en un entorno a gran escala, lo que disminuye el costo por ensayo en comparación con el marcaje individual de cada muestra en el momento del ensayo.

45

El ADN genómico de "muestra" y "referencia" se puede obtener de cualquier fuente adecuada. Los procedimientos específicos descritos en el presente documento comprenden el uso de ADN genómico de muestra de un sujeto individual. El ADN genómico de muestra y/o referencia se puede extraer de casi cualquier tejido, lo que incluye, entre otros, sangre, líquido amniótico, tumores sólidos, biopsias de órganos, frotis de mejillas, vellosidades coriónicas, blastocistos y blastómeros, productos de la concepción, saliva, orina y productos similares. Las muestras archivadas extraídas de muestras de patologías incluidas en parafina y fijadas con formalina (FFPE) también son fuentes del ADN genómico de muestra analizado por este procedimiento. El ADN genómico de muestra y/o referencia también se puede obtener de fuentes in vitro tales como líneas celulares. Los procedimientos para obtener ADN genómico de estas y otras fuentes son conocidos en la técnica.

55

En realizaciones específicas de la presente descripción, el ADN de referencia se caracteriza con respecto a una característica específica del ADN de muestra que se va a analizar. Por ejemplo, cuando el ADN de muestra se va a analizar para detectar la duplicación de un gen específico o locus cromosómico, el ADN de referencia se caracteriza para que se sepa cuántas copias del gen o el locus están presentes en el ADN de referencia. En general, se utilizan ADN de muestra y de referencia de la misma especie.

60

Un ensayo descrito en el presente documento se puede utilizar para detectar o caracterizar trastornos asociados con las ganancias o las pérdidas cromosómicas. Los trastornos constitucionales o congénitos incluyen trisomías de cromosomas completos, amplificaciones o eliminaciones de loci genómicos más pequeños (aproximadamente 200 kilobases a 20 megabases), y amplificaciones o eliminaciones en las regiones subteloméricas o centroméricas. Diversos cánceres también se caracterizan por las ganancias y las pérdidas cromosómicas que se pueden correlacionar con el tipo, estadio, resistencia a fármacos o respuesta a la terapia. Las líneas celulares de laboratorio, incluidas las líneas celulares madre, se pueden caracterizar en cuanto a la estabilidad cromosómica utilizando el presente procedimiento.

10

Aunque los procedimientos y las composiciones se describen en el presente documento mayoritariamente con referencia a ácidos nucleicos derivados de seres humanos, se aprecia que los procedimientos y las composiciones descritos en la presente se pueden utilizar para analizar ADN genómico de muestra de cualquiera de diversos organismos que incluyen, entre otros, primates no humanos, roedores, conejos, perros, gatos, caballos, ganado vacuno, cerdos, cabras y ovejas. También se pueden analizar fuentes no mamíferas de ADN de muestra, de forma ilustrativa, lo que incluye peces y otros organismos acuáticos, aves, aves de corral, bacterias, virus, plantas, insectos, reptiles, anfibios, hongos y micobacterias.

15

Los amplicones unidos a las partículas codificadas se hibridan con ADN genómico de muestra marcado de forma detectable de un sujeto individual para lograr la hibridación específica del ADN de amplicón y el ADN genómico de muestra marcado de forma detectable. Además, las secuencias de ADN unidas a las partículas codificadas se hibridan con ADN genómico de referencia marcado de forma detectable para lograr la hibridación específica del ADN de amplicón y el ADN genómico de referencia marcado de forma detectable.

20

Los términos "hibridación" e "hibridar" se refieren al apareamiento y la unión de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación se produce en diversos grados entre dos ácidos nucleicos según factores tales como el grado de complementariedad de los ácidos nucleicos, la temperatura de fusión, T_m , de los ácidos nucleicos y la rigurosidad de las condiciones de hibridación, tal como se sabe en la técnica. La expresión "rigurosidad de las condiciones de hibridación" se refiere a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y composición de un medio de hibridación con respecto a los aditivos comunes específicos tales como formamida y solución de Denhardt. La determinación de condiciones de hibridación específicas relacionadas con un ácido nucleico específico es de rutina y se conoce en la técnica, por ejemplo, como se describe en J. Sambrook y D.W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3.^a ed., 2001; y F.M. Ausubel, Ed., *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols; 5.^a ed., 2002. Las condiciones de hibridación de rigurosidad alta son aquellas que solo permiten la hibridación de ácidos nucleicos sustancialmente complementarios. Típicamente, los ácidos nucleicos que tienen aproximadamente el 85-100 % de complementariedad se consideran altamente complementarios y se hibridan en condiciones de rigurosidad alta. Las condiciones de rigurosidad intermedia se ejemplifican por las condiciones en las cuales se hibridan los ácidos nucleicos que tienen complementariedad intermedia, aproximadamente el 50-84 % de complementariedad, así como aquellos que tienen un grado alto de complementariedad. En cambio, las condiciones de hibridación de rigurosidad baja son aquellas en las cuales se hibridan los ácidos nucleicos que tienen un grado bajo de complementariedad. Las expresiones "hibridación específica" y "se hibrida específicamente" se refieren a la hibridación de un ácido nucleico específico con un ácido nucleico diana sin hibridación sustancial con ácidos nucleicos diferentes del ácido nucleico diana en una muestra.

30

35

40

Los ensayos descritos se pueden realizar en cualquier recipiente adecuado. En realizaciones específicas de la presente descripción, por ejemplo, donde se deben analizar múltiples muestras, se puede utilizar un recipiente de varias cámaras. Los recipientes de varias cámaras incluyen de forma ilustrativa sustratos de varias depresiones, como portaobjetos, chips de silicio o bandejas. En algunas realizaciones de la presente descripción, cada muestra se coloca en un pocillo diferente de una placa de varios pocillos. Por ejemplo, una placa de varios pocillos puede ser una placa de ensayo de 96 pocillos, 384 pocillos o 1024 pocillos.

50

Además se incluye la detección de una primera señal que indica hibridación específica de las secuencias de ADN unidas con ADN genómico marcado de forma detectable de un sujeto individual y detección de una segunda señal que indica hibridación específica de las secuencias de ADN unidas con ADN genómico de referencia marcado de forma detectable.

55

Cualquier procedimiento adecuado, que incluye de forma ilustrativa espectroscópico, óptico, fotoquímico, bioquímico, enzimático, eléctrico y/o inmunoquímico se utiliza para detectar los marcadores detectables del ADN de muestra y de referencia hibridado a los amplicones unidos a las partículas codificadas.

60

Las señales que indican el grado de la hibridación se pueden detectar, para cada partícula, mediante la evaluación de la señal de uno o más marcadores detectables. Las partículas se evalúan típicamente de forma individual. Por ejemplo, las partículas se pueden pasar a través de un citómetro de flujo. Los citómetros de flujo ejemplares incluyen el citómetro de flujo Coulter Elite-ESP o el citómetro de flujo FACScan.TM. disponible de Beckman Coulter, Inc.

- 5 (Fullerton Calif.) y el citómetro de flujo MOFLO.TM. disponible de Cytomation, Inc., Fort Collins, Colo. Además de la citometría de flujo, se puede utilizar una centrífuga como el instrumento para separar y clasificar las partículas. Un sistema adecuado es el que se describe en la patente estadounidense n.º 5.926.387. Además de la citometría de flujo y la centrifugación, se puede utilizar un aparato de electroforesis de flujo libre como el instrumento para separar y clasificar las partículas. Un sistema adecuado es el que se describe en la patente estadounidense n.º 4.310.408.
- 10 Las partículas también se pueden colocar en una superficie y escanear u obtener imágenes.

Se detecta una primera señal que indica hibridación específica de las secuencias de ADN unidas a la partícula codificada con ADN genómico marcado de forma detectable de un sujeto individual. Se detecta además una segunda señal que indica hibridación específica de las secuencias de ADN unidas a la partícula codificada con ADN

- 15 genómico de referencia marcado de forma detectable.

Se comparan la primera señal y la segunda señal y esto produce información acerca del ADN genómico del sujeto individual en comparación con el ADN genómico de referencia.

- 20 En realizaciones específicas de la presente descripción, una relación de las señales de los marcadores detectables del ADN de referencia y el ADN de muestra hibridados a los amplicones de uno o más conjuntos de partículas se utiliza para evaluar las diferencias entre el ADN de muestra y de referencia, lo que indica, por ejemplo, la ganancia y/o la pérdida genómica. En determinadas realizaciones de la presente descripción, el ADN de referencia y el ADN de muestra se hibridan a los amplicones de uno o más conjuntos de partículas en el mismo recipiente, como un
- 25 pocillo de una placa de varios pocillos. Después de la hibridación, los dos marcadores se analizan juntos, es decir, ambos marcadores detectables se detectan en el material hibridado o el material hibridado se divide en dos (o más) partes y cada parte se evalúa por separado para detectar los marcadores detectables. Los resultados de la evaluación se pueden utilizar para proporcionar la relación de señales de los dos marcadores detectables. El presente enfoque permite el uso de hibridación competitiva para normalizar toda variación entre los ensayos: las
- 30 muestras de referencia y experimentales se analizan simultáneamente en el mismo recipiente mezcladas con las mismas partículas.

Opcionalmente, el ADN de referencia marcado de forma detectable y el ADN de muestra marcado de forma detectable se hibridan con uno o más conjuntos de partículas en los diferentes recipientes, como diferentes pocillos

35 de una placa de varios pocillos. Se puede obtener una relación de señales de los dos marcadores detectables para evaluar las diferencias entre el ADN de muestra y el ADN de referencia. Cuando se utiliza este enfoque, una única muestra de referencia se puede compartir entre diversas o muchas muestras experimentales. Para los experimentos que implican múltiples muestras por día, puede haber un ahorro en el costo de los reactivos y la mano de obra al evitar el marcaje de múltiples muestras normales duplicadas. También resulta innecesario manipular la muestra para

40 obtener diferentes partes para análisis separados. Cada muestra se puede evaluar una sola vez.

Las partículas codificadas se identifican por su información codificada para asociar la codificación de partículas con la primera señal y con la segunda señal en realizaciones específicas de la presente descripción. Por ende, por ejemplo, la primera y la segunda señal están asociadas con las partículas codificadas de un primer conjunto de

45 partículas codificadas que contiene ADN humano del cromosoma 13. Se comparan la primera señal y la segunda señal asociadas con el primer conjunto de partículas codificadas y esto produce información acerca del ADN del cromosoma 13 del sujeto individual en comparación con el ADN de referencia del cromosoma 13. De modo similar, la primera y la segunda señal están asociadas con un segundo conjunto de partículas codificadas que contiene ADN humano del cromosoma 18. Se comparan la primera señal y la segunda señal asociadas con el segundo conjunto de

50 partículas codificadas y esto produce información acerca del ADN del cromosoma 18 del sujeto individual en comparación con el ADN de referencia del cromosoma 18.

Las figuras y las descripciones en el presente documento ilustran el mejor modo, pero muchos materiales y procesos alternativos se pueden sustituir. El experto en la técnica reconocerá materiales y procesos alternativos adecuados y

55 será capaz de producir y utilizar las composiciones y los procedimientos descritos sin experimentación indebida.

Las composiciones de los diversos amortiguadores y otros componentes de ensayo se pueden sustituir.

- Las condiciones de cultivo, purificación, amplificación, desnaturalización, acoplamiento, hibridación, unión de
- 60 indicadores, lavado y manipulación de perlas se pueden variar por el usuario para adaptarse a tipos específicos de

células, ADN genómico plantilla, muestras, indicadores seleccionados y similares.

El ensayo de los ejemplos del presente documento se puede realizar con tan solo 30 ng de ADN de muestra. En las situaciones en las cuales la fuente biológica produce una cantidad insuficiente de ADN para el ensayo descrito, la muestra se puede amplificar mediante diversos procedimientos de amplificación de genoma completo (WGA), tales como PCR de DOP o phi-29 PCR. Cuando se utilizan muestras procesadas por WGA, el ADN de referencia se puede procesar a través del mismo procedimiento de modo que cualquier sesgo de la amplificación específica de secuencia se corrija en gran medida por la relación de muestra/referencia de las señales.

- 10 Se proporcionan kits para analizar el ADN. En realizaciones específicas de la presente descripción, se proporciona un kit que incluye un conjunto de partículas codificadas y/o una mezcla de dos o más conjuntos de partículas codificadas. El material instructivo para utilizar el conjunto de partículas codificadas y/o reactivo multiplex que incluye dos o más conjuntos de partículas codificadas se incluye opcionalmente en un kit. También se incluye, opcionalmente, un reactivo complementario, como amortiguadores, enzimas, soluciones de lavado, soluciones de hibridación, marcadores detectables, reactivos de detección y similares.

Realizaciones de composiciones y procedimientos de ensayo de la presente descripción se ilustran en los siguientes ejemplos. Los presentes ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos y no se consideran limitaciones del alcance de las composiciones y procedimientos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

25 Preparación de un reactivo de conjunto de perlas para ensayo de ADN genómico

La figura 1A muestra un diagrama de flujo que ilustra la preparación de amplicones BAC a partir de un clon BAC único y la inmovilización de los amplicones como sondas en un conjunto de perlas codificadas. En el presente ejemplo, las perlas en el conjunto tienen el mismo código de ID.

- 30 El material de partida es un material de clon BAC vivo (10), una secuencia de ADN humano larga (100-200 kilobases típicamente) insertada en el genoma de una célula de bacteria E. coli. Se recoge un pequeño fragmento de material de reserva de glicerol BAC congelado y se utiliza como el material de partida para un procedimiento de cultivo celular bacteriano estándar (11). Se cultivan las células en 35 ml de medio en tubos de 50 ml durante la noche a 37 °C con un antibiótico selectivo de acuerdo con un protocolo de cultivo BAC estándar. Después, se centrifugan las células cultivadas hacia el fondo del tubo a 4 °C durante 20 minutos y se retira y se desecha el sobrenadante. Se resuspende el sedimento celular en un amortiguador que contiene RNasa y después se lisa utilizando LyseBlue (Qiagen, Valencia CA) y SDS. El lisado (12) se centrifuga (13) a aproximadamente 20.000 g durante 30 minutos, y el sobrenadante, que contiene el ADN en solución, se recoge y se desecha el sedimento. Se repite la centrifugación durante 15 minutos en el sobrenadante. Se recoge el sobrenadante claro que contiene el ADN de BAC disuelto, mientras que los desechos celulares, las proteínas y otras impurezas se llevan al fondo del tubo y se desechan. Se extrae el ADN de BAC y se purifica (17) a partir del sobrenadante utilizando un kit de purificación de columna Genomic-Tip 20/G Qiagen. Este kit comprende columnas de purificación (15) y amortiguadores de lavado y elución (16). Después de la elución, el ADN de BAC ahora altamente purificado se precipita y forma sedimentos mediante precipitación de isopropanol (19). El rendimiento es típicamente de 20 a 200 ng de ADN de BAC purificado (18). Este ADN de BAC se puede almacenar como un sedimento seco o resuspender en agua para utilizar inmediatamente en las siguientes etapas.

- 50 Una cantidad de amplicones de PCR que representan sustancialmente el contenido de la secuencia completo de cada ADN de BAC después se produce utilizando dos ciclos de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El primer ciclo de PCR (20) es PCR de cebador de oligonucleótidos redundantes (DOP) no específica utilizando una mezcla de cebadores de DOP (21), una polimerasa de PCR de DOP (22) y un amortiguador de PCR de DOP (23), con el ADN de BAC preparado anteriormente (18) utilizado como plantilla. El segundo ciclo de amplificación por PCR (25), utiliza un único cebador dirigido a los motivos de secuencia conocidos de los cebadores de DOP. Dos ciclos de PCR se utilizan para generar rendimientos de aproximadamente 20 µg de producto de amplicones final (29) para el acoplamiento posterior (32) de los amplicones (29) con las perlas codificadas (30).

Los amplicones se preparan del siguiente modo.

Una primera mezcla de 50 µl de PCR de DOP se elabora para cada ADN de BAC compuesto por:

10X amortiguador de PCR de DOP	5,0 µl
dNTP 10 mM (cada uno)	1,0 µl
MgCl 50 mM	5,0 µl
Mezcla de cebadores de DOP 10 uM (cada uno)	10,0 µl
20 a 50 ng de ADN plantilla de BAC	2,0 µl
Polimerasa Platinum Taq	0,5 µl
Agua	21,5 µl
Volumen total	50,0 µl

El amortiguador de PCR de DOP (23) incluía Tris HCL 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM y MgCl 5 mM. Los dNTP (Amersham Biosciences, Piscataway NJ) se encuentran en una concentración de 200 µM. La polimerasa platinum TAQ (Applied BioSystems) se encuentra en una concentración de 5 unidades/µl. La mezcla de cebadores de DOP (21), véase Fiegler y col. 2003, Genes Chromosomes Cancer, 36(4):361-74, incluía tres conjuntos de oligonucleótidos redundantes de las siguientes secuencias de 22-mer (Operon Biotechnologies, Huntsville AL), donde los Ns representan nucleótidos aleatorizados:

- 10 5' CCGACTCGAGNNNNNNCTAGAA 3' SEQ ID No. 1
 5' CCGACTCGAGNNNNNNNTAGGAG 3' SEQ ID No. 2
 5' CCGACTCGAGNNNNNNNTTCTAG 3' SEQ ID No. 3
 donde N indica nucleótidos aleatorios.

- 15 El ADN plantilla de BAC (18) se disuelve en agua, se purifica mediante purificación en columna (17) utilizando el kit de purificación de columna Genomic-Tip 20/G Qiagen. La polimerasa platinum TAQ (22) (Invitrogen, Carlsbad CA) se encuentra en una concentración de 5 unidades/µl.

- 20 La amplificación del primer ciclo (20), se realiza en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied BioSystems, Foster City CA) de acuerdo con el siguiente perfil de temperatura/tiempo:

3,0 min	94°C	
1,5 min	94°C	
2,5 min	30°C	9 ciclos
0,10C/seg	72°C (rampa)	
3,0 min	72°C	
1,0 min	94°C	
1,5 min	62°C	30 ciclos
2,0 min	72°C	
8,0 min	72°C	
4,0°C		(estado estable)

- 25 Los productos de amplicones (24) de este primer ciclo de PCR de DOP (20) después se utilizan como las plantillas para un segundo ciclo de PCR (25). El cebador único (26) en el segundo ciclo es específico para las partes de secuencias comunes de los cebadores de DOP (21) utilizadas en el primer ciclo (20). El presente cebador (26) es modificado por amina de modo que los amplicones resultantes (29) también tendrían un grupo amina en un extremo para facilitar el acoplamiento simple a las perlas codificadas en una etapa posterior (32).

- 30 El segundo ciclo de PCR se realiza del siguiente modo.

Una segunda mezcla de 100 µl de PCR se elabora para cada plantilla de amplicones BAC que incluye:

10X amortiguador de PCR	10,0 µl
dNTP 10 mM (cada uno)	2,0 µl
MgCl 50 mM	10,0 µl
Cebador de amina 10 uM	15,0 µl
Plantilla (de PCR n.º 1)	2,0 µl
Platinum Taq	0,5 µl
Agua	58,5 µl
Volumen total	100,0 µl

El amortiguador de PCR 2 (28) incluía Tris HCL 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM y MgCl 5 mM. Los dNTP (Amersham Biosciences, Piscataway NJ) se encuentran en una concentración de 200 µM. La polimerasa platinum TAQ (Applied Biosystems) se encuentra en una concentración de 5 unidades/µl.

5

El cebador unido a amina (Operon) tenía la siguiente secuencia.

5'-GGAAACAGCCCGACTCGAG-3' SEQ ID No. 4

Las plantillas en la reacción (25) son los amplicones de DOP (24) del ciclo de PCR de DOP anterior (20). La amplificación del segundo ciclo (25), se realiza en un termociclador GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) de acuerdo con el siguiente perfil de temperatura/tiempo:

10 min	95°C	
1,0 min	95°C	
1,5 min	60°C	35 ciclos
7,0 min	72°C	
10 min	72°C	
4,0°C		(estado estable)

Este segundo producto de PCR (29) después se purifica utilizando un kit basado en perlas magnéticas (9) (PCR Clean Beads, Agencourt Bioscience Corp., Beverly MA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los amplicones purificados (29) después se resuspenden en 40 µl de agua y se almacenan a -20 °C hasta el uso en la etapa de acoplamiento de perlas como se describe abajo.

El procedimiento de acoplamiento de perlas codificadas (32) para inmovilizar el producto de amplicones (29), como ADN de sonda en la superficie de las perlas codificadas se realiza en perlas carboxi Luminex (30) (Luminex, Austin TX) en una escala de 50 µl de la concentración de perlas estándar y produce aproximadamente 650.000 perlas. Las perlas están hechas de poliestireno, aproximadamente 5,6 µm de diámetro y están codificadas con cantidades controladas de dos o tres tintes fluorescentes para facilitar la detección de su ID de perlas en un instrumento de lectura de citómetro de flujo construido específicamente. 50 µl de perlas suspendidas (30), todas de una ID de perla o región, se transfieren del tubo Luminex en el cual se suministran a un tubo Eppendorf de 1,5 ml para el acoplamiento (32), con uso de agitación en vórtex y sonicación para garantizar la suspensión. Después, se centrifugan las perlas a 12.000 RPM durante 3 minutos y se retira el sobrenadante de amortiguador de perlas sin alterar el sedimento de perlas. Se agregan 25 µl de amortiguador MES a cada tubo de perlas, seguido de agitación en vórtex y sonicación. Después, se agregan de forma separada 10 µg de amplicones de PCR 2 (29) de cada BAC a un segundo conjunto de tubos de centrifuga de 1,5 ml, y el ADN en cada tubo después se seca completamente en un SpeedVac (ThermoFisher Scientific, Waltham MA). Después, se transfiere una suspensión de perlas a cada tubo de ADN, se agita en vórtex y se sonica durante 5 segundos cada mezcla, manteniendo un registro cuidadoso de la ID (región) de perla asociada con cada BAC.

A continuación, se agregan 1,5 µl de EDC recién disuelto (31) (hipocloruro de 1-etil-3-[dimetilaminopropil]-carbodiimida, Pierce, Rockford IL) a 10 mg/ml a cada tubo, se agita en vórtex inmediatamente y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad (para conservar la codificación fluorescente de perlas Luminex). Se realiza una nueva mezcla a los 15 minutos. El agregado de EDC, la incubación y la nueva mezcla después se repiten una segunda vez.

40

Después, se agregan 500 µl de amortiguador TNT (Tris 0,1 M pH 7,5, NaCl 0,15 M, Tween 20 al 0,02 %) a cada tubo y se agitan en vórtex. Después, se centrifugan los tubos en una microfuga durante 4 minutos a 12.000 RPM para llevar las perlas al fondo y se retira cuidadosamente el sobrenadante. A continuación, se agregan 500 µl de SDS al 0,1 % y se centrifugan las perlas nuevamente durante 4 minutos a 12.000 RPM y se retira cuidadosamente el sobrenadante. Por último, 50 µl de 1 x amortiguador TE (Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM) a cada tubo y se agita en vórtex.

El conjunto de perlas (33), con sondas de amplicones inmovilizadas (29), se puede incluir como un componente de un conjunto de perlas multiplex para utilizar en los ensayos de ADN genómico.

50

Ejemplo 2

Preparación de un reactivo de un conjunto de perlas codificadas multiplex para ensayo de ADN

La figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra la mezcla m de diferentes conjuntos de perlas codificadas, cada una con su ADN de sonda de amplicón BAC inmovilizada respectiva, para hacer un conjunto de perlas codificadas multiplexado.

- 5 Los conjuntos de perlas codificadas 34, 35, 36 y 37 se suspenden mediante sonicación, rotación de un recipiente de tubo, agitación en vórtex o un procedimiento similar. Después, se utiliza una pipeta para transferir alícuotas de cada conjunto de perlas a otro recipiente donde los conjuntos de perlas individuales se combinan y se mezclan, seguido de desnaturalización (38), para facilitar la hibridación posterior para el ADN de sonda inmovilizado en las perlas en un ensayo.

- 10 En un ejemplo descrito, el contenido de 50 µl de 2 o más conjuntos de perlas, cada uno en un tubo individual, cada conjunto de perlas codificadas con un ADN de sonda inmovilizada (33), se combinan en lotes en un tubo de centrífuga de 1,5 ml. Después de combinar aproximadamente 10 conjuntos de perlas, el tubo se centrifuga y se retira cuidadosamente el sobrenadante para mantener el volumen bajo. Esto se repite hasta combinar todos los
15 conjuntos de perlas (hasta 100 ID o regiones de perlas codificadas son soportados por el sistema Luminex 200, por ejemplo).

- Después de que todos los conjuntos de perlas se combinan en un conjunto de perlas multiplex, el ADN de sonda inmovilizada se desnaturaliza. Después de centrifugar las perlas y retirar el sobrenadante, se agregan 500 µl de
20 NaOH 0,1 N y se deja incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugan las perlas y se retira cuidadosamente el sobrenadante. Se agregan 500 µl de Tris 10 mM, NaCl 15 mM, Tween 20 al 0,2 %, se agita en vórtex el tubo, después se centrifugan las perlas y se retira el sobrenadante. Después, se repite este paso de lavado. Por último, se lleva el volumen a 500 µl con 1 X amortiguador TE y el conjunto de perlas multiplex (39), se almacena en la oscuridad a 4 °C hasta su uso para un ensayo.

25 **Ejemplo 3**

Ensayo de ganancia y pérdida genómica multiplexado

- 30 La figura 3A es un diagrama de flujo que ilustra una realización de la presente descripción que incluye ejecutar un ensayo de ganancia y pérdida genómica multiplexado en n muestras utilizando un conjunto de perlas codificadas multiplexado.

- En el presente ejemplo, se estudian dos muestras de ADN y dos referencias en paralelo. En la práctica, se pueden
35 ejecutar varias docenas de muestras simultáneamente en paralelo en un formato de microplacas. Se pueden analizar en paralelo más o menos muestras y referencias que esta cantidad.

- En el presente ejemplo, las cuatro muestras de ADN, 40 y 41 que representan dos referencias y 42 y 43 que representan dos muestras de ensayo, se marcan enzimáticamente con biotina y se purifican. Las muestras de
40 referencia son típicamente muestras agrupadas de macho y hembra normales, como ADN genómico femenino humano y ADN genómico masculino humano (Promega, Madison WI). Cada muestra de ADN y referencia se combina con nucleótidos marcados con biotina (45) (PerkinElmer, Boston MA), nucleótidos no marcados (49) (PerkinElmer), cebadores aleatorios (47) (Operon, Biotechnologies, Huntsville AL) y una enzima polimerasa de fragmento de Klenow (46) (Epicentre Biotechnologies, Madison WI). Después de la incubación (44), se limpia el
45 producto de reacción (50), utilizando un kit de purificación de columna de ADN (49), como un mini kit de ADN Purelink (Invitrogen). Se utilizan aproximadamente 5 µl a aproximadamente 200 ng/µl de muestra marcada para la hibridación posterior en el ensayo.

- Cada muestra o referencia marcada con biotina (51-54) después se hibrida (55) con las sondas inmovilizadas en las
50 perlas de un conjunto de perlas codificadas multiplexado (56). Se utilizan aproximadamente 500 perlas de cada conjunto de perlas (cada tipo de sonda); en este ejemplo de 55-plex, se utiliza un total de aproximadamente 55 x 500 = 27.500 perlas por hibridación.

- Las perlas de cada conjunto de perlas codificadas se pueden distinguir de las perlas de cada uno de los otros
55 conjuntos de perlas codificadas debido a la codificación. Cada uno de los 55 conjuntos de perlas incluye múltiples perlas codificadas que tienen amplicones unidos que representan sustancialmente un fragmento de ADN genómico de plantilla completo. El ADN plantilla para cada conjunto de perlas representa un locus genómico enumerado en la figura 9.

- 60 Un amortiguador de hibridación que contiene ADN Cot-1, formamida, sulfato de dextrano y 1,9x SSC se incluye en la

reacción de hibridación. El volumen total es de aproximadamente 15 µl y las reacciones se realizan en los pocillos de una microplaca tipo PCR rígida, como Bio-Rad HSP 9631 (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA). La placa se sella herméticamente para minimizar la evaporación utilizando un sellador de papel de aluminio (MSF 1001, Bio-Rad). La incubación de la hibridación (55) se realiza durante la noche a 50 °C en una incubadora de agitación de microplacas a 1150 rpm (Wallac NCS Incubator, PerkinElmer).

Después de la incubación de la hibridación (55), los cuatro conjuntos de perlas multiplex hibridados a las cuatro muestras (58-61), están listos para un lavado de hibridación (53), seguido de incubación con un indicador fluorescente (65) y un lavado de indicador (67). Primero, se agregan 100 µl de amortiguador de lavado a (2X SSC, formamida al 50 %) a cada pocillo, se sella nuevamente la placa y se incuba en la incubadora de agitación con agitación a 1150 rpm a 50 °C durante 20 minutos. El contenido de cada pocillo después se transfiere a una placa de filtro HT de 0,46 µm Millipore (Millipore, Billerica MA). Después, se retira el líquido de cada pocillo mediante vacío utilizando un colector de vacío MSVMHTS00 Millipore. A continuación, se agregan 100 µl de amortiguador de lavado b (2X SSC, detergente Igepal al 0,1 %) a cada pocillo, seguido de otros 20 minutos de incubación con agitación a 50 °C y aspiración de vacío. A continuación, se agregan 100 µl de amortiguador de lavado c (0,2X SSC) a cada pocillo y se repiten los 20 minutos de incubación con agitación a 50 °C, seguido de aspiración de vacío.

Después, se agregan 100 µl de 1X solución Phycolink SA, el indicador de estreptavidina-ficoeritrina (64) a cada pocillo. La presente solución indicadora se elabora a partir de 2 µl de 500X Phycolink SA PJ13S (Prozyme, San Leandro CA) mezclado en 1 ml de diluyente indicador, donde el diluyente es 1X PBS, BSA al 0,1 % y Tween 20 al 0,05 %. La presente solución indicadora se incuba con los conjuntos de perlas multiplex durante 30 minutos a 25 °C y 1050 RPM en la incubadora de agitación. Después de la incubación, se aspira la solución de los pocillos de la placa de filtro utilizando el colector de vacío como en las etapas de lavado anteriores.

Después, se lavan las perlas dos veces (67) con amortiguador de lavado d (66) que es 1X PBS con Tween 20 al 0,01 %. Se agregan 100 µl a cada pocillo de la placa de filtro, después, se aspira por vacío el líquido a través de los filtros en los fondos de los pocillos de la placa. Se agregan 100 µl una segunda vez y se incuban en la incubadora de agitación durante 2 minutos a 25 °C a 1050 RPM. Este segundo lavado no se aspira, sino que se utiliza para suspender las perlas para la lectura.

Los cuatro conjuntos de perlas del ejemplo (68-71) después están listos para la lectura (72) en un sistema Luminex 200 (Luminex Corporation, Austin TX). Las señales y las ID de las perlas de las perlas en cada pocillo se leen en secuencia, y la intensidad de fluorescencia mediana de las primeras 50 perlas de cada ID de perlas (región de perlas) se registra para cada pocillo o muestra, y se muestra el resultado en un archivo de datos (73). No hay pruebas de formación de redes de perlas; el lector Luminex se configura para analizar 50 perlas de cada región y no se registran fallas.

La figura 4 es un diagrama esquemático de una microplaca estándar SBS de 96 pocillos (80), que muestra ubicaciones ejemplares de referencias duplicadas y muestras duplicadas para ejecutar el ensayo en 46 muestras en paralelo. Las hibridaciones duplicadas de cada muestra marcada se pueden utilizar para garantizar la generación de datos en el caso de una falla de sellado de pocillos que produzca evaporación de los reactivos de un único pocillo. Cuando el duplicado no se ve afectado, de todos modos se generan datos de esa muestra. Utilizando el presente enfoque de microplacas y perlas codificadas, un solo técnico de laboratorio puede analizar, por ejemplo, 46 muestras y 2 referencias a la vez, todas por duplicado, con marcaje en un primer día, hibridación durante la noche y lavado y lectura en el segundo día. Alternativamente, el ensayo se puede realizar sin réplicas o con más de dos réplicas. Se muestran duplicados de dos referencias (81 y 82) y duplicados de muestras, y se indica un ejemplo de estos en 83.

La figura 5 es un ejemplo de los datos generados utilizando una muestra de ADN Coriell que tiene una trisomía en el cromosoma 13, sexo masculino. Los números 1 a 55 que se muestran al final de la figura 5 se enumeran en la figura 9.

Este dato se calcula a partir de los valores de fluorescencia mediana para cada región de perlas producidos por el lector Luminex. Los valores promedio de las perlas de control negativo 29, 54 y 56 se restan de todas las otras señales (véase la figura 9). Las señales de nueve clones autosómicos después se correlacionan con las señales de clones correspondientes de los ADN de referencia masculino y femenino. Se calcula un factor de normalización de modo que cuando el factor se aplica a todas las señales de clones autosómicos lleva la relación autosómica promedio a un valor de uno. Este factor de normalización después se aplica a todas las señales para la muestra.

Las relaciones resultantes se grafican y se muestran en la figura 5. Cabe destacar que las relaciones para los clones

del cromosoma 13 se encuentran todas en el intervalo de 1,3 a 1,6, mientras que los clones para los cromosomas 18 y 21, así como los otros clones autosómicos son todos menos uno inferiores a 1,2. La trisomía en el cromosoma 13 resulta fácilmente evidente. Además, la gráfica de relación de la muestra en comparación con la referencia masculina (puntos de datos cuadrados) es efectivamente horizontal a través del cromosoma sexual X e Y. Esta es la respuesta esperada de una muestra masculina. La gráfica de la muestra en comparación con la referencia femenina (puntos de datos en forma de diamante) se desplaza hacia abajo para X y hacia arriba para Y, también como se espera para una muestra masculina.

La figura 6 es un ejemplo de los datos generados utilizando una muestra de ADN Coriell que tiene una trisomía en el cromosoma 18, sexo masculino. Los datos se generan y se grafican como se describió para la figura 5.

La figura 7 es un ejemplo de los datos generados utilizando una muestra de ADN Coriell que tiene una trisomía en el cromosoma 21, sexo femenino. Los datos se generan y se grafican como se describió para la figura 5.

La figura 8 es un ejemplo de los datos generados utilizando una muestra de ADN Coriell que tiene una amplificación de 5 copias del cromosoma X. Los datos se generan y se grafican como se describió para la figura 5.

La figura 9 es una tabla que muestra los clones BAC que tienen insertos de ADN genómico humano utilizados para generar amplicones en los ensayos ejemplares, las ubicaciones en la citobanda y el cromosoma, la secuencia de los oligonucleótidos de control negativos y el ID de la perla (región de la perla Luminex) para el conjunto de perlas en el cual cada sonda de amplicones está inmovilizada. Los puntos graficados numerados de forma secuencial en el eje x de las figuras 5-8 están asociados con los BAC enumerados de arriba a abajo en la figura 9. Los puntos graficados numerados de forma secuencial en el eje x de las figuras 5-8 están asociados con los BAC enumerados de arriba a abajo en la figura 9. BAC RP11-186J16 está inmovilizado a dos regiones de perlas diferentes (42 y 86).

Para un control negativo, se selecciona un oligonucleótido que no tiene homología de secuencia con el genoma humano. Los oligonucleótidos de control negativo específicos que se utilizan son

5' GTCACATGCGATGGATCGAGCTC 3' SEQ ID No. 5
5'CTTTATCATCGTTCCACCTTAAT 3' SEQ ID No. 6
5'GCACGGACGAGGCCGGTATGTT 3' SEQ ID No. 7

Las señales generadas por las tres regiones de perlas 29, 54 y 56 que tienen oligonucleótidos de control negativo unidos se promedian y se restan de todas las otras señales de perlas antes de calcular las relaciones.

1. Un procedimiento para analizar una muestra de ADN que comprende:

proporcionar un primer conjunto de partículas codificadas que comprende partículas codificadas que tienen amplicones unidos, donde los amplicones comprenden secuencias de ácido nucleico aleatorias que juntas representan sustancialmente una primera secuencia de ADN plantilla completa;

hibridar los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra marcado de forma detectable;

hibridar los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de referencia marcado de forma detectable;

detectar una primera señal que indica hibridación específica de los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra marcado de forma detectable y una segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de referencia marcado de forma detectable; y

comparar la primera señal con la segunda señal para detectar diferencias entre la primera y la segunda señal, donde las diferencias entre la primera y la segunda señal indican las diferencias entre el ADN de muestra y el ADN de referencia, mediante lo cual se analiza la muestra de ADN.

2. El procedimiento del punto 1 donde los amplicones tienen una longitud en el intervalo de aproximadamente 500-1200 nucleótidos, inclusive.

3. El procedimiento del punto 1 donde el ADN de muestra marcado de forma detectable es ADN marcado de forma detectable obtenido de un sujeto individual.

4. El procedimiento de la reivindicación 3 donde el ADN de muestra marcado de forma detectable es ADN genómico marcado de forma detectable obtenido de un sujeto individual.

5. El procedimiento del punto 1 donde el ADN de muestra marcado de forma detectable es ADN humano.

6. El procedimiento del punto 1 que además comprende:

- 5 proporcionar un segundo conjunto de partículas codificadas que comprende partículas codificadas que tienen amplicones unidos, donde los amplicones comprenden secuencias de ácido nucleico aleatorias que juntas representan sustancialmente una segunda secuencia de ADN plantilla completa;
hibridar los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra marcado de forma detectable;
10 hibridar los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de referencia marcado de forma detectable;
detectar una primera señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra marcado de forma detectable y una segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de referencia marcado de forma detectable; y
15 comparar la primera señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con la segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas para detectar diferencias entre la primera y la segunda señal, donde las diferencias entre la primera y la segunda señal indican las diferencias entre el ADN de muestra y el ADN de referencia.

7. El procedimiento del punto 6 donde el primer y el segundo conjunto de partículas codificadas se proporcionan en una mezcla y además comprenden:

- 25 asociar la codificación del primer conjunto de partículas codificadas con la primera señal que indica hibridación específica de los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra marcado de forma detectable y una segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones del primer conjunto de partículas codificadas; y
asociar la codificación del segundo conjunto de partículas codificadas con la primera señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas con ADN de muestra marcado de forma detectable y la segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones del segundo conjunto de partículas codificadas.

8. Un procedimiento para analizar ADN de muestra que comprende:

- 35 proporcionar un reactivo multiplex que comprende una mezcla de dos o más conjuntos de partículas codificadas codificadas de modo que cada partícula de cada conjunto de partículas codificadas se pueda distinguir de forma detectable de cada partícula de los otros conjuntos de partículas codificadas, donde las partículas codificadas tienen amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla, donde cada conjunto de partículas codificadas tiene amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla diferente en comparación con los otros conjuntos de partículas codificadas,
hibridar los amplicones unidos con ADN marcado de forma detectable;
hibridar los amplicones unidos con ADN de referencia marcado de forma detectable;
detectar una primera señal que indica hibridación específica de los amplicones con ADN marcado de forma detectable;
45 detectar una segunda señal que indica hibridación específica de los amplicones con ADN de referencia marcado de forma detectable;
identificar las partículas codificadas para asociar la codificación de partículas con la primera señal;
identificar las partículas codificadas para asociar la codificación de partículas con la segunda señal; y
50 comparar la primera señal con la segunda señal para cada conjunto de partículas codificadas, donde las diferencias entre la primera y la segunda señal indican las diferencias entre el ADN de muestra y de referencia, mediante lo cual se analiza el ADN.

9. El procedimiento del punto 8 donde los amplicones unidos a cada conjunto de partículas codificadas comprenden secuencias de ácido nucleico aleatorias que juntas representan sustancialmente una secuencia de ADN plantilla completa, donde la secuencia de ADN plantilla completa es mayor que cada amplicón unido individual.

10. El procedimiento del punto 9 donde la secuencia de ADN plantilla completa tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 20-300 kilobases, inclusive y cada amplicón unido individual comprende una secuencia de ADN idéntica a una parte de la secuencia de ADN plantilla y tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 500-

1200 nucleótidos, inclusive.

11. El procedimiento del punto 8 donde el ADN de muestra marcado de forma detectable es ADN marcado de forma detectable obtenido de un sujeto individual.

5

12. El procedimiento del punto 11 donde el ADN de muestra marcado de forma detectable es ADN genómico marcado de forma detectable obtenido de un sujeto individual.

13. El procedimiento del punto 8 donde el ADN de muestra marcado de forma detectable es ADN humano.

10

14. Un procedimiento para preparar un conjunto de perlas codificadas para analizar el ADN que comprende:

a) realizar una primera reacción de amplificación utilizando un ADN plantilla y cebadores de oligonucleótidos de la primera reacción, donde cada uno de los múltiples cebadores de la primera reacción comprende una secuencia de ADN redundante no específica variable y una secuencia de ADN constante contigua, para producir un primer producto de reacción que comprende primeros amplicones, donde cada primer amplicón individual comprende una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria del ADN plantilla y una secuencia de ADN idéntica a la secuencia de ADN constante de los cebadores de la primera reacción;

15

b) realizar una segunda reacción de amplificación utilizando al menos una parte de los primeros amplicones como ADN plantilla y los cebadores de oligonucleótidos de la segunda reacción, donde los cebadores de oligonucleótidos de la segunda reacción comprenden la secuencia de ADN constante de los cebadores de la primera reacción, para producir un segundo producto de reacción que comprende segundos amplicones, donde cada segundo amplicón individual comprende una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria del ADN plantilla y una secuencia de ADN idéntica a la secuencia de ADN constante de los cebadores de la primera reacción;

20

c) unir los segundos amplicones a la primera pluralidad de partículas codificadas, lo que produce un conjunto de partículas codificadas para analizar el ADN.

25

15. El procedimiento para preparar un reactivo para analizar el ADN del punto 14 donde los cebadores de oligonucleótidos de la segunda reacción además comprenden un grupo funcional para la reacción con una partícula codificada.

30

16. El procedimiento para preparar un reactivo para analizar el ADN del punto 14 que además comprende repetir a)-c) utilizando un segundo ADN plantilla y unir los segundos amplicones obtenidos de ese modo con una segunda pluralidad de partículas codificadas diferentes de forma detectable de la primera pluralidad de partículas codificadas, lo que produce un segundo conjunto de partículas codificadas para analizar el ADN.

35

17. El procedimiento para preparar un reactivo para analizar el ADN del punto 16 que además comprende mezclar el primer conjunto de partículas codificadas con el segundo conjunto de partículas codificadas.

18. El procedimiento para preparar un reactivo para analizar el ADN del punto 16, que además comprende repetir a)-c) utilizando un tercer o posterior ADN plantilla y uniendo los terceros o posteriores amplicones producidos de ese modo con una tercera o posterior pluralidad de partículas codificadas, donde cada una de la tercera o posterior pluralidad de partículas codificadas es diferente de forma detectable de cada una de las otras pluralidades de partículas codificadas, lo que produce un tercer o posterior conjunto de partículas codificadas para analizar el ADN.

40

45

19. El procedimiento para preparar un reactivo para analizar el ADN del punto 18 que además comprende mezclar el primer conjunto de partículas codificadas, el segundo conjunto de partículas codificadas, el tercer conjunto de partículas codificadas y/o un conjunto de partículas codificadas posterior.

20. Un reactivo para analizar el ADN que comprende:

50

una pluralidad de partículas codificadas que tienen amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla, cada amplicón unido individual comprende una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla, donde los amplicones juntos representan sustancialmente el ADN plantilla completo y donde la secuencia de ácido nucleico idéntica a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla de cada amplicón individual es más corta que el ADN plantilla completo.

55

21. El reactivo del punto 20 donde la secuencia de ADN plantilla completa tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 20-300 kilobases, inclusive y cada amplicón unido individual comprende una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla que tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 500-1200 nucleótidos, inclusive.

60

22. Un reactivo multiplex para analizar el ADN que comprende:

una mezcla de dos o más pluralidades de partículas codificadas de modo que las partículas de cada pluralidad de partículas se puedan distinguir de forma detectable de las partículas de cada una de las otras pluralidades de partículas, donde las partículas codificadas tienen amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla, donde cada pluralidad de partículas codificadas tiene amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla diferente en comparación con cada una de las otras pluralidades de partículas codificadas, donde cada amplicón unido individual comprende una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla.

23. Un kit para analizar el ADN que comprende:

una mezcla de dos o más pluralidades de partículas codificadas de modo que las partículas de cada pluralidad de partículas se puedan distinguir de forma detectable de las partículas de cada una de las otras pluralidades de partículas, donde las partículas codificadas tienen amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla, donde cada pluralidad de partículas codificadas tiene amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla diferente en comparación con cada una de las otras pluralidades de partículas codificadas, donde cada amplicón unido individual comprende una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla.

24. Un procedimiento para analizar el ADN sustancialmente como se describe en el presente documento.

25. Un reactivo para analizar el ADN sustancialmente como se describe en el presente documento.

26. Un kit para analizar el ADN sustancialmente como se describe en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PerkinElmer LAS, Inc.
 <120> ENSAYOS DE GANANCIA Y PÉRDIDA GENÓMICA MULTIPLEXADOS
 <130> NEN-23602/16
 <140> 12/055,919
 <141> 2008-03-26
 <150> 60/992,489
 <151> 05/12/2007
 <160> 7
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido redundante
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(16)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 1
 ccgactcgag nnnnnnctag aa 22
 <210> 2
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido redundante
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (11)..(16)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 2
 5 ccgactcgag nnnnnntagg ag 22

 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido redundante
 <220>
 <221> misc_feature
 15 <222> (11)..(16)
 <223> n es a, c, g, o t

 <400> 3
 20 ccgactcgag nnnnnnttct ag 22

 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador

 <400> 4
 30 ggaacagcc cgactcgag 19

 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> oligonucleótido de control

 <400> 5
 40 gtcacatgcg atggatcgag ctc 23

 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> oligonucleótido de control

 <400> 6
 50 cttatcatc gttccacct taat 24

 <210> 7
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> oligonucleótido de control

 <400> 7
 60 gcacggacga ggccggtatg tt 22

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo para analizar el ADN que comprende:
 - 5 una pluralidad de partículas codificadas donde un código detectable está integrado dentro del interior de las partículas, donde la pluralidad de partículas codificadas tiene amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla, cada amplicón unido individual comprende un segmento de ADN derivado de cebadores y una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla, donde los amplicones juntos representan sustancialmente el ADN plantilla completo y donde la secuencia de ácido nucleico idéntica a una
10 parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla de cada amplicón individual es más corta que el ADN plantilla completo.
 2. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1 donde cada amplicón individual de los amplicones tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 500-1200 nucleótidos, inclusive.
15
 3. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde la secuencia de ADN plantilla completa tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 20-300 kilobases, inclusive.
 4. Un reactivo multiplex para analizar el ADN que comprende:
20 una mezcla de dos o más pluralidades de partículas como se definen en la reivindicación 1, donde las partículas están codificadas de modo que las partículas de cada pluralidad de partículas se puedan distinguir mediante detección óptica de las partículas de cada una de las otras pluralidades de partículas, donde las partículas codificadas tienen amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla, donde cada pluralidad
25 de partículas codificadas tiene amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla diferente en comparación con cada una de las otras pluralidades de partículas codificadas, donde cada amplicón unido individual comprende un segmento de ADN derivado de cebadores y una secuencia de ADN idéntica a una parte aleatoria de la secuencia de ADN plantilla.
 - 30 5. El reactivo multiplex de acuerdo con la reivindicación 4 donde cada amplicón individual de los amplicones tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 500-1200 nucleótidos, inclusive.
 6. El reactivo de acuerdo con la reivindicación 4 o 5 donde la secuencia de ADN plantilla completa tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 20-300 kilobases, inclusive.
35
 7. Un kit para analizar el ADN que comprende:
una mezcla de dos o más pluralidades de partículas como se definen en la reivindicación 1, donde las partículas están codificadas de modo que las partículas de cada pluralidad de partículas se puedan distinguir mediante
40 detección óptica de las partículas de cada una de las otras pluralidades de partículas, donde las partículas codificadas tienen amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla, donde cada pluralidad de partículas codificadas tiene amplicones unidos amplificados a partir de una secuencia de ADN plantilla diferente en comparación con cada una de las otras pluralidades de partículas codificadas, donde cada amplicón unido individual comprende un segmento de ADN derivado de cebadores y una secuencia de ADN idéntica a una parte
45 aleatoria de la secuencia de ADN plantilla.
 8. El kit de acuerdo con la reivindicación 7 donde cada amplicón individual de los amplicones tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 500-1200 nucleótidos, inclusive.
 - 50 9. El kit de acuerdo con la reivindicación 7 o 8 donde la secuencia de ADN plantilla completa tiene una longitud en el intervalo de aproximadamente 20-300 kilobases, inclusive.

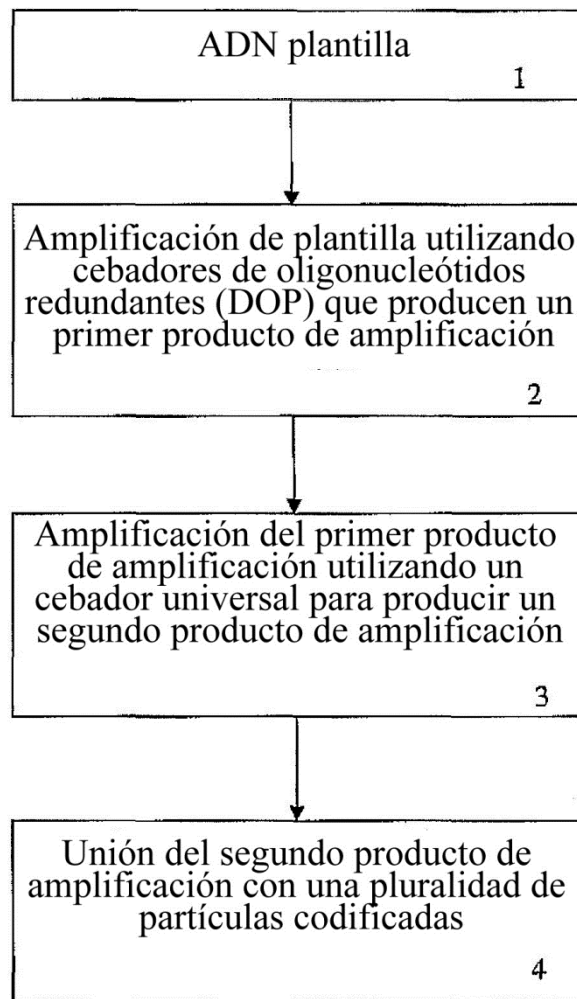


Figura 1

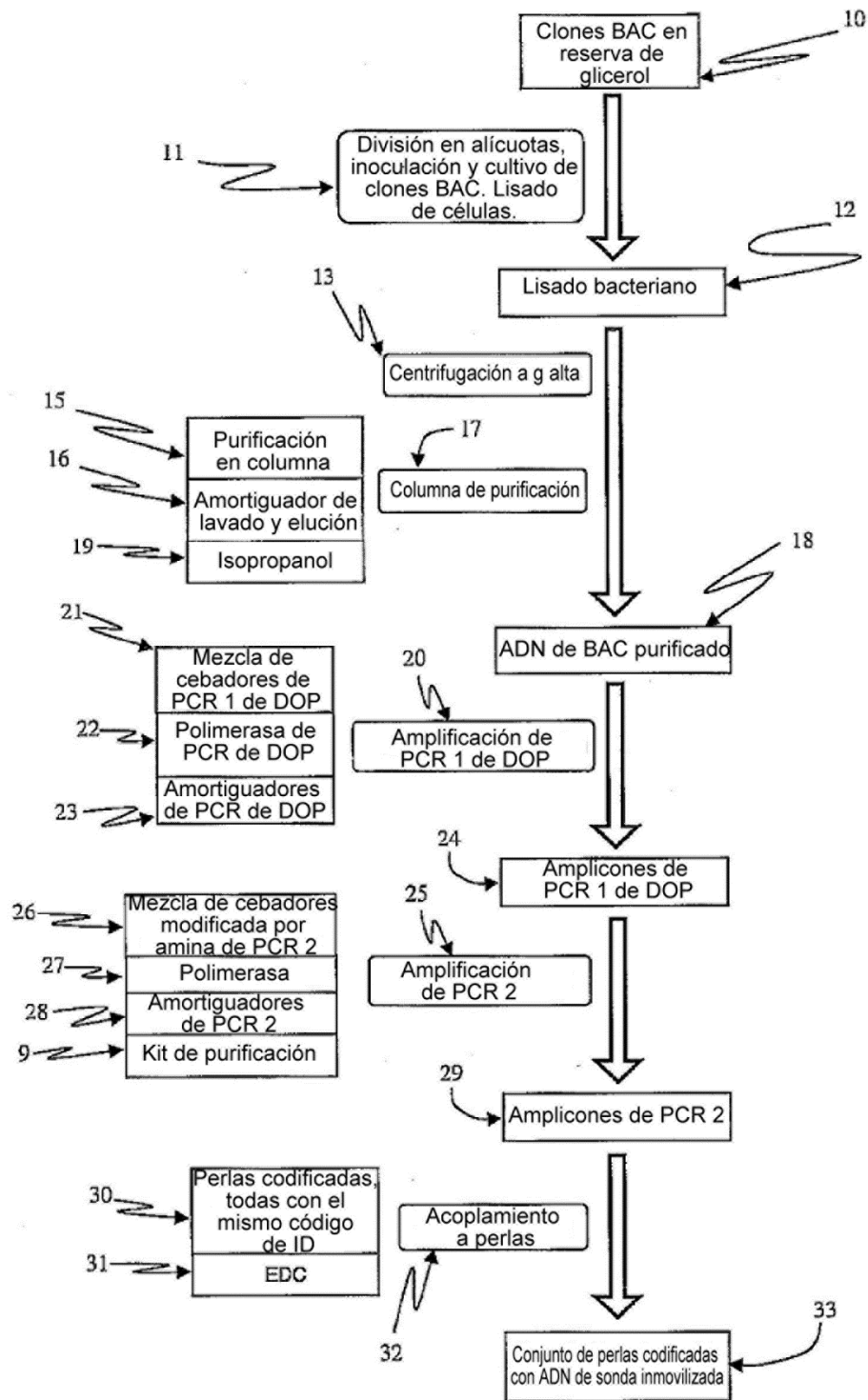


Figura 1A

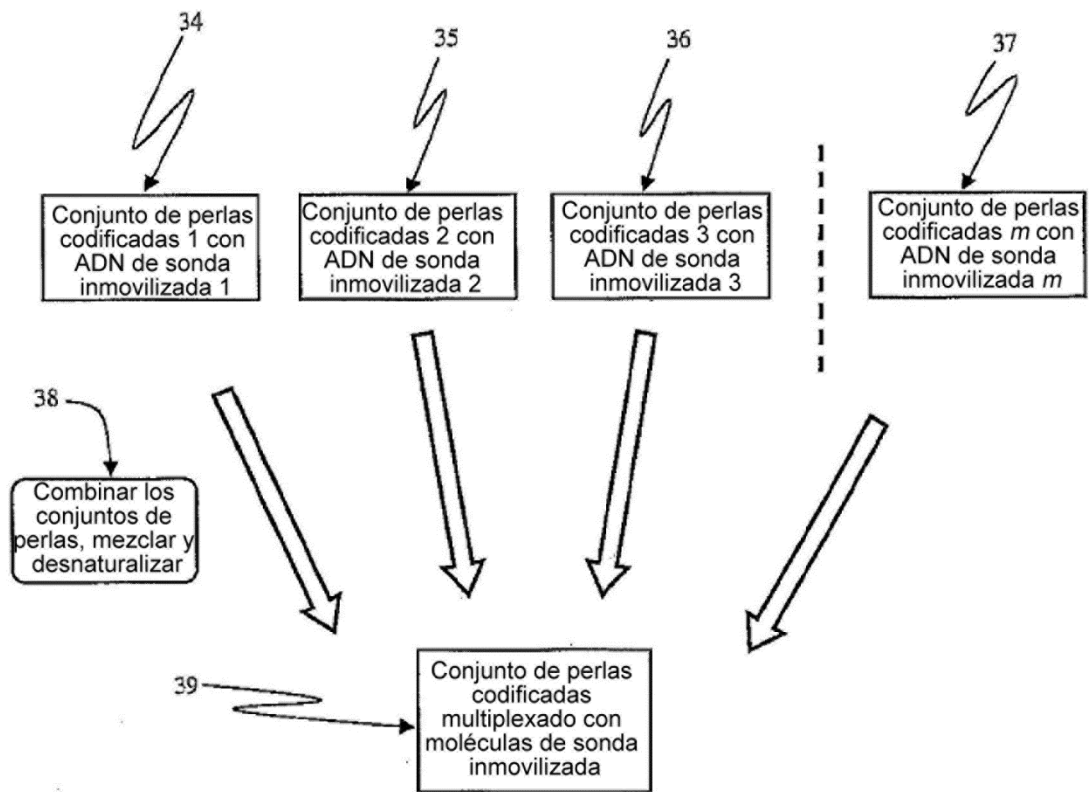


Figura 2

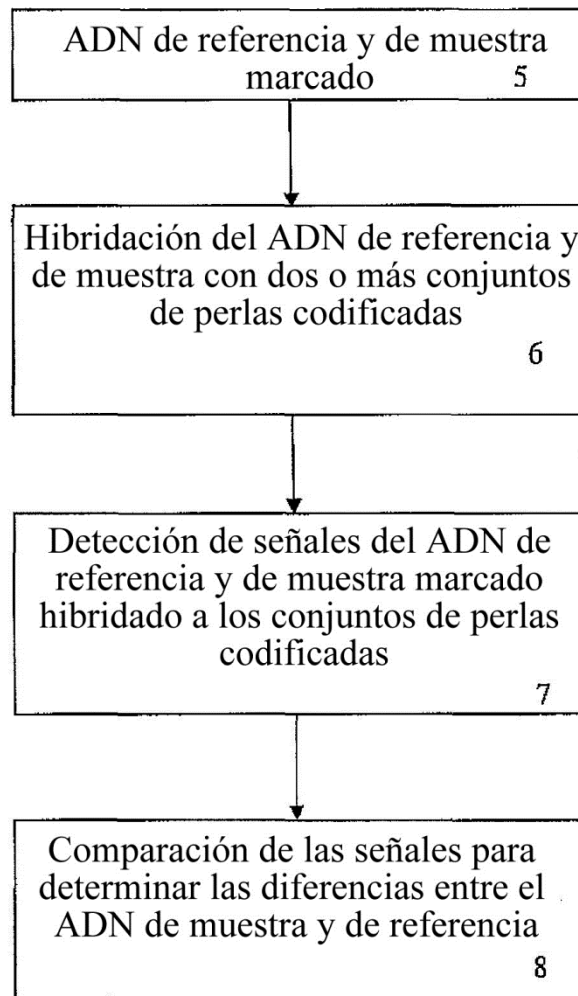


Figura 3

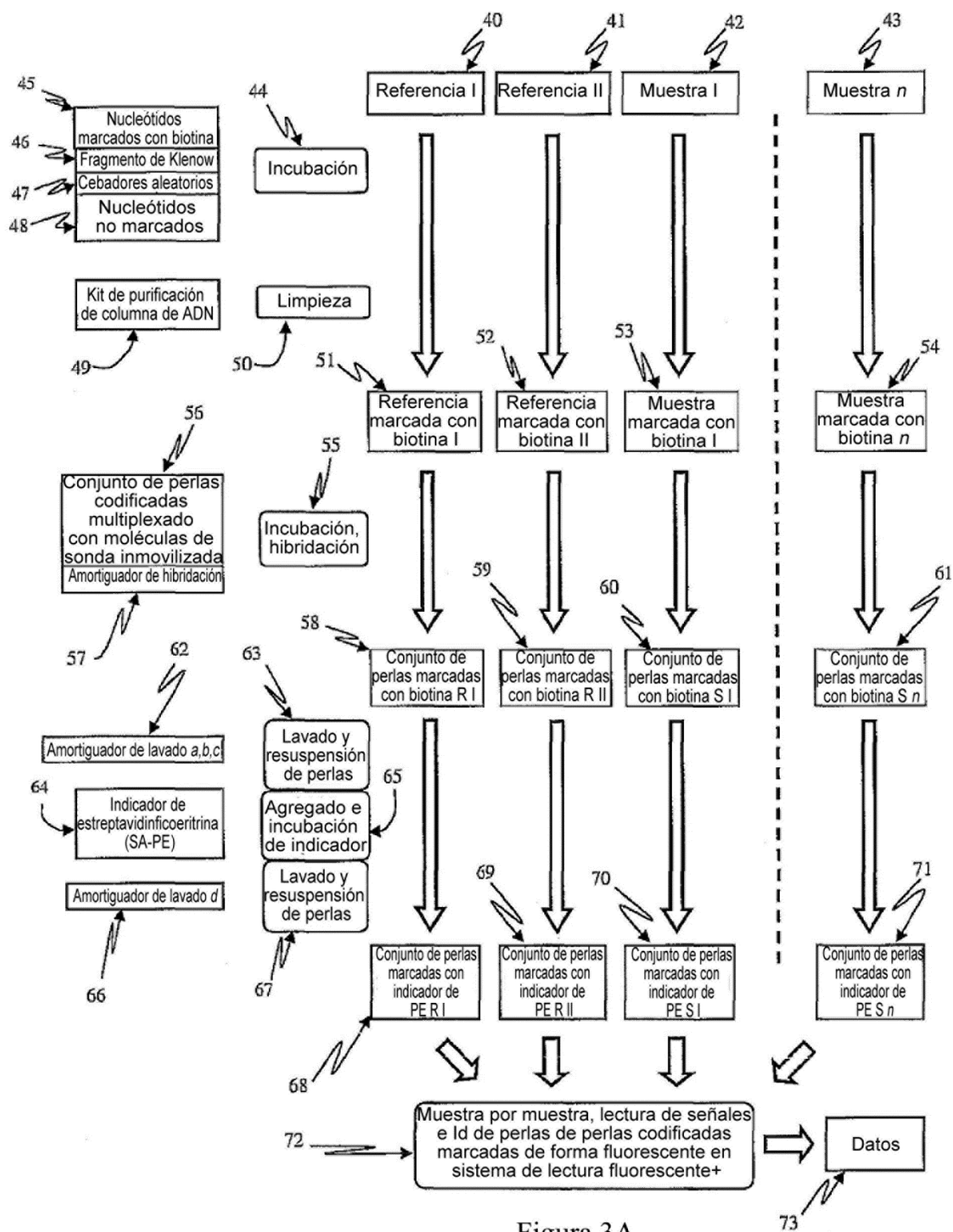


Figura 3A

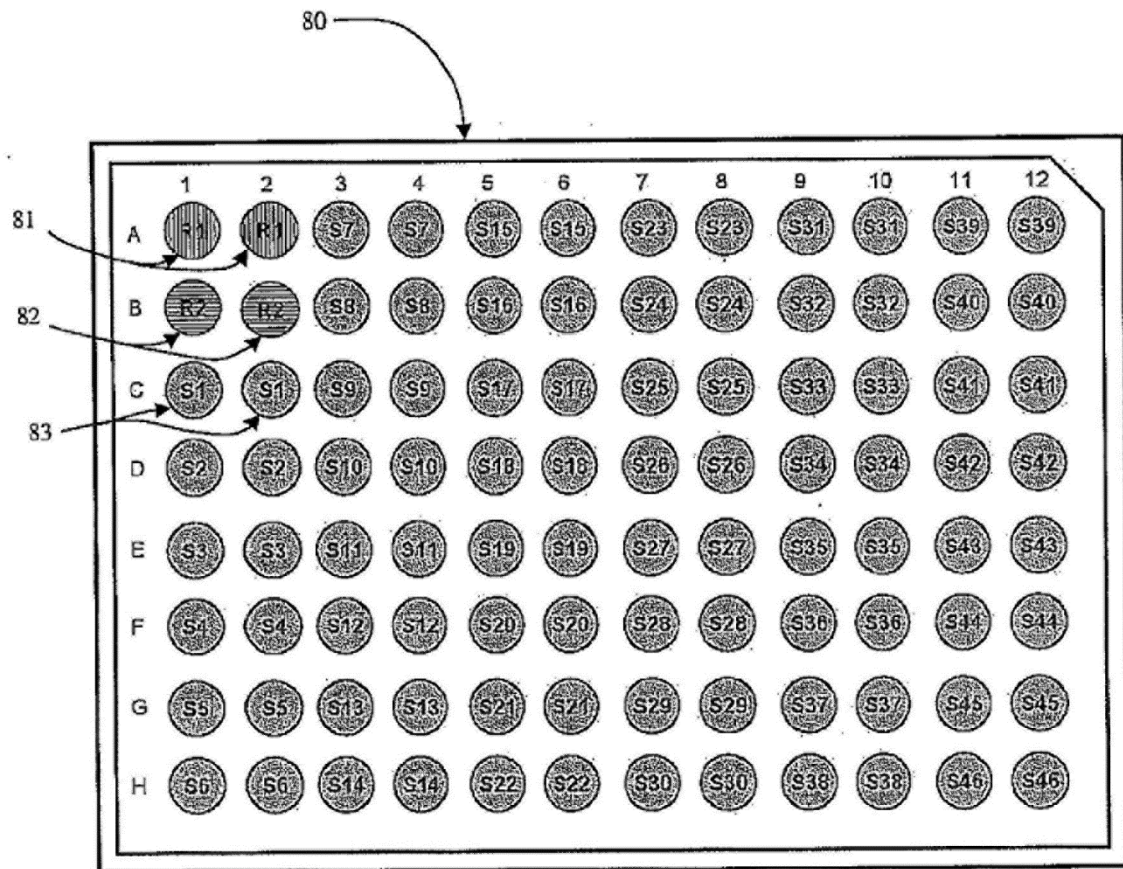


Figura 4

FIG - 5

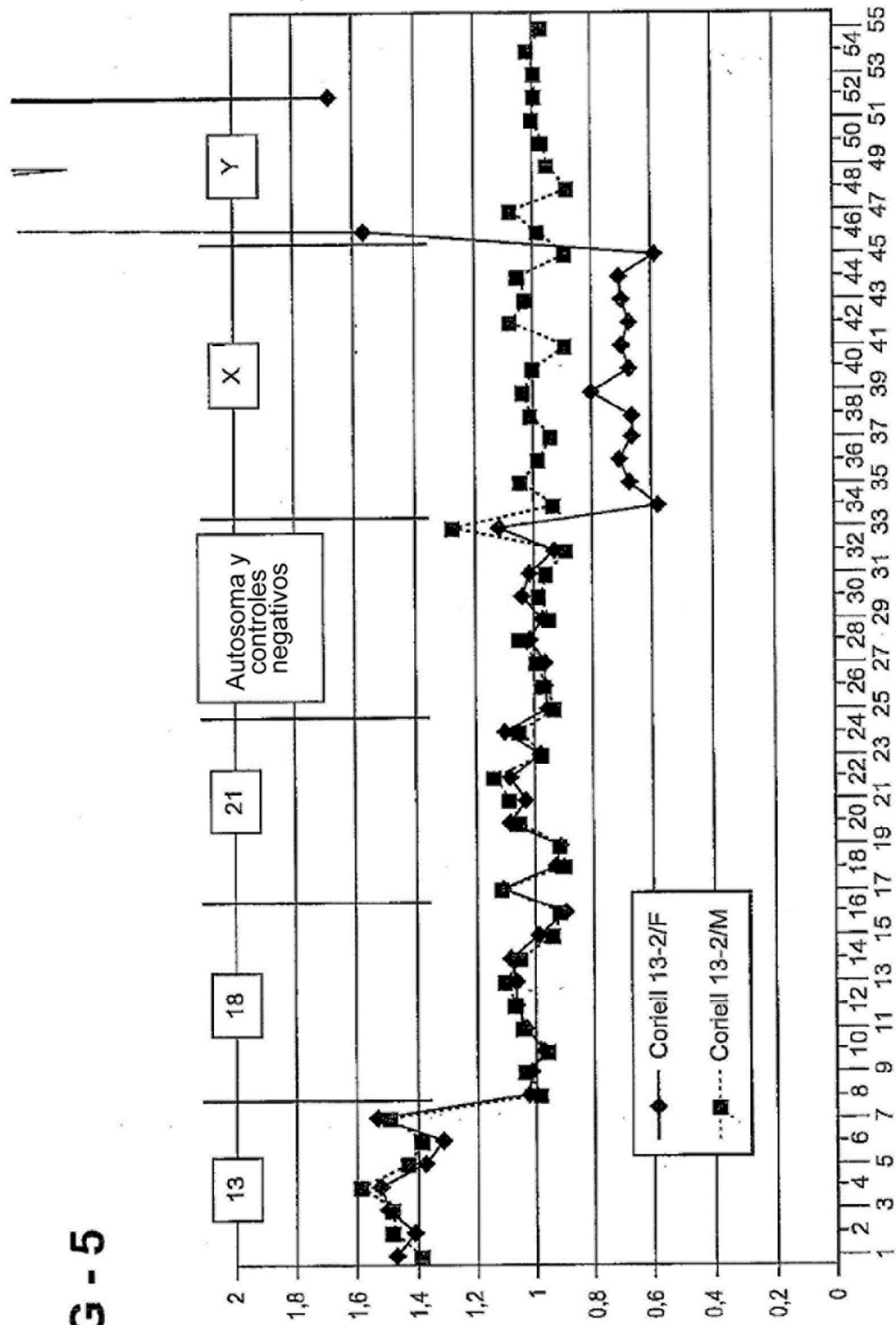
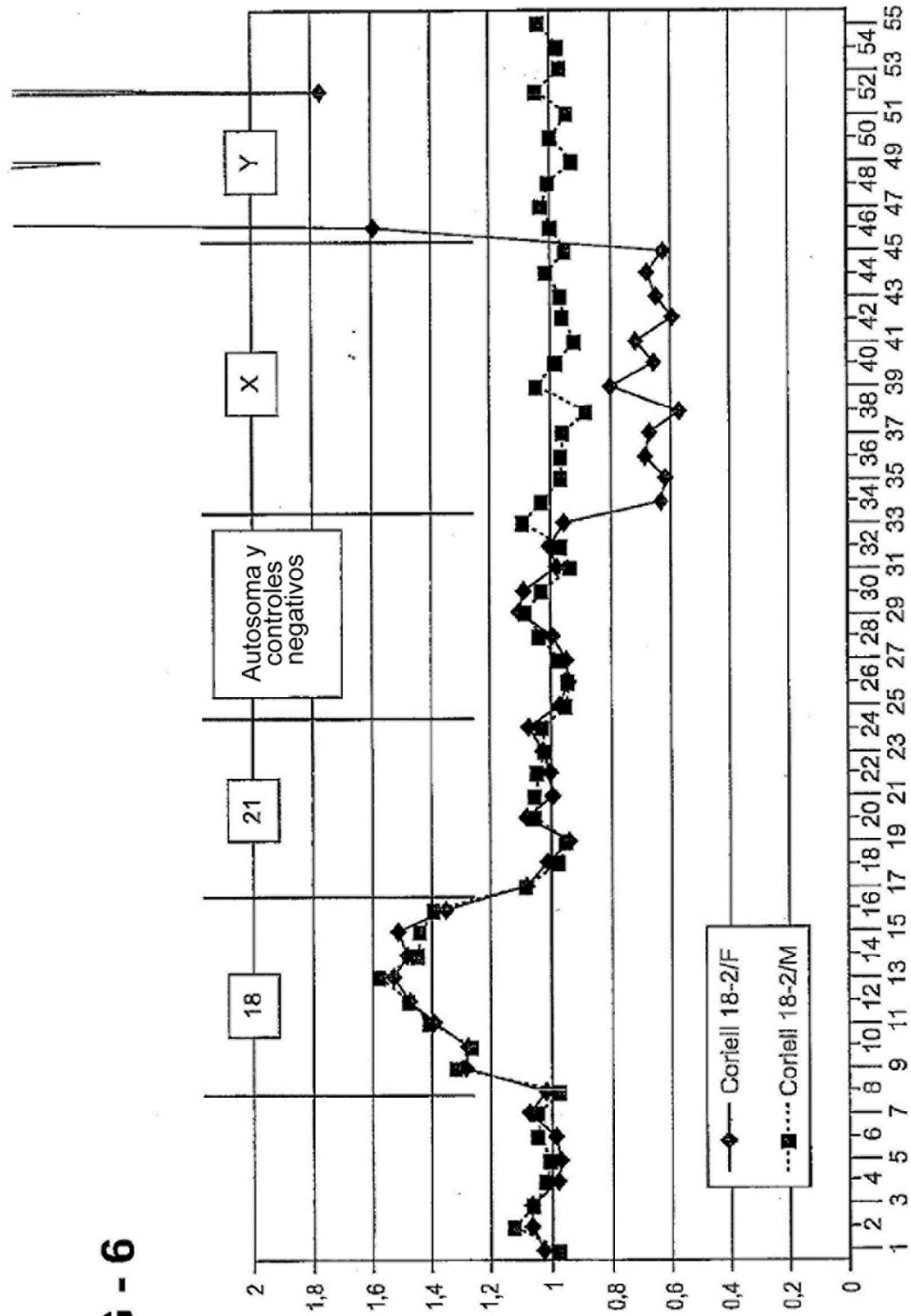


FIG - 6



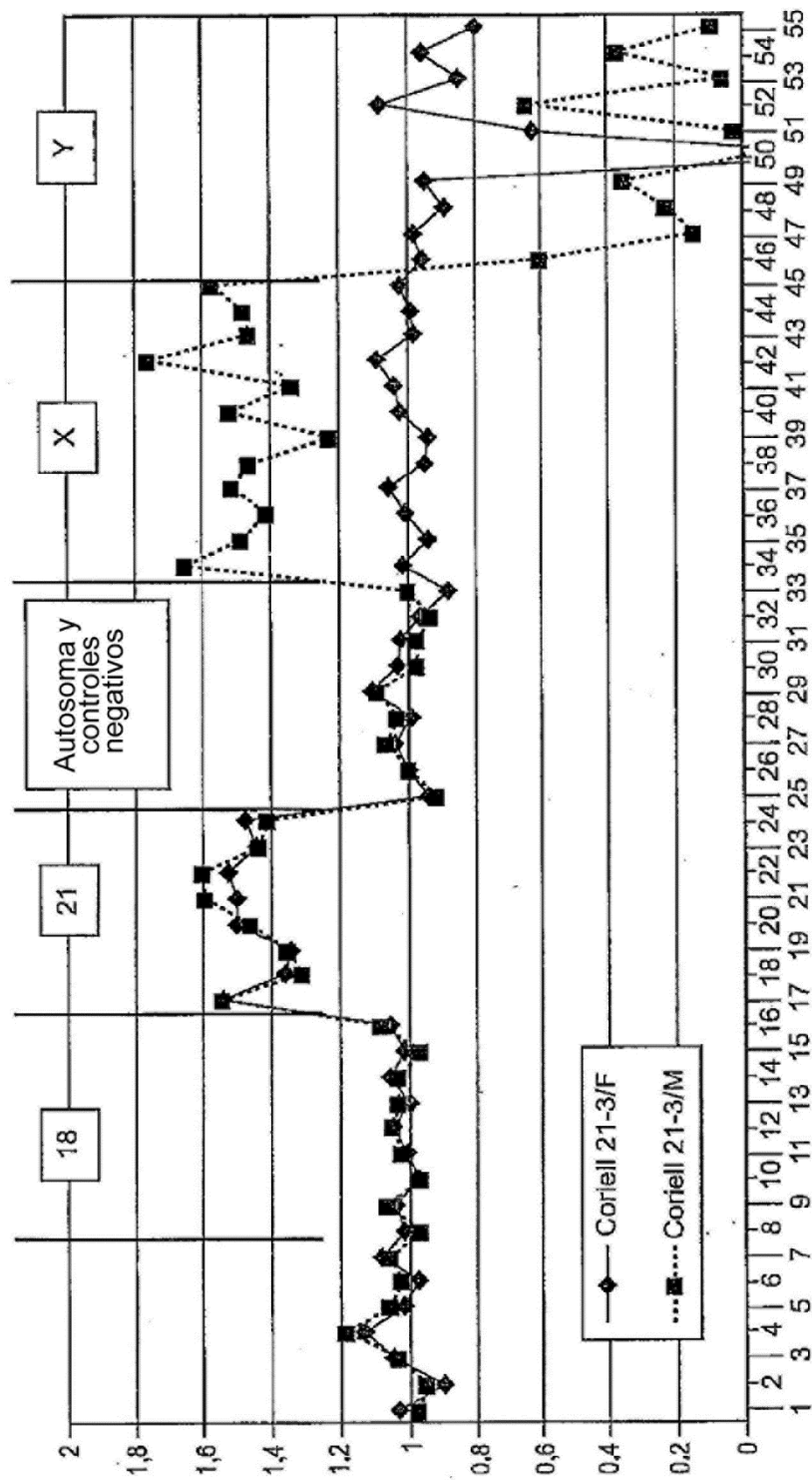


FIG - 7

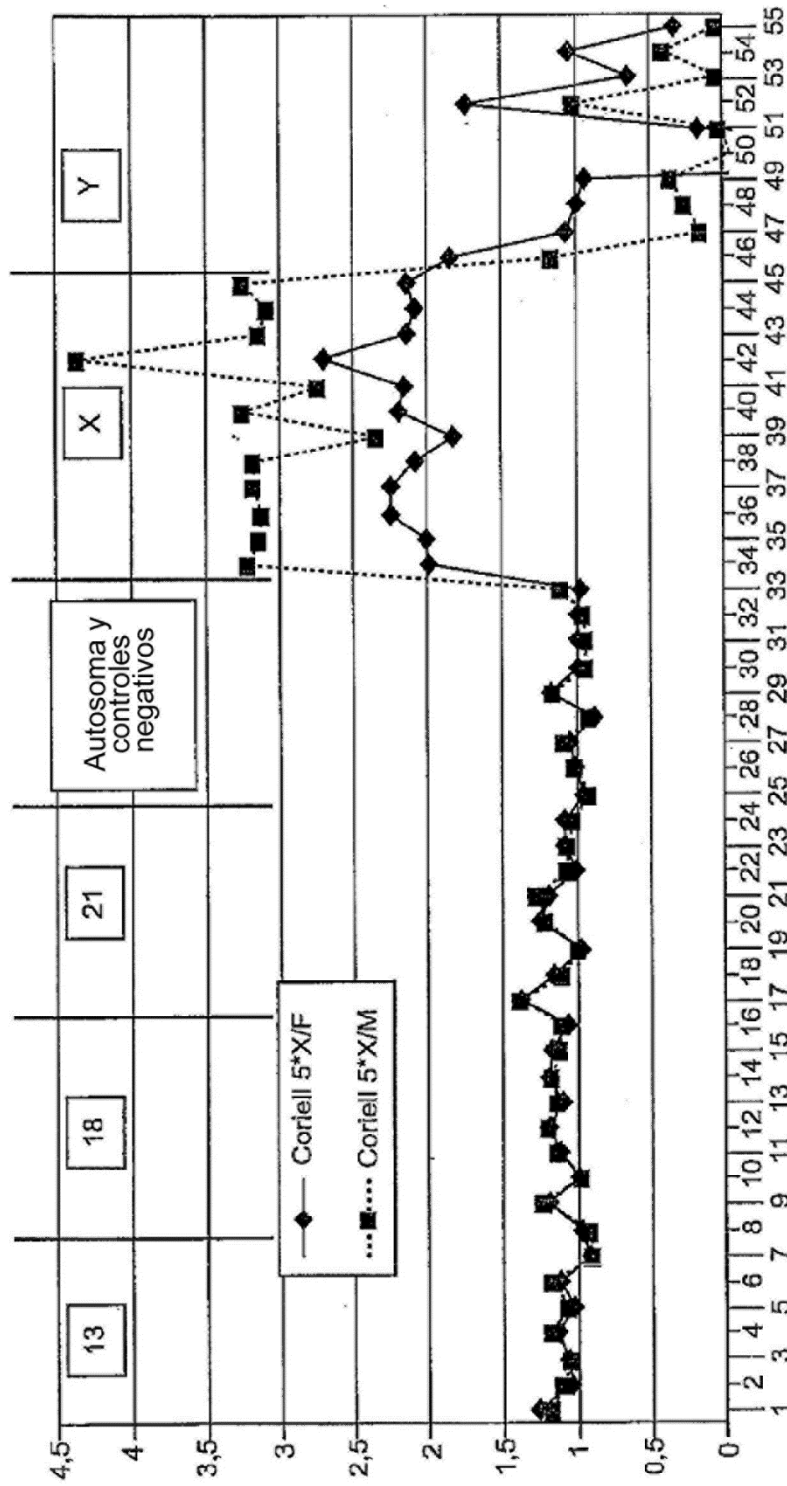


FIG - 8

BAC*	Cromosoma	Ubicación en la citobanda de BAC	ID de perlas
RP11-186J16	13	13q12.3	42
RP11-186J18		13q12.3	86
RP11-117I13		13q12.3	87
RP11-480G1		13q13.1	85
RP11-189B4		13q14.11	83
RP11-174I10		13q14.2	37
RP11-142D16		13q14.3	84
RP11-138D23		13q21.1	34
RP11-411B10	18	18p11.21	88
RP11-55N14		18p11.31	57
RP11-78H1		18p11.32	90
RP11-63N12		18q12.1	45
RP11-63N12		18q12.1	89
RP11-160B24		18q21.2	36
RP11-88B2		18q22	51
RP11-89N1		18q23	48
RP11-108H5	21	21q21.3	35
RP11-147H1		21q21.3	67
RP11-170O20		21q21.3	69
RP11-170O20		21q22.1	47
RP11-79A12		21q22.12	38
RP11-190A24		21q22.12	88
RP11-88N2		21q22.3	58
GS-63-H24		21q22.3	78
RP11-46A10	Autosómico y controles negativos	10q26.3	12
RP11-35P20		11p13	13
RP11-122N11		12p13.33	14
RP11-462G8		16p13.3	6
RP11-698N11		17p11.2	7
RP11-588F7		1q25.2	32
RP11-568F1		22q11.21	8
RP11-416I2		7q11.22	41
RP11-319F4		8p23.1	11
GTCACATGCGATCGATCGAGCTC		Oligo de control negativo	29
CTTTATCATCGTTCCACCTTAAT		Oligo de control negativo	54
GCACGGACGAGGCCGGTATGTT		Oligo de control negativo	56
RP11-380Z3	X	Xp11.23	72
RP11-495K15		Xp21.1-Xp21.1	73
RP11-79B3		Xp22.11	74
RP11-483M24		Xp22.31	75
RP11-589J20		Xp22.31	76
RP11-465E19		Xp11.1-Xp11.23	44
RP11-262J24		Xp11.21	43
RP11-253I23		Xp11.3-Xp11.4	63
RP1-185L21		Xp22.22	66
RP11-963J21		Xq27.3	65
RP11-90N17		Xq11-Xq11	52
RP3-368A4		Xq12-Xq12	53
RP11-400O10	Y	Yp11.31	20
RP11-336F2		Yq11.223	77
RP11-26D12		Yq11.23	17
RP11-392F24		Yq11.222	18
RP11-79J10		Yq11.23	19
RP11-375P13		Yp11.2	64
RP11-112L19		Yp11.31	33
RP11-20H21		Yq11.22	81
RP11-71M14		Yq11.221	46
RP11-214M24		Yq11.23	62

*u oligo de control negativo

Figura 9