

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 512**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2013 PCT/EP2013/074995**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14083118**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2013 E 13801511 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2925883**

54 Título: **Agente oxidante para nucleótidos modificados**

30 Prioridad:

30.11.2012 US 201261731941 P
06.02.2013 US 201361761521 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2018

73 Titular/es:

CAMBRIDGE EPIGENETIX LIMITED (100.0%)
30 Broad Street Great Cambourne
Cambridge CB23 6HJ, GB

72 Inventor/es:

OST, TOBY

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 669 512 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

Agente oxidante para nucleótidos modificados

5 Esta invención se refiere a reactivos, y particularmente agentes oxidantes, para usar en la detección de residuos de citosina modificada y el análisis y/o secuenciación de ácidos nucleicos que contienen residuos de citosina modificada.

10 La 5-metilcitosina (5mC) es una marca de ADN epigenético bien estudiada que tiene una función importante en el silenciamiento génico y en la estabilidad del genoma, y se encuentra enriquecida en dinucleótidos CpG (1). En metazoarios, la 5mC puede oxidarse a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) mediante la familia de enzimas de translocación diez-once (TET) (2, 3). Los niveles globales de 5hmC son apenas 10 veces más bajos que aquellos de 5mC y varían entre los tejidos (4). Cantidades relativamente altas de 5hmC (~0.4 % de todas las citosinas) se presentan en las células madres embrionarias (ES), donde 5hmC, se sugiere, tiene una función en el establecimiento y/o mantenimiento de la pluripotencia (2,3, 5-9). Se propone que 5hmC es un intermediario en la desmetilación activa del ADN, por ejemplo, mediante la desaminación o mediante una oxidación adicional de 5hmC a 5-formilcitosina (5fC) y 5-carboxicitosina (5cC) por las enzimas TET, seguido de la reparación por escisión de base que involucra a la timina ADN glicosilasa (TDG), o un fallo para mantener la marca durante la replicación (10). Sin embargo, 5hmC puede, además, constituir una marca epigenética *por sí misma*.

20 Es posible detectar y cuantificar el nivel de 5hmC presente en todo el ADN genómico mediante métodos analíticos que incluyen la cromatografía de capa fina y la cromatografía líquida en tándem seguida de espectrometría de masas (2, 11, 12). Hasta el momento, el mapeo de las localizaciones genómicas de 5hmC se logró mediante métodos de enriquecimiento que usan química o anticuerpos para la precipitación específica de los fragmentos de ADN ricos en 5hmC que se secuencian posteriormente (6-8, 13-15). Estos enfoques de precipitación tienen una resolución relativamente pobre (10s a 100s de nucleótidos) y solamente proporcionan una cantidad relativa de información que es probable sean propensos a sesgo de distribución durante el enriquecimiento. La secuenciación de un solo nucleótido cuantificable de 5mC se ha realizado mediante el uso del método de secuenciación por bisulfito (BS-Seq), que aprovecha la desaminación mediada por bisulfito de citosina a uracilo para la que la transformación correspondiente de 5mC es mucho más lenta (16). Sin embargo, se reconoce que tanto 5mC como 5hmC se desaminan muy lentamente en la reacción del bisulfito y por tanto, esas dos bases no pueden discriminarse (17, 18). Dos métodos de molécula únicas, relativamente nuevos y elegantes, demuestran ser promisorios en la detección de 5mC y 5hmC con una resolución de un solo nucleótido. La secuenciación de una sola molécula en tiempo real (SMRT) demostró detectar derivados de 5hmC en ADN genómico (19). Sin embargo, se requiere el enriquecimiento de fragmentos de ADN que contienen 5hmC, lo cual conduce a la pérdida de información cuantitativa (19). La 5mC puede detectarse, aunque con una exactitud más baja, mediante SMRT (19). Además, la SMRT tiene una tasa de errores de secuenciación relativamente alta (20), el máximo de lecturas de las modificaciones es impreciso (19) y la plataforma aún no secuenció un genoma completo. Los nanoporos de estado sólido y de proteínas pueden diferenciar 5mC de 5hmC y tienen el potencial para secuenciar moléculas de ADN no amplificadas con un desarrollo ulterior (21, 22).

40 Se ha informado el mapeo cuantitativo de 5hmC y 5mC en ADN genómico en una resolución de un solo nucleótido mediante el uso de los métodos de secuenciación con "bisulfito oxidativo" (oxBS-Seq) (23). Estos métodos implican la oxidación específica de 5hmC a 5fC mediante el uso de perrutenato de potasio (KRuO₄).

45 Los presentes inventores han reconocido que los complejos oxo metálicos (VI), tales como rutenato, pueden ser útiles para catalizar la oxidación selectiva de residuos de 5hmC en polinucleótidos con residuos de 5fC. Esto puede ser útil, por ejemplo, en métodos de análisis y secuenciación con "bisulfito oxidativo".

50 Un aspecto de la descripción proporciona un método de identificación de un residuo de citosina modificada en una secuencia de nucleótidos de la muestra que comprende:

(i) proporcionar una población de polinucleótidos los cuales comprenden la secuencia de nucleótidos de la muestra,
 (ii) tratar una primera porción de dicha población con un complejo oxo metálico (VI),
 (iii) tratar dicha primera porción de dicha población y una segunda porción de dicha población con bisulfito, y
 (iv) identificar los residuos en la primera y segunda secuencias de nucleótidos que corresponden con un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra.

En algunas modalidades, el residuo puede identificarse por secuenciación. Por ejemplo, un método para identificar un residuo de citosina modificada en una secuencia de nucleótidos de la muestra se describe así:

60 (i) proporcionar una población de polinucleótidos los cuales comprenden la secuencia de nucleótidos de la muestra,
 (ii) tratar una primera porción de dicha población con un complejo oxo metálico (VI),
 (iii) tratar dicha primera porción de dicha población y una segunda porción de dicha población con bisulfito,
 (iv) secuenciar los polinucleótidos en la primera y segunda porciones de la población por medio de las etapas ii) y iii) para producir una primera y segunda secuencias de nucleótidos, respectivamente e;
 65 (v) identificar el residuo en la primera y segunda secuencias de nucleótidos que corresponden a un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra

Los métodos de secuenciación adecuados se conocen bien en la técnica y se describen con mayor detalle más abajo.

5 Los residuos identificados en la primera y segunda secuencias de nucleótidos pueden ser indicativos de una citosina modificada en la posición correspondiente en la secuencia de nucleótidos de la muestra, es decir, la presencia de una citosina modificada en una posición en la secuencia de nucleótidos de la muestra puede determinarse a partir de la identidad de los residuos que se localizan en la misma posición en la primera y segunda secuencias de nucleótidos.

10 Por ejemplo, los residuos de citosina pueden presentarse en una o más posiciones en la secuencia de ácidos nucleicos de la muestra. Pueden identificarse los residuos en las posiciones correspondientes en la primera y segunda secuencias de nucleótidos. La presencia de una modificación, por ejemplo, una sustitución en 5, tal como sustitución 5-metil o 5-hidroximetil, sobre una citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra puede determinarse a partir de la combinación de residuos que se identifican en la primera y segunda secuencias de nucleótidos, respectivamente (es decir C y C, U y U, C y U, o U y C) en la posición de la citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra. Las modificaciones de citosina que se indican por combinaciones diferentes se muestran en la Tabla 1.

20 El tratamiento con el complejo oxo metálico (VI) oxida los residuos de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) en la primera porción de polinucleótidos a residuos de 5-formilcitosina (5fC). Los residuos de 5fC en la primera porción de polinucleótidos se convierten subsecuentemente en uracilo mediante el tratamiento con bisulfito de la etapa (iii). En algunas modalidades, el tratamiento con el complejo oxo metálico (VI) puede oxidar además algo o la totalidad de los residuos de 5-formilcitosina (5fC) a residuos de 5-carboxilcitosina (5caC). Los residuos de 5fC en la primera porción de polinucleótidos se convierten además en uracilo mediante el tratamiento con bisulfito de la etapa (iii).

25 Un complejo oxo metálico (VI) comprende un átomo de metal (M) en el estado de oxidación +6 coordinado con uno o más átomos de oxígeno.

30 El átomo de metal (VI) puede ser tri o tetraordinado, es decir, el átomo M6+ puede coordinarse con tres átomos de oxígeno (por ejemplo, óxido de renio Rh(VI)O_3) o cuatro átomos de oxígeno en un oxianión (por ejemplo, rutenato Ru(VI)O_4^{2-}).

En modalidades preferidas, el átomo de metal (VI) se coordina con cuatro átomos de oxígeno (MO_4^{2-}) en un oxianión, preferentemente con geometría tetraédrica. Los complejos oxo metálicos (VI) adecuados incluyen manganato (Mn(VI)O_4^{2-}), o rutenato (Ru(VI)O_4^{2-}).

35 En modalidades preferidas, el complejo oxo metálico (VI) es rutenato (Ru(VI)O_4^{2-}).

Los complejos oxo metálicos pueden prepararse por cualquier técnica adecuada y están disponibles diversos métodos en la técnica.

40 Por ejemplo, un complejo oxo metálico (VI) (M(VI)O_4^{2-}) adecuado para usar en la oxidación de hmC puede producirse por reducción del complejo oxo metálico (VII) o complejo oxo metálico (VIII) correspondientes (por ejemplo M(VII)O_4^- o M(VIII)O_4). Puede emplearse cualquier protocolo de reducción adecuado, por ejemplo, calentamiento o tratamiento con iones hidróxido o peróxido. Los complejos oxo metálicos (VI) adecuados (M(VI)O_4^{2-}) pueden producirse, además, por oxidación de óxidos metálicos y de complejos oxo (por ejemplo, MO_2)

45 El rutenato (Ru(VI)O_4^{2-}) puede prepararse convenientemente por reducción de perrutenato (Ru(VII)O_4^-) o de tetróxido de rutenio (Ru(VIII)O_4), por ejemplo, mediante el uso de yoduro, hidróxido (OH^-), peróxido (O_2^{2-}) o por calentamiento. El rutenato puede prepararse convenientemente mediante la oxidación de complejos de Ru, por ejemplo mediante el uso de KMnO_4 o HClO (hipoclorito). El rutenato (Ru(VI)O_4^{2-}) además puede prepararse a partir de trióxido de rutenio (RuO_3), por ejemplo, mediante el uso de base acuosa y persulfato.

50 El manganato (Mn(VI)O_4^{2-}), puede prepararse convenientemente por reducción de permanganato (Mn(VII)O_4^-) mediante el uso de hidróxido (OH^-), peróxido (O_2^{2-}) o por calentamiento.

55 Ejemplos de métodos adecuados para la preparación de complejos oxo de rutenato (VI) y complejos oxo de manganato (VI) se describen con más detalle más abajo.

Los complejos oxo metálicos (VI) además pueden obtenerse de fuentes comerciales (por ejemplo, de Alfa Aesar, MA Estados Unidos; de Sigma Aldrich, Estados Unidos).

60 El tratamiento con el complejo oxo metálico (VI) oxida selectivamente los residuos de 5-hidroximetilcitosina en la primera porción de la población de polinucleótidos a residuos de 5-formilcitosina. Sustancialmente ninguna otra funcionalidad en el polinucleótido se oxida por el complejo oxo metálico (VI). Por tanto, el tratamiento no resulta en la reacción de cualesquiera residuos de timina o de 5-metilcitosina, donde aquellas estén presentes.

65

- 5 La primera porción de polinucleótidos puede tratarse con el complejo oxo metálico (VI) en una concentración suficiente para oxidar de forma selectiva residuos de 5-hidroximetilcitosina en los polinucleótidos. Las concentraciones adecuadas del complejo oxo metálico (VI) para la oxidación selectiva de 5-hidroximetilcitosina puede determinarse fácilmente mediante el uso de técnicas estándar. Por ejemplo, puede emplearse 0,1 mM a 10 mM y con la máxima preferencia aproximadamente 1 mM de rutenato.
- 10 Típicamente, los complejos oxo metálicos (VI) para usar en los métodos descritos en la presente descripción, se almacenan en soluciones de reserva concentradas, que pueden tener, por ejemplo, una concentración que es de 5 veces, 10 veces, 100 veces, 150 veces o 500 veces mayor que la concentración usada para tratar la primera porción de polinucleótidos. Una solución de reserva típica puede ser de 100 mM a 150 mM.
- 15 La oxidación de residuos de hmC por el complejo oxo metálico (VI), no degrada o daña los polinucleótidos en la primera porción en un grado que impida la subsiguiente amplificación y/o secuenciación de la primera porción, es decir, la primera porción incluye suficientes polinucleótidos intactos o no dañados después del tratamiento con el complejo oxo metálico (VI), como para permitir la amplificación y/o secuenciación y que no esté totalmente degradado.
- 20 Preferentemente, el complejo oxo metálico (VI) no produce ninguna degradación o daño, o produce una degradación o daño mínimos a los polinucleótidos en la primera porción, o no provoca una degradación o daño sustancial a los polinucleótidos.
- 25 El daño o degradación de polinucleótidos puede incluir escisión de enlace fosfodiéster; defosforilación y/o despurinación del extremo 5'. El tratamiento con el complejo oxo metálico (VI) puede no causar una escisión sustancial del enlace fosfodiéster; ni defosforilación de 5'; ni despirimidinación y/o despurinación de los polinucleótidos en la primera porción y, preferentemente, causa mínima o ninguna escisión del enlace fosfodiéster; de defosforilación y/o de despurinación en 5'.
- 30 El tratamiento con el complejo oxo metálico (VI) puede resultar en la formación de algún producto de 5-carboxicitosina correspondiente, así como también, de 5-formilcitosina. La formación de este producto no influye negativamente en los métodos de identificación descritos en la presente descripción. Bajo las condiciones de la reacción de bisulfito que se usan para convertir 5-formilcitosina en uracilo, se observa que también 5-carboxicitosina se convierte en uracilo. Se comprende que una referencia a 5-formilcitosina que se obtiene por oxidación de 5-hidroximetilcitosina puede ser una referencia a un producto que, además, comprende 5-carboxicitosina que se obtiene, además, mediante esa oxidación.
- 35 Ventajosamente, las condiciones de tratamiento además pueden conservar los polinucleótidos en un estado desnaturalizado, es decir, pueden emplearse condiciones desnaturalizantes. Las condiciones adecuadas causan desnaturalización de los polinucleótidos sin causar daño o degradación. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden tratarse con el complejo oxo metálico (VI) bajo condiciones alcalinas, tales como 50 mM a 500 mM de NaOH o 50 mM a 500 mM de KOH.
- 40 Los polinucleótidos en la primera porción pueden purificarse, a continuación del tratamiento con el complejo oxo metálico (VI). La purificación puede realizarse mediante el uso de cualquier técnica conveniente para la purificación de ácidos nucleicos. Las técnicas adecuadas para la purificación de ácidos nucleicos incluyen la cromatografía en columnas de centrifugación.
- 45 Los polinucleótidos pueden someterse a tratamiento repetido adicional con el complejo oxo metálico (VI). Tales etapas se acometen para maximizar la conversión de 5-hidroximetilcitosina a 5-formilcitosina. Esto puede necesitarse donde un polinucleótido tiene suficiente estructura secundaria que es capaz de volver hibridarse. Cualquier porción hibridada del polinucleótido puede limitar o impedir el acceso del complejo oxo metálico (VI) a esa porción de la estructura, lo cual tiene el efecto de proteger la 5-hidroxicitosina de la oxidación.
- 50 En algunas modalidades, la primera porción de la población de polinucleótidos puede, por ejemplo, someterse a múltiples ciclos de tratamiento con el complejo oxo metálico (VI) seguido de la purificación. Por ejemplo, pueden realizarse uno, dos, tres, o más de tres ciclos.
- 55 A continuación del tratamiento con el complejo oxo metálico (VI) y de la purificación opcional, la primera porción de la población se trata después con bisulfito. Una segunda porción de la población que no se ha oxidado se trata, además, con bisulfito.
- 60 El tratamiento con bisulfito convierte en uracilo ambos residuos de citosina y 5-formilcitosina en un polinucleótido. Como se estableció anteriormente, donde esté presente cualquier 5-carboxicitosina (como un producto de la etapa de oxidación), esta 5-carboxicitosina se convierte en uracilo en el tratamiento con bisulfito. Sin desear estar ligado a la teoría, se cree que la reacción de 5-formilcitosina ocurre a través de la pérdida del grupo formilo hasta producir citosina, seguido de una desaminación subsecuente para dar uracilo. Se cree que 5-carboxicitosina produce uracilo a través de una secuencia de etapas de descarboxilación y desaminación. El tratamiento con bisulfito puede realizarse bajo condiciones que conviertan tanto a la citosina como a los residuos de 5-formilcitosina o 5-carboxicitosina del polinucleótido, en uracilo, como se describe en la presente descripción.
- 65

5 Los polinucleótidos pueden tratarse con bisulfito por incubación con iones bisulfito (HSO_3^{2-}). El uso de los iones de bisulfito (HSO_3^{2-}), para convertir las citosinas no metiladas en los ácidos nucleicos en uracilo, es común en la técnica y los reactivos y condiciones adecuadas se conocen bien por un experto en la técnica (52-55). Numerosos protocolos y reactivos están, además, disponibles comercialmente (por ejemplo, EpiTect™, Qiagen NL; EZ ADN Methylation™ Zymo Research Corp CA; CpGenome Turbo Bisulfite Modification Kit; Millipore).

10 Una característica de los métodos de OxBS es la conversión de citosina no metilada (que puede generarse in situ a partir de 5-formilcitosina o 5-carboxicitosina) en uracilo. Esta reacción se logra típicamente a través del uso de bisulfito. Sin embargo, en los aspectos generales de la invención, cualquier reactivo o condiciones de reacción pueden usarse para efectuar la conversión de citosina en uracilo. Tales reactivos o condiciones se seleccionan de manera que poca o ninguna 5-metilcitosina reaccione, y más específicamente, de manera que poca o ninguna 5-metilcitosina reaccione para formar uracilo. El reactivo, u opcionalmente un reactivo adicional, pueden, además, efectuar la conversión de 5-formilcitosina o 5-carboxicitosina en citosina o uracilo.

15 A continuación de la incubación con iones bisulfito, las porciones de polinucleótidos pueden inmovilizarse, lavarse, desulfonarse, eluirse y/o tratarse de cualquier otra manera según se requiera.

20 Los métodos que usan complejos oxo metálicos (VI) como se describe en la presente descripción pueden ser útiles para identificar y/o distinguir citosina (C), 5-metilcitosina (5mC), 5-hidroximetilcitosina (5hmC) en una secuencia de nucleótidos de la muestra. Por ejemplo, los métodos pueden ser útiles para distinguir un residuo del grupo que consiste en citosina (C), 5-metilcitosina (5mC) y 5-hidroximetilcitosina (5hmC) de otros residuos en el grupo.

25 Preferentemente, los residuos de citosina modificada, tal como 5-hidroximetilcitosina, en la primera porción de dicha población no se marcan, por ejemplo, con grupos sustituyentes, tal como la glucosa, antes de la etapa ii) de oxidación o reducción.

30 La identificación de un residuo, en una posición en una o en ambas de la primera y segunda secuencias de nucleótidos, como la citosina, en una o en ambas de la primera y la segunda secuencias de nucleótidos indica que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra es 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina.

35 La 5-hidroximetilcitosina (5hmC) puede identificarse en la secuencia de nucleótidos de la muestra. Un residuo de uracilo en una posición en la primera secuencia de nucleótidos que corresponde a una citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra y una citosina en la misma posición en la segunda secuencia de nucleótidos indican que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra es 5-hidroximetilcitosina (5hmC).

40 Un método de identificación de un residuo de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) en una secuencia de nucleótidos de la muestra o para distinguir 5-hidroximetilcitosina de citosina (C), 5-metilcitosina, y 5-formilcitosina (5fC) en una secuencia de nucleótidos de la muestra puede comprender;

45 (i) proporcionar una población de polinucleótidos los cuales comprenden la secuencia de nucleótidos de la muestra, (ii) tratar la primera porción de dicha población con un complejo oxo metálico (VI), (iii) tratar dicha primera porción de dicha población y una segunda porción de dicha población con bisulfito, y; (iv) identificar el residuo en la primera y segunda porciones de dicha población en la misma posición que un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra,

en donde la presencia de un residuo de uracilo en la primera porción y una citosina en la segunda porción indican que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra es 5-hidroximetilcitosina.

50 Por ejemplo, un método de identificación de un residuo de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) en una secuencia de nucleótidos de la muestra o para distinguir 5-hidroximetilcitosina de citosina (C), de 5-metilcitosina, y de 5-formilcitosina (5fC) en una secuencia de nucleótidos de la muestra puede comprender:

55 (i) proporcionar una población de polinucleótidos los cuales comprenden la secuencia de nucleótidos de la muestra, (ii) tratar la primera porción de dicha población con un complejo oxo metálico (VI), (iii) tratar además dicha primera porción de dicha población y una segunda porción de dicha población con bisulfito, (iv) secuenciar los polinucleótidos en la primera y segunda porciones de la población por medio de las etapas ii) y iii) para producir una primera y segunda secuencias de nucleótidos, respectivamente e; (v) identificar los residuos en la primera y segunda secuencias de nucleótidos que corresponden a un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra,

60 en donde la presencia de un residuo de uracilo en la primera secuencia de nucleótidos y una citosina en la segunda secuencia de nucleótidos indican que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra es 5-hidroximetilcitosina.

65

La 5-metilcitosina (5mC) puede identificarse en una secuencia de nucleótidos de la muestra. La citosina en una posición tanto en la primera como en la segunda secuencia de nucleótidos que corresponda a un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra indica que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra es 5-metilcitosina (5mC).

5

Un método de identificación de 5-metilcitosina en una secuencia de nucleótidos de la muestra o para distinguir 5-metilcitosina de citosina (C), de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) y de 5-formilcitosina (5fC) en una secuencia de nucleótidos de la muestra puede comprender:

10

(i) proporcionar una población de polinucleótidos los cuales comprenden la secuencia de nucleótidos de la muestra,
 (ii) tratar la primera porción de dicha población con un complejo oxo metálico (VI),
 (iii) tratar además la primera porción de dicha población y una segunda porción de dicha población con bisulfito, e
 (iv) identificar el residuo en la primera y segunda porciones de dicha población que está en la misma posición que un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra

15

en donde la presencia de una citosina en la primera y en la segunda porciones indica que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra es 5-metilcitosina (5mC).

20

Por ejemplo, un método de identificación de 5-metilcitosina en una secuencia de nucleótidos de la muestra o para distinguir 5-metilcitosina de citosina (C), de 5-hidroximetilcitosina (5hmC), y de 5-formilcitosina (5fC) en una secuencia de nucleótidos de la muestra puede comprender:

25

(i) proporcionar una población de polinucleótidos los cuales comprenden la secuencia de nucleótidos de la muestra,
 (ii) tratar la primera porción de dicha población con un complejo oxo metálico (VI),
 (iii) tratar además la primera porción de dicha población y una segunda porción de dicha población con bisulfito,
 (iv) secuenciar los polinucleótidos en la primera y segunda porciones de la población por medio de las etapas ii) y iii) para producir una primera y segunda secuencias de nucleótidos, respectivamente e;
 (v) identificar el residuo en la primera y segunda secuencias de nucleótidos que corresponden a un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra

30

en donde la presencia de una citosina en la primera y en la segunda secuencia de nucleótidos indica que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra es 5-metilcitosina (5mC).

35

Los residuos de uracilo en una posición tanto en la primera como en la segunda secuencias de nucleótidos que correspondan a una citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra indican que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra no es 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina, es decir el residuo de citosina es una citosina no modificada o 5-formilcitosina.

40

Un resumen de las modificaciones de la citosina en una posición en la secuencia de nucleótidos de la muestra que se indican mediante combinaciones específicas de citosina y uracilo en la posición de la primera y segunda secuencia de nucleótidos se muestra en la Tabla 1.

45

La primera y segunda porciones de la población de nucleótidos pueden tratarse con bisulfito y/o secuenciarse simultáneamente o secuencialmente.

50

En algunas modalidades, el tratamiento de la segunda porción puede no requerirse para identificar o distinguir un residuo de citosina modificada en la secuencia de nucleótidos de la muestra. Por ejemplo, la Tabla 1 muestra que la oxidación y el tratamiento con bisulfito de la primera porción de la población de polinucleótidos es suficiente para identificar 5-metilcitosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra. Un método de identificación de 5-metilcitosina en una secuencia de nucleótidos de la muestra o para distinguir 5-metilcitosina de citosina (C), de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) y de 5-formilcitosina (5fC) en una secuencia de nucleótidos de la muestra puede comprender:

55

(i) proporcionar una población de polinucleótidos los cuales comprenden la secuencia de nucleótidos de la muestra,
 (ii) tratar la primera porción de dicha población con un complejo oxo metálico (VI),
 (iii) tratar además la primera porción de polinucleótidos con bisulfito,
 (iv) identificar el residuo en la primera porción tratada de polinucleótidos que está en la misma posición que un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra (es decir, el residuo en la primera porción que corresponde al residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra),

60

en donde la presencia de una citosina en la posición en la primera porción tratada es indicativo de que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra es 5-metilcitosina (5mC).

65

Por ejemplo, un método de identificación de 5-metilcitosina en una secuencia de nucleótidos de la muestra o para distinguir 5-metilcitosina de citosina (C), de 5-hidroximetilcitosina (5hmC), y de 5-formilcitosina (5fC) en una secuencia de nucleótidos de la muestra puede comprender:

- (i) proporcionar una población de polinucleótidos los cuales comprenden la secuencia de nucleótidos de la muestra,
- (ii) tratar la primera porción de dicha población con un complejo oxo metálico (VI),
- (iii) tratar además la primera porción de polinucleótidos con bisulfito,
- (iv) secuenciar los polinucleótidos en la población por medio de las etapas ii) y iii) para producir una secuencia de nucleótidos tratada e;
- (v) identificar el residuo en la secuencia de nucleótidos tratada que corresponde a un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra,

en donde la presencia de una citosina en la secuencia de nucleótidos tratada indica que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra es 5-metilcitosina (5mC).

En algunas modalidades, los métodos de acuerdo con cualquiera de los aspectos y modalidades expuestos anteriormente pueden comprender la secuenciación de una primera porción de polinucleótidos que se han oxidado y tratado con bisulfito; y una segunda porción de polinucleótidos que se ha tratado con bisulfito. Por ejemplo, un método puede comprender:

- (i) proporcionar una población de polinucleótidos los cuales comprenden la secuencia de nucleótidos de la muestra,
- (ii) proporcionar la primera y segunda porciones de la población,
- (iii) tratar la primera porción de dicha población con un complejo oxo metálico (VI),
- (iv) tratar la primera y segunda porciones de dicha población con bisulfito,
- (v) secuenciar los polinucleótidos en la primera y segunda porciones de la población por medio de las etapas ii), iii) y iv) para producir una primera y segunda secuencias de nucleótidos, respectivamente e;
- (vi) identificar el residuo en la primera y segunda secuencias de nucleótidos que corresponden a un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra.

La secuencia de nucleótidos de la muestra puede conocerse previamente o esta pudiera determinarse. La secuencia de nucleótidos de la muestra es la secuencia de polinucleótidos no tratados en la población es decir, polinucleótidos los cuales no se oxidaron, ni se redujeron ni se trataron con bisulfito. En la secuencia de nucleótidos de la muestra, las citosinas modificadas no se distinguen de la citosina. La 5-metilcitosina, 5-formilcitosina y 5-hidroximetilcitosina se indican todas o se identifican como residuos de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra. Por ejemplo, los métodos de acuerdo con cualquiera de los aspectos y modalidades expuestas anteriormente pueden comprender además;

proporcionar una tercera porción de la población de polinucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de la muestra; y, secuenciar los polinucleótidos en la tercera porción para producir la secuencia de nucleótidos de la muestra.

La secuencia de los polinucleótidos en la tercera porción puede determinarse por cualquiera de las técnicas de secuenciación apropiadas.

Las posiciones de uno o más residuos de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra pueden determinarse. Esto puede hacerse mediante análisis estándar de secuencias. Debido a que los residuos de citosina modificada no se distinguen de la citosina, los residuos de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra pueden ser citosina, 5-metilcitosina, 5-formilcitosina, o 5-hidroximetilcitosina.

La primera y segunda secuencias de nucleótidos (es decir, las secuencias de nucleótidos de la primera y segunda porciones) pueden compararse con la secuencia de nucleótidos de la muestra. Por ejemplo, pueden identificarse los residuos en posiciones en la primera y segunda secuencias correspondientes a uno o más residuos de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra.

En algunas modalidades, puede identificarse el residuo en la primera y segunda porciones que se encuentra en la misma posición que un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra.

La modificación de un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra puede determinarse a partir de la identidad de los nucleótidos en las posiciones correspondientes en la primera y segunda secuencias de nucleótidos (es decir, los nucleótidos en la misma posición que el residuo de citosina en las secuencias de nucleótidos de la primera y segunda porciones).

Los polinucleótidos en la población contienen la misma secuencia de nucleótidos de la muestra, es decir la secuencia de nucleótidos de la muestra es idéntica en todos los polinucleótidos en la población.

El efecto de los diferentes tratamientos en los residuos de citosina dentro de la secuencia de nucleótidos de la muestra puede entonces determinarse, como se describe en la presente descripción.

La secuencia de nucleótidos de la muestra puede ser una secuencia genómica. Por ejemplo, la secuencia puede comprender toda o una parte de la secuencia de un gen, que incluye exones, intrones, o elementos regulatorios cadena

arriba o abajo, o la secuencia puede comprender secuencias genómicas que no se asocien con un gen. En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos de la muestra puede comprender una o más islas de CpG.

5 Los polinucleótidos adecuados incluyen ADN, preferentemente ADN genómico, y/o ARN, tal como ARN genómico (por ejemplo ARN genómico de mamíferos, plantas o virus), ARNm, ARNt, ARNr y ARN no codificante.

Los polinucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de la muestra pueden obtenerse o aislarse de una muestra de células, por ejemplo, células de mamíferos, preferentemente, células humanas.

10 Las muestras adecuadas incluyen células aisladas y muestras de tejidos tal como biopsias.

Los residuos de citosina modificada que incluyen 5hmC y 5fC se detectan en una variedad de tipos celulares que incluyen las células madres embrionarias (ESCS) y las células neurales (2, 3, 11, 45, 46).

15 Las células adecuadas incluyen células somáticas y de la línea germinal.

Las células adecuadas pueden encontrarse en cualquier estado del desarrollo, que incluye células total o parcialmente diferenciadas o no diferenciadas o células pluripotentes, que incluye las células madres, tales como células madres somáticas o adultas, células madres fetales, o células madres embrionarias.

20 Las células adecuadas incluyen, además, células madres pluripotentes inducidas (iPSCs), las que pueden derivarse de cualquier tipo de células somáticas de acuerdo con técnicas estándar.

25 Por ejemplo, los polinucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de la muestra pueden obtenerse o aislarse de células neurales, que incluyen neuronas y células de la glía, células de músculo esquelético, células de músculo liso, células hepáticas, células que sintetizan hormonas, células sebáceas, células de los islotes pancreáticos, células de la corteza adrenal, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales y uroteliales, osteocitos y condrocitos.

30 Las células adecuadas incluyen células asociadas a enfermedades, por ejemplo, células cancerosas, tales como carcinomas, sarcomas, linfomas, blastomas o células tumorales de la línea germinal.

Las células adecuadas incluyen células con el genotipo de un trastorno genético como la enfermedad de Huntington, la fibrosis quística, la anemia drepanocítica, la fenilcetonuria, el Síndrome de Down o el Síndrome de Marfan.

35 Los métodos para la extracción y el aislamiento del ADN genómico y el ARN de las muestras de células se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el ADN genómico o ARN pueden aislarse mediante el uso de cualquier técnica de aislamiento conveniente, tales como la extracción por fenol/cloroformo y precipitación alcohólica, la centrifugación por gradiente de densidad de cloruro de cesio, la cromatografía de intercambio aniónico en fase sólida, y las técnicas basadas en gel de sílice.

40 En algunas modalidades, el ADN genómico completo y/o ARN que se aíslan de las células pueden usarse directamente como una población de polinucleótidos como se describe en la presente descripción, después del aislamiento. En otras modalidades, el ADN genómico y/o el ARN que se aíslan pueden someterse a etapas de preparación adicionales.

45 El ADN y/o ARN genómico pueden fragmentarse, por ejemplo mediante sonicación, cizallamiento o digestión por enzimas endonucleasas, para producir fragmentos de ADN. Una fracción del ADN y/o ARN genómico pueden usarse como se describe en la presente descripción. Las fracciones adecuadas de ADN y/o ARN genómico pueden basarse en el tamaño u otros criterios. En algunas modalidades, una fracción de ADN genómico y/o fragmentos de ARN los cuales son ricos en islas de CpG (CGI) pueden usarse como se describe en la presente descripción.

50 El ADN y/o ARN genómico pueden desnaturalizarse, por ejemplo, mediante calentamiento o por tratamiento con un agente desnaturalizante. Los métodos adecuados para la desnaturalización del ADN genómico y el ARN se conocen bien en la técnica.

55 En los métodos de acuerdo con cualquiera de los aspectos y modalidades expuestos anteriormente, el ADN genómico y/o el ARN pueden adaptarse para la secuenciación y/u otro análisis antes de la oxidación y el tratamiento con bisulfito, o el tratamiento con bisulfito solo. La naturaleza de las adaptaciones depende del método de secuenciación o análisis que se va a emplear. Por ejemplo, para algunos métodos de secuenciación, los cebadores pueden ligarse a los extremos libres del ADN genómico y/o fragmentos de ARN después de la fragmentación. Los cebadores adecuados pueden contener 5mC para evitar que las secuencias de cebadores se alteren durante la oxidación y el tratamiento con bisulfito, o el tratamiento con bisulfito solo, como se describe en la presente descripción. En otras modalidades, el ADN genómico y/o el ARN pueden adaptarse para la secuenciación después del tratamiento de oxidación y/o con bisulfito, como se describe en la presente descripción.

65 Después del fraccionamiento, desnaturalización, adaptación y/o otras etapas de la preparación, el ADN y/o ARN genómico pueden purificarse por cualquier técnica conveniente.

Después de la preparación, la población de polinucleótidos puede proporcionarse en una forma adecuada para tratamientos posteriores como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, la población de polinucleótidos puede estar en una solución acuosa en ausencia de tampones antes del tratamiento como se describe en la presente descripción.

Los polinucleótidos para usar como se describe en la presente descripción pueden ser mono o bicatenarios.

La población de polinucleótidos puede dividirse en dos, tres, cuatro o más porciones separadas, cada una de las cuales contiene los polinucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos de la muestra. Estas porciones pueden tratarse y secuenciarse independientemente como se describe en la presente descripción.

Preferentemente, las porciones de polinucleótidos no se tratan para adicionar marcadores o grupos sustituyentes, tal como glucosa, a los residuos de 5-hidroximetilcitosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra, antes de la oxidación y/o reducción.

En los métodos de acuerdo con cualquiera de los aspectos y modalidades expuestos anteriormente, la primera y segunda porciones de polinucleótidos de la población pueden amplificarse después del tratamiento descrito anteriormente. Esto puede facilitar la manipulación y/o la secuenciación posterior. Las alteraciones de secuencia en la primera y segunda porciones de polinucleótidos se conservan después de la amplificación. Las técnicas de amplificación de polinucleótidos adecuadas se conocen bien en la técnica e incluyen la PCR.

La presencia de un residuo de uracilo (U) en una posición en la primera y/o segunda porciones del polinucleótido puede indicarse o identificarse por la presencia de un residuo de timina (T) en esa posición en el polinucleótido amplificado correspondiente. Opcionalmente, las porciones de polinucleótidos pueden purificarse antes de la amplificación.

Como se describió anteriormente, el residuo en la primera y segunda porciones de polinucleótidos en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra puede identificarse mediante secuenciación de los polinucleótidos en la primera y segunda porciones de la población por medio de las etapas ii) y iii) para producir la primera y segunda secuencias de nucleótidos, respectivamente. Los polinucleótidos pueden adaptarse después de un tratamiento de oxidación, reducción y/o con bisulfito para ser compatibles con una técnica o plataforma de secuenciación. La naturaleza de la adaptación dependerá de la técnica o plataforma de secuenciación. Por ejemplo, para la secuenciación Solexa-Illumina, los polinucleótidos tratados pueden fragmentarse, por ejemplo mediante sonicación, o tratamiento restrictivo con endonucleasas, los extremos libres de los polinucleótidos repararse según se requiera, y los cebadores ligarse en los extremos.

Los polinucleótidos pueden secuenciarse mediante el uso de cualquier técnica o plataforma conveniente de secuenciación de bajo o alto rendimiento, lo que incluye la secuenciación Sanger (38), la secuenciación Solexa-Illumina (39), la secuenciación basada en ligación (SOLiD™) (40), la pirosecuenciación (41), la secuenciación en tiempo real de una sola molécula (SMRT™) (42, 43) y la secuenciación en matriz de semiconductores (Ion Torrent™) (44).

Los protocolos, reactivos y equipamientos adecuados para la secuenciación de polinucleótidos se conocen bien en la técnica y están disponibles comercialmente.

El residuo en la primera y segunda porciones de polinucleótidos en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra puede identificarse mediante técnicas basadas en la hibridación.

En algunas modalidades, el residuo puede identificarse mediante el uso de sondas específicas de oligonucleótidos que se hibridan con los polinucleótidos con citosina en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra, pero que no se hibridan con los polinucleótidos con ningún otro residuo en esta posición; o que se hibridan con los polinucleótidos con un uracilo (o timina) en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra, pero que no se hibridan con los polinucleótidos con ningún otro residuo en la posición. Por ejemplo, el residuo en la primera y la segunda porciones puede identificarse al:

- a) poner en contacto los polinucleótidos de la primera y segunda porciones de la población con un oligonucleótido de detección, en donde el oligonucleótido de detección se hibrida específicamente con sólo uno de i) los polinucleótidos de dichas porciones que tienen una citosina en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra y ii) los polinucleótidos de dichas porciones que tienen un uracilo en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra y;
- b) determinar la hibridación del oligonucleótido de detección con los polinucleótidos de la primera y la segunda porciones.

La presencia o la cantidad de hibridación del oligonucleótido de detección con los polinucleótidos es indicativo de la identidad del residuo en la primera y segunda porciones de dicha población que corresponde al residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra.

En algunas modalidades, pueden emplearse dos o más oligonucleótidos de detección. Por ejemplo, un método puede comprender poner en contacto los polinucleótidos de la primera y segunda porciones de la población con:

- 5 i) un primer oligonucleótido de detección que se hibrida específicamente con polinucleótidos de dichas porciones que tienen una citosina en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra, y;
- i) un segundo oligonucleótido de detección que se hibrida específicamente con polinucleótidos de dichas porciones que tienen un uracilo en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra, y;
- 10 b) determinar la hibridación del primer y segundo oligonucleótidos de detección con los polinucleótidos de la primera y la segunda porciones,

en donde la presencia o el grado de hibridación del primer y segundo oligonucleótidos de detección es indicativo de la identidad del residuo en la primera y segunda porciones de dicha población en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra. Por ejemplo, la hibridación del primer oligonucleótido de detección, pero no del segundo, indica que el residuo es citosina, y la hibridación del segundo oligonucleótido de detección, pero no del primero, indica que el residuo es uracilo.

Los protocolos, reactivos y aparatos adecuados para la secuenciación de polinucleótidos se conocen bien en la técnica y están disponibles comercialmente. Las técnicas adecuadas incluyen la hibridación específica de alelos dinámicos (26), balizas moleculares (27), técnicas basadas en matrices (28) y Taqman™ (36).

En algunas modalidades, el residuo en la primera y segundas porciones puede identificarse mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que se hibridan con los polinucleótidos de la primera y segunda porciones. A continuación de la hibridación, puede determinarse la presencia o ausencia de un apareamiento erróneo de bases entre la sonda y el polinucleótido en la posición de los polinucleótidos que corresponde al residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra. Por ejemplo, el residuo en la primera y la segunda porciones puede identificarse al:

- a) poner en contacto los polinucleótidos de la primera y segunda porciones de la población con un oligonucleótido de detección que se hibrida específicamente con los polinucleótidos y;
- 30 b) determinar la presencia o ausencia de un apareamiento erróneo de bases entre el oligonucleótido de detección y los polinucleótidos en la posición del residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra.

Los apareamientos erróneos de base pueden determinarse mediante cualquier técnica adecuada. Los protocolos, reactivos y aparatos adecuados para la identificación del apareamiento erróneo de bases se conocen bien en la técnica e incluyen endonucleasas Flap y ensayos de Invader (32), ensayos de extensión de cebadores (28), ensayos de ligación de oligonucleótidos (28, 37), cromatografía líquida desnaturalizante de alta resolución (DHPLC) y escisión por endonucleasa específica de apareamiento erróneo (47, 49, 50, 51).

En algunas modalidades, pueden emplearse técnicas de extensión de cebadores para identificar el residuo en la primera y segunda porciones de los polinucleótidos que se encuentran en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra. Por ejemplo, un método puede comprender;

- a) poner en contacto los polinucleótidos de la primera y segunda porciones de la población con un oligonucleótido de detección que inmediatamente se hibrida con los polinucleótidos hacia el 3' de la posición del residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra,
- 45 b) extender el oligonucleótido de detección hibridado para incorporar un nucleótido que es complementario al residuo en los polinucleótidos que están en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra, y
- c) determinar la identidad del nucleótido incorporado.

Los protocolos, reactivos y aparatos adecuados para usar en ensayos de extensión de cebadores se conocen bien en la técnica e incluyen a extensión de cebadores de Infinium HD (Illumina; 33) y en matrices (APEX) (28, 34, 35).

En algunas modalidades, pueden emplearse técnicas de amplificación específicas para identificar el residuo en la primera y segunda porciones de polinucleótidos que corresponden a un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra. Los polinucleótidos de la primera y segunda porciones pueden amplificarse mediante el uso de cebadores de amplificación que producen un producto de amplificación solamente cuando se presenta un residuo de citosina en la misma posición en los polinucleótidos como el residuo de citosina en la secuencia de la muestra y no cuando está presente otro residuo en esta posición; o que produce un producto de amplificación solamente cuando un residuo de uracilo está presente en la misma posición en los polinucleótidos como el residuo de citosina en la secuencia de la muestra y no cuando está presente otro residuo en esta posición. Por ejemplo, un método puede comprender:

- a) someter la primera y segunda porciones de la población a amplificación sea con uno o más cebadores de amplificación;

- i) amplificar polinucleótidos en dichas porciones que tienen una citosina en la posición correspondiente al residuo de citosina en la secuencia de muestra para producir un producto de amplificación y no amplificar polinucleótidos en dichas porciones con otras bases en esta posición; o
- 5 ii) amplificar polinucleótidos en dichas porciones que tienen un uracilo en la posición correspondiente al residuo de citosina en la secuencia de muestra para producir un producto de amplificación y no amplificar polinucleótidos en dichas porciones con otras bases en esta posición, y;
- b) determinar la presencia de un producto de amplificación producido por dichos cebadores de amplificación.
- Las técnicas de amplificación adecuadas se conocen bien en la técnica e incluyen técnicas basadas en PCR tales como el sistema de mutación refractario de amplificación (ARMS)-PCR (29), PCR específica de alelos (30), amplificación específica de alelos (ASA; 31) y ASA mediada por ligación del adaptador (48).
- 10 En cualquiera de los métodos descritos anteriormente, el(los) oligonucleótido(s) de detección y/o cebadores de amplificación, pueden inmovilizarse, por ejemplo, en perlas o en una matriz.
- 15 Pueden emplearse otras técnicas adecuadas para identificar el residuo en la primera y segunda porciones de polinucleótidos que se encuentra en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra. Por ejemplo, un método puede comprender;
- 20 a) fragmentar los polinucleótidos de la primera y segunda porciones para producir fragmentos de la primera y segunda porciones,
- b) determinar el tamaño y/o la masa de los fragmentos y
- c) determinar a partir del tamaño y la masa de los fragmentos de la primera y segunda poblaciones, la identidad del residuo en la primera y segunda secuencias de nucleótidos.
- 25 Los polinucleótidos pueden fragmentarse por cualquier método adecuado, lo que incluye técnicas de endonucleasa específica de bases (47, 49, 50, 51). Los métodos adecuados para determinar el tamaño y/o la masa de los fragmentos de polinucleótidos se conocen bien en la técnica e incluyen MALDI-MS.
- 30 Los protocolos, reactivos y aparatos adecuados para su uso en técnicas de fragmentación y detección se conocen bien en la técnica e incluyen la genotipificación del SNP de iPLEX (Sequenom) (24, 25).
- En otras modalidades, el residuo en la primera y segunda porciones de polinucleótidos en la posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra puede identificarse mediante el uso de uno o ambos de i) un miembro de unión específico que se une a polinucleótidos de dichas porciones que tienen una citosina en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra y no se une a polinucleótidos de dichas porciones que no tienen una citosina en esta posición; y (ii) un miembro de unión específico que se une a polinucleótidos de dichas porciones que tienen un uracilo en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra y no se unen a polinucleótidos de dichas porciones que no tienen un uracilo en esta posición.
- 35 El miembro de unión específico puede ponerse en contacto con la primera y segunda porciones de polinucleótidos y determinarse la unión del miembro a los polinucleótidos. La presencia de la unión puede ser indicativa de la identidad del residuo en la primera y segunda porciones de polinucleótidos que se localiza en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra.
- 40 Los miembros de unión específicos adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen moléculas de anticuerpo, tales como anticuerpos completos y fragmentos, y aptámeros.
- 45 Pueden identificarse los residuos en las posiciones en la primera y segunda secuencias de nucleótidos que corresponden a citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra.
- 50 La modificación de un residuo de citosina en una posición en la secuencia de nucleótidos de la muestra puede determinarse a partir de la identidad de los residuos en las posiciones correspondientes en la primera y segunda secuencias de nucleótidos, como se describió anteriormente.
- 55 Puede determinarse la extensión o la cantidad de la modificación de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra. Por ejemplo, puede determinarse la proporción o cantidad de 5-hidroximetilcitosina y/o 5-metilcitosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra en comparación con las citosinas no modificadas.
- 60 En los métodos de acuerdo con cualquiera de los aspectos y modalidades descritos anteriormente, los polinucleótidos, por ejemplo, la población de polinucleótidos o 1, 2, o los 3 de la primera, segunda y tercera porciones de la población, pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido.
- 65 De manera similar, los oligonucleótidos de detección, los cebadores de amplificación y los miembros de unión específicos pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido.

Un soporte sólido es un cuerpo insoluble, no gelatinoso que presenta una superficie sobre la cual los polinucleótidos pueden inmovilizarse.

5 Los ejemplos de soportes adecuados incluyen láminas de cristal, pocillos, membranas o microperlas. Los soportes pueden ser en forma de partículas o sólidos, que incluyen por ejemplo una placa, un tubo de ensayo, perlas, bolilla, filtro, tela, polímero o membrana. Los polinucleótidos, por ejemplo, pueden fijarse a un polímero inerte, una placa de 96 pocillos, otro dispositivo, aparato o material que se use en la secuenciación de ácidos nucleicos u otros contextos de investigación. La inmovilización de un polinucleótido a la superficie de un soporte sólido se conoce bien en la técnica. En algunas modalidades, el soporte sólido mismo puede inmovilizarse. Por ejemplo, las microperlas pueden inmovilizarse sobre una segunda superficie sólida.

15 En algunas modalidades preferidas, el primer, segundo y/o tercero de los polinucleótidos pueden inmovilizarse sobre perlas magnéticas. Esto puede facilitar la purificación de los polinucleótidos entre etapas.

En los métodos de acuerdo con cualquiera de los aspectos y modalidades expuestos anteriormente, la primera, segunda y/o tercera porciones de polinucleótidos de la población pueden amplificarse antes de la secuenciación u otro análisis. Preferentemente, las porciones de polinucleótidos se amplifican después del tratamiento con bisulfito.

20 Los métodos adecuados para la amplificación de polinucleótidos se conocen bien en la técnica.

Después de la amplificación, las porciones amplificadas de la población de polinucleótidos pueden secuenciarse o analizarse de cualquier otra manera. En algunas modalidades, pueden emplearse cebadores de amplificación específicos, de manera que la presencia o ausencia de porciones amplificadas es indicativa, por sí misma, de la identidad del residuo en la porción de polinucleótidos que se localiza en la misma posición que el residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra.

25 Las secuencias de nucleótidos pueden compararse y los residuos en posiciones en la primera, segunda, tercera y/o cuarta secuencias de nucleótidos que se correspondan a citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra pueden identificarse, mediante el uso de un análisis de secuencia basado en computación.

30 Pueden identificarse las secuencias de nucleótidos, tal como islas de CpG, con modificación de citosina mayor que un valor umbral. Por ejemplo, pueden identificarse una o más secuencias de nucleótidos en las cuales más de 1 %, más de 2 %, más de 3 %, más de 4 % o más de 5 % de las citosinas están hidroximetiladas.

35 El análisis de secuencia basado en ordenador puede realizarse mediante el uso de cualquier sistema y programas informáticos convenientes.

40 Otro aspecto de la descripción proporciona un estuche para usar en un método de identificación de un residuo de citosina modificada de acuerdo con cualquiera de los aspectos y modalidades expuestos anteriormente, particularmente una 5-metilcitosina (5mC) o 5-hidroximetilcitosina (5hmC), que comprende;

- (i) un complejo oxo metálico (VI); y,
- (ii) un reactivo de bisulfito.

45 Los complejos oxo metálicos (VI) y los reactivos de bisulfito adecuados se describieron anteriormente. Por ejemplo, el complejo oxo metálico (VI) puede ser manganato (MnO_4^{2-}) o rutenato (RuO_4^{2-}).

50 En algunas modalidades preferidas, el complejo oxo metálico (VI) es rutenato (RuO_4^{2-}).

El complejo oxo metálico (VI) puede suministrarse en forma de una sal, por ejemplo una sal de metal alcalino, tal como sal de litio, de sodio o de potasio. Preferentemente el complejo oxo metálico (VI) se suministra en forma de una sal de potasio.

55 En algunas modalidades preferidas, el estuche puede comprender rutenato dipotásico (K_2RuO_4) o manganato dipotásico (K_2MnO_4).

60 El complejo oxo metálico (VI) o sal de este puede suministrarse en forma de una solución, preferentemente, una solución acuosa.

La solución puede ser una solución concentrada para la dilución hasta la concentración de trabajo apropiada en el momento de realizar el tratamiento de los polinucleótidos.

65 Una solución del complejo oxo metálico (VI) adecuada puede tener una concentración que es al menos 2 veces mayor que la concentración de trabajo, por ejemplo 2 veces a 100 veces mayor, preferentemente aproximadamente 10 veces

mayor. Por ejemplo, la solución concentrada puede comprender 0,1 mM a 10 M, 1 mM a 1 M, o 5 mM a 20 mM del complejo oxo metálico (VI), preferentemente aproximadamente 10 mM.

5 Preferentemente, la solución concentrada del complejo oxo metálico (VI) es alcalina. Por ejemplo, la solución puede tener un pH de 8 a 14. Una solución adecuada puede comprender 0.5 M a 5 M de OH⁻. Por ejemplo, el complejo oxo metálico (VI) puede disolverse en 0,5 M a 5M de NaOH o KOH.

10 El reactivo de bisulfito puede ser bisulfito de amonio (NH₄HSO₃) o bisulfito de sodio (NaHSO₃). El reactivo de bisulfito puede estar en forma de una solución. Por ejemplo, el estuche puede comprender una solución 1M a 10M de NH₄HSO₃ o NaHSO₃.

15 Un estuche puede comprender además una población de polinucleótidos de control que comprenden uno o más residuos de citosina modificada, por ejemplo 5-metilcitosina (5mC) o 5-hidroximetilcitosina (5hmC). En algunas modalidades, la población de polinucleótidos de control puede dividirse en una o más porciones, cada porción que comprende un residuo de citosina modificada diferente.

20 Un estuche para usar en la identificación de citosinas modificadas puede incluir uno o más artículos y/o reactivos para la ejecución del método, tales como medios para proporcionar la propia muestra de ensayo, lo que incluye el aislamiento de ADN y/o ARN y los reactivos de purificación, y recipientes de manipulación de muestras (tales componentes que generalmente están estériles).

25 Por ejemplo, el estuche puede comprender además reactivos de preparación de muestras para el aislamiento y extracción de ADN genómico o ARN de una célula. Los reactivos adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen reactivos y dispositivos de cromatografía de intercambio aniónico en fase sólida.

30 Un estuche puede comprender además adaptadores o cebadores para la ligación a los terminales de la población de polinucleótidos después de fragmentación. La naturaleza de los adaptadores o cebadores depende del método de secuenciación que se va a usar. Los cebadores adecuados pueden contener 5mC para evitar que las secuencias de cebadores se alteren durante la oxidación y el tratamiento con bisulfito, o el tratamiento con bisulfito solo, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, los adaptadores o cebadores pueden comprender un marcador, tal como biotina, para facilitar la inmovilización de los polinucleótidos.

35 Un estuche puede comprender además oligonucleótidos de detección y/o cebadores de amplificación para la identificación del residuo en una posición que corresponde a una citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra. Los oligonucleótidos y/o cebadores pueden comprender un marcador, tal como biotina, para facilitar la detección y/o inmovilización.

40 El estuche puede comprender además dispositivos de purificación y reactivos para aislar y/o purificar una porción de polinucleótidos, después del tratamiento como se describe en la presente descripción. Los reactivos adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen columnas de filtración en gel y tampones de lavado.

45 El estuche puede comprender además reactivos de amplificación para amplificación, preferentemente, amplificación por PCR, de la primera, segunda y/o tercera porciones de la población, después del tratamiento como se describe en la presente descripción. Los reactivos de amplificación adecuados se conocen bien en la técnica e incluyen cebadores de oligonucleótidos, nucleótidos, tampones y/o polimerasas. En algunas modalidades, el estuche puede comprender además perlas magnéticas para la inmovilización de una o más porciones de polinucleótidos. Las perlas magnéticas pueden revestirse con un miembro de unión específico, tal como estreptavidina, para la unión de los polinucleótidos.

50 El estuche puede incluir instrucciones para usar en un método de identificación de un residuo de citosina modificada como se describió anteriormente.

Un estuche puede incluir uno o más reactivos requeridos para el método, tales como soluciones tampón, reactivos de secuenciación y otros.

55 Los métodos y estuches para la secuenciación de OxBS se describen en Booth y otros (2012) Science 336 934 y la patente PCT/GB2012/051819.

60 Varios aspectos y modalidades de la invención reivindicada por ahora serán evidentes para aquellos expertos en la técnica en vista de la presente descripción.

"y/o" donde se usa en la presente descripción debe tomarse como descripción específica de cada uno de los dos componentes o características que se especifican con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" debe tomarse como una descripción específica de cada uno de (i) A, (ii) B, y (iii) A y B, justo como si cada uno se estableciera individualmente en la presente descripción.

65

Ciertos aspectos y modalidades de la invención reivindicada se ilustrarán ahora por medio de ejemplos y con referencias a las figuras descritas más abajo.

5 La Figura 1 muestra el esquema de reacción de bisulfito oxidativo de la invención: el tratamiento con complejo oxo metálico (VI) oxida 5hmC a 5fC y después el tratamiento con bisulfito y NaOH convierten 5fC en U. El grupo R es ADN.

10 La Figura 2 muestra un diagrama y una tabla que esbozan las técnicas BS-Seq y oxBS. La técnica BS-seq consiste en el tratamiento con bisulfito del ADN inicial y después la amplificación seguida de la secuenciación. La técnica oxBS-Seq consiste en un tratamiento con el complejo oxo metálico (VI) del ADN de entrada, seguido por tratamiento con bisulfito y amplificación después de la secuenciación. Mediante la comparación de la muestra inicial y la final procedentes de las técnicas BS-Seq y oxBS, la C, la 5mC y la 5hmC pueden discriminarse, mapearse y cuantificarse.

La Figura 3 muestra el espectro UV/visible de 750 μ M de RuO_4^{2-} en 50 mM de NaOH.

15 La Figura 4 muestra una traza de HPLC de los nucleótidos A, C, T y G no oxidados.

La Figura 5 muestra una traza de HPLC del oligonucleótido 3H15BP no oxidado que contiene tres residuos de 5hmC.

20 La Figura 6 muestra una traza de HPLC del oligonucleótido 3H15BP después de la oxidación con Mn(VI)O_4^{2-} .

La Figura 7 muestra una traza de HPLC del oligonucleótido 3H15BP después de la oxidación con Mo(VI)O_4^{2-} .

La Figura 8 muestra una traza de HPLC del oligonucleótido 3H15BP después de la oxidación con Ru(VI)O_4^{2-} .

25 La Tabla 1 muestra los resultados de la secuenciación para la citosina y citosinas modificadas sometidas a diversos tratamientos.

La Tabla 2 muestra las estructuras de la citosina (1a), 5-metilcitosina (5mC; 1b), 5-hidroximetilcitosina (5hmC; 1c) y 5-formilcitosina (5fC; 1d)

30 Experimentos

Materiales

35 Preparación de soluciones acuosas alcalinas de M(VI)O_4^{2-}

Las soluciones de reserva sólidas de ferrato de potasio, manganato de potasio, rutenato de potasio, osmato de potasio deshidratado, óxido de renio y molibdato de potasio se obtuvieron a partir de fuentes comerciales a la mayor pureza posible (Alfa Aesar).

40 Preparación de rutenato(VI)

1. Reducción de perrutenato potásico(VII) por hidróxido.

45 Se preparó una solución de perrutenato de potasio de 150 mM mediante disolución de la masa apropiada de KRuO_4 en 500 mM de NaOH. La disolución completa del sólido se logró por medio de mezclador de vórtice, lo que proporciona un color amarillo dorado/marrón a la solución. Esta solución se incubó a 25 °C durante 48 horas. Después del período de incubación, la solución se tornó de color rojo sangre oscuro y se acompañó por la evolución de un gas. (O_2).

50 $2\text{KRuO}_4 + 2\text{NaOH} \rightarrow 2\text{KNaRuO}_4 + \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2}\text{O}_2$

La conversión completa dentro del período de incubación de 48 horas se demostró por espectrofotometría UV/visible (Figura 2).

55 2. Disolución directa de rutenato de sodio (VI) en hidróxido de sodio.

Se probó la preparación directa de una solución de 150 mM de rutenato de sodio(VI) en 500 mM de hidróxido de sodio. El Na_2RuO_4 sólido es particularmente insoluble y después de más de una semana a 25 °C, no se logró la disolución completa del sólido en estas condiciones. Se tomó un espectro UV/visible de la fracción escasamente soluble que se disolvió y se demostró que era idéntico al espectro de rutenato en la literatura y al preparado mediante el Método 1.

60

Preparación de manganato (VI)

Descomposición del permanganato de potasio(VII) por calentamiento

65

El calentamiento hace que el permanganato de potasio sólido se descomponga en manganato con la liberación concomitante de oxígeno, de acuerdo con la ecuación más abajo:



5

La disolución de K_2MnO_4 sólido en 500 mM de NaOH proporciona una solución verde de K_2MnO_4 .

Espectrofotometría UV/visible

10

Ciertas soluciones acuosas alcalinas de M(VI)O_4^{2-} son altamente coloreadas y por lo tanto se caracterizan fácilmente mediante espectroscopia UV/visible.

15

Se tomaron espectros de soluciones acuosas alcalinas de M(VI)O_4^{2-} mediante el uso de un espectrofotómetro UV/visible Varian Cary 100, en una cubeta de vidrio de cuarzo de 1 cm de largo (1 mL de volumen). La composición típica de la solución fue 750 μM M(VI)O_4^{2-} en 50 mM de NaOH. Se recogieron espectros en el intervalo de 240 - 800 nm a una resolución de 1 nm a 25 °C. Todos los espectros se sometieron a una corrección de línea de base que comprendió la sustracción de un blanco de solución de 50mM de NaOH de cada espectro de M(VI)O_4^{2-} .

20

Ensayo de oxidación y digestión de oligonucleótidos por HPLC

Se usó un ensayo cualitativo de HPLC para visualizar la conversión oxidativa de 5-hmC a 5-fC. La digestión corta el oligonucleótido en monómeros de nucleósidos que pueden resolverse únicamente por cromatografía, cada monómero (A, C, G, T, U, 5-fC, 5-caC y 5-hmC) que tiene un tiempo de retención característico y predecible definido por las condiciones analíticas. Esto permite la evaluación cualitativa de (por ejemplo) la oxidación de 5-hmC a 5-fC.

25

Se empleó una reserva de 100 μM del oligonucleótido 3H15BP de 15mer (5' GAGACGACGTACAGG-3', donde C es 5hmC). 3H15BP contiene tres residuos de 5-hmC.

Oxidación de oligonucleótidos

30

Se prepararon soluciones de 3H15BP 8 μM en 50 mM de NaOH (20.75 μL de agua MilliQ, 1,25 μL de NaOH 1 M, 2 μL de 100 μM de 3H15BP) y se mezclaron mediante mezclador de vórtice. Estas se incubaron después a 37 °C durante 5 minutos para desnaturalizar cualquier estructura secundaria y después se enfriaron de forma brusca en agua helada (0 °C) durante 5 minutos. La oxidación se inició mediante la adición de 2 μL a la solución alcalina equilibrada de oligos de una solución de M(VI)O_4^{2-} 15 mM en 50 mM de NaOH. Una vez añadida, la solución de oxidación se mezcló agitando brevemente en un mezclador de vórtice y después se retornó al agua helada durante 60 minutos. La reacción de oxidación se mezcló mediante mezclador de vórtice dos veces durante la oxidación de 60 minutos después de 20 y 40 minutos. Después de cada mezcla, la reacción se retornó al agua helada.

35

40

Purificación de oligonucleótidos oxidados

Después de completar los 60 minutos de oxidación, las soluciones de oligonucleótidos oxidados se purificaron mediante el uso de una columna de centrifugado de oligos de Roche prelavada (4x 600 μL de MilliQ). El eluido de la columna se usó como entrada para la reacción de digestión.

45

Digestión de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos oxidados se digirieron mediante el uso del cóctel de digestión (22 μL de oligo oxidado + 23 μL de MilliQ + 5 μL de tampón de digestión 10X + 0,2 μL de cóctel de digestión) durante 12 horas a 37 °C.

50

El cóctel de digestión se preparó de 156U-benzonasa + 100U de fosfatasa alcalina + 0.15 mU de fosfodiesterasa I.

Después de la digestión, las muestras se pasaron a través de un filtro Amicon de 3 kDa mediante centrifugación para eliminar las enzimas de la muestra.

55

Ensayo de HPLC

Los oligonucleótidos digeridos y oxidados se analizaron por HPLC mediante el uso de un HPLC Agilent 1100 con un flujo de 1 mL/min sobre una columna Eclipse XDB-C18 de 3,5 μm , 3,0x150 mm. La temperatura de la columna se mantuvo a 45 grados. Los tampones de elución son tampón A (Acetato de Amonio 500 mM (Fisher) pH 5), tampón B (Acetonitrilo) y tampón C (H_2O). El tampón A se mantuvo al 1 % a través de toda la corrida y el gradiente para el resto de los tampones fue 0 min – 0,5 % B, 2 min – 1 % B, 8 min – 4 % B, 10 min – 95 % B.

60

65

Los tiempos de retención de 2'-deoxinucleósidos son como sigue: 2'-deoxi-5-carboxicitidina (1,0 min), 2'-deoxicitidina (1,8 min), 2'-deoxi-5-hidroximetilcitidina (2,1 min), 2'-deoxiuridina (2,7 min), 2'-deoxi-5-metilcitidina (4,0 min), 2'-deoxiguanosina (4,5 min), 2'-deoxi-5-formilcitidina (5,4 min), 2'-deoxitimidina (5,7 min), 2'-deoxiadesosina (7,4 min).

Los resultados del análisis de HPLC después de las trazas de la oxidación del oligonucleótido con manganato, molibdato y rutenato se muestran en las Figuras 6-8. Se encontró que el rutenato oxida de manera eficiente 5hmC a 5fC. Se encontró que el manganato oxida 5hmC en menor grado que el rutenato. No se observó oxidación de 5hmC con molibdato bajo estas condiciones.

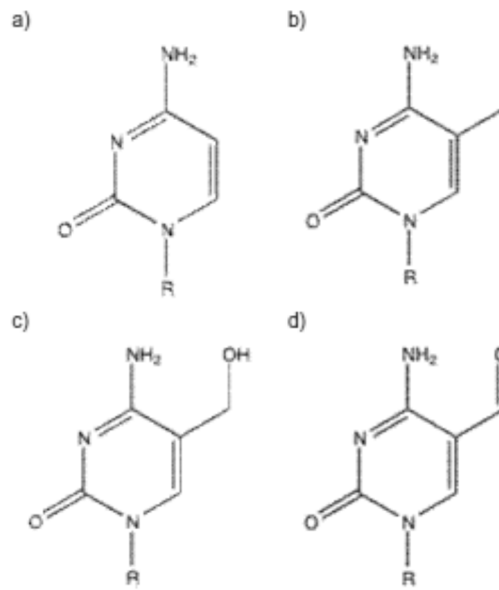
Referencias

1. A. M. Deaton y otros *Genes Dev.* 25, 1010 (15 de mayo, 2011).
2. M. Tahiliani y otros. *Science* 324, 930 (15 de mayo, 2009).
3. S. Ito y otros. *Nature* 466, 1129 (26 de agosto, 2010).
4. A. Szwagierczak y otros *Nucleic Acids Res.* (4 de agosto, 2010).
5. K. P. Koh y otros. *Cell Stem Cell* 8, 200 (4 de febrero, 2011).
6. G. Ficz y otros., *Nature* 473, 398 (19 de mayo, 2011).
7. K. Williams y otros. *Nature* 473, 343 (19 de mayo, 2011).
8. W. A. Pastor y otros. *Nature* 473, 394 (19 de mayo, 2011).
9. Y. Xu y otros. *Mol. Cell* 42, 451 (20 de mayo, 2011).
10. M. R. Branco y otros *Nat. Rev. Genet.* 13, 7 (enero, 2012).
11. S. Kriaucionis y otros *Science* 324, 929 (15 de mayo, 2009).
12. M. Munzel y otros. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 5375 (julio 2010).
13. H. Wu y otros. *Genes Dev.* 25, 679 (1 de abril, 2011).
14. S. G. Jin y otros *Nuc. Acids. Res.* 39, 5015 (julio, 2011).
15. C. X. Song y otros. *Nat. Biotechnol.* 29, 68 (enero, 2011).
16. M. Frommer y otros. *PNAS. U.S.A.* 89, 1827 (marzo 1992).
17. Y. Huang y otros. *PLoS One* 5, e8888 (2010).
18. C. Nestor y otros *Biotechniques* 48, 317 (abril, 2010).
19. C. X. Song y otros. *Nat. Methods*, (20 de noviembre, 2011).
20. J. Eid y otros. *Science* 323, 133 (2 de enero, 2009).
21. E. V. Wallace y otros. *Chem. Comm.* 46, 8195 (21 de noviembre, 2010).
22. M. Wanunu y otros. *J. Am. Chem. Soc.*, (14 de diciembre, 2010).
23. Booth y otros (2012) *Science* 336 934
24. Wu H y otros. *Science*. 2010; 329(5990) :444-448
25. van den Boom D *DNA Methylation: Methods and Protocols*. Vol. 507, 2da ed (2008) : 207-227.
26. Howell W M. y otros (January 1999). *Nat. Biotechnol.* 17(1): 87-8
27. Abravaya K y otros (2003).*Clin. Chem. Lab. Med.* 41 (4):468-74.
28. Harbron S y otros (2004). *Molecular analysis and genome discovery*. London: John Wiley ISBN 0-471-49919-6.
29. Newton, C. R. y otros *Nucl. Acids Res.* 17:2503-2516, 1989
30. Wu, D. Y. y otros. *PNAS USA*, 86:2757-2760, 1989
31. Okayama, H. y otros *J. Lab. Clin. Med.* 114:105-113, 1989
32. Olivier M (June 2005) *Mutat. Res.* 573 (1-2): 103-10.
33. Gunderson KL, (2006 *Meth. Enzymol. Methods in Enzymology* 410: 359-76.
34. Syvänen AC (diciembre 2001) *Nat. Rev. Genet.* 2 (12): 930-42.
35. *Molecular Diagnostics 2da Edición* (2010) editado por George Patrinos, Wilhelm Ansorge Elsevier ISBN 978-0-12-374537-8
36. McGuigan FE (2002) *Psychiatr. Genet.* 12 (3): 133-6
37. Jarvius y otros (2003) *Methods in Molecular Biology* 212 (2003) 215-228
38. Sanger, F. y otros *PNAS USA*, 1977, 74, 5463
39. Bentley y otros *Nature*, 456, 53-59 (2008)
40. KJ McKernan y otros *Genome Res.* (2009) 19: 1527-1541
41. M Ronaghi y otros *Science* (1998) 281 5375 363-365
42. Eid y otros *Science* (2009) 323 5910 133-138
43. Korlach y otros *Methods in Enzymology* 472 (2010) 431-455)
44. Rothberg y otros (2011) *Nature* 475 348-352
45. Li y otros *Nucleic Acids* (2011) Article ID 870726
46. Pfaffeneder, T. y otros (2011) *Angewandte*. 50. 1-6
47. Maeda y otros *Hum Immunol.* (1990) 27(2):111-21.
48. Wang y otros (2008) *Electrophoresis* abril;29(7):1490-501
49. Wolff y otros (2008). *BioTechniques* 44 (2): 193-4, 196, 199
50. Zhang y otros (2005). *Nucleic Acids Res.* 33: W489-92.
51. Hung y otros (2008) *BMC Biotechnology*, 8:62
52. Lister, R. y otros (2008) *Cell*. 133. 523-536
53. Wang y otros (1980) *Nucleic Acids Research*. 8 (20), 4777-4790
54. Hayatsu y otros (2004) *Nucleic Acids Symposium Series No.* 48 (1), 261-262
55. Lister y otros (2009) *Nature*. 462. 315-22

Tabla 1

Base	Secuenciación Regular	Secuenciación por Bisulfito	Oxidación seguida de Secuenciación por Bisulfito
C	C	U	U
5mC	C	C	C
5hmC	C	C	U

Tabla 2



Reivindicaciones

1. Un método de identificación de un residuo de 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina en una secuencia de nucleótidos de la muestra que comprende:
- 5 (i) proporcionar una población de polinucleótidos los cuales comprenden la secuencia de nucleótidos de la muestra que contiene un residuo de citosina;
- (ii) tratar una primera porción de dicha población con un complejo oxo metálico (VI);
- (iii) tratar dicha primera porción de dicha población y una segunda porción de dicha población con bisulfito, e;
- 10 (iv) identificar el residuo en la primera y segunda porciones de dicha población que corresponde a un residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de muestra;
- en donde el complejo oxo metálico (VI) es manganato ($Mn(VI)O_4^{2-}$), o rutenato ($Ru(VI)O_4^{2-}$).
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el residuo en la primera y segunda porciones se identifica mediante un método que comprende:
- 15 a) secuenciar los polinucleótidos en la primera y segunda porciones de la población siguiendo la etapa iii) para producir una primera y segunda secuencias de nucleótidos, respectivamente e;
- b) identificar el residuo en la primera y segunda secuencias de nucleótidos que corresponden al residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en donde el residuo en la primera y segunda porciones se identifica mediante un método que comprende:
- 20 a) poner en contacto los polinucleótidos de la primera y segunda porciones de la población con un oligonucleótido de detección;
- en donde el oligonucleótido de detección se hibrida específicamente con uno de
- 25 i) los polinucleótidos de dichas porciones que tienen una citosina en la posición que corresponde al residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra, o;
- ii) los polinucleótidos de dichas porciones que contienen un uracilo en la posición que corresponde al residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra, y;
- 30 b) determinar la hibridación del oligonucleótido de detección con los polinucleótidos de la primera y la segunda porciones; o
- determinar la presencia o ausencia de un apareamiento erróneo de bases entre el oligonucleótido de detección y los polinucleótidos de la primera y segunda porciones en la posición que corresponde al residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra;
- 35 en donde la hibridación del oligonucleótido de detección o la presencia o ausencia de un apareamiento erróneo de bases es indicativo de la identidad del residuo en la primera y segunda porciones de dicha población que corresponde al residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra.
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el residuo en la primera y segunda porciones se identifica mediante un método que comprende:
- 40 a) hibridar los polinucleótidos de la primera y segunda porciones de la población con un oligonucleótido de detección que es complementario con el 3' de la secuencia de nucleótidos de la muestra del residuo de citosina;
- b) extender el oligonucleótido de detección para incorporar un nucleótido que es complementario con el residuo en los polinucleótidos que corresponden al residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra, y;
- 45 c) determinar la identidad del nucleótido incorporado.
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde el residuo en la primera y segunda porciones se identifica mediante un método que comprende:
- 50 a) someter la primera y segunda porciones de la población a reacciones de amplificación con uno o más cebadores de amplificación o bien;
- i) amplificar polinucleótidos que contengan citosina en la posición correspondiente al residuo de citosina en la secuencia de muestra para producir un producto de amplificación, o;
- 55 ii) amplificar polinucleótidos que tengan un uracilo o timina en la posición correspondiente al residuo de citosina en la secuencia de muestra para producir un producto de amplificación, y;
- b) determinar la presencia de un producto de amplificación producido por dichos cebadores de amplificación.
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en donde se inmovilizan los oligonucleótidos de detección o los cebadores de amplificación.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el residuo en la primera y segunda porciones se identifica mediante un método que comprende:
- 60 a) fragmentar los polinucleótidos de la primera y segunda porciones para producir fragmentos de la primera y segunda porciones;
- b) determinar el tamaño y/o la masa de los fragmentos, y;
- 65 c) determinar a partir del tamaño y la masa de los fragmentos de la primera y segunda poblaciones, la identidad del residuo en la primera y segunda secuencias de nucleótidos.

8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en donde el residuo en la primera y segunda porciones se identifica mediante un método que comprende:
 a) poner en contacto los polinucleótidos de la primera y segunda porciones de la población con un miembro de unión específico;
 5 en donde el miembro de unión específico une específicamente a uno de i) los polinucleótidos de dichas porciones que tienen una citosina en la posición que corresponde al residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra, o; ii) los polinucleótidos de dichas porciones que contienen un uracilo en la posición que corresponde al residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra, y;
 b) determinar la unión del miembro de unión específico a los polinucleótidos de la primera y segunda porciones;
 10 en donde el miembro de unión específico es indicativo de la identidad del residuo en la primera y segunda porciones de dicha población que corresponde al residuo de citosina en la secuencia de nucleótidos de la muestra.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende:
 15 proporcionar una tercera porción de la población de polinucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de la muestra; y secuenciar los polinucleótidos en la tercera porción para producir la secuencia de nucleótidos de la muestra.
10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde los polinucleótidos son de ADN.
 20
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde los polinucleótidos son de ARN.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde se inmoviliza la población de polinucleótidos o una o más de la primera, segunda y tercera porciones de la población.
 25
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde una o más de la primera, segunda y tercera porciones de la población se amplifican por medio de la etapa iii).
14. Un estuche para usar en un método de identificación de un residuo de 5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende:
 30 (i) un complejo de manganato ($Mn(VI)O_4^{2-}$) o rutenato ($Ru(VI)O_4^{2-}$) en una solución acuosa alcalina, y;
 (ii) un reactivo de bisulfito.
15. Un estuche de acuerdo con la reivindicación 14 que comprende además reactivos de amplificación de ácidos nucleicos.
 35

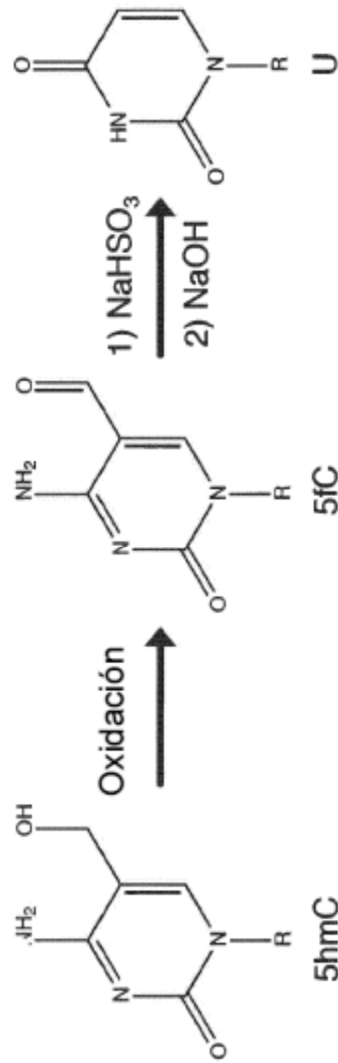


Figura 1

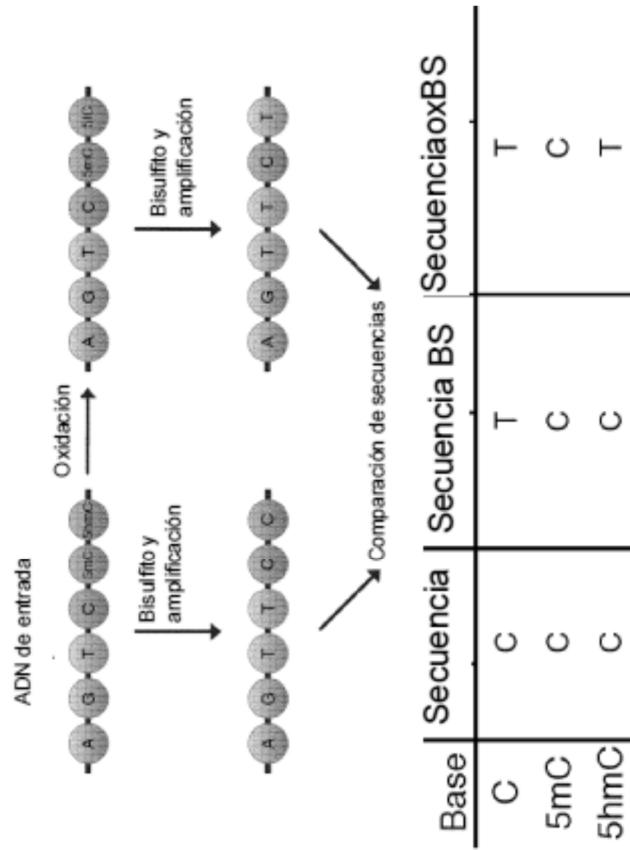


Figura 2

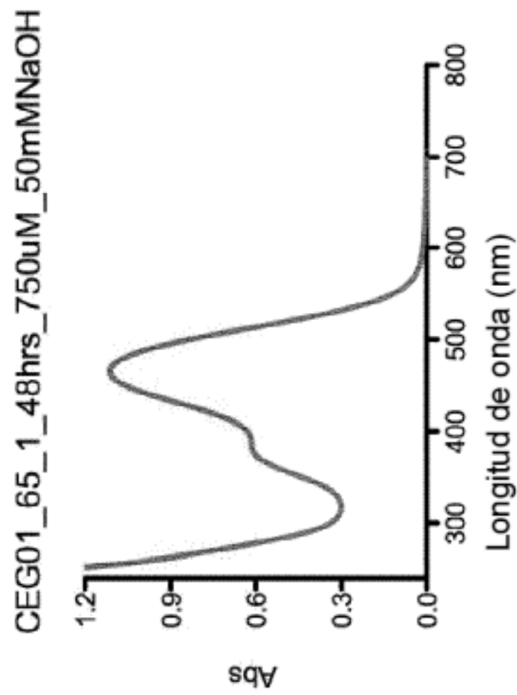


Figura 3

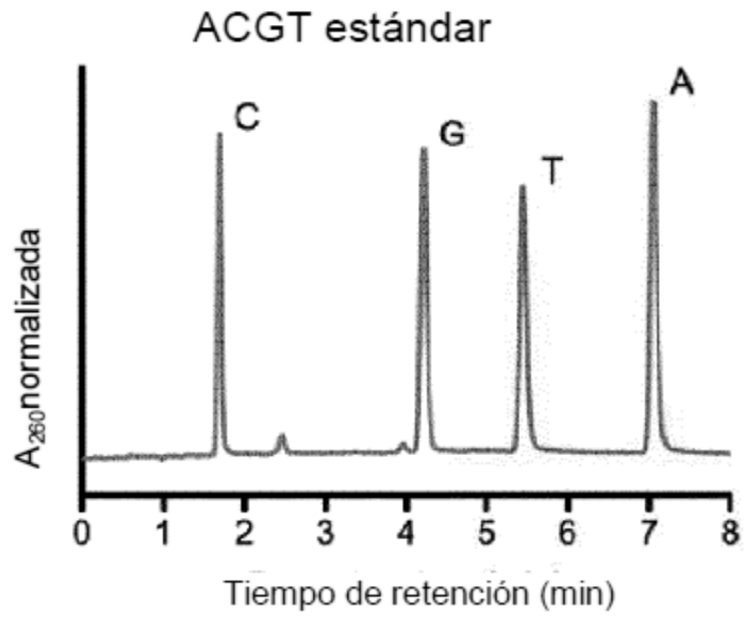


Figura 4

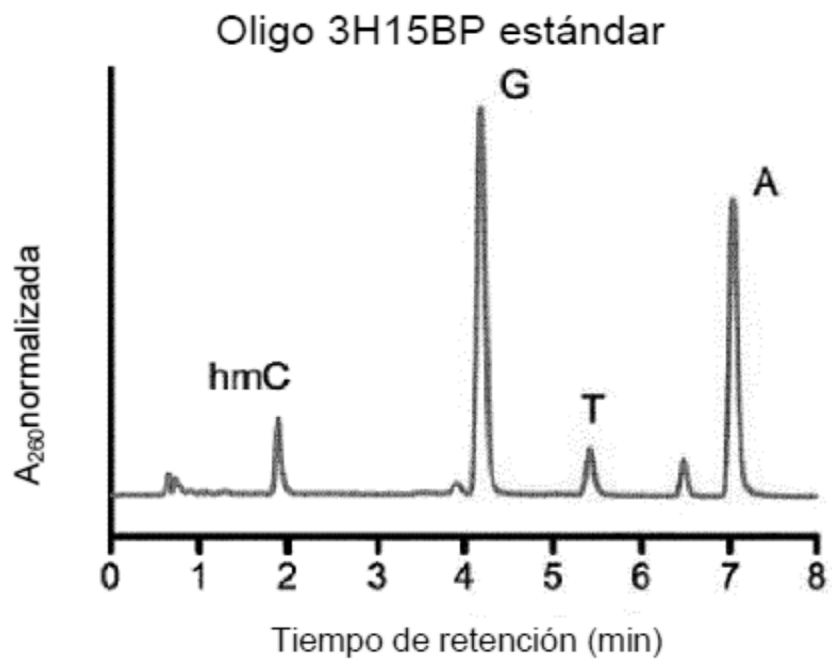


Figura 5

Oligo 3H15BP: oxidante Mn(VI)O_4^{-2}

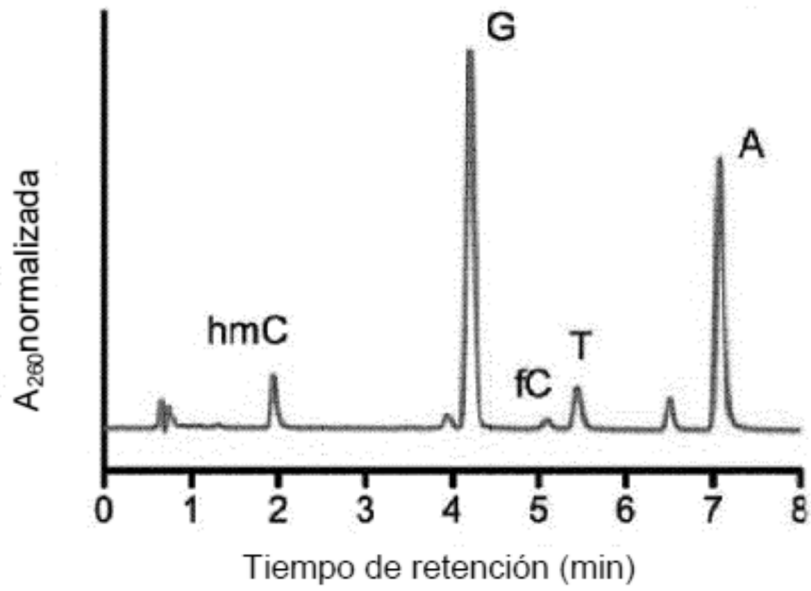


Figura 6

Oligo 3H15BP: oxidante Mo(VI)O_4^{-2}

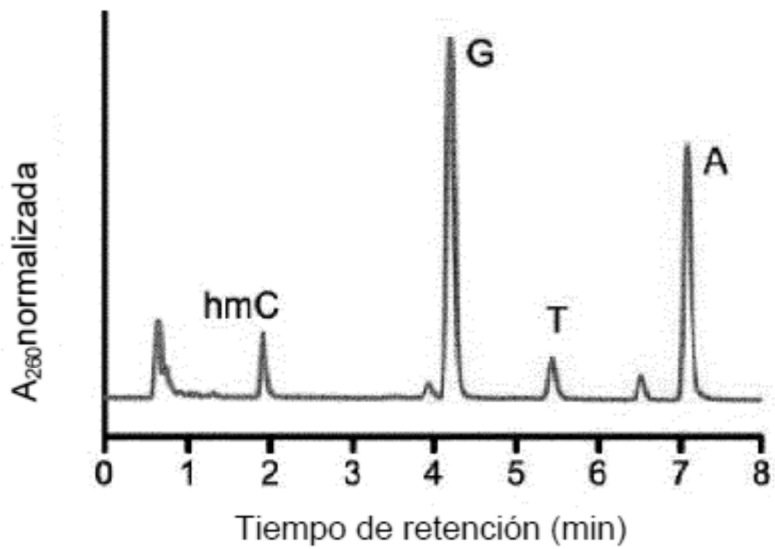


Figura 7

Oligo 3H15BP: oxidante Ru(VI)O_4^{-2}

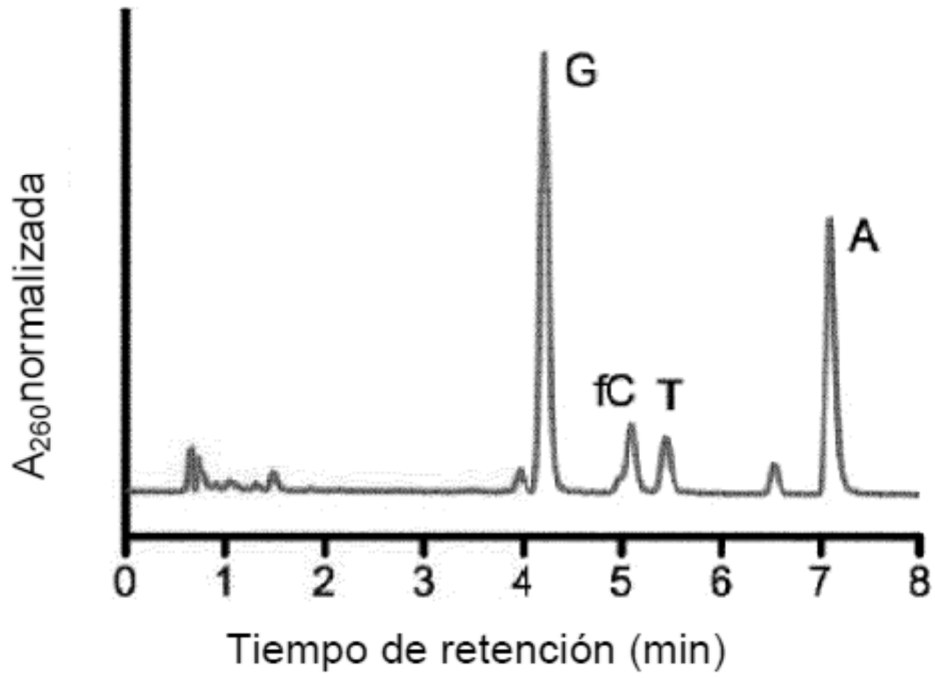


Figura 8