

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 584**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2013 PCT/US2013/023908**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13116375**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2013 E 13743659 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2809811**

54 Título: **Modificación de ADN en perlas magnéticas**

30 Prioridad:

**30.01.2012 US 201261592272 P**

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

**11.07.2018**

73 Titular/es:

**EXACT SCIENCES DEVELOPMENT COMPANY,  
LLC (100.0%)  
441 Charmany Drive  
Madison, Wisconsin 53719, US**

72 Inventor/es:

**DOMANICO, MICHAEL J.;  
ALLAWI, HATIM;  
LIDGARD, GRAHAM P.;  
AIZENSTEIN, BRIAN;  
HUNT, OLIVER y  
ZUTZ, TOBIAS CHARLES**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 675 584 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

Modificación de ADN en perlas magnéticas

**Campo de la invención**

5 Se proporciona en el presente documento una tecnología relacionada con la modificación química y purificación de ADN. Específicamente, la tecnología proporciona procedimientos para llevar a cabo una reacción de conversión de bisulfitos en pequeñas cantidades de ADN fragmentado de cadena sencilla y llevando a cabo las etapas posteriores de desulfonación y purificación utilizando perlas magnéticas, y procedimientos para recuperar el ADN modificado de las perlas.

**Antecedentes**

10 La metilación de ADN es una modificación epigenética que regula la expresión genética y marca genes sellados. En consecuencia, se sabe que la metilación de un ADN aberrante altera el desarrollo embrionario y la regulación del ciclo celular, y puede promover la oncogénesis que produce cánceres. En los mamíferos, la metilación se produce solamente en los restos de citosina y más específicamente solamente en un resto de citosina que esté adyacente a un resto de guanina (es decir, en la secuencia CG, a menudo denotado como "CpG"). La detección y mapeo de  
15 sitios de metilación de ADN son etapas esenciales para entender la regulación epigenética de genes y para proporcionar herramientas diagnósticas para identificar cánceres y otros estados de enfermedad asociados con errores en la regulación genética.

El mapeo de los sitios de metilación se consigue actualmente por el procedimiento del bisulfito descrito por Frommer, y col. para la detección de 5-metilcitosinas en el ADN (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1827-31 (1992), o  
20 variaciones de las mismas. El procedimiento bisulfito de mapeo de 5-metilcitosinas se basa en la observación de que la citosina, pero no la 5-metilcitosina reacciona con un ion del sulfito de hidrógeno (también conocido como bisulfito). La reacción se lleva a cabo normalmente de acuerdo con las siguientes etapas: primero, la citosina reacciona con el sulfito de hidrógeno para formar una citosina sulfonada. A continuación, la desaminación del intermedio sulfonado de la reacción da como resultado un uracilo sulfonado. Finalmente, el uracilo sulfonado se desulfona en condiciones  
25 alcalinas para formar uracilo. La detección es posible porque el uracilo forma pares de bases con adenina (por lo tanto, se comporta como una timina). Esto hace posible la discriminación entre las citosinas metiladas y las citosinas no metiladas mediante, por ejemplo, secuenciación genómica del bisulfito (Grigg G, & Clark S, Bioessays (1994) 16: 431-36; Grigg G, DNA Seq. (1996) 6: 189-98) o PCR específica de metilación (MSP) como se desvela, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 5.786.146. Véase, por ejemplo, Hayatsu, H., Proc. Jpn. Acad., Ser. B 84, N.º 8: 321  
30 (2008).

El tratamiento con bisulfito normalmente necesita fases de lavado y cambios de tampón para producir una muestra de ADN convertido y purificado para el análisis. Las tecnologías convencionales utilizan una variedad de estrategias para facilitar estas etapas, por ejemplo, columnas de centrifugación, purificación en etanol, y soportes sólidos. Sin embargo, los procedimientos que utilizando columnas de centrifugación de sílice o purificación en etanol a menudo  
35 da como resultado las pérdidas de muestra que comprometen la utilidad del procedimiento bisulfito como una medición cuantitativa de la metilación de citosina. Además, aunque se han desarrollado algunas mejoras utilizando soportes sólidos, estos procedimientos necesitan grandes cantidades de ADN de entrada y también tienen problemas de pérdida de muestra y reproducibilidad. En consecuencia, los procedimientos convencionales solo proporcionan mediciones de metilación de ADN cualitativas. En la práctica, los procedimientos actuales están  
40 adaptados en general para la secuenciación de productos convertidos por bisulfito o para la detección del amplicón de PCR solo como un producto final, sin cuantificación. Adicionalmente, los procedimientos convencionales necesitan a menudo largos periodos (por ejemplo, de 1-2 días) para completar (por ejemplo, en parte debido a los largos tiempos de incubación) y no proporcionan una conversión y recuperación eficaces del ADN convertido. Los procedimientos que emplean columnas de centrifugación son muy laboriosos y no son factibles fácilmente para la automatización y por lo tanto para su incorporación en el flujo de trabajo del laboratorio clínico.  
45

Además, la secuenciación de bisulfito convencional a menudo resulta en la degradación del ADN debido a las condiciones necesarias para la conversión completa, tales como los largos periodos de incubación, temperaturas elevadas, y concentraciones altas de bisulfito. Estas condiciones despurinan el ADN, dando como resultado roturas  
50 aleatorias de cadena que pueden dar lugar a la degradación del 90 % del ADN incubado (véase, por ejemplo, Ehrlich M, y col. (2007). "A new method for accurate assessment of DNA quality after bisulfite treatment", Nucleic Acids Res 35(5): e29; Grunau C, y col. (Julio 2001), "Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters", Nucleic Acids Res 29 (13): E65-5). Véase también, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N.º 7.413.855. La extensa degradación inducida por las tecnologías convencionales es problemática, especialmente para las muestras que contienen cantidades cada vez menores de ADN. En consecuencia, los análisis corriente  
55 abajo (por ejemplo, PCR y otros ensayos) de dichas muestras están gravemente comprometidos debido a un muestreo disminuido de moléculas de ADN representativo de la muestra. Esto, a su vez, evita la adquisición de una información cuantitativamente precisa de los niveles de metilación. El documento WO 2009/088987 desvela "metilación en perlas" que se basa en la unión de ADN en perlas de silicio magnéticas en un tampón que comprende isopropanol e hipoclorato sódico, la conversión en bisulfito y la desulfonación. Por lo tanto, existe una falta de

procedimientos apropiados para la evaluación cuantitativa del estado de metilación de pequeñas cantidades de ADN.

### Sumario

5 El alcance de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas. En consecuencia, se proporciona en el presente documento es una tecnología relacionada con la modificación y purificación de ADN. Específicamente, la tecnología proporciona procedimientos y kits para llevar a cabo una reacción de conversión de bisulfito en pequeñas cantidades de ADN de cadena sencilla fragmentado y llevar las etapas posteriores de desulfonación y purificación utilizando perlas magnéticas para la purificación eficaz y recuperación del ADN convertido. Los procedimientos utilizan perlas magnéticas revestidas de sílice, una rigurosa concentración alta de hidrocloreto de guanidina en un tampón de unión, y una alta concentración de etanol en tampones de lavado. En realizaciones preferidas el tampón de unión no incluye alcohol. Las etapas posteriores de desulfonación y purificación se llevan a cabo en el ADN capturado en las perlas.

15 Los procedimientos generalmente proceden de la siguiente manera. Primero se lavan las perlas magnéticas en un tampón de unión para retirar la solución de almacenamiento y conservante. En una reacción por separado, se somete el ADN a conversión con bisulfito, por ejemplo, mediante reacción con un reactivo de sulfonación tal como el sulfito de hidrógeno amónico (véase, por ejemplo, Hayatsu, H., Proc. Jpn. Acad., Ser. B 84, N.º 8: 321 (2008)), sulfito de hidrógeno sódico, o utilizando un kit comercial. En algunas realizaciones, se utiliza una alta concentración (por ejemplo, una solución al 45 %) de sulfito de hidrógeno amónico como reactivo de sulfonación. El ADN convertido con bisulfito y el tampón de unión (por ejemplo, hidrocloreto de guanidina 4,0-8,0 M, por ejemplo, en algunas realizaciones, aproximadamente 7,0 M de guanidina) se añaden a las perlas y se incuban para unir el ADN a las perlas. En algunas realizaciones, las etapas de lavado de las perlas y de unión del ADN se combinan en una única etapa en la que se añade un exceso de cantidad de tampón de unión a las perlas seguido por la adición del ADN convertido con bisulfito. Después de la unión, se retira la solución de unión, las perlas se lavan, y se añade un tampón de desulfonación (por ejemplo, hidróxido sódico 0,3 N en alcohol). El tampón de desulfonación se retira entonces se lavan las perlas, y se eluye el ADN en un tampón de elución de ADN. La solución de ADN entonces es adecuada para una medición cuantitativa de la conversión con bisulfito y por lo tanto proporcionar una medición cuantitativa de la metilación de citosina.

25 En algunas realizaciones, el reactivo de desulfonación comprende un alcohol isopropílico (isopropanol, 2-propanol, "IPA"), por ejemplo, algunas realizaciones proporcionan un reactivo de desulfonación que comprenden aproximadamente un 70 % de isopropanol y aproximadamente 0,1 N de hidróxido sódico.

30 En algunas realizaciones, el recipiente de muestra en el que se captura y se lava el ADN se expone a una solución proteica, por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA) y/o caseína. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se añade una solución de BSA y/o caseína al recipiente de muestra que contienen las perlas magnéticas, por ejemplo, se incluye en una o más de las soluciones utilizadas para procesar el ADN (por ejemplo, para la conversión con bisulfito, aislamiento, y/o purificación del ADN) para reducir o eliminar la variación en la recuperación de cadena. En algunas realizaciones, se añade a solución a una solución de lavado utilizada después de la captura de ADN y antes de la elución de las cadenas. En algunas realizaciones, el recipiente de muestra es en el que dicho recipiente de muestra es un pocillo o una placa multi-pocillo, por ejemplo, una placa que tiene 24, 96, 384, o 1536 pocillos, o cualquier otro número de pocillos. En algunas realizaciones, los procedimientos de la tecnología se llevan a cabo en un procedimiento automático, por ejemplo, utilizando robots y/o manipuladores de líquidos automáticos.

35 En algunas realizaciones, la tecnología que se proporciona en el presente documento provee de un procedimiento para la recuperación de ácido nucleico en un recipiente de muestra, que comprende las etapas de unir el ácido nucleico en un recipiente de muestra y recuperar al menos una parte del ácido nucleico del recipiente, en el que el recipiente de muestra se expone a una solución que comprende una proteína antes de recuperar el ácido nucleico del recipiente. En algunas realizaciones, la solución comprende al menos uno de entre albúmina sérica bovina o caseína. En algunas realizaciones, el ácido nucleico está unido a una partícula o perla en el recipiente de muestra, por ejemplo, una perla o partícula magnética y/o de sílice.

40 En ciertas realizaciones preferidas, la solución proteica comprende al menos 5-10 ng/μl de albúmina sérica bovina, preferentemente al menos 10 ng/μl. En algunas realizaciones, la solución comprende no más de 100 ng/μl de albúmina sérica bovina. En algunas realizaciones, la solución comprende entre aproximadamente un 0,001 % y aproximadamente un 0,01 % de caseína. En realizaciones preferidas, el procedimiento comprende la recuperación del ácido nucleico del pocillo de muestra comprende la elución del ácido nucleico de una perla o partícula del recipiente.

45 En ciertas realizaciones de la tecnología, la exposición del recipiente de muestra a la solución proteica se produce después de unir el ácido nucleico del recipiente de muestra, mientras que, en otras realizaciones, el recipiente de muestra se expone a la solución antes de que el ácido nucleico se una en el recipiente. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es un ADN tratado con bisulfito, y el procedimiento comprende la desulfonación del ADN unido en el recipiente de muestra antes de exponer el recipiente de muestra a la solución proteica. En otras realizaciones, el recipiente se expone a la proteína antes de la desulfonación del ADN unido.

La tecnología proporciona realizaciones de los procedimientos para el tratamiento del ADN que comprenden poner en contacto un ADN con un reactivo bisulfito y la unión del ADN a una perla magnética en un tampón de unión. Algunas realizaciones, proporcionan etapas adicionales, por ejemplo, lavado del ADN con un primer tampón de lavado. Realizaciones adicionales proporcionan adicionalmente procedimientos que comprenden poner en contacto el ADN con un reactivo de desulfonación, lavar el ADN con un tampón de lavado, y eluir el ADN con un tampón de elución para producir una muestra analítica. En algunas realizaciones, el tampón de unión comprende aproximadamente 7 M de hidrocloreto de guanidina y en algunas realizaciones, se utiliza un único tampón de lavado que comprende aproximadamente un 80 % de etanol y 10 mM de Tris HCl a un pH aproximadamente de 8,0.

Un aspecto de la tecnología se refiere a la conversión de fragmentos de ADN con bisulfito, por ejemplo, ADN pequeños de aproximadamente 200 bases o menos de longitud. En consecuencia, en algunas realizaciones, el ADN sometido a tratamiento con bisulfito comprende o consiste en una población de cadenas de ADN de 200 o menos nucleótidos de longitud. Además, en algunas realizaciones, el ADN es de cadena sencilla. Otro aspecto de la tecnología proporciona el procesamiento eficaz y la recuperación de ADN, por ejemplo, para proporcionar una medición cuantitativa de metilación de citosina en una muestra después de una reacción con bisulfito. En algunas realizaciones se proporcionan por lo tanto procedimientos en los que una primera cantidad de ADN en la etapa de contacto es sustancialmente la misma que una segunda cantidad de ADN en la muestra analítica y/o la segunda cantidad refleja una recuperación casi completa de la primera cantidad después de tener en cuenta un factor de dilución o concentración apropiado. Como un procedimiento para tratar el ADN con bisulfito para convertir las citosinas, pero no las metilcitosinas, en uracilo, algunas realizaciones proporcionan que, si está presente una citosina en el ADN, se convierta en uracilo. Aunque la tecnología no está limitada en el tipo de perla que se utiliza, en algunas realizaciones la perla magnética es una perla magnética revestida de silicio y en algunas realizaciones la perla tiene un diámetro de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ .

Se proporcionan adicionalmente kits para llevar a cabo la conversión con bisulfito del ADN para cuantificar la metilación de ADN. En algunas realizaciones, la tecnología proporciona realizaciones de un kit que comprende un reactivo de sulfonación, una perla magnética, un tampón de unión, un tampón de lavado, o un tampón de elución. En algunas realizaciones de los kits proporcionados, el tampón de unión comprende aproximadamente 7 M de hidrocloreto de guanidina y está libre de alcohol. En algunas realizaciones, el reactivo de sulfonación es un reactivo de sulfito de hidrógeno amónico. En algunas realizaciones, el reactivo de sulfonación sulfito de hidrógeno amónico comprende isopropanol.

En algunas realizaciones, se tiene que entender que una o más soluciones del kit tienen que proporcionarse por el usuario del kit. Por ejemplo, en algunas realizaciones no se incluye un tampón de lavado en el kit y lo suministra el usuario del kit. Los kits de acuerdo con las realizaciones de la tecnología comprenden un tubo de muestra, unas instrucciones de uso, y un contenedor.

En un aspecto, las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento se refieren a procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos pequeños (por ejemplo, ADN de cadena sencilla o doble que consiste en 200 bases o menos). Dicho aislamiento es útil, por ejemplo, en el tratamiento de ADN con reactivos de bisulfito para cuantificar la metilación de ADN. En algunas realizaciones, el aislamiento de pequeñas moléculas de ADN comprende el uso de un tampón de unión de ADN que comprende hidrocloreto de guanidina y no alcohol. En algunas realizaciones, la captura de ADN implica el uso de perlas magnéticas.

Las realizaciones adicionales de la tecnología proporcionada en el presente documento serán aparente para los expertos en la técnica relevante basándose en las enseñanzas contenidas en el presente documento.

### **Breve descripción de los dibujos**

Estas y otras características, aspectos, y ventajas de la presente tecnología se llegarán a entender mejor con respecto a los siguientes dibujos:

La Figura 1 es un diagrama de flujo que describe un procedimiento para la desulfonación de ADN tratado con bisulfito, de acuerdo con realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento.

La Figura 2 es un diagrama de flujo que describe un procedimiento para la desulfonación del ADN tratado con bisulfito, de acuerdo con realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento.

La Figura 3A-B muestra gráficos de datos de experimentos que comparan la medición cuantitativa de la metilación de ADN como se determina por dos protocolos diferentes. La Figura 3A muestra los resultados de experimentos que comparan el uso de perlas magnéticas y un tampón de unión como se describe en los procedimientos, utilizando perlas magnéticas y utilizando columnas de centrifugación. Para las mediciones, los inventores llevaron a cabo cada conjunto de condiciones. La Figura 3B muestra gráficos de datos de una repetición de los experimentos que producían los datos mostrados en la Figura 3A.

La Figura 4 muestra gráficos de datos de los experimentos para ensayar los tampones de unión de hidrocloreto de guanidina. La Figura 4A muestra los resultados de experimentos que comparan los tampones de unión que tienen 4,5 a 8,0 M de hidrocloreto de guanidina sin alcohol, y la Figura 4B muestra las medias de los valores para las repeticiones de la Figura 4A.

La Figura 5 muestra gráficos de datos de experimentos que ensayan los tampones de unión de hidrocloreto de

guanidina. La Figura 5A muestra los resultados de experimentos que comparan los tampones que tienen 5,5 a 7,0 M de hidrocloreuro de guanidina sin alcohol, y la Figura 5B muestra las medias de los valores de las repeticiones de la Figura 5A.

La Figura 6 muestra un gráfico de datos de los experimentos que ensayan las concentraciones de NaOH y etanol en el tampón de desulfonación. Los resultados que se muestran son medias de ejecuciones por duplicado de un agrupamiento positivo de ADN fecal (ADNs) que se convirtió con un 34 % de ABS a 68 °C durante 1 hora seguido por la purificación de perlas de sílice y desulfonación. En cada grupo de barras, el orden de las barras de izquierda a derecha es el mismo que en la leyenda de arriba a abajo.

La Figura 7 muestra un gráfico de datos de los experimentos para evaluar el tiempo de desulfonación. Los resultados que se muestran son medias de ejecuciones por duplicado de un agrupamiento positivo de ADNs convertido con un 34 % de ABS a 68 °C durante 1 hora seguido por purificación de perlas de sílice y desulfonación. En cada grupo de barras, el orden de las barras de izquierda a derecha es el mismo que en la leyenda de arriba abajo.

La Figura 8 muestra una tabla que compara las cantidades de ácido nucleico recuperado de 96 pocillos repetidos en una placa de 96 pocillos profundos. La recuperación de cadenas de NDRG4 de cada pocillo de la placa varía en función de la posición del pocillo, con la tendencia general de una recuperación progresivamente mayor desde arriba (fila A) abajo (fila H) de la placa.

La Figura 9 muestra tablas que comparan las cantidades de ácido nucleico recuperadas de pocillos repetidos en los que las cadenas capturadas se lavaron con 10 mM de Tris 0,1 mM de EDTA ("Te") o una solución proteica (BSA) antes de la elución.

La Figura 10 muestra una tabla que compara los efectos de diferentes concentraciones de solución de BSA sobre el número medio de cadenas de ADN pequeño sintético NDRG-4 o KRAS-38 recuperado de una placa de 96 pocillos profundos, cuando los pocillos de ensayo se exponen a la solución de BSA antes de la elución del ADN convertido con bisulfito. Estos datos son señales promediadas de 16 reacciones repetidas del ensayo QuARTS.

La Figura 11 compara los efectos de diferentes concentraciones de soluciones de BSA y caseína sobre el número medio de cadenas de ADN pequeños sintéticos KRAS y panel ANB recuperado de placas de 96 pocillos profundos, cuando los pocillos de ensayo se exponen a las soluciones proteicas antes de la elución del ADN convertido con bisulfito. En el panel ANB, que consiste en ACTB ( $\beta$ -activa, que sirve normalmente como una convención de referencia en los ensayos), NDRG4 (miembro de la familia del gen N-myc regulado negativamente), y BMP3 (proteína 3 morfogenética del hueso), la señal "FAM" indica las dianas KRAS 35T, 34T, 38, HEX indica las dianas KRAS 34A, 35C, 34A, 34C, y QSR indica las dianas ACTB. Estos datos son señales promediadas para 46 reacciones repetidas del ensayo QuARTS.

### **Descripción detallada**

Se proporciona en el presente documento una tecnología relacionada con la modificación química y la purificación de ADN. Específicamente, la tecnología proporciona procedimientos para llevar a cabo una reacción de conversión con bisulfito en pequeñas cantidades de ADN de cadena sencilla fragmentado, y llevar a cabo las etapas posteriores de desulfonación y purificación utilizando perlas magnéticas. Además, los procedimientos proporcionan condiciones que promueven una unión altamente estable del ADN a las perlas. Esto facilita la recuperación eficaz del ADN tratado con bisulfito a pesar de las condiciones de desulfonación altamente básicas en las que un experto en la técnica esperaría que alterara la interacción del ADN con las perlas. Por la combinación de las etapas innovadoras proporcionadas en el presente documento, la tecnología proporciona procedimientos para preparar ADN convertido con bisulfito rápidamente, en menos de 2 horas, con una recuperación completa o casi completa del ADN introducido.

La tecnología se refiere a hallazgos experimentales que se describen posteriormente y que se desarrollan en los ejemplos experimentales. Estos ejemplos describen el desarrollo y ensayo de los reactivos utilizados para el análisis del estado de metilación de un ácido nucleico. En particular, la tecnología se refiere a los tampones de desulfonación que comprende isopropanol, tampones de unión libres de alcohol, y el uso de albúmina sérica bovina y/o caseína en distintos tampones para minimizar o eliminar la variación de recuperaciones de cadena pocillo a pocillo cuando los ensayos se llevan a cabo en un formato de alto rendimiento tal como en una placa de 96 pocillos profundos. Los tampones de desulfonación comprenden isopropanol resolvían algunos problemas asociados con el uso de tampones de desulfonación que comprenden etanol (por ejemplo, la formación de precipitados). Además, los ensayos que utilizan tampones de unión fabricados sin un alcohol producían resultados con menos variabilidad en comparación con los ensayos que utilizan los tampones de unión convencionales que comprenden un alcohol tal como isopropanol o etanol.

### **Definiciones**

Para facilitar un entendimiento de la presente tecnología, posteriormente se definen varios términos y frases. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, los siguientes términos tienen los significados asociados explícitamente en el presente documento, a menos de que el contexto dicte claramente otra cosa. La frase "en una realización" como se utiliza en el presente documento no se refiere necesariamente a la misma realización, aunque

podría ser. Además, la frase “en otra realización” como se utiliza en el presente documento no se refiere necesariamente a una realización diferente, aunque podría ser. Por lo tanto, como se describe posteriormente, se pueden combinar fácilmente distintas realizaciones de la invención, sin alejarse del alcance o espíritu de la invención.

5 Además, como se utiliza en el presente documento, el término “o” es un operador “o” inclusivo y es equivalente a la expresión “y/o” a menos de que el contexto dicte claramente otra cosa. La expresión “basándose en” no es exclusivo y permite que se base en factores adicionales no descritos, a menos de que el contexto dicte claramente otra cosa. Además, a lo largo de la memoria descriptiva, el significado de “un”, “una” y “el” incluyen las referencias en plural. Por lo tanto, “un” o “una” o “el” pueden significar uno o más de uno. Por ejemplo, “un” artillugio puede significar un artillugio o una pluralidad de artillugios. El significado de “en” incluye “en” y “sobre”.

10 Como se utiliza en el presente documento, un “fragmento de ADN” o “ADN pequeño” o “ADN corto” significa un ADN que consiste en no más de aproximadamente 200 pb. Una ADN pequeño puede estar en una mezcla de ADN más largos.

15 Como se utiliza en el presente documento, el término “genoma” se refiere al material genético (por ejemplo, cromosomas) de un organismo o una célula.

Como se utiliza en el presente documento, “ADN sulfonado” se refiere al producto intermedio de la reacción con bisulfito que es un ADN que comprende citosinas o uracilos que se han sulfonado como resultado del tratamiento con bisulfito.

20 Como se utiliza en el presente documento, una “cantidad pequeña” de ADN significa menos de aproximadamente 100.000 moléculas de ADN o uno o más ADN que tienen sustancialmente la misma secuencia funcional.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “sulfito de hidrógeno” y “bisulfito” son intercambiables.

25 Como se utiliza en el presente documento, las expresiones “partículas magnéticas” y “perlas magnéticas” se utilizan de manera intercambiable y se refieren a partículas o perlas que responden a un campo magnético. Normalmente, las partículas magnéticas comprenden materiales que no tienen un campo magnético pero que forman un dipolo magnético cuando se exponen a un campo magnético, por ejemplo, materiales capaces de magnetizarse en presencia de un campo magnético pero que no son propiamente magnéticos en ausencia de dicho campo. El término “magnético” como se utiliza en este contexto incluye materiales que son materiales paramagnéticos o superparamagnéticos. El término “magnético”, como se utiliza en el presente documento, también engloba materiales magnéticos temporalmente, tales como materiales ferromagnéticos o ferrimagnéticos con temperaturas de Curie bajas, a condición de que dichos materiales magnéticos sean paramagnéticos temporalmente en un intervalo de temperaturas al que las partículas magnéticas de silicio que contienen dichos materiales se utilizan de acuerdo con los procedimientos presentes para aislar materiales biológicos.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término “kit” se refiere a cualquier sistema de suministro para suministrar materiales. En el contexto de sistemas de purificación de ácido nucleico y ensayos de reacción, dichos sistemas de suministro incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte o suministro de reactivos y dispositivos (por ejemplo, adsorbentes inhibidores, partículas, desnaturizantes, oligonucleótidos, filtros de centrífuga, etc. en envases apropiados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para llevar a cabo un procedimiento, etc.) de una localización a otra. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más envases (por ejemplo, cajas) que contenían reactivos de reacción relevantes y/o materiales de soporte. Como se utiliza en el presente documento, la expresión “kit fragmentado” se refiere a un sistema de suministro que comprende dos o más envases distintos que contienen cada uno una subparte de los componentes totales del kit. los envases pueden suministrarse al receptor que se pretende juntos o por separado. Por ejemplo, un primer envase puede contener materiales para la recolección de muestras y un tampón, mientras que el segundo envase contiene los oligonucleótidos de captura y desnaturizantes. La expresión “kit fragmentado” tiene la intención de englobar kits que contienen reactivos específicos de Análisis (ASR) regulados bajo la sección 520 (e) del Acta Federal de Alimentos, fármacos y cosméticos, pero no se limitan a estos. Además, cualquier sistema de suministro que comprende dos o más envases diferentes que contengan cada uno una subparte de los componentes totales del kit se incluyen en la expresión “kit fragmentado”. Por el contrario, un “kit combinado” se refiere a un sistema de suministro que contiene todos los componentes de un ensayo de reacción en un único envase (por ejemplo, en una única caja que alberga cada uno de los componentes deseados). El término “kit” incluye ambos kit fragmentados y combinados.

55 El término “sistema” como se utiliza en el presente documento se refiere a una colección de artículos para su uso en un fin particular. En algunas realizaciones, los artículos comprenden instrucciones para su uso, como información suministrada en, por ejemplo, un artículo, en papel, o medios grabables (por ejemplo, un disquete, CD, memoria flash, etc.). En algunas realizaciones, las instrucciones se dirigen a un usuario desde una localización en internet, por ejemplo, una página de internet.

**Realizaciones de la tecnología**

- Los procedimientos descritos en el presente documento proporcionan una conversión con bisulfito sorprendentemente eficiente y eficaz de cantidades muy pequeñas de fragmentos de ADN de cadena sencilla, y la recuperación del producto convertido. Se descubrió que el tratamiento de fragmentos de ADN utilizando los protocolos de desmetilación descritos en el presente documento, seguido por la unión del ADN a perlas magnéticas revestidas de sílice (por ejemplo, como se describe en la Pat. de EE. UU. N.º 6.296.937, y proporcionadas comercialmente como Partículas Paramagnéticas MagneSil (número de catálogo AS1220), Promega, Madison, WI; promega.com) para la desulfonación y el lavado permitían una reproductibilidad mejorada (aproximadamente con un 10 % de variabilidad), rendimientos más altos de ADN (aproximadamente 1,103 a 1,253 de más rendimiento con respecto a las tecnologías convencionales, por ejemplo, un procedimiento de columna de centrifugación), y un tiempo de procesamiento disminuido (aproximadamente 100 minutos) con respecto a las tecnologías convencionales. Algunas realizaciones de estos procedimientos comprenden el uso de un tampón de unión rigurosos y un tampón de lavado que comprende un 80 % de etanol y 10 mM de Tris HCl a un pH 8. La elución del ADN convertido se lleva a cabo utilizando un tampón de elución.
- Las realizaciones descritas en el presente documento se pueden aplicar en ácidos nucleicos de varias fuentes, incluyendo, pero sin limitarse a muestras de heces. Los procedimientos de aislamiento y purificación del ADN para su uso en las realizaciones descritas posteriormente se encuentran, por ejemplo, en la Publicación de Patente PCT WO 2012/155072.

- Se desarrollaron realizaciones adicionales de la tecnología como resultado de los experimentos que comprende el uso de un tampón de unión de hidrocioruro de guanidina libre de alcohol. Se proporcionan posteriormente realizaciones específicas de la tecnología.

*Sulfonación de ADN*

- Los experimentos que se llevan a cabo durante el desarrollo de realizaciones de la tecnología que se proporcionan en el presente documento demostraron que la sulfonación de ADN con bisulfito amónico (sulfito de hidrógeno amónico) proporciona la sulfonación eficaz de ADN en un tiempo más corto que la sulfonación con bisulfito sódico (sulfito de hidrógeno sódico). Por ejemplo, los procedimientos convencionales de sulfonación de ADN comprenden incubaciones largas, normalmente de una noche, en bisulfito sódico, por ejemplo, durante 16 horas o más (véase, por ejemplo, Frommer M y col. (1992), "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands" Proc. Natl. Acad. Sci, USA. 89:1827-31).
- Las realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento proporcionan la sulfonación del ADN en tiempos menores (por ejemplo, aproximadamente no más de 1 hora, aproximadamente no más de 2 horas, menos de 8 horas, menos de 16 horas) por incubación con bisulfito amónico. En consecuencia, la tecnología proporcionada en el presente documento reduce el tiempo de la reacción de sulfonación y el tiempo total para producir una muestra analítica con respecto a las tecnologías convencionales.

*Perlas magnéticas*

- La tecnología proporcionada en el presente documento se refiere al tratamiento con bisulfito y el aislamiento de ADN para una medición cuantitativa de la metilación del ADN. En algunas realizaciones, se utilizan perlas magnéticas para el tratamiento y aislamiento de ADN, por ejemplo, perlas que comprenden un núcleo magnético y un revestimiento de sílice. El revestimiento de sílice se une al ADN y el núcleo magnético proporciona una forma eficaz para concentrar y aislar las perlas (y el ADN unido) utilizando un imán. En algunas realizaciones, las perlas magnéticas revestidas de sílice son Partículas Paramagnéticas MagneSil (Promega, Madison, WI; número de catálogo AS1220 o AS640A, promega.com).

- La tecnología no se limita a cualquier tipo particular de perlas magnéticas. Las realizaciones de la tecnología descrita en el presente documento utilizan cualquier perla magnética (por ejemplo, perlas paramagnéticas) que tienen afinidad por ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, las perlas magnéticas tienen un núcleo de magnetita (por ejemplo,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y un revestimiento que comprende dióxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ). La estructura de la perla (por ejemplo, tamaño, porosidad, forma) y la composición de la solución en la que se une un ácido nucleico a la perla pueden alterarse para que se unan diferentes tipos de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN o ARN de cadena sencilla, cadena doble u otras conformaciones y formas); derivados de origen natural, sintetizados químicamente, sintetizados enzimáticamente (por ejemplo, por PCR)) y tamaños de ácidos nucleicos (por ejemplo, oligómeros pequeños, cebadores, genómicos, plásmidos, fragmentos (por ejemplo, que consisten en 200 o menos bases) de manera selectiva. Estas características de las perlas afectan la unión y la elución de los ácidos nucleicos a las perlas. Se describen tecnologías relacionadas, por ejemplo, en las Pat. de EE. UU. N.º 6.194.562; 6.270.970; 6.284.470; 6.368.800; 6.376.194. También se contemplan perlas magnéticas revestidas con, por ejemplo, organosilano (como se describe en la Pat. de EE. UU. N.º 4.554.088); poliacrilato carboxilado (como se describe en la Pat. de EE. UU. N.º 5.648.124); hidroxisilano (como se describe en la Sol. de Pat. de EE. UU. Ser. N.º 11/459.541); y ligandos alifáticos hidrófobos (como se describe en la Sol. de Pat. de EE. UU. Ser. N.º 12/221.750).

La tecnología no se limita a un tamaño particular de la perla magnética. En consecuencia, las realizaciones de la

tecnología utilizan perlas magnéticas de varios tamaños diferentes. Las perlas más pequeñas proporcionan más área de superficie (por base unitaria de peso) para la adsorción, pero las perlas más pequeñas están limitadas en la cantidad de material magnético que pueden incorporar en el núcleo de la perla con respecto a una perla más grande. En algunas realizaciones, las partículas se distribuyen en un intervalo de tamaños con un tamaño promediado o medio apropiado para la tecnología en que se utilizan las perlas. En algunas realizaciones, las partículas tienen una distribución de tamaño de partícula monodal relativamente estrecha.

En algunas realizaciones, las perlas que se utilizan en la presente tecnología tienen poros que son accesibles desde el exterior de la partícula. Dichos poros tienen un intervalo de tamaños controlado que es suficientemente grande para admitir un ácido nucleico, por ejemplo, un fragmento de ADN, en el interior de la partícula y unirlo en la superficie interior de los poros. Los poros se diseñan para proporcionar un área de superficie grande que sea capaz de unirse a un ácido nucleico. Además, en un aspecto de la tecnología no se limita a cualquier procedimiento particular de unión y/o aislamiento de un ácido nucleico (por ejemplo, un ADN). Por lo tanto, en algunas realizaciones, los aspectos de la tecnología relativas a la reacción con bisulfito se combinan con otros procedimientos adecuados de aislamiento de ADN (por ejemplo, precipitación, cromatografía en columna (por ejemplo, una columna de centrifugación), etc.).

Las perlas (y material de unión) se retiran de una mezcla utilizando un campo magnético. En algunas realizaciones, se utilizan otras formas de fuerzas externas además de un campo magnético para aislar la sustancia biológica diana de acuerdo con la presente tecnología. Por ejemplo, formas adicionales adecuadas de fuerzas externas incluyen, pero no se limitan a, filtración gravitatoria, filtración al vacío, y centrifugación.

Las realizaciones de la tecnología aplican un campo magnético externo para retirar el complejo del medio. Dicho campo magnético puede generarse adecuadamente en el medio utilizando cualquiera de varios medios diferentes conocidos. Por ejemplo, se puede posicionar un imán en la superficie externa de un recipiente de una solución que contienen las perlas, produciendo que las partículas migren a través de la solución y recolectarlas en la superficie interna del recipiente adyacente al imán. El imán se puede mantener en la posición sobre la superficie externa del recipiente de manera que las partículas se mantengan en el recipiente por el campo magnético generado por el imán, mientras se decanta la solución fuera del contenedor y se desecha. Se puede añadir entonces una segunda solución en el recipiente y se retira el imán de manera que las partículas migren en la segunda solución. De manera alternativa se puede insertar una sonda magnetizable en la solución y la sonda magnetizada, de manera que las partículas se depositen en el final de la sonda sumergida en la solución. La sonda se podría entonces retirar de la solución mientras permanece magnetizada, se sumerge en una segunda solución, y se suspende el campo magnético permitiendo que las partículas entren en la segunda solución. Existen fuentes comerciales de imanes diseñados para utilizarse en ambos tipos de las técnicas de retirada y transferencia magnética descritas en términos generales anteriormente. Véase, por ejemplo, Tecnología de Separación Magnética MagneSphere Stand o la serie PolyATract 9600TM Multi-Magnet, ambas disponibles en Promega Corporation, Magnetight Separation Stand (Novagen, Madison, Wis.); o Dynal Magnetic Particle Concentrator (Dynal, Oslo, Noruega). Algunas realizaciones comprenden el uso de un dispositivo magnético de acuerdo con la Sol. de Pat. de EE. UU. N.º 13/089116. Además, algunas realizaciones contemplan el uso de un "canal jet" o separación con una punta de pipeta magnética (por ejemplo, como se describen en las Pat. de EE. UU. N.º 5.647.994 y 5.702.950). Algunas realizaciones contemplan el uso de una estrategia de sonda sumergida (por ejemplo, como se describe en las Pat. de EE. UU. N.º 6.447.729 y 6.448.092), por ejemplo, como se ejemplifica en los sistemas KingFisher disponible en el mercado en Thermo Scientific.

#### *Tampón de unión libre de alcohol*

Algunas realizaciones se refieren al uso de un tampón de unión libre de alcohol. Los experimentos que se llevan a cabo durante el desarrollo de realizaciones de las tecnologías descritas en el presente documento demostraron que un tampón de unión libre de alcohol (por ejemplo, aproximadamente 6,5-7,5 M de hidrocloreuro de guanidina, por ejemplo, 7 M de hidrocloreuro de guanidina) actuaba sustancialmente mejor que un tampón de unión convencional (por ejemplo, aproximadamente 3,6 M de tiocianato de guanidina; 10 mM de Tris HCl, pH 8,0; un 40 % de 2-propanol). Compárese, por ejemplo, los Ejemplos 3 y 5 (véase, por ejemplo, la Figura 3A y 3B) con los Ejemplos 6 y 7 (Figuras 4 y 5), cada uno de los cuales utiliza aproximadamente la misma cantidad de ADN de entrada. Las señales que se consiguen utilizando el tampón de unión libre de alcohol son aproximadamente 1,5 a 2 veces más altas que las del tampón que contiene alcohol. Los experimentos demuestran que la recuperación de los productos de reacción utilizando el tampón de unión mejorado proporciona un procedimiento cuantitativo de medición de la metilación del ADN.

La tecnología contempla el uso de otras composiciones en el tampón de unión, por ejemplo, otras sales tales como sales caotrópicas. Las sales caotrópicas son sales de iones caotrópicos. Dichas sales son altamente solubles en soluciones acuosas. Los iones caotrópicos que proporcionan dichas sales, a una concentración suficientemente alta en soluciones acuosas de proteínas o ácidos nucleicos producen que las proteínas se desplieguen, los ácidos nucleicos pierdan la estructura secundaria, o en el caso de ácidos nucleicos de doble cadena, se funden (por ejemplo, se separan las cadenas). Sin quedar ligados por teoría alguna, y con el entendimiento de que la práctica de la tecnología no depende de ningún mecanismo en particular, se cree que los iones caotrópicos tienen estos efectos debido a que alteran las redes de uniones hidrógeno que existen en el agua líquida y de esta manera hacen que las

proteínas y ácidos nucleicos desnaturalizados sean más estables termodinámicamente que sus equivalentes plegados o estructurados correctamente. Los iones caotrópicos incluyen, por ejemplo, el guanidinio, yoduro, perclorato, y tricloroacetato. En algunas realizaciones, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente para la presente tecnología, la sal es una sal de ion guanidinio. Las realizaciones de la tecnología incluyen otras sales que incluyen hidrocloreuro de guanidina, tiocianato de guanidina (al que se hace referencia a veces como isotiocianato de guanidina o iso-tiocianato de guanidina), yoduro sódico, perclorato sódico, y tricloroacetato sódico. La concentración de sales o iones caotrópicos en composiciones formadas de acuerdo con las presentes tecnologías es generalmente entre aproximadamente 0,1 M y 8 M y en las realizaciones de la tecnología es suficientemente alta para producir que el material biológico diana se adhiera a partículas magnéticas de sílice de la mezcla, pero no tan alta como para desnaturalizar sustancialmente, degradar, o producir que el material se precipitara fuera de la mezcla.

#### *Tampón de desulfonación de isopropanol*

Algunas realizaciones que se proporcionan en el presente documento se refieren al uso de un tampón de desulfonación que comprende isopropanol. Los experimentos que se llevaron a cabo durante el desarrollo de las tecnologías descritas en el presente documento demostraban que un tampón de desulfonación que comprende isopropanol minimizaba o eliminaba algunos problemas asociados con el uso de tampones de desulfonación que comprenden etanol. Por ejemplo, los experimentos demostraban que los tampones de desulfonación que comprenden etanol formaban precipitados en algunas condiciones. En las mismas condiciones similares, los tampones de desulfonación que comprenden isopropanol no formaban un precipitado. Los tampones de desulfonación que comprenden isopropanol son útiles, por ejemplo, en un procesamiento automático en el que los precipitados podrían comprometer el ensayo del estado de metilación y/o perjudicar el equipo automático que lleva a cabo la manipulación del líquido y los datos recolectados para los ensayos.

#### *Soluciones que comprenden BSA o caseína*

Algunas realizaciones que se proporcionan en el presente documento se refieren al uso de soluciones que comprenden BSA o caseína. Los experimentos que se llevaron a cabo durante el desarrollo de las tecnologías descritas en el presente documento demostraban que añadiendo BSA o caseína a las muestras minimizaba o eliminaba una variación en la recuperación de cadenas en función de la localización del pocillo en una placa multi-pocillos. Además, la adición de BSA o caseína a las muestras antes de eluir el ADN capturado resultaba en un aumento de la recuperación de cadenas con respecto a las eluciones que se llevan a cabo en ausencia de BSA o caseína. Las soluciones que comprenden BSA y/o caseína son útiles en el lavado o el tratamiento de la superficie del recipiente antes de su uso para un ensayo. Los recipientes ejemplares son, por ejemplo, un vial, un pocillo de una placa multi-pocillo tal como una placa de 96 pocillos profundos, un tubo, etc. Los recipientes pueden estar hechos de cristal, plástico (por ejemplo, policarbonato, poliestireno), papel, metal, goma, etc. En otras realizaciones, el BSA y/o caseína se añaden a las soluciones de lavado u otras soluciones utilizadas en las realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, después de la captura y desulfonación del ADN en las perlas, algunas realizaciones proporcionan una solución que comprende BSA y/o caseína en el lavado de las perlas, recipiente de muestras, etc. durante las etapas de purificación y/o elución de los procedimientos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, las soluciones que comprenden BSA y/o caseína y los procedimientos relacionados con el uso de BSA y/o caseína para tratar, manipular, y/o recuperar ácidos nucleicos se aplican para normalizar la recuperación de muestras de ácidos nucleicos en algunos recipientes con respecto a otros recipientes (por ejemplo, los pocillos individuales de una placa de ensayo de 96 pocillos). Por ejemplo, durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología que se proporciona en el presente documento, la recuperación de los ácidos nucleicos de una placa de ensayo de 96 pocillos variaba en función con la posición del pocillo en la placa. En consecuencia, se proporciona en el presente documento una tecnología que comprende el uso de BSA y/o caseína en las soluciones (por ejemplo, que se añade antes de la elución de un ácido nucleico) que normaliza la recuperación de los ácidos nucleicos de los pocillos de la placa de 96 pocillos (por ejemplo, aumentando la recuperación de ácido nucleico de los pocillos en los que estaría reducida de otra manera en ausencia de BSA y/o caseína).

#### *Análisis de los productos de reacción con bisulfito*

En algunas realizaciones, se analiza el producto desulfonado recuperado. En algunas realizaciones, el análisis comprende la secuenciación directa, pirosecuenciación, análisis de conformación de cadena sencilla sensible a la metilación (MS-SSCA), análisis de fusión de alta resolución, extensión por cebador de nucleótido sencillo sensible a metilación (MS-SnuPE), espectrometría de masas/escisión específica de base (por ejemplo, por MALDI-TOF), PCR específica de metilación (MSP), análisis de micromatrices, análisis de digestión de restricción, ensayo QuARTS (descrito en la Sol. de Pat. Serie N.º 12/946.737; 12/946.745; y 12/946.752. El ensayo INVADER, combinaba el análisis de restricción de bisulfito o inmunoprecipitación de ADN metilado (MeDIP). Estos y otros procedimientos se revisan con mayor detalle en, por ejemplo, Fraga MF & Esteller M (2002), "DNA methylation: a profile of methods and applications", *BioTechniques* 33(3): 632, 634, 636-49; El-Maarri O (2003), "Methods: DNA methylation", *Advances in Experimental Medicine and Biology* 544: 197-204; Laird PW (2003), "The power and the promise of DNA methylation markers", *Nat. Rev. Cancer* 3(4): 253-66; Callinan PA & Feinberg AP (2006), "The emerging science of epigenomics", *Hum Mol Genet* 15(90001): R95-101.

### *Automatización*

En un aspecto, la tecnología descrita en el presente documento se puede automatizar, por ejemplo, el procesamiento sin una extensa o ninguna intervención humana, por ejemplo, por robótica, control computarizado, etc. De esta manera, algunas realizaciones se refieren al uso de bisulfito amónico, perlas magnéticas, tampón de unión libre de alcohol, tampón de desulfonación con isopropanol, y/o soluciones que comprenden caseína en un procedimiento o sistema automático para el procesamiento de ácidos nucleicos, por ejemplo, en ensayos para evaluar el estado de metilación de un ácido nucleico.

### *Aislamiento de fragmentos pequeños de ADN*

Los datos experimentales recolectados durante el desarrollo de la tecnología demostraban que la tecnología descrita proporciona una recuperación eficaz de moléculas de ADN corto de una solución. En consecuencia, las realizaciones de la tecnología que se proporciona en el presente documento se refieren a la purificación y aislamiento cuantitativo (por ejemplo, mayor del 90 % de recuperación, más del 95 % de recuperación, preferentemente más del 97 % de recuperación, y más preferentemente más del 99 % de recuperación) de fragmentos de ácido nucleico (por ejemplo, ADN). La tecnología comprende tanto la captura eficaz de ADN por las perlas y la liberación eficaz del ADN aislado de las perlas, ambas en condiciones manipulables por el usuario de la tecnología para efectuar, si se desea, la unión y liberación según sea apropiado para su aplicación. En algunas realizaciones, es útil en la tecnología un tampón de unión libre de alcohol que comprende hidrocloreuro de guanidina.

### **Realizaciones específicas**

Un ejemplo de una realización específica del procedimiento, como se ilustra en la Figura 1, comprende las etapas que se llevan a cabo de la siguiente manera. Las perlas magnéticas (por ejemplo, 45-50  $\mu$ l, por ejemplo 50  $\mu$ l) se pipetea en un tubo de 2 ml, se coloca en un imán y se desecha la solución de conservante de almacenamiento. Después, se suspenden las perlas y se mezclan con 200-300  $\mu$ l (por ejemplo, aproximadamente 250  $\mu$ l) de tampón de unión para retirar cualquier resto de solución de almacenamiento. Entonces se desecha el tampón de unión y se añaden el ADN convertido con bisulfito (por ejemplo, 100-200  $\mu$ l, por ejemplo, 150  $\mu$ l) y el tampón de unión (por ejemplo, 450-550  $\mu$ l, por ejemplo, 500  $\mu$ l) a las perlas y se incuban a la vez que se mezcla durante 10-20 minutos (por ejemplo, 15 minutos) para permitir la unión eficaz del ADN a las perlas. Después de la unión, las perlas se colocan en un imán y se retira sustancialmente toda la solución, se reemplaza con aproximadamente 150-250  $\mu$ l (por ejemplo, 200  $\mu$ l) de tampón de desulfonación, y se mezcla durante 1-10 minutos (por ejemplo, aproximadamente 5 minutos). El tampón de desulfonación se retira entonces colocando el tubo en un imán y retirando el sobrenadante. Después de esta etapa, se lavan las perlas una vez con tampón de unión y dos veces con tampón de lavado, se deja secar para retirar el etanol residual por evaporación, y después se eluye el ADN de las perlas a 60-70  $^{\circ}$ C (por ejemplo, a 65  $^{\circ}$ C) durante 25-35 minutos (por ejemplo, 30 minutos) utilizando una solución que comprende aproximadamente 10 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, y 20 ng/ $\mu$ l de ARNt, a un pH 8,0.

Una segunda realización específica se ilustra en la Figura 2. Esta realización proporciona un procedimiento que comprende las siguientes etapas. Primero, las perlas magnéticas (por ejemplo, 45-50  $\mu$ l, por ejemplo 50  $\mu$ l) se pipetea en un tubo de 2 ml. Después, se mezclan las perlas con 700-800  $\mu$ l (por ejemplo, 750  $\mu$ l) de un tampón de unión libre de alcohol (por ejemplo, aproximadamente 7 M de hidrocloreuro de guanidina) y el ADN convertido con bisulfito (100-200  $\mu$ l, por ejemplo, 150  $\mu$ l). La mezcla se incuba mezclando durante 25-35 minutos (por ejemplo, aproximadamente 30 minutos) para permitir una unión eficaz del ADN a las perlas. Después de la unión, las perlas se colocan en un imán y se retira sustancialmente toda la solución, se reemplaza con 900-1100  $\mu$ l (por ejemplo, 1000  $\mu$ l) de tampón de lavado y se mezcla durante 1-10 minutos (por ejemplo, aproximadamente 5 minutos). Después, se retira el tampón de lavado colocando la solución en un imán y retirando el sobrenadante. A continuación, se añaden 150-250  $\mu$ l (por ejemplo, 200  $\mu$ l) de tampón de desulfonación y se mezcla durante 1-10 minutos (aproximadamente 5 minutos). El tampón de desulfonación se retira entonces colocando el tubo en un imán y retirando el sobrenadante. Después de esta etapa, las perlas se lavan dos veces con tampón de lavado (por ejemplo, un 80 % de etanol; 10 mM de Tris HCl, pH 8,0), se permite que se seque para eliminar el etanol residual por evaporación, y después se eluye el ADN de las perlas, por ejemplo, mediante incubación a 25-35  $^{\circ}$ C (por ejemplo, a aproximadamente 30  $^{\circ}$ C) durante 30-45 minutos utilizando una solución de elución (por ejemplo, una solución que comprende 10 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, y 20 ng/ $\mu$ l de ARNt, a un pH de 8,0).

En algunas realizaciones, se utilizan una o más soluciones para el procesamiento (por ejemplo, lavado de captura, elución de captura, conversión, y/o purificación) de ADN que comprenden BSA y/o caseína para minimizar o eliminar un patrón de tendencia sistemático (por ejemplo, de arriba abajo, de izquierda a derecha) de la variación de recuperación de cadenas (por ejemplo, hasta aproximadamente 3 veces) en función de la localización del pocillo (por ejemplo, por columna y/o por fila) en una placa multi-pocillo (por ejemplo, una placa de 96 pocillos, por ejemplo, una placa de pocillos profundos) y/o para aumentar la recuperación de cadenas.

Aunque la divulgación del presente documento se refiere a ciertas realizaciones ilustradas, se tiene que entender que estas realizaciones se presentan a modo de ejemplo y no a modo de limitación. Aunque la descripción detallada describe la tecnología como que se refiere en general a ácidos nucleicos, la descripción detallada de este aspecto en particular de la presente invención no pretende limitar el ámbito de la invención. La presente divulgación

proporciona unas directrices suficientes para hacer posible que un experto en la técnica de la presente invención utiliza los procedimientos de la presente invención para aislar materiales biológicos de distintos tipos de materiales de ácidos nucleicos, por ejemplo, proteínas o anticuerpos.

### **Ejemplos experimentales**

#### 5 **Ejemplo 1**

##### *Tecnología de ensayo convencional*

10 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología que se proporciona en el presente documento, los experimentos demostraban que la desulfonación y purificación de ADN desulfonado utilizando perlas magnéticas (Partículas Paramagnéticas MagneSil Promega, número de catálogo de Promega AS 1050) y en condiciones de reacción convencionales recomendadas por el proveedor comercial (tampón de unión: 3 M de tiocianato de guanidina y un 50 % de alcohol isopropílico; tampón de lavado 1: 3 M de tiocianato de guanidina y un 40 % de alcohol isopropílico; tampón de lavado 2: un 25 % de etanol, un 25 % de alcohol isopropílico, y 0,1 M de NaCl) daba como resultado una recuperación altamente variable de las muestras procesadas cuando se ensayaban por varios usuarios el mismo día o días diferentes.

#### 15 **Ejemplo 2**

##### *Ensayo de diferentes tipos de perlas magnéticas*

20 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología que se proporciona en el presente documento, se utilizó un tipo de perlas diferentes para ensayar si la reproducibilidad y recuperación mejorarían. Para estos experimentos se utilizaron perlas magnéticas Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter Genomics, número de catálogo A63987). La desulfonación y purificación del ADN que reaccionó con bisulfito utilizando estas perlas daba como resultado una menor variabilidad que utilizando las perlas MagneSil en las condiciones del Ejemplo 1, pero las perlas producían una menor recuperación (por ejemplo, una pérdida de ADN mayor del 50-70 %).

#### **Ejemplo 3**

##### *Ensayo de diferentes rigurosidades de tampón*

25 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología que se proporciona en el presente documento, las perlas magnéticas revestidas de sílice utilizadas en el Ejemplo 1 se re-ensayaron utilizando un tampón de unión modificado y más riguroso que comprendía 3,6 M de tiocianato de guanidina y un 50 % de alcohol isopropílico, un tampón de lavado inicial que comprende 3 M de tiocianato de guanidina y un 50 % de alcohol isopropílico, y tampón de lavado de la última etapa que comprende un 80 % de etanol y 10 mM de Tris-HCl a un pH de 8. El uso de este protocolo daba como resultado una recuperación que era mayor del 110 % en comparación con el procedimiento convencional de columna de centrifugación y daba datos más reproducibles en y entre los experimentos.

#### **Ejemplo 4**

##### *Ensayo de procedimientos con menos etapas y disminución del tiempo de procesamiento*

35 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología que se proporciona en el presente documento, el protocolo de las perlas magnéticas revestidas de sílice del Ejemplo 3 se modificó para reducir la cantidad de tiempo necesario para la ejecución satisfactoria (por ejemplo, considerando la reproducibilidad, eficacia, y recuperación). Inicialmente, el protocolo necesitaba 2,5 horas para completarlo. Después de la disminución del número de etapas de lavados finales de tres a dos, esto no mostraba efecto en la recuperación de ADN. Después, se combinó el tampón de lavado 1 con el tampón de unión, y se descubrió que el uso de este tampón de unión modificado afectaba mínimamente la recuperación de ADN y la reproducibilidad. También se intentó con distintos tiempos y temperaturas de unión y elución. Los experimentos demostraban que la disminución de la temperatura de elución de 85 °C a 65 °C y la incubación durante 20 minutos y disminuyendo el tiempo de unión de 30 a 15 minutos daba como resultado una recuperación satisfactoria de ADN con menos de dos horas de tiempo de procesamiento total.

#### **Ejemplo 5**

##### *Ensayo de desulfonación en perlas magnéticas*

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología desvelada en el presente documento, se llevaron a cabo experimentos para comparar la desulfonación en perlas magnéticas respecto a la desulfonación utilizando una columna de centrifugación.

##### *Materiales*

50 Tampón de unión: 3,6 M de tiocianato de guanidina, 10 mM de Tris HCl (pH 8,0), un 39 % de alcohol isopropílico. Por ejemplo, para hacer 20 ml de tampón de unión, se mezclan 12 mililitros de tiocianato de guanidina 6 M, 0,2

mililitros de Tris HCl 1 M (pH 8,0), y 7,8 mililitros de un alcohol isopropílico (2-propanol).

Tampón de lavado: un 80 % de etanol con 10 mM de Tris HCl (pH 8,0). Por ejemplo, para hacer 10 mililitros de tampón de lavado, se mezclan 8 mililitros de etanol al 100 %, 0,1 mililitros de Tris HCl 1 M (pH 8,0) y 1,9 de agua (destilada dos veces).

- 5 Tampón de desulfonación: NaOH 0,3 N en etanol. Por ejemplo, para hacer 10 mililitros, se mezclan 7 mililitros de etanol al 100 % con 3 mililitros de hidróxido sódico (NaOH) 1 N.

10 Las muestras se mezclan utilizando cualquier dispositivo o tecnología apropiados para mezclar o incubar muestras a las temperaturas y velocidades de mezclado esencialmente como se describen posteriormente. Por ejemplo, se puede utilizar un Thermomixer (Eppendorf) para mezclar o incubar las muestras. Como se utiliza en el presente documento, "ANB" se refiere a un ensayo de los tres marcadores ACTB (beta actina), NDRG4, y BMP3.

### *Procedimientos*

#### *Conversión con sulfito de hidrógeno amónico*

- 15 1. En cada tubo, se combinan 10 µl de ADN, 4,5 µl de NaOH 1 M, y 0,5 µl de agua (por ejemplo, Fisher filtrado por 0,1 µm, calidad de biología molecular).  
 2. Se incuba a 42 °C durante 20 minutos.  
 3. Se añaden 135 µl de sulfito de hidrógeno amónico al 45 % y se incuba a 66 °C durante 1 hora.  
 4. Se incuba a 4 °C durante 10 minutos.

#### *Desulfonación utilizando perlas magnéticas*

- 20 1. Se mezcla la materia prima de perlas completamente removiendo la botella durante 1 minuto.  
 2. Se toman alícuotas de 50 µl de perlas en un tubo de 2,0 ml (por ejemplo, de USA Scientific).  
 3. Se añaden 750 µl de tampón de unión a las perlas.  
 4. Se añaden 150 µl de ADN sulfonado.  
 5. Se mezcla (por ejemplo, a 1000 rpm a 30 °C durante 30 minutos).  
 25 6. Se coloca en tubo en la plataforma magnética y se deja en su sitio durante 5 minutos. Con los tubos en la plataforma, se retira y se desecha el sobrenadante.  
 7. Se añaden 1.000 µl de tampón de lavado. Se mezcla (por ejemplo, a 1000 rpm a 30 °C durante 3 minutos).  
 8. Se coloca el tubo en la plataforma magnética y se deja en su sitio durante 5 minutos. Con los tubos en la plataforma, se retira y se desecha el sobrenadante.  
 9. Se añaden 250 µl de tampón de lavado. Se mezcla (por ejemplo, a 1000 rpm a 30 °C durante 3 minutos).  
 30 10. Se coloca el tubo en la gradilla magnética; se retira y se desecha el sobrenadante después de 1 minuto.  
 11. Se añaden 200 µl de tampón de desulfonación. Se mezcla (por ejemplo, a 1000 rpm a 30 °C durante 5 minutos).  
 12. Se coloca el tubo en la gradilla magnética; se retira y desecha el sobrenadante después de 1 minuto.  
 13. Se añaden 250 µl de tampón de lavado. Se mezcla (por ejemplo, a 1000 rpm a 30 °C durante 3 minutos).  
 35 14. Se coloca el tubo en la gradilla magnética; se retira y desecha el sobrenadante después de 1 minuto.  
 15. Se añaden 250 µl de tampón de lavado al tubo. Se mezcla (por ejemplo, a 1000 rpm a 30 °C durante 3 minutos).  
 16. Se coloca el tubo en la gradilla magnética; se retira y desecha el sobrenadante después de 1 minuto.  
 40 17. Se incuban todos los tubos a 30 °C con la tapa abierta durante 15 minutos.  
 18. Se retira el tubo de la gradilla magnética y se añaden 60 µl de tampón de elución directamente a las perlas.  
 19. Se incuban las perlas con el tampón de elución (por ejemplo, a 1000 rpm a 40 °C durante 45 minutos).  
 20. Se colocan los tubos en una gradilla magnética; se retira y se guarda el sobrenadante después de 1 minuto.

El ADN está listo para el análisis inmediato o se puede almacenar congelado (por ejemplo, a o por debajo de -20 °C) para su uso posterior. Para un almacenamiento a largo plazo, se almacena a o por debajo de -70 °C.

#### 45 *Desulfonación utilizando una columna de centrifugación*

Se utilizaron columnas Zymo IC de centrifugación (Zymo Research, Irvine, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la siguiente manera:

- 50 1. Se añaden 400 µl de tampón de unión a una columna Zymo-Spin IC y se coloca la columna en un Tubo de Recolección que se provee.  
 2. Se cargan 150 µl de muestra en la columna Zymo-Spin IC que contiene el tampón de unión. Se cierra la tapa y se mezcla por inversión.  
 3. Se centrifuga a velocidad completa durante 30 segundos. Se desecha el flujo continuo.  
 4. Se añaden 100 µl de tampón Zymo M de lavado a la columna. Se centrifuga a velocidad completa durante 30 segundos. Se desecha el flujo continuo.  
 55 5. Se añaden 200 µl de tampón Zymo M de desulfonación a la columna y se deja a temperatura ambiente durante 15 minutos.

6. Se centrifuga a velocidad completa durante 30 segundos. Se desecha el flujo continuo.
7. Se añaden 200 µl de tampón Zymo M de lavado a la columna. Se centrifuga a velocidad completa durante 30 segundos. Se desecha el flujo continuo.
8. Se añaden 200 µl de tampón Zymo M de lavado a la columna. Se centrifuga a velocidad completa durante 60 segundos. Se desecha el flujo continuo.
9. Se coloca la columna en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añaden 60 µl de tampón de elución directamente en la matriz de la columna.
10. Se centrifuga a toda velocidad durante 30 segundos. Se guarda el flujo continuo que contiene la muestra.

El ADN está listo para el análisis inmediato o se puede almacenar congelado (por ejemplo, a o por debajo de -20 °C) para su uso posterior. Para un almacenamiento a largo plazo, se almacena a o por debajo de -70 °C.

#### Ensayo QuARTS

La tecnología QuARTS combina un procedimiento de amplificación de un ADN diana basado en polimerasa con un procedimiento de amplificación de señal basado en escisión invasiva. La tecnología se describe, por ejemplo, en la Pat. de EE. UU. 8.361.720, y la Sol. de Pat. de EE. UU. Ser. N.º 12/946.745; 12/946.752, y 61/705.603, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia. La señal de fluorescencia generada por la reacción QuARTS se controla de una forma similar a la PCR en tiempo real y permite la cuantificación de la cantidad de un ácido nucleico diana en una muestra.

Una reacción QuARTS ejemplar comprende normalmente aproximadamente 400-600 nmol/l (por ejemplo, 500 nmol/l) de cada cebador y sonda de detección, aproximadamente 100 nmol/l del oligonucleótido invasivo, aproximadamente 600-700 nmol/l de cada FAM (por ejemplo, como suministra comercialmente Hologic, Inc.), HEX (por ejemplo, como suministra comercialmente BioSearch Technologies, IDT) y Quasar 670 (por ejemplo, como suministra comercialmente BioSearch Technologies ) casetes FRET, 6,675 ng/µl de FEN-1 (por ejemplo, Cleavase® (por ejemplo, 2.0), Hologic, Inc.), 1 unidad de ADN polimerasa Taq en un volumen de reacción de 30 µl (por ejemplo, ADN polimerasa GoTaq®, Promega Corp., Madison, WI), 10 mmol/l de ácido 3-(n-morfolino)propano sulfónico (MOPS), 7,5 mmol/l de MgCl<sub>2</sub>, y 250 mmol/l de cada dNTP. Las condiciones ejemplares del ciclo QuARTS consiste en una incubación inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguido por 10 ciclos a 95 °C durante 20 segundos, 67 °C durante 30 segundos, y 70 °C durante 30 segundos. Después de completar los 10 ciclos, se llevan a cabo normalmente 37 ciclos adicionales a 95 °C durante 20 segundos, 53 °C durante 1 minuto, 70 °C durante 30 segundos, y 40 °C durante 30 segundos. En algunas aplicaciones, el análisis del ciclo de cuantificación (C<sub>q</sub>) proporciona una media del número inicial de cadenas de ADN diana (por ejemplo, número de copias) en la muestra.

Las reacciones se ensamblan de la siguiente manera:

1. Se remueve 3x de la Mezcla de Reacción y 3x de la Mezcla de Oligos ANB durante 3-5 segundos. Se centrifuga cada tubo durante 1-3 segundos.
2. Se formula la Mezcla Maestra en un tubo de 2,0 ml (por ejemplo, de USA Scientific) utilizando 10 µl de 3x del tampón de reacción y 10 µl de 3x de mezcla de oligos ANB por reacción.
3. Se remueve la Mezcla Maestra durante 3-5 segundos. Se centrifuga brevemente para recolectar la muestra.
4. Se tomaron alícuotas de 50 µl de la Mezcla Maestra en tiras de tubos de 200 µl de 8 pocillos, uno para las referencias y una o más para las muestras.
5. Se remueve y se centrifugan las referencias y las muestras. Se dispensan 25 µl en tiras de tubos de 200 µl que contienen la Mezcla Maestra.
6. Se tapan las tiras de tubos y se remueven bien. Se centrifuga brevemente para recolectar la muestra.
7. Se añaden 30 µl de los contenidos de las tiras de tubos en una placa LightCycler LC480 (según la distribución de la placa).
8. Se sella la placa con la hoja de sellado LightCycler LC480. Se centrifuga a 3000 rpm durante 2 minutos.
9. Después de la centrifugación, se coloca en el LightCycler LC480 con las siguientes condiciones de ciclo y se comienza el ensayo:

Parámetros de Reacción de QuARTS				
Estadio	Temp/Tiempo	Tasa de subida (°C por segundo)	N.º de ciclos	Adquisición
Pre-incubación	95 °C/3'	4,4	1	ninguna
Amplificación 1	95 °C/20"	4,4	10	ninguna
	64 °C/30"	2,2		ninguna
	70 °C/30"	4,4		ninguna

(continuación)

Parámetros de Reacción de QuARTS				
Estadio	Temp/Tiempo	Tasa de subida (°C por segundo)	N.º de ciclos	Adquisición
Amplificación 2	95 °C/20"	4,4	35	Ninguna
	53 °C/1'	2,2		sencilla
	70 °C/30"	4,4		ninguna
Enfriamiento	40 °C/30"	2,2	1	ninguna

Los experimentos se llevaron a cabo para comparar los procedimientos para cuantificar la metilación del ADN. El ADN del gen de beta-actina (ACTB) se utilizó como el ADN metilado de entrada en estos experimentos. Las muestras de ADN se sulfonaron de acuerdo con el procedimiento de sulfito de hidrógeno amónico descrito anteriormente en los Procedimientos, y las muestras se desulfonaron posteriormente y se purificaron de acuerdo con los procedimientos de desulfonación en perlas magnéticas o columnas de centrifugación que se describen anteriormente en los Procedimientos. Las condiciones se ensayaron utilizando perlas magnéticas o columnas de centrifugación, utilizando los tampones y procedimientos descritos anteriormente, con cada ensayo por cuadruplicado. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 3A y una repetición de este experimento se muestra en la Figura 3B. Estos datos muestran que las perlas producen una señal sustancialmente más alta.

### Ejemplo 6

#### *Ensayo de un tampón de unión libre de alcohol*

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología que se desvela en el presente documento, los experimentos demostraban que un tampón de unión que comprende hidrocloreto de guanidina y no alcohol actuaba mejor que un tampón de unión de tiocianato de guanidina que comprende alcohol.

#### *Materiales*

Tampón de unión "Gu.HCl": 4,5 a 8,0 M de hidrocloreto de guanidina. Por ejemplo, para hacer una solución de materia prima de hidrocloreto de guanidina, se disolvieron 191 g de hidrocloreto de guanidina en 250 ml de agua y se mezclaron a 35 °C durante 30 minutos. Se hicieron soluciones de hidrocloreto de guanidina de 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 y 8,0 M mezclando 11,25, 12,5, 13,75, 15, o 20 ml, respectivamente de la solución de materia prima de hidrocloreto de guanidina 8 M con agua suficiente para hacer un volumen total de 20 ml. El pH total de las soluciones era aproximadamente de 5,5 tanto a temperatura ambiente como a 75 °C.

#### *Procedimientos*

La conversión con sulfito de hidrógeno amónico se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5. La reacción de desulfonación utilizando perlas magnéticas se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5, con la sustitución de un tampón de unión de hidrocloreto de guanidina (4,5-8,0 M) por el tampón de unión de tiocianato de guanidina que contenía alcohol. La reacción de desulfonación utilizando una columna de centrifugación se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5. Se llevó a cabo el ensayo QuARTS como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5.

Se llevaron a cabo experimentos para comparar el producto de los tampones de unión que utilizan la reacción con bisulfito de 4,5 a 8,0 M de hidrocloreto de guanidina y perlas magnéticas. Se utilizó el ADN del gen de beta-actina (ACTB) como el ADN metilado de entrada para estos experimentos. Las muestras de ADN se sulfonaron de acuerdo con el procedimiento de sulfito de hidrógeno amónico descrito anteriormente en los Procedimientos, y las muestras se desulfonaron posteriormente y se purificaron de acuerdo con los procedimientos de desulfonación en perlas magnéticas o columnas de centrifugación descritos anteriormente en los Procedimientos de este Ejemplo. Los resultados de estos experimentos se recopilan en la Figura 4.

Como se muestra en la Figura 4, un tampón de unión de 6,0 M de hidrocloreto de guanidina da como resultado la mayor cuantificación de ADN por el ensayo QuARTS.

### Ejemplo 7

#### *Ensayo de tampón de unión de hidrocloreto de guanidina*

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología desvelada en el presente documento, los experimentos demostraban que un tampón de unión que comprende hidrocloreto de guanidina y no alcohol actuaba mejor que un tampón de unión de tiocianato de guanidina que comprende alcohol.

**Materiales**

5 Tampón de unión "Gu.HCl": 5,5 a 7,0 M de hidrocloreto de guanidina. Se hicieron soluciones de hidrocloreto de guanidina de 5,5, 6,0, 6,5, y 7,0 M mezclando 13,75, 15, 16,25 o 17,5 ml, respectivamente, de la solución de materia prima de hidrocloreto de guanidina 8 M con agua suficiente para hacer un volumen total de 20 ml. El pH de las soluciones era aproximadamente de 5,5 tanto a temperatura ambiente como a 75 °C.

**Procedimientos**

10 La conversión con sulfito de hidrógeno amónico se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5. La reacción de desulfonación utilizando perlas magnéticas se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5, con la sustitución de un tampón de unión de hidrocloreto de guanidina (5,5-7,0 M) por el tampón de unión de tiocianato de guanidina que contenía alcohol. La reacción de desulfonación utilizando una columna de centrifugación se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5. Se llevó a cabo el ensayo QuARTS como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5.

15 Se llevaron a cabo experimentos para comparar el producto de los tampones de unión que utilizan la reacción con bisulfito de 5,5 a 7,0 M de hidrocloreto de guanidina y perlas magnéticas en el mismo tampón de unión. Se utilizó el ADN del gen de beta-actina (ACTB) como el ADN metilado de entrada para estos experimentos. Las muestras de ADN se sulfonaron de acuerdo con el procedimiento de sulfito de hidrógeno amónico descrito anteriormente en los Procedimientos, y las muestras se desulfonaron posteriormente y se purificaron de acuerdo con los procedimientos de desulfonación en perlas magnéticas o columnas de centrifugación descritos anteriormente en los Procedimientos de este Ejemplo. Los resultados de estos experimentos se recopilan en la Figura 5.

20 Como se muestra en la Figura 5, un tampón de unión de 6,5-7,0 M de hidrocloreto de guanidina da como resultado la mayor cuantificación de ADN por el ensayo QuARTS.

**Ejemplo 8****Ensayo de tampón de desulfonación con un isopropanol**

25 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología desvelada en el presente documento, se llevaron a cabo experimentos para ensayar una solución de alcohol isopropílico e hidróxido sódico (NaOH) para las reacciones de desulfonación en partículas magnéticas revestidas de sílice. En particular, los datos se recolectaron en experimentos que compraban los tampones de desulfonación que comprende isopropanol/hidróxido sódico con tampones de desulfonación que comprende etanol/hidróxido sódico.

30 Los experimentos iniciales para la purificación en perlas con sílice empleaban el tampón de M-Desulfonación del kit EZ-DNA Methylation™ (Zymo research, PN D5002-5). De acuerdo con los procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, Laird, C. D., y col. (2004) "Hairpin-bisulfite PCR: Assessing Epigenetic Methylation Patterns on Complementary Strands of Individual DNA Molecules". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 204-209), una solución de hidróxido sódico 0,3 N en etanol al 70 % se escogió inicialmente para ensayarse contra el tampón de M-desulfonación. Los experimentos se llevaron a cabo para comparar la conversión, purificación, y desulfonación de cadenas de ACTB en perlas utilizando el Tampón de M-Desulfonación y la solución de NaOH 0,3 N en etanol al 70 %. Los datos recolectados demostraban una actuación equivalente entre los dos tampones (Tabla 1). La Tabla 1 muestra la recuperación de la cadena de ACTB después del tratamiento con bisulfito utilizando formulaciones de tampón de sulfonación variadas. El ADN de entrada es de 10 µl de ADNs capturado convertido en 170 µl de bisulfito amónico al 68 % a 65 °C durante 1 hora.

40

**Tabla 1**

Tampón de desulfonación	Media de cadenas de ACTB (N=2)
Tampón M-Desulfonación	1,288 ± 46
NaOH 0,3 N en EtOH al 70 %	1,248 ± 17

45 Como resultado de estos experimentos, se llevaron a cabo experimentos adicionales para ensayar las concentraciones de NaOH y etanol en el tampón de desulfonación. Para ensayar distintas cantidades de etanol e hidróxido sódico en el tampón de desulfonación, se llevaron a cabo experimentos utilizando un agrupamiento positivo de ADNs que se trató con un 34 % de bisulfito amónico durante 1 hora a 68 °C y entonces las perlas se purificaron y desulfonaron utilizando una serie de tampones de NaOH 0,1, 0,2 y 0,3 N y etanol al 60 %, 70 % y 80 %. Los resultados de estos experimentos demuestran que todos los tampones ensayados actuaban igual y están en la desviación experimental entre ellos (Figura 6). Basándose en estos resultados, se decidió utilizar NaOH 0,3 N en un 80 % de etanol como tampón de desulfonación.

50 Se llevaron a cabo experimentos adicionales para ensayar distintos tiempos de incubación para la reacción de

desulfonación. Estos experimentos utilizaban un agrupamiento positivo de ADN que se trató con un 34 % de bisulfito amónico durante 1 hora a 68 °C, entonces las perlas se purificaron y desulfonaron utilizando NaOH 0,3 N y etanol al 80 % durante distintos periodos. Los resultados muestran que un tiempo de 10 minutos es suficiente para la reacción (Figura 7).

- 5 Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología proporcionada en el presente documento, los experimentos demostraron que un reactivo de desulfonación que comprende hidróxido sódico y etanol producía un precipitado blanco después de exponerse al aire durante más de aproximadamente una hora. Por ejemplo, los experimentos en curso que utilizan el tampón de desulfonación con etanol al 80 %, NaOH 0,3 N mostraba que su exposición prolongada al aire causaba la formación de un precipitado blanco, más probablemente de carbonato sódico, que no se disuelve fácilmente. En un ensayo adicional de distintas concentraciones de etanol y NaOH de desulfonación y precipitación, los reactivos que variaban desde etanol al 70 % y el 90 % y NaOH de 0,1 a 0,3 N formaban un precipitado blanco en 3 horas de exposición al aire. Dicho precipitado podría causar problemas y/o errores de ensayo en algunas realizaciones de la tecnología en cuyas etapas se integran en un flujo de trabajo automático. Como resultado, se ensayaron las composiciones de tampón de sulfonación alternativas.
- 10
- 15 Se llevaron a cabo experimentos para ensayar tampones de desulfonación alternativos como posibles remplazos de los tampones basados en etanol. Los experimentos descritos posteriormente demostraban que el uso de un alcohol isopropílico en vez de etanol minimizaba o eliminaba el problema de formación de precipitados.

Se hicieron distintas soluciones de desulfonación que comprende un alcohol isopropílico como un remplazo del etanol y se ensayaron colocándolos en recipientes abiertos durante 3 horas para determinar si se formaba un precipitado. Las observaciones iniciales fueron que, al mezclar la solución, ciertas soluciones de alcohol isopropílico/NaOH no formaban un precipitado sino más bien formaban una bicapa diferenciada. La tabla 2 enumera los distintos tampones de desulfonación con alcohol isopropílico fabricados y su propensión a formar una bicapa diferenciada.

20

**Tabla 2**

Tampones de alcohol isopropílico e hidróxido sódico ensayados		
% de alcohol isopropílico	NaOH, (N)	Formación de una bicapa
90 %	0,3 N	Sí
90 %	0,2 N	Sí
90 %	0,1 N	Sí
80 %	0,3 N	Sí
80 %	0,2 N	Sí
80 %	0,1 N	Sí, Moderada
70 %	0,3 N	Sí
70 %	0,2 N	Sí, Moderada
70 %	0,1 N	No

25 Como resultado de las soluciones de ensayo que comprenden alcohol isopropílico e hidróxido sódico en canto a la precipitación, se llevaron a cabo experimentos adicionales para ensayar tampones que comprende un 70 % de alcohol isopropílico y NaOH 0,1 N en cuanto a la actividad de desulfonación. Al comparar la actuación de un tampón que comprende un 80 % de etanol /0,3 N NaOH frente a un tampón que comprende un 70 % de alcohol isopropílico/NaOH 0,1 N a altos y bajos niveles ("HD" y "LD", respectivamente) de cadenas sintéticas convertidas se demostraba que el uso de un alcohol isopropílico al 70 % daba como resultado una conversión de cadena ligeramente mejor que el etanol (Tabla 3).

30

Para estos experimentos, se utilizaron ultrámeros HD y LD (cadenas sintetizadas químicamente de aproximadamente 150 a 200 nucleótidos) que contenían  $1,7 \times 10^5$  cadenas de cada uno de los ADN diana NDRG y BMP3 y  $2 \times 10^6$  cadenas de cada una de las dianas ACTB y KRAS. Los ultrámeros LD contenían  $5 \times 10^4$  cadenas de cada una de las cadenas sintéticas metiladas NDRG y BMP3 y  $2 \times 10^6$  cadenas de cada uno de los ACTB y KRAS sintéticos. Los ultrámeros se sometieron a una conversión con ABS y estando en una solución de ABS al 34 % se mezclaron con 750 µl de guanidina HCl 7 M y 50 µl de 16 µg/µl de perlas de sílice y se permitió que se unieran mientras se mezclaba a 1000 rpm durante 30 minutos. Las perlas se lavaron entonces dos veces, se desulfonaron durante 10 minutos utilizando un tampón de desulfonación con alcohol isopropílico al 70 %/ NaOH 0,1 N o etanol (EtOH) al 80 %/ NaOH 0,3 N a 30 °C, se lavaron dos veces, y se secaron a 75 °C durante 15 minutos seguido por

35

40

una elución con 70 µl. En la Tabla 3, la media de cadenas y las desviaciones típicas son el resultado de 23 repeticiones.

**Tabla 3**

Tampones de desulfonación basados en alcohol isopropílico frente a basados en etanol							
Marcador de metilación		NDRG4		BMP3		ACTB	
Tampón de desulfonación		EtOH	IPA	EtOH	IPA	EtOH	IPA
Ultrámeros HD	Media de cadenas	565	904	349	570	5.337	8.594
	Desviaciones típicas	148	129	82	101	1.445	1.546
Ultrámeros LD	Media de cadenas	128	260	82	137	4.359	7.908
	Desviaciones típicas	44	41	19	33	1.193	929

5 Para ensayar el efecto de cambio del tiempo de desulfonación para las reacciones que utilizaban el tampón con IPA al 70 %, NaOH 0,1 N, se llevaron a cabo experimentos que utilizaban un agrupamiento de ADN positivo para comparar los tiempos de desulfonación de 5, 10, 20 y 30 minutos a 30 °C. En los experimentos se mezclaron, 200 µl de ADN convertido en una solución de ABS al 34 % con 750 µl de 7 M de hidrocloreto de guanidina y 50 µl de 16 µg/µl de perlas de sílice y se permitió que se unieran mientras se mezclaba a 1000 rpm durante 30 minutos. 10 Entonces se lavaron las perlas dos veces, se desulfonaron durante distintos tiempos utilizando alcohol isopropílico al 70 % y NaOH 0,1 N a 30 °C, se lavaron dos veces, y se secaron a 75 °C durante 15 minutos seguido por elución con 70 µl de tampón de elución. La media de cadenas y los coeficientes de variación son los resultados de tres repeticiones.

15 Los resultados muestran que 10 minutos de desulfonación son suficientes y más tiempo de desulfonación no daba como resultado una desulfonación de cadenas significativamente mayor (Tabla 4).

**Tabla 4**

Ensayo del tiempo de desulfonación utilizando un tampón de desulfonación con un IPA al 70 %, NaOH 0,1 N						
	Media de las cadenas (N=3)			% CV		
Tiempo de desulfonación	NDRG4	BMP3	ACTB	NDRG4	BMP3	ACTB
<b>5 minutos</b>	2.668	920	10.788	15 %	13 %	14 %
<b>10 minutos</b>	3.084	1.029	12.245	11 %	9 %	13 %
<b>20 minutos</b>	3.141	1.012	12.089	5 %	5 %	6 %
<b>30 minutos</b>	3.477	1.112	12.868	6 %	5 %	10 %

20 Se llevaron a cabo experimentos para ensayar distintas condiciones de reacción evaluando el efecto de desviaciones menores de formulación sobre la eficacia del tampón de desulfonación. En estos experimentos, se hicieron y ensayaron distintas formulaciones se desviaban ligeramente del tampón con IPA al 70 %, NaOH 0,1 N. Se mezcló un volumen de 200 µl de ADN convertido en una solución de ABS al 34 % con 750 µl de 7 M de guanidina HCl y 50 µl de perlas de sílice a 16 µg/µl y se permitió que se unieran mientras se mezclaba a 1000 rpm durante 30 minutos. Las perlas se lavaron entonces dos veces, se desulfonaron durante 10 minutos utilizando el tampón de desulfonación inducido a 30 °C, se lavaron dos veces, y se secaron a 75 °C durante 15 minutos seguido por la 25 elución con 70 µl. La media de las cadenas y los coeficientes de variación son el resultado de tres repeticiones. Las fluctuaciones menores de las concentraciones de alcohol isopropílico o NaOH tienen efectos insignificantes sobre la eficacia de desulfonación (Tabla 5).

**Tabla 5**

Evaluación de desviaciones menores en la formulación sobre la eficacia del tampón de desulfonación						
	Media de cadenas (N=3)			% CV		
Tampón de desulfonación	NDRG4	BMP3	ACTB	NDRG4	BMP3	ACTB
<b>70 % IPA, NaOH 0,1 N (Contr</b>	11.121	3.663	54.250	1 %	4 %	3 %

(continuación)

Evaluación de desviaciones menores en la formulación sobre la eficacia del tampón de desulfonación						
Tampón de desulfonación	Media de cadenas (N=3)			% CV		
	NDRG4	BMP3	ACTB	NDRG4	BMP3	ACTB
70 % IPA, NaOH 0,125 N	11.092	3.679	56.262	5 %	7 %	8 %
70 % IPA, NaOH 0,075 N	12.607	4.147	63.329	5 %	5 %	8 %
60 % IPA, NaOH 0,1 N	10.526	3.520	52.178	2 %	3 %	3 %
65 % IPA, NaOH 0,1 N	11.641	3.804	56.618	11 %	10 %	12 %

Basándose en estos resultados, una formulación de alcohol isopropílico al 70 %, NaOH 0,1 N se seleccionó como tampón de desulfonación.

## 5 Ejemplo 9

### *Soluciones proteicas que mejoran la recuperación de ácido nucleico*

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología que se desvela en el presente documento, se recolectaron datos que demostraban una variación significativa en la recuperación de ADN (por ejemplo, ADN tratado con bisulfito) a partir de las sondas de captura en recipientes de reacción. La variación observada en las placas de reacción (por ejemplo, placas multi-pocillo tales como placas de 96 pocillos profundos) parecía ser en función de la localización del pocillo en la placa. En particular, se demostró que la recuperación de ADN variaba de arriba abajo (por ejemplo, en función de la fila de la placa) y/o de izquierda a derecha (por ejemplo, en función de la columna de la placa). En algunos experimentos, la variación en la recuperación de ADN era de hasta tres veces. Por ejemplo, los experimentos que utilizaban muestras de 96 repeticiones de un ácido nucleico diana (por ejemplo, NDRG4) a lo largo de la placa completa presentaba que el número de cadenas recuperadas de los diferentes pocillos en la placa variaba en general desde arriba (fila H) de una placa de 96 pocillos (véase, por ejemplo, la Figura 8).

La variación de la eficacia de recuperación asociada con las posiciones particulares en una placa de muestra impide la adaptación de la tecnología a un formato automático de altas prestaciones (por ejemplo, en una placa multi-pocillo tal como una placa de 96 pocillos profundos). Los intentos para resolver este problema incluían los experimentos llevados a cabo utilizando placas multi-pocillo obtenidas de diferentes fabricantes cambiando el orden de adición del reactivo, lavando las placas antes de su uso (por ejemplo, con NaOH). Ninguno de estos intentos reducía satisfactoriamente la variación en recuperación de cadenas.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales para ensayar el efecto de la adición de proteínas, por ejemplo, albúmina sérica bovina (BSA) o caseína, a las soluciones que se utilizan para lavar el ADN capturado en la placa o para eluir el ADN de las perlas de captura, como se describe en el presente documento. Como se expone posteriormente, estos ensayos demostraban que la BSA y caseína reducían o eliminaban las aberraciones de la recuperación de cadenas en placas multi-pocillo. En algunas realizaciones, la BSA y/o caseína se añade a la solución de lavado que se utiliza después de la etapa de captura y antes de la etapa de elución a pH alto.

En algunas realizaciones, el ADN es un ADN tratado con bisulfito. Los experimentos demostraron que la adición de BSA a una concentración final de aproximadamente 10 ng/μl reducía la variación en la recuperación observada en los paneles de ACTB, NDRG-4 y BMP-3 (panel "ANB") tratados con bisulfito.

Por ejemplo, en algunos experimentos, se redujo la variación desde aproximadamente una diferencia de tres veces entre la parte superior y la inferior de la placa a ninguna diferencia a aproximadamente una relación relativa de 1,25 entre la parte superior y la inferior de la placa. Véase, por ejemplo, la Figura 10, que compara los efectos de diferentes concentraciones de BSA sobre la recuperación de ADN NDGR-4 y KRAS 38A (columnas 8-11). Para el ensayo de metilación, se observaba un aumento de 4 veces en la media de columnas al añadir BSA, y se muestra adicionalmente que la adición de BSA disminuía la tendencia de bajada de la placa de 3 veces como se muestra en la Figura 9, a 1,25 veces, como se observa dividiendo la media de cadenas de la fila H por la fila A en la Figura 10.

Esta reducción en la variación era desde aproximadamente un 300 % a un 30 %. Los experimentos adicionales para ensayar las concentraciones de BSA demostraban que la BSA aliviaba la variación observada a una concentración de BSA de aproximadamente 27 ng/μl o más, y además, que la recuperación de cadenas aumentaba con concentraciones crecientes de BSA hasta aproximadamente 100 ng/μl como se muestra posteriormente:

	ng/μl de BSA	Media de cadenas		%CV	
		ANB	KRAS	ANB	KRAS
<b>FAM</b>	<b>28</b>	6960	21460	19 %	21 %
	<b>55</b>	7296	24928	15 %	18 %
	<b>900</b>	6738	31856	11 %	16 %
<b>HEX</b>	<b>1800</b>	4383	26150	11 %	26 %
	<b>250</b>	3146	14423	16 %	17 %
	<b>500</b>	3189	18379	11 %	13 %
	<b>900</b>	3443	23000	11 %	16 %
	<b>1800</b>	2280	20319	6 %	17 %
<b>QSR</b>	<b>250</b>	64815	120769	18 %	20 %
	<b>500</b>	80171	125977	18 %	14 %
	<b>900</b>	70401	163284	15 %	13 %
	<b>1800</b>	56421	143850	9 %	12 %

Los paneles y fluoróforos son los que se describen en la Figura 11. Estos datos eran señales promediadas de 46 reacciones del ensayo QuARTS.

- 5 En otros experimentos llevados a cabo para ensayar el efecto de la caseína para aliviar la variación observada, los datos recolectados demostraban que añadiendo caseína, por ejemplo, caseína alcalina desnaturalizada, a una o más soluciones a una concentración del 0,001 % al 0,01 % (por ejemplo, comparando un 0,001 %, 0,003 %, 0,006 % y 0,01 %) se reducía o eliminaba la variación de recuperación de cadenas de ADN por la posición del pocillo y se observaba un aumento de la recuperación de cadenas de ADN con la concentración creciente de caseína.
- 10 En algunos experimentos se comparan directamente los efectos de BSA y caseína, los datos demostraban que la caseína dobla la recuperación de cadenas en comparación con la BSA. Véase, por ejemplo, la Figura 11. Los experimentos adicionales demostraban que el prelavado y aclarado de las placas multi-pocillos con una solución de BSA (por ejemplo, antes de la captura de ADN) también disminuía la variación.

15 En algunos experimentos, este problema de variación de recuperación de cadenas de ADN en función de la posición del pocillo en una placa multi-pocillo se asociaba con el procesamiento (por ejemplo, la conversión con bisulfito y/o la purificación, elución) de ADN de aproximadamente 200 nucleótidos o menos en un formato multi-pocillo (por ejemplo, en una placa de pocillos profundos tal como una placa de 96 pocillos profundos). Como este fenómeno era inesperado, la base física de la variación sistemática no se conoce y el mecanismo para minimizar o eliminar la variación por BSA y/o caseína no se conoce. Sin embargo, no es necesario el entendimiento de la base de la variación y/o el mecanismo por el que se minimiza o elimina por la BSA y/o caseína para la práctica de la tecnología.

20 Sin quedar ligados por teoría alguna, una explicación puede ser que la BSA y/o caseína minimiza o elimina la unión de ADN a las superficies del pocillo que varía, por ejemplo, debido al proceso de fabricación y/o defectos en las placas.

25 En resumen, durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología relativa a la integración automática (por ejemplo, para llevar a cabo la captura, lavado, elución, conversión, y purificación en un instrumento automático y un formato de 96 pocillos profundos), se observaba un patrón de tendencia de sistemático (por ejemplo, de arriba abajo, de izquierda a derecha) de la variación de recuperación de cadenas (por ejemplo, hasta aproximadamente tres veces) a partir de sondas de captura para las cadenas de ADN (por ejemplo, un ADN sintético convertido con bisulfito). Se ensayaron distintas soluciones y los datos sugerían que la adición de BSA y/o caseína minimizaba o eliminaba la variación de recuperación de cadenas de ADN y un aumento de la recuperación de cadenas de ADN, por ejemplo, eluidas de las sondas de captura.

30

Aunque se ha descrito la tecnología en conexión con realizaciones ejemplares específicas, se debería entender que la invención reivindicada no se debería limitar indebidamente a dichas realizaciones específicas. Además, se pretende que las distintas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que sean obvias para los expertos en bioquímica, biología molecular, medicina clínica, genómica, o campos relaciones estén dentro del ámbito de las siguientes reivindicaciones.

35

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de tratamiento de ADN pequeño para cuantificar la metilación de ADN, comprendiendo el procedimiento:
- 5 a) poner en contacto una muestra que comprende el ADN pequeño con un reactivo de sulfonación para producir un ADN pequeño sulfonado, en el que dicho reactivo de sulfonación comprende sulfito de hidrógeno amónico;
- b) unir dicho ADN pequeño sulfonado con una perla magnética en un tampón de unión libre de alcohol que comprende hidrocloreuro de guanidina para producir un ADN pequeño sulfonado unido a la perla;
- c) poner en contacto el ADN pequeño unido a la perla con un reactivo de desulfonación para producir un ADN pequeño convertido; y
- 10 d) cuantificar la metilación de ADN si está presente, en el ADN pequeño convertido;
- en el que dicho ADN pequeño tiene 200 o menos bases de longitud.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tampón de unión comprende aproximadamente 7,0 M de hidrocloreuro de guanidina.
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende adicionalmente la elución de dicho ADN pequeño convertido para proporcionar una muestra analítica.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la cantidad de ADN pequeño que se pone en contacto con dicho reactivo de desulfonación es sustancialmente la misma que la cantidad de ADN pequeño en la muestra analítica.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la perla magnética es una perla magnética revestida de sílice.
- 20 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el procedimiento de producción de dicho ADN pequeño convertido se completa en 4 horas o menos, preferentemente en 3 horas o menos, más preferentemente en 2 horas o menos.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el reactivo de desulfonación comprende un isopropanol aproximadamente al 70 % e hidróxido sódico aproximadamente 0,1 N.
- 25 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha perla magnética y dicho ADN pequeño están en un recipiente de muestra, y en el que dicho procedimiento comprende una etapa de exposición de dicho recipiente de muestra que contienen dicha perla magnética y dicho ADN pequeño a una solución que comprende al menos una de entre albúmina sérica bovina o caseína.
- 30 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicha solución comprende entre aproximadamente 10 ng/μl y 100 ng/μl de albúmina sérica bovina o en el que dicha solución comprende entre aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 0,01 % de caseína.
10. Un kit para el tratamiento de un ADN pequeño para cuantificar la metilación de ADN que comprende:
- 35 a) un reactivo de sulfonación de sulfito de hidrógeno amónico;
- b) una perla magnética revestida de sílice;
- c) un tampón de unión de hidrocloreuro de guanidina libre de alcohol;
- d) un tampón de lavado;
- e) un reactivo de desulfonación; y
- f) un tampón de elución.
- 40 11. El kit de la reivindicación 10, en el que el tampón de unión comprende aproximadamente 6,5-7,5 M de hidrocloreuro de guanidina.
12. El kit de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que el reactivo de desulfonación comprende un isopropanol.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el reactivo de desulfonación comprende un isopropanol a aproximadamente un 70 % e hidróxido sódico a aproximadamente 0,1 N.
- 45 14. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende adicionalmente una solución que contiene al menos una de entre albúmina sérica bovina y/o caseína.

FIG. 1

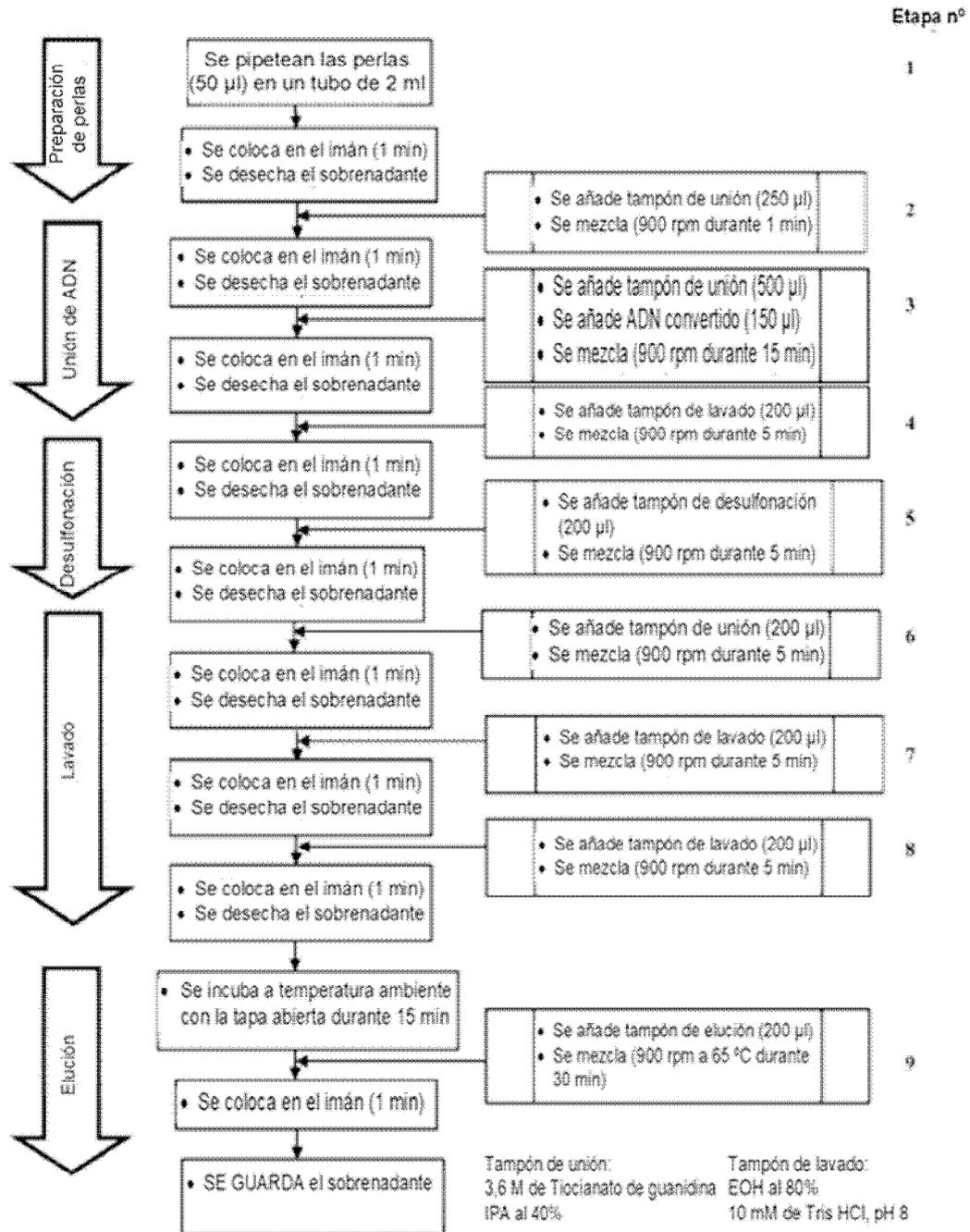


FIG. 2

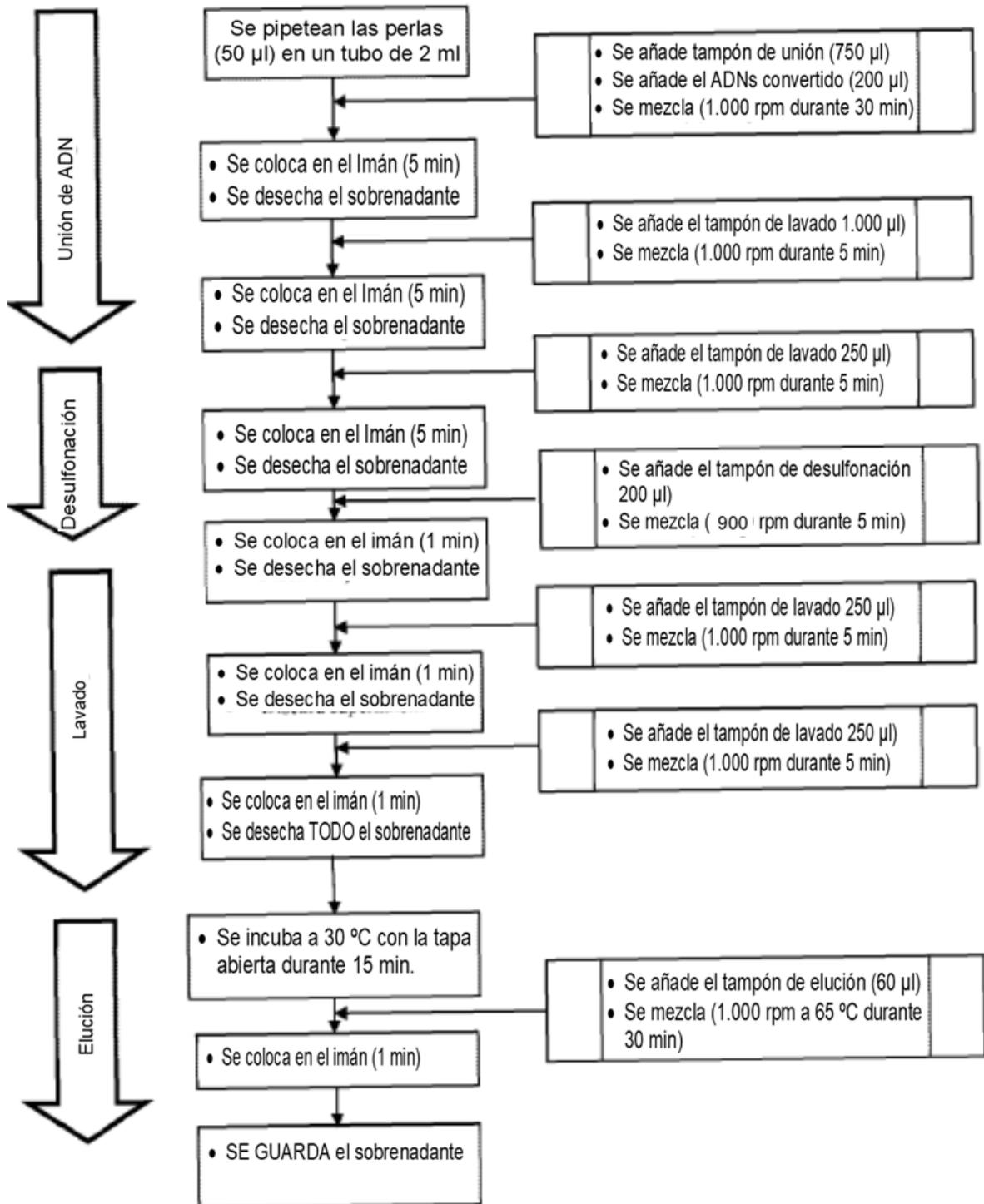
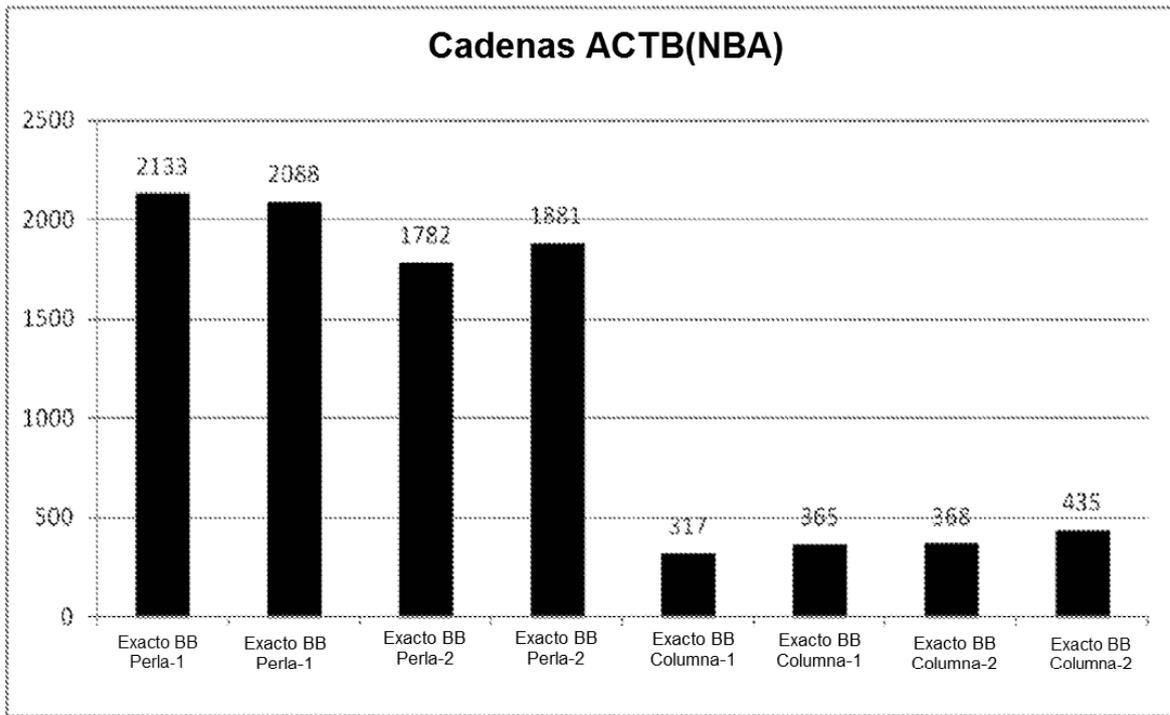


FIG. 3

A.



B.

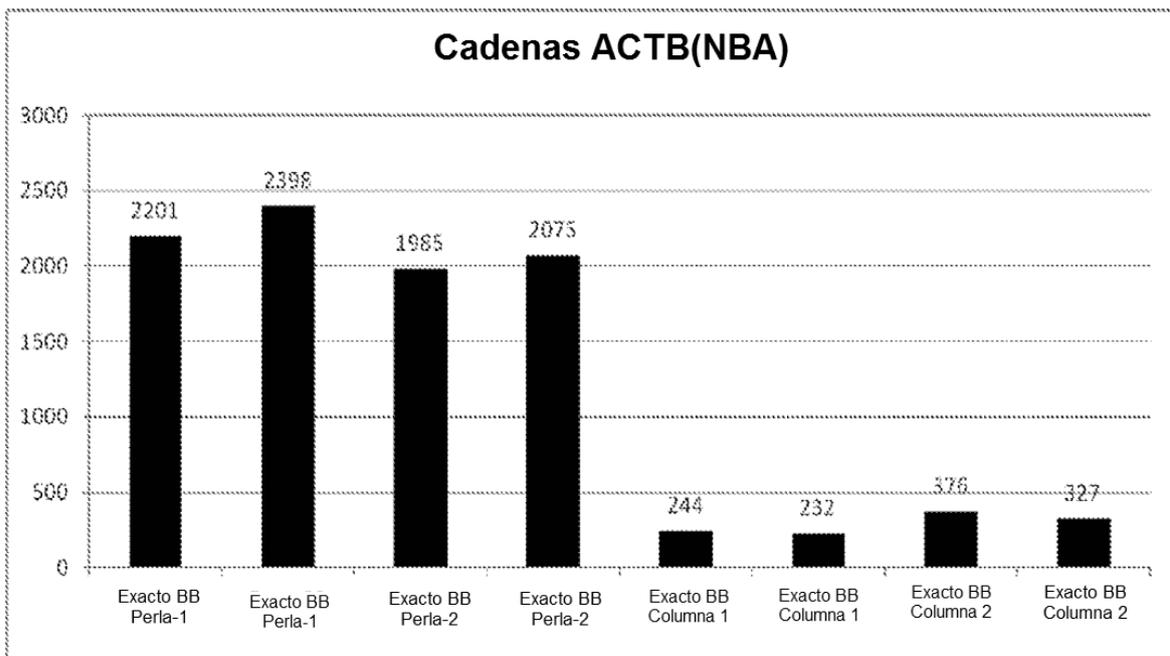


FIG. 4

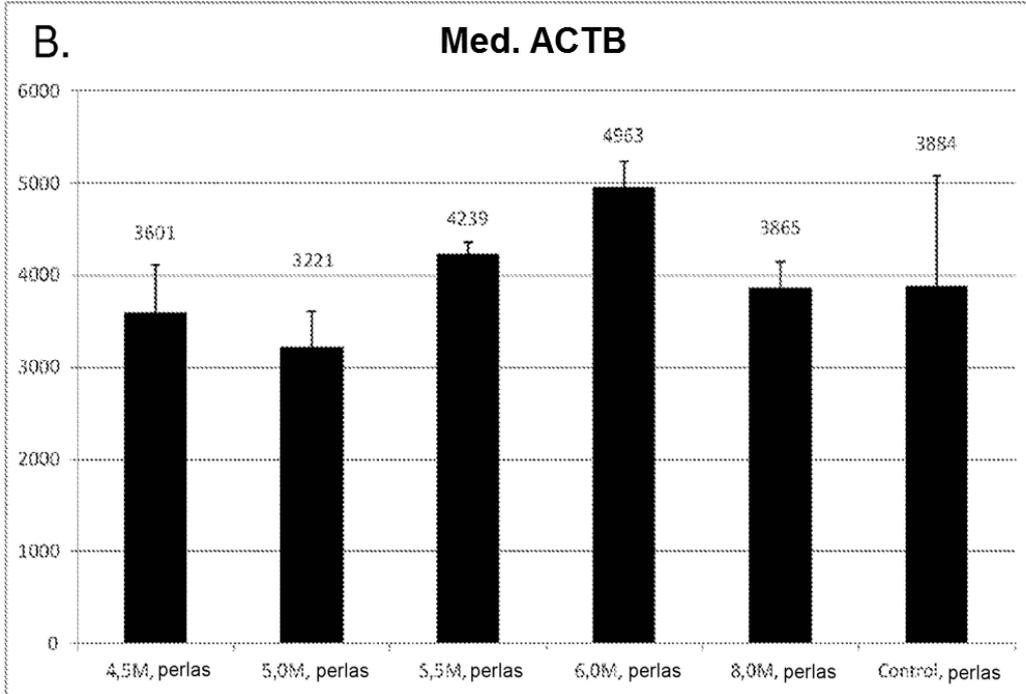
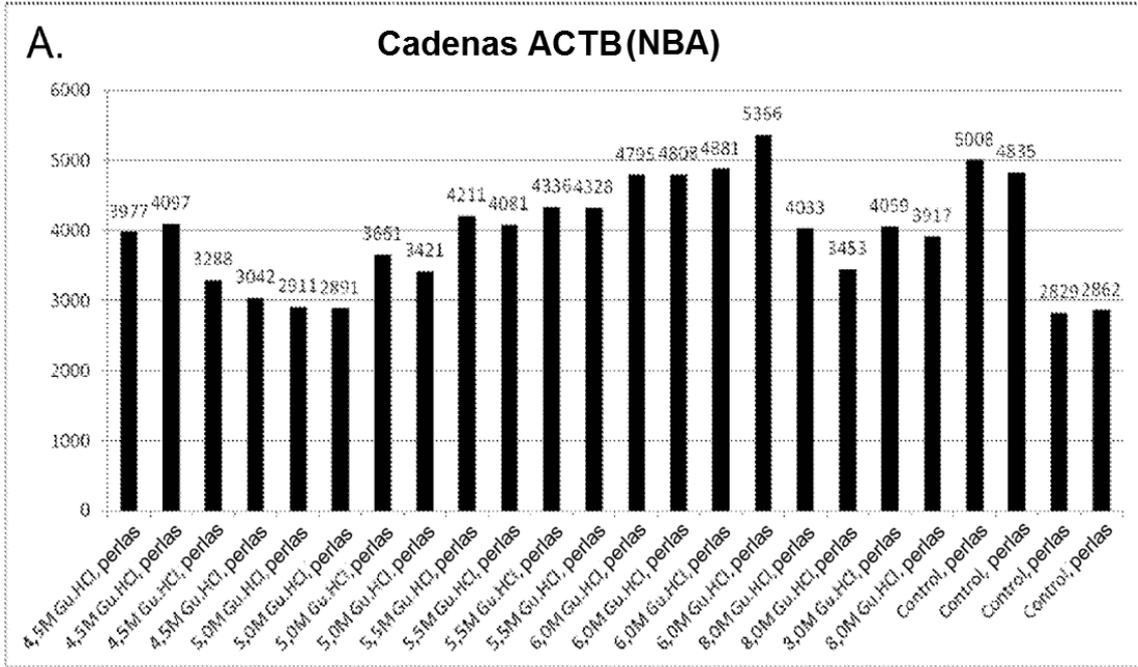
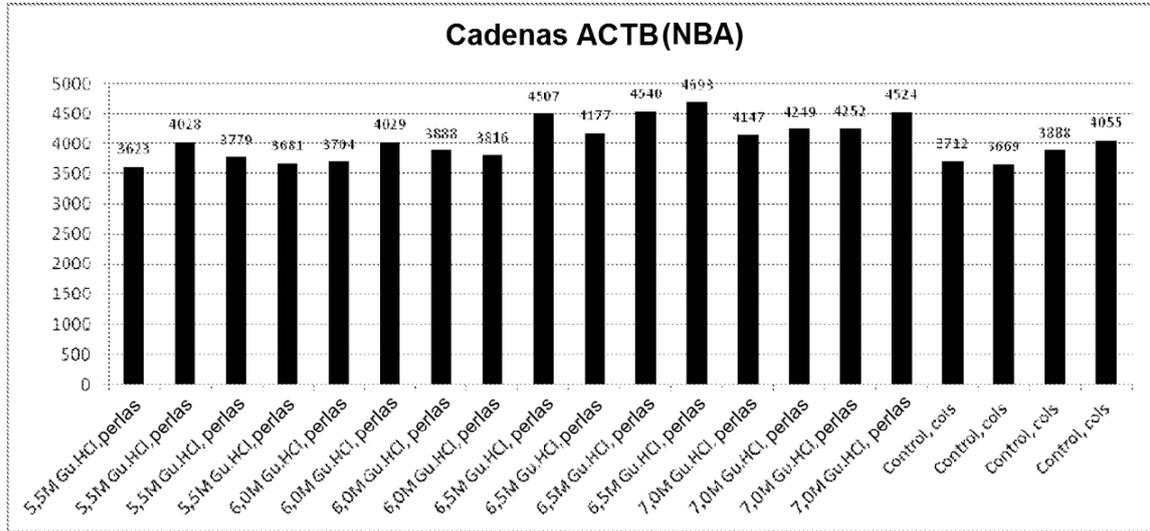
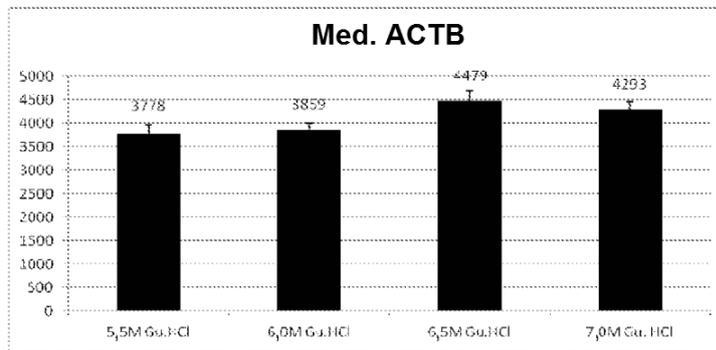


FIG. 5

A.



B.



B.

FIG. 6

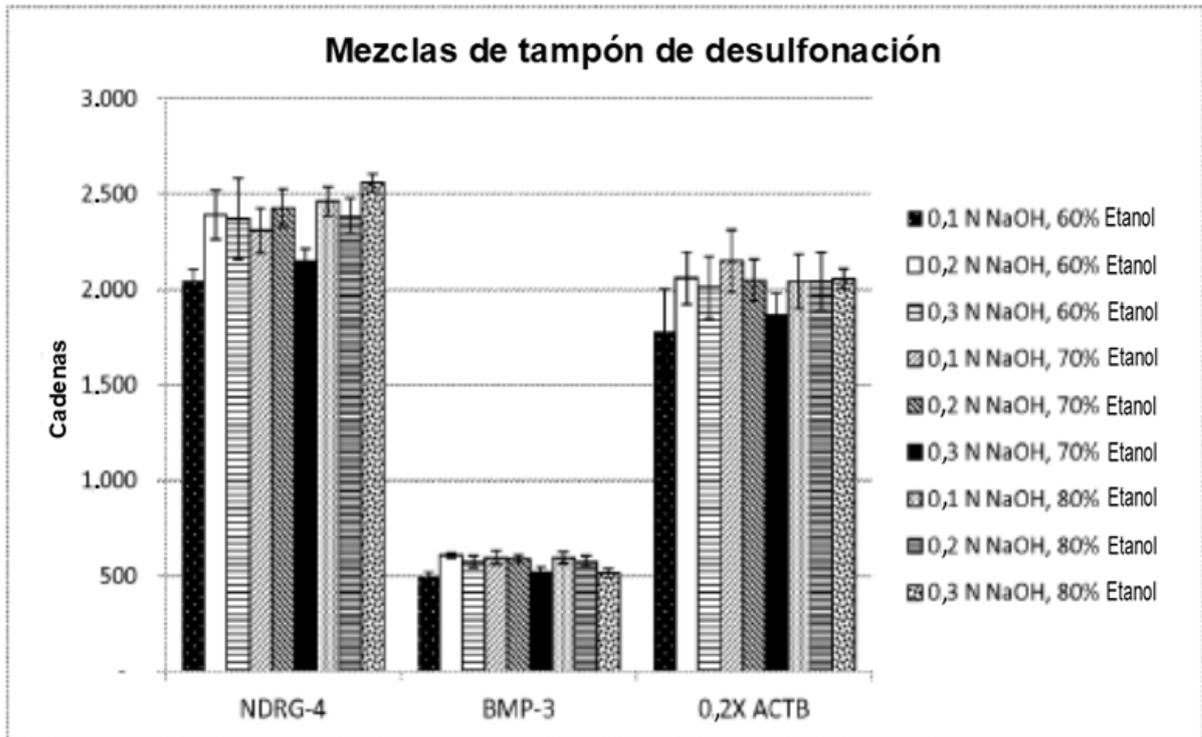


FIG. 7

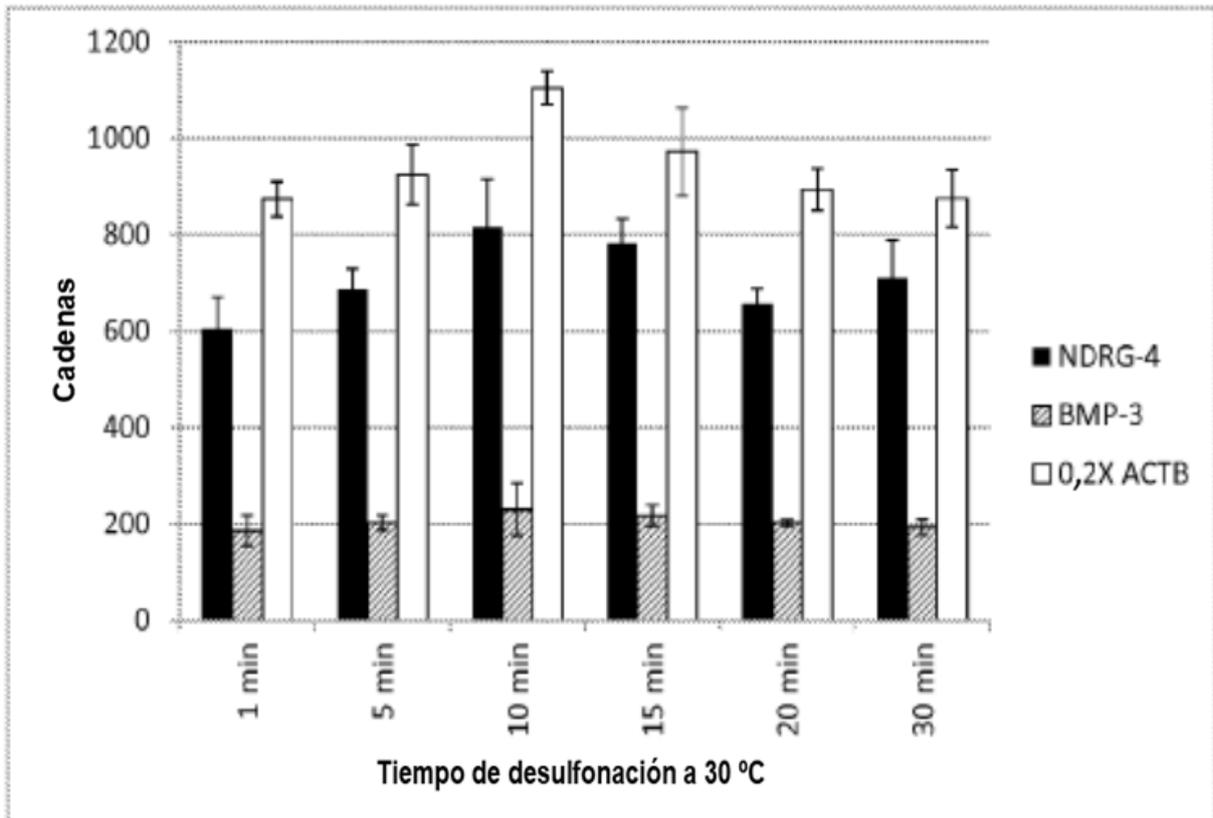


FIG. 8

<b>NDRG4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	1121	480	547	455	488	806	554	529	553	546	589	1054
<b>B</b>	573	507	438	538	478	695	744	830	964	515	533	547
<b>C</b>	1007	817	736	594	678	841	875	715	706	815	910	1105
<b>D</b>	953	1018	860	801	827	1014	841	781	891	799	1343	1090
<b>E</b>	1050	1337	973	981	1198	800	1027	884	799	1054	1271	1088
<b>F</b>	1177	1308	1153	1358	791	915	1024	1134	1028	1349	1152	1135
<b>G</b>	1263	990	1185	1014	1139	1124	944	952	1178	1277	1155	1312
<b>H</b>	1709	1495	1377	1301	1468	1239	1648	1194	1504	1473	1499	1366

FIG. 9

	Metilación de NDRG4				Mutación 38A							
	Te	BSA	Te	BSA	Te	BSA	Te	BSA				
NDRG4/38A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		533	777	3892	4275			20143	23362	29247	30869	
B		972	710	4360	4415			22385	22176	33166	32147	
C		994	878	4436	4822			24827	22735	27471	29478	
D		1075	932	4370	4594			21295	22570	29559	31734	
E		1089	1469	3833	5615			19918	21514	26408	24399	
F		1350	1776	6820	4463			22632	23004	24715	25416	
G		1352	1039	4901	4892			18037	20836	22618	22915	
H		1775	2125	4176	6239			22391	22937	23499	28512	
Media de cadenas		1.178		4.753				21.924		27.634		

FIG. 10

Ch1	Ensayo de metilación - NDRG-4								Ensayo de mutación - KRAS 38A																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
A	1863	1956	2182	1484	1561	1467	3841	5656	5381	6031	4516	4846																
B	1759	1888	2126	1669	1962	1354	3814	5616	6036	5184	4156	5591																
C	2076	1457	2092	1959	1049	1761	4879	6280	5589	4978	3299	3539																
D	1967	2385	2854	1998	1544	1874	5156	4754	5006	6159	2819	5024																
E	2518	2702	2360	1870	1477	1665	5367	5691	5160	5765	3562	4396																
F	2526	2661	2761	2551	2490	1991	5195	5728	5151	5642	4805	4840																
G	2252	2273	2763	2812	2063	-	4864	4703	5587	5463	4154	-																
H	2743	2586	2627	2861	2531	-	5220	5472	6273	5292	4122	-																
5 ng/μL BSA													20 ng/μL BSA				10 ng/μL BSA				20 ng/μL BSA							
Media de cadenas													2311				5140				5543				4262			
2226													1771				5140				5543				4262			

FIG. 11

	ng/μl BSA	Med. de cadenas		ng/μl caseína	Med. de cadenas	
		ANB	KRAS		ANB	KRAS
<b>FAM</b>	28	6.960	21.460	2,8	10.554	44.288
	55	7.296	24.928	5,6	10.004	42.849
	100	6.738	31.856	11,2	11.835	50.737
	200	4.383	26.150			
<b>HEX</b>	28	3.346	14.423	2,8	4.378	29.071
	55	3.189	18.379	5,6	4.400	26.291
	100	3.443	23.000	11,2	4.826	31.218
	200	2.280	20.319			
<b>QSR</b>	28	64.815	120.769	2,8	98.350	271.122
	55	80.171	125.977	5,6	100.855	237.179
	100	70.401	163.284	11,2	109.903	286.628
	200	56.421	143.850			