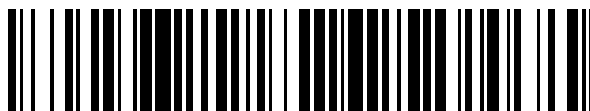


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 484**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6809 (2008.01)

C12Q 1/6851 (2008.01)

C12Q 1/6881 (2008.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

C12Q 1/6858 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.02.2007** **E 15195673 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019** **EP 3002339**

54 Título: **Prueba genética fetal no invasiva mediante análisis digital**

30 Prioridad:

02.02.2006 US 764420 P

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

31.01.2020

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (100.0%)
Office of the General Counsel, Building 170, Third
Floor, Main Quad, P.O. Box 20386
Stanford, CA 94305-2038, US**

72 Inventor/es:

**QUAKE, STEPHEN y
FAN, HEI-MUN CHRISTINA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 739 484 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

Prueba genética fetal no invasiva mediante análisis digital

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al campo de la detección genética fetal y para el campo del análisis cuantitativo de ácidos nucleicos.

Técnica relacionada

15 Ahora se reconoce que el ADN fetal se arroja desde la placenta y se mezcla con la sangre de la madre en niveles bastante elevados - entre el 3% y el 6% del ADN en la sangre de la madre es del feto. Esta observación se ha utilizado en combinación con los ensayos de PCR para una variedad de pantallas genéticas fetales - género, Rh, y la talasemia. Sin embargo, la técnica sigue siendo limitada por dos razones principales: primero, los ensayos de PCR intercambian sensibilidad por la especificidad, lo que hace difícil identificar mutaciones particulares, y segundo, el trastorno genético más común, Síndrome de Down, es una trisomía cromosómica y por lo tanto no puede ser detectado por PCR convencional en una muestra mixta.

25 Ahora se ha encontrado que estos problemas pueden ser resueltos mediante el examen cuantitativo de un gran número de muestras de cromosomas mediante el uso de técnicas altamente escalables. Este enfoque se denomina aquí "análisis digital", y consiste en la separación del material genómico extraído en unidades discretas de modo que la detección de una secuencia diana (por ejemplo, el cromosoma 21) puede ser simplemente cuantificada como binario (0, 1) o como múltiplos sencillos , 2, 3, etc. El ejemplo principal de una técnica que se puede utilizar para producir tales resultados "digital" es "PCR digital", que permite la amplificación eficiente de las moléculas individuales, seguida de análisis cuantitativo posterior. PCR Digital, como el término se utiliza aquí, se refiere a una dilución cuantitativa, limitada de una muestra de ácido nucleico, tal como en placas de múltiples pocillos, a 30 continuación, la amplificación de una molécula de ácido nucleico en un pozo, que debido a la dilución, debe ser o pocillo molécula 0 o 1. PCR Digital utilizando placas de múltiples pocillos se ha utilizado anteriormente para detectar mutaciones raras ya sea por análisis en serie de una sola molécula (es decir, clonal) amplicones (Vogelstein B, Kinzler KW Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1999 Aug 3; 96 (16): 9236-41) o mediante la mejora de la sensibilidad de la 35 amplificación diferencial (<http://www.fluidigm.com/did/FC.htm>). A continuación se describe una invención en la que PCR digital se puede aplicar al diagnóstico fetal no invasivo para detectar mutaciones fetales con una especificidad y sensibilidad más allá de lo que es posible con el análisis de PCR convencional.

40 Además, como también se describe en relación con la invención que se describe a continuación, PCR digital se puede utilizar para detectar aneuploidía, tales como la trisomía que causa el Síndrome de Down. Desde aneuploidías no presentan un cambio mutacional en secuencia, y no son más que un cambio en el número de cromosomas, no ha sido posible detectarlos en un feto sin recurrir a técnicas invasivas como la amniocentesis o el muestreo de vellosidades coriónicas (Science 309, 2 09 2005 pp. 1476-8).

45 Otra forma de PCR digital se ha sido descrito como emulsión de PCR, que se ha utilizado para preparar pequeñas microesferas con ADN clonalmente amplificado - en esencia, cada microesfera contiene un amplicón de PCR digital. (Dressman et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 100, 8817 (22 Jul, 2003).

50 Otra forma de PCR digital se puede llevar a cabo utilizando microfluídica. En esta realización, descrita a continuación, el ADN se diluye y se separa en muestras pequeñas, discretas para formar muestras de reacción por una serie de canales y válvulas.

55 Un ejemplo de un método adecuado para el análisis de moléculas individuales que se puede adaptar a los presentes métodos se dan en Braslavsky et al., "Sequence information can be obtained from single ADN molecules, Proc. Nat. Acad. Sci. 100 (7):3960-3964 (2003), que utiliza la incorporación secuencial de nucleótidos marcados en un molde de ADN inmovilizada de cadena sencilla y seguimiento por microscopía fluorescente.

60 Otro aspecto de la técnica relevante implica la preparación de muestras con el fin de llevar a cabo los presentes procedimientos. Es decir, el ADN fetal puede ser enriquecido con respecto al ADN materno. Chan, et al., "Size Distribution of Maternal and Fetal ADN in Maternal Plasma", Clin. Chem. 50 (1):88-92 (2004) informa de que las moléculas de ADN son fragmentos de ADN de plasma principalmente cortos. Los fragmentos de ADN en el plasma de mujeres embarazadas son significativamente más largos que los fragmentos de ADN de las mujeres no embarazadas, y más largos que el ADN fetal.

Publicaciones y patentes relacionadas

65

Vogelstein et al., "Digital Amplification," EE.UU. 6.440.706, expedida el 27 de agosto 2002, describe la identificación de mutaciones predefinidas que se espera que estén presentes en una fracción menor de una población de células.

5 Lo, "Fetal ADN in Maternal Plasma: Biology and Diagnostic Applications", Clin. Chem. 46:1903-1906 (2000) describe la demostración de ADN fetal en el plasma materno. Los autores encontraron un nivel fraccional medio de ADN fetal 3,4% en el ADN en el plasma materno durante el embarazo temprano. Los autores informan de la detección de los genes y polimorfismos de microsatélites RhD en el plasma de mujeres embarazadas.

10 Li et al., "Detection of Paternally Inherited Fetal Point Mutations for β -Thalassemia Using Size Fractionated Cell-Free ADN in Maternal Plasma," J. Amer. Med. Assoc. 293:843-849 (16 de febrero 2005) describe que el análisis del ADN fetal libre de células en el plasma materno ha demostrado ser extraordinariamente fiable para la evaluación de fetal loci ausente del genoma materno, tales como las secuencias específicas del cromosoma Y o el gen RhD en mujeres embarazadas que son Rh-negativas. Los autores informan sobre la extracción y la fraccionización de tamaño de ADN plasmática materna, utilizando electroforesis de gel de agarosa. A continuación, se utilizan ácidos péptido-nucleicos (PNA) para unirse específicamente a un alelo materno para suprimir la amplificación por PCR de la del alelo materno de tipo salvaje, enriqueciendo de esta manera la presencia de secuencias mutantes heredadas del padre. Se examinaron cuatro mutaciones puntuales diferentes en el gen de la β -globina. Se encontró que la etapa de PNA era necesaria para la detección de alelos mutantes utilizando alelo PCR específico.

20 Lo et al., "Quantitative Analysis of Fetal ADN in Maternal Plasma and Serum: Implications for Noninvasive Prenatal Diagnosis," Am. J. Hum. Genet. 62:768-775 (1998) da a conocer un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real para medir la concentración de ADN fetal en plasma y suero materno. Los autores encontraron una media de 25,4 equivalentes de genoma/ml de ADN fetal en el embarazo temprano. Esto corresponde a aproximadamente el 3,4% del ADN total en el embarazo temprano.

30 Chan et al., "Size Distribution of Maternal and Fetal ADN in Maternal Plasma", Clin. Chem. 50:89-92 (enero de 2004) investigaron la distribución de tamaño de ADN en plasma en mujeres no embarazadas y mujeres embarazadas, utilizando un panel de ensayos de PCR cuantitativa con diferentes tamaños de amplificación dirigidos al gen de la leptina. Encontraron que los fragmentos de ADN en el plasma de mujeres embarazadas son significativamente más largos que aquellos en el plasma de mujeres no embarazadas, y las moléculas de ADN-maternas son más largas que las derivadas-fetales.

35 Tufan et al., "Analysis of Cell-Free Fetal ADN from Maternal Plasma and Serum Using a Conventional Multiplex PCR: Factors Influencing Success". Turk. J. Med. Sci. 35:85-92 (2005) compararon las tasas de éxito de dos técnicas de extracción de ADN diferentes, el método directo basado en el calor y el mini kit de ADN de sangre método QIAMP. También se informó de la función crucial de la optimización de la PCR. Los autores utilizaron el marcador DYS14 para el cromosoma Y y el gen GAPH para un control. Se encontró que el kit QIAMP Mini dio los mejores resultados en el análisis de la determinación del sexo utilizando multiplex PCR y tinción con bromuro de etidio en gels.

45 Hromadnikova y otros, "Quantitative analysis of ADN levels in maternal plasma in normal and Down Syndrome pregnancies," BMC Pregnancy and Childbirth 2 (4):1-5. (2002), investigaron los niveles totales de ADN en el plasma materno y no se encontró ninguna diferencia en los niveles de ADN fetales entre los pacientes que llevan fetos con síndrome de Down y los controles. El análisis de PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando cebadores con el gen de β -globina y el locus SRY.

50 Grundevikk y Rosen, "(Molecular Diagnosis of Aneuploidies ", publicado en línea en <http://www.molbiotech.chalmers.se/research/mk/mbtk/Molecular%20diagnostics%20of%20aneuploidias%20-20rapport.pdf>, sugiere que los métodos no invasivos para la detección de aneuploidías (como el síndrome de Down, síndrome de Edwards o exceso de cromosomas sexuales) pueden llevarse a cabo en las células nucleadas fetales aisladas de la sangre materna. En su opinión, los autores también describen polimerasa de fluorescencia cuantitativa, reacción en cadena (QF-PCR), basada en la amplificación de repeticiones de tándem cortas específicas para el cromosoma a ensayar. Describen ensayos en los que se amplificó el ADN de muestras de vellosidades amnióticas o coriónicas. Los autores sugieren que los marcadores STR darán productos PCR de diferente tamaño, y estas diferencias de tamaño se pueden estudiar mediante el análisis de tamaños de pico en la electroforesis. también se propone que PCR cuantitativa en tiempo real se puede utilizar para diagnosticar el síndrome de Down mediante la comparación de la cantidad de un gen localizado en el cromosoma 12 con la cantidad de un gen localizado en el otro cromosoma autosómico. Si la relación de estos dos genes es 1:1, el feto es normal, pero si la proporción de estos genes es 3:2, indica el Síndrome de Down. Los autores proponen la utilización de marcador de Síndrome de Down *DSCR3*. También sugieren que el gen housekeeping GAPDH en el cromosoma 12 se puede utilizar como una referencia.

65 Poon et al., " Differential ADN Methylation between Fetus and Mother as a Strategy for Detecting Fetal ADN in Maternal Plasma", Clin. Chem. 48 (1):35-41 da a conocer la detección de genes o mutaciones en un feto en donde

la misma mutación o condición también está presente en el ADN materno. Es decir, el uso de ADN fetal en plasma materno está limitado debido a la baja cantidad de ADN fetal en comparación con ADN materno. Los autores han vencido esta limitación mediante la detección del locus IGF2- H19, que se mantiene en un estado de ADN metilado en el alelo paterno y no está metilado en el alelo materno. Los autores utilizaron un kit de modificación con bisulfito mediante el cual los residuos de citosina no metilados se convirtieron en uracilo. La diferencia de secuencia entre secuencias de ADN metiladas y no metiladas se podía distinguir con diferentes cebadores de PCR. Se utilizó el ADN extraído de la capa leucocitaria.

Science 309:1476 (2 de septiembre de 2005) News Focus " An Earlier Look at Baby's Genes" describe los intentos de desarrollar pruebas para el síndrome de Down utilizando la sangre materna. Los primeros intentos para detectar el síndrome de Down utilizando células fetales en sangre materna fueron llamados "sólo mínimamente prometedores." El informe también describe el trabajo de Dennis Lo para detectar el gen Rh en un feto en el que está ausente en la madre. Se ha informado también que otras mutaciones heredadas del padre se han detectado, como la fibrosis quística, la talasemia beta, un tipo de enanismo y la enfermedad de Huntington. Sin embargo, estos resultados no han sido siempre reproducibles.

La solicitud de patente de Estados Unidos 20040137470 a Dhallan, Ravinder S, publicada el 15 de julio de 2004, titulada "métodos para la detección de trastornos genéticos", describe un método para la detección de trastornos genéticos utilizando PCR del molde de ADN conocida y análisis de restricción. También se describe un procedimiento de enriquecimiento de ADN fetal. También se describe un método utilizado para detectar mutaciones y anomalías cromosómicas incluyendo pero no limitándose a la translocación, transversión, monosomía, trisomía, y otras aneuploidías, delección, adición, la amplificación, fragmento, la translocación, y reordenamiento. Numerosas alteraciones se pueden detectar de forma simultánea. Se dice que el método proporciona un método no invasivo para determinar la secuencia de ADN fetal a partir de un tejido, tal como sangre, extraída de una mujer embarazada, y un método para aislar ácido nucleico libre de una muestra que contiene ácido nucleico.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La invención reivindicada es un método para detectar la presencia o ausencia de una aneuploidía fetal mediante detección diferencial de secuencias objetivo en una mezcla de material genético materno y fetal, en donde la mezcla de material genético materno y fetal es una mezcla de ADN genómico materno y fetal obtenido a partir de plasma sanguíneo materno, que comprende los pasos de: a) distribuir el material genético en muestras discretas de tal manera que la medición de una secuencia objetivo pueda cuantificarse como múltiplos binarios o simples; b) detectar la presencia de diferentes secuencias objetivo usando reactantes específicos de secuencia, en donde una de las diferentes secuencias objetivo está en un cromosoma que es diploide en el material genético materno y posiblemente aneuploide en el material genético fetal y otra de las diferentes secuencias objetivo está en un cromosoma que es diploide o presumiblemente diploide tanto en el material genético materno como en el fetal; c) analizar una serie de diferentes secuencias objetivo suficientes para obtener resultados que distinguen la secuencia objetivo que está en un cromosoma que es diploide en el material genético materno y posiblemente aneuploide en el material genético fetal de la secuencia objetivo que está en un cromosoma que es diploide o presumiblemente diploide tanto en el material genético materno como en el fetal; y d) detectar la presencia o ausencia de la aneuploidía fetal mediante análisis estadístico de los resultados.

BREVE RESUMEN DE LA DESCRIPCION

El siguiente breve resumen de la descripción de este documento no se pretende incluir todas las características y aspectos de la presente invención, ni tampoco implica que la invención debe incluir todas las características y aspectos analizados en el resumen.

En resumen, la presente descripción está dirigida a un método de detección diferencial de secuencias diana en una mezcla de material genético materno y fetal. Se obtiene tejido materno que contiene material genético tanto de la madre y como del feto. Preferiblemente, el tejido materno es la sangre periférica materna o plasma sanguíneo. El término "plasma" puede incluir plasma o suero. El material genético puede ser ADN o ARN genómica, preferiblemente ARNm. En el caso de ARNm, se puede elegir secuencias diana correspondientes a los genes que son altamente expresadas en la placenta para el material genético fetal. El material genético (por ejemplo, ADN) en cada muestra de reacción se detecta con un reactivo específico de secuencia dirigida a al menos una de las dos secuencias diana en el material genético para obtener un producto de reacción detectable si la secuencia diana está presente en la muestra de reacción. Por ejemplo, una sonda específica para el cromosoma 21 se une a la muestra de reacción, junto con una sonda de control específico a otro cromosoma. En la mayoría de los casos, los resultados serán de ADN materno, pero un pequeño número de resultados se obtendrán a partir de ADN fetal. Con el fin de distinguir la variación aleatoria de los resultados fetales, un gran número de reacciones se realizan, y los métodos estadísticos se aplican a los resultados. El etiquetado y la detección en el presente método se utiliza para distinguir la presencia o ausencia de una única secuencia diana, a la que se hace referencia como "análisis digital", a pesar de que se puede realizar con los métodos de detección de ácidos nucleicos sensibles que distinguen entre una y más de una secuencia de diana en una muestra discreta. Muchas técnicas fluorescentes tienen esta sensibilidad. Las

secuencias diana se eligen de modo que una secuencia de la madre y una secuencia fetal son distinguibles, por ejemplo, dos copias de una secuencia materna frente a dos copias de una secuencia fetal.

El material genético obtenido de este modo se distribuye en muestras discretas, donde cada muestra contenga, en promedio no más de aproximadamente una secuencia diana por muestra. El promedio de una secuencia diana significa que, por razones prácticas, la muestra contendrá, preferiblemente 0,1 a 0,8 equivalentes de genoma por muestra discreta, idealmente 0,5 genoma equivalente por muestra. El método puede llevarse a cabo con diluciones por el que más secuencias diana se detectan en muestras que contienen un número de copias trisómico o aumento de secuencia diana. Es decir, si se está analizando el cromosoma 21, la mezcla se puede diluir de tal modo que, en promedio, se puede detectar dos cromosomas presentes en un ADN materno, y tres cromosomas en un ADN fetal de Síndrome de Down. Alternativamente, el método puede llevarse a cabo con diluciones mediante las cuales más muestras de reacción son positivas en esta situación. se detecta la presencia o ausencia de diferentes secuencias diana en las muestras discretas; y los resultados se analizaron mediante el cual el número de resultados de la muestras discretas deberá proporcionar datos suficientes para obtener resultados que distinguen diferentes secuencias diana. En un aspecto, el método implica un análisis de una trisomía. En este método, una de las diferentes secuencias diana (por ejemplo, el cromosoma 21) es diploide en el material genético de la madre y aneuploides en el material genético fetal y otra de las diferentes secuencias diana (por ejemplo, el cromosoma 12) es diploide, tanto en el material genético materno como fetal.

Las muestras discretas están en muestras de reacción en las que se pueden analizar las secuencias diana. Las muestras de reacción pueden ser, por ejemplo, los pocillos en una placa de microtitulación, las fases acuosas en una emulsión, áreas en una superficie de la matriz, o cámaras de reacción en un dispositivo de microfluidos. Las muestras de reacción se pueden utilizar para el análisis de PCR de las muestras discretas. Las muestras discretas se ponen en contacto con una pluralidad de cebadores de PCR, incluyendo al menos un (o uno hacia delante y uno inverso) cebador dirigido específicamente a una secuencia de control de la madre, la cual se espera que sea la misma tanto en la madre como en el feto. Los cebadores de PCR también se dirigen específicamente a una secuencia fetal, es decir, que puede estar presente en la madre y el feto, pero se amplifica o altera en el feto. La amplificación por PCR permite la detección de estas dos secuencias diferentes, y, de acuerdo con el presente método, habrá un diferencial en el caso de una secuencia diana fetal anormal. El método de PCR puede ser (pero no es necesariamente) cuantitativo. PCR en tiempo real cuantitativa, que incluye secuencias diana de hibridación con un ácido nucleico que tiene una etiqueta fluorescente, puede ser utilizado. Una sonda fluorescente que hibrida con la secuencia diana también puede ser utilizada. Un número de protocolos de PCR "digitales" son conocidos para este fin, pocillo como a base de microesfera o PCR de Emulsión. Mientras que las sondas fluorescentes están fácilmente disponibles y pueden ser utilizadas para proporcionar resultados sensibles, por ejemplo, en combinaciones de FRET, se pueden utilizar otras técnicas de etiquetado.

El número de muestras discretas se elige de acuerdo a los resultados deseados. En un aspecto, se prefiere que se obtiene un alto grado de significancia estadística, y el número de muestras es al menos aproximadamente 10.000. Con el fin de mejorar la confianza estadística, es preferible emplear un gran número de reacciones, preferentemente entre 500 y 100.000, más preferiblemente entre 10.000 y 100.000 o más reacciones, dependiendo del porcentaje de ADN fetal presente en la mezcla. Los resultados que se obtengan deben ser estadísticamente significativa para los propósitos del análisis llevado a cabo, por ejemplo, selección inicial, diagnóstico principal, etc. Una medida comúnmente usada de significación estadística cuando un resultado altamente significativo que se desea es $p < 0,01$, es decir, un intervalo de confianza del 99% sobre la base de un chi-cuadrado o t-test.

Sin embargo, como se muestra a continuación, los resultados se pueden obtener con menos, por ejemplo, en el orden de aproximadamente 500 muestras, colocadas en las muestras de reacción separadas. Menos muestras discretas pueden analizarse donde está presente el material genético en una concentración más alta en la mezcla. La mezcla puede ser enriquecida de material genético fetal. Un método para enriquecer el ADN de plasma para el ADN fetal es la separación por tamaños, en el que una preparación que comprende solamente fragmentos de ADN de menos de aproximadamente 300 pb se utilizan para la medición de las secuencias diana.

Una variedad de anomalías genéticas pueden ser detectadas de acuerdo con el presente procedimiento, incluidas las modificaciones conocidas de uno o más de los genes: CFTR, Factor VIII (gen F8), beta globina, hemocromatosis, G6PD, neurofibromatosis, GAPDH, beta amiloide y quinasa de piruvato. Se conocen las secuencias y mutaciones comunes de estos genes. Otras anomalías genéticas pueden ser detectadas, tales como las que implican una secuencia que se elimina en un cromosoma humano, se mueve en una translocación o inversión, o se duplicaron en una duplicación de cromosomas, en la que dicha secuencia se caracteriza en un trastorno genético conocido en el material genético del feto no está presente en el material genético materno. Por ejemplo trisomías cromosómicas pueden incluir parcial, mosaico, anillo, 18, 14, 13, 8, 6, 4 etc. Una lista de anomalías conocidas se pueden encontrar en el mapa OMIM Morbid, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/getmorbid.cgi>.

En general, el término "aneuploidía" se utiliza para referirse a la aparición de uno o más cromosomas que sobran o faltan.

En un aspecto, el método reivindicado puede implicar la secuenciación directa de las secuencias diana del material genético. La secuenciación de una sola molécula, como se sabe, se describe más adelante. El método reivindicado puede comprender también la secuenciación de derivados amplificados de clones o amplicones de diana secuencias del material genético. Es decir, una secuencia diana en una muestra discreta es amplificada por PCR, es decir, como un amplicón, o clonado en un vector que se cultiva y con ello se amplifica mediante la obtención de múltiples copias del inserto del vector.

En otro aspecto, la presente descripción contempla materiales seleccionados y combinados para la realización de los presentes procedimientos. Por lo tanto, se describe un kit para la detección diferencial de las secuencias diana en el ADN materno y fetal en una muestra de ADN mixto, que comprende cebadores específicos para una secuencia genéticamente anormal y una secuencia de control, tales como dos cromosomas, uno de los cuales es posiblemente aneuploides y uno de los cuales se presume diploide; un tampón de reacción de PCR para formar una muestra de reacción de PCR con los cebadores en un dispositivo que tiene las muestras de reacción separadas; y un medio de separación por tamaño para separar la muestra de ADN en una fracción que tiene menos de aproximadamente 1000 pb. El medio de separación por tamaño puede ser material de gel o centrifugación para la recuperación de fragmentos de ADN más pequeños y por lo tanto el enriquecimiento de ADN fetal. El kit puede comprender además un par de cebadores específicos para el cromosoma 21. El kit puede comprender además el dispositivo que tiene muestras de reacción separadas para muestras discretas. El dispositivo puede ser un dispositivo de microfluidos, o una placa de microtitulación que tiene al menos 1.000 muestras de reacción discretas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una ilustración esquemática del método de análisis presente, que muestra la distribución de material genético en compartimentos (1A), los picos de cromosomas de diferente altura (1B), y el análisis estadístico de los cromosomas (1C);

La Figura 2 es una fotografía de un chip microfluídico que tiene 12 paneles (numerados 1 a 12) que contienen ADN con el cromosoma 21 marcado;

La Figura 3 es una fotografía de un chip microfluídico que tiene 12 paneles (numerados 1 a 12) que contienen ADN con el cromosoma 12 marcado; y

La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de experimentos realizados usando análisis digital de ADN mezclado normal y trisómico (Síndrome de Down, trisomía 21).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

Esquema

I. Visión general

II. Descripción de pasos

A. Preparación de tejidos

B. Distribución de las moléculas de ADN

C. Detección y Cuantificación

1. Los métodos de PCR digitales

2. Emulsión de grano de PCR

3. Dilución de microfluidos con PCR

4. Detección de moléculas individuales y/o secuenciación

D. Evaluación cuantitativa

III. Aplicaciones específicas

A. Preparación para la trisomía con el análisis de frecuencia.

B. Protocolo de Muestra

IV. Ejemplos

I. Visión general

Los métodos y materiales descritos a continuación aplican técnicas para el análisis de numerosos ácidos nucleicos contenidos en una muestra de tejido (preferiblemente suero o, más preferiblemente, plasma) que contienen una mezcla de ADN de la madre y del feto, y que permite la detección de diferencias pequeñas pero estadísticamente significativas.

La presente descripción contempla el análisis de la sangre materna para una condición genética, en la que el ADN fetal y el ADN materno mezclados en la sangre materna se analiza para distinguir una mutación fetal o una anomalía genética del fondo de el ADN materno. Se ha encontrado que, utilizando una combinación de etapas, una muestra de ADN que contiene el ADN de la madre y del feto puede ser analizada para distinguir una condición genética presente en una fracción menor del ADN, lo que representa el ADN fetal. El método emplea el "análisis digital," en el que se aísla el ADN en la muestra a una molécula diana sola nominal en un pequeño volumen de reacción. Cada mezcla de muestra tiene una posibilidad de haberse distribuido en ella menos de 1 diana (es decir, 0 diana) o más de una diana. A continuación, las moléculas diana se detectan en cada reacción pocillo, preferiblemente como secuencias diana que son amplificadas, que pueden incluir una cuantificación de iniciar el número de copias de la secuencia diana, es decir, 0, 1, 2, 3, etc. Una secuencia de control se utiliza para distinguir un aumento anormal en la secuencia diana, por ejemplo, un trisomía. Pocillo, hay una detección diferencial de secuencias diana, una de las cuales se elige para representar un genotipo normal presente en la madre y descendencia, y uno de los cuales se elige para la detección de un genotipo anormal en la descendencia, donde la secuencia diana en la descendencia será diferente de la de la madre, por ejemplo, en la trisomía.

Fig. 1A ilustra una realización en la detección cuantitativa, por ejemplo, PCR cuantitativa en tiempo real, se utiliza. Sangre 10 se procesa para obtener ADN de plasma 12, que se diluye y se distribuye en partes alícuotas 14. Éstas se añaden a las reacciones de los pocillos 1A a 5D. Mostradas en los pocillos están dianas que representan a los cromosomas 21 y 22. En el pocillo 2A, no se encuentra ninguna ADN diana; algunos pocillos (no mostrados) pueden tener un exceso de ADN. En el pocillo 3B, ADN fetal que tiene trisomía 21 (Síndrome de Down) se encuentra. El resto de los pocillos contiene ADN materno. El ADN se amplifica y/o se etiquetada y se obtiene una lectura cuantitativa, como se muestra en 16. El pico 18, el cual representa pocillo 3B será 50% mayor que los picos del otro pocillo, o los picos de una secuencia de referencia en el cromosoma 22. Pocillo A2, el cual carece de 21 y 22, no tendrá ningún pico. Los picos se muestran en 20. Una sola aplicación tendrá numerosas variaciones al azar, tales como pocillos que no tienen una secuencia diana, o que tienen la duplicación a través de la variabilidad de la muestra. Además, las muestras sin diana claramente no resultarán en ningún pico en absoluto; pocillos con dos o más dianas, darán picos significativamente más altos que el pico 18, es decir, controles 2X o 2,5 X. Estos resultados se distinguen mediante la ejecución de una multitud de reacciones, seguida de análisis estadístico que puede discriminar variaciones aleatorias de resultados verdaderos.

Fig. 1C ilustra una realización en la que se distribuye el ADN de una forma más diluida (menos de 1, o alrededor de un medio equivalente de genoma por pocillo). En este caso las etiquetas de cromosoma 21 (cebadores) generarán más positivos que el cromosoma 22 (un cromosoma diploide) etiquetas específicas (por ejemplo, cebadores) debido simplemente a la ligeramente mayor abundancia del cromosoma 21 en una muestra que contiene trisomía. Como se muestra, algunos pocillos contendrán positivos 20 para ambos cromosomas, algunos contienen negativos 22 para ambos cromosomas, pero algunos contendrán espacios en blanco 24 para el diploide de cromosomas y los picos para el cromosoma trisómico, debido a su mayor abundancia. Los datos de un pico más alto 18 no se utiliza en este modo. Como se explica más adelante, esta pequeña diferencia puede hacerse estadísticamente significativa mediante el examen de un gran número de pocillos, y por la sensibilidad del presente método a una única molécula.

Por lo tanto, el presente método comprende generalmente las etapas siguientes:

1. La obtención de un tejido que contiene el ADN de una mujer embarazada, siendo conocido que su ADN tiene alrededor del 3%. ADN fetal Este material se extrae preferiblemente de la sangre, y el ADN circulante se encuentra en el plasma sanguíneo, en lugar de en las células. La sangre o plasma pueden estar opcionalmente enriquecidos para el ADN fetal por métodos conocidos, tales como el tamaño de fraccionamiento para seleccionar fragmentos de ADN de menos de aproximadamente 300 pb. Alternativamente, el ADN materno, que tiende a ser mayor que aproximadamente 500 pares de bases puede ser excluido. Otra etapa de enriquecimiento puede ser para el tratamiento de la muestra de sangre con formaldehído, como se describe en Dhallan et al.. " Methods to Increase the Percentage of Free Fetal ADN Recovered From the Maternal Circulation," J. Am Medicina. Soc. 291 (9):1114-1119 (Marzo 2004).

2. La distribución de las moléculas individuales de ADN de esta muestra a una serie de muestras de reacción discretas, donde se selecciona el número de muestras de reacción para dar un resultado

estadísticamente significativo para el número de copias de una diana en las moléculas de ADN. Además, la muestra de reacción se limita a un pequeño volumen para que las moléculas de reacción en estrecha aproximación. La cantidad de molécula de ADN por muestra de reacción es preferiblemente del orden de una copia del cromosoma de interés equivalente por muestra de reacción.

3. La detección de la presencia de la diana en el ADN en un gran número de muestras de reacción, preferiblemente con una técnica específica de secuencia como la secuenciación de lectura corta altamente multiplexada o una reacción de PCR en el que el producto de PCR se marca para producir una lectura cuantitativamente conveniente. La etapa de detección se denomina aquí "PCR digital" y puede ser llevada a cabo por una variedad de métodos, tales como (a) por PCR en muestras diluidas en pocillos individuales de una placa de microtitulación; (b) PCR en muestras diluidas en emulsiones que contienen cebadores inmovilizados a microsferas; o (c) PCR en muestras atrapadas en una cámara de microfluidos; y

4. El análisis cuantitativo de la detección de las secuencias diana maternas y fetales. En algunos casos, esto puede incluir dianas a diferentes regiones, tales como sondas para una diana en un cromosoma sospechoso de estar presente en un número de copia anormal (trisonomía) en comparación con un cromosoma diploide normal, que se utiliza como control.

II. Descripción de los Pasos

A. Preparación de tejidos

El presente procedimiento se refiere a pruebas no invasivas. El material de partida preferido es sangre venosa periférica materna. Con el fin de obtener suficiente ADN para la prueba, se prefiere que se extraiga 10 a 20 ml de sangre, a fin de obtener alrededor de al menos 10.000 equivalentes de genoma de ADN total. Este tamaño de la muestra se basa en una estimación de estar presente el ADN fetal como más o menos 25 equivalentes de genoma/ml de plasma materno en el embarazo temprano, y una concentración de ADN fetal de aproximadamente el 3,4% del ADN total en plasma. Sin embargo, menos sangre puede extraerse para una pantalla genética donde se requiere menos significación estadística, o la muestra de ADN se enriquece para el ADN fetal.

Cabe señalar que, aunque la presente descripción se refiere a ADN, ARN fetal encontrado en la sangre materna se puede analizar también. Como se describe en Ng et al., "mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma," Proc. Nat. Acad. Sci. 100 (8):4.748-4.753 (2003), HPL (lactógeno placentario humano) y hCG (gonadotropina coriónica humana) transcritos de ARNm eran detectables en el plasma materno, tal como se analizó mediante los ensayos en tiempo real RT-PCR respectivos. En el presente método, el ARNm que codifican genes expresados en la placenta y el presente en el cromosoma de arco de interés utilizado. Por ejemplo, DSCR4 (región crítica 4 de Síndrome de Down) se encuentra en el cromosoma 21 y se expresa principalmente en la placenta. Su secuencia de ARNm se puede encontrar en GenBank NM_005867. En este caso, se prefiere utilizar RNasa H menos (RNasa H) transcriptasas inversas (RT) para preparar cADN para la detección. RNasa H-RTs están disponibles de varios fabricantes, con SuperScript™ II (Invitrogen), siendo el más ampliamente utilizado. La transcriptasa inversa PCR se puede usar como se describe a continuación para el ADN cromosómico.

i. Enriquecimiento de ADN o ARN a partir de plasma

La sangre materna se puede procesar para enriquecer la concentración de ADN fetal en el ADN total, como se describe en Li et al., supra. Brevemente, el ADN circulatorio se extrae de plasma materno 5-a 10 ml utilizando la tecnología de la columna comercial (Roche High. Pure Template ADN Purification Kit; Roche, Basel, Suiza) en combinación con una bomba de vacío. Después de la extracción, el ADN se separa por electroforesis en gel de agarosa (1%) de electroforesis (Invitrogen, Basilea, Suiza), y la fracción de gel que contiene ADN circulatorio con un tamaño de aproximadamente 300 pb se escindió cuidadosamente. El ADN se extrae de esta porción de gel utilizando un kit de extracción (QIAEX II Gel Extraction Kit; Qiagen, Basilea, Suiza) y se eluyó en un volumen final de 40 µl de ácido trishidroclórico 10-mM estéril, pH 8,0 (Roche).

ADN puede ser concentrado por métodos conocidos, incluyendo centrifugación y diversos inhibidores de la enzima. El ADN se une a una membrana selectiva (por ejemplo, sílice) para separarlo de contaminantes. El ADN se enriquece preferiblemente para los fragmentos que circulan en el plasma, que son menos de 1000 pares de bases de longitud, generalmente de menos de 300 pb. Esta selección de tamaño se realiza en un medio de separación de tamaño de ADN, tal como un gel electroforético o material de cromatografía. Tal material se describe en Huber et al., "High-resolution liquid chromatography of ADN fragments on non-porous poly(styrene-divinylbenzene) particles," Nucleic Acids Res. 1993 de marzo de 11; 21 (5):1061-1066, cromatografía de filtración en gel, gel TSK, tal como se describe en Kato et al., "A New Packing for Separation of ADN Restriction Fragments by High Performance Liquid Chromatography", J. Biochem, 1984, vol. 95, No. 1 83-86.

Además, el enriquecimiento puede conseguirse por la supresión de ciertos alelos a través de la utilización de ácidos nucleicos peptídicos (PNA), que se unen a sus secuencias diana complementarias, pero no se amplifican.

La extracción de ARN de plasma se describe en Enders et al., "The Concentration of Circulating Corticotropin-releasing Hormone mRNA in Maternal Plasma Is Increased in Preeclampsia," *Clinical Chemistry* 49:727-731, 2003. Como se describe allí, el plasma cosechado después de etapas de centrifugación se mezcla con reactivo de Trizol LS (Invitrogen) y cloroformo. La mezcla se centrifugó, y la capa acuosa transferida a nuevos tubos. El etanol se añadió a la capa acuosa. La mezcla se aplica entonces a una minicolumna RNeasy (Qiagen) y se procesa de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

ii. Extracción de sangre a partir de células fetales

La solicitud de patente de Estados Unidos 20040137470 de Dhallan, Ravinder S, publicada el 15 de julio de 2004, titulada "Los métodos para la detección de trastornos genéticos", describe un procedimiento de enriquecimiento de ADN fetal", en el que se recoge la sangre en 9 ml de tubos Vacuette EDTA (número de catálogo NC9897284) y 0,225 ml de 10% solución tamponada neutral que contiene formaldehído (4% en peso), se añade a cada tubo, y cada tubo suavemente se invierte. Los tubos se almacenaron a 4°C hasta el momento de tratamiento.

Los agentes que impiden la lisis celular o estabilizan las membranas celulares se pueden añadir a los tubos que incluyen pero no se limitan a formaldehído, y derivados de formaldehído, formalina, glutaraldehído, y derivados de glutaraldehído, reticulación, reticulantes reactivos de amina primaria, reticulantes de sulfhidrilo reactivo, adición de sulfhidrilo o disulfuro de reducción, reticulantes reactivos de carbohidratos, reticulantes reactivos de carboxilo, reticulantes fotorreactivos, reticulantes escindibles, etc. Cualquier concentración de agente que estabiliza las membranas celulares o impide la lisis celular se puede añadir. En una realización preferida, el agente que estabiliza las membranas celulares o impide la lisis celular se añade a una concentración que no impide o dificulta reacciones posteriores.

Las técnicas de citometría de flujo también se pueden usar para enriquecer células fetales (Herxenberg et al., *PNAS* 76:1453-1455 (1979); Bianchi et al., *PNAS* 87: 3.279-3.283 (1990); Bruch et al., *Diagnóstico prenatal* 11:787-798 (1991)). La patente de EE.UU. n° 5.432.054 también describe una técnica para la separación de glóbulos rojos nucleados fetales, usando un tubo que tiene una amplia parte superior y una parte inferior estrecha, capilar de polietileno. Centrifugación utilizando un programa de velocidad variable resulta en un apilamiento de células rojas de la sangre en el capilar sobre la base de la densidad de las moléculas. La fracción de densidad que contiene células rojas de la sangre de baja densidad, incluyendo las células rojas de la sangre del feto, se recupera y después se hemoliza diferencialmente para destruir preferentemente las células rojas de la sangre materna. Un gradiente de densidad en un medio hipertónico se utiliza para separar las células rojas de la sangre, ahora enriquecidas en las células rojas de la sangre fetal a partir de linfocitos y células maternas rotas. El uso de una solución hipertónica contrae las células rojas de la sangre, lo que aumenta su densidad, y facilita la purificación de los linfocitos más densos. Después de que aislarse las células fetales, el ADN fetal puede ser purificado utilizando técnicas estándar en la técnica.

Además, un agente que estabiliza las membranas celulares se pueden añadir a la sangre materna para reducir la lisis celular materna incluyendo, pero no limitándose a aldehídos, urea formaldehído, fenol formaldehído, DMAE (dimetilaminoetanol), colesterol, derivados de colesterol, altas concentraciones de magnesio, vitamina E, y derivados de vitamina E, calcio, gluconato de calcio, taurina, niacina, derivados de hidroxilamina, bimoclomol, sacarosa, astaxantina, glucosa, amitriptilina, fenilacetato tetral de hopano de isómero A, fenilacetato tetral de hopano de isómero B, citicolina, inositol, vitamina B, complejo de vitamina B, hemisuccinato de colesterol, sorbitol, calcio, coenzima Q, ubiquinona, vitamina K, vitamina del complejo K, menaquinona, zonegrano, zinc, extracto de ginkgo biloba, difenilhidantoína, perftoran, polivinilpirrolidona, fosfatidilserina, tegretol, PABA, cromglicato disódico, sodio nedocromil, feniloin, citrato de zinc, mexitil, dilantin, hialuronato de sodio, o polaxamer 188.

Un ejemplo de un protocolo para el uso de este agente es el siguiente: La sangre se almacena a 4°C hasta su procesamiento. Los tubos se centrifugan a 1000 rpm durante diez minutos en una centrífuga con el conjunto de potencia de frenado en cero. Los tubos se centrifugaron una segunda vez a 1000 rpm durante diez minutos. El sobrenadante (plasma) de cada muestra se transfiere a un nuevo tubo y se centrifugó a 3000 rpm durante diez minutos con el freno fijado en cero. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo y se almacenó a -80°C. Aproximadamente dos mililitros de la "capa leucocitaria", que contiene células maternas, se coloca en un tubo separado y se almacenaron a -80°C.

iii. ADN fetal libre de plasma

El ADN genómico puede aislarse a partir del plasma usando el kit Qiagen Midi para la purificación de ADN a partir de células de sangre, siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAmp ADN Kit de Sangre Midi, número de catálogo 51183). ADN se eluye en 100µl de agua destilada. El Kit de Qiagen Midi también se utiliza para aislar el ADN de las células maternas contenidas en la "capa leucocitaria".

Por último, se observa que, en ciertas realizaciones, también se puede utilizar muestras de tejidos, saliva,

orina, desgarró, secreción vaginal, fluido de mama, leche materna, o sudor.

B. Distribución de las moléculas de ADN

5 En el método ilustrado, el ADN genómico obtenido de un tejido materno como se describe anteriormente se diluye en múltiples muestras de reacción, por ejemplo, en placas de múltiples pocillos, de modo que no es, en promedio, menos de un equivalente del genoma por pocillo. Por lo tanto, cuando se analizan las muestras discretas individuales para la presencia de la anomalía genética a ensayar, el ADN (cromosoma) a ser analizado estará, en promedio, presente o ausente, permitiendo el pocillo llamado "análisis digital." Una muestra de reacción, en general, contendrá una sola molécula de molde (haplotipo), dos moléculas diana (diploides) o tres moléculas diana (trisomía).

15 Los pocillos de reacción proporcionan muestras discretas y pueden implementarse en un número de dispositivos, tales como placas de microtitulación, microesferas en una emulsión, o un dispositivo de microfluidos. Estos se describen en detalle a continuación. El dispositivo debe ser capaz de llevar a cabo un gran número de reacciones de amplificación discretas. Como se describe a continuación, este número debe ser, como mínimo, de 10.000 reacciones, y preferiblemente del orden de 100.000 reacciones. La muestra de reacción preferiblemente tiene aproximadamente 10-100 ml de una muestra de reacción de PCR que contenía el ADN genómico, nucleótidos (dNTPs), polimerasa y cebadores de PCR apropiados. Los cebadores se utilizan en conjunción con una etiqueta para la detección cuantitativa rápida de productos de PCR. El tipo de etiquetado dependerá del sistema de amplificación/detección utilizado, por ejemplo, una sonda fluorescente de "baliza molecular" para la amplificación a base de placas de microtitulación. Este tipo de sonda se describe, por ejemplo, en Vogelstein et al., supra. Alternativamente, el etiquetado puede hacerse con SYBR Green, que tiene muy baja fluorescencia en ausencia de ADN de cadena doble y de muy alta fluorescencia en presencia de ADN de doble cadena.

25 Otra forma de análisis paralelo útil en la presente invención es el análisis de una sola molécula. Una vez más, se diluye una muestra para contener menos de un equivalente de genoma nominal simple de ADN, y la presencia de la diana de interés (es decir, el cromosoma 21 trisomía) se puede determinar en un gran número de muestras. Mediante el análisis de un gran número de muestras, el ADN fetal puede ser distinguido del ADN materno. Esto se denomina un "análisis digital", porque cada pocillo tiene, en promedio, un equivalente del genoma por célula, y por otra parte, la dilución puede ser leído como un binario "sí-no" resultado en cuanto a la presencia del cromosoma u otro secuencia para contarse.

35 Otro método para el análisis de moléculas individuales implica el uso de etiquetas fluorescentes específicas de sitio que se detectan a medida que el ADN se extrae a través de un dispositivo de microfluidos en una sola molécula, de flujo alargado. Un ejemplo de esta técnica, se describe a continuación, se denomina "análisis directo lineal" o DLA.

C. Detección y cuantificación

40 Habiéndose aislado el ADN de la muestra en un equivalente del genoma nominal, la presencia de la secuencia de ADN o cromosoma de interés debe cuantificarse. Esto se puede hacer ya sea en el modo de una sola molécula, o con un producto amplificado.

45 Aunque la realización preferida de la invención se describe en términos de PCR, la invención se dirige principalmente al uso de múltiples detecciones genéticas de secuencias individuales. En algunas realizaciones, el método de amplificación tal vez, por ejemplo, la reacción de secuencia autosostenida, reacción en cadena de la ligasa, amplificación rápida de extremos de ADNc, reacción en cadena de la polimerasa y reacción en cadena de la ligasa, amplificación del fago Q-beta, amplificación de desplazamiento de cadena, o reacción en cadena de polimerasa de extensión de superposición de empalme.

50 Además, mientras que la detección puede convenientemente llevarse a cabo por una sonda específica de la secuencia, la detección puede también llevarse a cabo mediante la secuenciación directa de una región de interés para determinar si se trata de la secuencia diana de interés.

55 1. Métodos de PCR digitales

Mientras que los métodos de PCR conocidos en la actualidad se pueden multiplexar, es decir, aplicarse con múltiples cebadores a múltiples dianas, es preferible limitar el número de pares de cebadores en una reacción dada. En general, habrá dos pares de cebadores: uno para la amplificación de una secuencia de prueba, y otro par para amplificar una secuencia de control. Los cebadores están diseñados de acuerdo a los parámetros conocidos para evitar estructuras secundarias y auto-hibridación. Además, los dos pares de cebadores deben recocer y se funden aproximadamente a la misma temperatura.

Cebadores

65

Los cebadores se pueden preparar por una variedad de métodos que incluyen pero no se limitan a la clonación de secuencias apropiadas y síntesis química directa mediante métodos bien conocidos en la técnica (Narang et al., *Methods Enzymol* 68:90 (1979); Brown et al., *Methods Enzymol* 68: 109 (1979)). Los cebadores también pueden ser obtenidos de fuentes comerciales tales como Operon Technologies, Amersham Pharmacia Biotech, Sigma, y Life Technologies. Los cebadores pueden tener una temperatura de fusión idéntica. Las longitudes de los cebadores pueden extenderse o acortarse al extremo 5' o al extremo 3' para producir cebadores con temperaturas de fusión deseadas. Además, la posición de recocido de cada par de cebadores puede diseñarse de tal manera que la secuencia y, la longitud de los pares de cebadores producen la temperatura de fusión deseada. La ecuación simple para la determinación de la temperatura de fusión de los cebadores más pequeños de 25 pares de bases es la Regla de Wallace ($T_d=2(A+T)+4(G+C)$). Los programas de ordenador también se pueden utilizar para diseñar cebadores, incluyendo pero no limitándose a Designer Software Array (Arrayit Inc.), Oligo- nucleotide Probe Sequence Design Software for Genetic Analysis (Olympus Optical Co.), NetPrimer, y ADNsis de Hitachi Software Engineering. El TM (temperatura de fusión o de recocido) de cada cebador se calcula utilizando programas de software como Oligo Design, disponible de Invitrogen Corp.

La temperatura de recocido de los cebadores puede recalcularse y aumentarse después de cualquier ciclo de la amplificación, incluyendo, pero no limitándose al ciclo 1, 2, 3, 4, 5, ciclos 6-10, ciclos 10-15, ciclos 15-20, ciclos 20-25, ciclos 25-30, ciclos 30-35, o ciclos 35-40. Después de los ciclos iniciales de la amplificación, la mitad 5' de los cebadores se incorpora en los productos de cada loci de interés, por lo tanto la TM puede volverse a calcular sobre la base tanto de las secuencias de la mitad 5' como de la mitad 3' de cada cebador. Cualquier ADN polimerasa que cataliza la extensión del cebador se puede utilizar, incluyendo pero no limitado a Polimerasa de ADN de *E. coli*, el fragmento Klenow de polimerasa de ADN de *E. coli* 1, polimerasa de ADN T7, polimerasa de ADN T4, polimerasa de Taq, polimerasa de ADN de Pfu, polimerasa de ADN de Vent, bacteriófago 29, REDTaq.TM. polimerasa de ADN genómico, o sequenasa. Preferiblemente, se utiliza una polimerasa de ADN termoestable. Una PCR "de arranque en caliente" también se puede realizar en la que la reacción se calienta a 95°C durante dos minutos antes de la adición de la polimerasa o la polimerasa puede mantenerse inactiva hasta que la primera etapa de calentamiento en el ciclo 1. PCR de "arranque en caliente" puede ser usada para reducir al mínimo la amplificación no específica. Cualquier número de ciclos de PCR se puede utilizar para amplificar el ADN, incluyendo, pero no limitado a 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, o 45 ciclos. En una realización más preferida, el número de ciclos de PCR realizado es tal que se producen cantidades equimolares de cada loci de interés.

Un número de cebadores de PCR específicos son útiles en el presente proceso, tales como los descritos en la literatura técnica de Qiagen. Que la literatura describe un protocolo donde se purificó el ADN de los cultivos de sangre y amniocitos periféricos utilizando el Mini Kit de Sangre de ADN QIAmp. Para la amplificación del gen de amiloide en el cromosoma 21, (NCBI gen ID 473931, la adhesión NC_006488) secuencias de cebador y sonda fueron:

SEQ ID NO: 1:cebador directo, 5'-GGG AGC TGG TAC AGA AAT GAC TTC-3'; cebador inverso, SEQ ID NO: 10:5'-TTG CTC ATT GCG CTG ACA A-3'; y la sonda, SEQ ID NO: 2 5'-(FAM) AGC CAT CCT TCC CGG GCC TAG G (TAMRA)-3'.

Para amplificación de GAPDH, (GenBank locus 12p13.31-p13.1) cebadores y sondas eran: cebador directo, SEQ ID NO: 3, 5'-CCC CAC ACA CAT GCA CTT ACC-3'; cebador inverso, SEQ ID NO: 4, 5'-CCT ACT CCC AGG GCT TTG ATT-3'; y la sonda, SEQ ID NO:5, 5'- (VIC) AAA GAG CTA GGA AGG ACA GGC AAC TTG GC (TAMRA)-3'. PCR se realizó utilizando el sistema TaqMan, con 2 µl de molde de ADN en cada reacción de 25 µl y concentraciones finales de 300 nmol/litro de cada cebador y 150 nmol/litro de cada sonda de doble etiquetado TaqMan. Las condiciones de los ciclos eran de incubación a 50°C durante 2 minutos, después 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 60°C, 1 minuto y 95°C, 15 segundos.

Utilizando el protocolo ejemplar anterior, la diferente relación del gen amiloide y el gen GAPDH en muestras cariotípicamente normales y de trisomía 21 era claramente distinguible en el ensayo de PCR multiplex, como se informa en la literatura del producto Qiagen. Los ensayos utilizando una serie de diluciones de la molde de ADN mostraron que la diferencia permaneció transparente sobre una amplia gama de concentraciones de la molde y con el inicio de concentraciones de ADN tan bajo como 10 mg/litro. Por supuesto, en una muestra de sangre materna, la concentración de ADN fetal sería mucho menor.

Fluorescente de amplificación in situ

Tecnologías basadas en la sonda fluorescente, que se pueden realizar en los productos de PCR "in situ" (es decir, en los mismos pocillos), son particularmente adecuadas para esta aplicación. Este método se describe en detalle en Vogelstein PNAS 96:9236, arriba, y Vogelstein et al.. "La amplificación digital," US 6.440.706, referenciada en la presente por su descripción de este procedimiento de amplificación.

El método "digi-PCR" de Vogelstein et al.. se describe en la patente antes mencionada. Un protocolo ejemplar como se expone en esa patente es como sigue: la PCR se realiza en 7 µl volúmenes en placas de PCR de

96 pocillos de polipropileno (Marsh Biomedical Products, Rochester, N.Y.). La composición de las reacciones es: 67 mM Tris, pH 8,8, 16,6 mM NH₄ SO₄, 6,7 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1mM dGTP, 1mM TTP, 6% DMSO, 1 μM cebador F1, 1 μM cebador R1, 0,05 unidades/μl polimerasa Platino Taq (Life Technologies, Inc.), y "un equivalente de genoma de una mitad" de ADN.

5 Para determinar la cantidad de ADN correspondiente a un equivalente de genoma de una mitad, las muestras de ADN se diluyeron en serie y se ensayaron mediante PCR. La cantidad que produjo productos de amplificación en la mitad de los pocillos, por lo general en torno a 1,5 pg de ADN total, se define como "un equivalente de genoma de una mitad" y se utiliza en cada pocillo de experimentos de amplificación digital posteriores. Cincuenta μl de aceite mineral ligero (Sigma M-3516) se añade a cada reacción y pocillo realizados en un termociclador Hybaid a las siguientes temperaturas: desnaturalización a 94°C durante un minuto; 60 ciclos de 94°C durante 15 seg, 55°C durante 15 seg, 70°C durante 15 segundos.; 70°C durante cinco minutos.

15 MB, o sondas de baliza molecular, que se convierten en fluorescentes sobre la unión a la secuencia de destino, como se describe en más detalle a continuación, se pueden utilizar como sigue:

20 Para el análisis de fluorescencia, se añade 3,5 μl de una solución con la siguiente composición a cada pocillo: 67 mM Tris, pH 8,8, 16,6 mM NH₄ SO₄ 6,7 mM MgCl₂, 10 mM β.-mercaptoetanol, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM TTP, 6% de DMSO, 5 μM cebador, 1 μM MB-GREEN, 1 μM MB-RED, 0,1 unidades/μl polimerasa Platino Taq. Las placas se centrifugan durante 20 segundos a 6.000 g y la fluorescencia de lectura a longitudes de onda de excitación/emisión de 485 nm/530 nm para MB-GREEN y 530 nm/590 nm para MB-RED. Las placas se colocan en un termociclador para la amplificación asimétrica a las siguientes temperaturas: 94°C durante un minuto; 10-15 ciclos o 94°C tor 15 see, 55°C durante 15 seg, 70°C durante 15 segundos; 94°C durante un minuto; y 60°C durante cinco minutos. Las placas se incuban a continuación a temperatura ambiente durante diez a sesenta minutos y se midió la fluorescencia como se describe anteriormente.

30 Sondas MB son oligonucleótidos con estructuras de horquilla que contienen un colorante fluorescente en el extremo 5' y un agente de extinción (Dabcilo) en el extremo 3'. El grado de enfriamiento a través de la fluorescencia de transferencia de energía de resonancia es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre el grupo de Dabcilo y el colorante fluorescente. Después de calentamiento y enfriamiento, MB sondea la reforma de una estructura de horquilla, que apaga la señal fluorescente del tinte. Si un producto de PCR cuya secuencia es complementaria a la secuencia de bucle está presente durante el ciclo de calentamiento/enfriamiento, la hibridación de la MB a una hebra del producto de PCR incrementará la distancia entre el Dabcilo y el colorante, lo que resulta en un aumento de la fluorescencia.

35 Los ejemplos siguientes utilizan un protocolo de PCR, que también se basa en sondas de tipo MB, excepto en conexión con un dispositivo de microfluidos.

40 Los presentes métodos de PCR digitales pueden ser utilizados con ARN, así como de ADN. El aislamiento de ARN de plasma se describe a continuación. En este caso, se hacen copias de ADNc y después se amplifican por PCR basada en la polimerasa de ADN. Diferentes cebadores se pueden usar para la síntesis de cADN. Se prefieren las moldes específicas, basadas en secuencias genéticas en los cromosomas de interés. Véase, Bustina et al., "Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerise Chain Reaction", Journal of Biomolecular Techniques, 15:155-166 (2004). El uso de ARNm expresado constitutivamente, es decir, genes housekeeping, puede utilizarse para un control, y los genes que son altamente expresados en la placenta (descritos a continuación) son los preferidos. Actualmente cuatro composiciones químicas diferentes, TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.), balizas moleculares, Scorpions® y SYBR® Green (Sondas Moleculares), están disponibles para PCR en tiempo real. Todas estas químicas permiten la detección de productos de PCR a través de la generación de una señal fluorescente y puede adaptarse para transcripción inversa-PCR. Ambion's MessageSensor™ RT Kit incluye una RNasa H+ MMLV RT. MessageSensor incluye un control de ARN total, un conjunto de cebadores de control humano de GAPDH, inhibidor de RNasa, y nucleótidos, pocillo como un aditivo de amortiguación que permite la detección con colorante SYBR® Green. Ambion recomienda el uso de 18S ARNr como un control interno debido a que muestra una menor variación en la expresión a través de las condiciones de tratamiento de β-actina y GAPDH. Un gen de cromosoma de codificación 21 (LOC90625), que muestra una fuerte expresión en la placenta de primer trimestre similares a CSH1 (lactógeno placentario humano) y fue seleccionado para el análisis de plasma en Oudejans et al., "Detection of Chromosome 21-encoded mRNA of Placental Origin in Maternal Plasma", Clinical Chemistry 49:1445-1449, 2003. Los cebadores específicos para su uso con este gen se indica en este documento. Transcripciones singularmente expresadas de cromosoma 21 se describen en Gardiner et al., "Analysis of human chromosome 21: correlation of physical and cytogenetic maps; gene and CpG island distributions". E.M.B.O.J. 9 (1):25-34 (1990), a saber cADN de los productos identificados ETS2, MX1, MX2, CBS, COL6A1 y BCE1, que puede ser secuenciado o mapeado parcialmente de acuerdo con los presentes métodos.

2. Emulsión de grano PCR

65 PCR de Emulsión se ha utilizado para preparar pequeñas microesferas con ADN clonalmente amplificado -

en esencia, cada microesfera contiene un tipo de amplicón de PCR digital. (Dressman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 100, 8817 (22 julio, 2003)). Mediante el uso de cebadores específicos para las regiones de los cromosomas A y B mientras se realiza la PCR en emulsión, uno creará microesferas con amplicones digitales de sólo estos dos cromosomas, y sólo es necesario contar el número de microesferas positivas de cada tipo. Hay muchas maneras de realizar esto; señalaremos dos de ellos. En primer lugar, utilizar dos especies diferentes de microesferas (o pocillo en el tamaño o etiquetado fluorescente) para anclar los dos amplicones respectivamente. Alternativamente, se podría etiquetar los cebadores no anclados con diferentes fluoróforos y utilizar un solo tipo de microesfera. Después de la amplificación, las microesferas positivas (amplicones) de cada tipo se pueden contar con métodos tales como la citometría de flujo o simplemente contándolos en un microscopio equipado adecuadamente.

Esta técnica se describe adicionalmente en Dressman et al. (supra) y Dressman et al. publicación de PCT WO2005010145, "METHOD AND COMPOSITIONS FOR DETECTION AND ENUMERATION OF GENETIC VARIATIONS," publicada 2005-02-03, y aquí referenciada por su descripción de un proceso basado en microesferas. En pocas palabras, en el paso 1, microesferas magnéticas recubiertas con estreptavidina covalentemente están obligadas a oligonucleótidos biotinilados ("oligos"). En el paso 2, una mezcla acuosa que contiene todos los componentes necesarios para la PCR, más microesferas de cebador unido y el ADN de molde se agitó junto con una mezcla de aceite/detergente para crear microemulsiones. Los compartimentos acuosos (que se pueden ilustrar como pequeñas gotas en una capa de aceite) contienen un promedio de < 1 molécula de molde y < 1 microesfera. Diferentes moldes (control y de prueba) pueden ser fotografiadas en una o menos gotas para representar dos moléculas de molde cuyas secuencias difieren en uno o varios nucleótidos. En el Paso 3, las microemulsiones son cicladas por temperatura como en una PCR convencional. Si un molde de ADN y un cordón están presentes juntos en un solo compartimiento acuoso, los oligonucleótidos unidos de microesfera actúan como cebadores para la amplificación. Después, se puede imaginar líneas rectas que corresponden a productos de la PCR unidos a las moldes correspondientes conectadas a las microesferas para representar productos de extensión a partir de los dos tipos diferentes de moldes. En el paso 4, las emulsiones de arco roto y las microesferas se purifican con un imán. En el paso 5, después de la desnaturalización, las microesferas se incubaron con oligonucleótidos que pueden distinguir entre las secuencias de los diferentes tipos de moldes. Anticuerpos marcados con fluorescencia se utilizan para etiquetar las sondas de hibridación con destino. Esto hace que las microesferas que contienen el producto PCR como colores diferentes (por ejemplo, rojo o verde) tras la excitación de láser apropiada. En el Paso 6, citometría de flujo se utiliza para contar las bolas de color rojo y verde. Preferiblemente, cada microesfera se une a al menos 10, 50, 100, 500, o 1000 moléculas de la misma secuencia de ácido nucleico.

Para los fines de la descripción detallada, el siguiente ejemplo se ha tomado de la publicación PCT antes citada:

Ejemplo de protocolo detallado usando emulsiones de microesferas

Paso 1-Acoplamiento de oligonucleótidos a microesferas. microesferas superparamagnéticas de $1,05 \pm 0,1$ μm de diámetro, unidos de forma covalente a estreptavidina, se compran de Dynal Biotech, Inc. (650.01, Lake Success, NY). Las microesferas se lavaron una vez con tampón de Ix PCR (53286, Invitrogen, Carlsbad, CA) después se suspendió en enlace y de tampón de lavado (BWB) (5 mMTris-HCl, 0,5 mM EDTA, 1,0 MNaCl, pH 7,5). Las microesferas se incubaron en BWB durante 30 min a temperatura ambiente en presencia de oligonucleótidos de 10 μM . Estos oligonucleótidos se modifican con un grupo de biotina dual en el extremo 5' con los grupos de biotina separados por un enlazador de seis carbonos (IDT, Coralville, IA). Después de la unión, las microesferas se lavaron 3 veces con tampón de Ix PCR para eliminar completamente los oligonucleótidos no unidos.

Paso 2-microemulsiones de preparación. Las microemulsiones para la PCR se preparan en una fase de aceite que está compuesta de 4,5% de Span 80 (S6760, Sigma, St. Louis, MO), 0,40% de Tween 80 (Sigma S-8074), y 0,05% de Triton X-100 (Sigma T - 9284) en aceite mineral (Sigma M-3516). La fase acuosa está compuesta por 67 mMTris-HCl (pH 8. 8), NH_4SO_4 16,6 mM, 6,7 mMMgCl₂, 10 mM (3-mercaptopetanol, 1 mMdATP, 1 mMdCTP, 1 mMdGTP, 1 mMdTTP, 0,05 μM de cebador directo, 25 mM de cebador inverso, 45 unidades de Platino Taq (Invitrogen 10966-034), diversas cantidades de ADN de molde, y ~ 108 microesferas emparejadas con oligonucleótidos en un volumen total de 300 μl . El cebador directo es un oligonucleótido cuya secuencia es idéntica a la 3'20-22 nt de la descrita en el paso 1 y no está modificado con biotina.

Microemulsiones de agua-en-aceite se preparan por adición gota a gota de 200 microlitros de la fase acuosa a 400 microlitros de la fase de aceite previamente colocados en un vial criogénico de fondo redondo de 2 ml (430661, Coming, Corning, NY).

La adición gota a gota se lleva a cabo a lo largo de un minuto mientras la mezcla se agitó a 1400 rpm con una barra magnética de microagitación (58948-353, VWR, Plainfield, NJ) en un agitador magnético modelo VWR 565. Después de la adición de la fase acuosa, la mezcla continuó agitándose durante un tiempo total de 30 minutos. Dos emulsiones se realizan a la vez mediante la colocación de dos tubos en un bastidor colocado en el centro del agitador magnético.

Paso 3- Ciclos de PCR. Las emulsiones se dividieron en alícuotas en cinco pocillos de una placa de PCR de 96 pocillos, conteniendo cada uno 100 µl. PCR se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones de ciclo: 94°C durante 2 minutos; 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 57°C durante 30 segundos, 70°C durante 30 segundos. Los productos de PCR analizados en este estudio oscilaron entre un 189 a la 239 pb.

Paso 4 - Captura magnética de microesferas. Después del ciclo de PCR, la microemulsión de cinco pocillos de una placa de PCR se agruparon y se rompieron por la adición de microlitros de tampón NX de 800 (100 mMNaCl que contienen 1% de Triton X-100, 10 mMTris- HCl, pH 7,5, EDTA 1 mM) en un tubo de 1,5 ml (Corning 430909). Después de agitación durante 20 seg. las microesferas se sedimentaron por centrifugación en una microcentrífuga a 8000 rpm (5000 g) durante 90 segundos. La fase de aceite superior, y todos menos-300 microlitros de la fase acuosa, se retira del tubo y se añadieron 600 microlitros de tampón de NX. Estas etapas se repiten. El tubo se coloca entonces en un imán (Dynal MPC-S) y el resto del sobrenadante se pipeteó cuidadosamente. Las microesferas se lavan 3 veces más con tampón 1x PCR utilizando separación magnética en lugar de centrifugación y finalmente se resuspendieron en 100 microlitros de tampón de 1x PCR.

Paso 5 - Diferenciación de secuencia. Dos sondas de oligonucleótidos se utilizan para cada reacción. Una de ellas es 5'-etiquetada con 6-carboxifluoresceína (6-FAM) y es específica para un alelo, mientras que la segunda es 5'-etiquetada con biotina y es específica para el otro alelo. Las sondas se sintetizan por IDT. Las reacciones de hibridación de 30 microlitros contenían 10 µM de cada sonda y 5-25 millones de microesferas de 1x tampón de PCR. Las reacciones se realizaron en placas de PCR en un ciclador térmico por calentamiento a 94°C durante 30 segundos y después enfriándose a 75°C a una velocidad de 0,5°C por segundo, enfriándose a 45°C a 0,2°C por segundo, y finalmente se enfrió a 30°C a 1°C por segundo.

Todos los pasos posteriores se realizaron a temperatura ambiente. Las reacciones se transfirieron a una placa Costar de 96 pocillos (Corning 3797) y se colocan sobre un imán de 96 pocillos. Los granos se recogen magnéticamente al exponerlos al imán durante 2 minutos. Se elimina el sobrenadante y las microesferas se lavaron 3 veces con tampón 1x PCR pipeteándolas y recogiénolas por dos minutos. Finalmente se volvieron a suspender en 100 microlitros de tampón B-PCR (1mg/ml de BSA en tampón 1x PCR).

Las microesferas se incuban a continuación durante 10 minutos en un volumen total de tampón B-PCR de 100 microlitros que contienen 3 µg de anticuerpo anti-fluoresceína de conejo de Alexa-488 (Sondas Moleculares A-11090, Eugene, OR) y 3 µg de Nutravidina marcada con R-ficoeritrina (Sondas Moleculares A-2660) en tampón B-PCR. Las microesferas se lavaron tres veces y se resuspendieron en tampón B-PCR como se describe anteriormente. Se incubaron a continuación durante diez minutos en un volumen total de 100 microlitros de tampón B-PCR que contiene 6 µg de anticuerpo de anti-conejo de pollo conjugado 488 (Sondas Moleculares A-21441) y 3 µg de anticuerpo anti-avidina de cabra biotinilado (BA -0300, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las microesferas se lavaron tres veces y se resuspendieron en tampón B-PCR como se describe anteriormente. Se incubaron a continuación durante diez minutos en un volumen total de 100 microlitros de tampón B-PCR que contiene 3 µg de un anticuerpo anti-pollo de cabra conjugado de Alexa-488 (Sondas Moleculares A-11039) y 3 microgramos de estreptavidina marcada con R- ficoeritrina (Sondas Moleculares S-866). Después, esta solución se lava 3 veces más con tampón 1x PCR y se resuspendió en 20 microlitros de tampón 1 X PCR.

Paso 6 - Citometría de flujo. La suspensión de microesferas se diluye a una concentración de- 106-107 microesferas por ml en 10 mMTris-HCl, 1 mMEDTA (351-010-131, Quality Biological, Inc., Gaithersburg, MD) y se analizaron usando un instrumento de LSR (BD Biosciences , Franklin Lakes, NJ). El instrumento está configurado para el análisis de dos colores estándar utilizando un láser de argón y filtros de luz que distinguía entre los dos colorantes fluorescentes. Ninguna deconvolución espectral se requiere, ya que las principales poblaciones de microesfera están bien separadas. En algunos casos, la exploración se realiza con instrumentos FACScan o FACSCalibur (BD Biosciences).

3. Dilución de microfluidos con PCR

Otro enfoque para PCR digital entraña el uso de microfluidos para lograr las condiciones digitales de PCR usadas en el presente método.

En general, una muestra de ADN obtenida como se describe anteriormente se diluye en una concentración apropiada, se mezcla con reactivos de la PCR, cebadores, dNTPs, etc., y flúa a través de un número de canales que puede ser cerrado en múltiples segmentos, lo que resulta en una serie de muestras de reacción discretas, o cámaras. Las cámaras pueden ser sometidas a ciclos térmicos PCR y los productos cuantitativamente detectados por fluorescencia, como se describe anteriormente.

Un dispositivo de microfluidos adecuado es producido por Fluidigm Corporation, denominado Aislamiento Digital y Detección de CFI (circuito de fluido integrado). Un dispositivo adecuado se describe también en la patente de EE.UU. 6.960.437 a Enzelberger, et al., expedida el 1 de noviembre 2005, titulada "amplificación de ácidos nucleicos utilizando dispositivos de microfluidos," aquí referenciada a los efectos de la descripción de un dispositivo

de microfluidos capaz de soportar múltiples ampliaciones de ácidos nucleicos en paralelo y detecciones. Como se describe en esta patente, un dispositivo de microfluidos ejemplar para la realización de reacciones de ciclo térmico incluye en la capa con los canales de flujo una pluralidad de entradas de muestra, una unión en T mezclada, un bucle de circulación central (es decir, el canal de flujo sustancialmente circular), y un canal de salida. La intersección de un canal de control con un canal de flujo puede formar una microválvula. Esto es así porque los canales de control y de flujo están separados por una membrana elastomérica fina que puede ser desviada en el canal de flujo o retraída de la misma. La deflexión o retracción de la membrana elastomérica se logra mediante la generación de una fuerza que hace que la deflexión o retracción se produzca. En ciertos sistemas, esto se logra mediante el aumento o disminución de la presión en el canal de control en comparación con el canal de flujo con el que se cruza con el canal de control. Sin embargo, una amplia variedad de otros enfoques puede ser utilizada para accionar las válvulas que incluyen diversos enfoques electrostáticos, magnéticos, electrolíticos y electrocinéticos. Otro dispositivo de microfluidos, adaptado para realizar reacciones de PCR, y útil en los presentes procedimientos, se describen en US 2005/0252773 por McBride, et al., publicada el 17 de noviembre de 2005, titulada "thermal reaction device and method for using the same."

El bucle central sustancialmente circular y los canales de control que se cruzan con él forman la parte central de la bomba rotativa. La bomba que causa que la solución fluya a través del canal de flujo sustancialmente circular constan de un conjunto de al menos tres canales de control que son adyacentes entre sí y que cruzan el canal de flujo de rama sustancialmente circular (es decir, el bucle central). Cuando se apliquen una serie de secuencias de actuación encendido/apagado para los canales de control, el fluido en el bucle central se puede bombear peristálticamente en una dirección, ya sea en sentido horario o antihorario elegido. La acción de bombeo peristáltica resulta de la desviación secuencial de las membranas que separan los canales de control y canal de flujo dentro o fuera del canal de flujo. En general, cuanto mayor sea la frecuencia de accionamiento, más rápido el fluido rotará a través del bucle central. Sin embargo, un punto de saturación eventualmente se alcanza en el que la frecuencia aumentada no resulta en el flujo de fluido más rápido. Esto se debe principalmente a las limitaciones en la velocidad a la que la membrana puede volver a una posición no accionada. Un sistema ejemplificado tiene dos conjuntos de bombas y (es decir, dos conjuntos de tres canales de control que cubren el canal de flujo sustancialmente circular) una única bomba puede ser utilizada (es decir, un único conjunto de tres canales de control de la superposición del canal de flujo sustancialmente circular). Además, mientras que se muestre que cada bomba incluye tres canales de control, más canales de control pueden ser utilizados. También debe entenderse que los tres canales de control pueden ser diferentes segmentos de un único canal de control que cubren el canal de flujo.

La descripción detallada del análisis de muestras múltiples se lleva a cabo en los pocillos no significa que las secuencias diana deben estar separados físicamente en los pocillos, ya que las secuencias pueden estar en muestras que sean aislados, simplemente por estar en diferentes microesferas (como se describió anteriormente) o por la adhesión a diferentes áreas de un sustrato (tal como se describe a continuación).

4. Métodos de secuenciación/detección individual de moléculas

Debe apreciarse que los métodos que implican PCR u otra ampliación no son la única manera de detectar o enumerar las moléculas en una muestra de reacción discreta dada. Es posible usar solo citometría de flujo para contar moléculas individuales que han sido marcadas con una sonda fluorescente específica de la secuencia. También es posible secuenciar la secuencia diana en la muestra de reacción directamente, ya sea después de la ampliación o en el nivel de una sola molécula.

Incorporación de nucleótidos fluorescentes mediante polimerasa ADN

Como se describe en la publicación PNAS anteriormente referenciada por Braslavsky et al., polimerasa de ADN se puede emplear para aplicar secuenciación de imagen a la información en un molde de ADN cuando su cadena complementaria se sintetice. Los nucleótidos se insertan de forma secuencial; sólo se requiere la resolución de tiempo para discriminar sucesivas incorporaciones. Después de cada evento de incorporación exitosa, una señal fluorescente se mide y después se anula por fotoblanqueo. Este método se presta a paralelismo masivo.

En resumen, esta técnica permite la observación de la fluorescencia de una sola molécula mediante un microscopio convencional equipado con iluminación de reflexión total interna, lo que reduce la fluorescencia de fondo. La superficie de un portaobjetos de cuarzo se trata químicamente para anclar específicamente moldes de ADN mientras que se previene la unión no específica de nucleótidos libres, y una celda de flujo de plástico está unida a la superficie para soluciones de intercambio. Oligonucleótidos de molde de ADN se hibridan con un cebador marcado fluorescentemente y unidos a la superficie de viastreptavictina y biotina con una densidad superficial suficientemente baja como para resolver moléculas individuales. Los moldes cebados se detectan a través de sus etiquetas fluorescentes, sus ubicaciones se registran para referencias futuras, y las etiquetas se fotoblanquean. Trifosfatos de nucleótidos marcados y enzima de polimerasa de ADN se lavan a continuación, dentro y fuera de la célula de flujo, mientras que las ubicaciones conocidas de los moldes de ADN son monitoreados para la aparición de fluorescencia. La técnica utiliza una combinación de microscopía de onda evanescente y un solo par de fluorescencia de transferencia de energía de resonancia (spFRET) para rechazar el ruido no deseado. El fluoróforo

donador excita aceptadores sólo dentro del radio de Forster, creando una fuente de campo cercano de alta resolución extrema. Debido a que el radio de Forster de este par fluoróforo es 5 nm, la resolución espacial de este método excede el límite de difracción en un factor de 50 y la microscopía de campo cercano convencional por un orden de magnitud.

El ADN genómico del tejido tomado de la madre, es decir, la mezcla de material genético fetal y materno, pueden ser distribuidos en muestras discretas que están anclados a una superficie y secuenciales o monitoreados por sondas marcadas para detectar una secuencia específica diana, por ejemplo, una región única del cromosoma 21, por ejemplo, AML1. Nuevas orientaciones para la preparación de secuencias únicas de cromosomas 21 se pueden encontrar, por ejemplo, en Fuscoe et al., "An Efficient Method for Selecting Unique-Sequence Clones from ADN Libraries and Its Application To Fluorescent Staining of Human Chromosome 21 Using *In Situ* Hybridization," Genomics, vol. 5, 1989, pp. 100-109. Una metodología útil en la plataforma de la presente invención se basa en la secuenciación paralela masiva de millones de fragmentos usando "la unión de ADN genómico fragmentado al azar a una superficie ópticamente transparente planar, y la amplificación en fase sólida para crear una celda de flujo de secuenciación de alta densidad con millones de racimos, conteniendo cada uno ~1,000 copias de moldes por metro cuadrado. cm. Estos moldes se secuenciaron utilizando la tecnología del ADN de cuatro colores de secuenciación por síntesis. Véase, productos ofrecidos por Illumina, Inc., San Diego California. También, véase el documento US 2003/0022207 a Balasubramanian, et al., publicada el 30 de enero de 2003, titulada "Arrayed polynucleotides and their use in genome analysis."

La secuenciación se puede combinar con los métodos basados en la amplificación en un chip microfluídico que tiene cámaras de reacción tanto para la PCR como la secuenciación basada en un molde microscópico. Sólo se necesitan aproximadamente 30 pb de la información de la secuencia al azar para identificar una secuencia como perteneciente a un cromosoma humano específico. Las secuencias más largas se pueden identificar de forma exclusiva dianas más particulares. Un algoritmo para el diseño de secuencias únicas se describe en Yamada, et al. "PrimerStation: a highly specific multiplex genomic PCR primer design server for the human genome". Nucleic Acids Res., 1 de julio de 2006; 34 (Web Server issue): W665 - W669, ilustrativo de métodos de software que se pueden utilizar para identificar una secuencia en comparación con la secuencia de genoma conocido. Véase, también Zhu et al., "Single molecule profiling of alternative pre-mRNA splicing," Science. 2003 Agosto 8; 301 (5634):836-838, describe una tecnología basada en una sola molécula para el estudio de ARNm.

Análisis lineal directa (DLA)

Otro método de determinar la identidad de ADN genómico a partir de las presentes muestras se denomina análisis lineal directa, y se describe en Chan et al., "ADN Mapping Using Microfluidic Stretching and Single-Molecule Detection of Fluorescent Site-Specific Tags," Genome Research 14:1137-1146 (2004). En este método, un dispositivo de microfluidos se utiliza para el estiramiento de moléculas de ADN en flujo de alargamiento que está acoplado a un sistema de detección multicolor capaz de sensibilidad de fluoróforo único. Las moléculas de ADN de doble cadena se etiquetaron en sitios específicos de motivos en la secuencia con etiquetas de bisPNA fluorescentes (ácido nucleico peptídico). Las moléculas de ADN son entonces estiradas en el dispositivo de microfluidos y accionadas en una corriente de flujo por detectores de fluorescencia confocales. DLA puede proporcionar las localizaciones espaciales de múltiples motivos de secuencias específicas de ADN a lo largo de las moléculas individuales, y miles de moléculas individuales pueden ser analizadas por minuto.

Una configuración de microchip y condiciones de operación se pueden preparar de acuerdo con esta publicación que son adecuadas para el estiramiento de ADN largo de 50 kb. El chip incluye un campo de mensaje, un embudo con relación de desmultiplicación de conicidad 10:1, una forma cónica que proporciona perfil $W(x)1/x^2$ (W es la anchura del canal, y x es la coordenada a lo largo de la dirección del flujo), y un canal de interrogación de una anchura de 5 μ m. El canal de interrogación tiene una sección transversal uniforme para garantizar la velocidad de disolución constante, lo que era de 10-15 μ m/ms. Una vez dentro del canal, las moléculas de ADN estiradas y etiquetadas viajan a través de puntos de luz de láser enfocado que excita la fluorescencia. Epi-iluminación de la muestra y detección confocal están dispuestas dentro de un microscopio de fluorescencia.

Los rayos láser de excitación se dirigen hacia el diana del microscopio con un espejo dicróico que refleja la luz con 532 nm (rayo ExI) y 633 nm (rayos ExII y ExIII) longitudes de onda, pero es transparente a la emisión de fluorescencia excitada por estos rayos. La emisión se divide además por otros filtros de paso de banda y espejo dicróico. la fluorescencia excitada por el láser verde es entregado por fibra óptica al fotodiodo de avalancha de recuento de fotones (APD) para la detección de la señal en el canal de datos 1. La fluorescencia excitada por rayos rojos ExII y EXIII se dirige a la APD de canales de datos 2 y 3, respectivamente.

El dispositivo descrito anteriormente puede estar configurado con longitudes de camino más grandes con el fin de dar cabida a las hebras de ADN más grandes, presumiblemente hasta longitudes cromosómicas enteras. La muestra genómica se sondeó con una sonda específica del cromosoma 21 roscado a través del canal de interrogación, y la presencia de uno o más cromosomas se detecta.

D. Evaluación cuantitativa

La PCR digital permite la detección de aneuploidía meramente contando las transcripciones, como se ilustra mediante el siguiente cálculo. Supongamos que el ADN fetal está presente en la sangre materna a un nivel fracción de ϵ , y que estamos tratando de descubrir una aneuploidía de orden relativa a euploidía e (en el ejemplo, en relación a la detección del Síndrome de Down en los seres humanos, $e=2$ es euploidía y el Síndrome de Down trisomía $\alpha=3$). Si cromosoma A es euploides y representa un control interno, y el cromosoma B es aneuploides y es el diana a medirse, entonces se puede amplificar segmentos representativos de ambos cromosomas mediante PCR digital. En la comparación de los amplicones de cada tipo, uno espera encontrar que por cada e amplicones de cromosoma A hay $e(1-\epsilon)+\alpha\epsilon$ amplicones de cromosoma B. En el caso de una trisomía y $\epsilon=3\%$, entonces para cada 2 amplicones del cromosoma A uno espera 2,03 amplicones de cromosomas B. Mientras que esta diferencia es pequeña, que se pueden medir. Por ejemplo, si uno amplifica una muestra de 1.000 equivalentes celulares, a continuación, uno espera 2.000 amplicones de cromosoma A y 2030 de cromosoma B. La diferencia de 30 amplicones es en principio detectable.

La confianza estadística requerida para resolver la diferencia en las proporciones se puede estimar de la siguiente manera. Ahí es una variación estadística aleatoria asociada con el tamaño de la muestra inicial, que va aproximadamente como la raíz cuadrada del número de muestras tomadas. De hecho, es a menudo difícil de comenzar con precisión con un número fijo de células equivalentes, y en el ejemplo anterior se espera un error estadístico de orden 32 amplicones (raíz cuadrada 32 (1000)) para la mayoría de las técnicas de preparación de muestras. Este es el mismo tamaño que la señal que estamos tratando de detectar y por lo tanto en la práctica se requiere más de 1.000 equivalentes celulares para la detección robusta. Precisamente cuántos se requiere depende de la certeza estadística que se requiere. Si a uno le gustaría un resultado que es significativo para desviaciones estándar k en consecuencia

$$k\sqrt{N} = N(e(1-\epsilon)+\alpha\epsilon - e) = N\epsilon(\alpha-e)$$

$$\text{or } N = (k/(\epsilon(\alpha-e)))^2$$

Utilizando los valores del ejemplo anterior, si se requiere desviaciones estándar $k=3$, entonces el número de amplicones N debe ser de al menos 10.000 para la detección de Síndrome de Down. Sin embargo, como se discutió anteriormente, el número de secuencias diana necesarios para la confianza estadística se puede reducir mediante el uso de secuencias de control, y, además, la muestra puede ser enriquecida para el ADN fetal.

III. Aplicaciones específicas

La presente invención está particularmente adaptada para detectar anomalías genéticas que involucran diferencias cuantitativas entre las secuencias genéticas maternas y fetales. Estas anomalías genéticas incluyen mutaciones que pueden ser heterocigotos y homocigotos entre el ADN materno y fetal, y para aneuploidías. Por ejemplo, una copia que falta de cromosoma X (monosomía X) resulta en el Síndrome de Turner, mientras que una copia adicional del cromosoma 21 resulta en el Síndrome de Down. Otras enfermedades, como el síndrome de Edward y síndrome de Patau son causadas por una copia adicional del cromosoma 18 y el cromosoma 13, respectivamente. El presente método puede ser utilizado para la detección de una translocación. Además, la amplificación, transversión, inversión, aneuploidía, poliploidía, monosomía, trisomía, trisomía 21, trisomía 13, trisomía 14, trisomía 15, trisomía 16, trisomía 18, trisomía 22, triploidía, tetraploidía, y anomalías de cromosomas sexuales incluyendo, pero no limitado a XO, XXY, XYY, y XXX.

Otros cebadores específicos de cromosoma se describen en la solicitud de patente de EE.UU. 20050164241 a Hahn, Sinuhé, et al., publicada el 28 de julio de 2005, titulada "Non-invasive detection of fetal genetic traits," aquí referenciada para la descripción de los métodos de preparación de muestras y ciertos cebadores de PCR, descritos como sigue:

Los cebadores para los genes se preparan sobre la base de secuencias de nucleótidos obtenidas a partir de bases de datos como GenBank, EMBL y similares. Los nombres de los cebadores polimórficos y las secuencias de los cebadores para los genes se muestran para los cromosomas respectivos en los siguientes ejemplos (#2, el Ejemplo 1; #4, Ejemplo 6, #14, el Ejemplo 9; #22, Ejemplo 2). Los siguientes marcadores genéticos polimórficos y fabricantes (pares de cebadores STS polimórficos: D2S207, D2S177, D2S156 y D2S159, BIOS Laboratories, Inc.) se utilizan para identificar el cromosoma #2.

Hay más de 1.000 conjuntos de cebadores de cromosoma 21 de PCR específicos que figuran en el sitio web del NIH UniSTS, que pueden estar situados en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unists> y se encuentran con la frase de búsqueda "human[organism] AND 21[chr]". UniSTS es una base de datos completa de sitios de secuencia etiquetada (STS) derivados de mapas basados en STS y otros experimentos. STS están

definidas por pares de cebadores de PCR y se asocian con información adicional, como posición genómica, genes y secuencias. Del mismo modo, las secuencias de cebadores para otros cromosomas humanos se pueden encontrar modificando adecuadamente la consulta de búsqueda.

5 Los ejemplos de enfermedades en las que la secuencia diana puede existir en una copia en ADN materno (heterocigoto), pero causa enfermedades en un feto (homocigoto), incluyen anemia de células falciformes, fibrosis quística, hemofilia, y la enfermedad de Tay Sachs. En consecuencia, utilizando los métodos descritos aquí, se pueden distinguir los genomas con una mutación de los genomas con dos mutaciones.

10 La anemia de célula falciforme es una enfermedad autosómica recesiva. Nueve por ciento de los negros en Estados Unidos son heterocigotos, mientras que 0,2% son homocigotos recesivos. El alelo recesivo causa una única sustitución de aminoácidos en las cadenas beta de la hemoglobina.

15 La enfermedad de Tay-Sachs es una enfermedad autosómica recesiva que resulta en la degeneración del sistema nervioso. Los síntomas se manifiestan después del nacimiento. Los niños homocigotos recesivos para este alelo rara vez sobreviven más allá de años de edad vivos. Las víctimas carecen de la capacidad de tomar la enzima N-acetil-hexosaminidasa, que descompone el lípido gangliósido GM2.

20 Otro ejemplo es la fenilcetonuria (PKU), un trastorno de herencia recesiva cuyos pacientes carecen de la capacidad para sintetizar una enzima para convertir el aminoácido fenilalanina en individuos de tirosina de homocigótico recesivo para que este alelo tenga una acumulación de fenilalanina y productos de degradación anormal en la orina y la sangre.

25 La hemofilia es un grupo de enfermedades en las que la sangre no coagula normalmente. Factores en la sangre están implicados en la coagulación. Hemofílicos que carecen del factor VIII normal, se dice que tienen hemofilia A, y aquellos que carecen del factor IX tienen hemofilia B. Estos genes se encuentran en los cromosomas X, por lo que los cebadores y sondas se pueden utilizar en el presente método para detectar si un feto ha heredado o no el cromosoma X defectuoso de la madre, o alelo normal del padre.

30 Un listado de las mutaciones del gen para el que se encuentra el presente método se puede adaptar en [http:// www.gdb.org/gdb](http://www.gdb.org/gdb), The GDB Human Genome Database, The Official World-Wide Database for the Annotation of the Human Genome Hosted by RTI International, North Carolina USA.

35 **A. Preparación para trisomía con el análisis de frecuencia**

En este protocolo, se utiliza el número de muestras positivas de reacción, sin tener en cuenta el aumento de la intensidad de tres contra dos cromosomas en una muestra de reacción. Es decir, como se ha descrito anteriormente, la trisomía se puede detectar ya sea mediante la búsqueda de un aumento de la señal de un solo pozo que tienen múltiples copias de ADN cromosómicas, o mediante la dilución de una muestra y contando la frecuencia de respuestas del marcador trisómico frente a un marcador diploide de control.

40 ADN fetal que circula en el plasma materno se usa aquí para proporcionar material suficiente para el análisis cromosómico. ADN se extrae de una muestra de sangre y alícuotas a diferentes cámaras de reacción sobre la base de equivalentes de genoma, es decir, todo el contenido genómico de una célula normal (46 cromosomas). Esto pesa aproximadamente 6,6 pg. El término "genoma nominal equivalente" se utiliza para referirse a la distribución calculada de ADN de la muestra basada en un tamaño de genoma calculado y el peso del ADN. En la práctica, habrá cierta variación experimental en tamaño de la muestra de ADN, y, debido a la distribución de fragmentos al azar, un genoma equivalente dado no contendrá exactamente los fragmentos de ADN correspondientes a un único genoma diploide completo, pero un gran número, en promedio, sí los contendrán.

50 Para cada panel en el chip de matriz digital, se requiere 10 ul de mezcla de reacción. Para lograr ~ 1/3 del panel lleno, la concentración final requerida del molde en la mezcla de reacción debe ser de aproximadamente 48 copias/ul, (cada 0,33 molde por cámara 7nl). De este modo, para un volumen de 10 ul de reacción (1 Panel), 480 copias (~240 equivalentes de genoma, "GE") de ADN total flotante se requiere. Estos cálculos se basan en Chiu et al., "Effects of Blood-Processing Protocols on Fetal and Total ADN Quantification in Maternal Plasma," Clinical Chemistry, 47:9. 1607-1613. 2001, donde se usó PCR en tiempo real cuantitativo para estimar ADN plasma aislado bajo diferentes protocolos, y Li Y, Zimmermann et al., "Size Separation of Circulatory ADN in Maternal Plasma Permits Ready Detection of Fetal ADN Polymorphisms", Clinical Chemistry, 50.:6. 1002-1011. 2004.

60 Suponiendo que el volumen de sangre 55% es plasma, se puede obtener la recuperación de 80% de extracción de gel con una preparación de ADN tal como con un kit QIAEX II. Si hay 20 ml de sangre recogida, el volumen de plasma = 20 ml de sangre * 0,55 = 11 ml. El ADN de libre flotación total = 11 ml * 1000 GE/ml = 11000 GE. Por lo tanto, se puede calcular la cantidad de ADN < 300 pb, en el que 11000 GE * 0,27 = 2,970 GE. La cantidad de ADN < 300 pb después de la recuperación = 2.970 GE * 0,8 = 2376 GE = 4752 copias.

65

De este modo, una extracción de sangre de 20 ml debe contener suficiente ADN total de menos de 300 pb (aproximadamente de ADN fetal del 85%) durante unos 10 paneles, lo suficiente, como se muestra a continuación, para alcanzar significación estadística.

5 B. Protocolo de Muestra

El siguiente protocolo de muestra proporciona un procedimiento para su uso en la preparación de una muestra de plasma materna y el aumento de la señal del cromosoma 21.

10 Colección de plasma: recoger 20 ml de sangre periférica de la mujer embarazada. Esto se recoge en 2 tubos con EDTA como anticoagulante. Se ha de procesar la sangre dentro de 2 horas de recogida de las muestras. La sangre se procesa primero por centrifugación a 1600 g por 10 min. Se proporciona alícuotas de plasma a tubos de polipropileno (1 ml cada uno), con cuidado de no alterar la capa leucocitaria. A continuación, el sobrenadante se microcentrifugó a 16000g (velocidad completa) durante 10 min para eliminar las células maternas residuales. En este momento, se extrae ADN del plasma, con QIAamp Blood Mini Kit ("protocolo de fluido corporal"). Se aplica 800 µl de plasma por columna y se eluye en 40 µl de tampón.

20 Dependiendo de la concentración de ADN real en plasma, uno puede tener que procesar todo el plasma en una sola columna (con kit Midi o Maxi) para lograr una concentración final más alta de ADN. Entonces, el ADN se sometió a electroforesis en gel (Li et al. Clin Chem 50:6 1002-1011 2004) para separar fragmentos de ADN de tamaño más pequeños. Una bandeja de gel UV se prepara con gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio al 0,5 mg/L. Escalera 100 pb y HindIII digirieron ADN de fago Lambda utilizado como marcadores. El ADN extraído se carga en un gel; el gel se lleva a cabo a 80 V durante 1 hora. El ADN se extrae a partir del gel primero mediante la escisión ADN <300 pb con una hoja limpia. Esta banda se recuperó con QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) y se eluyó en 40ul de tampón de elución.

Cuantificación total de ADN con PCR en tiempo real:

30 La cantidad de ADN de libre flotación total puede cuantificarse utilizando cebadores y la sonda TaqMan diseñada para el gen GAPDH (cromosoma 12). PCR en tiempo real se ejecuta con cebadores y sondas GAPDH y amiloide (21 cromosomas) y antes de aplicarse con matriz digital para confirmar que las regiones de amplificación están intactas. Para aumentar la señal del cromosoma 21, un conjunto adicional de cebadores y sondas se pueden utilizar.

35 Un candidato posible es el siguiente (Véase Sangre 104(1):149-158 (2004):

DSCR1 (Región Crítica de Síndrome de Down 1) Chr 21

40 SEQ ID NO: 6: 5' (sonda) -AGG TTG TGA AAA CAG CAG CAA TGC AAT GT- (extintor) P3'

Adelante:(SEQ ID NO: 7) 5' TAG CCA CAG GAA CCG CCG T 3'

Reverso:(SEQ ID NO: 8):5' TGA GGG AAG AAA GGA GCT AAC 3'

45 Región de amplificación (con cebadores subrayados) SEQ ID NO: 9):

CCACAGGAAGCCGCCTAGTGCAGAGAGGTTGTGAAAACAGCAGCAATGCAATGTGG

50 AAATTGTAGCGTTTCCTTTCTTCCCTCA. Un conjunto adicional de cebadores y sondas se puede diseñar para aumentar la señal del control (estos cebadores pueden ser para el cromosoma 12 o cualquier otro cromosoma salvo el cromosoma 21).

Si se utiliza un dispositivo de microfluidos automatizado, se proporcionan canales y válvulas apropiadas para la introducción de los reactivos de PCR y, si se utiliza, una sonda.

55 En los ejemplos a continuación, se utilizó un chip prototipo de Fluidigm DID. El chip de aislamiento digital y de detección (DID) trabaja mediante la partición de una muestra/ensayo (ensayos TaqMan®) mezcla en cientos de decenas de miles de cámaras de reacción, donde reacciones de QPCR en tiempo real se supervisan continuamente mediante un lector de matriz dinámica. El chip DID descrito aquí contiene entradas para las mezclas 12 muestras/ensayo, y sus particiones de arquitectura de 7,5 µl de fluido por cada entrada en 1.200 cámaras de reacción. Éstas se muestran como 12 paneles en las Figuras 2 y 3. Instrumentación se utiliza para conducir las mezclas de muestra/de ensayo de los pocillos en el soporte en las cámaras de reacción apropiadas. Como se muestra en las figuras 2 y 3, los puntos blancos indican la ubicación de las cámaras de reacción positiva para el cebador indicado y colorante. La suma de los pocillos positivos en cada sección estará en consonancia con las copias de genes/cromosomas que se midieron en la muestra. El número de puntos de luz que se muestran representa el número de cámaras de reacción positiva; no cuantificación se utilizó en estos experimentos, y los

resultados no dependen de la cuantificación de una señal de una mezcla (discreta) de la muestra individual. Tal cuantificación se puede utilizar, pero también puede ser una fuente de error en los métodos que dependen de ello.

Este chip se describe adicionalmente en Ottesen et al., "Microfluidic Digital PCR Enables Multigene Analysis of Individual Environmental Bacteria," *Science* 314:1464-1467 (1 de diciembre de 2006). Como se discute allí, la muestra de ADN se suspende en un tampón de reacción PCR y se carga en el dispositivo de microfluidos. En el presente trabajo se realizó una versión más reciente de ese dispositivo de microfluidos. Este dispositivo se describe más adelante. Como alternativa al protocolo anterior, se puede utilizar un kit con reactivos pre-optimizados, tales como el Kit de Qiagen QuantiTect Multiplex PCR, que contiene QuantiTect Multiplex PCR Buffer, que tiene el factor sintético MP y una combinación optimizada de KCl y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que promueven la hibridación específica y estable de los cebadores a los moldes. Este kit también contiene polimerasa de ADN HotStarTaq: Puesto que esta polimerasa requiere la incubación a 95°C para la activación, productos malcebados y dímeros de cebadores, los cuales pueden competir por los reactivos, no se forman durante la instalación de reacción.

También se utiliza los siguientes procedimientos anti-contaminación:

1. El uso de puntas de pipeta resistentes de aerosol
2. El tratamiento de preamplificación mediante el uso de N-glicosilasa de uracilo, el cual destruyó los productos de PCR que contienen uracilo/ARN
3. Blanco negativo de agua
4. Blanco negativo de rodajas de gel
5. Panel de Control negativo de matriz digital

Extracción alter de sangre y purificación, la concentración preferida de muestra de ADN debe ser ~140-240 copias/ μl , es decir, ~70-120 GE/ μl . Esto corresponde a ~3.4 a 2 μl de volumen de molde requerido en un volumen digital de reacción de PCR de 10 μl .

En este protocolo y los siguientes ejemplos, se diluye la mezcla de material genético materno y fetal obtenido de la madre para lograr una alta probabilidad de que una sola secuencia diana estará presente en una muestra dada a analizar. Como se muestra en la Fig. 1A, también es posible llevar a cabo este proceso con menor dilución y menos sitios de muestreo vacíos si la cuantificación se utiliza para distinguir un número de secuencias diana en una muestra.

IV. Ejemplos

A continuación se presentan los datos obtenidos a partir del ADN genómico extraído de una línea celular humana normal y de una línea celular de Síndrome de Down (trisomía 21). Estas líneas celulares se adquirieron de ATCC. Cebadores de PCR TaqMan específicos para el cromosoma 21 y el cromosoma 12 han sido adaptados de una referencia: Zimmermann B et al., "Novel Real-Time Quantitative PCR Test for Trisomy 21". *Clinical Chemistry*. 48 (nº2). 2002. 362-363. HEX (hexaclaro-6-carboxifluoresceína) y FAM (6-carboxi-fluoresceína) son tintes fluorescentes bien conocidos; extintor BHQ® es extintor colorante de agujero negro (BHQ, Biosearch Technologies, Novato, CA).

Amiloide directa: 5' GGG AGC TGG TAC AGA AAT GAC TTC 3' (SEQ ID NO:11)

Amiloide inversa: 5' TTG CTC ATT GCG CTG ACA A 3' (SEQ ID NO:12)

Sonda amiloide: 5' (FAM) AGC CAT CCT TCC CGG CCG TAG G (BHQ) 3' (SEQ ID NO:13)

GAPDH directa: 5' CCC CAC ACA CAT GCA CTT ACC 3' (SEQ ID NO:14)

GAPDH inversa: 5' CCT ACT CCC AGG GCT TTG ATT 3' (SEQ ID NO:15)

GAPDH Sonda: 5' (HEX) AAA GAG CTA GGA AGG ACA GGC AAC TTG GC (BHQ) 3' (SEQ ID NO:16)
 cebadores y sondas se sintetizaron por IDT (Integrated ADN Technologies)). Las muestras de ADN fueron analizadas por PCR digital utilizando PCR digital de microfluidos en un chip microfluidico Pluidigm®, teniendo 12 paneles con 765 (pocillos) particiones cada uno. Se analizaron varias mezclas de ADN normal y Downs (que representa una mezcla de células fetales y maternas en una muestra de sangre). Pequeñas cantidades de cada molde se pipetearon directamente en cada mezcla de PCR; alternativamente, una mezcla de moldes se puede preparar primero, a continuación verterse en la mezcla de PCR, lo que debería dar resultados más precisos. El método alternativo se utilizó en estos experimentos. En estos ejemplos, la

trisomía se detectó en base al número de pocillos que muestra el marcador cromosómico por triplicado, es decir, el análisis se ilustra en la Fig. 1C. No se utilizan los datos de intensidad del cromosoma triplicado, excepto como una relación a un marcador de cromosomas normales. Debido a que la muestra es diluida, muchos de los pocillos no tendrán ningún cromosoma de interés (o fragmento de marcador), como puede verse en las Figs. 2 y 3, que muestran fotografías de las virutas del Ejemplo 2.

Protocolo: se combinan los cebadores 300 nM; Las sondas 150 nm; iTaq Supermix con ROX o iQ supermix. Tween 20 (0,1%); molde de ADN (2 µl, premezclado con el porcentaje deseado de ADN Downs); Agua (hasta el volumen total de reacción de 10 µl).

Cada panel se cargó con la mezcla de reacción de 10 ml, y la PCR se realizó en un ciclador térmico similar al Sistema de Biomark disponible comercialmente de Fluidigm de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones de ciclación fueron: 98°C 30 s, 97°C 30 s, 95°C 2 min, [56°C 30 s, 58°C 30 s, 60°C 30 s, 98°C 15 s] x 40 ciclos, 60°C durante 10 min.

Un programa MATLAB fue escrito para restar la imagen del chip tomada antes de un ciclo de la adoptada en el ciclo 40 para cada canal fluorescente. Se contó el número de pocillos positivos en cada canal fluorescente.

Los experimentos se realizaron con las muestras que contenían 100% Downs, 60% Downs, 50% Downs, 40% Downs, 30% Downs y 0% Downs (es decir, 100% Normal) de ADN. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Fig. 4, donde cada barra y punto de datos representa una concentración diferente de ADN de Down.

Los datos de los Datos se analizan como sigue:

X^* =número de recuentos HEX (Cromosoma 12)

Y^* =número de recuentos FAM (Cromosoma 21)

Hay una respuesta característica de PCR digital. Al bajo número de copias, como se describe adicionalmente en Warren L, Bryder D, Weissman IR, Quake SR. Caracterización de factor de transcripción en progenitores hematopoyéticos individuales por Digital RT-PCR. Véase, PNAS 2006. 103: 17807-17812).

X =número real de copias de aporte de Cromosoma 12

Y =número real de copias de aporte de Cromosoma 21

$X = \log(1 - X^*/N) / \log(1 - 1/N)$

$Y = \log(1 - Y^*/N) / \log(1 - 1/N)$

N =número total de participación por panel = 765

Interval de confianza $k = (Y - X) / \sqrt{Y}$

En la Fig. 4, el nivel de confianza obtenido de un solo chip se representó frente al por cien de ADN Downs y se comparó con el intervalo de confianza predicho (línea). El intervalo de confianza observado en, por ejemplo, 30% de ADN, fue menor de lo previsto, pero, no obstante, mostró un intervalo de confianza de > 1 para un solo panel.

Este cálculo se realiza de la siguiente manera:

Para equivalencia genómico 1,

Número de copia de Cromosomas 12 = $2(1 - \epsilon) + 2\epsilon = 2$

Número de copia de Cromosomas 21 = $2(1 - \epsilon) + 3\epsilon = 2 + \epsilon$

Diferencia entre número de copia de Chr21 y Chr12 = ϵ

Donde $\epsilon = \text{ADN fetal} / \text{ADN flotante libre total} * 100\%$

Para equivalencia genómico m,

Y =número de copia de Cromosoma 21

X =número de copia de Cromosoma 12

ES 2 739 484 T3

Diferencia entre número de copia de Chr21 y Chr12 = $D = Y - X = m\epsilon$

$D = k\sigma = k \cdot \sqrt{Y}$, suponiendo que la distribución de Y sigue aquella de Poisson (Promedio = desviación estándar = Y)

$$k = m\epsilon / \sqrt{Y}$$

$$m = Y / (2 + \epsilon)$$

$$k = \sqrt{Y} \cdot \epsilon / (2 + \epsilon)$$

Si se utiliza un tercio del panel (es decir, 1 compartimento positivo en cada 3 compartimentos)

N = número de compartimentos

$$Y^* = N/3$$

$$Y = \log(1 - Y^*/3) / \log(1 - 1/N) = \log(2/3) / \log(1 - 1/N)$$

k varía con N como se muestra en el gráfico.

El intervalo de confianza k corresponde a la desviación estándar, donde una desviación estándar más alta indica una mayor diferencia entre el ADN normal y el de Down. Incluso a la concentración más baja utilizada (30%) y con sólo 10 paneles analizados, el análisis estadístico mostró la viabilidad del presente método.

Figs. 2 y 3 muestran los resultados de las muestras 100% de Downs, para facilitar el análisis visual. En cada panel, el número de manchas blancas indica los pocillos positivos para los marcadores de la prueba. Se puede ver que el cromosoma 21 tiene más puntos por simple observación visual, distinguiendo la trisomía del cromosoma normal. En una mezcla de 30% (lo que representa una muestra de sangre materna enriquecida), los resultados se analizaron estadísticamente.

La Tabla 1 a continuación muestra los resultados para cada panel (numerados como en las figuras 2 y 3) en un solo experimento utilizando el ADN que es 30% de Down.

Tabla 1

Panel	Muestra	FAM	HEX	Relación
1	Normal	221	213	1,04
2	Normal	254	264	0,96
3	Normal	271	252	1,08
4	Normal	246	257	0,96
5	Normal	241	238	1,01
8	30% Downs	270	222	1,22
9	30% Downs	219	194	1,13
10	30% Downs	249	234	1,06
11	30% Downs	230	223	1,03
12	30% Downs	216	189	1,14

La columna "FAM" muestra los compartimentos (pocillos) que son positivos para el cromosoma 21, y la columna "HEX" muestra los compartimentos positivos para el cromosoma 12. La importancia de las relaciones más altas en los casos Downs se muestra en la Fig. 4, y también se analizó en el ensayo T de Student, con un valor de 0,036599344.

El análisis anterior muestra que la fiabilidad estadística del presente método se puede mejorar drásticamente simplemente aumentando el número de pocillos ensayados. Dado que se requiere aproximadamente 240 equivalentes de genoma por panel, y alrededor de 4,700 equivalentes de genoma se encuentran en una muestra de 20 ml, es posible, dada la presente descripción, simplemente ejecutar análisis adicionales para aumentar

la significación estadística.

CONCLUSIÓN

5 Los presentes ejemplos, métodos, procedimientos, compuestos y moléculas específicas tienen el propósito de ejemplificar e ilustrar la invención y no deberían en modo alguno verse como una limitación del alcance de la invención, que se define por el alcance literal y equivalente de las reivindicaciones adjuntas. Cualesquiera patentes o publicaciones mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas de los niveles de los expertos en la técnica a la que pertenece la patente y están destinadas a transmitir detalles de la invención que no se podrán formular
10 explícitamente pero serían entendidas por trabajadores en el campo. Los protocolos ejemplares dados son para la conveniencia del lector y no deben ser interpretados como necesarios para un experto ordinario en la técnica, dadas las enseñanzas de la presente memoria descriptiva en relación con los distintos métodos y materiales que se utilizarán.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERISTY

<120> EXAMINACIÓN GENÉTICA FETAL NO INVASIVA POR ANÁLISIS DIGITAL

20 <130> P067232EP

<140>

<141> 2007-02-02

25 <150> US 60/764,420
<151> 2006-02-02

<160> 16

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 24

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

40 <400> 1
gggagctggt acagaaatga cttc 24

<210> 2

45 <211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

50 <223> Sintético

<400> 2

agccatcctt cccgggccta gg 22

55 <210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

60 <220>

<223> Sintético

<400> 3

ccccacacac atgcacttac c 21

65

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
5
<220>
<223> Sintético

<400> 4
10 cctactccca gggcttgat t 21

<210> 5
<211> 29
<212> ADN
15 <213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 5
20 aaagagctag gaaggacagg caactggc 29

<210> 6
<211> 29
25 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 6
30 aggttgtaa aacagcagca atgcaatgt 29

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

<220>
40 <223> Sintético

<400> 7
ccacaggaag cgcctagt 19

<210> 8
<211> 21
45 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
50 <223> Sintético

<400> 8
55 tgaggaaga aaggaaacgc t 21

<210> 9
<211> 84
60 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 9
65

	ccacaggaag cgcctagtg cagagaggtt gtgaaaacag cagcaatgca atgtggaaat	60
	tgtagcgttt cttttcttcc ctca	84
5	<210> 10 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Sintético	
	<400> 10 ttgctcattg cgctgaca 19	
15	<210> 11 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Sintético	
	<400> 11 gggagctggt acagaaatga cttc 24	
25	<210> 12 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Sintético	
	<400> 12 ttgctcattg cgctgaca 19	
35	<210> 13 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Sintético	
	<400> 13 agccatcct cccggccta gg 22	
45	<210> 14 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Sintético	
	<400> 14 ccccacac atggcactta cc 22	
55	<210> 15 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220>	
65	<220>	

ES 2 739 484 T3

<223> Sintético
<400> 15

5 cctagtcca gggcttgat t 21

<210> 16
<211> 29
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sintético

15 <400> 16
aaagagctag gaaggacagg caactggc 29

20

25

30

35

40

45

50

55

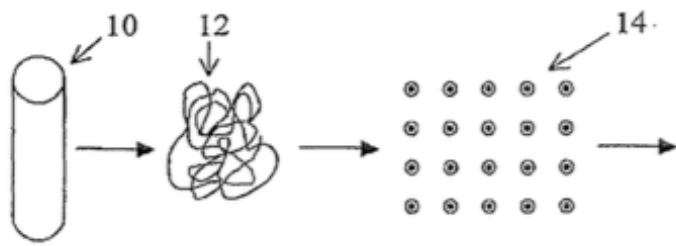
60

65

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método de detección diferencial de secuencias objetivo en una mezcla de material genético materno y fetal, en donde la mezcla de material genético materno y fetal es una mezcla de ADN genómico materno y fetal obtenido a partir de plasma sanguíneo materno, que comprende los pasos de:
- 10 a) distribuir el material genético en muestras discretas de tal manera que la medición de una secuencia objetivo pueda cuantificarse como múltiples binarios o simples;
- 15 b) medir la presencia de diferentes secuencias objetivo en muestras discretas usando reactantes específicos de secuencia, en donde una de las diferentes secuencias objetivo está en un cromosoma que es diploide en el material genético materno y posiblemente aneuploide en el material genético fetal y otra de las secuencias objetivo diferentes está en un cromosoma que es diploide o presumiblemente diploide en tanto el material genético materno como en el fetal;
- 20 c) analizar una serie de muestras discretas suficientes para obtener resultados que distinguen la secuencia objetivo que está en un cromosoma que es diploide en el material genético materno y posiblemente aneuploide en el material genético fetal de la secuencia objetivo que está en un cromosoma que es diploide o presumiblemente diploide en tanto el material genético materno como el fetal; y
- d) detectar una aneuploidía fetal mediante análisis estadístico de los resultados.
- 25 **2.** El método de la reivindicación 1, en el que medir la presencia de una secuencia objetivo comprende la hibridación con un ácido nucleico que tiene un marcador fluorescente y, opcionalmente, en donde dicho ácido nucleico está en una muestra para unirse a una secuencia objetivo y generar un cambio resultante en la fluorescencia.
- 30 **3.** El método de la reivindicación 1, en el que detectar la aneuploidía fetal en el paso (c) implica detectar una diferencia entre los resultados obtenidos para la secuencia diana que está en un cromosoma que es diploide en el material genético materno y posiblemente aneuploide en el material genético fetal y los resultados obtenidos para la secuencia objetivo que está en un cromosoma que es diploide o presumiblemente diploide en tanto el material genético materno como el fetal.
- 35 **4.** El método de la reivindicación 1, en el que el análisis estadístico en el paso (c) comprende además tener en cuenta el nivel de fracción de ADN fetal en la mezcla de ADN genómico materno y fetal.
- 5.** El método de la reivindicación 1, en el que los reactantes específicos de secuencia son sondas específicas de secuencia y, opcionalmente, en donde:
- 40 (i) dichas sondas comprenden una sonda específica para el cromosoma humano 21;
- (ii) se usa una sonda fluorescente que hibrida con la secuencia objetivo; o
- (iii) el método comprende el uso de sondas que se vuelven fluorescentes al unirse a las) secuencia(s) objetivo.
- 45 **6.** El método de la reivindicación 1, en el que el ADN se amplifica y/o marca.
- 7.** El método de la reivindicación 1, en el que:
- 50 (i) la mezcla de material genético materno y fetal se distribuye en muestras discretas de tal manera que cada muestra discreta contiene de media no más de aproximadamente una secuencia objetivo por muestra;
- (ii) la mezcla de material genético materno y fetal se distribuye en muestras discretas de tal manera que cada muestra discreta contiene de media menos de un genoma equivalente de ADN; o
- (iii) la mezcla de material genético materno y fetal se distribuye en muestras discretas que se monitorizan mediante sondas marcadas para detectar una secuencia específica del objetivo,
- y en donde opcionalmente las muestras discretas se ponen en contacto con una pluralidad de cebadores de PCR, que incluyen por lo menos un cebador dirigido específicamente a una secuencia materna y por lo menos un cebador dirigido específicamente a una secuencia fetal, y que incluye además el paso de amplificar la secuencia materna y la secuencia fetal.
- 55 **8.** El método de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en el que las muestras discretas están en muestras de reacción seleccionadas del grupo que consiste de: pocillos en una placa de microtitulación, fases acuosas en una emulsión, áreas en una superficie de matriz y cámaras de reacción en un dispositivo microfluídico.
- 60 **9.** El método de cualquier reivindicación anterior, en el que medir la presencia de diferentes secuencias objetivo en el material genético usando reactantes específicos de secuencia comprende detectar la presencia de marcadores genéticos en las diferentes secuencias objetivo usando reactantes específicos de secuencia.
- 65 **10.** El método de cualquier reivindicación anterior:

- 5 a. que comprende además amplificar los segmentos cromosómicos que son diploides en el material genético materno y son aneuploides en el material genético fetal, y amplificar los segmentos cromosómicos que son diploides en el material genético materno y son diploides en el material genético fetal;
- 10 b. en el que analizar el número de muestras discretas comprende cuantificar los segmentos cromosómicos que son diploides en el material genético materno y son aneuploides en el material genético fetal, y cuantificar los segmentos cromosómicos que son diploides en el material genético materno y son diploides en el material genético fetal; o
- 15 c. en donde detectar la aneuploidía fetal mediante análisis estadístico de los resultados comprende detectar la aneuploidía fetal mediante análisis estadístico de los resultados de la cuantificación de los segmentos cromosómicos que son diploides en el material genético materno y son aneuploides en el material genético fetal, y cuantificar los segmentos cromosómicos que son diploides en el material genético materno y son diploides en el material genético fetal.
- 20 **11.** El método de cualquier reivindicación anterior, en el que analizar una serie de muestras discretas comprende proporcionar una cantidad representativa de una cantidad del primer cromosoma y una cantidad representativa de una cantidad del segundo cromosoma.
- 25 **12.** El método de la reivindicación 11, en el que detectarla aneuploidía fetal mediante análisis estadístico de los resultados comprende un análisis estadístico usando la cantidad representativa de la cantidad del primer cromosoma y la cantidad representativa de la cantidad del segundo cromosoma.
- 30 **13.** El método de cualquier reivindicación anterior, que es un método para detectar una trisomía fetal, y en el que opcionalmente:
- 35 (a) el método es para detectar trisomía fetal 21;
 (b) el método es para detectar trisomía fetal 13;
 (c) el método es para detectar la trisomía fetal 14;
 (d) el método es para detectar la trisomía fetal 15;
 (e) el método es para detectar la trisomía fetal 16;
 (f) el método es para detectar la trisomía fetal 18; o
 (g) el método es para detectar trisomía fetal 22.
- 40 **14.** El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que es un método para detectar una monosomía fetal, y en el que opcionalmente el método es para detectar la monosomía X.
- 45 **15.** El método de la reivindicación 13, en el que medir la presencia de diferentes secuencias objetivo comprende el uso de ácidos nucleicos específicos para el cromosoma humano 21 y específicos para otro cromosoma humano.
- 50 **16.** El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende además el paso de enriquecer la mezcla para material genético fetal, en donde opcionalmente:
- 55 (i) el método comprende el paso de enriquecer la mezcla para el material genético fetal mediante separación por tamaño, por medio del cual se usa una preparación que comprende solo fragmentos de ADN menores de aproximadamente 1000 pb para medir las secuencias diana;
- 60 (ii) el método comprende el paso de enriquecer la mezcla para el material genético fetal mediante separación por tamaño, por medio del cual se usa una preparación que comprende solo fragmentos de ADN menores de aproximadamente 300 pb para medir las secuencias objetivo; o
- 65 (iii) se excluyen los fragmentos de ADN mayores de aproximadamente 500 pb.



	1	2	3	4	5
A	21, 21 22, 22		21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22
B	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22
C	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22
D	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22	21, 21 22, 22

Fig. 1A

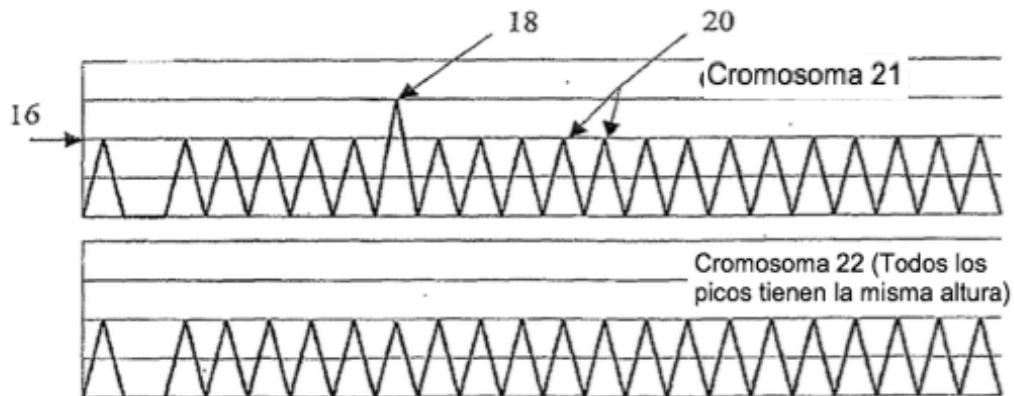


Fig. 1B

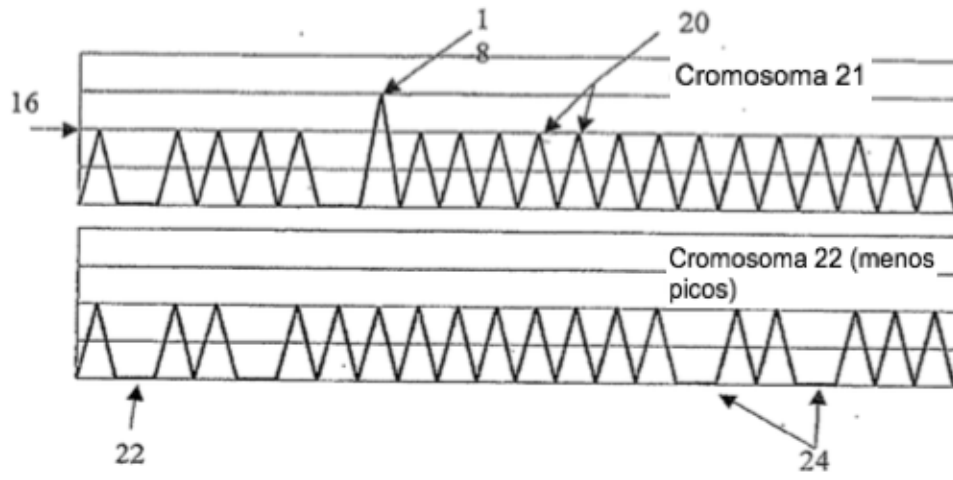
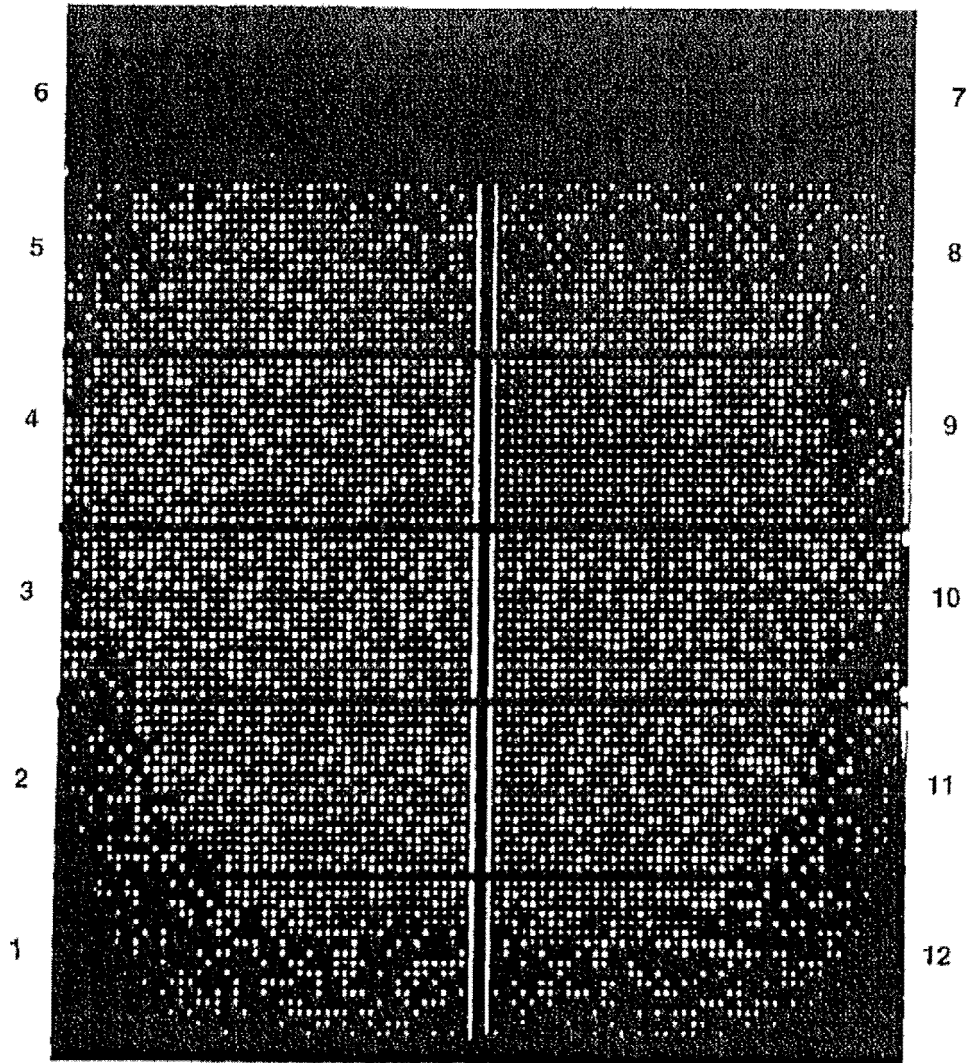
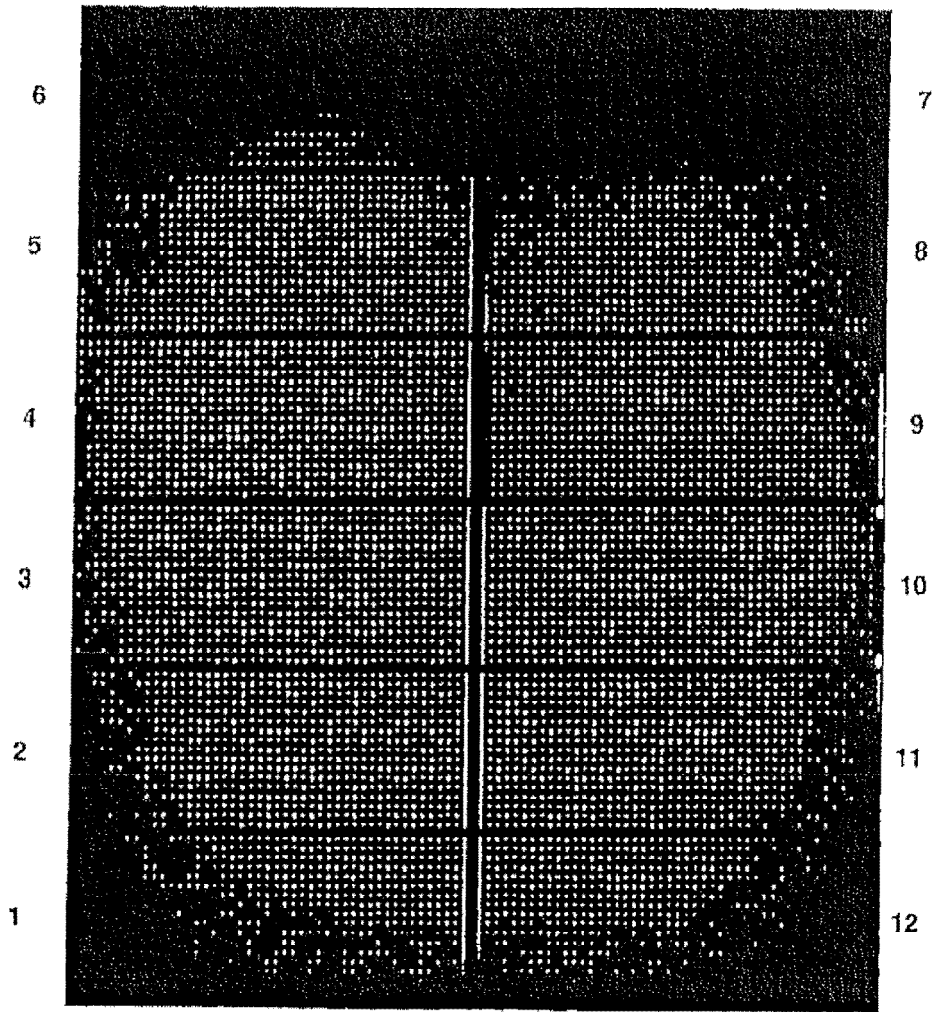


Fig. 1C



Chr21 FAM

Fig. 2



Chr 12 HEX

Fig. 3

