

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 237**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6858 (2008.01)

C12Q 1/683 (2008.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/026027**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14160199**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14773880 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2971172**

54 Título: **Método para la cuantificación relativa de cambios en la metilación del ADN, usando reacciones combinadas de nucleasa, ligamiento, y polimerasa**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361783657 P

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

05.03.2020

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
395 Pine Tree Road, Suite 310, CCTEC
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**BARANY, FRANCIS y
SPIER, EUGENE**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 746 237 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

Método para la cuantificación relativa de cambios en la metilación del ADN, usando reacciones combinadas de nucleasa, ligamiento, y polimerasa

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método para cuantificación relativa de cambios en la metilación del ADN, usando reacciones combinadas de nucleasa, ligamiento, y polimerasa.

10

Antecedentes de la invención

Los cánceres contienen patrones de metilación alterados que dan como resultado una expresión anómala de genes críticos. La hipermetilación desactiva la expresión de genes necesarios para regular el crecimiento normal, mientras que la hipometilación permite la expresión inapropiada de genes que permiten que las células proliferen. Los promotores de genes a menudo tienen regiones de alto contenido de CpG conocidas como "islotos CpG". Cuando los genes, tales como los genes supresores de tumores con islotos CpG promotores, se desactivan, esto suele ir acompañado de la metilación de la mayoría de las secuencias CpG dentro del promotor y las primeras regiones intrónicas. La hipermetilación del promotor anómalo se produce en la posición 5 de la citosina dentro del dinucleótido CpG. (Gardiner-Garden *et al.*, J. Mol. Biol, 196 (2): 261-82 (1987)). Inactiva la expresión de genes críticos que están involucrados en la supresión tumoral, reparación de ADN, control de metástasis tumoral e invasión (Cheng *et al.*, Genome Res. 16 (2): 282-89 (2005), Feinberg *et al.*, Nature, 301: 89-92 (1983); Jones *et al.*, Nat. Rev. Genet., 3 (6): 415-28 (2002)). Tanto en la investigación básica como en la clínica existe una gran necesidad de identificar el estado de metilación del ADN del promotor con eficacia y precisión elevadas para diagnósticos y pronósticos de enfermedades.

15

20

25

La presencia y ausencia de metilación en ciertas regiones genéticas tiene aplicaciones de diagnóstico y de pronóstico prenatal. Por ejemplo, la metilación anómala en regiones en los cromosomas 13, 18, 21, X e Y se puede usar para diagnosticar el síndrome de Down (Patsalis *et al.*, Exp. Opin. Biol. Ther. 12 (Supl. 1): S155-S161 (2012)). Dado que el ADN fetal y el ADN materno están metilados diferencialmente, el ADN libre de células en el plasma materno puede proporcionar una fuente de ADN fetal, que se puede obtener de forma no invasiva y se puede usar para evaluar el estado de metilación de los cromosomas mencionados anteriormente.

30

En la actualidad, varios grupos usan enfoques de bisulfito para detectar la presencia de bajos niveles de ADN metilado en suero, tal como un marcador de cáncer temprano (deVos, Clinical Chemistry 55 (7): 1337-1346 (2009), Lind *et al.*, Molecular Cancer 10: 85 (2011)). Sin embargo, a menudo un solo marcador da resultados de falsos positivos y falsos negativos inaceptablemente elevados (Alquist *et al.*, Clin. Gastroenterol. Hepatol. 10 (3): 272-277 (2012)). Por lo tanto, uno o algunos marcadores de metilación son insuficientes para la detección robusta del cáncer temprano a partir del suero. Existe una necesidad urgente de métodos con detección multiplexada de niveles muy bajos de ADN metilado cuando la mayoría del ADN con la misma secuencia no está metilada. Por ejemplo, la detección de múltiples secuencias de ADN metiladas en el ADN libre de células aislado del suero puede permitir la detección temprana del cáncer. Del mismo modo, también se necesitan con urgencia métodos para la detección multiplexada de niveles muy bajos de ADN no metilado cuando la mayoría del ADN con la misma secuencia está metilada para aplicaciones tales como la detección temprana del cáncer.

35

40

45

Se han desarrollado varios métodos para el estudio del estado de metilación del ADN promotor de genes conocidos (Laird P. W., Nature Review Cancer, 3: 253-266 (2003)). Generalmente estos métodos se pueden agrupar en dos categorías: ensayos de endonucleasa de restricción sensibles a la metilación y enfoques basados en la conversión de bisulfito de sodio.

50

Métodos de digestión con endonucleasa de restricción sensible a la metilación

Este enfoque aprovecha las enzimas de restricción sensibles a metilo, en las que el ADN genómico se escinde cuando no se metila, y esto va seguido por una amplificación por PCR usando cebadores que flanquean el sitio(s) (Singer-Sam *et al.*, Nucleic Acids Res., 18 (3): 687 (1990), Singer-Sam *et al.*, Mol. Cell. Biol, 10 (9): 4987-9 (1990)). Un sitio de endonucleasa de restricción metilada da como resultado la presencia del producto de PCR adecuado. La credibilidad de este método depende de la digestión completa del ADN no metilado por la endonucleasa de restricción. Este problema se ve exacerbado por: (i) limitar las cantidades de ADN metilado en la muestra, (ii) el requisito de algunas enzimas de restricción para unir dos sitios no metilados de forma simultánea, y (iii) la falta o poca actividad de las enzimas de restricción para ADN monocatenario que puede surgir durante la preparación de la muestra. Es difícil dirigir las digestiones de endonucleasas hasta su finalización. Por lo tanto, a veces es difícil determinar si los amplicones de PCR resultan de una digestión incompleta (es decir, falsos positivos) o de aquellos de sitios de metilación de baja abundancia (es decir, positivos verdaderos). Las técnicas de enzimas de restricción se basan en la eliminación del ADN no metilado, y suponiendo que la amplificación por PCR del ADN restante surge porque estaba metilado, y en consecuencia el método es susceptible a falsos positivos obtenidos a partir de la eliminación incompleta del ADN no metilado. Esta técnica tiene la desventaja de que no es precisa para encontrar niveles bajos de ADN

55

60

65

metilado cuando la mayor parte de la misma secuencia no está metilada, como podría ser el caso con la detección de metilación asociada al cáncer en múltiples marcadores en el ADN libre de células del suero.

Conversión química a base de bisulfito de sodio

5 La conversión química de citosinas en uracilos usando bisulfito se puede usar para detectar diferencias de metilación del ADN. Las 5-metilcitosinas son resistentes a la conversión, y la desaminación solo se produce en citosinas no metiladas (Frommer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (5): 1827-31 (1992)). El bisulfito se puede añadir de forma cuantitativa a los 5-6 dobles enlaces de citosina si no hay un grupo metilo en la posición 5. La adición de bisulfito hace
10 que la citosina sea susceptible a la desaminación hidrolítica; la posterior eliminación del bisulfito da como resultado la formación de uracilo (Voss *et al.*, Anal. Chem., 70 (18): 3818-3823 (1998)). Una hebra de las secuencias de ADN modificadas se puede amplificar y secuenciar a continuación por PCR. Sin embargo, debido a la contaminación de las células del estroma en una muestra clínica habitual, la secuenciación directa sin clonar los productos de PCR reduce la sensibilidad de la técnica. Requiere que aproximadamente un 25 % de los alelos se metilen para una detección
15 precisa (Myohanen *et al.*, DNA Sequence, 5: 1-8 (1994)).

El desarrollo de la PCR específica de metilación (MSP) ha permitido el estudio sensible y específico de secuencias de metilación de baja abundancia (Herman *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (18): 9821-6 (1996)). La MSP se basa en la modificación química del ADN usando bisulfito y cebadores de PCR diseñados específicamente que son
20 complementarios al molde ADN modificado con bisulfito. Por lo general, se deben incluir más de tres sitios CpG en las secuencias de oligonucleótidos. Se diseñan dos conjuntos de cebadores MSP PCR, un conjunto de cebadores MSP tiene la secuencia para hibridarse perfectamente con la hebra complementaria de la secuencia de ADN metilada tratada con bisulfito con metil-citosinas que residen en los sitios CpG. El otro conjunto de cebadores MSP solo está diseñado para hibridarse perfectamente con la hebra complementaria de la secuencia de ADN tratada con bisulfito en
25 ausencia de citosina metilada. Por lo tanto, los productos de PCR específicos de MSP solo resultan del molde ADN que contiene metil-citosinas.

Hay tres dificultades principales con este enfoque. El diseño de los cebadores de MSP requiere que haya suficientes cantidades de citosinas metiladas en la secuencia del cebador para garantizar la capacidad de selección. Puede que
30 no sea lo suficientemente sensible para distinguir secuencias metiladas parciales de secuencias totalmente metiladas. Además, este ensayo analiza un gen a la vez, y ambos conjuntos de cebadores MSP tienen diferentes temperaturas de hibridación que pueden ralentizar aún más su rendimiento. Por último, el tratamiento del ADN con bisulfito a menudo corta el ADN (es decir, destruye la cadena principal) ya que también está convirtiendo las citosinas no metiladas en uracilo. Las condiciones que aseguran que todas las citosinas no metiladas se conviertan en uracilo también pueden
35 destruir el ADN. Las condiciones que aseguran que queda suficiente ADN intacto pueden no asegurar que todas las citosinas no metiladas se conviertan en uracilo. Por lo tanto, la ausencia de una banda puede ser la consecuencia de destruir demasiado ADN inicial y, en consecuencia, una amplificación insuficiente, lo que lleva a un resultado falso negativo. Del mismo modo, la presencia de una banda puede ser la consecuencia de la conversión incompleta de citosina no metilada en uracilo, lo que permite la unión del cebador en un sitio no metilado y conduce a un resultado
40 de falso positivo. Algunos de estos problemas pueden superarse combinando el uso del tratamiento con bisulfito, la reacción en cadena de la polimerasa y la reacción de detección de ligasa (véase el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.358.048 de Barany *et al.*)

Una mejora adicional de esta técnica emplea un oligonucleótido de bloqueo que se hibrida con la secuencia del ADN no metilado convertido con bisulfito, enriqueciendo de ese modo la amplificación del ADN metilado convertido con
45 bisulfito (deVos *et al.*, Clinical Chemistry 55 (7): 1337-1346 (2009)). La desventaja es que el tratamiento con bisulfito destruye de un 50 % a un 90 % de la integridad del ADN original al cortarlo. Cuando se comienza con ADN del suero (con una longitud promedio de aproximadamente 160 bases), esto puede ser un problema importante. Además, la conversión de C en U reduce la complejidad de la secuencia de 4 bases a 3 bases. Por lo tanto, se pueden producir
50 amplificaciones no específicas. Esto generalmente requiere un enfoque de PCR anidada; esto corre el riesgo de contaminación por arrastre y generalmente no es ideal para amplificaciones multiplexadas.

El documento WO 0026401 discute un método para identificar un ácido nucleico que contiene CpG metilado, que incluye poner en contacto un ácido nucleico con una endonucleasa de restricción sensible a la metilación que escinde los sitios CpG no metilados, poner en contacto la muestra con un isosquizómero de la endonucleasa de restricción
55 sensible a la metilación, en el que el isosquizómero escinde sitios CpG tanto metilados como no metilados.

Batbayar *et al.*, 2006 Genome Research 16: 1046-1055 discute un ensayo denominado HELP (HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR), que permite tanto la formación de perfiles intragenómicos como las comparaciones intergenómicas de la metilación de citosina.

El documento WO 2006/088978 discute un método para determinar el patrón de metilación de un ácido polinucleico.

60 La presente invención se refiere a la superación de esta y otras deficiencias en la técnica.

Sumario de la invención

65 La invención es tal como se presenta en las reivindicaciones y proporciona:
un método para identificar, en una muestra que se ha obtenido, una o más moléculas de ácido nucleico diana que

se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos metilados, comprendiendo dicho método:

5 someter una o más moléculas de ácido nucleico diana en la muestra a al menos una reacción de digestión enzimática insensible a la metilación y al menos una reacción de digestión enzimática sensible a la metilación para formar una pluralidad de productos de digestión;

desnaturalizar los productos de digestión para formar productos de digestión monocatenarios;

10 proporcionar una pluralidad de adaptadores de oligonucleótido, comprendiendo cada adaptador de oligonucleótido una primera parte específica de cebador y un extremo en la posición 3', dicho extremo en la posición 3' configurado para ligarse a una parte en la posición 5' de un producto de digestión monocatenario e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región de oligonucleótido que es complementaria a una parte en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, extendiéndose dicha parte a través de la secuencia de digestión enzimática insensible a la metilación del producto de digestión monocatenario;

15 someter los productos de digestión a una reacción de ligamiento que comprende un tratamiento de hibridación, en el que cada uno de los productos de digestión monocatenarios se hibridan a su región complementaria del complemento de adaptador de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del adaptador es adyacente al extremo en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, y tratamiento de ligamiento, en el que el extremo en la posición 3' del adaptador de oligonucleótido se liga al extremo la posición 5' del producto de digestión monocatenario adyacente formando de ese modo productos de digestión etiquetados con adaptador;

20 proporcionar uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario, comprendiendo cada conjunto de cebador de oligonucleótido primario (i) un primer cebador de oligonucleótido primario que comprende la secuencia de nucleótidos que es la misma que la primera parte específica de cebador de los productos de digestión etiquetados con adaptador y (ii) un segundo cebador de oligonucleótido primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región del producto de digestión que está en la posición 3' con respecto a uno o más sitios de restricción metilados, sin escindir, y una segunda parte específica de cebador;

25 mezclar la pluralidad de productos de digestión etiquetados con adaptador, el uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario, y una primera polimerasa para formar una primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa;

30 someter la primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación, y un tratamiento de extensión formando de ese modo productos primarios de extensión; y

35 detectar y distinguir los productos primarios de extensión, identificando de ese modo la presencia de una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos metilados.

40 La invención también proporciona:
un método para identificar, en una muestra que se ha obtenido, una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos no metilados, comprendiendo dicho método:

45 someter una o más moléculas de ácido nucleico diana en la muestra a al menos una reacción de digestión enzimática sensible a la metilación para formar una pluralidad de productos de digestión que comprenden uno o más restos no metilados;

desnaturalizar los productos de digestión para formar productos de digestión monocatenarios;

50 proporcionar una pluralidad de adaptadores de oligonucleótido, comprendiendo cada adaptador de oligonucleótido una primera parte específica de cebador y un extremo en la posición 3', dicho extremo en la posición 3' configurado para ligarse a una parte en la posición 5' de un producto de digestión monocatenario e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región de oligonucleótido que es complementaria a una parte en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, extendiéndose dicha parte a través de la secuencia de digestión enzimática sensible a la metilación del producto de digestión monocatenario;

55 someter los productos de digestión a una reacción de ligamiento que comprende un tratamiento de hibridación, en el que cada uno de los productos de digestión monocatenarios se hibridan a su región complementaria del complemento de adaptador de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del adaptador es adyacente al extremo en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, y tratamiento de ligamiento, en el que el extremo en la posición 3' del adaptador de oligonucleótido se liga to al extremo la posición 5' del producto de digestión monocatenario adyacente formando de ese modo productos de digestión etiquetados con adaptador;

60 proporcionar uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario, comprendiendo cada conjunto de cebador de oligonucleótido primario (i) un primer cebador de oligonucleótido primario que comprende la secuencia de nucleótidos que es la misma que la primera parte específica de cebador de los productos de digestión etiquetados con adaptador y (ii) un segundo cebador de oligonucleótido primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región de la parte del producto de digestión del producto de digestión

65

etiquetado con adaptador, y una segunda parte específica de cebador;
mezclar la pluralidad de productos de digestión etiquetados con adaptador, el uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario, y una primera polimerasa para formar una primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa;

5 someter la primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación, y un tratamiento de extensión formando de ese modo productos primarios de extensión; y
detectar y distinguir los productos primarios de extensión, identificando de ese modo la presencia de una o más
10 moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos no metilados.

La invención además proporciona:

un método para identificar, en una muestra que se ha obtenido, una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos no metilados,
15 comprendiendo dicho método:

someter una o más moléculas de ácido nucleico diana en la muestra a una digestión enzimática sensible a la metilación que digiere moléculas de ácido nucleico sin metilar, pero no metiladas para formar una pluralidad de productos de digestión que comprenden uno o más restos no metilados;

20 proporcionar una pluralidad de conjuntos de adaptador de oligonucleótido, comprendiendo cada conjunto de adaptadores de oligonucleótido (a) un primer adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 3' configurado para ligarse a un extremo en la posición 5' de un producto de digestión e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 5' de un producto de digestión, y (b) un segundo adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 5' configurado para ligarse a un extremo en la posición 3' de un producto de digestión e hibridado a su
25 complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 5' está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 3' de un producto de digestión;

someter los productos de digestión a una reacción de ligamiento que comprende un tratamiento de desnaturalización para formar productos de digestión monocatenarios, un tratamiento de hibridación, en el que los productos de digestión monocatenarios se hibrida a sus regiones complementarias del primer y el segundo adaptadores de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del primer adaptador es adyacente al extremo en la posición 5' del producto de digestión monocatenario y el extremo la posición 5' del segundo adaptado es adyacente al extremo en la posición 3' del producto de digestión monocatenario, y un tratamiento de ligamiento en el que los adaptadores de oligonucleótido se ligan a sus productos de digestión monocatenarios hibridados formando de ese modo productos de digestión etiquetados con adaptador doble; y
30 detectar productos de digestión etiquetados con adaptador doble, identificando de ese modo una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos no metilados.

40 La invención también proporciona:

un método para identificar, en una muestra que se ha obtenido, una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos metilados,
45 comprendiendo dicho método:

someter una o más moléculas de ácido nucleico diana en la muestra a al menos una reacción de digestión enzimática insensible a la metilación y al menos una reacción de digestión enzimática sensible a la metilación para formar una pluralidad de productos de digestión que comprenden uno o más sitios de restricción sin escindir metilados;

50 proporcionar una pluralidad de conjuntos de adaptador de oligonucleótido, comprendiendo cada conjunto de adaptadores de oligonucleótido (a) un primer adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 3' configurado para ligarse a un extremo en la posición 5' de un producto de digestión e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 5' de un producto de digestión, y (b) un segundo adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 5' configurado para ligarse a un extremo en la posición 3' de un producto de digestión e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 5' está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 3' de un producto de digestión;

someter los productos de digestión a una reacción de ligamiento que comprende un tratamiento de desnaturalización para formar productos de digestión monocatenarios, un tratamiento de hibridación, en el que los productos de digestión monocatenarios se hibrida a sus regiones complementarias del primer y el segundo adaptadores de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del primer adaptador es adyacente al extremo en la posición 5' del producto de digestión monocatenario y el extremo la posición 5' del segundo adaptado es adyacente al extremo en la posición 3' del producto de digestión monocatenario, y un tratamiento de ligamiento en el que los adaptadores de oligonucleótido se ligan a sus productos de digestión monocatenarios hibridados
65

formando de ese modo productos de digestión etiquetados con adaptador doble; y

detectar productos de digestión etiquetados con adaptador doble, identificando de ese modo una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos metilados.

Los métodos que se han descrito anteriormente para detectar restos metilados en la molécula de ácido nucleico diana tienen múltiples niveles de discriminación que permiten los niveles más altos de sensibilidad y especificidad, incluso cuando se trata de detectar moléculas de ácido nucleico diana metilado de baja abundancia.

Cuando se usa un enfoque de adaptador de oligonucleótido único, estos niveles de discriminación incluyen: (i) uso de enzima de restricción insensible a la metilación para generar un fosfato en la posición 5' competente para ligamiento único en moléculas de ácido nucleico diana bicatenarias, (ii) uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir moléculas de ácido nucleico diana bicatenarias cuando no están metiladas, (iii) uso de fidelidad de ligamiento de ligasa termoestable para ligar el adaptador de oligonucleótido correcto a la molécula de ácido nucleico diana digerida, (iv) uso de cebador de oligonucleótido específico de locus y polimerasa para amplificar moléculas de ácido nucleico diana etiquetadas con adaptador, y (v) uso de secuencias en el extremo en la posición 3' del adaptador de oligonucleótido, de modo que cuando no están ligadas a las moléculas de ácido nucleico diana, forman horquillas y se extienden sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican y no se detectan.

Cuando se usa un enfoque de adaptador doble, estos niveles de discriminación incluyen: (i) uso de enzima de restricción insensible a la metilación para generar fosfato en la posición 5' y OH en la posición 3' competentes para ligamiento único en moléculas de ácido nucleico diana bicatenarias, (ii) uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir moléculas de ácido nucleico diana bicatenarias cuando no están metiladas, (iii) uso de fidelidad de ligamiento de ligasa termoestable para ligar adaptadores de oligonucleótido correctos a moléculas de ácido nucleico diana, (iv) uso de actividad de nucleasa en la dirección 5' → 3' de polimerasa o Fen nucleasa el adaptador de oligonucleótido cadena abajo, y (v) uso de secuencias en ambos extremos en las posiciones 3' y 5' de adaptadores de oligonucleótido, de modo que cuando no están ligadas a las moléculas de ácido nucleico diana, forman horquillas para prevenir la unión al cebador, o se extienden sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican y no se detectan.

Del mismo modo, los métodos que se han descrito anteriormente para detectar restos no metilados en ADN diana tienen múltiples niveles de discriminación que permiten los niveles más altos de sensibilidad y especificidad, incluso con dianas no metiladas de baja abundancia. Estos niveles de discriminación reflejan los articulados anteriormente, en los que el uso de enzimas de restricción insensibles a la metilación es opcional. Por último, una ventaja abrumadora de los métodos que se describen en el presente documento es la capacidad de detectar y cuantificar de forma simultánea dianas metiladas y no metiladas de baja abundancia en las mismas reacciones iniciales de ligamiento de nucleasas.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A-1B muestran una realización del proceso de endonucleasa de restricción-ligamiento-polimerasa de la presente invención. En la Figura 1 A, el ADN diana bicatenario se escinde mediante enzima(s) de restricción sensibles a la metilación (por ejemplo, HinP1I). Los productos de digestión de ADNds que contienen uno o más restos no metilados se desnaturalizan, generando un producto de digestión monocatenario que tiene un PO₄ único en la posición 5' competente para ligamiento que es adecuado para ligamiento a un adaptador de oligonucleótido. El ADNss que está presente en la muestra no se digiere con estas enzimas y no generará un fosfato de ese tipo en la posición 5'. Se proporciona un adaptador de oligonucleótido que comprende una primera parte específica de cebador y un extremo en la posición 3' configurado para ligarse al producto de digestión. El extremo en la posición 3' del adaptador de oligonucleótido se hibrida a su complemento en el que el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 5' de un producto de digestión. El complemento del extremo en la posición 3' y la región complementaria a una parte en la posición 5' del producto de digestión comprenden un oligonucleótido que contiene uracilo como se muestra en la Figura 1 A, etapa 2. El adaptador de oligonucleótido se hibrida y se liga a su producto de digestión correspondiente de una manera específica de secuencia (Figura 1 A, etapa 2) para formar productos de digestión etiquetados con adaptador. Posteriormente, el oligonucleótido que contiene uracilo hibridado se digiere usando uracil ADN glicosilasa (UDG). Una PCR primaria se lleva a cabo usando un conjunto de cebadores primarios que comprende (i) un primer cebador de oligonucleótido primario que comprende la secuencia de nucleótidos que es la misma que la primera parte específica de cebador de los productos de digestión etiquetados con adaptador y (ii) un segundo cebador de oligonucleótido primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región del producto de digestión, y una segunda parte específica de cebador. Este enfoque generará productos de PCR solo si la secuencia diana no está metilada en el sitio que genera el extremo la posición 5' adecuado para ligamiento. La Figura 1B es análoga a la Figura 1A; sin embargo, en este caso, el ADN diana bicatenario se escinde tanto con enzima(s) de restricción insensibles a la metilación (por ejemplo, HaeIII), como con enzima(s) de restricción sensibles a la metilación (por ejemplo, HinP1I). En este ejemplo, el segundo cebador de oligonucleótido primario comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región del producto de digestión que esta

situada cadena abajo de uno o más sitios de restricción metilados, sin escindir, y una segunda parte específica de cebador. Este enfoque generará productos de PCR solo si las secuencias de ADN diana entre el adaptador y los cebadores específicos del locus estuvieran metilados (y por lo tanto fueron refractarios a la escisión mediante las enzimas sensibles a la metilación). La citosina metilada se muestra como "c*". La ligasa se muestra como un círculo; la polimerasa como un diamante. Ejemplos de enzimas de restricción sensibles a la metilación que se pueden usar: Acil, HinPII, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI o una combinación de las mismas. Ejemplos de enzimas de restricción insensibles a la metilación que se pueden usar: MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, BsaJI, o una combinación de las mismas.

Las Figuras 2A-2B muestran una realización del proceso de endonucleasa de restricción-ligamiento-polimerasa de la presente invención usando un adaptador de ligamiento horquillado. En la Figura 2A, el ADN diana bicatenario se escinde mediante enzima(s) de restricción sensibles a la metilación (por ejemplo, HinP1I). Los productos de digestión de ADNds se desnaturalizan, generando un producto de digestión monocatenario que tiene un PO₄ único en la posición 5' competente para ligamiento que es adecuado para ligamiento a un adaptador de oligonucleótido. En esta figura, la primera parte específica de cebador y el complemento del extremo en la posición 3' de cada adaptador de oligonucleótido se acoplan para permitir la formación de la horquilla. Después de la desnaturalización, los productos de digestión monocatenarios se hibridan a su región complementaria de los adaptadores de oligonucleótido horquillados de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del adaptador es adyacente al extremo de fosfato en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, y en presencia de una ADN ligasa, los adaptadores de oligonucleótido se ligan a sus productos de digestión monocatenarios hibridados para formar productos de digestión etiquetados con adaptador. La PCR se lleva a cabo usando un conjunto de cebadores primario como se describe en referencia a la Figura 1A. La actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa destruye la parte del molde del oligonucleótido ligado, creando un producto primario de extensión. Los adaptadores de oligonucleótido horquillados sin ligar se extenderán sobre ellos mismos y no se anticiparán más. Este enfoque generará productos de PCR solo si la secuencia diana no está metilada en el sitio que genera el extremo la posición 5' adecuado para ligamiento. La Figura 2B es análoga a la Figura 2A; sin embargo, en este caso, el ADN diana bicatenario se escinde tanto con enzima(s) de restricción insensibles a la metilación (por ejemplo, HaeIII), como con enzima(s) de restricción sensibles a la metilación (por ejemplo, HinP1I). En este ejemplo, el segundo cebador de oligonucleótido primario comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región de la parte del producto de digestión del producto de digestión etiquetado con adaptador que esta situada cadena abajo de uno o más sitios de restricción metilados, sin escindir, y una segunda parte específica de cebador (etiqueta específica del locus). Este enfoque generará productos de PCR solo si las secuencias de ADN diana entre el adaptador y los cebadores específicos del locus estuvieran metilados (y por lo tanto fueron refractarios a la escisión mediante las enzimas sensibles a la metilación). La citosina metilada se muestra como "c*". La ligasa se muestra como un círculo; la polimerasa como un diamante. Ejemplos de enzimas de restricción sensibles a la metilación que se pueden usar: Acil, HinPII, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI o una combinación de las mismas. Ejemplos de enzimas de restricción insensibles a la metilación que se pueden usar: MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, BsaJI, o una combinación de las mismas.

La Figura 3 demuestra cómo se puede usar una región de control como un control positivo en la misma mezcla de reacción que se muestra en las Figuras 1 y 2, para proporcionar una señal de control equivalente a la presencia de un 1 % de ADN metilado o no metilado. Los adaptadores y cebadores de oligonucleótido generalmente son diferentes a los usados en los métodos que se representan en las Figuras 1 y 2. Por lo tanto, el ADN de control se detecta en la misma reacción como diana metilada/no metilada, pero usando una etiqueta de detección diferente, por ejemplo, un colorante fluorescente. Después de desnaturalizar los productos de digestión de control bicatenarios, uno de dos adaptadores de oligonucleótido que contienen uracilo se liga al molde monocatenario. Uno de los adaptadores de oligonucleótido contiene una primera parte específica de cebador, u otra etiqueta detectable, y el segundo adaptador de oligonucleótido no contiene la primera parte específica de cebador o etiqueta detectable. Los dos adaptadores de oligonucleótido se proporcionan como una mezcla en una proporción conocida, por ejemplo, 1:99 tal como se muestra. Después del ligamiento, el oligonucleótido que contiene uracilo hibridado del adaptador se digiere usando uracil ADN glicosilasa (UDG). La PCR se lleva a cabo usando cebador de control específico de locus etiquetado (LSCP) y control de cebador universal (U1Pc) que etiqueta de forma específica el ADN de control. Un 99 % del ADN se liga a adaptador de oligonucleótido no amplificante y solo un 1 % del ADN genómico se liga a un adaptador de oligonucleótido que se puede amplificar y/o detectar. La señal generada a partir de la reacción de controles equivalente a la señal que se podría generar a partir de una molécula de ácido nucleico diana metilada o no metilada presente en un 1 % de la muestra de ADN.

La Figura 4 demuestra cómo se puede usar una región de control como un control positivo en la misma mezcla de reacción que se muestra en las Figuras 1 y 2 usando adaptadores horquillados para proporcionar una señal de control equivalente a la presencia de un 1 % de ADN metilado o no metilado. Los adaptadores y cebadores de oligonucleótido son generalmente diferentes a los usados en las Figuras 1 y 2. Por lo tanto, el ADN de control se detecta en la misma reacción como diana metilada/no metilada, pero usando una etiqueta de detección diferente, por ejemplo, un colorante fluorescente. Solo el ADNds se digiere mediante enzima de restricción insensible a la metilación, por ejemplo, HaeIII. Después de desnaturalizar los productos de digestión de control bicatenarios, uno de los dos adaptadores de oligonucleótido horquillados se ligan al molde monocatenario. Uno de los adaptadores de oligonucleótido contiene una primera parte específica de cebador, u otra etiqueta detectable, y el segundo adaptador de oligonucleótido no contiene la primera parte específica de cebador o etiqueta detectable. Los dos adaptadores de oligonucleótido se proporcionan como una mezcla en una proporción conocida, por ejemplo, 1:99

tal como se muestra. La PCR se lleva a cabo usando cebador de control específico de locus etiquetado (LSCP) y control de cebador universal (U1Pc) que etiqueta de forma específica el ADN de control. La actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa destruye la parte del molde del adaptador de oligonucleótido ligado, crean un producto que contiene etiquetas tanto cadena arriba como cadena abajo y que es adecuado para amplificación. Un 99 % del ADN se liga a adaptadores de oligonucleótido no amplificantes, y solo un 1 % del ADN se liga a un adaptador de oligonucleótido que se puede amplificar y/o detectar indicando la señal generada a partir de un equivalente de un 1 % de ADN metilado o no metilado.

LA Figura 5 muestra la detección de productos primarios de extensión generados con el proceso de endonucleasa de restricción-ligamiento-polimerasa de la presente invención usando el código de cremallera en un ensayo tradicional de tipo Taqman® (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) en el que el oligonucleótido de captura sirve como la sonda Taqman®.

La Figura 6 muestra un ejemplo de detección de horquilla de código de cremallera de separación Taqman® universal de productos formados usando el proceso de nucleasa-ligamiento-PCR de la presente invención. Los productos de partida pueden ser los productos primarios de extensión de los productos de digestión etiquetados con adaptador, productos de digestión etiquetados con adaptador doble, o productos primarios de extensión de los productos de digestión con doble etiqueta.

La Figura 7 muestra un ejemplo de detección de horquilla de código de cremallera de separación universal de productos formados usando el proceso de nucleasa-ligamiento-PCR de la presente invención. Los productos de partida pueden ser los productos primarios de extensión de los productos de digestión etiquetados con adaptador, productos de digestión etiquetados con adaptador doble, o productos primarios de extensión de los productos de digestión con doble etiqueta.

Las Figuras 8A-8C muestran tres ejemplos de detección por PCR de productos de nucleasa-ligasa de la presente invención usando horquilla mediada por UniTaq (Figura 8A), sondas UniTaq 5' nucleasa (también conocidas como Taqman®) (Figura 8B), y detección de círculo UniTaq (Figura 8C).

Las Figuras 9A-9D muestran diversas realizaciones del proceso de endonucleasa de restricción-ligamiento de la presente invención usando ligamiento doble. En la Figura 9A, Etapa 1, el ADN diana bicatenario se escinde mediante enzima(s) de restricción sensibles a la metilación (por ejemplo, HinP1I). Los fragmentos digeridos de ADNds se desnaturalizan, generando productos de digestión monocatenarios que contienen un PO₄ único en la posición 5' competente para ligamiento así como un OH en la posición 3' competente para ligamiento único. El ADN monocatenario que está presente en la muestra no se digiere con estas enzimas y no generará un fosfato de ese tipo en el OH en las posiciones 5' o 3'. Una pluralidad de conjuntos de adaptadores de oligonucleótido se añaden, comprendiendo cada conjunto de adaptadores de oligonucleótido un primer adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 3' configurado para ligarse a un extremo en la posición 5' de un producto de digestión e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región complementaria a la parte en la posición 5' de un producto de digestión, y un segundo adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 5' configurado para ligarse a un extremo en la posición 3' de un producto de digestión e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 5' está acoplado a una región complementaria a la parte en la posición 3' de un producto de digestión. En esta figura, las partes complementarias de los adaptadores de oligonucleótido y las regiones del adaptador que son complementarias al producto de digestión comprenden oligonucleótidos que contienen uracilo. Después de la desnaturalización, los productos de digestión monocatenarios se hibridan y se ligan a sus adaptadores de oligonucleótido correspondientes de un conjunto de adaptadores de una manera específica de secuencia (Figura 9A, Etapa 2). Posteriormente, el oligonucleótido que contiene uracilo hibridado se digiere usando uracil ADN glicosilasa (UDG). Se lleva a cabo una PCR opcional (Figura 9A, Etapa 3) usando un conjunto de cebadores primarios que comprende (i) un primer cebador de oligonucleótido primario que comprende la secuencia de nucleótidos que es la misma que la primera parte específica de cebador de los productos de digestiones etiquetados con adaptador doble y (ii) un segundo cebador de oligonucleótido primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la segunda parte específica de cebador de los productos de digestiones etiquetados con adaptador doble. Este enfoque generará productos detectables que corresponden a fragmentos de ADN genómico en los que ambos sitios de endonucleasa de restricción están sin metilar, permitiendo de este modo la generación de un extremo específico fosforilado en la posición 5' y un extremo en la posición 3' específico adecuado para ligamiento. En las muestras en las que al menos uno de estos sitios está metilado o el ADN es monocatenario, el ADN no se digiere con estas enzimas y no generará un sustrato adecuado para ligamiento, y por lo tanto no se producirá amplificación o señal por PCR. La ligasa se muestra como un círculo; la polimerasa como un diamante. La Figura 9B muestra otra realización del proceso de endonucleasa de restricción-ligamiento de la presente invención usando ligamiento doble de adaptadores horquillados. El proceso es similar al que se describe para la Figura 9A, excepto porque el extremo en la posición 3' y el complemento del extremo en la posición 3' del primer adaptador de oligonucleótido se acoplan para permitir que el primer adaptador de oligonucleótido forme una horquilla, y el extremo la posición 5' y el complemento del extremo en la posición 5' del segundo adaptador de oligonucleótido se acoplan para permitir que el segundo adaptador de oligonucleótido forme una horquilla. El segundo adaptador de oligonucleótido horquillado también tiene una parte de solapa de oligonucleótido en la posición 5' que contiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región en la posición 3' del segundo adaptador de oligonucleótido. La "X" en el oligonucleótido molde indica un grupo de bloqueo en el extremo en la posición 3', por ejemplo, un fosfato, C3 o cualquier otro resto no expansiva con una polimerasa. Después de la desnaturalización, los productos de digestión monocatenarios se hibridan a su región complementaria del primer y el segundo adaptadores de oligonucleótido de una manera específica de secuencia.

La superposición del oligonucleótido en la posición 5' del segundo adaptador de oligonucleótido se escinde para generar un fosfato en la posición 5' competente para ligamiento, y en presencia de ADN ligasa, los adaptadores de oligonucleótido se ligan a sus productos de digestión monocatenarios hibridados para formar productos de digestión etiquetados con adaptador doble (Figura 9B, Etapa 2). Una PCR opcional se lleva a cabo como se describe en la Figura 9A (Figura 9B, Etapa 3). Este enfoque generará productos de ligamiento o PCR correspondientes a fragmentos de ADN genómico en los que ambos sitios están sin metilar, generando un extremo específico fosforilado en la posición 5' y un extremo específico en la posición 3' adecuado para ligamiento. En las muestras en las que al menos un sitio está metilado o es ADN monocatenario, este no se digiere con estas enzimas y no generará un sustrato adecuado para ligamiento, y por lo tanto no se producirá amplificación o señal de PCR. Las Figuras 9C y 9D muestran la realización generalizada del proceso de endonucleasa de restricción-ligamiento de la presente invención para detección de restos no metilados y/o metilados usando ligamiento doble de adaptadores horquillados acoplados. En la Figura 9C el ADN diana bicatenario se digiere con enzima(s) insensibles a la metilación y con enzima(s) sensibles a la metilación para generar productos de digestión que contienen uno o más sitios de endonucleasa de restricción metilados, sin escindir. Como se muestra en esta figura, los adaptadores de oligonucleótido horquillados de la Figura 9B se pueden acoplar entre sí. Los adaptadores de oligonucleótido horquillados acoplados se hibridan y se ligan a sus respectivos productos de gestión como se muestra en la Figura 9C, Etapa 2. Una etapa de PCR opcional usando cebadores universales detecta solamente ADN en el que ambos sitios están sin metilar, o uno o más sitios de restricción metilados, sin escindir estaban presentes en el fragmento (Figura 9C, Etapa 3). Los segundos adaptadores de oligonucleótido horquillados sin ligar se extiende desde su extremo OH en la posición 3' sobre sí mismos hasta que alcanzan el bloqueador de polimerasa (X). Se genera una señal para fragmentos de ADN en los que ambos sitios están sin metilar cuando se escinden con enzima(s) sensibles a metilo, y/o cuando los sitios insensibles a metilo flanquean uno o más sitios de restricción metilados, sin escindir y se usan enzimas tanto sensibles a metilo como insensibles a metilo, generando un extremo específico fosforilado en la posición 5' y un extremo específico en la posición 3' adecuado para ligamiento. La ligasa se muestra como un círculo; la polimerasa como un diamante. La Figura 9D muestra el caso generalizado para fragmentos y a nadie aproximadamente 20-40 bases o aproximadamente 30-150 o más bases. La señal será solamente para fragmentos de ADN en los que ambos sitios están sin metilar cuando se escinden con enzima(s) sensibles metilo, y/o cuando los sitios insensibles a metilo flanquean uno o más sitios de restricción metilados, sin escindir y se usan enzimas tanto sensibles a metilo como insensibles a metilo, generando un extremo específico fosforilado en la posición 5' y un extremo específico en la posición 3' adecuado para ligamiento. La parte izquierda de la Figura 9D muestra el diseño de cebador cuando se genera un fragmento de aproximadamente 20-30 bases. La parte derecha de la Figura 9D muestra el diseño de cebador cuando se genera un fragmento de aproximadamente 30 - 150 o más bases.

Figura 10 muestra cómo combinar la señal de varios sitios de metilación y normalizar la señal con respecto a un gen de control. Puede haber varias dianas y varios genes de control. La señal "M" es del molde totalmente metilado. La señal "Gen A" es del nivel de metilación del gen A. La señal "Gen B" es del nivel de metilación del gen B (control). La señal "U" es del molde sin metilar. $\Delta Ct1$ se usa para calcular el porcentaje de metilación con respecto a un 100 % metilado; $\Delta Ct2$ mide la metilación diferencial entre los dos genes. Como se describe en las Figuras 3 y 4, el uso de una mezcla de cebadores de ligamiento incompetentes para amplificación con cebadores de ligamiento competentes para amplificación a proporciones de 99:1 o 999:1 proporcionará una señal de control que representa un 1 % o un 0,1 %, respectivamente, del molde ADN de entrada total de partida. De este modo, los niveles bajos de ADN metilado en un exceso de ADN sin metilar se pueden cuantificar de forma precisa.

Descripción detallada de la invención

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos metilados. Este método implica una muestra que contiene una o más moléculas de ácido nucleico diana que contienen potencialmente uno o más restos metilados y someter la una o más moléculas de ácido nucleico diana en la muestra a al menos una reacción de digestión enzimática insensible a la metilación y al menos una reacción de digestión enzimática sensible a la metilación para formar una pluralidad de productos de digestión. Se proporciona una pluralidad de adaptadores de oligonucleótido, comprendiendo cada adaptador de oligonucleótido una primera parte específica de cebador y un extremo en la posición 3', siendo configurado dicho extremo en la posición 3' para ligarse a la parte en la posición 5' de un producto de digestión e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 5' de un producto de digestión. Los productos de digestión se someten a una reacción de ligamiento que comprende un tratamiento de desnaturalización para formar productos de digestión monocatenarios, un tratamiento de hibridación, en el que los productos de digestión monocatenarios se hibrida a su región complementaria de los adaptadores de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del adaptador es adyacente al extremo en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, y tratamiento de ligamiento, en el que los adaptadores de oligonucleótido se ligan a sus productos de digestión monocatenarios hibridados formando de ese modo productos de digestión etiquetados con adaptador. El método además implica proporcionar uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario, comprendiendo cada conjunto de cebador de oligonucleótido primario (i) un primer cebador de oligonucleótido primario que tiene una secuencia de nucleótidos que es la misma que la primera parte específica de cebador de los productos de digestión etiquetados con adaptador, y (ii) un segundo cebador de oligonucleótido primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región del

producto de digestión está en la posición 3' de uno o más sitios de restricción metilados, sin escindir, y una segunda parte específica de cebador. La pluralidad de productos de digestión etiquetados con adaptador, el uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario, y una primera polimerasa se combinan para formar una primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa, y la primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación, y un tratamiento de extensión formando de ese modo productos primarios de extensión. Los productos primarios de extensión se detectan y se distinguen, identificando de ese modo la presencia de una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos metilados.

Las Figuras 1B y 2B representan el proceso para detectar una o más moléculas de ácido nucleico diana la que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos metilados usando el proceso de reacción en cadena de endonucleasa de restricción-ligamiento-polimerasa (PCR) de la presente invención. El proceso comienza con la escisión de ADN bicatenario en una muestra usando una o más endonucleasas de restricción insensibles a la metilación y una o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación (Figuras 2B y 2B, etapa 1). Los productos de digestión bicatenarios se desnaturalizan para proporcionar fragmentos de ADN monocatenario que contienen grupos fosfato en la posición 5' únicos adecuados para ligamiento a un oligonucleótido adaptador de una manera específica de secuencia.

Como se usa en el presente documento, una "endonucleasa de restricción insensible a la metilación" es una endonucleasa que escinde una secuencia de reconocimiento de ADN diana en presencia o en ausencia de un resto metilado particular dentro de la secuencia de reconocimiento (es decir, es insensible a la presencia de un resto metilado particular dentro de su secuencia de reconocimiento). En el contexto de la presente solicitud, y para los ejemplos que siguen a continuación, el resto metilado es un 5-metil-C, dentro de la secuencia CpG (es decir, 5-metil-CpG), que a menudo está metilado en muestras clínicas de pacientes. TaqI es un ejemplo de una enzima de restricción insensible a la metilación que extiende la secuencia TCGA si el C es un 5-metil-C. Sin embargo, TaqI no escinde la misma secuencia de reconocimiento si el A es el resto metilado. Un listado no limitante de enzimas endonucleasa de restricción insensibles a metilación que son adecuadas para su uso en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, BsaJI, o cualquier combinación de las mismas.

Como también se usa en el presente documento, "endonucleasa de restricción sensible a la metilación" es una endonucleasa que no distinguirá su secuencia de reconocimiento homóloga en una molécula de ácido nucleico cuando ésta contiene un resto metilado (es decir, es sensible a la presencia de un resto metilado dentro de su secuencia de reconocimiento). Para los ejemplos que siguen a continuación, el resto metilado es un 5-metil-C, dentro de la secuencia de CpG (es decir, 5-metil-CpG). Un listado no limitante de enzimas endonucleasa de restricción sensibles a metilación que son adecuadas para su uso en los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, AclI, HinfI, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI, o cualquier combinación de las mismas.

En la siguiente etapa del proceso acoplado de endonucleasa de restricción-ligamiento-PCR, los adaptadores de oligonucleótido se ligan a los productos de digestión monocatenarios (véanse las Figuras 1B y 2B, Etapa 2). Cada adaptador de oligonucleótido comprende al menos una primera parte específica de cebador, y un extremo en la posición 3' que está configurado para ligarse al extremo en la posición 5' de un producto de digestión y que se hibrida a su complemento. El complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 5' de un producto de digestión. En la realización que se representa en la Figura 1B, el complemento del extremo en la posición 3' acoplado a la región complementaria a la parte en la posición 5' del producto de digestión es un oligonucleótido que contiene uracilo. El oligonucleótido que contiene uracilo pone al extremo en la posición 3' del adaptador de oligonucleótido en una posición adyacente al extremo de fosfato en la posición 5' del producto de digestión y sirve como un molde para facilitar el ligamiento del adaptador de oligonucleótido al producto de digestión para formar productos de digestión etiquetados con adaptador. Después del ligamiento, el oligonucleótido que contiene uracilo se digiere usando, por ejemplo, uracil ADN glicosilasa (Figura 1B, Etapa 3).

En la realización que se representa en la Figura 2B, la primera parte específica de cebador del adaptador de oligonucleótido se acopla al complemento del extremo en la posición 3' del adaptador de oligonucleótido que permite que el adaptador de oligonucleótido forme una horquilla. Como se muestra en la Figura 2B, este adaptador de oligonucleótido horquillado dirige el extremo en la posición 3' del adaptador al extremo de fosfato en la posición 5' de un producto de digestión y sirve como un molde para ligamiento para formar el producto de digestión etiquetado con adaptador. Después del ligamiento, el complemento del extremo en la posición 3' y la región complementaria en la parte en la posición 5' del producto de digestión del adaptador de oligonucleótido horquillado se escinden mediante la actividad de nucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa que se usa en la siguiente etapa de PCR (Figura 2B, Etapa 3).

La reacción de ligamiento usada en los métodos de la presente invención se conoce bien en la técnica. De acuerdo con esto y todos los aspectos de la presente invención, las ligasas adecuadas para ligar adaptadores de oligonucleótido a sus productos de digestión correspondientes incluyen, pero no se limitan a, ligasa de *Thermus aquaticus*, ligasa de *E. coli*, T4 ADN ligasa, T4 ARN ligasa, Taq ligasa, 9 N° ligasa, y ligasa de *Pyrococcus*, o cualquier

otra ligasa termoestable conocida en la técnica.

De acuerdo con éste y todos los aspectos de la presente invención los adaptadores de oligonucleótido y/o los cebadores de oligonucleótido pueden estar en forma de ribonucleótidos, desoxinucleótidos, ribonucleótidos modificados, desoxirribonucleótidos modificados, análogos de nucleótido peptídicos, análogos de nucleótido peptídicos modificados, oligonucleótidos de estructura principal de fosfato-azúcar modificados, análogos de nucleótido, grupos de bloqueo de polimerasa, espaciadores, y mezclas de los mismos.

Después del ligamiento del adaptador de oligonucleótido al extremo la posición 5' de los productos de digestión monocatenarios, los productos de digestión etiquetados con adaptador se amplifican en una etapa de PCR tal como se muestra en la Etapa 4 de la Figura 1B y en la Etapa 3 de la Figura 2B. La PCR se lleva a cabo usando un primer cebador de oligonucleótido que tiene la misma secuencia de nucleótidos que la primera parte específica de cebador del adaptador de oligonucleótido una parte más pequeña de la misma. La primera parte específica de cebador puede ser una parte de cebador universal, es decir, una parte de cebador que es la misma para todos los adaptadores de oligonucleótido independientemente de la molécula de ácido nucleico diana que se va a detectar. De acuerdo con esta realización, el primer cebador de oligonucleótido es un cebador de oligonucleótido universal. El segundo cebador de oligonucleótido es un cebador específico de locus (LSP) etiquetado. Este segundo cebador de oligonucleótido es complementario a una región del producto de digestión que esta situada cadena abajo de uno o más sitios de restricción metilados, sin escindir. El segundo cebador de oligonucleótido también contiene al menos una segunda parte específica de cebador.

En una realización de la presente invención, el primer y/o el segundo cebadores de oligonucleótido de un conjunto de cebadores se diseñan para que contengan un grupo de bloqueo escindible sobre su extremo la posición 3' harán aumentar la amplificación específica de diana. Por ejemplo, los cebadores pueden contener un resto de ribonucleótido individual cerca de su extreman la posición 3' que edita la extensión por polimerasa del cebador. La hibridación del cebador a partes específicas de cebador complementarias en el producto de digestión etiquetado con adaptador forma un sustrato para RNasa H2, que distingue el cebador en la posición 5' a la base de ARN generando de ese modo un resto 3'-OH en el cebador que es capaz de extensión por polimerasa (véase Dobosy *et al.*, "RNase H-dependent PCR (rhPCR): Improved Specificity and Single Nucleotide Polymorphism Detection Using Blocked Cleavable Primers", BMC Biotechnology 11:80 (2011)).

El proceso de reacción en cadena de la polimerasa se conoce bien en la técnica y se describe completamente en H. Erlich, *et al.*, "Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction", Science 252: 1643-50 (1991); M. Innis, *et al.*, PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: New York (1990); y R. Saiki, *et al.*, "Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase", Science 239: 487-91 (1988).

Los productos primarios de extensión que resultan de la etapa de reacción en cadena de la polimerasa contienen la primera parte específica de cebador, el producto de digestión, y una segunda parte específica de segundo cebador. En el presente documento se describen con detalle métodos para detectar los productos primarios de extensión.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos no metilados. Este método implica una muestra que contiene una o más moléculas de ácido nucleico diana que contienen potencialmente uno o más restos no metilados y someter la una o más moléculas de ácido nucleico diana en la muestra a al menos una reacción de digestión enzimática sensible a la metilación para formar una pluralidad de productos de digestión que comprenden uno o más restos no metilados. Se proporciona una pluralidad de adaptadores de oligonucleótido, comprendiendo cada adaptador de oligonucleótido una primera parte específica de cebador y un extremo en la posición 3', siendo configurado dicho extremo la posición 3' para ligarse a una parte en la posición 5' de un producto de digestión e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 5' de un producto de digestión. Los productos de digestión se someten a una reacción de ligamiento que comprenden un tratamiento de desnaturalización para formar productos de digestión monocatenarios, un tratamiento de hibridación, en el que los productos de digestión monocatenarios se hibrida a su región complementaria de los adaptadores de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del adaptador es adyacente al extremo en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, y tratamiento de ligamiento, en el que los adaptadores de oligonucleótido se ligan a sus productos de digestión monocatenarios hibridados formando de ese modo productos de digestión etiquetados con adaptador. El método además implica proporcionar uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario, comprendiendo cada conjunto de cebador de oligonucleótido primario (i) un primer cebador de oligonucleótido primario que comprende la secuencia de nucleótidos que es la misma que la primera parte específica de cebador de los productos de digestión etiquetados con adaptador y (ii) un segundo cebador de oligonucleótido primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región del producto de digestión, y una segunda parte específica de cebador. La pluralidad de productos de digestión etiquetados con adaptador, el uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario, y una primera polimerasa se combinan para formar una primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa, y la primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación, y un tratamiento de extensión formando de ese modo productos

primarios de extensión. Los productos primarios de extensión se detectan y se distinguen, identificando de ese modo la presencia de una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos no metilados.

5 Las Figuras 1A y 2A representan el proceso de detección de una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos no metilados usando el proceso acoplado de endonucleasa de restricción-ligamiento-PCR de la presente invención. La primera etapa de este proceso comienza mediante la escisión de ADN bicatenario en una muestra usando solo una o más endonucleasas de restricción sensibles a la metilación (Figuras 1A y 2A, etapa 1). Las endonucleasas de restricción sensibles a la metilación adecuadas se han descrito anteriormente. Los productos de digestión bicatenario los resultantes contienen restos no metilados en el sitio de endonucleasa de restricción en el extremo la posición 5' del producto de digestión. Los productos de digestión bicatenarios se desnaturalizan fragmentos de ADN monocatenario que contienen grupos fosfato en la posición 5' únicos adecuados para ligamiento a un oligonucleótido adaptador de una manera específica de secuencia.

15 En la siguiente etapa del proceso acoplado de endonucleasa de restricción-ligamiento-PCR, los adaptadores de oligonucleótido se ligan a los productos de digestión monocatenarios. Los adaptadores de oligonucleótido representados en la Figura 1A (Etapa 2), son similares a los adaptadores de oligonucleótido que se han descrito anteriormente en referencia a la Figura 1B, es decir, comprenden un oligonucleótido que contiene uracilo que dirige el ligamiento del extremo en la posición 3' del adaptador de oligonucleótido al extremo de fosfato en la posición 5' del producto de digestión. Como se ha indicado anteriormente, el oligonucleótido que contiene uracilo posteriormente se destruye mediante tratamiento con uracil ADN glicosilasa (Figura 1 A, Etapa 3). De forma alternativa, como se representa en la Figura 2A, Etapa 2, la primera parte específica de cebador del adaptador de oligonucleótido se acopla al complemento del extremo en la posición 3' del adaptador de oligonucleótido que permite la formación de horquilla. Como se ha descrito anteriormente en referencia a la Figura 2B, este adaptador de oligonucleótido horquillado dirige el es más del extremo en la posición 3' del adaptador al extremo la posición 5' del producto de digestión.

20 Después del ligamiento del adaptador de oligonucleótido a los productos de digestión monocatenarios, los productos de digestión etiquetados con adaptador se amplifican en una etapa de PCR como se muestra en la Etapa 4 de la Figura 1A y en la Etapa 3 de la Figura 2A. La PCR se lleva a cabo usando un primer cebador de oligonucleótido que tiene la misma secuencia de nucleótidos que la primera parte específica de cebador del adaptador de oligonucleótido una parte más pequeña del mismo. El primer cebador de oligonucleótido puede ser un cebador de oligonucleótido universal. El segundo cebador de oligonucleótido es un LSP etiquetado que es complementario a una región del producto de digestión y también contiene una segunda parte específica de cebador. Como se ha descrito anteriormente, uno o ambos de los cebadores de oligonucleótido usados en la PCR se puede diseñar para que contenga un grupo de bloqueo en la posición 3', por ejemplo, un resto de ARN, que bloquean la extensión con polimerasa. Solo cuando el cebador(s) se indica a su secuencia complementaria en los productos de digestión etiquetados con adaptador se escindirán el grupo de bloqueo en la posición 3' (por ejemplo, mediante RNasa H2), generando de ser un resto OH en la posición 3' capaz de extensión con polimerasa (véase Dobosy *et al.*, "RNase H-dependent PCR (rhPCR): Improved Specificity and Single Nucleotide Polymorphism Detection Using Blocked Cleavable Primers", BMC Biotechnology 11: 80 (2011)).

45 Los productos primarios de extensión que resultan de la etapa de reacción en cadena de la polimerasa contienen la primera parte específica de cebador, el producto de digestión, y una segunda parte específica que cebador. Los productos primarios de extensión se detectan y se distinguen, identificando de ese modo la presencia de una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos no metilados.

50 Los procesos que se describen en las Figuras 1A y 1B incluyen las mismas cuatro etapas: (i) restricción de ADN bicatenario para generar grupos fosfato en la posición 5' únicos, (ii) ligamiento de adaptadores de oligonucleótido a los extremos en la posición 5' de los productos de digestión únicamente generados, (iii) retirada de la hebra molde, por ejemplo mediante digestión con UDG de oligonucleótidos que contienen uracilo, y (iv) uso de cebadores específicos de locus y universales para amplificar PCR productos adecuados para posterior detección y cuantificación. Como tal, los dos procesos se pueden llevar a cabo en la misma muestra de forma simultánea, permitiendo una identificación y cuantificación precisas de dianas tanto de metilación como de no metilación de baja abundancia en la misma reacción. Del mismo modo, los procesos que se describen en las Figuras 2A y 2B incluyen las mismas tres etapas: (i) restricción de ADN bicatenario para generar grupos fosfato en la posición 5' únicos, (ii) ligamiento de adaptadores de oligonucleótido al extremo la posición 5' de productos de digestión únicamente generados, y (iii) uso de cebadores específicos de locus y universales para amplificar PCR productos adecuados para posterior detección y cuantificación. Como tal, los dos procesos se pueden llevar a cabo en la misma muestra de forma simultánea, permitiendo una identificación y cuantificación precisas de dianas tanto de metilación como de no metilación de baja abundancia en la misma reacción.

65 Las Figuras 3 y 4 demuestra cómo se puede usar una región conocida de una molécula de ácido nucleico como control positivo en la misma mezcla de reacción que se muestra en las Figuras 1 y 2, para proporcionar una señal de control equivalente a la presencia de un 1 % de ADN metilado o no metilado. Los adaptadores y cebadores de oligonucleótido

generalmente son diferentes a los usados en los métodos que se representan en las Figuras 1 y 2. Por lo tanto, el ADN de control se detecta en la misma reacción como diana metilada/no metilada, pero usando una etiqueta de detección diferente, por ejemplo, un colorante fluorescente. Como se representa en la Figura 3, después de la desnaturalización de los productos de digestión de control bicatenarios, uno de todos adaptadores de oligonucleótido que contienen uracilo se ligan al molde monocatenario. Como se representa en la Figura 4, después de la desnaturalización de los productos de digestión de control bicatenarios, uno de dos adaptadores de oligonucleótido horquillados se ligan al molde monocatenario. En ambos ejemplos, uno de los adaptadores de oligonucleótido contiene una primera parte específica de cebador, u otra etiqueta detectable, y el segundo adaptador de oligonucleótido no contiene la primera parte específica de cebador o etiqueta detectable. Los dos adaptadores de oligonucleótido se proporcionan como una mezcla en una proporción conocida, por ejemplo, 1:99 o 1:999, respectivamente. Tanto el adaptador de oligonucleótido que contiene uracilo (Figura 3) como el adaptador de oligonucleótido horquillado (Figura 4) son adecuados para su uso en una reacción de control. La PCR se lleva a cabo usando cebador de control específico de locus etiquetado (LSCP) y control de cebador universal (U1Pc) que etiqueta de forma específica el ADN de control. Como resultado de la proporción de adaptadores de oligonucleótido etiquetados con respecto a etiquetados proporcionada, un 99 % o un 99,9 % del ADN se liga a adaptador de oligonucleótido no amplificante (no etiquetado) y solamente un 1 % o un 0,1 % del ADN genómico se liga a un adaptador de oligonucleótido que se puede amplificar y/o detectar. La señal generada a partir de la reacción de controles equivalente a la señal que se podría generar a partir de una molécula de ácido nucleico diana metilada o no metilada presente en un 1 % o un 0,1 % de la muestra de ADN.

Los productos primarios de extensión de la presente invención se pueden detectar usando varios métodos de detección conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, de la presente invención, uno del primer o segundo cebadores de oligonucleótido de un conjunto de cebadores usado en la etapa de PCR primaria (es decir, la Etapa 4 en las Figuras 1A-1B y la Etapa 3 en las Figuras 2A-2B) contiene una etiqueta detectable. Cuando el primer cebador de oligonucleótido es cebador universal, el marcador detectable se acopla preferentemente al segundo cebador de oligonucleótido para conseguir la detección específica de la diana. En la técnica se conoce una amplia variedad de marcadores detectables. Los colorantes fluorescentes son particularmente adecuados para detectar y cuantificar productos de PCR. Los colorantes fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, FAM, TET, JOE, VIC, HEX, CY3, TAMRA, Rojo Texas, CY5, ROX.

En otra realización de la presente invención, tanto la primera como la segunda partes específicas de cebador de los productos primarios de extensión tienen secuencias de cebador universal que permiten una amplificación universal posterior de todos los productos primarios de extensión formados en un solo conjunto de condiciones. Esto es particularmente útil cuando se detectan moléculas de nucleótidos diana de baja abundancia. Por lo tanto, después de la formación del producto primario de extensión, se lleva a cabo una amplificación por PCR universal para amplificar proporcionalmente todos los productos de extensión en la muestra. De acuerdo con esta realización, los adaptadores de oligonucleótido y/o el segundo cebador de oligonucleótido del conjunto de cebadores de oligonucleótido primario están diseñados para contener una o más partes específicas de cebador específicas de diana u otras partes de detección (por ejemplo, parte de código de cremallera o parte de Unitaq) como se describe a continuación para facilitar la detección y/o la cuantificación.

En una realización de la presente invención, la detección de los productos primarios de extensión es facilitada por una parte de código de cremallera. De acuerdo con esta realización, el adaptador de oligonucleótido o el segundo cebador de oligonucleótido del conjunto de cebadores primario además comprende una parte de código de cremallera. Como se usa en el presente documento, un código de cremallera es una secuencia de nucleótidos corta, por ejemplo, de 16 a 24 nucleótidos de longitud, que no tiene identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos diana, y preferentemente, poca o ninguna secuencia se identifica con ninguna secuencia de nucleótidos genómica. En una colección de códigos de cremallera, cada secuencia del código de cremallera se diferencia de la secuencia de otros códigos de cremallera en la colección en al menos un 25 %, sin embargo, todos los códigos de cremallera de una colección están diseñados para tener temperaturas de fusión similares con el fin de facilitar la hibridación a oligonucleótidos de captura complementarios en condiciones de hibridación uniformes con poca o ninguna hibridación inespecífica a secuencias de oligonucleótidos no capturados. En una realización de la presente invención, la parte del código de cremallera se usa para identificar y distinguir diferentes productos primarios de extensión en una muestra, por lo tanto, la parte del código de cremallera para cada producto primario de extensión diferente tiene una secuencia de nucleótidos diferente. En una realización alternativa, en la que el objetivo es simplemente detectar la presencia o ausencia de uno o más restos metilados o no metilados en una región genómica particular, pero la identidad del restos metilado o no metilado particular dentro de esa región no es crítica, la misma parte del código de cremallera se puede usar para detectar diferentes productos primarios de extensión. En cualquier realización, la incorporación de un código de cremallera en el adaptador de oligonucleótido o el segundo cebador de oligonucleótido del conjunto de cebadores primario permite la detección altamente multiplexada de varias secuencias diana de forma simultánea. Los métodos de diseño de colecciones de secuencias de código de cremallera y sus secuencias de oligonucleótidos de captura complementarios se describen en detalle en los documentos de Patente de Estados Unidos N.^{os} 6.852.487, 7.455.965 y 6.506.594, todas de Barany *et al.*

La detección usando el código de cremallera se puede llevar a cabo usando la detección tradicional Taqman[™] (véase la Patente de Estados Unidos N.^o 6.270.967 de Whitcombe *et al.*, y la Patente de Estados Unidos N.^o 7.601.821 de

Anderson *et al.*). De acuerdo con esta realización, el adaptador de oligonucleótido o el segundo cebador de oligonucleótido del conjunto primario de cebadores contiene una parte del código de cremallera de manera que el producto primario de extensión resultante contiene una parte del código de cremallera. Se proporciona una colección de oligonucleótidos de captura, en la que cada oligonucleótido de captura comprende una molécula de desactivación y una etiqueta detectable que están separadas entre sí (es decir, la sonda Taqman™). La molécula de desactivación y la etiqueta detectable están lo suficientemente cerca como para que la molécula de desactivación inactive cualquier señal de la etiqueta detectable.

10 En un enfoque, la colección de oligonucleótidos de captura se añade a la primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa (es decir, la Etapa 4 de las Figuras 1A-1B y la Etapa 3 de las Figuras 2A-2B). De acuerdo con este enfoque, el adaptador de oligonucleótido contiene la parte de código de cremallera de manera que el producto de digestión etiquetado con el adaptador resultante también contiene el código de cremallera. Durante el tratamiento de hibridación de cada ciclo de PCR, los oligonucleótidos de captura de la colección se hibridan a sus partes complementarias de código de cremallera del producto de digestión etiquetado con adaptador o sus complementos. Durante el tratamiento de extensión de cada ciclo de PCR, el cebador secundario extiende y escinde la molécula inhibidora y/o el marcador detectable de los oligonucleótidos de captura hibridados y la molécula de ácido nucleico diana se detecta después de la separación de la etiqueta detectable de la molécula inhibidora.

20 En otro enfoque, los productos primarios de extensión se detectan por hibridación y escisión de las sondas de oligonucleótidos de captura después de la etapa de PCR inicial mostrada en la Etapa 4 de las Figuras 1A e 1B y la Etapa 3 de las Figuras 2A y 2B. Este enfoque, que se muestra en la Figura 5, es particularmente adecuado cuando se detectan secuencias de ácido nucleico diana de baja abundancia. En este enfoque, la colección de oligonucleótidos de captura, cada uno de los cuales comprende una molécula inhibidora y una etiqueta detectable que están muy cerca pero separadas entre sí, se proporciona junto con un conjunto de cebadores de oligonucleótidos secundarios que es capaz de hibridarse a los productos primarios de extensión. Los oligonucleótidos de captura, los cebadores de oligonucleótido secundarios y una polimerasa se mezclan con los productos primarios de extensión para formar una segunda reacción de PCR. Durante el tratamiento de hibridación de la segunda reacción de PCR, los oligonucleótidos de captura se hibridan a partes complementarias de código de cremallera de los productos primarios de extensión, y los cebadores de oligonucleótido secundarios se hibridan a regiones complementarias de los productos primarios de extensión. Durante el tratamiento de extensión de cada ciclo de PCR, el cebador secundario extiende y escinde la molécula inhibidora y/o la etiqueta detectable de un oligonucleótido de captura hibridado. La molécula de ácido nucleico diana se detecta después de la separación de la etiqueta detectable de la molécula inhibidora.

35 Además en otro enfoque, los productos primarios de extensión pueden incluir además una o más secuencias únicas (que varían de 0 a 10 bases) internas a la primera y segunda partes de cebador (es decir, Ai Única, Bi Única), representadas como sigue a continuación.

Parte de Cebador 1- Ai Única- Zi de código de cremallera - ADN Diana - Bi Única - Parte de Cebador 2

40 Estas secuencias únicas se introducen en los productos primarios de extensión mediante el adaptador de oligonucleótido y el segundo cebador de oligonucleótido del conjunto primario de cebadores. Para detección usando ensayos de Taqman de código de cremallera, después de los 8-20 ciclos de amplificación universal, la muestra se podría diluir de 10 a 100 veces y se podrían añadir cebadores únicos que se superpusieran con la secuencia Ai Única y Bi Única para cada producto. La sonda Taqman podría ser un oligonucleótido de captura que sea complementario a la secuencia del código de cremallera.

Otro enfoque de detección que usa códigos de cremallera implica que la parte de código de cremallera se divida en dos partes dentro del producto de digestión etiquetado con el adaptador resultante. Las partes divididas de código de cremallera se acercan entre sí usando una región corta de secuencia complementaria en ambos lados de las partes divididas. En particular, el primer adaptador de oligonucleótido comprende una primera parte del código de cremallera y una primera parte de etiqueta que está en la posición 3' con respecto a la primera parte de código de cremallera, y el segundo cebador de oligonucleótido del conjunto de cebador de oligonucleótido primario comprende una segunda parte del código de cremallera y una segunda parte de etiqueta que está en la posición 5' con respecto a la segunda parte de código de cremallera. La primera y segunda partes de etiqueta de un producto primario de extensión son complementarias entre sí, y preferentemente tienen una longitud de aproximadamente 5 a 8 bases. Cuando las dos etiquetas están en la misma cadena única de un producto de extensión, la hibridación entre las dos etiquetas permite la formación transitoria de horquilla del producto de extensión. La horquilla se estabiliza hibridando ambas mitades de la secuencia del código de cremallera, que se acercan entre sí como resultado de la hibridación de la etiqueta, a un oligonucleótido de captura complementario de longitud completa.

La Figura 6 muestra un ejemplo de detección de horquilla de código de cremallera de división con Taqman universal. En esta figura, y de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, el primer adaptador de oligonucleótido comprende una primera parte específica de cebador (representada en la Figura 6 como U1 y A1), una primera parte del código de cremallera (Z1.T), y una primera parte de etiqueta (T1) que está en la posición 3' con respecto a la primera parte de código de cremallera. El segundo cebador de oligonucleótido del conjunto de cebador de

oligonucleótido primario comprende una segunda parte del código de cremallera (Z1.2'), una segunda parte de etiqueta (T1') que está en la posición 5' con respecto a la segunda parte de código de cremallera, y la segunda parte específica de cebador (B1-U2). Los productos primarios de extensión resultantes tal como se muestra en la etapa 1 de la Figura 6, contienen la (i) primera parte específica de cebador, U1-A1, en la que U1 es una parte específica de cebador universal y A1 es una parte de cebador único, específico de producto, (ii) la primera parte de código de cremallera (Z1.T), (iii) la primera parte de etiqueta (T1), (iv) la parte de producto de digestión, (v) la segunda parte de etiqueta (T1'), (vi) la segunda parte del código de cremallera (Z1.2'), y (vii) la segunda parte específica de cebador, B1-U2, en la que B1 es una parte de cebador único, específico de producto y U2 es una parte de cebador universal.

5
10
15

Como se muestra en la Figura 6, Etapa 1, las secuencias únicas A1 y B1 sirven para facilitar una amplificación por PCR específica de producto de la secuencia del producto primario de extensión cuando los cebadores de PCR que se usan se extienden a las partes de cebador universal y a las partes A1 y B1, respectivamente. Esta amplificación por PCR específica de diana puede ir precedida opcionalmente por una reacción de amplificación por PCR universal usando cebadores que se hibridan a las partes específicas de cebador universal en las posiciones 5' y 3' (es decir, U1 y U2). Una primera reacción de amplificación universal es particularmente adecuada cuando se detectan secuencias de ácido nucleico diana de baja abundancia en una muestra.

20
25
30
35

Siguiendo la amplificación por PCR específica de diana de los productos de extensión primarios (Figura 6, Etapa 1), los productos de ADN bicatenario se desnaturalizan (Figura 6, Etapa 2). A medida que disminuye la temperatura, la primera y la segunda partes de etiqueta (T1 y T1') en una cadena se hibridan de forma transitoria, llevando la primera porción de la secuencia del código de cremallera (Z1.T del adaptador de oligonucleótido) cerca de la segunda secuencia de código de cremallera (Z1.2' del segundo cebador de oligonucleótido). La hibridación transitoria entre T1 y T1' se estabiliza mediante la hibridación simultánea de un oligonucleótido de captura etiquetado (Z1) que es complementario a las secuencias de código de cremallera de separación (Figura 6, Etapa 3) colocadas de forma adyacente. En una realización, el oligonucleótido de captura tiene una molécula inhibidora (Q) y una etiqueta detectable (F) que están separadas entre sí, en el que la etiqueta detectable se inhibe cuando está cerca de la molécula inhibidora. La señal se genera por la actividad nucleasa en la posición 5' de una polimerasa a medida que extiende un cebador (es decir, el "cebador de digestión") que está unido a la parte universal específica del cebador (U2), la parte B1 única, o una combinación de las mismas y escinde el oligonucleótido de captura hibridado. La extensión del cebador corta el marcador detectable del oligonucleótido de captura que libera el marcador detectable de la molécula inhibidora, lo que permite la detección (Figura 6, Etapa 4). Tan pronto como la polimerasa ha atravesado Z1.2', el tallo corto entre Z1.2' y Z1.1' se separa y la polimerasa continúa extendiéndose para crear un producto de ADNds. En la técnica se conoce una amplia variedad de marcadores detectables, es decir, colorantes fluorescentes y están disponibles en el mercado, por ejemplo, FAM, TET, JOE, VIC, HEX, CY3, TAMRA, Rojo Texas, CY5, ROX. Del mismo modo, las moléculas inhibitoras, por ejemplo, MGB-NFQ, BHQ-[0123], inhibidor ZEN de IDT, también son conocidas por las personas con experiencia en la materia.

40
45
50

La Figura 7 muestra otro ejemplo de detección de horquilla de código de cremallera separada. En esta figura, los productos primarios de extensión se forman usando adaptadores de oligonucleótido que tienen una primera parte específica de cebador (U 1 and A1), una primera parte del código de cremallera (Z1.1') y una primera parte de etiqueta (T1) que está en la posición 3' con respecto a la primera parte de código de cremallera. El segundo cebador de oligonucleótido del conjunto de cebador de oligonucleótido primario comprende una segunda parte del código de cremallera (Z1.2'), una segunda parte de etiqueta (T1') que está en la posición 5' con respecto a la segunda parte de código de cremallera, y la segunda parte específica de cebador (U2). Los productos primarios de extensión resultantes tal como se muestra en la etapa 1 de la Figura 7, contienen la (i) primera parte específica de cebador, U1-A1, en la que U1 es una parte específica de cebador universal y A1 es una parte de cebador único, específico de producto (es decir, una parte de tercer cebador), (ii) la primera parte de código de cremallera (Z1.1'), (iii) la primera parte de etiqueta (T1), (iv) la parte de producto de digestión, (v) la segunda parte de etiqueta (T1'), (vi) la segunda parte del código de cremallera (Z1.2'), y (vii) la segunda parte específica de cebador (U2).

55
60
65

En la Etapa 1 de la Figura 7, los productos primarios de extensión opcionalmente se amplifican inicialmente usando un conjunto de cebadores de oligonucleótido universal que se unen a las partes de cebador U1 y U2 de los productos primarios de extensión. Los productos primarios de extensión amplificados formados a partir de esta etapa de PCR universal están sujetos a una etapa secundaria de PCR (Figura 7, etapa 2) usando un conjunto de cebadores secundarios que incluye un primer cebador de oligonucleótido secundario que tiene (i) una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción de cebador A1 (A1), (ii) una parte de oligonucleótido de captura (Z1) que es complementaria a la primera y segunda partes de código de cremallera ubicadas adyacentes a un producto de extensión (es decir, Z1.1' y Z1.2'), (iii) una molécula de inhibición (Q) y una etiqueta detectable (F) que están separadas por dicha parte de oligonucleótido de captura. El segundo cebador de oligonucleótido secundario (U2) del conjunto de cebadores tiene la misma secuencia de nucleótidos que la segunda parte específica de cebador del segundo cebador de oligonucleótido primario. La molécula de inhibición del primer cebador secundario puede servir como un bloqueador de polimerasa para bloquear la extensión de polimerasa de su cadena complementaria. De forma alternativa, un bloqueador de polimerasa tal como HEG (hexetilenglicol), THF (tetrahidrofurano), Sp-18, o cualquier otro bloqueador conocido en la técnica que sea suficiente para detener la extensión de polimerasa se puede colocar próximo al resto de inhibidor. Los productos de ADN bicatenario resultantes (que se muestran en la Figura 7, Etapa 3) se desnaturalizan, y la temperatura se disminuye para permitir la formación de horquilla doble con tallos entre Z1.1' y

Z1.2' (tallo formado por hibridación entre T1 y T1') y entre la parte de captura de oligonucleótidos (Z1) y Z1.17Z1.2' (Figura 7, Etapa 4). La señal es generada por la actividad nucleasa en la posición 5' de la polimerasa cuando extiende un "cebador de digestión" complementario a la parte en la posición 5' universal específica del cebador. La extensión del cebador corta el marcador detectable (F) o la molécula inhibidora (Q) del oligonucleótido de captura que libera el
 5 marcador detectable (F) de la molécula inhibidora (Q), lo que permite la detección (Figura 7, Etapa 5). Tan pronto como la polimerasa ha atravesado Z1.2', el tallo corto entre Z1.2' y Z1.1' se disgrega y la polimerasa continúa extendiéndose hasta que llega al bloqueador de polimerasa para crear un producto de ADNds similar al de la etapa 1.

Un enfoque alternativo para usar las secuencias de código de cremallera/oligonucleótido de captura para la detección de los productos metilados o no metilados formados usando el proceso de endonucleasa de restricción-ligamiento-PCR de la presente invención implica el enfoque de UniTaq. El sistema UniTaq se describe completamente en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2011/0212846 de Spier. El sistema UniTaq implica el uso de dos a tres secuencias de "etiqueta" únicas cortas (1-10 nucleótidos), en el que al menos una de las secuencias de etiqueta únicas (Ai) está presente en el adaptador de oligonucleótido, y la segunda y tercera partes de etiqueta únicas (Bi y Ci) están en el segundo cebador de oligonucleótido del conjunto de cebadores de oligonucleótido primario. Los productos primarios de extensión resultantes contienen la secuencia Ai- secuencias de producto de digestión-secuencia Bi-secuencia Ci. La esencia del enfoque de UniTaq es que una señal detectable solo se detecta cuando el adaptador de oligonucleótido se liga correctamente a su producto de digestión correspondiente de una manera específica de secuencia y el segundo cebador de oligonucleótido del cebador de oligonucleótido primario se hibrida
 10 correctamente con su producto de digestión etiquetado con adaptador correspondiente.

En una realización de la presente invención, las partes de etiqueta de UniTaq de un adaptador de oligonucleótido y el segundo cebador de oligonucleótido se usan para identificar y distinguir productos primarios de extensión individuales formados en una muestra. De acuerdo con esta realización, las partes de UniTaq para cada producto primario de extensión diferente son diferentes. En una realización alternativa, las mismas partes de etiqueta de UniTaq se pueden
 15 usar para detectar diferentes productos de ligamiento.

Las Figuras 8A-8C muestran varias formas en las que se puede incorporar el sistema de etiqueta de UniTaq en el proceso de restricción de endonucleasa-ligamiento-PCR de la presente invención. En el primer enfoque, que se muestra en la Figura 8A, el producto primario de extensión contiene una primera parte específica de cebador, U1-Ai, en la que U1 es una parte específica de cebador universal y Ai es una parte única de cebador específico de producto UniTaq. El producto primario de extensión también contiene B'i (una parte de detección de UniTaq) y Ci (una segunda parte específica de cebador), que se introducen en los productos primarios de extensión a través del segundo cebador de oligonucleótido del conjunto primario de cebadores. Los productos primarios de extensión se ceban en ambas cadenas usando un conjunto de cebadores de oligonucleótido secundarios que comprende un primer cebador de oligonucleótido secundario que tiene la misma secuencia de nucleótidos que Ai, y un segundo cebador de oligonucleótido que es complementario a C'i (es decir, Ci). El primer cebador de oligonucleótido secundario también incluye una sonda de detección de UniTaq (Bi) que tiene una etiqueta detectable D1 en un extremo y una molécula inhibidora (Q) en el otro extremo (D1-Bi-Q-Ai). Opcionalmente una unidad de bloqueo de polimerasa se encuentra situada proximal a la molécula inhibidora, por ejemplo, HEG, THF, Sp-18, o cualquier otro bloqueador conocido en la técnica que sea suficiente para parar la extensión con polimerasa. Un bloqueador de polimerasa puede no ser necesario si la cola en la posición 5' se pliegan un tallo que tiene una o más bases en el extremo la posición 5' que no son complementarias a la secuencia de etiqueta universal en la parte media, de modo que la horquilla formada mediante la hebra de ADN opuesta (con el extremo en la posición 3' al final del tallo) no se puede extender durante la PCR. También se puede diseñar una horquilla pequeña en la parte en la posición 5' del primer cebador secundario, de modo que el colorante y la molécula inhibidora se ponen en conjunto más cerca, al del mismo modo que los cebadores y sondas "Sunrise" para mejorar la inactivación y disminución de la fluorescencia de fondo. Por ejemplo, véase los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.866.336 y 6.270.967.
 20 30 35 40 45

La amplificación por PCR usando el segundo conjunto de cebadores de oligonucleótido genera el producto bicatenario que se muestra en la Figura 8A, etapa 2. En este ejemplo, una unidad de bloqueo de polimerasa evita que una polimerasa copie la parte en la posición 5' (Bi) del primer cebador universal, de modo que la hebra complementaria (es decir, la hebra inferior) del producto no puede formar una horquilla cuando se vuelve monocatenaria. La formación de una horquilla de este tipo podría dar como resultado que el extremo en la posición 3' del tallo se hibridara con el amplicón de modo tal que la extensión de polimerasa de este extremo en la posición 3' podría terminar la reacción de PCR.
 50 55

Los productos de PCR bicatenarios se fusionan (por ejemplo, aumentando la temperatura a aproximadamente 95 °C) para separar la hebra superior de la hebra inferior, y cuando la temperatura se reduce posteriormente, la hebra superior del producto forma una horquilla que tiene un tallo entre la parte en la posición 5' (Bi) del primer cebador de oligonucleótido secundario y la parte B'i en el extremo opuesto de la hebra (Figura 8A, etapa 3). También durante esta etapa, el segundo cebador de oligonucleótido (Ci) se une a la parte específica del cebador en la posición 5' (C'i). La formación de horquillas intramoleculares se produce rápidamente y es impulsada por la termodinámica: la energía libre está determinada por la longitud del tallo, el contenido de GC y la longitud del bucle. Es importante que la temperatura de fusión (Tm) de la horquilla sea significativamente mayor (por ejemplo, aproximadamente 10 °C o más elevada) que la Tm del segundo cebador de oligonucleótido. De esta manera, cuando la temperatura disminuye, casi
 60 65

un 100 % de las moléculas formarán la horquilla antes de que el segundo cebador de oligonucleótido se hibride y se extienda. Después de la extensión del segundo cebador secundario en la etapa 4, la actividad de nucleasa en la posición 5' de la polimerasa escinde el marcador detectable (D1) o la molécula inhibidora (Q) del extremo de la posición 5' del amplicón, aumentando de ese modo la distancia entre el marcador y la molécula inhibidora o colorante FRET y permitiendo la detección de la etiqueta.

En el enfoque que se muestra en la Figura 8B, se usa un ensayo de tipo Taqman™ tradicional para detectar el producto de ligamiento. Este método implica proporcionar una sonda de detección UniTaq (Bi) que sea complementaria a la parte de detección UniTaq (B'i). La sonda de detección UniTaq comprende una molécula de inactivación (Q) y una etiqueta detectable (D1) que están separadas entre sí. La sonda de detección UniTaq (Bi) se hibrida con su parte de detección UniTaq complementaria en el producto de extensión al mismo tiempo que el segundo cebador de oligonucleótido (Ci) se hibrida con la parte específica C'i de cebador en la posición 5' del producto primario de extensión durante una reacción de PCR secundaria. La extensión del segundo cebador de oligonucleótido (Ci) genera una señal mediante la escisión por exonucleasa en la posición 5' de D1, separando D1 de la molécula de inhibición.

Un formato de detección a modo de ejemplo adicional implica la formación de un círculo universal como se ilustra esquemáticamente en la Figura 8C. Como se ha indicado anteriormente, el producto primario de extensión en la Figura 8C contiene una primera parte específica de cebador (Ai), una parte de producto de digestión específica de diana, una parte de detección UniTaq (B'i), y una segunda parte específica de cebador (C'i). El producto de extensión se amplifica usando un cebador de oligonucleótido (Ai) que tiene la misma secuencia de nucleótidos que la parte específica del cebador Ai del producto de extensión, y un segundo cebador de oligonucleótido que incluye (i) una parte de cebador (Ci) que es complementaria a la parte específica de cebador en la posición 5' C'i de un producto de extensión, (ii) una región espaciadora que contiene un bloqueador de polimerasa (x), (iii) una molécula inhibidora (Q), (iv) una sonda de detección UniTaq (Bi), y (v) una etiqueta detectable (DI) que se inhibe cuando está cerca de la molécula inhibidora. Durante una reacción de PCR que usa estos cebadores, la parte del cebador del segundo cebador de oligonucleótido (Ci) se une a su parte específica del cebador correspondiente del producto de extensión mientras que la sonda de detección UniTaq (Bi) se hibrida con su parte de detección complementaria UniTaq del producto de extensión (Figura 8C, Etapa 1). En este ejemplo, la extensión del segundo cebador de oligonucleótido (Figura 8C, Etapa 2) escinde la sonda de detección UniTaq hibridada (Bi) liberando de ese modo el marcador detectable. La liberación de la etiqueta detectable de la molécula de desactivación genera una señal detectable.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para identificar, en una más, una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos no metilados. Este método implica una muestra que contiene una o más moléculas de ácido nucleico diana que contienen potencialmente uno o más restos no metilados y que someter la una o más moléculas de ácido nucleico diana en la muestra a una digestión enzimática sensible a la metilación que digiere moléculas de ácido nucleico sin metilar, pero no metiladas para formar una pluralidad de productos de digestión que comprende uno o más restos no metilados. Se proporciona una pluralidad de conjuntos de adaptadores de oligonucleótido, comprendiendo cada conjunto de adaptadores de oligonucleótido (a) un primer adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 3' configurado para ligarse a un extremo en la posición 5' de un producto de digestión e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 5' de un producto de digestión y (b) un segundo adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 5' configurado para ligarse a un extremo en la posición 3' de un producto de digestión e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 5' está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 3' de un producto de digestión. Los productos de digestión se someten a una reacción de ligamiento que comprenden un tratamiento de desnaturalización para formar productos de digestión monocatenarios, un tratamiento de hibridación, en el que los productos de digestión monocatenarios se hibrida a sus regiones complementarias del primer y el segundo adaptadores de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del primer adaptador es adyacente al extremo en la posición 5' del producto de digestión monocatenario y el extremo la posición 5' del segundo adaptador es adyacente al extremo en la posición 3' del producto de digestión monocatenario, y un tratamiento de ligamiento en el que los adaptadores de oligonucleótido se ligan a sus productos de digestión monocatenarios hibridados formando de ese modo productos de digestión etiquetados con adaptador doble. Los productos de digestión etiquetados con adaptador doble se detectan, identificando de ese modo una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos no metilados.

Las Figuras 9A-9B dos realizaciones de este aspecto de la presente invención. Como se muestra en la Figura 9A (etapa 1), el ADN diana bicatenario se escinde mediante enzima(s) de restricción sensibles a la metilación (por ejemplo, HinP1I) para producir productos de digestión no metilados (es decir, los sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción en el extremo en las posiciones 5' y 3' de los productos de digestión no están metilados). Las enzimas de restricción sensibles a la ventilación adecuadas se han desvelado anteriormente. Los fragmentos digeridos de ADNds se desnaturalizan, generando productos de digestión monocatenarios que tienen un PO₄ único en la posición 5' competente para ligamiento así como un OH en la posición 3' competente para ligamiento único que son adecuados para ligamiento al primer y segundo adaptadores de oligonucleótido, respectivamente. El ADN monocatenario que está presente en la muestra no se digiere con las enzimas de restricción sensibles a la metilación y no generarán extremos de ese tipo competentes para ligamiento de fosfato en la posición 5' u OH en la posición 3'.

Se añade una pluralidad de conjuntos de adaptadores de oligonucleótido, comprendiendo cada conjunto de adaptadores de oligonucleótido un primer adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 3' configurado para ligarse a un extremo en la posición 5' de un producto de digestión, en el que el extremo en la posición 3' se hibrida a su complemento. El complemento del extremo en la posición 3' del primer adaptador de oligonucleótido está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 5' del producto de digestión. El segundo adaptador de oligonucleótidos de un conjunto de adaptadores tiene un extremo en la posición 5' configurado para ligarse a un extremo en la posición 3' de un producto de digestión y se impide a su complemento. El complemento del extremo en la posición 5' del segundo adaptador de oligonucleótido está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 3' de un producto de digestión. Como se muestra en la Figura 9A, el complemento del extremo en la posición 3' del primer adaptador que está acoplado a la región complementaria a una parte en la posición 5' del producto de digestión y/o el complemento del extremo en la posición 5' del segundo adaptador que está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 3' del producto de digestión comprenden oligonucleótidos que contienen uracilo. Los productos de digestión monocatenarios que surgen a partir de la ingestión con endonucleasa de restricción sensible a la metilación se hibridan a regiones complementarias de los primeros adaptadores de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del primer adaptador es adyacente al extremo fosforilado en la posición 5' del producto de digestión monocatenario (Figura 9A, Etapa 2). Del mismo modo, los productos de digestión también se hibridan a regiones complementarias de los segundos adaptadores de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo fosforilado en la posición 5' del segundo adaptador es adyacente al extremo de OH en la posición 3' del producto de digestión monocatenario (Figura 9A, Etapa 2). En presencia de una ADN ligasa, los adaptadores de oligonucleótido se ligan a sus productos de digestión monocatenarios hibridados para formar productos de digestión etiquetados con adaptador doble. Posteriormente, los oligonucleótidos que contienen uracilo hibridados se difieren usando uracil ADN glicosilasa (UDG) (Figura 9A, Etapa 3).

Como se ha indicado anteriormente, el método que se muestran a Figura 9A genera productos de digestión etiquetados con adaptador doble en los que ambos sitios de endonucleasa de restricción del producto de digestión no estaban metilados. En las muestras en las que al menos un sitio está metilado o es ADN monocatenario, la misma digestión no se produce y el producto de digestión particular no se genera. Por lo tanto, en ausencia del producto de digestión apropiado, no hay ligamiento de adaptador.

Después del ligamiento de los adaptadores de oligonucleótido (Figura 9A, Etapa 2), los productos de ligamiento se pueden detectar directamente si cualquiera del primer o segundo adaptador de oligonucleótido además comprende una etiqueta detectable (no se muestra). Sin embargo, en muchos casos, especialmente cuando la molécula de ácido nucleico diana es una molécula de ácido nucleico diana de baja abundancia, se lleva a cabo una PCR primaria opcional antes de la detección como se muestra en la Figura 9A, Etapa 4. DE acuerdo con esta realización de la presente invención, el primer adaptador de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores de oligonucleótido además comprende una primera parte específica de cebador y el segundo adaptador de oligonucleótido del conjunto de adaptadores de oligonucleótido comprende una segunda parte específica de cebador. Después del ligamiento, los productos de digestión etiquetados con adaptador doble comprenden la primera parte específica de cebador, el producto de digestión, and the segunda parte específica de cebador. Las partes que contienen uracilo de los adaptadores de oligonucleótido se eliminan mediante digestión con UDG como se muestra en la Figura 9, etapa 3. Como se muestra en la Figura 9A, etapa 4, la PCR se lleva a cabo usando un conjunto de cebadores primario que comprende (i) un primer cebador de oligonucleótido primario que comprende la secuencia de nucleótidos que es la misma que la primera parte específica de cebador del producto de digestión etiquetado con adaptador doble y (ii) un segundo cebador de oligonucleótido primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la segunda parte específica de cebador de los productos de digestiones etiquetados con adaptador doble. La pluralidad de productos de digestión etiquetados con adaptador doble, el uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario y una primera polimerasa se combinan para formar una primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa. La primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de PCR que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación, y un tratamiento de extensión para formar productos primarios de extensión. En algunas realizaciones de la presente invención, el primer o segundo cebador de oligonucleótido el primer conjunto de oligonucleótidos primario puede comprender además una etiqueta detectable. Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico diana no metilada se identifica mediante la detección y distinción de productos primarios de extensión etiquetados.

En una realización de la presente invención, el primer y/o segundo cebadores de oligonucleótido de un conjunto de cebadores se diseñan para que contengan un grupo de bloqueo escindible en su extremo en la posición 3' para aumentar la amplificación específica de diana. Por ejemplo, los cebadores deben contener un solo resto de ribonucleótido cerca de su extremo en la posición 3' que evitar la extensión con polimerasa del cebador. La hibridación del cebador a partes específicas de cebador complementarias en el producto de digestión etiquetado con adaptador doble forma un sustrato para la RNasa H2, que escinde el cebador en la posición 5' a la base de ARN generando de ese modo un resto 3'-OH en el cebador que es capaz de extensión con polimerasa (véase Dobosy *et al.*, "RNase H-dependent PCR (rhPCR): Improved Specificity and Single Nucleotide Polymorphism Detection Using Blocked Cleavable Primers", BMC Biotechnology 11: 80 (2011)).

En la realización que se representa en la Figura 9B, el ADN diana bicatenario se escinde con enzima(s) de restricción

sensible a la metilación (por ejemplo, *HinP1I*) para generar productos de digestión que tienen dos sitios de restricción no metilados (es decir, productos de digestión no metilados) (Figura 9B, Etapa 1). Los fragmentos digeridos de ADNds se desnaturalizan, generando productos de digestión monocatenarios que tienen un PO₄ único en la posición 5' competente para ligamiento así como un OH en la posición 3' competente para ligamiento único que son adecuados para ligamiento al primer y segundo adaptadores de oligonucleótido, respectivamente. Como se representa en esta realización de la presente invención, el extremo en la posición 3' y el complemento del extremo en la posición 3' del primer adaptador de oligonucleótido se acoplan para permitir que el primer adaptador de oligonucleótido forme una horquilla. Del mismo modo, el extremo en la posición 5' y el complemento del extremo en la posición 5' del segundo adaptador de oligonucleótido se acoplan para permitir que el segundo adaptador de oligonucleótido forme una horquilla. En una realización, el segundo adaptador de oligonucleótido horquillado también puede tener una parte de solapa de oligonucleótido en la posición 5' que contiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región en la posición 3' del segundo adaptador de oligonucleótido. La parte de solapa de oligonucleótido en la posición 5' puede contener una base de solapamiento idéntica a la base en el resto OH en la posición 3' del producto de digestión. Esta base de solapamiento idéntica se somete a escisión con una nucleasa en la posición 5', produciendo un extremo en la posición 5' competente para ligamiento en el segundo adaptador de oligonucleótido. La "X" en la región del segundo adaptador de oligonucleótido que es complementaria a una parte en la posición 3' del producto de digestión indica un extremo bloqueado en la posición 3', por ejemplo, un fosfato, C3, o cualquier otro resto que no se pueda extender con una polimerasa.

Después de la desnaturalización, los productos de digestión monocatenarios se hibridan a sus regiones complementarias del primer y el segundo adaptadores de oligonucleótido de una manera específica de secuencia, respectivamente (Figura 9B, etapa 2). Una indicación de ese tipo hace que el extremo en la posición 3' del primer adaptador de oligonucleótido sea adyacente al extremo fosforilado en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, y la parte de solapa en la posición 5' del segundo adaptador de oligonucleótido con respecto al extremo de OH en la posición 3' del producto de digestión monocatenario. Como se ha indicado anteriormente, en presencia de una ADN polimerasa que tiene actividad de nucleasa en la posición 5', la parte de solapa en la posición 5' del segundo adaptador de oligonucleótido se escinde generando un fosfato 5' en la posición competente para ligamiento. La ADN ligasa liga los adaptadores de oligonucleótido a sus productos de digestión monocatenarios hibridados para formar productos de digestión etiquetados con adaptador doble. A1 igual que en la Figura 9A, los productos de ligamiento se pueden detectar directamente si uno de los adaptadores de oligonucleótido se acopla a una etiqueta detectable. De forma alternativa, cada uno del primer y segundo adaptadores de oligonucleótido además comprende una primera y una segunda parte específica de cebador, respectivamente, y se lleva a cabo una PCR opcional (Figura 9B, etapa 3) como se ha descrito anteriormente en referencia a la Figura 9A. La actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa usada en esta etapa de PCR destruye la parte del molde ambos adaptadores de oligonucleótido ligados (es decir, el complemento del extremo en la posición 3' del primer adaptador de oligonucleótido, la región complementaria a la parte en la posición 5' del producto de digestión, y el complemento del extremo en la posición 5' del segundo adaptador de oligonucleótido, y la región complementaria a una parte en la posición 3' del producto de digestión). Opcionalmente, se pueden diseñar cebadores de PCR que tengan un grupo de bloqueo escindible en la posición 3' que evita la extensión con polimerasa no específica de los cebadores con los hibridan a algo que no es su secuencia complementaria correspondiente en el producto de digestión etiquetado con adaptador doble como se ha descrito anteriormente.

Normalmente es deseable ocluir sondas de oligonucleótidos no ligados de la muestra que contiene secuencias de producto ligadas antes de la amplificación por PCR para evitar la extensión y/o amplificación de la sonda no ligada que puede generar señales de falso positivo. Un enfoque para ocluir las sondas de oligonucleótidos no ligados de acuerdo con este aspecto de la presente invención es incorporar la parte de solapa en la posición 5' del segundo adaptador de oligonucleótido. En ausencia de ligamiento, la parte de solapa en la posición 5' se hibrida de nuevo en su región complementaria en la posición 3' del segundo adaptador de oligonucleótido formando una horquilla que se extenderá sobre sí misma evitando cualquier amplificación. Un enfoque alternativo para evitar la señal independiente de Mariana que surge de los adaptadores no ligados es incorporar una etapa de digestión con exonucleasa después del ligamiento y antes de la amplificación por PCR (L-H Guo y R. Wu, *Methods in Enzymology* 100: 60-96 (1985)). Todos los productos de repetición circular están protegidos de la escisión por la exonucleasa, mientras que los oligonucleótidos de adaptador no ligados y otros fragmentos de diana no ligados son digeridos por la exonucleasa

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos metilados. Este método implica una muestra que contiene una o más moléculas de ácido nucleico diana que contienen potencialmente uno o más restos metilados, y someter la una o más moléculas de ácido nucleico diana en la muestra a al menos una reacción de digestión enzimática insensible a la metilación y al menos una reacción de digestión enzimática sensible a la metilación para formar una pluralidad de productos de digestión que comprenden uno o más sitios de restricción sin escindir metilados. Se proporciona una pluralidad de conjuntos de adaptadores de oligonucleótido, comprendiendo cada conjunto de adaptadores de oligonucleótido (a) un primer adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 3' configurado para ligarse a un extremo en la posición 5' de un producto de digestión e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 5' de un producto de digestión y (b) un segundo adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 5' configurado para ligarse a un extremo en la

posición 3' de un producto de digestión e hibridado a su complemento, en el que el complemento del extremo en la posición 5' está acoplado a una región complementaria a una parte en la posición 3' de un producto de digestión. Los productos de digestión se someten a una reacción de ligamiento que comprende un tratamiento de desnaturalización para formar productos de digestión monocatenarios, un tratamiento de hibridación, en el que los productos de digestión monocatenarios se hibrida a sus regiones complementarias del primer y el segundo adaptadores de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del primer adaptador es adyacente al extremo en la posición 5' del producto de digestión monocatenario y el extremo la posición 5' del segundo adaptado es adyacente al extremo en la posición 3' del producto de digestión monocatenario, y un tratamiento de ligamiento en el que los adaptadores de oligonucleótido se ligan a sus productos de digestión monocatenarios hibridados formando de ese modo productos de digestión etiquetados con adaptador doble. Los productos de digestión etiquetados con adaptador doble se detectan, identificando de ese modo una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra mediante uno o más restos metilados.

La Figura 9C representa una realización de este aspecto de la presente invención. En esta figura, el ADN diana bicatenario se escinde con una o más enzimas insensibles a la metilación para formar fragmentos que tienen al menos un sitio de restricción sensible a la metilación interno (Figura 9C, Etapa 1). El ADN diana bicatenario además se escinde con una o más enzimas sensibles a la metilación para generar una pluralidad de productos de digestión que contienen uno o más sitios de restricción metilados sin escindir internos (Figura 9C, Etapa 1). Los adaptadores de oligonucleótido representados en esta figura son horquillados como se describe en la Figura 9B y además acoplados entre sí (es decir, el extremo la posición 5' del primer adaptador de oligonucleótido se acopla al extremo en la posición 3' del segundo adaptador de oligonucleótido) (Figura 9C, Etapa 2). Los adaptadores acoplados comprenden un grupo de bloqueo de polimerasa ("X"). Este grupo de lo que interfiere con la extensión con polimerasa de un primer adaptador no ligado, pero no interfiere con la actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa en la extensión posterior de productos de ligamiento. El segundo adaptador de oligonucleótido por contener opcionalmente una parte de solapa en la posición 5' que se escinde mediante la actividad de nucleasa de una polimerasa después de la hibridación del segundo adaptador de oligonucleótido al producto de digestión y antes de ligamiento.

Como se muestra en la Figura 9C, etapa 2, los adaptadores de oligonucleótido acoplados se hibridan a sus correspondientes productos de digestión de una manera específica de secuencia, haciendo que el extremo en la posición 3' del primer adaptador de oligonucleótido sea adyacente al extremo la posición 5' del producto de digestión y el extremo con solapa en la posición 5' del segundo adaptador de oligonucleótido sea adyacente al extremo en la posición 3' del producto de digestión. La solapa en la posición 5' en el segundo oligonucleótido se escinde cuando comprende un nucleótido que se solapa y que es idéntico al nucleótido en la posición 3' del producto de digestión. En ausencia de esta escisión, la solapa en la posición 5' se hibrida de nuevo en una región complementaria en la posición 3' del segundo adaptador de oligonucleótido para inhibir el cebado del adaptador no ligado. La ADN ligasa liga el primer y segundo adaptadores acoplados al producto de digestión de modo que el extremo la posición 5' del producto de digestión se acopla al extremo en la posición 3' del producto de digestión (Figura 9C, Etapa 2).

Como se ha indicado anteriormente, los productos de ligamiento formados en la Figura 9C, Etapa 2 se pueden detectar directamente cuando al menos uno de los adaptadores de oligonucleótido se acopla a una etiqueta detectable. De manera alternativa, cada uno del primer y segundo adaptadores de oligonucleótido además comprende una primera y una segunda parte específica de cebador respectivamente, y se lleva a cabo una PCR opcional (Figura 9C, etapa 3) como se ha descrito anteriormente en referencia a la Figura 9A. La actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa usada en esta PCR destruye la parte del molde ambos adaptadores de oligonucleótido ligados (es decir, el complemento del extremo en la posición 3' del primer adaptador de oligonucleótido, la región complementaria a la parte en la posición 5' del producto de digestión, y el complemento del extremo en la posición 5' del segundo adaptador de oligonucleótido, y la región complementaria a una parte en la posición 3' del producto de digestión). Opcionalmente, los cebadores de PCR se pueden diseñar para que tengan un grupo de bloqueo escindible en la posición 3' que evita una extensión con polimerasa no específica de los cebadores cuando seguirían algo que no es su secuencia complementaria correspondiente en el producto de digestión etiquetado con adaptador doble como se ha descrito anteriormente.

Como se ha descrito anteriormente, una etapa de digestión con exonucleasa se puede incluir después del ligamiento y antes de la amplificación por PCR de los productos de ligamiento para destruir oligonucleótidos de adaptador no ligados.

Aunque las Figuras 9A y 9B presentan métodos para detectar restos no metilados dentro de una muestra (es decir, el ADN bicatenario sólo se digiere con una enzima sensible a la metilación), y la Figura 9C nuestro método para detectar restos metilados con una muestra (es decir, el ADN bicatenario se digiere con enzimas tanto sensibles a la metilación como insensibles a la metilación), alguien con experiencia en la materia podría observar rápidamente que los diversos diseños de adaptador de oligonucleótido que se muestran en las Figuras 9A-9C se pueden usar en cualquier método. En otras palabras, los adaptadores de oligonucleótido que contienen uracilo de la Figura 9A y los adaptadores de oligonucleótido no acoplados horquillados de la Figura 9B se pueden usar en un método para detectar restos metilados, y los adaptadores de oligonucleótido acoplados horquillados que se muestran en la Figura 9C se pueden usar en un método para detectar restos no metilados.

La Figura 9D muestra la aplicabilidad del método de endonucleasa de restricción-ligamiento-PCR de la presente invención para detectar fragmentos de aproximadamente 20-40 bases (Figura 9D, lado en la parte izquierda) o aproximadamente 30-150 o más bases (Figura 9D, lado en la parte derecha). La señal se genera solo si se generan fragmentos específicos en los que ambos sitios están o (i) metilados o (ii) no metilados, generando de ese modo un extremo específico fosforilado en la posición 5' y un extremo específico en la posición 3' adecuado para ligamiento.

Los procesos que se describen en la Figura 9A incluyen las cuatro etapas siguientes: (i) restricción de ADN bicatenario para generar grupos únicos fosfato en la posición 5' y OH en la posición 3', (ii) ligamiento de adaptadores de oligonucleótido a ambos extremos en las posiciones 5' y 3' de productos de digestión únicamente generados, (iii) retirada de la hebra molde, por ejemplo mediante digestión con UDG de oligonucleótidos que contienen uracilo, y (iv) uso de cebadores universales para amplificar PCR productos adecuados para posterior detección y cuantificación. Como tal, los procesos que se describen en las Figuras 1A, 1B, y 9A, o cualquier combinación de los mismos, se pueden llevar a cabo en la misma muestra de forma simultánea, permitiendo una identificación y cuantificación precisas de dianas tanto metiladas como no metiladas de baja abundancia en la misma reacción. Del mismo modo, los procesos que se describen en las Figuras 9B, 9C, y 9D incluyen las mismas tres etapas: (i) restricción de ADN bicatenario para generar grupos únicos fosfato en la posición 5' y OH en la posición 3', (ii) ligamiento de adaptadores de oligonucleótido a ambos extremos en las posiciones 5' y 3' de productos de digestión únicamente generados, y (iii) uso de cebadores universales para amplificar PCR productos adecuados para posterior detección y cuantificación. Como tal, los procesos que se describen en las Figuras 2A, 2B, 9B, 9C, y 9D, o cualquier combinación de los mismos, se pueden llevar a cabo en la misma muestra de forma simultánea, permitiendo una identificación y cuantificación precisas de dianas tanto metiladas como no metiladas de baja abundancia en la misma reacción.

Las secuencias de productos ligados o producto primario de extensión de las mismas que se forman de acuerdo con los aspectos de la presente invención representados en las Figuras 9A-9D se pueden detectar y distinguirse de varias maneras. Como se ha descrito anteriormente, uno de los adaptadores de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores se puede acoplar a una etiqueta detectable para facilitar la detección del producto de ligamiento. En otra realización, los adaptadores de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores comprenden primera y segunda parte específica de cebadores para facilitar la formación de productos primarios de extensión que pueden detectarse directamente usando cebadores de PCR etiquetados. En otras realizaciones, los adaptadores de oligonucleótido además de una parte de código de cremallera o parte de detección UniTaq, que facilita la detección a través de uno o más métodos alternativos como se describe con más detalle a continuación.

En una realización de la presente invención, uno o ambos adaptadores de oligonucleótido primero o segundo de un conjunto de adaptadores además comprenden una parte de código de cremallera. Como se ha descrito anteriormente, un código de cremallera es una secuencia de nucleótidos corta, por ejemplo, entre 16 y 24 de longitud, que no tiene identidad de secuencia con respecto a secuencia de nucleótidos diana, y, preferentemente, poca o ninguna secuencia se identifica con ninguna secuencia de nucleótidos genómica. Los códigos de cremallera se hibridan a oligonucleótidos de captura complementarios a partir de una colección de oligonucleótidos de captura cómo también se ha descrito anteriormente.

La detección usando el código de cremallera se puede llevar a cabo usando la detección tradicional Taqman™ que se ha descrito anteriormente en referencia a la Figura 5 (véase el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.270.967 de Whitcombe *et al.*, y el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.601.821 de Anderson *et al.*). De acuerdo con esta realización, el primer adaptador de oligonucleótido comprende una primera parte específica de cebador, y el segundo adaptador de oligonucleótido comprende una segunda parte específica de cebador. Además, el primer o segundo adaptador de oligonucleótido del adaptador contiene además una parte de código de cremallera. Después del ligamiento, los productos de digestión etiquetados con adaptador doble comprenden la primera parte específica de cebador, la parte de código de cremallera, la parte de producto de digestión, y la segunda parte específica de cebador. Los productos de digestión etiquetados con adaptador doble se pueden detectar proporcionando una colección de oligonucleótidos de captura, en el que cada oligonucleótido de captura comprende una molécula inhibidora y una etiqueta detectable que están separadas entre sí (es decir, la sonda Taqman™). En un enfoque, la colección de oligonucleótidos de captura se combina con los productos de digestión etiquetados con adaptador doble, un conjunto de cebador de oligonucleótido primario como sea descrita anteriormente en referencia a la Figura 9A (es decir, que comprende un primer cebador de oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es la misma que la primera parte específica de cebador del producto de digestión etiquetado con adaptador doble y un segundo cebador de oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la segunda parte específica de cebador del producto de digestión etiquetado con adaptador doble), y una polimerasa para formar una primera reacción en cadena de la polimerasa. Los oligonucleótidos de captura de la colección se hibridan a sus partes de código de cremallera complementarias de los productos de digestión etiquetados con adaptador doble o complementos de los mismos durante el tratamiento de hibridación de la primera PCR. La molécula inhibidora y/o el marcador detectable se escinden de los oligonucleótidos de captura hibridados durante el tratamiento de extensión de la PCR, y se detecta el marcador detectable, separado de la molécula inhibidora. En una realización alternativa, que se muestra en la Figura 5, los productos de ligamiento etiquetados dobles están sujetos a la primera reacción de PCR en ausencia de la colección de sondas de oligonucleótidos de captura. Los productos primarios de extensión formados a partir de la primera PCR se combinan a continuación con la colección de sondas de oligonucleótidos de captura, un

- conjunto de cebadores de oligonucleótidos secundarios que es capaz de hibridarse con los productos primarios de extensión y una segunda polimerasa para formar una segunda PCR. Este enfoque es particularmente adecuado cuando se detectan secuencias de ácido nucleico diana de baja abundancia. Los oligonucleótidos de captura de la colección hibridan con sus partes complementarias de código de cremallera de los productos primarios de extensión y los cebadores de oligonucleótido secundarios también hibridan con los productos primarios de extensión. La extensión del cebador secundario escinde la molécula inhibidora y/o el marcador detectable de los oligonucleótidos de captura hibridados durante el tratamiento de extensión de la PCR, y el marcador detectable se detecta, separado de la molécula inhibidora.
- En otro enfoque, los productos de digestión de doble adaptador o los productos primarios de extensión, de los mismos, pueden contener una o más secuencias únicas (que varían de 0 a 10 bases) internas a la primera y segunda parte específica de cebador (Ai Única, Bi Única), representado como sigue a continuación.
Parte de Cebador 1- Ai Única- Zi de código de cremallera - ADN Diana - Bi Única - Parte de Cebador 2
- Estas secuencias únicas introducen a través del primer y segundo adaptadores de oligonucleótido. Para detección usando ensayos de Taqman de código de cremallera, la muestra se diluye de 10 a 100 veces después de los 8-20 ciclos de amplificación universal, y se añaden más cebadores únicos que se superponen con las secuencias Ai Única y Bi Única para cada producto. La sonda Taqman es un oligonucleótido de captura que es complementario a la secuencia del código de cremallera.
- Otro enfoque de detección que usa códigos de cremallera implica que la parte de código de cremallera se divida en dos partes, que se acercan entre sí usando una región corta de secuencia complementaria en ambos lados de las partes de código de cremallera divididas como se al escrito anteriormente en referencia a la Figura 6 y a la Figura 7.
- De acuerdo con este aspecto de la presente invención y en referencia a la Figura 6, el primer adaptador de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores comprende una primera parte específica de cebador (U1 y A1), una primera parte del código de cremallera (Z1.1') y una primera parte de etiqueta (T1) que está en la posición 3' con respecto a la primera parte de código de cremallera. El segundo adaptador de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores comprende una segunda parte de código de cremallera (Z1.2'), una segunda parte de etiqueta (T1') que está en la posición 5' con respecto a la segunda parte de código de cremallera, and the segunda parte específica de cebador (B1-U2). Los productos de digestión etiquetados con adaptador doble resultantes contienen la (i) primera parte específica de cebador, U1-A1, en la que U1 es una parte específica de cebador universal y A1 es una parte de cebador único, específico de diana, (ii) la primera parte de código de cremallera (Z1.1'), (iii) la primera parte de etiqueta (T1), (iv) la parte de producto de digestión, (v) la segunda parte de etiqueta (T1'), (vi) la segunda parte del código de cremallera (Z1.2'), y (vii) la segunda parte específica de cebador, B1-U2, en el que Bi es una parte de cebador único, específico de diana y U2 es una parte de cebador universal.
- Como se muestra en la Figura 6, etapa 1, las secuencias únicas de A1 y B1 sirven para facilitar una amplificación por PCR específica de diana de los productos de digestión etiquetados con doble adaptador cuando los cebadores de PCR que se usan abarcan la parte de cebador universal y las partes A1 y B1, respectivamente. Esta amplificación por PCR específica de diana puede ir precedida opcionalmente de una reacción de amplificación por PCR universal usando cebadores que hibridan con las partes específicas de cebador universales en las posiciones 5' y 3'. Una primera reacción de amplificación universal es particularmente adecuada cuando se detectan secuencias de ácido nucleico diana de baja abundancia en una muestra.
- Siguiendo la amplificación por PCR específica de diana de los productos de digestión con doble etiqueta o productos primarios de extensión de los mismos (Figura 6, Etapa 1), los productos de extensión de ADN bicatenario se desnaturalizan (Figura 6, Etapa 2). A medida que disminuye la temperatura, la primera y la segunda parte de etiqueta (T1 y T1') se hibridan juntas de manera transitoria, llevando la primera porción de la secuencia del código de cremallera (Z1.1' del primer adaptador de oligonucleótido) cerca del segundo código de secuencia cremallera (Z1.2' del segundo adaptador de oligonucleótido). La hibridación transitoria se estabiliza mediante la hibridación simultánea de un oligonucleótido de captura etiquetado (Z1) que es complementario a las secuencias de código de cremallera ubicadas adyacente (es decir, Z1.1' y Z1.2'; Figura 6, Etapa 3). En una realización, el oligonucleótido de captura tiene una molécula inhibidora (Q) y una etiqueta detectable (F) que están separadas entre sí, en el que la etiqueta detectable se inhibe cuando está cerca de la molécula inhibidora. La señal se genera por la actividad nucleasa en la posición 5 de una polimerasa, ya que extiende un cebador (es decir, el "cebador de digestión") que está unido a la parte universal específica del cebador (U2), la parte única B1, o una combinación de las mismas y escinde el oligonucleótido de captura hibridado. La extensión del cebador corta el marcador detectable del oligonucleótido de captura que libera el marcador detectable de la molécula inhibidora, lo que permite la detección (Figura 6, Etapa 4). Tan pronto como la polimerasa ha atravesado Z 1.2', el tallo corto entre Z1.2' y Z1.1' se disgrega y la polimerasa continúa extendiéndose para crear el producto de ADNds. En la técnica se conoce una amplia variedad de marcadores detectables, es decir, colorantes fluorescentes y están disponibles en el mercado para su uso en esta realización de la presente invención, por ejemplo, FAM, TET, JOE, VIC, HEX, CY3, TAMRA, Rojo Texas, CY5, ROX. Del mismo modo, las moléculas inhibidoras, por ejemplo, MGB-NFQ, BHQ-[0123], inhibidor de ZEN de IDT, también son bien conocidas por los expertos en la materia y están disponibles para su uso en esta realización de la presente invención.
- La Figura 7 muestra el otro ejemplo de detección de horquilla de código de cremallera dividida. En esta figura, los

productos de digestión con adaptador doble están formados por un cebador adaptador de oligonucleótido que tiene una primera parte específica de cebador (U1 y A1), una primera parte del código de cremallera (Z1.1') y una primera parte de etiqueta (T1) que está en la posición 3' con respecto a la primera parte de código de cremallera. El segundo adaptador de oligonucleótido del conjunto de adaptadores de oligonucleótido comprende una segunda parte de código de cremallera (Z1.2'), una segunda parte de etiqueta (T1') que está en la posición 5' con respecto a la segunda parte de código de cremallera, y la segunda parte específica de cebador (U2). Los productos de digestión etiquetados con adaptador doble resultantes tal como se muestra en la etapa 1 de la Figura 7, contienen la (i) primera parte específica de cebador, U1-A1, en la que U 1 es una parte específica de cebador universal y A1 es una parte de cebador único, específica de diana (es decir, una parte de tercer cebador), (ii) la primera parte de código de cremallera (Z1.1'), (iii) la primera parte de etiqueta (T1), (iv) la parte de producto de digestión, (v) la segunda parte de etiqueta (T1'), (vi) la segunda parte del código de cremallera (Z1.2'), y (vii) la segunda parte específica de cebador (U2).

En la Etapa 1 de la Figura 7, los productos de digestión etiquetados con adaptador doble opcionalmente se amplifican inicialmente usando un conjunto de cebadores de oligonucleótido universal que se une a las partes de cebador U 1 y U2 de los productos de digestión etiquetados con adaptador doble. Los productos primarios de extensión formados a partir de esta etapa de PCR universal están sujetos a una etapa secundaria de PCR (Figura 7, etapa 2) usando un conjunto de cebadores secundarios que incluye un primer cebador oligonucleótido secundario que tiene (a) una secuencia de nucleótidos que es la misma que la parte de cebador A1 (A1), (b) una parte de oligonucleótido de captura (Z1) que es complementaria a la primera y segunda partes de código de cremallera ubicadas adyacente de un conjunto de sondas de oligonucleótidos, (c) una molécula inhibidora (Q) y una etiqueta detectable (F) separadas por dicha parte de oligonucleótido de captura. El segundo cebador de oligonucleótido secundario (U2) del conjunto de cebadores tiene la misma secuencia de nucleótidos que la segunda parte específica de cebador del segundo cebador de oligonucleótido primario. La molécula inhibidora del primer cebador secundario puede servir como un bloqueador de polimerasa para bloquear la extensión de polimerasa de la hebra inferior. De forma alternativa, un bloqueador de polimerasa tal como HEG (hexetilenglicol), THF (tetrahidrofurano), Sp-18, o cualquier otro bloqueador conocido en la técnica que sea suficiente para detener la extensión de polimerasa se puede colocar próximo al resto de inactivación. Los productos de ADN bicatenario (que se muestran en la Figura 7, Etapa 3) se desnaturalizan y la temperatura disminuye para permitir la formación de horquillas dobles con tallos entre Z1.1' y Z1.2' (tallo formado por hibridación entre T1 y T1') y entre la parte de oligonucleótidos de captura (Z1) y Z1.17Z1.2' (Figura 7, Etapa 4). La señal es generada por la actividad nucleasa en la posición 5' de la polimerasa cuando extiende un "cebador de digestión" complementario a la parte en la posición 5' universal específica del cebador. La extensión del cebador corta el marcador detectable (F) o la molécula inhibidora (Q) del oligonucleótido de captura que libera el marcador detectable (F) de la molécula inhibidora (Q), lo que permite la detección (Figura 7, Etapa 5). Tan pronto como la polimerasa ha atravesado Z1.2', el tallo corto entre Z1.2 y Z1.1' se disgrega y la polimerasa continúa extendiéndose hasta que llega al bloqueador de polimerasa para crear un producto de ADNds similar al de la etapa 1, pero que carece de señal fluorescente.

Un enfoque alternativo para usar las secuencias de código de cremallera/oligonucleótido de captura para la detección implica el enfoque de UniTaq que se ha descrito anteriormente.

Las Figuras 8A-8C muestran varias formas en las que el sistema de etiqueta UniTaq se puede incorporar a los productos de digestión etiquetados con adaptador doble formados mediante el proceso de nucleasa-ligamiento-PCR de la presente invención. En cada uno de estos enfoques, que se han descrito con detalle anteriormente, el primer adaptador de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores comprende una primera parte específica de cebador (U1 o U1-Ai), y el segundo adaptador de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores comprende la parte de detección de UniTaq (B'i) y una segunda parte específica de cebador (C'i). Por lo tanto, y como se representa en la realización que se muestra en la Figura 8A, los productos de digestión etiquetados de forma doble contienen (i) una primera parte específica de cebador, U1-Ai, en el que U1 es una parte específica del cebador universal y Ai es una parte de cebador específico de UniTaq, único, (ii) el producto de digestión, (iii) una parte de detección de UniTaq (B'i), y (iv) una segunda parte específica de cebador (C'i). En la Figura 8A etapa 1, los productos primarios de extensión de los productos de digestión con doble etiqueta que se formaron en una reacción de PCR universal inicial, se ceban usando un conjunto de cebadores de oligonucleótido secundarios que comprende un primer cebador de oligonucleótido secundario que tiene la misma secuencia de nucleótidos que Ai, y un segundo cebador de oligonucleótido que es complementario a C'i (es decir, Ci). El primer cebador de oligonucleótido secundario también incluye una sonda de detección UniTaq (Bi) que tiene una etiqueta detectable D1 en un extremo y una molécula inhibidora (Q) en el otro extremo (D1-Bi-Q-Ai). Opcionalmente colocado proximal a la molécula inhibidora se encuentra una unidad de bloqueo de polimerasa, por ejemplo, HEG, THF, Sp-18, o cualquier otro bloqueador conocido en la técnica que sea suficiente para detener la extensión de la polimerasa.

Alguien con experiencia en la materia podría observar fácilmente que los productos de digestión etiquetados con doble adaptador pueden ser el material de partida en la Figura 8A, etapa 1 (es decir, denominado "producto de ligamiento"), en lugar de los productos primarios de extensión.

La amplificación por PCR de los productos primarios de extensión de los productos de digestión etiquetados con adaptador doble que usan el segundo conjunto de cebador oligonucleótido generan los productos de extensión de doble hebra que se muestran en la Figura 8 A, etapa 2. La detección de los productos de PCR producidos con el

conjunto de cebadores de oligonucleótido secundario procede como se describe anteriormente con respecto a las etapas 2-4 de la Figura 8 A.

En el enfoque que se muestra en la Figura 8B, se usa un ensayo de Taqman™ tradicional para detectar los productos de digestión etiquetados con adaptador doble como se ha descrito en detalle anteriormente. El material de partida en la Figura 8B, Etapa 1, puede ser el producto de digestión etiquetado con adaptador doble ("producto de ligamiento") o productos primarios de extensión del mismo formados en una primera PCR universal. Del mismo modo, el formato de detección que se muestra en la Figura 8C y que se ha descrito con detalle anteriormente también se puede usar para detectar productos de digestión etiquetados con adaptador doble. Alguien con experiencia en la materia técnica observa fácilmente que el material de partida en la Figura 8C, Etapa 1, puede ser el producto de digestión etiquetado con adaptador doble ("producto de ligamiento") o productos primarios de extensión del mismo formados en una primera PCR universal.

El desafío para desarrollar ensayos de diagnóstico e identificación sistemática confiables basados en cambios en la metilación del ADN, es distinguir aquellos marcadores que emanan del tumor o del feto que son indicativos de enfermedad (es decir, cáncer temprano) con respecto a la presencia de los mismos marcadores que emanan del tejido normal. También es necesario equilibrar el número de marcadores examinados y el coste del ensayo, con la especificidad y sensibilidad del ensayo. Este es un desafío que debe abordar la variación biológica en enfermedades tales como el cáncer. En muchos casos, el ensayo debe servir como una herramienta de identificación sistemática, que requiere la disponibilidad de un seguimiento de diagnóstico secundario (es decir, colonoscopia, amniocentesis).

Con respecto al problema biológico se encuentra la necesidad de detectar de manera confiable los cambios en la metilación del ADN en un número muy pequeño de células iniciales (es decir, de las CTC), o cuando la señal específica de cáncer o del feto está en presencia de una mayoría de ácido nucleico que emana de células normales.

Por último, existe el desafío técnico de distinguir la señal verdadera resultante de la detección del marcador de metilación de ácido nucleico específico de la enfermedad deseada con respecto a la señal falsa generada a partir de los ácidos nucleicos normales presentes en la muestra frente a la señal falsa generada en ausencia del núcleo específico del marcador de metilación de ácido nucleico específico de la enfermedad.

Los métodos de la presente invención descritos en el presente documento proporcionan soluciones a estos desafíos. Estas soluciones comparten algunos temas comunes que se destacan a continuación.

El primer tema es la multiplexación. La PCR funciona mejor cuando la concentración del cebador es relativamente alta, de 50 nM a 500 nM, lo que limita la multiplexación. Además, a medida que se añaden más pares de cebadores de PCR, las posibilidades de amplificar productos incorrectos o crear dímeros de cebadores aumentan exponencialmente. Por el contrario, para las sondas de reacción de detección de ligamiento (LDR), se usan bajas concentraciones del orden de 4 nM a 20 nM, y los dímeros de sonda están limitados por el requisito de hibridación adyacente en la diana para permitir un suceso de ligamiento. El uso de bajas concentraciones de cebadores de PCR específicos de genes o sondas LDR con "colas" de secuencia universal de cebadores permite la posterior adición de concentraciones más altas de cebadores universales para conseguir la amplificación proporcional de los productos iniciales de PCR o LDR. En el presente documento, el enfoque de LDR tradicional se invierte mediante el uso de adaptadores de oligonucleótido como moldes para capturar y añadir etiquetas específicas a fragmentos diana monocatenarios de muy baja abundancia.

El segundo tema se relaciona con las fluctuaciones en la señal debido a la baja entrada de ácidos nucleicos objetivo. A menudo, el ácido nucleico diana se originó a partir de unas pocas células, capturadas como CTC, o de células tumorales que sufrieron apoptosis y liberaron su ADN como pequeños fragmentos (140 a 160 pb) en el suero. En tales condiciones, es preferente llevar a cabo algún nivel de amplificación proporcional para evitar perder la señal por completo o informar un número de copia inexacto debido a la distribución de Poisson al distribuir pequeñas cantidades de moléculas de partida en pocillos individuales (para cuantificación por PCR digital o en tiempo real). Mientras estas amplificaciones universales iniciales se mantengan a un nivel razonable (aproximadamente de 8 a 20 ciclos), el riesgo de contaminación por arrastre durante la apertura del tubo y la distribución de amplicones para su posterior detección/cuantificación (usando PCR en tiempo real o de gólicas) minimizado. Si es necesario, la señal de arrastre se puede eliminar mediante la incorporación de uracilo convencional durante la etapa de amplificación universal, y usando UNG y AP endonucleasa en el procedimiento de tratamiento previo a la amplificación. De forma alternativa, la señal de transferencia se puede evitar por completo realizando múltiples etapas en un sistema cerrado, como dispositivos de "laboratorio en un chip" microfabricados de plástico.

El tercer tema es la señal independiente de la diana. Esto podría surgir de reacciones de polimerasa o ligasa que se producen en ausencia de la diana correcta. Parte de esta señal se puede minimizar mediante un diseño con criterio del cebador. Para las reacciones de ligamiento, la actividad de nucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa se puede usar para liberar el fosfato en la posición 5' del cebador de ligamiento cadena abajo (solo cuando se hibrida con la diana), por lo que es adecuado para el ligamiento. En la invención presentada en el presente documento, la especificidad de las endonucleasas de restricción sensibles a metilo e insensibles a metilo se usa para generar grupos fosfato en la posición 5' y OH en la posición 3' competentes para ligamiento en posiciones definidas en la diana.

El cuarto tema es la amplificación suprimida (reducida) o la amplificación incorrecta (falsa) debido a cebadores no usados en la reacción. Un enfoque para eliminar cebadores de ese tipo no usados es capturar ADN genómico en un soporte sólido, permitir que los cebadores de ligamiento se hibriden y se ligen, y a continuación eliminen cebadores o productos que no se hibridan con el ADN genómico en un soporte sólido. Otro enfoque es eliminar las cadenas adaptadoras de molde de oligonucleótidos, ya sea usando uracilo ADN glicosilasa para digerir el molde artificial que contiene uracilo, o usando la actividad de nucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa para digerir la cadena de molde de un producto ligado. Otro enfoque más es diseñar el adaptador de oligonucleótido de horquilla en sentido ascendente para que, en ausencia de ligamiento, se extienda sobre sí mismo y no se amplifique más. Otro enfoque más es diseñar el adaptador de oligonucleótido de horquilla en sentido descendente para que comprenda una solapa en la posición 5' que se escinde mediante la actividad de nucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa cuando se hibrida con el fragmento cortado, pero la solapa sin cortar se hibrida de nuevo a una región complementaria en el adaptador de manera que inhiba el cebado posterior de un oligonucleótido no ligado. Otro enfoque más es incorporar un grupo de bloqueo dentro del oligonucleótido adaptador que interfiere con la extensión del extremo en la posición 3'. Otro enfoque más es usar un grupo de bloqueo que evite la extensión de un adaptador horquillado cadena arriba no ligado más allá del grupo de bloqueo y, por lo tanto, evite la generación de un molde artificial competente para la amplificación, pero dicho grupo de bloqueo no interfiere con la actividad de nucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa para digerir la era del molde de un producto ligado. Además otro enfoque es usar diseños de cebador universal en PCR o cebadores de adaptador de oligonucleótido, que son ligeramente más cortos que los cebadores universales. Esto permite una amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (i.e., hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más elevada (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales se unen preferentemente al producto deseado (en comparación con la PCR compuesta o cebadores de adaptador de oligonucleótido que se unen a productos incorrectos).

Los métodos de la presente invención descritos en el presente documento son capaces de detectar y cuantificar una o más moléculas de ácido nucleico diana de baja abundancia que tienen uno o más, restos metilados y/o uno o más restos no metilados. Como se usa en el presente documento "molécula de ácido nucleico diana de baja abundancia" se refiere a una molécula de ácido nucleico diana que está presente en niveles tan bajos como de un 1 % a un 0,01 % de la muestra. En otras palabras, una molécula de ácido nucleico de baja abundancia con uno o más restos metilados o uno o más restos no metilados se puede distinguir de un exceso de 100 a 10.000 veces de moléculas de ácido nucleico en la muestra que tienen una secuencia de nucleótidos similar a la baja abundancia moléculas de ácido nucleico pero sin uno o más restos metilados o con uno o más restos metilados, respectivamente. En algunas realizaciones de la presente invención, el número de copias de una o más secuencias de nucleótidos diana de baja abundancia se cuantifica en relación con el número de copias de un exceso de moléculas de ácido nucleico en la muestra que tiene una secuencia de nucleótidos similar a las moléculas de ácido nucleico de baja abundancia. En otras realizaciones de la presente invención, las secuencias de nucleótidos diana de una o más de baja abundancia se cuantifican en la muestra. Esta cuantificación puede ser absoluta o relativa con respecto a otras secuencias de nucleótidos en la muestra. En otras realizaciones de la presente invención, se cuantifica el número relativo de copias de una o más secuencias de nucleótidos diana.

Las moléculas de ácido nucleico diana de baja abundancia que se van a detectar pueden estar presentes en cualquier muestra biológica, incluyendo, pero no limitado a, tejidos, células, suero, sangre, plasma, líquido amniótico, esputo, orina, fluidos corporales, secreciones corporales, excreciones corporales, ácidos nucleicos circulantes sin células, ácidos nucleicos fetales circulantes sin células en mujer embarazada, células tumorales circulantes, tumor, biopsia tumoral y exosomas.

Con respecto a la detección temprana del cáncer, los métodos de la presente invención son adecuados para la detección de marcadores de metilación de alta sensibilidad para hipermetilación de promotor (cuando está presente de un 1 % a un 0,01 %) en ADN enriquecido con metilo, o incluso ADN sérico total, por ejemplo, hipermetilación de promotor en p16 y otros genes supresores de tumores, "islotos" de CpG, Sept9, Vimentina, etc. Los métodos de la presente invención también son adecuados para la detección de marcadores no metilados de alta sensibilidad, por ejemplo, la hipometilación del promotor cuando está presente de un 1 % a un 0,1 % en el ADN sérico total. Por ejemplo, el método es útil para detectar la hipometilación del promotor en oncogenes potenciales, regiones "en los bordes" de CpG y pérdida de metilación en Alu u otras secuencias de repetición.

La presencia y ausencia de metilación en ciertas regiones genéticas tiene aplicaciones de diagnóstico y pronóstico prenatal. Por ejemplo, la metilación anómala en regiones en los cromosomas 13, 18, 21, X e Y se puede usar para diagnosticar el síndrome de Down (Patsalis *et al.*, "A New Non-Invasive Prenatal Diagnosis of Down Syndrome through Epigenetic Markers and Real-Time qPCR", *Exp. Opin. Biol. Ther.* 12 (Supl. 1): S155-S161 (2012)). Dado que el ADN fetal y el ADN materno están metilados de manera diferencial, el ADN fetal libre de células en el plasma materno puede proporcionar una fuente de ADN fetal, que se puede obtener de manera no invasiva y se puede usar para evaluar el estado de metilación de los cromosomas mencionados anteriormente. Dado que el ADN fetal libre de células solo representa un 3-6 % del ADN total en la circulación materna durante el primer trimestre, los métodos altamente sensibles de la presente invención son particularmente adecuados para su uso en estos tipos de ensayos de diagnóstico prenatal no invasivos. La presente invención permite la detección prenatal no invasiva de aneuploidías cromosómicas en el ADN fetal mediante el uso de PCR digital para cuantificar la metilación en regiones cromosómicas

que no están metiladas en suero normal, y/o mediante PCR digital para cuantificar la falta de metilación en regiones cromosómicas que están metilados en el ADN aislado del suero normal.

Ejemplos proféticos

5 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar realizaciones proféticas de la presente invención pero no pretenden limitar el modo alguno no de su alcance.

10 **Ejemplo profético 1 - Detección de Marcador de Metilación de Alta Sensibilidad para Hipermetilación de Promotor (presente de un 1 % a un 0,01 %).**

Un número de grupos ha determinado un estado de metilación de ADN tanto normal como tumoral a una amplia escala del genoma (Irizarry *et al.*, "The Human Colon Cancer Methylome Shows Similar Hypo- and Hypermethylation at Conserved Tissue-Specific CpG Island Shores", Nat. Genetics 41 (2): 178-186 (2009), y Hinoue *et al.*, "Genome-Scale Analysis of Aberrant DNA Methylation in Colorectal Cancer", Genome Res. 22: 271-282 (2012)). Estos estudios informaron sobre selección de marcadores.

20 **Visión general del enfoque:** El ADN genómico aislado, o el ADN enriquecido con metilo se trata con un cóctel de enzimas sensibles a metilo (AciI, HinfII, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI o una combinación de las mismas), así como con enzimas insensibles a metilo (MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, BsaJI, o una combinación de las mismas). La idea es generar un fragmento de ADN de aproximadamente 40 bases o más, en el que el fosfato en la posición 5' del fragmento se origina a partir de una enzima insensible a metilo. El fragmento debería tener al menos 3 sitios de enzima sensible a metilo, de modo que la escisión podría hacer que estos fragmentos se disiparan. Una hebra del fragmento genómico a continuación se hibrida en un molde artificial que contiene uracilo, en el que la región cadena arriba está relacionada con el ADN genómico, y un cebador cadena arriba se hibrida a esa región, y puede ligarse al fragmento genómico en el fosfato en la posición 5'. La hebra del molde a continuación se destruye con UNG y AP endonucleasa. Un oligonucleótido cadena abajo que se hibrida al fragmento genómico a continuación se añade cadena abajo de donde se hibridó a la hebra del molde. Ambos oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo tienen secuencias específicas UniTaq, una secuencia específica de código de cremallera, y secuencias universales fuera, lo que permite una "preamplificación" simultánea durante 8-20 ciclos, antes de la apertura del tubo, y división en los ensayos de UniTaq taqman apropiados. Para cada región de promotor, habrá tres posiciones de interrogación, de modo que se observa cuando la señal aparece (el valor de Ct indicando una cantidad relativa de secuencia metilada) así como una fuerza de la señal total (es decir, = 1, 2, o 3 sitios metilados para ese promotor).

35 La etapa de UNG y AP endonucleasa es necesaria para destruir el molde modo que los cebadores no se amplifiquen de forma accidental hasta del molde. La insistencia en tener una endonucleasa genera el fosfato en la posición 5', esto evita una señal falsa, y debería desprenderse también de cualquier señal de ligamiento no específica. Por lo tanto, cualquier fragmento raro de ADN genómico que fuera monocatenario antes de la purificación, o que no se hubiera escindido no formará un sustrato productivo para notificaciones de PCR posteriores, ya que el molde artificial tiene secuencias no genómicas en ambos lados.

Para resumir los niveles de discriminación del enfoque mencionado anteriormente para detección de metilación de baja abundancia:

- 45 1. Usar enzima de restricción insensible a la metilación para generar un fosfato en la posición 5' único en el ADN diana bicatenario.
2. Usar enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
3. Usar fidelidad de ligamiento de ligasa termoestable para ligar la etiqueta correcta a la hebra de la diana en el molde.
- 50 4. Usar uracil ADN glicosilasa para destruir hebras de molde.
5. Usar cebador específico de locus y polimerasa para amplificar hebras diana ligadas.

55 **Protocolo Detallado: Detección de Marcador de Metilación de Alta Sensibilidad para hipermetilación de promotor (presente de un 1 % a un 0,01 %) en ADN enriquecido con metilo o ADN de suero total (véase la Figura 1B)**

Etapa 1: Escindir el ADN genómico aislado, o el ADN enriquecido con metilo con un cóctel de enzimas sensibles a metilo (AciI, HinfII, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI o una combinación de las mismas), así como con enzimas insensibles a metilo (MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, BsaJI, o una combinación de las mismas). Generar fragmentos de aproximadamente 40 bases o más que tienen un fosfato en la posición 5' de un sitio insensible a la metilación (es decir, MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, o BsaJI), y al menos un sitio sensible a la metilación (que no se escinden porque estaban metilados). Preferentemente, se generan tres fragmentos de ese tipo por promotor.

65 Etapa 2: Calentar las endonucleasas de destrucción (65 °C durante 15 minutos, 80 °C durante 20 minutos para endonucleasas termófilas pero no termoestables) y desnaturalizar el ADN (94 °C 1 minuto). Añadir moldes artificiales

(que contienen uracilo, y desde el lado en la posición 3' complementario a UniTaq Ai, y complementario al ADN diana con Tm de aproximadamente 72 °C con respecto al lado en la posición 5'), cebadores cadena arriba (que contienen 5' Cebador Universal U1Pm, seguido por UniTaq Ai), y ligasa termostable, e incubar a 60 °C para permitir la hibridación y el ligamiento de cebadores cadena arriba al fosfato la posición 5' del ADN diana si y solo si estaba metilado e hibridado al molde correcto.

Etapa 3: Añadir UNG y AP endonucleasa, Taq polimerasa de inicio en caliente, dNTPs, Cebador Universal U1Pm, Cebador Universal U2, y cebadores cadena abajo (que contienen Cebador Universal U2 en la posición 5', seguido por UniTaq Bi, seguido por secuencia diana específica de locus complementaria al fragmento diana con secuencia que está justo cadena abajo de la secuencia de hebra molde artificial). Incubar a 37 °C durante 30 minutos para destruir la hebra molde artificial, activar la polimerasa a 95 °C durante 5 minutos, y a continuación permitir que la amplificación evolucione durante 8-20 ciclos. De manera ideal, el cebador universal trenza U1Pm y U2 en el LDR y los cebadores del compuesto de PCR son ligeramente más cortos que los cebadores Universales U1 y U2. Esto permite una amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más elevada (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales U1Pm y U2 se unen preferentemente al producto deseado (en comparación con cebadores compuestos que se unen a productos incorrectos). Además los cebadores universales U1Pm y U2 contienen una secuencia corta en común (es decir, 6-10 bases) para evitar la formación de dímero de cebador. En una variación opcional para minimizar amplificar genes independientes de diana, los cebadores de PCR cadena abajo contienen una base susceptible y un extremo en la posición 3' bloqueado, que se libera mediante una enzima que escinde la base susceptible cuando el cebador se hibrida a su diana. Por ejemplo, la base susceptible puede ser un nucleótido de ARN, con la enzima de escisión siendo una RNasaH (Véase Dobosy *et al.*, BMC Biotechnology 2011, 11: 80)). Estas condiciones amplifican productos de la secuencia:

Cebador Univ. U1Pm- UniTaq Ai -ADN Diana- UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Etapa 4: diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a pocillos de Taqman, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos de UniTaq del formato F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (en el que F1 es un colorante fluorescente que se inhibe con la molécula inhibidora Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:

F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai -ADN Diana- UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Esto formará una horquilla, de modo que la secuencia de UniTaq Bi se empareja con la secuencia de UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia del Cebador Univ. U2', la actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa digiere la secuencia de UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente de F1.

La detección de metilación altamente sensible se puede llevar a cabo usando matriz código de cremallera, Taqman de código de cremallera, o detección de Taqman tradicional como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el cebador cadena arriba solo necesita contener un Cebador Univ. U1 en la posición 5' seguido por una secuencia de código de cremallera. El cebador cadena abajo solo necesita contener un Cebador Univ. U2 en la posición 5' seguido por ADN diana. Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia: Cebador Univ. U1- Zi de código de cremallera -ADN Diana - Cebador Univ. U2'.

Para detección usando matrices universales que contienen oligonucleótidos de captura, el Cebador Univ. U2 podría contener una etiqueta indicadora, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 podría contener un fosfato en la posición 5', y la amplificación podría continuar durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto podría permitir el uso de exonucleasa lambda para digerir la segunda hebra, haciendo que el producto etiquetado con fluorescencia sea monocatenario y adecuado para hibridación en una materia universal (código de cremallera) que contiene oligonucleótidos de captura.

En un enfoque alternativo, la detección de metilación altamente sensible se puede llevar a cabo usando secuencias de código de cremallera de separación. Este enfoque podría usar primeros cebadores de oligonucleótido cadena arriba (Cebador Univ. U1 en la posición 5' seguido por una primera mitad de secuencia Ai de código de cremallera y una secuencia corta Ci), y segundos cebadores de oligonucleótido cadena abajo (Cebador Univ. U2 en la posición 5' seguido por una segunda mitad de secuencia Ai de código de cremallera, la secuencia corta Ci, y ADN diana). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1- 1^a ½ de Zi de código de cremallera - Ci Corto -ADN Diana - Ci' Corto - 2^a ½ de Zi de código de cremallera - Cebador Univ. U2'.

Cuando el Ci Corto se hibrida de forma transitoria al Ci' Corto, la 1^a secuencia de ½ de Zi de código de cremallera se lleva a las proximidades de la 2^a ½ de Zi de código de cremallera, y la hibridación transitoria se puede estabilizar cuando se hibridan ambas secuencias de mitad de Zi de código de cremallera a la secuencia Zi' de código de cremallera de longitud completa en una matriz de código de cremallera.

Además, las construcciones mencionadas anteriormente pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) internas a los cebadores Universales (Ai Única, Bi Única), representada como sigue a continuación. Cebador Univ. U1- Ai Única- 1^a ½ de Zi de código de cremallera - Ci Corto -ADN Diana - Ci' Corto - 2^a ½ de Zi de

código de cremallera - Bi Única - Cebador Univ. U2'.

Para detección usando ensayos de Taqman de código de cremallera, después de los 8-20 ciclos de amplificación universal, la muestra se podría diluir de 10 a 100 veces y se podrían añadir cebadores únicos que se superpusieran con la secuencia de Ai Única y la secuencia de Bi Única para cada producto. La sonda Taqman podría ser para la secuencia de código de cremallera de longitud completa.

Dado que cada secuencia de unión entre las secuencias diana es única, los productos de la amplificación universal inicial también se pueden identificar y cuantificar usando secuenciación de próxima generación.

Protocolo Detallado: Detección de Marcador de Metilación de Alta Sensibilidad para hipermetilación de promotor (presente de un 1 % a un 0,01 %) en ADN enriquecido con metilo o ADN de suero total (véase la Figura 2B)

Visión general del enfoque: El ADN genómico aislado, o el ADN enriquecido con metilo se trata con un cóctel de enzimas sensibles a metilo (Acil, HinPII, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI o una combinación de las mismas), así como con enzimas insensibles a metilo (MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, BsaJI, o una combinación de las mismas). La idea es generar un fragmento de ADN de aproximadamente 40 bases o más, en el que el fosfato en la posición 5' del fragmento se origina a partir de una enzima insensible a metilo. El fragmento debería tener al menos 3 sitios de enzima sensible a metilo, de modo que la escisión podría hacer que estos fragmentos se disiparan. Una hebra del fragmento genómico a continuación se hibrida en un molde artificial que contiene una horquilla, con una región cadena arriba, que no está relacionada con el ADN genómico, y puede ligarse al fragmento genómico en el fosfato en la posición 5'. Un oligonucleótido cadena abajo que se hibrida al fragmento genómico cadena abajo de donde se hibridó con la hebra molde se añade. Cuando el cebador específico de locus se extiende, la actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa destruye la parte del molde del oligonucleótido ligado, creando un producto que contiene etiquetas tanto cadena arriba como cadena abajo y que es adecuado para amplificación. El oligonucleótido horquillado sin ligar se extenderá sobre sí mismo y no se amplificará más. Ambos oligonucleótidos cadena arriba y cadena abajo tienen secuencias específicas UniTaq, una secuencia específica de código de cremallera, y secuencias universales fuera, lo que permite una "preamplificación" simultánea durante 8-20 ciclos, antes de la apertura del tubo, y división en los ensayos de UniTaq taqman apropiados. Para cada región de promotor, habrá tres posiciones de interrogación, de modo que se puede ver cuando aparece la señal (el valor de Ct indicando una cantidad relativa de secuencia metilada) así como una fuerza de la señal total (es decir, = 1, 2, o 3 sitios metilados para ese promotor).

Para resumir los niveles de discriminación del enfoque mencionado anteriormente para detección de metilación de baja abundancia:

1. Usar enzima de restricción insensible a la metilación para generar un fosfato en la posición 5' único en el ADN diana bicatenario.
2. Usar enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
3. Usar fidelidad de ligamiento de ligasa termoestable para ligar la etiqueta correcta a la hebra diana.
4. Usar cebador específico de locus y polimerasa para amplificar hebras diana ligadas.
5. Uso de secuencias en el extremo en la posición 3' de oligonucleótidos de etiqueta, de modo que cuando no se ligan, forman horquillas y se extienden sobre ellos mismos para formar productos que no se amplifican.

Etapa 1: Escindir el ADN genómico aislado, o el ADN enriquecido con metilo con un cóctel de enzimas sensibles a metilo (Acil, HinPII, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI o una combinación de las mismas), así como con enzimas insensibles a metilo (MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, BsaJI, o una combinación de las mismas). Generar fragmentos de aproximadamente 40 bases o más que tienen un fosfato en la posición 5' de un sitio insensible a la metilación (es decir, MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, o BsaJI), y al menos un sitio sensible a la metilación (que no se escinden porque estaban metilados). Preferentemente, generar tres fragmentos de ese tipo por promotor. Calentar las endonucleasas de destrucción (65 °C durante 15 minutos, 80 °C durante 20 minutos si se usa endonucleasa termófila) y desnaturalizar el ADN (94 °C 1 minuto). Los moldes artificiales contienen una región de cebador cadena arriba (5' Cebador Universal U1Pm, seguido por UniTaq Ai) así como una región complementaria a UniTaq Ai, y una región complementaria al ADN diana con una Tm de aproximadamente 72 °C). Incubar a 60 °C para permitir la hibridación y el ligamiento de oligonucleótidos horquillados al fosfato la posición 5' del ADN diana si y solo si estaba metilado e hibridado al molde correcto.

Etapa 2: Añadir Taq polimerasa de inicio en caliente, dNTPs, Cebador Universal U1Pm, Cebador Universal U2, y cebadores cadena abajo (que contienen Cebador Universal U2 en la posición 5', seguido por UniTaq Bi, seguido por secuencia diana específica de locus complementaria al fragmento diana con secuencia que está justo cadena abajo de la secuencia de hebra molde artificial). Cuando el cebador específico de locus se extiende, la actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa destruye la parte del molde del oligonucleótido ligado, creando un producto que contiene etiquetas tanto cadena arriba como cadena abajo y que es adecuado para amplificación. El oligonucleótido horquillado sin ligar se extenderá sobre sí mismo y no se amplificará más. De manera ideal, el cebador universal trenza U1Pm y U2 en el LDR y los cebadores del compuesto de PCR son ligeramente más cortos que los

cebadores Universales U1 y U2. Esto permite una amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más elevada (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales U1Pm y U2 se unen preferentemente al producto deseado (en comparación con cebadores compuestos que se unen a productos incorrectos). Además, los cebadores universales U1Pm y U2

5 contienen una secuencia corta en común (es decir, 6-10 bases) para evitar la formación de dímero de cebador. En una variación opcional para minimizar amplificar genes independientes de diana, los cebadores de PCR cadena abajo contienen una base uracilo y un extremo en la posición 3' bloqueado, que se libera con una RNasa-H que escinde la base uracilo cuando el primer se hibrida a su diana. Estas condiciones generan productos de amplificación universal de la secuencia:

10 Cebador Univ. U1Pm- UniTaq Ai -ADN Diana- UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'.

Etapa 3: Abrir el tubo, diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a pocillos de Taqman, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos de UniTaq del formato F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai (en el que F1 es un colorante fluorescente que se inhibe con la molécula inhibidora Q). En estas condiciones,

15 se formarán los siguientes productos secundarios de extensión:

F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai -ADN Diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'.

Esto formará una horquilla, de modo que la secuencia de UniTaq Bi se empareja con la secuencia de UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia del Cebador Univ. U2', la actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa digiere la secuencia de UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente de F1.

20

Como un control para la cantidad total de ADN presente, se puede elegir un fragmento diana cercano en el que el fosfato en la posición 5' se genera mediante una enzima insensible a metilo (HaeIII o MspI), y el resto del fragmento carece de sitios de enzima sensible a metilo. El oligonucleótido cadena arriba que se liga al fragmento diana es una mezcla de dos oligonucleótidos: (i) Un oligonucleótido presente de 1 a 100 con la secuencia específica de UniTaq correcta, y (ii) un oligonucleótido presente de 99 a 100 con una secuencia que tiene aproximadamente 8-10 bases complementarias a su extremo en la posición 3'. Después del suceso de ligamiento y destrucción del molde con UNG y AP endonucleasa, se añaden los cebadores universales para la amplificación por PCR. El producto de ligamiento que contiene las secuencias de UniTaq se amplifica y proporcionará una señal equivalente a 1 de 100 del molde original. La mayor parte del producto de ligamiento carece de la secuencia universal en el extremo la posición 5', y no se amplifica exponencialmente. El cebador cadena arriba no ligado formará una horquilla de nuevo sobre sí mismo y extenderá su propia secuencia en la posición 3' sobre sí mismo, sacándolo de la contención por llegar a formar parte de otro amplicón de PCR. De forma alternativa o además, el control puede usar una proporción diferente de los dos oligonucleótidos, por ejemplo 1:10 o 1:1.000 para permitir comparaciones precisas con niveles bajos del ADN metilado presente en el sitio del promotor de interés. (Por favor véase la Fig. 3).

25

30

35

Un control alternativo usa una mezcla de dos oligonucleótidos: (i) Un oligonucleótido horquillado presente en 1 de 100 con la secuencia específica de UniTaq correcta, y (ii) Un oligonucleótido horquillado presente en 99 de 100 sin la secuencia de UniTaq. Después del suceso de ligamiento, los cebadores universales se añaden para amplificación por PCR. Cuando el cebador específico de locus se extiende, la actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa destruye la parte del molde del oligonucleótido ligado, creando un producto que contiene etiquetas tanto cadena arriba como cadena abajo y que es adecuado para amplificación. El oligonucleótido horquillado sin ligar se extenderá sobre sí mismo y no se amplificará más. El producto de ligamiento que contiene las secuencias de UniTaq se amplifica y proporcionará una señal equivalente a 1 de 100 del molde original. La mayor parte del producto de ligamiento carece de la secuencia universal en el extremo la posición 5', y no se amplifica exponencialmente. (Por favor véase la Fig. 4).

40

45

La detección de metilación altamente sensible se puede llevar a cabo usando matriz código de cremallera, Taqman de código de cremallera, o detección de Taqman tradicional como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el cebador cadena arriba solo necesita contener un Cebador Univ. U1 en la posición 5' seguido por una secuencia de código de cremallera. El cebador cadena abajo solo necesita contener Cebador Univ. U2 en la posición 5' seguido por ADN diana. Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia: Cebador Univ. U1- Zi de código de cremallera -ADN Diana - Cebador Univ. U2'

50

Para detección usando matrices universales que contienen oligonucleótidos de captura, el Cebador Univ. U2 podría contener una etiqueta indicadora, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 podría contener un fosfato en la posición 5', y la amplificación podría continuar durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto podría permitir el uso de exonucleasa lambda para digerir la segunda hebra, haciendo que el producto etiquetado con fluorescencia sea monocatenario y adecuado para hibridación en una materia universal (código de cremallera) que contiene oligonucleótidos de captura.

60

En un enfoque alternativo, la detección de metilación altamente sensible se puede llevar a cabo usando secuencias de código de cremallera de separación. Este enfoque podría usar primeros cebadores de oligonucleótido cadena arriba (Cebador Univ. U1 en la posición 5' seguido por una primera mitad de secuencia Ai de código de cremallera y una secuencia corta Ci), y segundos cebadores de oligonucleótido cadena abajo (Cebador Univ. U2 en la posición 5' seguido por una segunda mitad de secuencia Ai de código de cremallera, la secuencia corta Ci, y ADN diana). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

65

Cebador Univ. U1- 1ª ½ de Zi de código de cremallera - Ci Corto -ADN Diana - Ci' Corto - 2ª ½ de Zi de código de cremallera - Cebador Univ. U2'.

5 Cuando el Ci Corto se hibrida de forma transitoria al Ci' Corto, la 1ª secuencia de la ½ de Zi de código de cremallera se lleva a las proximidades de la 2ª ½ de Zi de código de cremallera, y la hibridación transitoria se puede estabilizar cuando se hibridan ambas secuencias de mitad de Zi de código de cremallera a la secuencia Zi' de código de cremallera de longitud completa en una matriz de código de cremallera.

10 Además, las construcciones mencionadas anteriormente pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) internas a los cebadores Universales (Ai Única, Bi Única), representada como sigue a continuación. Cebador Univ. U1- Ai Única- 1ª ½ de Zi de código de cremallera - Ci Corto -ADN Diana - Ci' Corto - 2ª ½ de Zi de código de cremallera - Bi Única - Cebador Univ. U2'.

15 Para detección usando ensayos de Taqman de código de cremallera, después de los 8-20 ciclos de amplificación universal, la muestra se podría diluir de 10 a 100 veces y se podrían añadir cebadores únicos que se superpusieran con la secuencia de Ai Única y la secuencia de Bi Única para cada producto. La sonda Taqman podría ser para la secuencia de código de cremallera de longitud completa.

20 Dado que cada secuencia de unión entre las secuencias diana es única, los productos de la amplificación universal inicial también se pueden identificar y cuantificar usando secuenciación de próxima generación.

Etiquetado fluorescente: Considerar un instrumento que pueda detectar 5 señales fluorescentes, F1, F2, F3, F4, y F5, respectivamente. Para cada región de promotor, habrá una, dos, o tres posiciones de interrogación, de modo que se puede ver cuando aparece la señal (el valor de Ct indicando una cantidad relativa de secuencia metilada o no metilada) así como una fuerza de la señal total (es decir, = 1, 2, o 3 sitios metilados o no metilados para ese promotor). (Por favor véase la Fig. 10). Para ampliar este concepto un poco más, la reacción de UniTaq proporcionados tipos de señal, el valor de Ct y el punto final, o fuerza de la señal total. Durante la etapa de amplificación universal (2.3c mencionada anteriormente, véase también la Figura 5), el Cebador Universal U2 se usa en todos los amplicones, y debería estar en exceso, aunque cada cebador específico de UniTaq, F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai, can se puede usar para proporcionar una fuerza de señal específica. Por ejemplo, considerar que la escala es 1.000 FU (unidades de fluorescencia). Mediante la titulación de los cebadores tanto etiquetados con fluorescencia (F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai), no etiquetados (UniTaq Bi -Q - UniTaq Ai) de la misma secuencia, la fuerza de la señal final se puede calibrar a un nivel particular, por ejemplo, 100 FU. Considerar siguientes 3 controles, Metilación de Promotor Génico, control de cuantificación de ADN, y controles de ADN no metilado, con un instrumento que puede detectar 5 señales fluorescentes, F1, F2, F3, F4, y F5, respectivamente. Los productos potenciales podrían ser:

Metilación de Promotor del Gen 1

F1-UniTaq B1 - Q - UniTaq A1 - ADN Diana - UniTaq B1' - Cebador Univ. U2'

F1-UniTaq B2 - Q - UniTaq A2 - ADN Diana - UniTaq B2' - Cebador Univ. U2'

F1-UniTaq B3 - Q - UniTaq A3 - ADN Diana - UniTaq B3' - Cebador Univ. U2'

Metilación de Promotor del Gen 2

F2-UniTaq B4 - Q - UniTaq A4 - ADN Diana - UniTaq B4' - Cebador Univ. U2'

F2-UniTaq B5 - Q - UniTaq A5 - ADN Diana - UniTaq B5' - Cebador Univ. U2'

F2-UniTaq B6 - Q - UniTaq A6 - ADN Diana - UniTaq B6' - Cebador Univ. U2'

Metilación de Promotor del Gen 3

F3-UniTaq B7 - Q - UniTaq A7 - ADN Diana - UniTaq B7' - Cebador Univ. U2'

F3-UniTaq B8 - Q - UniTaq A8 - ADN Diana - UniTaq B8' - Cebador Univ. U2'

F3-UniTaq B9 - Q - UniTaq A9 - ADN Diana - UniTaq B9' - Cebador Univ. U2'

Control de Cuantificación de ADN (1:100)

F4-UniTaq B10 - Q - UniTaq A10 - ADN Diana - UniTaq B10' - Cebador Univ. U2'

Control de ADN no metilado

F5-UniTaq B11 - Q - UniTaq A11 - ADN Diana - UniTaq B11' - Cebador Univ. U2'

(Los productos sin etiquetas fluorescentes no se muestran por cuestiones de claridad. Para cada producto fluorescente, en la siguiente ronda de amplificación, el grupo fluorescente se extiende para crear una señal)

En este ejemplo, solo se hace el recuento de un promotor como metilado si 2/3 o 3/3 señales son positivas. Considerar los siguientes resultados después de 45 ciclos:

F1, Ct = 31,5, FU final = 220

F2, Ct = 38,5, FU final = 90

F3, Ct > 45

F4, Ct = 28,5, FU final = 110
F5, Ct > 45

5 El resultado mencionado anteriormente sugiere que el promotor del gen 1 (señal de F1) está completamente metilado en 2/3 de los fragmentos interrogados. Con un valor de ΔCt de 3 en comparación con el control a 1:100, el ADN metilado está presente en 1/800, o aproximadamente un 0,12 %. Esto sería coherente con el ADNcf que surge a partir de un tumor. El promotor del gen 2 (F2), por otro lado, dio alguna señal, lo que sugiere que 1/3 fragmentos estaban metilados, pero con un valor de ΔCt de 10 en comparación con el control a 1:100, el ADN metilado está presente en 1/102.400, o aproximadamente un 0,0009%. Esto probablemente esté en el límite de los equivalentes del genoma
10 interrogados en la muestra de suero y, por lo tanto, probablemente representa la metilación estocástica debido al envejecimiento. El promotor del gen 3 y los controles no metilados no dieron señal.

15 Se reconoce que la identificación de un fragmento de la longitud deseada flanqueada por los sitios de restricción apropiados depende de la secuencia del promotor particular. Sin embargo, este enfoque es susceptible de detectar niveles bajos de promotores no metilados, promotores metilados (análogos al esquema en la Figura 2B), así como amplificaciones de control análogas al esquema en la Figura 4.

20 **Ejemplo profético 2 - Detección de Marcador de No Metilación de Alta Sensibilidad para hipermetilación de promotor (presente de un 1 % a un 0,01 %)**

25 La mayoría de los cambios de metilación en los tumores se deben a la hipometilación. Cuando una hipometilación de ese tipo se produce en una región promotora que anteriormente estaba metilada, puede causar una mayor expresión de un gen, como un oncogén. Además, las regiones de elementos repetitivos y los elementos móviles generalmente se silencian mediante la metilación general, pero dicho silenciamiento se pierde cuando el tumor se hipometila.

30 **Visión general del enfoque:** Aunque las enzimas de restricción sensibles a metilo se pueden usar para ayudar a amplificar e identificar de forma selectiva niveles bajos de secuencias metiladas, el enfoque no funciona para identificar niveles bajos de secuencias no metiladas. Se puede usar el tratamiento con bisulfito y el uso de cebadores de PCR dirigidos a convertir ADN no metilado, aunque dichos cebadores son muy ricos en AT y puede haber dificultades para amplificar todos los fragmentos deseados, especialmente cuando se intenta una PCR multiplexada.

35 La belleza del protocolo de enzima de restricción/LDR/PCR descrito en la Sección 1 (mencionada anteriormente) es que se puede usar directamente para buscar también secuencias no metiladas. En este caso, se necesitan fragmentos que estén limitados en un lado por una enzima sensible a metilo, y a continuación el fragmento debe tener aproximadamente 30-40 bases sin ningún sitio adicional. (Por favor véanse las Figs. 1A y 2A y la discusión en la Sección 1).

40 Existe la posibilidad de que un sitio determinado no esté metilado, mientras que otros sitios cercanos están metilados. Cuando se puntúa que solo un sitio único no está metilado, se requiere que al menos 2 de los 3 sitios dentro de la región promotora proporcionen una señal, y generalmente una región promotora completa está metilada o no metilada.

45 Un enfoque para mejorar la significancia de la puntuación para sitios no metilados es requerir que ambos lados de un fragmento provengan de la escisión de sitios no metilados. A continuación se muestra un esquema que requiere ligamiento en ambos lados de un fragmento no metilado.

Para resumir los niveles de discriminación del enfoque de escisión de sitio doble mencionado anteriormente para detección de sitios no metilados de baja abundancia:

- 50
1. Usar enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada en ambos sitios.
 2. Usar fidelidad de ligamiento de ligasa termoestable para ligar etiquetas correctas a la hebra diana en ambos lados.
 3. Usar uracil ADN glicosilasa para destruir hebras de molde.

55 **Protocolo Detallado para Detección de No Metilación de Promotor de Alta Sensibilidad (presente de un 1 % a un 0,01 %) usando dos sitios (Figura 8)**

60 Etapa 1: Escindir el ADN genómico aislado, o el ADN enriquecido con metilo con un cóctel de enzimas sensibles a metilo (Acil, HinP1I, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI o una combinación de las mismas). Como una opción, cuando de forma simultánea se puntúan sitios metilados de baja abundancia, las enzimas insensibles a metilo (MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, BsaJI, o una combinación de las mismas) se pueden incluir en la reacción de escisión. Generar fragmentos de aproximadamente 25-35 bases que tienen un fosfato en la posición 5' de un sitio Acil, HinP1I, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, o HhaI, y no sitios adicionales sensibles a metilo. Preferentemente, generar tres fragmentos de ese tipo por promotor. La mezcla también contiene cebadores cadena
65 abajo de la secuencia UniTaq Bi' - - Cebador Univ. U2', en la que el extremo la posición 5' ya contiene un grupo fosfato, o como alternativa es parte de una secuencia de restricción que se corta con una de las enzimas de restricción para

enmascarar de forma apropiada un fosfato en la posición 5' adecuado para un ligamiento posterior. (Esto se puede conseguir usando un sitio de restricción dentro de un bucle de horquilla en el extremo la posición 5' del oligonucleótido) con

5 Etapa 2: Calentar las endonucleasas de destrucción (65 °C durante 15 minutos) y desnaturalizar el ADN (94 °C 1 minuto). Añadir moldes artificiales (que contienen uracilo, y desde el lado en la posición 3' complementario a UniTaq Ai, complementario al ADN diana con una Tm de aproximadamente 72 °C, complementario a UniTaq Bi con respecto al lado en la posición 5'), cebadores cadena arriba (que contienen Cebador Universal U1 en la posición 5', seguido por UniTaq Ai), (los cebadores cadena abajo con extremos en la posición 5' liberados ya estarán presentes) y ligasa
10 termostable, e incubar a 60 °C para permitir la hibridación y el ligamiento de cebadores cadena arriba al fosfato la posición 5' del ADN diana y cebado cadena abajo con respecto al extremo de OH en la posición 3' del ADN en diana si y solo si no estaba metilado en ambos lados, e hibridado al molde correcto.

15 Etapa 3: Añadir UNG y AP endonucleasa, Taq polimerasa de inicio en caliente, dNTPs, Cebador Universal U1, Cebador Universal U2. Incubar a 37 °C durante 30 minutos para destruir la hebra molde artificial, activar la polimerasa a 95 °C durante 5 minutos, y a continuación permitir que la amplificación evolucione durante 8-20 ciclos. De manera ideal, el cebador universal trenza U1 y U2 en los cebadores del compuesto de ligamiento son ligeramente más cortos que los cebadores Universales U1 y U2. Esto permite una amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más elevada (es decir, hibridación a
20 65 °C) de modo que los cebadores universales U1 y U2 se unen preferentemente al producto deseado (comparado con los cebadores de LDR compuestos que se unen a productos incorrectos). Además los cebadores universales U1 y U2 contienen una secuencia corta en común (es decir, 6-10 bases) para evitar la formación de dímero de cebador. Estas condiciones de PCR con universal amplifican fragmentos de la secuencia:
Cebador Univ. U1- UniTaq Ai - ADN Diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

25 Etapa 4: diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a pocillos de Taqman, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos de UniTaq del formato F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (en el que F1 es un colorante fluorescente que se inhibe con la molécula inhibidora Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:
30 F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai -ADN Diana- UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Esto formará una horquilla, de modo que la secuencia de UniTaq Bi se empareja con la secuencia de UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia del Cebador Univ. U2', la actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa digiere la secuencia de UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente de F1.
35

Protocolo Detallado para Detección de No Metilación de Promotor de Alta Sensibilidad (presente de un 1 % a un 0,01 %) usando dos sitios (Figura 9A)

40 Una segunda variación podría ser el uso de oligonucleótidos horquillados tanto cadena arriba como cadena abajo. Sin embargo, para que sea eficaz, podría ser necesario activar el cebador de LDR horquillado cadena abajo después de la digestión de restricción. El uso de la nucleasa de Taq polimerasa en la dirección 5' → 3' podría no necesariamente activar el lado en la posición 5' del fragmento diana sin requerir una digestión de restricción. Esto se puede evitar teniendo una falta de coincidencias entre la secuencia del fragmento (es decir, GCGC) y la secuencia diana (es decir, la parte diana complementaria lee AGCG en la dirección 5' → 3' en lugar de CGCG). Los oligonucleótidos horquillados
45 cadena arriba no ligados se extenderán sobre ellos mismos y no se amplifican más. El oligonucleótido de ligamiento cadena abajo tiene una cola en la posición 5' que se escinden mediante la actividad en la dirección 5' → 3' de la Taq polimerasa cuando se hibrida al fragmento de corte, pero la cola que no es de corte se hibrida de nuevo a la región del Cebador Universal U2' de modo que inhibe el cebado del oligonucleótido no ligado.

50 Para resumir los niveles de discriminación del enfoque de escisión de sitio doble mencionado anteriormente para detección de sitios no metilados de baja abundancia:

1. Usar enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada en ambos sitios.
- 55 2. Usar fidelidad de ligamiento de ligasa termoestable para ligar etiquetas correctas a la hebra diana en ambos lados.
3. Usar la actividad de nucleasa en la dirección 5'-3' de la polimerasa o de la Fen nucleasa en la etiqueta cadena abajo.

60 Etapa 1: Preparar una mezcla que contiene enzimas de restricción, moldes horquillados artificiales (véase a continuación), Taq polimerasa opcional (véase a continuación), y ligasa termostable. Escindir el ADN genómico aislado, o el ADN enriquecido con metilo con un cóctel de enzimas sensibles a metilo (Acil, HinP1I, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpalI, HhaI o una combinación de las mismas). Como una opción, cuando de forma simultánea se puntúan
65 sitios metilados de baja abundancia, las enzimas insensibles a metilo (MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, BsaJI, o una combinación de las mismas) se pueden incluir en la reacción de escisión. Generar fragmentos de aproximadamente 40 bases que tienen un fosfato en la posición 5' de un sitio Acil, HinP1I, Hpy99I,

HpyCH4IV, BstUI, HpaII, o HhaI, y no sitios adicionales sensibles a metilo. Preferentemente, generar tres fragmentos de ese tipo por promotor. Calentar las endonucleasas de destrucción (65 °C durante 15 minutos, o a 80 °C durante 20 minutos cuando se usan enzimas termófilas) y desnaturalizar el ADN (94 °C 1 minuto). Los moldes artificiales contienen una región de cebador cadena arriba (Cebador Universal U1 en la posición 5', seguido por UniTaq Ai) así como una región complementaria a UniTaq Ai, y una región complementaria al ADN diana con una Tm de aproximadamente 72 °C). Los moldes artificiales contienen una región de cebador cadena abajo (UniTaqBi' seguido por Cebador Universal U2') así como una región complementaria a UniTaq Bi', y una región complementaria al ADN diana con una Tm de aproximadamente 72 °C). En la variación preferente, el oligonucleótido de ligamiento cadena abajo tiene una cola en la posición 5' que se desciende mediante la actividad en la dirección 5' → 3' de la Taq polimerasa cuando se hibrida al fragmento de corte, pero la cola que no es de corte se hibrida de nuevo a la región del Cebador Universal U2' de modo que inhibe el cebado del oligonucleótido no ligado. Incubar a 60 °C para permitir la hibridación, escisión, y ligamiento de oligonucleótidos horquillados al fosfato en la posición 5' y al OH en la posición 3' del ADN diana si y solo si no estaba metilado en ambos sitios de restricción, e hibridado al molde correcto.

Etapa 2: Añadir dNTP de inicio en caliente o regulares, Cebador Universal U1, y Cebador Universal U2. Cuando se extienden con el Cebador Universal U2, la actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa destruye la parte del molde de ambos oligonucleótidos ligados, crean un producto que contiene etiquetas tanto cadena arriba como cadena abajo y que es adecuado para amplificación. Los oligonucleótidos horquillados cadena arriba no ligados se extenderán sobre ellos y no se amplifican más. De manera ideal, el cebador universal trenza U1 y U2 en los cebadores horquillados solicitante más cortos que los cebadores Universales U1 y U2. Esto permite una amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más elevada (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales U1 y U2 se unen preferentemente al producto deseado (en comparación con cebadores compuestos que se unen a productos incorrectos). Además los cebadores universales U1 y U2 contienen una secuencia corta en común (es decir, 6-10 bases) para evitar la formación de dímero de cebador. Estas condiciones de PCR con universal amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1- UniTaq Ai - ADN Diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Etapa 4: diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a pocillos de Taqman, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos de UniTaq del formato F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (en el que F1 es un colorante fluorescente que se inhibe con la molécula inhibidora Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:

F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai -ADN Diana- UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Esto formará una horquilla, de modo que la secuencia de UniTaq Bi se empareja con la secuencia de UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia del Cebador Univ. U2', la actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa digiere la secuencia de UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente de F1.

40 **Protocolo Detallado para Detección de Metilación o No Metilación de Promotor de Alta Sensibilidad (presente de un 1 % a un 0,01 %) usando dos sitios y sondas ligadas (Figura 9B):**

El enfoque mencionado anteriormente también se puede extender para detectar también metilación de baja abundancia. Además, el concepto de uso de ligamiento en ambos lados se puede extender en un sentido general mediante la unión de los dos moldes horquillados artificiales entre sí de modo que formen un solo molde para el fragmento. La ventaja del uso del diseño unido es que ahora es necesario que la diana correctamente escindida se hibride solo a un molde artificial individual, y esto permite el uso de oligonucleótidos de concentración más baja. El molde artificial tiene dentro del mismo una región de unión o espaciador aquí podría bloquear la extensión de la polimerasa al extremo en la posición 3' de la horquilla no ligada a través del monto de modo que no se pueda ligar asimismo en ausencia de diana, pero no interfiere de una actividad de nucleasa en la dirección 5'-3' de la polimerasa cuando se extiende al Cebador Univ. U2 para destruir la hebra del molde artificial de una diana ligada de forma apropiada.

Etapa 1: Preparar una mezcla que contiene enzimas de restricción, moldes horquillados artificiales (véase a continuación), Taq polimerasa opcional (véase a continuación), y ligasa termostable. (i) Para detección de alta sensibilidad de ADN metilado, escindir el ADN genómico aislado, o el ADN enriquecido con metilo con un cóctel de enzimas sensibles a metilo (AciI, HinP1I, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI o una combinación de las mismas), así como con enzimas insensibles a metilo (MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, BsaJI, o una combinación de las mismas). Generar fragmentos de aproximadamente 20-40 bases o más que tengan un fosfato la dirección 5' de un sitio MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, o BsaJI, y al menos un sitio(s) sensible a metilo (que no se escinde/n porque estaban metilados). Preferentemente, generar tres fragmentos de ese tipo por promotor, (ii) Para detección de alta sensibilidad de ADN no metilado, escindir el genómico aislado con un cóctel de enzimas sensibles a metilo (AciI, HinP1I, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI o una combinación de las mismas). Opcionalmente, si también se detecta una diana metilada de baja abundancia, incluir las enzimas insensibles a metilo (MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, NlaIII, DdeI, BsaJI, o una combinación de las mismas). Generar fragmentos de aproximadamente 20-40 bases o más que tienen un fosfato en la posición 5' de un sitio AciI, HinP1I, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, o HhaI, y no sitios adicionales sensibles a metilo. Preferentemente, generar

tres fragmentos de ese tipo por promotor. Calentar las endonucleasas de destrucción (65 °C durante 15 minutos) y desnaturalizar el ADN (94 °C 1 minuto). Los moldes artificiales contienen una región de cebador cadena arriba (Cebador Universal U1 en la posición 5', seguido por UniTaq Ai) así como una región complementaria a UniTaq Ai, y una región complementaria a la de mediana, un espaciador o análogo de nucleótido que termina la extensión de la polimerasa, una región complementaria a la de mediana, la región complementaria a UniTaq Bi', Cebador Universal U2', seguido por UniTaqBi'. El molde artificial no se escinde con enzimas de restricción usando: (i) 5-metil C en el monte, Ibarra o (ii) alterando la secuencia en las uniones del ligamiento de modo que no se reconocen con la enzima de restricción. La variación preferente, la parte cadena bajo hotel oligonucleótido de ligamiento unido tiene una cola en la posición 5' que se escinde mediante la actividad de en la dirección 5' → 3' de la Taq polimerasa cuando se hibridar al fragmento de corte, pero la cola no cortadas se hibridar de nuevo a la región del Cebador Universal U2' de modo que inhibe el cebado del oligonucleótido no ligado. Incubar a 60 °C para permitir la hibridación, escisión, y ligamiento de oligonucleótidos horquillados unidos fosfato en la dirección 5' y OH en la dirección 3' del ADN dianas si y solo si estaba metilado (usando enzimas al igual que en (i)) o no metilado (usando enzimas al igual que en (ii)) en ambos sitios de restricción, e hibridado al molde correcto.

Etapa 2: Añadir dNTP de inicio en caliente o regulares, Cebador Universal U1, y Cebador Universal U2. Cuando se hace la extensión con el Cebador Universal U2, la actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa destruye la parte del molde del oligonucleótido ligado, creando un producto que contiene etiquetas tanto cadena arriba como cadena abajo y que es adecuado para amplificación. La horquilla cadena arriba de los oligonucleótidos no ligados se extenderá sobre los mismos hasta que alcancen la región espaciadora o de bloqueo en el molde, y no se amplifican más. De manera ideal, el cebador universal trenza U1 y U2 en los oligonucleótidos horquillados que son ligeramente más cortos que los Cebadores Universales U1 y U2. Esto permite una amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más elevada (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales U1 y U2 se unen preferentemente al producto deseado (en comparación con cebadores compuestos que se unen a productos incorrectos). Además los cebadores universales U1 y U2 contienen una secuencia corta en común (es decir, 6-10 bases) para evitar la formación de dímero de cebador. Estas condiciones de PCR universal amplifican fragmentos de la secuencia:
Cebador Univ. U1- UniTaq Ai - ADN Diana - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Etapa 4: diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a pocillos de Taqman, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos de UniTaq del formato F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (en el que F1 es un colorante fluorescente que se inhibe con la molécula inhibidora Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:
F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai -ADN Diana- UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Esto formará una horquilla, de modo que la secuencia de UniTaq Bi se empareja con la secuencia de UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia del Cebador Univ. U2', la actividad de exonucleasa en la dirección 5' → 3' de la polimerasa digiere la secuencia de UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente de F1. La detección de no metilación o metilación altamente sensible se puede llevar a cabo usando matriz código de cremallera, Taqman de código de cremallera o detección de Taqman tradicional como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el cebador cadena arriba solo necesita contener un Cebador Univ. U1 en la posición 5' seguido por una secuencia de código de cremallera. El cebador cadena abajo solo necesita contener Cebador Univ. U2 en la posición 5' seguido por ADN diana. Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:
Cebador Univ. U1- Zi de código de cremallera -ADN Diana - Cebador Univ. U2'

Para detección usando matrices universales que contienen oligonucleótidos de captura, el Cebador Univ. U2 podría contener una etiqueta indicadora, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 podría contener un fosfato en la posición 5', y la amplificación podría continuar durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto podría permitir el uso de exonucleasa lambda para digerir la segunda hebra, haciendo que el producto etiquetado con fluorescencia sea monocatenario y adecuado para hibridación en una materia universal (código de cremallera) que contiene oligonucleótidos de captura.

En un enfoque alternativo, la detección de metilación altamente sensible se puede llevar a cabo usando secuencias de código de cremallera de separación. Este enfoque podría usar primeros cebadores de oligonucleótido cadena arriba (Cebador Univ. U1 en la posición 5' seguido por una primera mitad de secuencia Ai de código de cremallera y una secuencia corta Ci) y segundos cebadores de oligonucleótido cadena abajo (Cebador Univ. U2 en la posición 5' seguido por una segunda mitad de secuencia Ai de código de cremallera, la secuencia corta Ci, y ADN diana). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:
Cebador Univ. U1- 1^a ½ de Zi de código de cremallera - Ci Corto -ADN Diana - Ci' Corto - 2^a ½ de Zi de código de cremallera - Cebador Univ. U2'

Cuando el Ci Corto se hibrida de forma transitoria al Ci' Corto, la 1^a secuencia de ½ de Zi de código de cremallera se lleva a las proximidades de la 2^a ½ de Zi de código de cremallera, y la hibridación transitoria se puede estabilizar cuando se hibridan ambas secuencias de mitad de Zi de código de cremallera a la secuencia Zi' de código de cremallera de longitud completa en una matriz de código de cremallera.

Además, las construcciones mencionadas anteriormente pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) internas a los cebadores Universales (Ai Única, Bi Única), representada como sigue a continuación.

5 Cebador Univ. U1- Ai Única- 1^a ½ de Zi de código de cremallera - Ci Corto -ADN Diana - Ci' Corto - 2^a ½ de Zi de código de cremallera - Bi Única - Cebador Univ. U2'

10 Para detección usando ensayos de Taqman de código de cremallera, después de los 8-20 ciclos de amplificación universal, la muestra se podría diluir de 10 a 100 veces y se podrían añadir cebadores únicos que se superponen con la secuencia de Ai Única y la secuencia de Bi Única para cada producto. La sonda Taqman podría ser la secuencia del código de cremallera de longitud completa.

Dado que cada secuencia de unión entre las secuencias diana es única, los productos de la amplificación universal inicial también se pueden identificar y cuantificar usando secuenciación de próxima generación.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar, en una muestra que se ha obtenido, una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico de la muestra en uno o más restos metilados, comprendiendo dicho método:

someter una o más moléculas de ácido nucleico diana en la muestra a al menos una reacción de digestión enzimática insensible a la metilación y al menos una reacción de digestión enzimática sensible a la metilación para formar una pluralidad de productos de digestión;

desnaturalizar los productos de digestión para formar productos de digestión monocatenarios;

proporcionar una pluralidad de adaptadores de oligonucleótido, comprendiendo cada adaptador de oligonucleótido una primera parte específica de cebador y un extremo en la posición 3', dicho extremo en la posición 3' configurado para ligarse a una parte en la posición 5' de un producto de digestión monocatenario e hibridado a su complemento, en donde el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región de oligonucleótido que es complementaria a una parte en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, extendiéndose dicha parte a través de la secuencia de digestión enzimática insensible a la metilación del producto de digestión monocatenario;

someter los productos de digestión a una reacción de ligamiento que comprende un tratamiento de hibridación, en el que cada uno de los productos de digestión monocatenarios se hibridan a su región complementaria del complemento de adaptador de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del adaptador es adyacente al extremo en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, y a un tratamiento de ligamiento, en el que el extremo en la posición 3' del adaptador de oligonucleótido se liga al extremo la posición 5' del producto de digestión monocatenario adyacente formando de ese modo productos de digestión etiquetados con adaptador;

proporcionar uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario, comprendiendo cada conjunto de cebador primario (i) un primer cebador de oligonucleótido primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la primera parte específica de cebador de los productos de digestión etiquetados con adaptador y (ii) un segundo cebador de oligonucleótido primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región del producto de digestión que está en la posición 3' con respecto a uno o más sitios de restricción metilados, sin escindir, y una segunda parte específica de cebador;

mezclar la pluralidad de productos de digestión etiquetados con adaptador, el uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario y una primera polimerasa para formar una primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa;

someter la primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión formando de ese modo productos primarios de extensión; y

detectar y distinguir los productos primarios de extensión, identificando de ese modo la presencia de una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico en la muestra en uno o más restos metilados.

2. Un método para identificar, en una muestra que se ha obtenido, una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico de la muestra en uno o más restos no metilados, comprendiendo dicho método:

someter una o más moléculas de ácido nucleico diana en la muestra a al menos una reacción de digestión enzimática sensible a la metilación para formar una pluralidad de productos de digestión que comprende uno o más restos no metilados;

desnaturalizar los productos de digestión para formar productos de digestión monocatenarios;

proporcionar una pluralidad de adaptadores de oligonucleótido, comprendiendo cada adaptador de oligonucleótido una primera parte específica de cebador y un extremo en la posición 3', dicho extremo en la posición 3' configurado para ligarse a una parte en la posición 5' de un producto de digestión monocatenario e hibridado a su complemento, en donde el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región de oligonucleótido que es complementaria a una parte en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, extendiéndose dicha parte a través de la secuencia de digestión enzimática sensible a la metilación del producto de digestión monocatenario;

someter los productos de digestión a una reacción de ligamiento que comprende un tratamiento de hibridación, en el que cada uno de los productos de digestión monocatenarios se hibridan a su región complementaria del complemento de adaptador de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del adaptador es adyacente al extremo en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, y a un tratamiento de ligamiento, en el que el extremo en la posición 3' del adaptador de oligonucleótido se liga al extremo la posición 5' del producto de digestión monocatenario adyacente formando de ese modo productos de digestión etiquetados con adaptador;

proporcionar uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario, comprendiendo cada conjunto de cebador de oligonucleótido primario (i) un primer cebador de oligonucleótido primario que comprende la secuencia de nucleótidos que es la misma que la primera parte específica de cebador de los productos de digestión etiquetados con adaptador y (ii) un segundo cebador de oligonucleótido primario que comprende una secuencia de nucleótidos, que es complementaria a una región de la parte del producto de digestión del producto de digestión

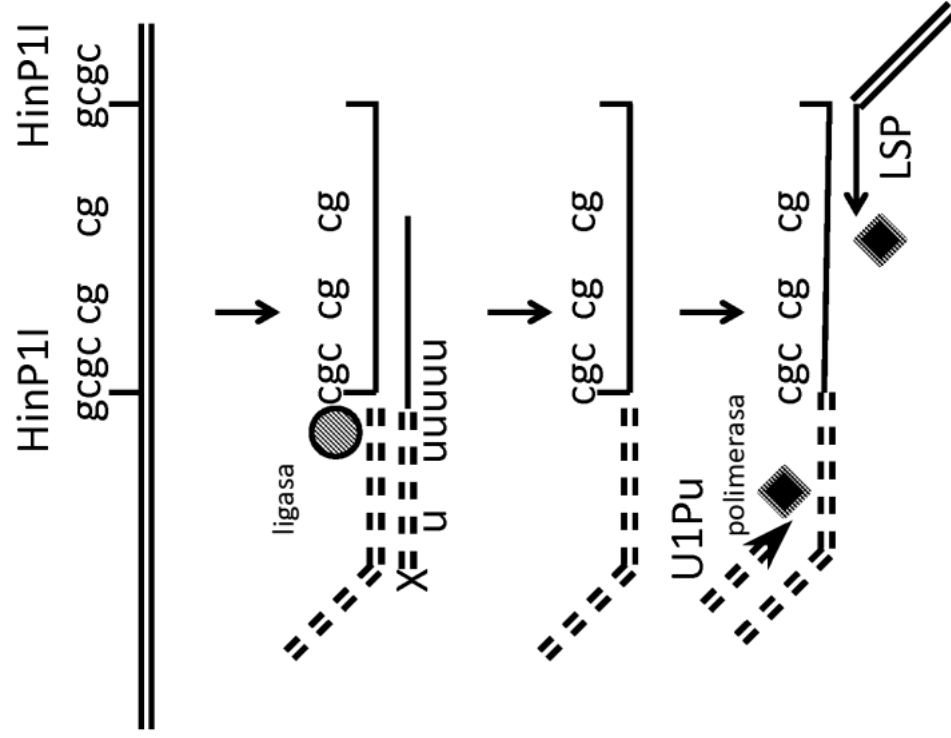
- etiquetado con adaptador, y una segunda parte específica de cebador;
mezclar la pluralidad de productos de digestión etiquetados con adaptador, el uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario y una primera polimerasa para formar una primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa;
- 5 someter la primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión formando de ese modo productos primarios de extensión; y
detectar y distinguir los productos primarios de extensión, identificando de ese modo la presencia de una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico de la muestra en uno
10 o más restos no metilados.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que cada complemento del extremo en la posición 3' acoplado a la región complementaria a la parte en la posición 5' del producto de digestión es un oligonucleótido que contiene uracilo.
- 15 4. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la primera parte específica de cebador y el complemento del extremo en la posición 3' de cada adaptador de oligonucleótido se acoplan para permitir que dicho adaptador de oligonucleótido forme una horquilla.
5. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que los adaptadores de oligonucleótido además comprenden una parte de código de cremallera, en el que las partes de código de cremallera se hibridan a oligonucleótidos de captura complementarios de una colección de oligonucleótidos de captura en condiciones de hibridación uniformes.
- 20 6. Un método para identificar, en una muestra que se ha obtenido, una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico de la muestra en uno o más restos no metilados, comprendiendo dicho método:
- 30 someter una o más moléculas de ácido nucleico diana en la muestra a una digestión enzimática sensible a la metilación que digiere moléculas de ácido nucleico sin metilar, pero no metiladas para formar una pluralidad de productos de digestión que comprenden uno o más restos no metilados;
desnaturalizar los productos de digestión para formar productos de digestión monocatenarios;
proporcionar una pluralidad de conjuntos de adaptador de oligonucleótido, comprendiendo cada conjunto de adaptadores de oligonucleótido (a) un primer adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 3' configurado para ligarse a un extremo en la posición 5' de un producto de digestión monocatenario e hibridado a su complemento, en donde el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región de oligonucleótido que es complementaria a una parte en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, extendiéndose dicha parte a través de la primera secuencia de digestión enzimática sensible a la metilación del producto de digestión monocatenario y (b) un segundo adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 5' configurado para ligarse al extremo en la posición 3' del producto de digestión monocatenario e hibridado a su complemento, en donde el complemento del extremo en la posición 5' está acoplado a una región de oligonucleótido que es complementaria a una parte en la posición 3' del producto de digestión monocatenario, extendiéndose dicha parte a través de la segunda secuencia de digestión enzimática sensible a la metilación del producto de digestión monocatenario;
- 35 someter los productos de digestión a una reacción de ligamiento que comprende un tratamiento de hibridación, en el que cada uno de los productos de digestión monocatenarios se hibridan a sus regiones complementarias del primer y el segundo adaptadores de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del primer adaptador es adyacente al extremo en la posición 5' del producto de digestión monocatenario y el extremo la posición 5' del segundo adaptado es adyacente al extremo en la posición 3' del producto de digestión monocatenario, y a un tratamiento de ligamiento en el que los adaptadores de oligonucleótido se ligan a sus productos de digestión monocatenarios hibridados formando de ese modo productos de digestión etiquetados con adaptador doble; y
detectar productos de digestión etiquetados con adaptador doble, identificando de ese modo una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico de la muestra en uno o más restos no metilados.
- 40 45 50
- 55 7. Un método para identificar, en una muestra que se ha obtenido, una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico de la muestra en uno o más restos metilados, comprendiendo dicho método:
- 60 someter una o más moléculas de ácido nucleico diana en la muestra a al menos una reacción de digestión enzimática insensible a la metilación y al menos una reacción de digestión enzimática sensible a la metilación para formar una pluralidad de productos de digestión que comprenden uno o más sitios de restricción sin escindir metilados;
desnaturalizar los productos de digestión para formar productos de digestión monocatenarios;
proporcionar una pluralidad de conjuntos de adaptador de oligonucleótido, comprendiendo cada conjunto de adaptadores de oligonucleótido (a) un primer adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 3' configurado para ligarse a un extremo en la posición 5' de un producto de digestión monocatenario e hibridado a
- 65

- su complemento, en donde el complemento del extremo en la posición 3' está acoplado a una región de oligonucleótido que es complementaria a una parte en la posición 5' del producto de digestión monocatenario, extendiéndose dicha parte a través de la primera secuencia de digestión enzimática insensible a la metilación del producto de digestión monocatenario, y (b) un segundo adaptador de oligonucleótido que tiene un extremo en la posición 5' configurado para ligarse al extremo en la posición 3' del producto de digestión monocatenario e hibridado a su complemento, en donde el complemento del extremo en la posición 5' está acoplado a una región de oligonucleótido que es complementaria a una parte en la posición 3' del producto de digestión monocatenario, extendiéndose dicha parte a través de la segunda secuencia de digestión enzimática insensible a la metilación del producto de digestión monocatenario;
- 5 someter los productos de digestión a una reacción de ligamiento que comprende un tratamiento de hibridación, en el que cada uno de los productos de digestión monocatenarios se hibridan a sus regiones complementarias del primer y el segundo adaptadores de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores de oligonucleótido de una manera específica de secuencia de modo que el extremo en la posición 3' del primer adaptador es adyacente al extremo en la posición 5' del producto de digestión monocatenario y el extremo la posición 5' del segundo adaptador es adyacente al extremo en la posición 3' del producto de digestión monocatenario, y a un tratamiento de ligamiento en el que los adaptadores de oligonucleótido se ligan a sus productos de digestión monocatenarios hibridados formando de ese modo productos de digestión etiquetados con adaptador doble; y
- 10 detectar productos de digestión etiquetados con adaptador doble, identificando de ese modo una o más moléculas de ácido nucleico diana que se diferencian de otras moléculas de ácido nucleico de la muestra en uno o más restos metilados.
- 20
8. El método de las reivindicaciones 6 o 7, en el que uno de los adaptadores de oligonucleótido del conjunto de adaptadores de oligonucleótido comprende una etiqueta detectable.
- 25
9. El método de las reivindicaciones 6 o 7, en el que cada complemento del extremo en la posición 3' del primer adaptador de oligonucleótido acoplado a la región complementaria a la parte en la posición 5' del producto de digestión y cada complemento del extremo en la posición 5' del segundo adaptador de oligonucleótido acoplado a la región complementaria a la parte la posición 3' del producto de digestión es un oligonucleótido que contiene uracilo.
- 30
10. El método de las reivindicaciones 6 o 7, en el que el extremo en la posición 3' y el complemento del extremo en la posición 3' del primer adaptador de oligonucleótido se acoplan para permitir que dicho primer adaptador de oligonucleótido forme una horquilla y en el que el extremo la posición 5' y el complemento del extremo en la posición 5' del segundo adaptador de oligonucleótido se acoplan para permitir que el segundo adaptador de oligonucleótido forme una horquilla.
- 35
11. El método de la reivindicación 10, en el que el segundo adaptador de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores además comprende una parte de solapa de oligonucleótido en la posición 5' que contiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región en la posición 3' del segundo adaptador de oligonucleótido, en donde dicha parte de solapa de oligonucleótido en la posición 5' se escinde antes de dicho tratamiento de ligamiento.
- 40
12. El método de las reivindicaciones 1 o 7, en el que la reacción de digestión insensible a la metilación se lleva a cabo usando una o más enzimas endonucleasa de restricción seleccionadas entre el grupo que consiste en MspI, HaeIII, AluI, TaqI, HpyCH4V, HpyCH4III, BfaI, N1aIII, DdeI, BsaJI y combinaciones de las mismas.
- 45
13. El método de las reivindicaciones 1, 2, 6 o 7, en el que la reacción de digestión insensible a la metilación se lleva a cabo usando una o más enzimas endonucleasa de restricción seleccionadas entre el grupo que consiste en AclI, HinP1I, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI y combinaciones de las mismas
- 50
14. El método de las reivindicaciones 6 o 7, en el que el primer adaptador de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores de oligonucleótido además comprende una primera parte específica de cebador acoplada al extremo en la posición 3' y el segundo adaptador de oligonucleótido del conjunto de adaptadores de oligonucleótido comprende una segunda parte específica de cebador acoplada al extremo la posición 5', comprendiendo dichos productos de digestión etiquetados con adaptador doble la primera parte específica de cebador, el producto de digestión y la segunda parte específica de cebador, dicho método comprendiendo además:
- 55
- proporcionar uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario, comprendiendo cada conjunto de cebador primario (i) un primer cebador de oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es la misma que la primera parte específica de cebador de los productos de digestión etiquetados con adaptador doble y (ii) un segundo cebador de oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la segunda parte específica de cebador de los productos de digestión etiquetados con adaptador doble;
- 60
- mezclar la pluralidad de productos de digestión etiquetados con adaptador doble, el uno o más conjuntos de cebador de oligonucleótido primario y una primera polimerasa para formar una primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa; y
- 65
- someter la primera mezcla de reacción en cadena de la polimerasa a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión formando de ese modo productos primarios de extensión, de modo que dicha detección implica la

detección de los productos primarios de extensión.

5 15. El método de las reivindicaciones 1, 2 o 14, en el que uno del primer o segundo cebadores de oligonucleótido de un conjunto de cebadores de oligonucleótido comprende una etiqueta detectable, de modo que dicha detección implica la detección de productos primarios de extensión etiquetados.

10 16. El método de la reivindicación 14, en el que uno o ambos de los adaptadores de oligonucleótido de un conjunto de adaptadores de oligonucleótido además comprenden una parte de código de cremallera, en donde las partes de código de cremallera se hibridan a oligonucleótidos de captura complementarios de una colección de oligonucleótidos de captura en condiciones de hibridación uniformes.



- 1. Restricción:** El ADNds se escinde mediante enzima de restricción sensible a la metilación (por ejemplo, HinP1I). Los fragmentos restringidos por ADNds se desnaturalizan, proporcionando un 5' fosfato único en un fragmento de ADN monocatenario (ss) adecuado para ligamiento a un oligonucleótido adaptador. El ADNss que está presente en la muestra no se digiere con estas enzimas y no generará un 5' fosfato de ese tipo.
- 2. Ligamiento:** los adaptadores de oligonucleótido que contienen un ácido que se extienden a los sitios HinP1I sirven como un molde para ligamiento de adaptadores que tienen etiquetas en la posición 5' para el ADNss: diferentes etiquetas se pueden ligar al ADN restringido por HinP1I.
- 3. El tratamiento con UDG (uracil ADN glicosilasa) digiere la parte del adaptador que contiene uracilo.**
- 4. PCR se lleva a cabo usando cebador(es) específicos de locus etiquetados (LSP) y cebadores universales U1Pu específicos para etiquetas no metiladas.**

Figura 1A

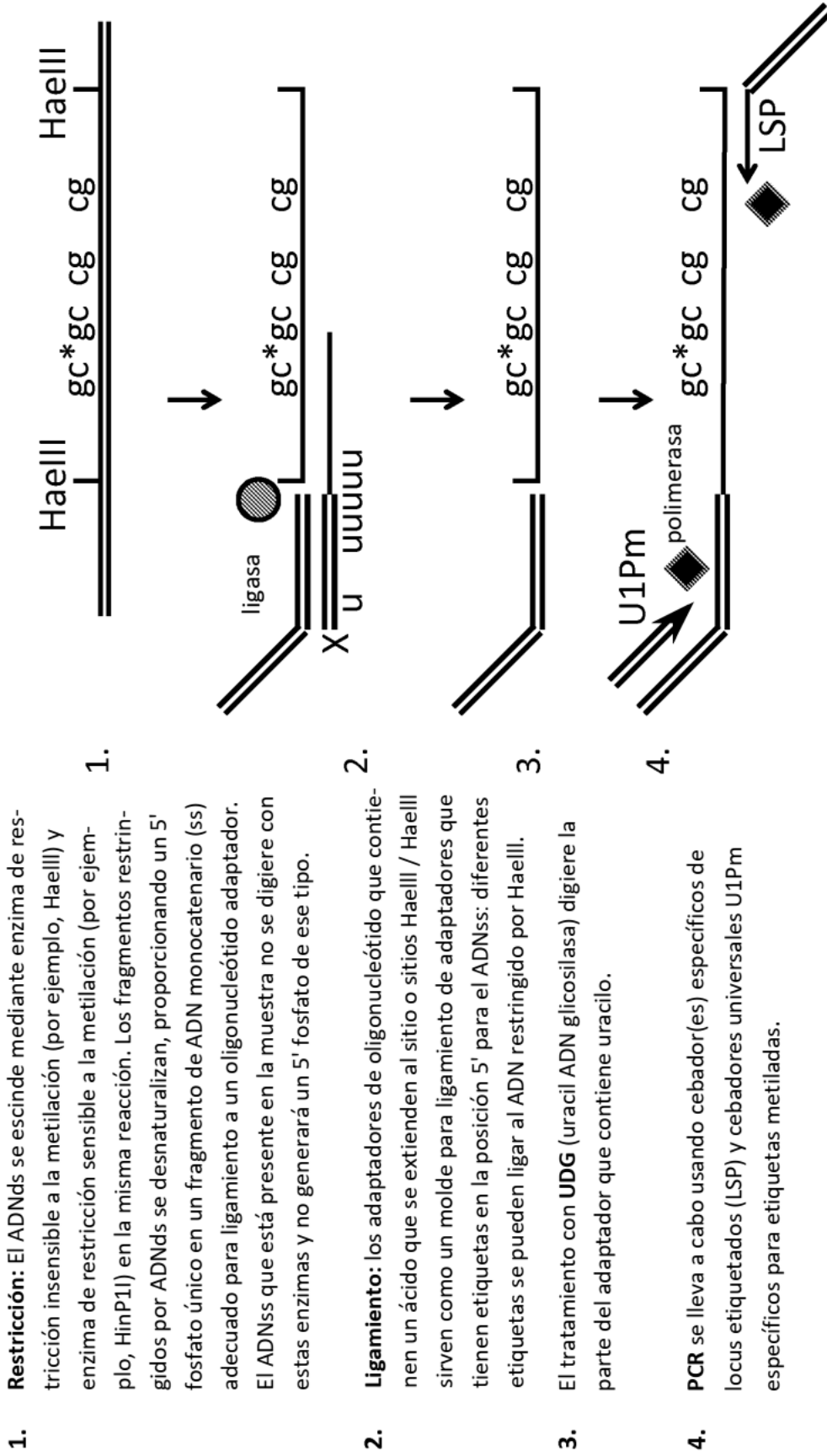
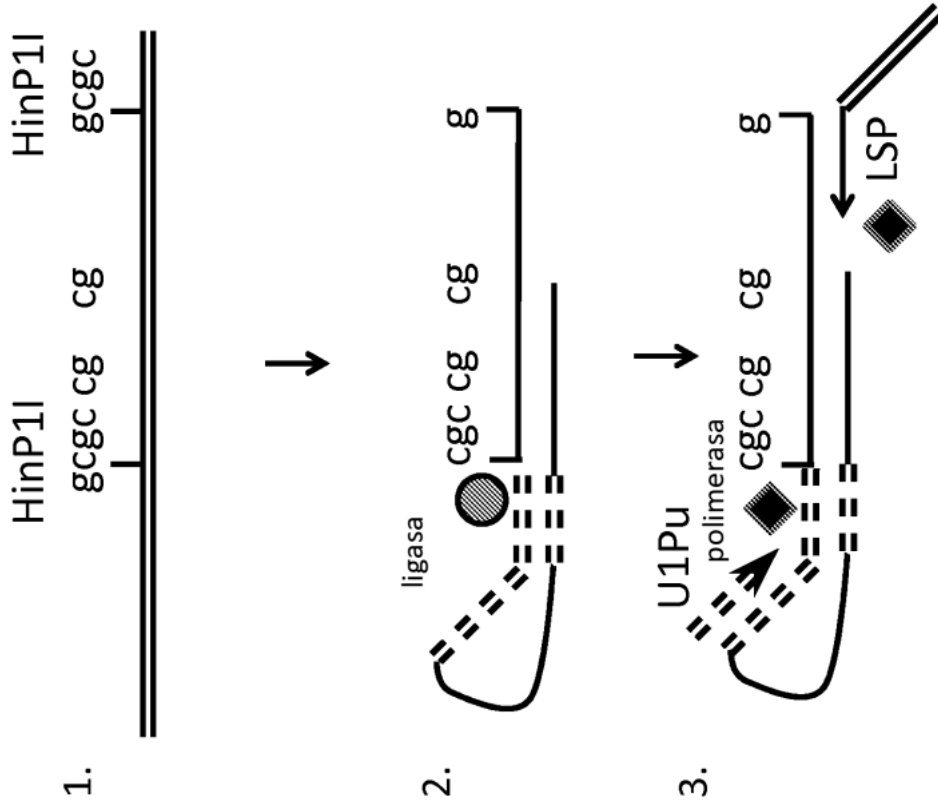


Figura 1B

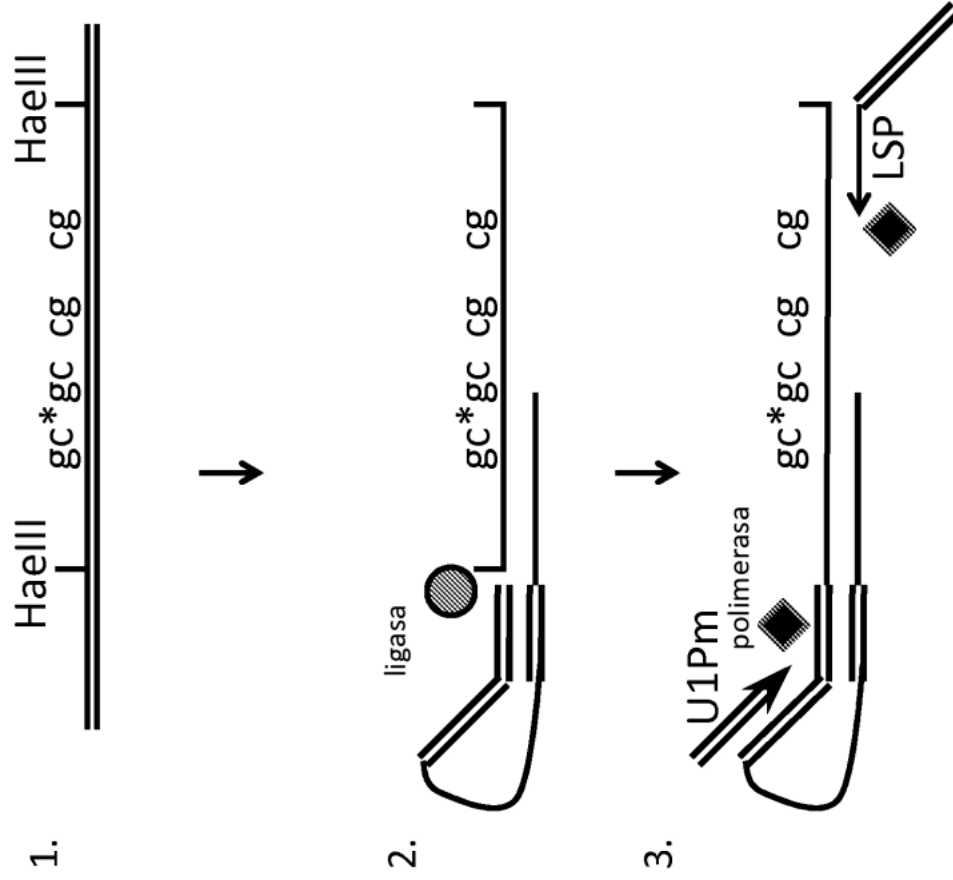


1. Restricción: El ADN se escinde mediante la enzima de restricción sensible a la metilación (por ejemplo, HinP1I). Los fragmentos restringidos por ADNds se desnaturalizan, proporcionando un 5' fosfato único en un fragmento monocatenario adecuado para ligamiento a un oligonucleótido adaptador. El ADNss que está presente en la muestra no se digiere con estas enzimas y no generará un 5' fosfato de ese tipo.

2. Ligamiento: los adaptadores de oligonucleótido que contienen horquilla que se extienden al sitio HinP1I sirven como asociado/moldes de ligamiento doble y contienen etiquetas: diferentes etiquetas se pueden ligar fragmentos de ADNss restringidos por HinP1I.

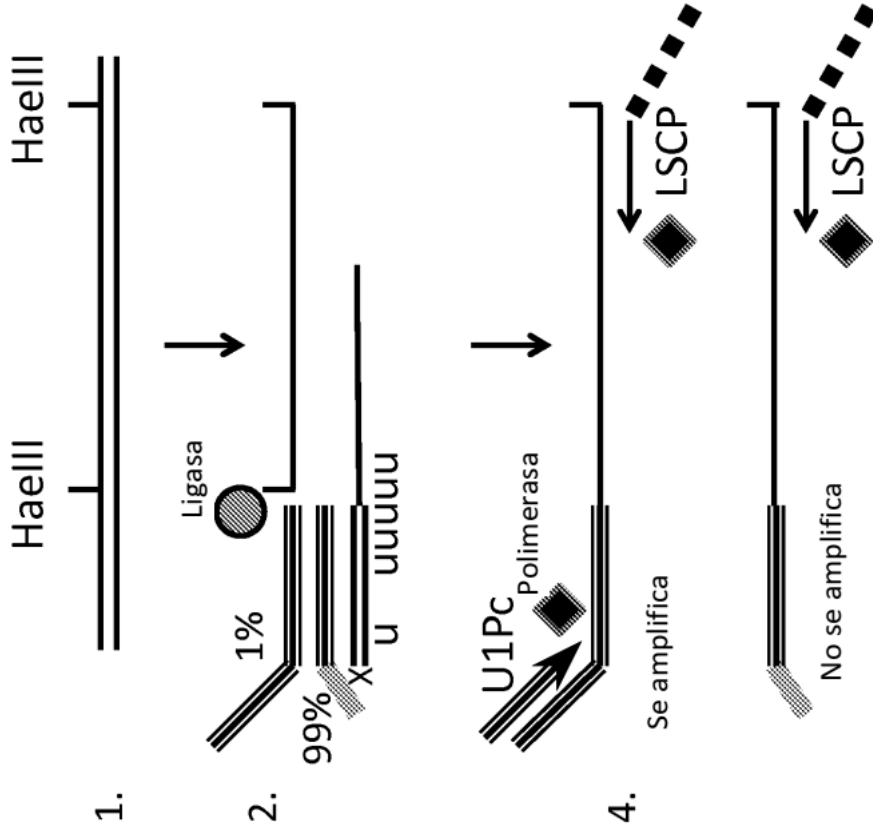
3. La PCR se lleva a cabo usando cebador específico del locus etiquetado (LSP) y cebadores universales U1Pu específicos para etiquetas que corresponden a ADN no metilado. La actividad de exonucleasa en la dirección 5'→3' de la polimerasa destruye la parte del molde del adaptador ligado, creando un producto que contiene etiquetas tanto hacia arriba como hacia abajo y adecuado para amplificación. El adaptador horquillado sin ligarse se extenderá sobre sí mismo y no se amplificará más.

Figura 2A



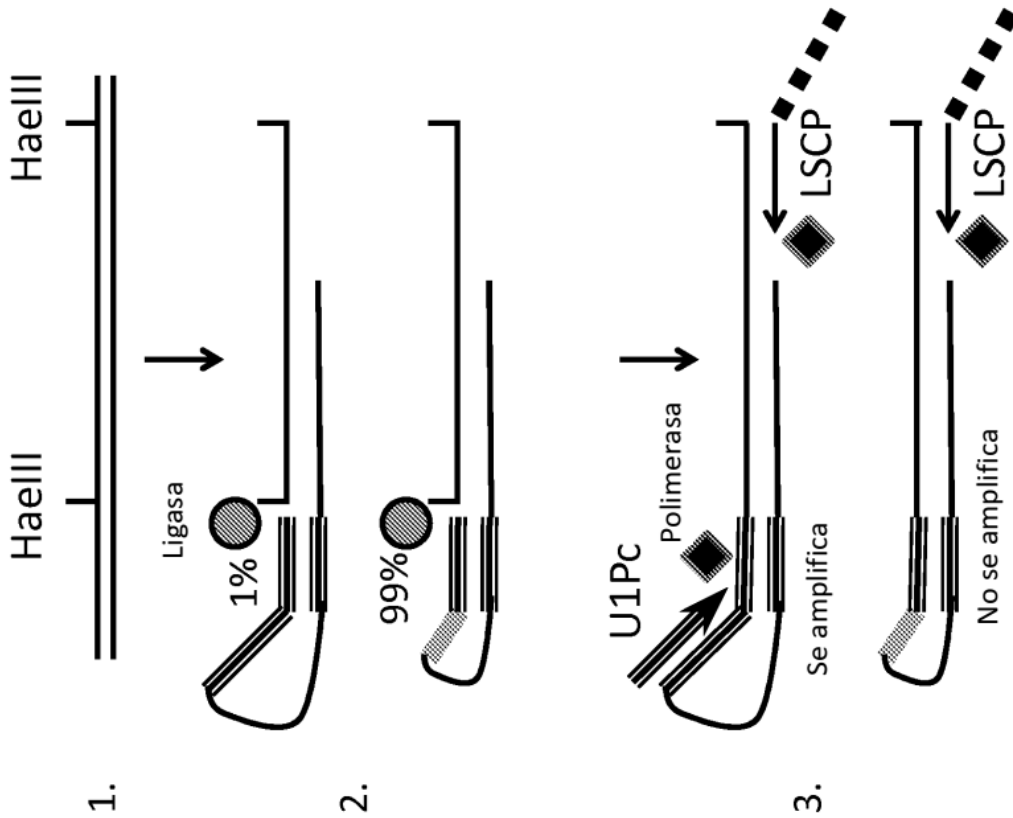
1. **Restricción:** El ADNds se escinde mediante enzima de restricción insensible a la metilación (por ejemplo, HaeIII) y enzima de restricción sensible a la metilación (por ejemplo, HinP1) en la misma reacción. Los fragmentos restringidos por ADNds se desnaturalizan, proporcionando un 5' fosfato único en un fragmento monocatenario adecuado para ligamiento a un oligonucleótido adaptador. El ADNss que está presente en la muestra no se digiere con estas enzimas y no generará un 5' fosfato de ese tipo.
2. **Ligamiento:** Los adaptadores de oligonucleótido que contienen horquilla que se extienden al sitio o sitios HaeIII / HinP1 sirven como asociado/moldes de ligamiento doble y contienen etiquetas: diferentes etiquetas se pueden ligar a fragmentos de ADNss restringidos por HaeIII.
3. La **PCR** se lleva a cabo usando cebador específico del locus etiquetado (LSP) y cebadores universales U1Pm específicos para etiquetas que corresponden a ADNss metilado. La actividad de exonucleasa en la dirección 5'→3' de la polimerasa destruye la parte del molde del adaptador ligado, creando un producto que contiene etiquetas tanto cadena arriba como cadena abajo y adecuado para amplificación. El adaptador horquillado sin ligar se extenderá sobre sí mismo y no se amplificará más.

Figura 2B



- 1. Restricción:** solo el ADNds, está restringido por enzima de restricción insensible a la metilación, por ejemplo, HaeIII. A continuación los fragmentos restringidos por ADNds se funden.
- 2. Ligamiento:** un adaptador que contiene uracilo que se extiende al sitio HaeIII sirve como un molde para ligamiento de adaptador universal con una etiqueta en la posición 5' que es diferente a las etiquetas que se muestran en las Figs. 1 y 2. Se usa una mezcla de dos adaptadores en proporciones conocidas, por ejemplo, 1: 99 como se muestra.
El tratamiento con **UDG** (uracil ADN glicosilasa) digiere la parte del adaptador que contiene uracilo (no se muestra).
- 4.** La **PCR** se lleva a cabo usando cebador de control específico del locus etiquetado (LSCP) y control de cebador universal (U1Pc) con etiquetas específicas para ADN de control. Un 99 % del ADN está ligado a adaptador no amplificante; solo un 1 % del ADN está amplificado indicando la señal generada a partir de un equivalente de un 1 % de ADN metilado o no metilado.

Figura 3



- 1. Restricción:** solo el ADNds, está restringido por enzima de restricción insensible a la metilación, por ejemplo, HaeIII. A continuación los fragmentos restringidos por ADNds se funden.
- 2. Ligamiento:** los adaptadores de oligonucleótido que contienen horquilla que se extienden al sitio HaeIII sirven como asociado/moldes de ligamiento doble y contienen etiquetas que son diferentes de las etiquetas que se muestran en las Figs. 1 y 2. Se usa una mezcla de dos adaptadores horquillados en proporciones conocidas, por ejemplo, 1 : 99 como se muestra.

- 3. La PCR** se lleva a cabo usando cebador de control específico del locus etiquetado (LSCP) y control de cebador universal (U1Pc) con etiquetas específicas para ADN de control. La actividad de exonucleasa en la dirección 5'→3' de la polimerasa destruye la parte del molde del adaptador ligado, creando un producto que contiene etiquetas tanto cadena arriba como cadena abajo y adecuado para amplificación. El adaptador horquillado sin ligarse extenderá sobre sí mismo y no se amplificará más. Un 99 % del ADN está ligado a adaptador no amplificante; solo un 1 % del ADN está amplificado indicando la señal generada a partir de un equivalente de un 1 % de ADN metilado o no metilado.

Figura 4

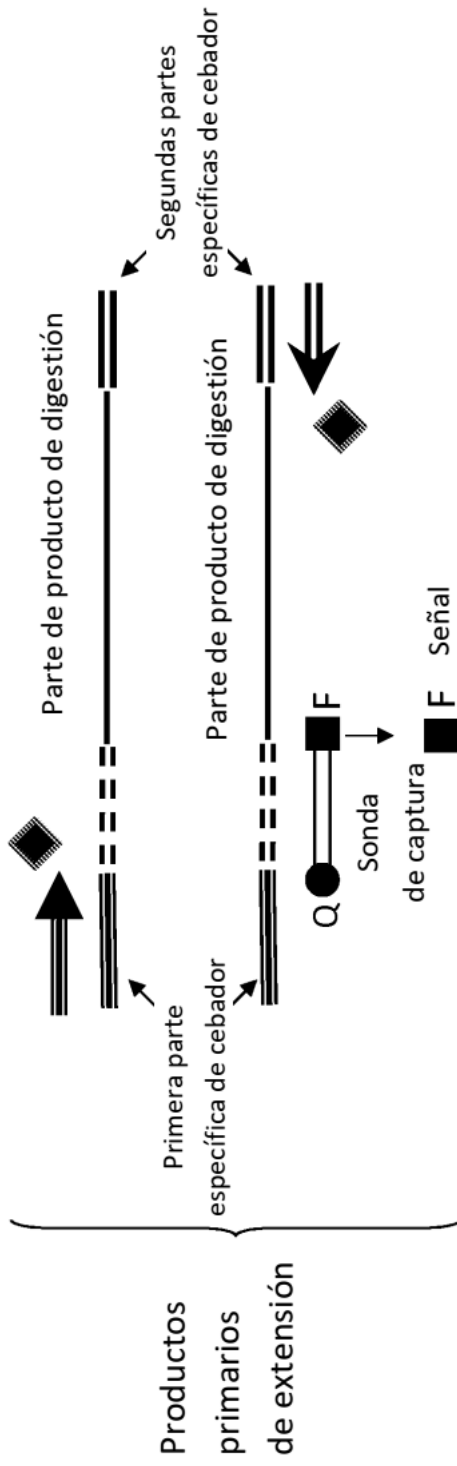


Figura 5

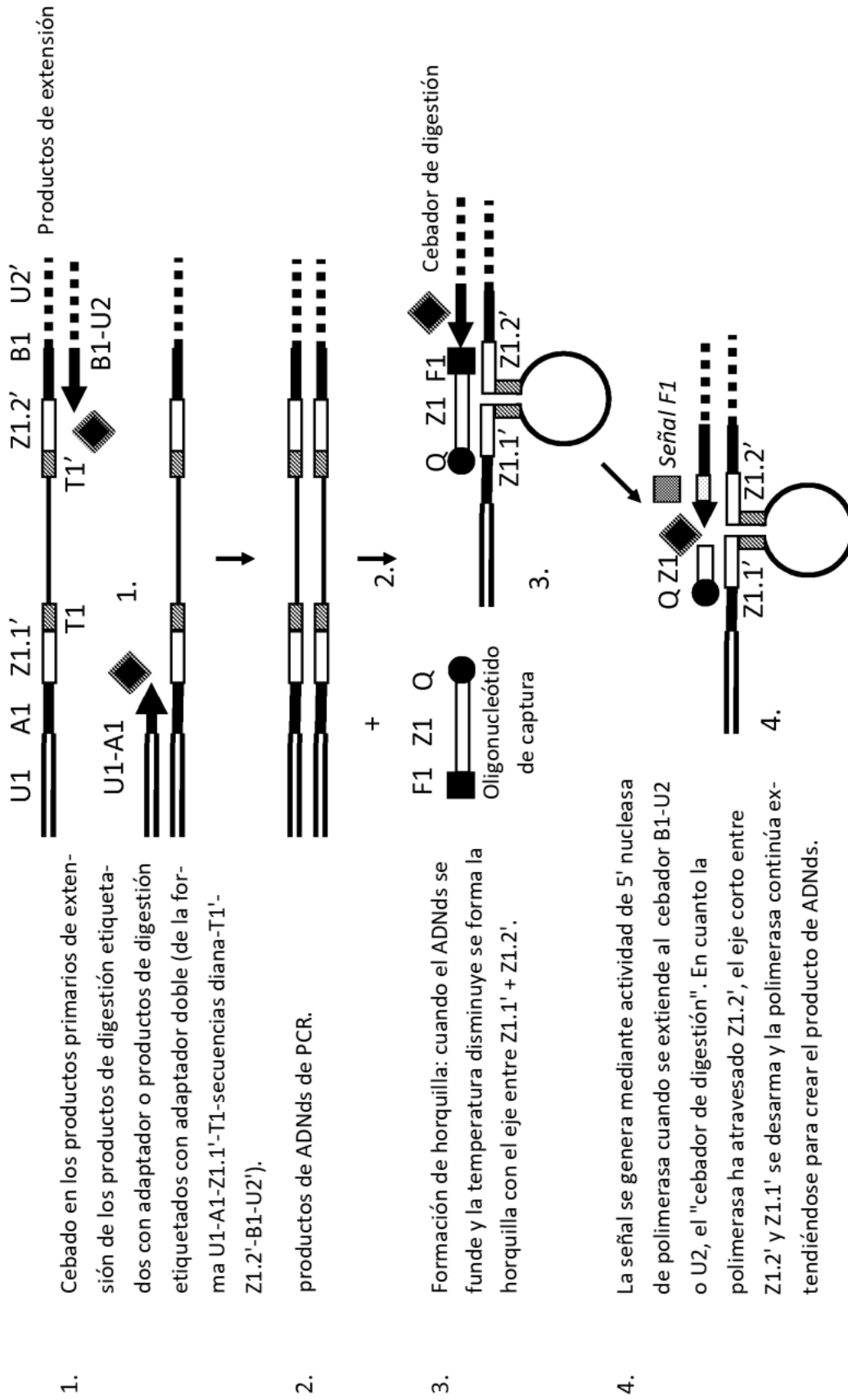


Figura 6

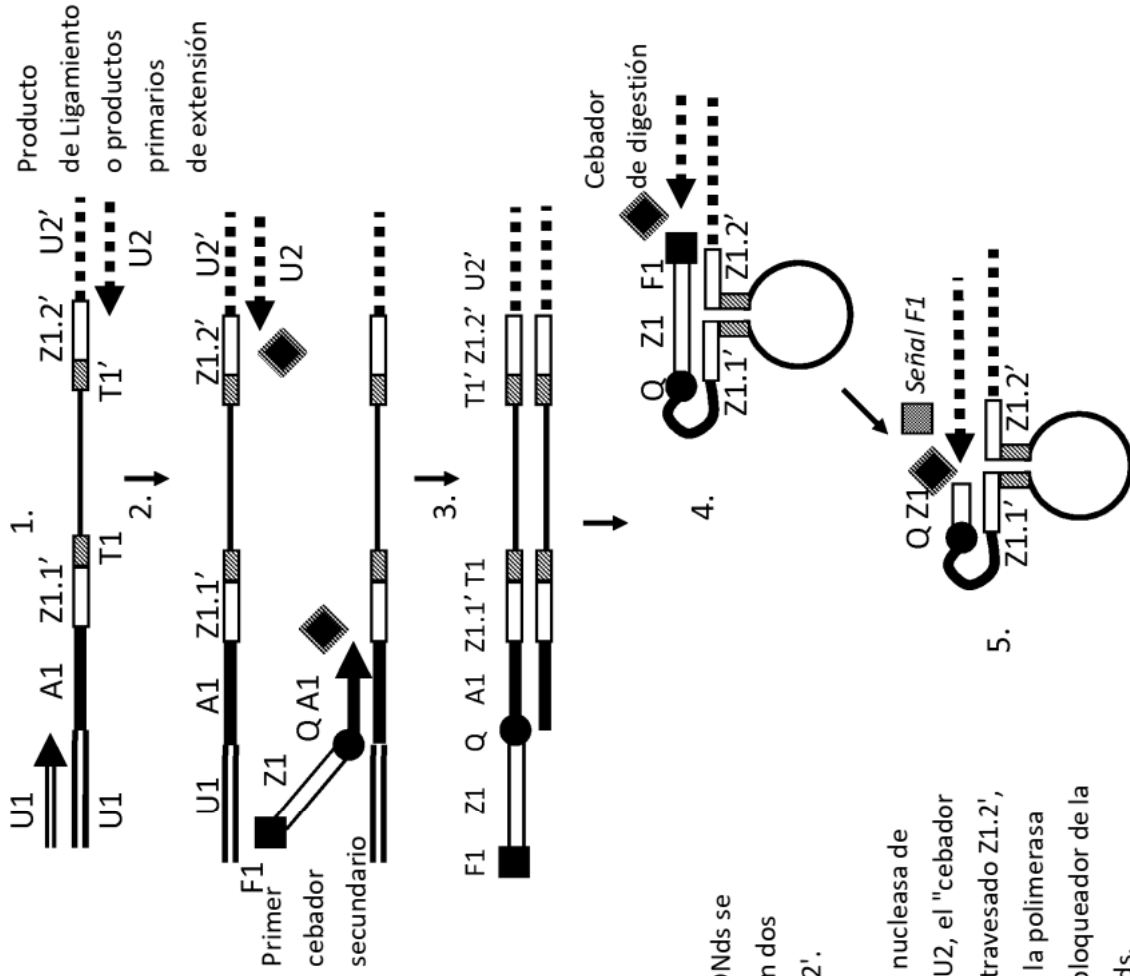
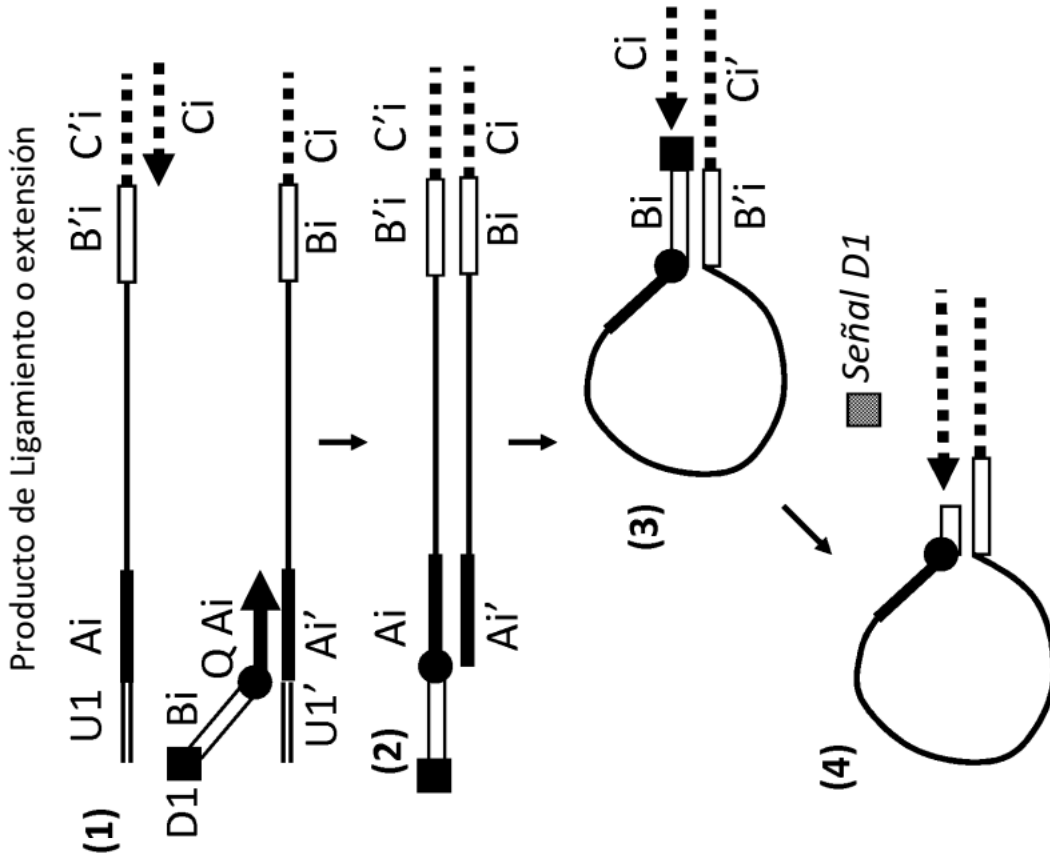
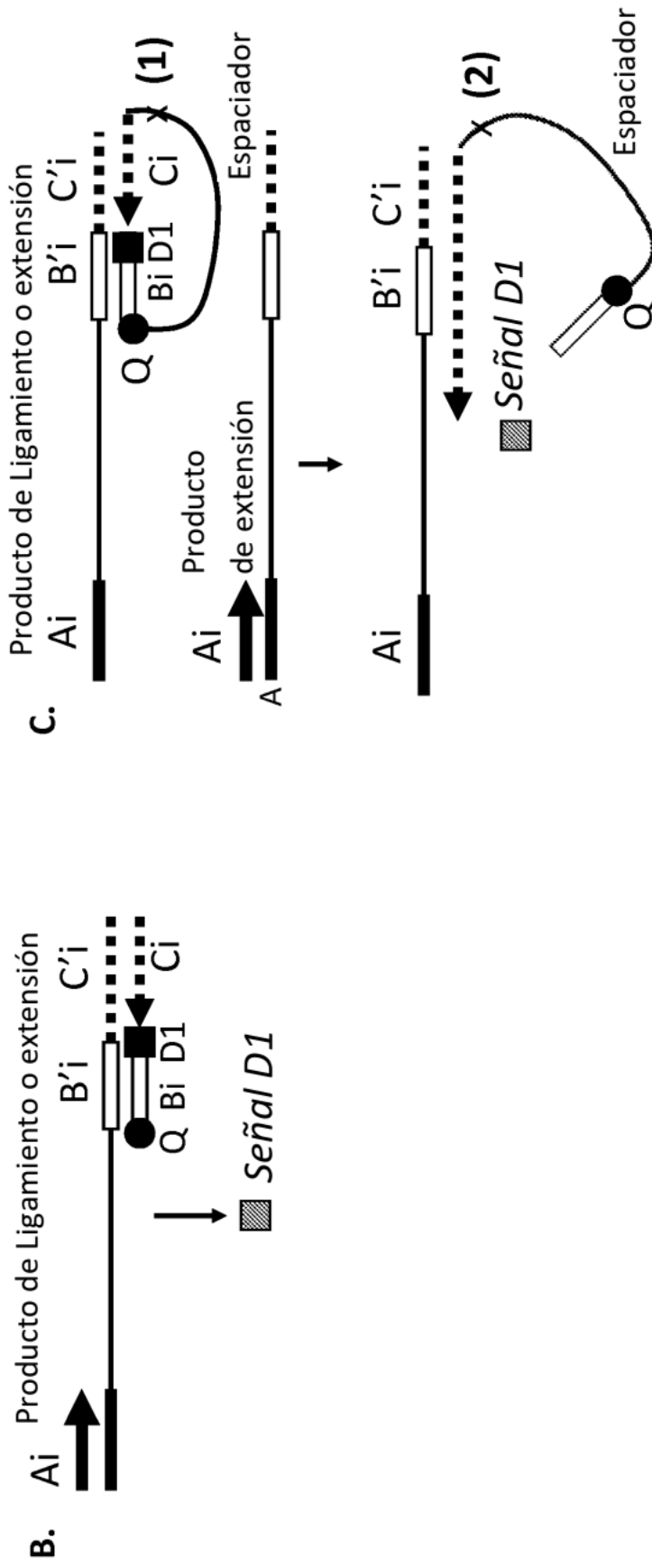


Figura 7



1. Cebado en ambas hebras de los productos de extensión o Ligamiento codificados por etiqueta (de la forma U1-Ai-secuencias di-
na-B'1-C'i).
2. Productos de ADNds de PCR; el bloqueador de la polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.
3. Formación de horquilla: cuando el ADNds se funde y la temperatura disminuye se forma la horquilla con el eje entre B1 y B1'.
4. La señal se genera mediante actividad de 5' nucleasa de polimerasa cuando se extiende al cebador Ci, el "cebador de digestión".

Figura 8A



Figuras 8B-8C

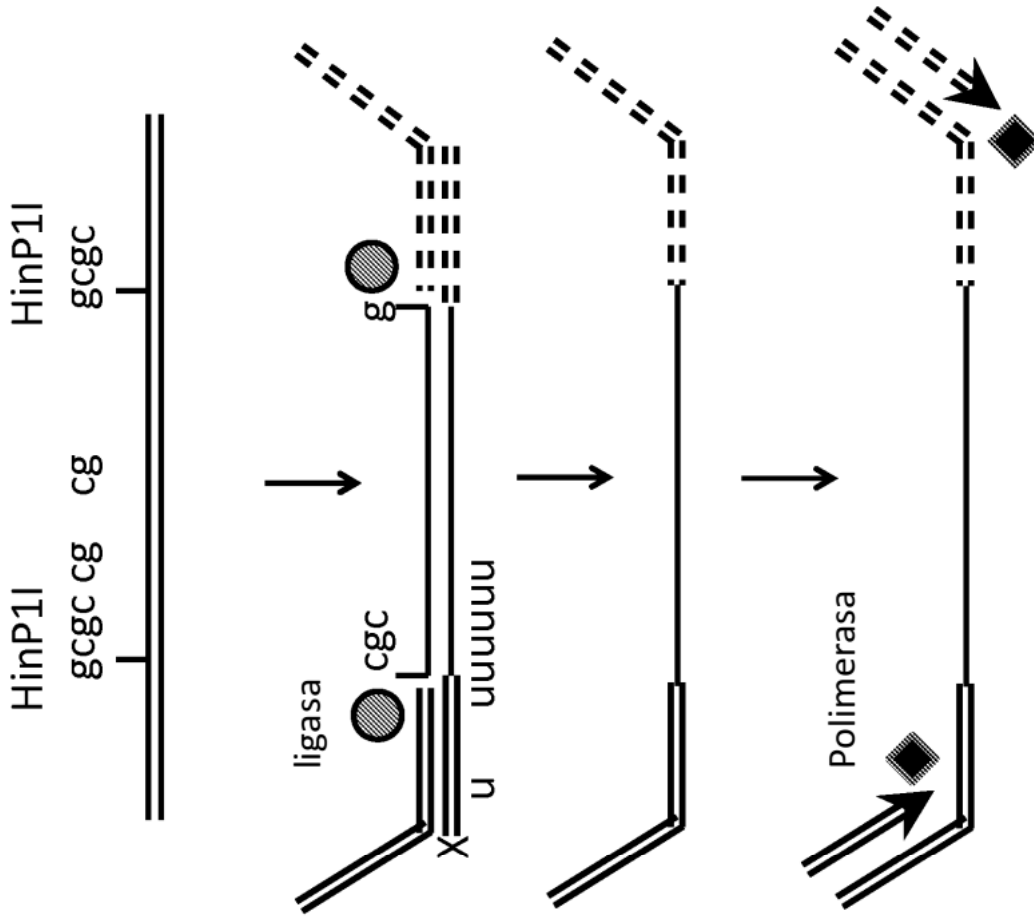
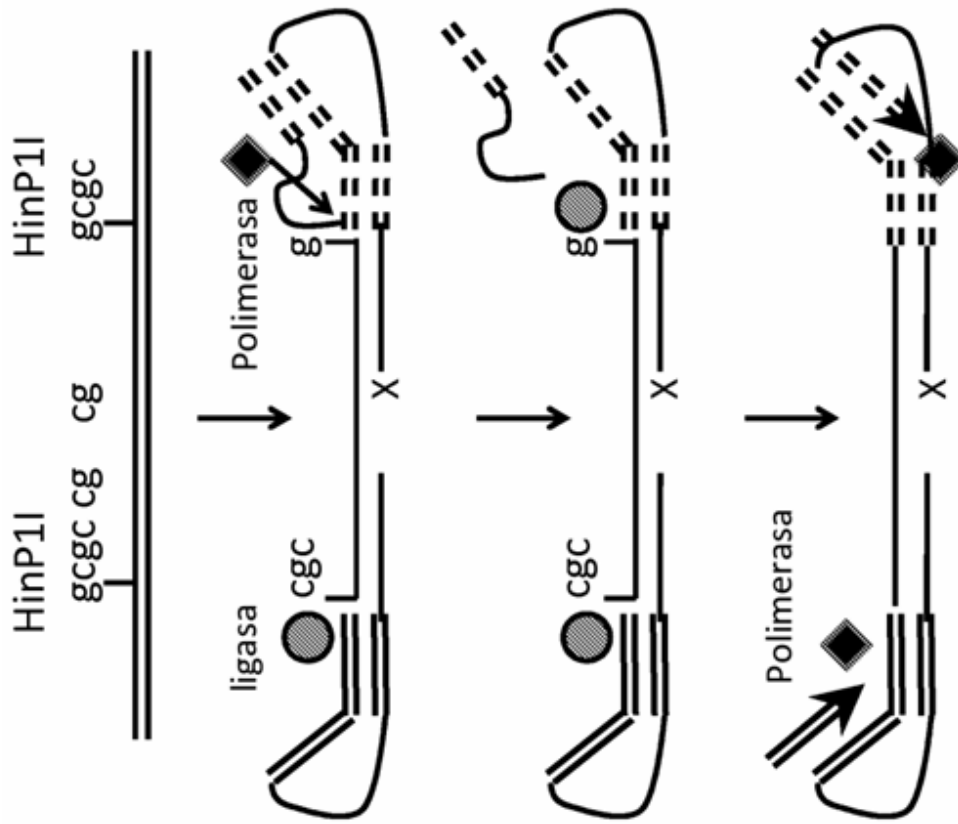
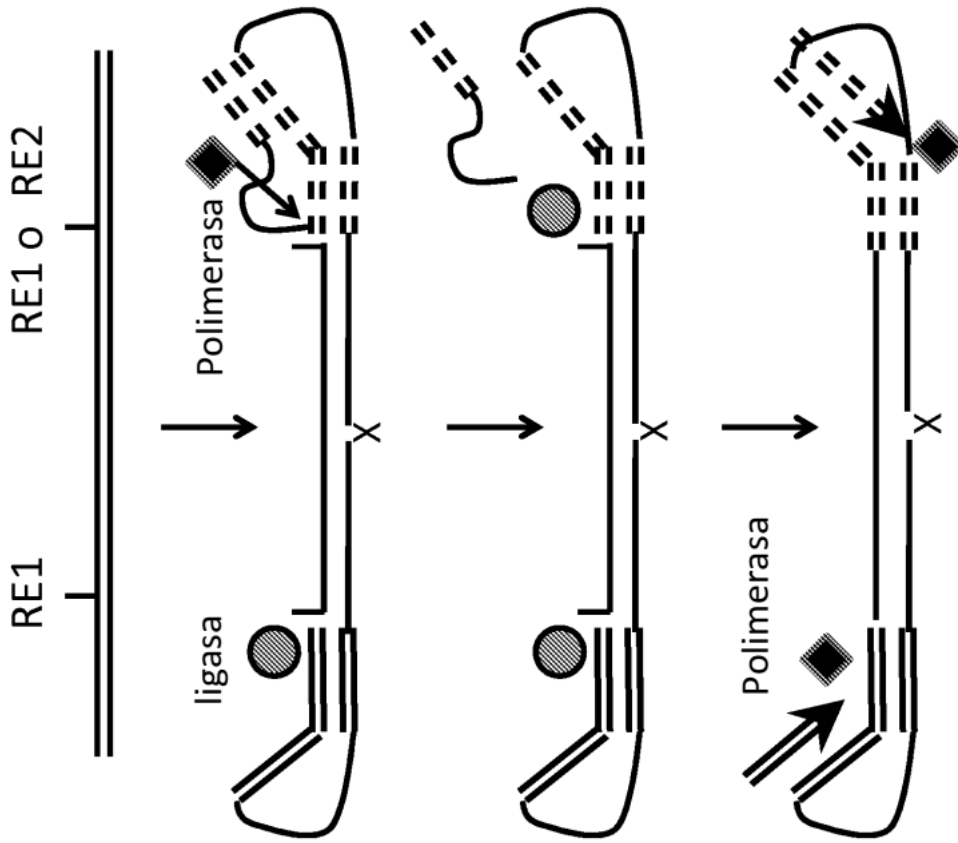


Figura 9A



1. Digestión de **Restricción** usando enzima sensible a la metilación, por ejemplo, HinP1I. Solo se restringe el ADN no metilado.
2. **Ligamiento** de adaptadores que contienen horquilla que se extienden a los sitios HinP1I sirve como asociado/ moldes del ligamiento doble y contienen diferentes etiquetas. El adaptador del ligamiento cadena abajo tiene una cola en la posición 5' que se escinde mediante la actividad en la dirección 5'->3' de la Taq polimerasa cuando se hibrida al producto de digestión, pero el adaptador no escindido se hibrida de nuevo a la región U2' del Cebador Universal de modo que inhibe el cebado posterior del adaptador no ligado.
3. La **PCR** usando cebadores universales solo detecta ADN cuando ambos sitios están sin metilar. La actividad de exonucleasa en la dirección 5'->3' de la polimerasa destruye la parte del molde de ambos adaptadores de oligonucleótido ligados, creando un producto que contiene etiquetas tanto cadena arriba como cadena abajo y adecuado para amplificación. Los adaptadores cadena arriba no ligados se extienden sobre ellos mismos y no se amplifican.

Figura 9B



1. Digestión de **Endonucleasa de Restricción (RE)** usando: (i) enzima(s) insensibles a metilo para formar fragmentos, con al menos un sitio interno sensible a metilo, para seleccionar el ADN metilado, y/o (ii) enzima(s) sensibles a la metilación, para seleccionar ADN no metilado.
2. **Ligamiento** de adaptadores de oligonucleótido que contienen horquilla que se extienden a los sitios RE sirven como asociado/ moldes de ligamiento doble y contienen diferentes etiquetas. El adaptador del ligamiento cadena abajo tiene una cola en la posición 5' que se escinde mediante la actividad en la dirección 5'->3' de la Taq polimerasa cuando se hibrida a un producto de digestión, pero el adaptador no escindido se hibrida de nuevo a la región U2' del Cebador Universal de modo que inhibe el cebado posterior del adaptador no ligado.
3. La **PCR** usando cebadores universales solo detecta ADN cuando ambos sitios están sin metilar. La actividad de exonucleasa en la dirección 5'->3' de la polimerasa destruye la parte del molde de ambos adaptadores ligados, creando un producto que contiene etiquetas tanto cadena arriba como cadena abajo y adecuado para amplificación. La horquilla cadena arriba ligada se extiende sobre sí misma aún bloqueada (X) y no se amplifica.

Figura 9C

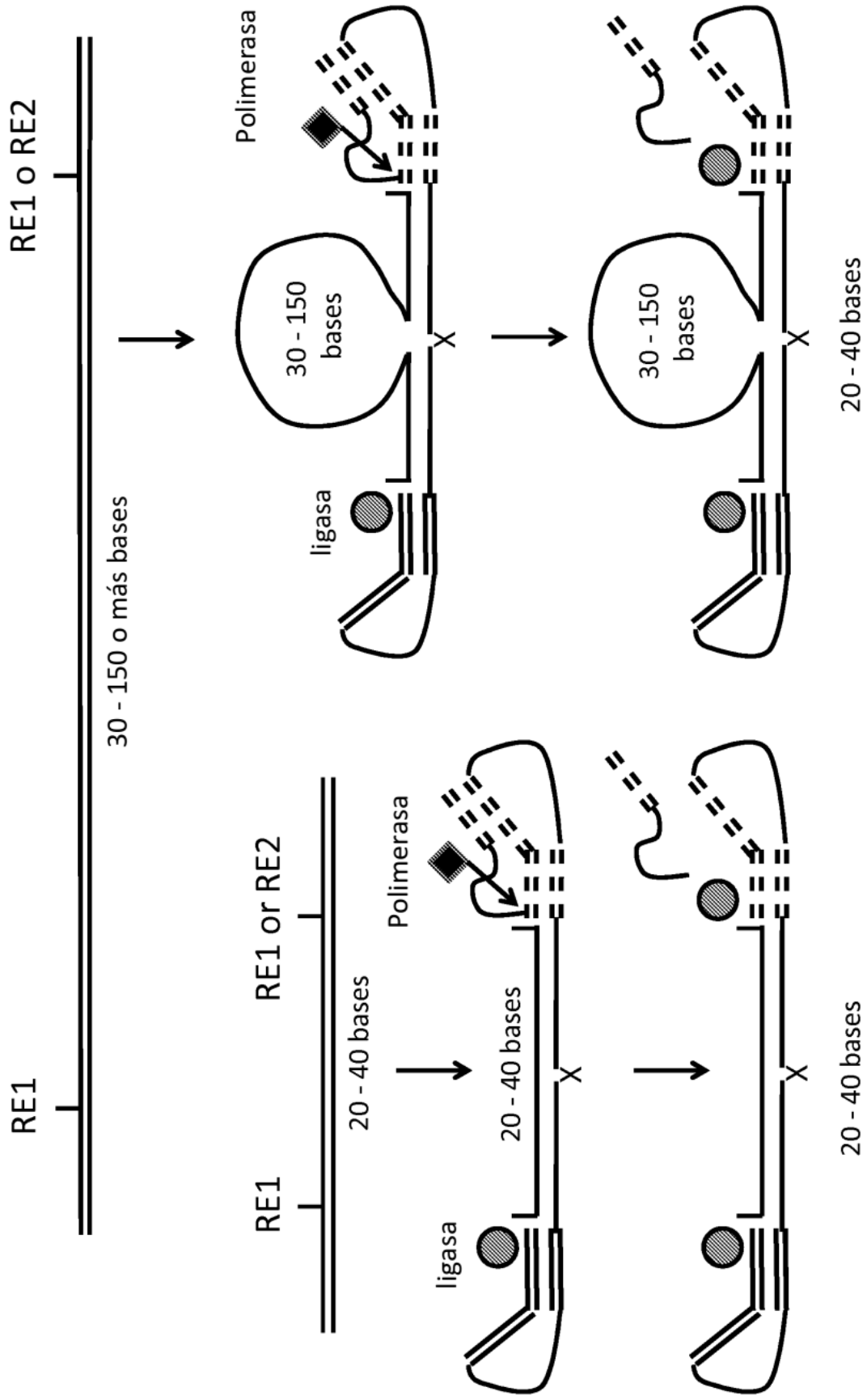


Figura 9D

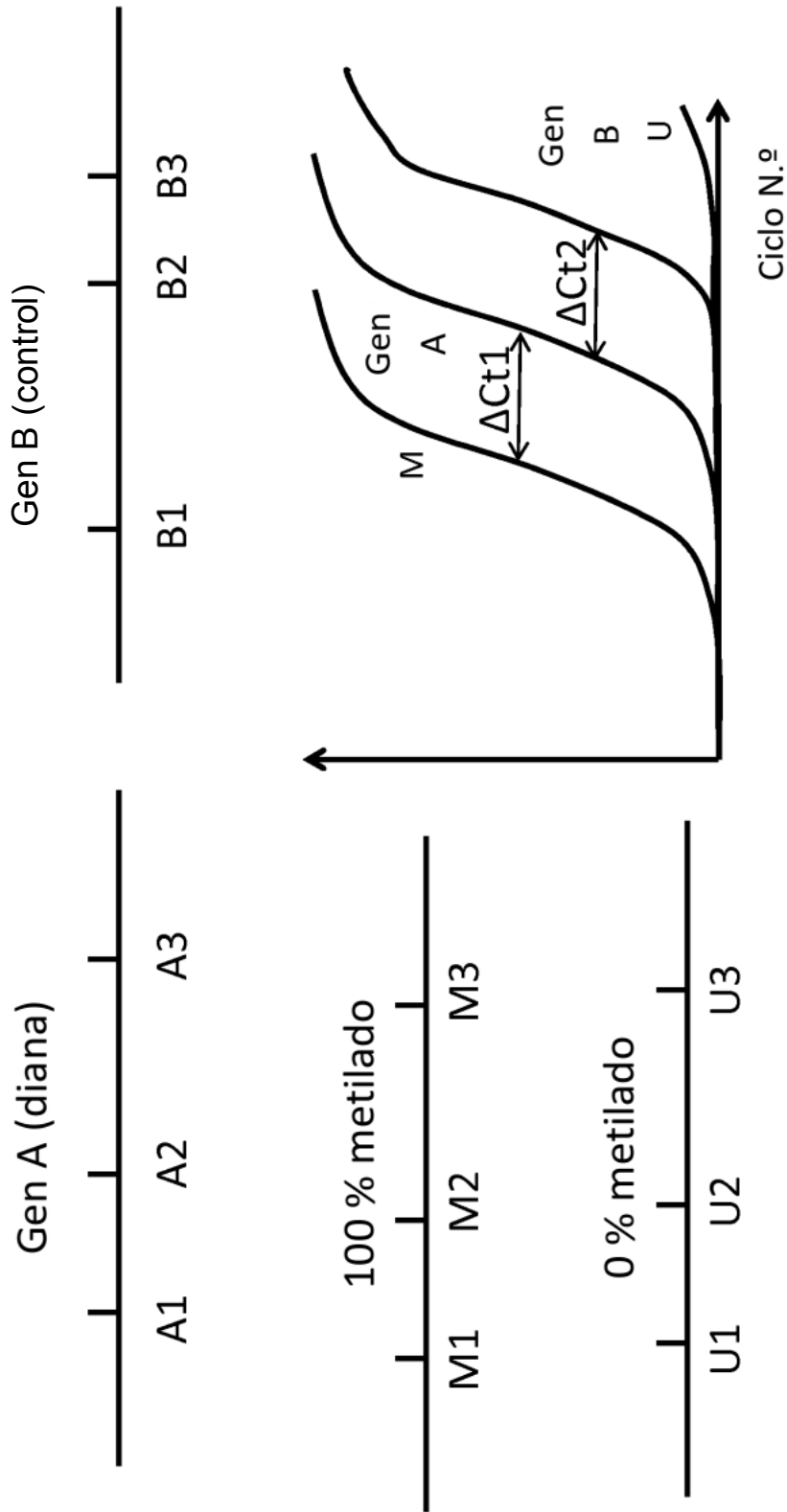


Figura 10