

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 807 222**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/683 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2015 PCT/US2015/023535**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2015 WO15153571**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2015 E 15772834 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3126523**

54 Título: **Detección de metilación de ADN usando reacciones combinadas de ligamiento y nucleasa**

30 Prioridad:

01.04.2014 US 201461973496 P

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

22.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BARANY, FRANCIS

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 807 222 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

Detección de metilación de ADN usando reacciones combinadas de ligamiento y nucleasa

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

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

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

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. A menudo los promotores para genes tienen regiones de alto contenido de CpG conocidas como "Islas de CpG". Cuando los genes, tal como los genes supresores de tumores, con las islas de CpG promotoras se desactivan, esto va acompañado normalmente por la metilación de la mayoría de las secuencias de CpG dentro de las regiones del promotor y del primer intrón. La hipermetilación anómala del promotor 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 implicados 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)). Existe una gran necesidad, tanto en investigación básica como clínica, de identificar el estado de metilación del ADN del promotor con alta eficacia y precisión para diagnósticos y pronósticos de enfermedades.

La presencia y ausencia de metilación en ciertas regiones genéticas tiene aplicaciones de diagnóstico y pronóstico prenatal. Por ejemplo, la metilación anómala en regiones de 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 de manera diferencial, el ADN sin 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.

En la actualidad, varios grupos han usado enfoques de bisulfito para detectar la presencia de niveles bajos de ADN metilado en suero, como un marcador de cáncer precoz (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 precoz del suero. Hay 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 metilado. Por ejemplo, la detección de múltiples secuencias de ADN metilado en ADN sin células aislado del suero puede permitir la detección precoz del cáncer. Del mismo modo, para aplicaciones como la detección precoz del cáncer, también se necesitan con urgencia métodos para la detección multiplexada de niveles muy bajos de ADN sin metilar cuando la mayoría del ADN con la misma secuencia está metilado.

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

50 **Métodos de digestión con endonucleasa de restricción sensible a la metilación:**

Este enfoque aprovecha las enzimas de restricción sensibles a metilo, en donde el ADN genómico se escinde cuando está sin metilar, y esto va seguido por una amplificación por PCR usando cebadores que flanquean el sitio o sitios (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 metilado da como resultado la presencia del producto de PCR adecuado. La credibilidad de este método depende de la digestión completa del ADN sin metilar por la endonucleasa de restricción. Este problema se ve exacerbado por: (i) la limitación de las cantidades de ADN metilado en la muestra, (ii) el requisito de algunas enzimas de restricción para unir dos sitios sin metilar simultáneamente, y (iii) la falta o poca actividad de enzimas de restricción para ADN monocatenario que puede surgir durante la preparación de la muestra. La realización de digestiones con endonucleasas hasta su finalización es difícil. Por lo tanto, en ocasiones 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 sin metilar, y en la suposición de que la amplificación por PCR del ADN restante aparece porque está metilado, y por consiguiente el método es susceptible de falsos positivos derivados de la eliminación incompleta del ADN sin metilar. Esta técnica tiene la desventaja de que no es precisa para encontrar niveles bajos de ADN 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 sin células del suero.

5 **Conversión química basada en bisulfito sódico.**

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

El desarrollo de 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 de ADN modificado con bisulfito. Generalmente, en las secuencias de oligonucleótidos se tienen que incluir más de tres sitios de CpG. Se diseñan dos conjuntos de cebadores de PCR de MSP, un conjunto de los cebadores de MSP tiene la secuencia para hibridarse perfectamente con la cadena complementaria de la secuencia de ADN metilada tratada con bisulfito con metil-citosinas que residen en los sitios de CpG. El otro conjunto de cebadores de MSP se diseña solo para que se hibride perfectamente con la cadena complementaria de la secuencia de ADN tratada con bisulfito en ausencia de citosina metilada. En consecuencia, los productos de PCR
25 específicos de MSP solo resultan del molde de ADN que contiene metil-citosinas.

Con este enfoque hay tres dificultades principales. El diseño de cebadores de MSP requiere que haya cantidades
30 suficientes de citosinas metiladas en la secuencia del cebador para garantizar la capacidad de selección. Puede que no sea lo suficientemente sensible como para distinguir las secuencias metiladas parciales de las secuencias completamente metiladas. Además, este ensayo analiza un gen a la vez, y ambos conjuntos de cebadores de MSP tienen temperaturas de hibridación diferentes 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 sin metilar en uracilo. Las condiciones que aseguran que todas las citosinas sin metilar se
35 conviertan en uracilo también pueden destruir el ADN. Las condiciones que aseguran que queda suficiente ADN intacto pueden no asegurar que todas las citosinas sin metilar 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 da como resultado un falso negativo. Del mismo modo, la presencia de una banda puede ser la consecuencia de la conversión incompleta de citosina sin metilar en uracilo, lo que permite la unión del cebador a un sitio sin metilar y da como un resultado un 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 de ADN
45 sin metilar convertido por bisulfito, enriqueciendo de ese modo la amplificación del ADN metilado convertido por bisulfito (deVos *et al.*, Clinical Chemistry 55 (7): 1337-1346 (2009)). La desventaja es que el tratamiento con bisulfito destruye del 50 % al 90 % de la integridad original del ADN al cortarlo. Cuando se comienza con el 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 2013/123220 discute métodos para identificar la presencia de una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra que implica una reacción de ligamiento con nucleasa.

El documento US 2007/092883 discute un método de amplificación multiplexada dependiente de ligamiento para
55 detectar la presencia de sitios metilados específicos en un ácido nucleico diana monocatenario.

El documento US 2006/234252 discute métodos para determinar el estado de metilación de al menos un nucleótido diana que emplea una reacción catalizada por una nucleasa específica de estructura, generalmente acoplada con una reacción de ligamiento.

Zou *et al.*, 2011 Clinical Chemistry 58: 375-383 discute a un enfoque de detección multiplexado para cuantificar, de
60 manera eficaz, los marcadores para aplicaciones clínicas tales como identificación sistemática del cáncer colorrectal.

El documento US 2012/122088 discute un método para detectar un locus genómico metilado.

El documento US 2012/021949 discute un método para detectar la presencia de un sitio metilado en una ubicación específica en una secuencia de ácidos nucleicos diana monocatenarios.

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

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención se define mediante las reivindicaciones.

5 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 en uno o más restos metilados. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácido nucleico diana que contienen potencialmente uno o más restos metilados dentro de al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. La muestra se somete a una digestión de enzima de restricción sensible a la metilación para escindir moléculas de ácido nucleico diana en la muestra que tienen restos sin metilar dentro de al menos una secuencia de enzima de restricción sensible a la metilación. Se proporcionan uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas, comprendiendo cada conjunto de sondas (a) una primera sonda oligonucleotídica que tiene una parte específica de diana, y (b) una segunda sonda oligonucleotídica que tiene una parte específica de diana. La primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden adyacentes entre sí en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas, y, en un conjunto de sondas, la parte específica de diana de la segunda sonda oligonucleotídica tiene un nucleótido superpuesto idéntico en la unión con la primera sonda oligonucleotídica. El método implica además poner en contacto la muestra y los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas en condiciones eficaces para que la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se hibriden en posiciones adyacentes de una manera específica de la base con su molécula de ácido nucleico diana correspondiente, si estuviera presente en la muestra, en donde después de la hibridación, el nucleótido idéntico superpuesto de la segunda sonda oligonucleotídica forma una aleta en la unión que comprende el nucleótido idéntico superpuesto. El nucleótido idéntico superpuesto de la segunda sonda oligonucleotídica se escinde con una enzima que tiene actividad de 5' nucleasa, liberando de ese modo un 5' fosfato en la segunda sonda oligonucleotídica. La primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas se ligan juntas en la unión para formar un producto de ligamiento hibridado con su molécula de ácido nucleico diana complementaria, en donde el producto de ligamiento y su molécula de ácido nucleico diana hibridada comprenden al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. El método implica además mezclar al menos una enzima de restricción sensible a la metilación con los productos de ligamiento hibridados para formar una mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación, y someter la mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación a condiciones adecuadas para la escisión del producto de ligamiento y su molécula de ácido nucleico diana hibridada si la molécula de ácido nucleico diana no contiene uno o más restos metilados dentro de la al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. La escisión no se producirá si la molécula de ácido nucleico diana contiene uno o más restos metilados dentro de la al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. Los productos de ligamiento sin escindir en la muestra se detectan y se distinguen, y 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 se identifica basándose en la detección.

40 También se desvela un segundo 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 en uno o más restos metilados. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácido nucleico diana que contienen potencialmente uno o más restos metilados dentro de una o más secuencias de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación, y proporcionar uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas, comprendiendo cada conjunto de sondas (a) una primera sonda oligonucleotídica que tiene una parte específica de diana, y (b) una segunda sonda oligonucleotídica que tiene una parte específica de diana que contiene al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. La primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden en la molécula de ácido nucleico diana. La muestra y los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas se ponen en contacto en condiciones eficaces para que la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se hibriden de una manera específica de la base con su molécula de ácido nucleico diana correspondiente, si estuviera presente en la muestra, para formar productos de hibridación. El método además implica la mezcla de al menos una enzima de restricción sensible a la metilación con los productos de hibridación, si estuvieran presentes en la muestra, para formar una mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación. La mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación se somete a condiciones adecuadas para que la enzima de restricción sensible a la metilación se escinda de la segunda sonda oligonucleotídica de un producto de hibridación en su secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación si la molécula de ácido nucleico diana del producto de hibridación contiene uno o más restos metilados dentro de la secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación, liberando dicha escisión un 5' fosfato en la segunda sonda oligonucleotídica. La primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas se ligan juntas para formar productos de ligamiento. El método implica además detectar y distinguir los productos de ligamiento en la muestra, e identificar 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 basándose en dicha detección.

65 También se desvela un tercer 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 en uno o más restos metilados. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácido nucleico diana que contienen potencialmente uno o más restos metilados dentro de una o más secuencias de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. Se proporcionan uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas, comprendiendo cada conjunto de sondas al menos una primera sonda oligonucleotídica que comprende una parte específica de diana configurada para hibridarse en la molécula de ácido nucleico diana y poner en contacto (i) al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación, (ii) un grupo de bloqueo en 3', horquilla, o región de aleta, y (iii) una parte específica de cebador en 5'. La muestra se pone en contacto con los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas en condiciones eficaces para que la al menos primera sonda oligonucleotídica de un conjunto de sondas se hibride de una manera específica de la base con una molécula de ácido nucleico diana correspondiente, si estuviera presente en la muestra, para formar productos de hibridación. El método además implica la mezcla de al menos una enzima de restricción sensible a la metilación con los productos de hibridación para formar una mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación, y someter la mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación a condiciones adecuadas para escindir la al menos primera sonda oligonucleotídica de un producto de hibridación cuando la molécula de ácido nucleico diana de dicho producto de hibridación contiene uno o más restos metilados dentro de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. La escisión libera un 3'-OH en la al menos primera sonda oligonucleotídica del producto de hibridación. El método además implica a extender el 3'OH liberado de la al menos primera sonda oligonucleotídica escindida del producto de hibridación usando una polimerasa para formar un producto de extensión hibridado. Se proporcionan uno o más conjuntos de cebadores oligonucleotídicos primarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores (i) un primer cebador oligonucleotídico primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que una región de la secuencia de la molécula de ácido nucleico diana, en donde dicha región está en 5' de la una o más secuencias de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación de la molécula de ácido nucleico diana, y una parte secundaria específica de cebador, y opcionalmente, (ii) un segundo cebador oligonucleotídico primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la parte específica de cebador en 5' de la al menos primera sonda oligonucleotídica en un conjunto de sondas. El método implica además mezclar los productos de extensión hibridados, los uno o más conjuntos de cebadores oligonucleotídicos primarios, y una polimerasa para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa, y someter la 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 de extensión primarios. Los productos de extensión primarios 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 en uno o más restos metilados.

Los métodos descritos 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 intenta detectar moléculas de ácido nucleico diana metilado de baja abundancia.

De acuerdo con la presente invención, los niveles de discriminación incluyen (i) uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada, (ii) uso de actividad de 5'-3' nucleasa de la polimerasa o nucleasa Fen en la segunda sonda cadena abajo, (iii) uso de fidelidad de ligamiento en 3' de la ligasa termoestable en la primera sonda cadena arriba, (iv) reutilización de enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado, (v) uso de secuencias en el extremo 5' de las sondas cadena abajo, de modo que cuando no se escinden, formen horquillas a menor temperatura y se extiendan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

De acuerdo con una aplicación del segundo método desvelado, los niveles de discriminación para detección de moléculas de ácido nucleico diana hemimetiladas incluyen (i) uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada, (ii) uso de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para cortar la diana bicatenaria en la segunda sonda cadena abajo cuando el ADN genómico original estaba hemimetilado, (iii) uso de fidelidad de ligamiento en 3' de ligasa termoestable en la primera sonda cadena arriba, (iv) reutilización de enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado, y (v) uso de secuencias en el extremo 5' de la segunda sonda cadena abajo, de modo que cuando no se escinden, formen horquillas a menor temperatura y se extiendan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

De acuerdo con otra aplicación del segundo método desvelado, los niveles de discriminación para detección de moléculas de ácido nucleico diana metilado incluyen (i) uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada, (ii) uso de enzimas de restricción HinP1I sensibles a la metilación para cortar la diana bicatenaria tanto en la primera sonda cadena arriba como en la segunda sonda cadena abajo cuando el ADN genómico original estaba metilado, (iii) uso de fidelidad de ligamiento en 3' de ligasa termoestable en la primera sonda cadena arriba, (iv) reutilización de enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado, (v) uso de secuencias en el extremo 3' de la primera sonda cadena arriba y en el extremo 5' de la segunda sonda cadena abajo, de modo que cuando no se escinden, formen horquillas a menor temperatura y se extiendan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

De acuerdo con el tercer método desvelado, los niveles de discriminación para detección de metilación de baja abundancia incluyen (i) uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada, (ii) uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación para cortar la diana bicatenaria tanto en la primera sonda cadena arriba como en la segunda sonda cadena abajo cuando el ADN genómico original estaba metilado, (iii) uso de actividad de extensión en 3' de la polimerasa, (iv) reutilización de enzimas de restricción HinP1I sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado, (v) uso de secuencias en el extremo 3' de la primera sonda cadena arriba y la segunda sonda cadena abajo, de modo que cuando no se escinden, formen horquillas a menor temperatura y se extiendan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A-1D representan el proceso general de identificación de uno o más restos metilados dentro de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación de una molécula de ácido nucleico diana usando el proceso de ligamiento con 5'-nucleasa (FEN)-digestión con enzima de restricción sensible a la metilación de la presente invención.

Las Figuras 2A-2I muestran el proceso de reacción de ligamiento con FEN-digestión con enzima de restricción sensible a la metilación de la presente invención para detectar la metilación de moléculas de ácido nucleico diana en sitios de metilación de BstU1 (es decir, sitios C*GC*G).

Las Figuras 3A-3P muestran el proceso de reacción de ligamiento con FEN-digestión con enzima de restricción sensible a la metilación de la presente invención usando un diseño de sonda acoplada para detectar la metilación de moléculas de ácido nucleico diana en sitios de metilación de BstU1 (es decir, sitios C*GC*G). Las Figuras 3A-3I muestran una variación de este proceso donde las sondas acopladas se diseñan para formar horquillas en ausencia de ligamiento para evitar la amplificación independiente de diana y la generación de señales de falsos positivos. Las Figuras 3J-3P muestran una variación alternativa de este proceso en donde las sondas acopladas sin ligar se eliminan del proceso de reacción mediante digestión con exonucleasa para evitar la amplificación independiente de diana y la generación de señales de falsos positivos. La endonucleasa de restricción se muestra como un triángulo; la ligasa se muestra como un círculo; y la polimerasa como un diamante.

Las Figuras 4A-4D muestran el proceso general de identificación de uno o más restos metilados dentro de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación de una molécula de ácido nucleico diana usando el proceso de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-ligamiento que se describe en el presente documento.

Las Figuras 5A-5H muestran el proceso de reacción de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-ligamiento para detectar hemimetilación en sitios de metilación de BstU1 (por ejemplo, sitios C*GCG) en una molécula de ácido nucleico diana. En la presente solicitud, las segundas sondas oligonucleotídicas sin ligar son capaces de formar horquillas para evitar la amplificación independiente de diana y la generación de señales de falsos positivos. La endonucleasa de restricción se muestra como un triángulo; la ligasa se muestra como un círculo; y la polimerasa como un diamante.

Las Figuras 6A-6N muestran el proceso de reacción de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-ligamiento usando un diseño de sonda acoplada para detectar hemimetilación en sitios de metilación de BstU1 en una molécula de ácido nucleico diana. Las Figuras 6A-6H muestran una variación de este proceso donde se diseñan sondas acopladas para formar horquillas en ausencia de ligamiento para evitar la amplificación independiente de diana y la generación de señales de falsos positivos. Las Figuras 6I-6N muestran una variación alternativa de este proceso en donde las sondas acopladas sin ligar se eliminan del proceso de reacción mediante digestión con exonucleasa para evitar la amplificación independiente de diana y la generación de señales de falsos positivos. La endonucleasa de restricción se muestra como un triángulo; la ligasa se muestra como un círculo; y la polimerasa como un diamante.

Las Figuras 7A-7H muestran el proceso de reacción de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-ligamiento para detectar la metilación en sitios de metilación de HinP1I (por ejemplo, sitios G*CGC) en una molécula de ácido nucleico diana. En la presente solicitud, las segundas sondas oligonucleotídicas sin ligar son capaces de formar horquillas para evitar la amplificación independiente de diana y la generación de señales de falsos positivos. La endonucleasa de restricción se muestra como un triángulo; la ligasa se muestra como un círculo; y la polimerasa como un diamante.

Las Figuras 8A-8N muestran el proceso de reacción de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-ligamiento usando un diseño de sonda acoplada para detectar la metilación en sitios de metilación de HinP1I en una molécula de ácido nucleico diana. Las Figuras 8A-8H muestran una variación de este proceso donde se diseñan sondas acopladas para formar horquillas en ausencia de ligamiento para evitar la amplificación independiente de diana y la generación de señales de falsos positivos. Las Figuras 8I-8N muestran una variación alternativa de este proceso en las sondas acopladas sin ligar se eliminan del proceso de reacción mediante digestión con exonucleasa para evitar la amplificación independiente de diana y la generación de señales de falsos positivos. La endonucleasa de restricción se muestra como un triángulo; la ligasa se muestra como un círculo; y la polimerasa como un diamante.

Las Figuras 9A-9L muestran el proceso de reacción de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-extensión-ligamiento para detectar la metilación en sitios de metilación de HinP1I adyacentes en una

molécula de ácido nucleico diana.

Las Figuras 9A-9F muestran una variación de este proceso donde la primera sonda oligonucleotídica contiene una horquilla en su extremo 3'. En ausencia de digestión con HinP1I, la horquilla en 3' se retroextenderá sobre sí misma. Las Figuras 9G-9L muestran una variación alternativa de este proceso en donde la primera sonda oligonucleotídica contiene un grupo de bloqueo en su extremo 3'. La endonucleasa de restricción se muestra como un triángulo; la ligasa se muestra como un círculo; y la polimerasa como un diamante.

Las Figuras 10A-10J muestran el proceso de reacción de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-extensión-ligamiento usando un diseño de sonda acoplada para detectar la metilación en sitios de metilación de HinP1I adyacentes en una molécula de ácido nucleico diana. Las Figuras 10A-10F muestran una variación de este proceso donde se diseñan sondas acopladas para formar horquillas en ausencia de ligamiento para evitar la amplificación independiente de diana y la generación de señales de falsos positivos. Las Figuras 10G-10J muestran una variación alternativa de este proceso donde las sondas acopladas sin ligar se eliminan del proceso de reacción mediante digestión con exonucleasa para evitar la amplificación independiente de diana y la generación de señales de falsos positivos. La endonucleasa de restricción se muestra como un triángulo; la ligasa se muestra como un círculo; y la polimerasa como un diamante.

Las Figuras 11A-11F representan como una región de ADN conocida que se puede usar como un control positivo en las mismas mezclas de reacción que se muestran en la Figura 9, para proporcionar una señal de control equivalente a la presencia de un 1 % de ADN metilado.

Las Figuras 12A-12D muestran el proceso de reacción de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-ligamiento para detectar la metilación en sitios de metilación de HinP1I alejados en una molécula de ácido nucleico diana. La endonucleasa de restricción se muestra como un triángulo; la ligasa se muestra como un círculo; la polimerasa como un diamante; la distancia sin definir entre sitios HinP1I en la molécula de ácido nucleico diana se indica como "/".

Las Figuras 13A-13D muestran el proceso de reacción de digestión con nucleasa-ligamiento para detectar translocaciones génicas en una molécula de ácido nucleico diana donde se desconoce la posición de la unión de translocación precisa. En la presente solicitud, se utilizan tres sondas oligonucleotídicas, es decir, una primera sonda oligonucleotídica o cadena arriba, una sonda oligonucleotídica media, y una segunda sonda oligonucleotídica o cadena abajo. La primera sonda tiene una parte específica de diana cadena arriba con un 3' OH competente para ligamiento que se solapa con el extremo 5' OH de flanqueo inmediato de la sonda oligonucleotídica media. La sonda media contiene una parte específica de diana cadena arriba que es adyacente a la parte específica de diana cadena arriba de la primera sonda. La sonda media también tiene una parte específica de diana cadena abajo con un 3' OH competente para ligamiento que se solapa con el extremo 5' OH de flanqueo inmediato de la segunda sonda oligonucleotídica. La segunda sonda oligonucleotídica contiene una parte específica de diana cadena abajo que es adyacente a la parte específica de diana cadena abajo de la sonda media. En ausencia de escisión y ligamiento con nucleasa, las sondas cadena abajo sin ligar forman una horquilla y se extienden sobre sí mismas para evitar la amplificación independiente de diana y la generación de señales de falsos positivos. La ligasa se muestra como un círculo; la polimerasa como un diamante.

Las Figuras 14A-14D muestran una variación del proceso de reacción de digestión con nucleasa-ligamiento representado en la Figura 13 para detectar translocaciones génicas en una molécula de ácido nucleico diana donde se desconoce la posición precisa de la unión. En esta realización, la primera sonda oligonucleotídica cadena arriba y la segunda sonda oligonucleotídica cadena abajo se acoplan juntas y se utilizan junto con una sonda media. Como se describe en referencia a la Figura 13, las sondas primera y media tienen extremos 3'OH competentes para ligamiento que se solapan con los extremos 5'OH que flanquean inmediatamente las sondas media y segunda, respectivamente. En ausencia de escisión y ligamiento con nucleasa, las sondas sin ligar se someten a digestión con exonucleasa para evitar la amplificación independiente de diana y la generación de señales de falsos positivos. La ligasa se muestra como un círculo; la polimerasa como un diamante.

Las Figuras 15A-15D muestran el proceso de reacción de digestión con nucleasa-ligamiento para detectar polimorfismos de nucleótido individuales alejados (SNP) o sucesos de corte y empalme alternativos en una molécula de ácido nucleico diana. En esta realización, se utilizan tres sondas oligonucleotídicas, es decir, una primera sonda oligonucleotídica o cadena arriba, una sonda oligonucleotídica media, y una segunda sonda oligonucleotídica o cadena abajo. La primera sonda tiene una parte específica de diana cadena arriba con un 3' OH competente para ligamiento que se solapa con el extremo 5' OH de flanqueo inmediato de la sonda oligonucleotídica media. La sonda media contiene una parte específica de diana cadena arriba que es adyacente a la parte específica de diana cadena arriba de la primera sonda. La sonda media también tiene una parte específica de diana cadena abajo con un 3' OH competente para ligamiento que se solapa con el extremo 5' OH de flanqueo inmediato de la segunda sonda oligonucleotídica. La segunda sonda oligonucleotídica contiene una parte específica de diana cadena abajo que es adyacente a la parte específica de diana cadena abajo de la sonda media. En ausencia de escisión y ligamiento con nucleasa, las sondas cadena abajo sin ligar forman una horquilla y se extienden sobre sí mismas para evitar la amplificación independiente de diana y una generación de señales de falso positivo. La ligasa se muestra como un círculo; la polimerasa como un diamante; la distancia sin definir entre los SNP alejados en la molécula de ácido nucleico diana se indica como "/".

Las Figuras 16A-16D muestran una variación del proceso de reacción de digestión con nucleasa-ligamiento representada en la Figura 15 para detectar polimorfismos de nucleótido individuales alejados (SNP) o sucesos de corte y empalme alternativos en una molécula de ácido nucleico diana. En esta realización, la primera sonda oligonucleotídica cadena arriba y la segunda sonda oligonucleotídica cadena abajo se acoplan y se utilizan en conjunto con una sonda media. Como se describe en referencia a la Figura 15, las sondas primera y media

tienen extremos 3'OH competentes para ligamiento que se solapan con los extremos 5'OH que flanquean inmediatamente las sondas media y segunda, respectivamente. En ausencia de digestión con enzima de restricción y/o ligamiento, las sondas sin ligar se someten a digestión con exonucleasa para evitar la amplificación independiente de diana y una generación de señales de falso positivo. La ligasa se muestra como un círculo; la polimerasa como un diamante; la distancia sin definir entre los SNP alejados en la molécula de ácido nucleico diana se indica como "//".

Las Figuras 17A-17E muestran el proceso de digestión con enzima de restricción-ligamiento usando un diseño de sonda oligonucleotídica acoplada (es decir, una sonda circularizable).

Las Figuras 18A-18M muestran el proceso de reacción de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-extensión para detectar la metilación en sitios de metilación de HinP1I adyacentes en una molécula de ácido nucleico diana. Las Figuras 18A-18G muestran una variación de este proceso donde la primera sonda oligonucleotídica y la sonda oligonucleotídica adicional opcional contienen una horquilla en sus extremos en 3'. En ausencia de digestión con HinP1I, las horquillas en 3' se retroextenderán sobre sí mismas. Las Figuras 18H-18M muestran una variación alternativa de este proceso donde la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas contienen un grupo de bloqueo en su extremo 3'. La Figura 18K también muestra una variación del proceso que implica el uso de un cebador cadena abajo que contiene un grupo de bloqueo escindible en su extremo 3' para aumentar la amplificación específica de diana. La endonucleasa de restricción se muestra como un triángulo; la polimerasa como un diamante; y la enzima capaz de escindir el grupo de bloqueo en 3' en el cebador se muestra como una estrella.

Las Figuras 19A-19G representan cómo una región de ADN conocida se puede usar como un control positivo en las mismas mezclas de reacción que se muestran en la Figura 18, para proporcionar una señal de control equivalente a la presencia de un 1 % de ADN metilado.

Las Figuras 20A-20M muestran el proceso de reacción de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-extensión para detectar la metilación en sitios de metilación de BstU1 adyacentes en una molécula de ácido nucleico diana. Las Figuras 20A-20G muestran una variación de este proceso donde la primera sonda oligonucleotídica y la sonda oligonucleotídica adicional opcional contienen una horquilla en sus extremos en 3'. En ausencia de digestión con BstU1, las horquillas en 3' se retroextenderán sobre sí mismas. Las Figuras 20H-20M muestran una variación alternativa de este proceso en donde la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas contienen un grupo de bloqueo en su extremo 3'. La Figura 20K también muestra una variación del proceso que implica el uso de un cebador cadena abajo que contiene un grupo de bloqueo escindible en su extremo 3' para aumentar la amplificación específica de diana. La endonucleasa de restricción se muestra como un triángulo; la polimerasa como un diamante; y la enzima capaz de escindir el grupo de bloqueo en 3' en el cebador se muestra como una estrella.

La Figura 21 es un esquema que muestra un diseño de sonda oligonucleotídica que facilita la separación de las sondas oligonucleotídicas sin ligar de los productos de ligamiento para bloquear la extensión o amplificación de la sonda oligonucleotídica sin ligar en la fase de amplificación después del ligamiento. En este diseño, la segunda sonda oligonucleotídica tenía marcadores B₁ y B₁' complementarios. Durante el proceso de digestión con enzima de restricción-ligamiento, las segundas sondas oligonucleotídicas no forman horquillas significativas porque la temperatura de hibridación de la sonda con la molécula de ácido nucleico diana es demasiado alta como para permitir una formación de tallo intramolecular estable entre B₁ y B₁'. Después del ligamiento, la temperatura disminuye permitiendo que las segundas sondas oligonucleotídicas sin ligar experimenten una hibridación intramolecular entre B₁ y B₁'. El extremo 3' del segundo oligonucleótido horquillado sin ligar (B₁) se extiende formando un tallo altamente estable en términos de termodinámica. El oligonucleótido *panhandle* ya no puede participar en la extensión del cebador de PCR.

Las Figuras 22A-22C son esquemas que muestran varios diseños de sonda oligonucleotídica que facilitan la separación de productos de ligamiento de sondas oligonucleotídicas sin ligar. En la Figura 22A, la segunda sonda oligonucleotídica tiene una cola C₁ en 3' que es complementaria con la cola C₁' en 5' en la primera sonda oligonucleotídica, y en la Figura 22B, la segunda sonda oligonucleotídica tiene una cola A₁' en 3' que es complementaria con la cola A₁ en 5' en la primera sonda oligonucleotídica. En ambos casos, los productos de ligamiento correctos forman una horquilla a la temperatura utilizada para el tratamiento con exonucleasa I. La 3' exonucleasa específica monocatenaria escinde oligonucleótidos sin ligar monocatenarios, pero no productos ligados que forman horquillas. En la Figura 22C, la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas llevan marcadores complementarios específicos de diana, C₁ y C₁', y adicionalmente, la segunda sonda oligonucleotídica tiene un marcador L₁ universal. Después del ligamiento, se forma una horquilla después de la hibridación de C₁ y C₁'. Un oligonucleótido biotinilado universal (L₁') se liga con el producto horquillado en la misma reacción permitiendo la selección de estreptavidina para productos de ligamiento que portan de biotina.

Las Figuras 23A-23C muestran un ejemplo del proceso de digestión con enzima de restricción-ligamiento-PCR de la presente invención donde la detección de los productos resultantes se facilita mediante una secuencia Zipcode. La Figura 23A es un esquema que muestra del proceso de digestión con enzima de restricción-ligamiento-PCR de la presente invención. Los productos de ligamiento o productos de extensión formados durante este proceso contienen partes específicas de cebador en 3' y 5' (U1 y U2), una parte de Zipcode (Z1) y las partes específicas de diana. La Figura 23B muestra la detección del producto de ligamiento o un producto de extensión del mismo usando la parte de Zipcode en un ensayo tradicional de tipo Taqman® (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) donde un oligonucleótido de captura complementario con la parte de Zipcode sirve como la sonda Taqman®. La Figura 23C muestra captura mediada por Zipcode de productos de extensión en una matriz universal que contiene oligonucleótidos de captura complementarios.

La Figura 24 muestra un ejemplo de detección de horquilla Zipcode de separación universal de productos de ligamiento o extensión formados usando los métodos de la presente invención.

La Figura 25 muestra un ejemplo de detección de horquilla Zipcode de separación universal de productos de ligamiento o extensión formados usando los métodos de la presente invención.

Las Figuras 26A-26C muestran tres ejemplos para la detección por PCR de los productos de ligamiento o extensión de la presente invención usando formación de horquilla mediada por UniTaq (Figura 26A), sondas de 5' nucleasa UniTaq (Figura 26B) y detección de círculo UniTaq (Figura 26C).

La Figura 27 muestra cómo combinar la señal de varios sitios de metilación y normalización frente a un gen de control. Puede haber varias dianas y varios genes de control. La señal "M" proviene de un 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" proviene de un molde sin metilar. $\Delta Ct1$ se usa para calcular el porcentaje de metilación en relación con un 100 % metilado; $\Delta Ct2$ mide la metilación diferencial entre los dos genes. Como se describe en el presente documento, el uso de una mezcla de sondas oligonucleotídicas incompetentes para amplificación con sondas oligonucleotídicas competentes para amplificación en una proporción de 99:1 proporcionará una señal de control que representa el 1 % del molde de ADN de entrada total inicial. De esta manera, los niveles bajos de ADN metilado en un exceso de ADN sin metilar se pueden cuantificar con precisión.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

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 en uno o más restos metilados. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácido nucleico diana que contienen potencialmente uno o más restos metilados dentro de al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación y someter la muestra a una digestión con enzima de restricción sensible a la metilación para escindir moléculas de ácido nucleico diana en la muestra que tienen restos sin metilar dentro de la al menos una secuencia de enzima de restricción sensible a la metilación. Se proporcionan uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas, comprendiendo cada conjunto de sondas (a) una primera sonda oligonucleotídica que tiene una parte específica de diana, y (b) una segunda sonda oligonucleotídica que tiene una parte específica de diana. La primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden adyacentes entre sí en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas, y, en un conjunto de sondas, la parte específica de diana de la segunda sonda oligonucleotídica tiene un nucleótido de solapamiento idéntico en la unión con la primera sonda oligonucleotídica. El método implica además poner en contacto la muestra y los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas en condiciones eficaces para que la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se hibriden en posiciones adyacentes de una manera específica de la base con su molécula de ácido nucleico diana correspondiente, si estuvieran presentes en la muestra, en donde después de la hibridación del nucleótido de solapamiento idéntico de la segunda sonda oligonucleotídica forma una aleta en la unión que comprende el nucleótido de solapamiento idéntico. El nucleótido de solapamiento idéntico de la segunda sonda oligonucleotídica se escinde con una enzima que tiene actividad de 5' nucleasa, liberando de ese modo un 5' fosfato en la segunda sonda oligonucleotídica. La primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas se ligan juntas en la unión para formar un producto de ligamiento hibridado a su molécula de ácido nucleico diana complementaria, en donde el producto de ligamiento y su molécula de ácido nucleico diana hibridada comprenden al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. El método además implica mezclar al menos una enzima de restricción sensible a la metilación con los productos de ligamiento hibridados para formar una mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación, y someter la mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación a condiciones adecuadas para la escisión del producto de ligamiento y su molécula de ácido nucleico diana hibridada si la molécula de ácido nucleico diana no contiene uno o más restos metilados dentro de la al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. La escisión no se producirá si la molécula de ácido nucleico diana contiene uno o más restos metilados dentro de la al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. Los productos de ligamiento sin escindir en la muestra se detectan y se distinguen, y 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 se identifica basándose en la detección.

Las Figuras 1A-1D representan el proceso general de identificación de uno o más restos metilados dentro de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación de una molécula de ácido nucleico diana usando el proceso de reacción de nucleasa acoplada-ligasa-digestión con enzima de restricción sensible a la metilación de la presente invención. La reacción utiliza una pluralidad de conjuntos de sondas, consistiendo cada conjunto de sondas en al menos una primera y una segunda sondas oligonucleotídicas. Cada sonda oligonucleotídica tiene una parte específica de diana que es complementaria con una región de una secuencia de moléculas de ácido nucleico diana (Figura 1A). La primera sonda oligonucleotídica tiene un extremo 3' OH competente para ligamiento mientras que la segunda sonda oligonucleotídica tiene un extremo 5' incompetente para ligamiento (es decir, una sonda oligonucleotídica sin un 5' fosfato). De acuerdo con este aspecto de la presente invención, las sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se diseñan de modo que la parte de la base más cercana a 3' de la primera sonda oligonucleotídica se solape con la parte de la base más cercana al extremo 5' de flanqueo inmediato de la segunda sonda oligonucleotídica que es complementaria con la molécula de ácido nucleico

diana. El nucleótido de solapamiento se denomina "aleta". Como se muestra en la Figura 1B, cuando el nucleótido de aleta de solapamiento de la segunda sonda oligonucleotídica (representado como "X") es complementario con la secuencia de la molécula de ácido nucleico diana ("X'") y tiene la misma secuencia que el nucleótido en 3' de terminación de la primera sonda oligonucleotídica ("X"), el enlace fosfodiéster inmediatamente cadena arriba del nucleótido de aleta de la segunda sonda oligonucleotídica se escinde de manera discriminatoria mediante una enzima que tiene actividad de endonucleasa de aleta (FEN) o de 5' nucleasa. Esa actividad específica de FEN produce un nuevo extremo de 5' fosfato competente para ligamiento en la segunda sonda oligonucleotídica que se coloca de forma precisa a lo largo del 3' OH adyacente de la primera sonda oligonucleotídica. Dado que la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas se hibridan adyacentes entre sí, una ligasa sella el corte (Figura 1C) formando un producto de ligamiento que se hibrida con su molécula de ácido nucleico diana complementaria. Los productos de ligamiento hibridados se mezclan con al menos una enzima de restricción sensible a la metilación ("RE") para formar una reacción de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación, donde la enzima de restricción sensible a la metilación escinde el producto de ligamiento y su molécula de ácido nucleico diana hibridada si la molécula de ácido nucleico diana hibridada no contiene un resto metilado dentro de la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción sensible a la metilación. Sin embargo, esta enzima no escindirá el producto de ligamiento y su molécula de ácido nucleico diana hibridada si la molécula de ácido nucleico diana hibridada contiene uno o más restos metilados dentro de la secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación (representada en X* en la Figura 1). Los productos de ligamiento sin escindir se detectan en la muestra para identificar los restos metilados de una molécula de ácido nucleico diana presentes en la muestra. En esta representación, la primera sonda oligonucleotídica tiene una parte específica de cebador en 5' y la segunda sonda oligonucleotídica tiene una parte específica de cebador en 3' que ayudan en la detección cadena abajo del producto de ligamiento. Las sondas oligonucleotídicas también pueden contener partes alternativas relacionadas con la detección como se describe en el presente documento.

La Figura 1D muestra una reacción doble de nucleasa-ligamiento-enzima de restricción con primera, segunda, y tercera "media" sondas oligonucleotídicas. En esta realización, la primera y tercera sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden adyacentes entre sí en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre ellas y la tercera y segunda sonda oligonucleotídica de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden adyacentes entre sí en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre ellas. La parte específica de diana de la tercera sonda oligonucleotídica tiene una aleta nucleotídica idéntica de solapamiento en la unión con la primera sonda oligonucleotídica en un conjunto de sondas que se elimina mediante una enzima que tiene actividad de FEN cuando es complementaria con la secuencia de nucleótidos diana y tiene la misma secuencia que el nucleótido en 3' de terminación de la primera sonda oligonucleotídica. Del mismo modo, la parte específica de diana de la segunda sonda oligonucleotídica tiene una aleta nucleotídica idéntica de solapamiento en la unión con la tercera sonda oligonucleotídica en un conjunto de sondas que se elimina mediante una enzima que tiene actividad de FEN cuando es complementaria con la secuencia de nucleótidos diana y tiene la misma secuencia que el nucleótido en 3' de terminación de la tercera sonda oligonucleotídica. La escisión de las aletas de solapamiento libera un 5' fosfato competente para ligamiento en la tercera sonda oligonucleotídica y en la segunda sonda oligonucleotídica que permite el ligamiento entre la primera y tercera sondas y entre la segunda y tercera sondas en sus uniones respectivas para formar un producto de ligamiento. La utilización de tres sondas en un conjunto de sondas permite la detección de restos metilados alejados en regiones diana más largas.

De acuerdo con este aspecto de la presente invención, las endonucleasas de aleta o nucleasas en el extremo 5' que son adecuadas para la escisión de la aleta en el extremo 5' de la segunda sonda oligonucleotídica antes del ligamiento incluyen, sin limitación, polimerasas que tienen actividad de 5' nucleasa tal como ADN polimerasa de *E. coli* y polimerasa es de *Taq* y *T. thermophilus*, así como T4 RNasa H y *TaqExo*.

La reacción de ligamiento utilizada en éste y todos los aspectos de la presente invención se conoce bien en la técnica. Las ligasas adecuadas para ligamiento de sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas juntas en una unión de ligamiento, sin limitación, ligasa de *Thermus aquaticus*, ligasa de *E. coli*, T4 ADN ligasa, T4 ARN ligasa, ligasa *Taq*, ligasa 9 N°, y la ligasa de *Pyrococcus*, o cualquier otra ligasa termoestable conocida en la técnica. De acuerdo con la presente invención, el proceso de ligamiento con nucleasa de la presente invención se puede llevar a cabo usando una reacción de ensayo de ligamiento de oligonucleótido (OLA) (véase Landegren, *et al.*, "A Ligase-Mediated Gene Detection Technique," *Science* 241: 1077-80 (1988); Landegren, *et al.*, "DNA Diagnostics - - Molecular Techniques and Automation," *Science* 242: 229-37 (1988); y documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.988.617 de Landegren, *et al.*), una reacción de detección de ligamiento (LDR) que utiliza un conjunto de sondas oligonucleotídicas complementarias (véase, por ejemplo, el documento WO 90/17239 de Barany *et al.*), o una reacción en cadena de ligamiento (LCR) de utilizar los conjuntos de sondas oligonucleotídicas complementarias (véase, por ejemplo, documento WO 90/17239 de Barany *et al.*

Las sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se pueden presentar en la forma de ribonucleótidos, desoxinucleótidos, ribonucleótidos modificados, desoxirribonucleótidos modificados, análogos de nucleótido peptídico, análogos de nucleótido peptídico modificados, oligonucleótidos de cadena principal de fosfato-azúcar modificados, análogos de nucleótido, y mezclas de los mismos.

De acuerdo con éste y todos los aspectos de la presente invención, una "enzima de restricción sensible a la

metilación" es una endonucleasa que no escindirá su secuencia de reconocimiento relacionada en una molécula de ácido nucleico cuando contiene un resto metilado (es decir, es sensible a la presencia de un resto metilado dentro de su secuencia de reconocimiento). Una "secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación" es la secuencia de reconocimiento similar para una enzima de restricción sensible a la metilación. 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). Un listado no limitante de enzimas endonucleasa de restricción sensibles a la metilación que son adecuadas para su uso en los métodos de la presente invención incluyen, sin limitación, Acil, HinP1I, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI, o cualquier combinación de las mismas.

Las Figuras 2A-2I representan una realización de este aspecto de la presente invención en el que la metilación en una o más secuencias de reconocimiento de BstU1 dentro de una molécula de ácido nucleico diana se detecta. Como se representa en la Figura 2A, una aplicación de este método implica una etapa de digestión con BstU1 para escindir el ADN de genómico total en la muestra. Dado que BstU1 escinde el ADN sin metilar en su sitio de reconocimiento CGCG, las moléculas de ácido nucleico diana que contienen sitios BstU1 sin metilar se bloquearán esencialmente del análisis adicional, enriqueciendo de ese modo la muestra en moléculas de ácido nucleico diana que contienen sitios BstU1 metilados. Como se muestra en la Figura 2B, la primera sonda oligonucleotídica (también denominada en el presente documento sonda cadena arriba) se diseña con una base guanina ("G") en el extremo 3', y la segunda sonda oligonucleotídica (también denominada en el presente documento sonda cadena abajo) se diseña para que contenga una G cerca de su extremo 5'. La primera sonda oligonucleotídica representada en la Figura 2B puede contener además un grupo de bloqueo en el extremo 3' escindible que evita la extensión de polimerasa. Los grupos de bloqueo adecuados incluyen, sin limitación, un grupo propanol (3'SpC3), una base didesoxirribosa (3'ddC), o un fosfato (3' fosfato). La segunda sonda oligonucleotídica representada en la Figura 2B contiene además una región de aleta en su extremo 5' que es complementaria con una región en el extremo 3' de la segunda sonda oligonucleotídica. Este diseño de sonda oligonucleotídica facilita la separación de sondas oligonucleotídicas sin ligar de productos de ligamiento después de la etapa de ligamiento como se describe con más detalle en el presente documento y en el documento WO2013/123220 de Barany y Spier. En esta representación, la primera sonda oligonucleotídica tiene una parte específica de cebador en 5' y la segunda sonda oligonucleotídica tiene una parte específica de cebador en 3' que ayudan en la amplificación cadena abajo y en la detección del producto de ligamiento.

En la segunda etapa de este método, la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas se hibridan con su secuencia de ácidos nucleicos diana complementaria (Figura 2C). La escisión por FEN de la base superpuesta en el extremo 5' y la aleta de la segunda sonda oligonucleotídica genera un 5' fosfato competente para ligamiento. Si el extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica se modifica para contener un grupo de bloqueo escindible, esta modificación se puede eliminar usando RNasaH cuando la sonda se diseña para que contenga una base interna de ribonucleótidos, usando Endo IV de *Tth* o Endo IV de *E. coli* cuando la sonda se diseña para que contenga un sitio abásico interno (por ejemplo, tetrahidrofurano), o usando Endo V de *Tth* o Endo V de *E. coli* cuando la sonda se diseña para que contenga un U interno emparejado con una G en el mol de (la escisión liberará el 2º o 3º enlace fosfodiéster en el extremo 3' a la falta de coincidencia de U-G). La escisión del extremo 3' modificado de la primera sonda oligonucleotídica libera un 3'OH adecuado para ligamiento.

Un ligasa sella covalentemente el extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica al extremo 5' competente para ligamiento recién generado de la segunda sonda oligonucleotídica para generar un producto de ligamiento que comprende una parte específica de cebador en 5', partes específicas de diana y una parte específica de cebador en 3' (Etapa 3, Figura 2D). El producto de ligamiento hibridado con su molécula de ácido nucleico diana se denomina en el presente documento producto de ligamiento bicatenario. BstU1 se añade a la muestra para escindir productos de ligamiento y moléculas de ácido nucleico diana hibridadas cuando la molécula de ácido nucleico diana no está metilada (Etapa 4, Figura 2F). Los productos escindidos no se amplifican ni se detectan. BstU1 no escinde los productos de ligamiento hibridados con una molécula de ácido nucleico diana totalmente metilada, es decir, GC*GC* (Figura 2F). Por lo tanto, la detección de productos de ligamiento no escindidos indica la presencia de un sitio BstU1 metilado dentro de la molécula de ácido nucleico diana. Si la molécula de ácido nucleico diana está parcialmente metilada (es decir, GC*GC o GCGC*), BstU1 escindirá el producto de ligamiento, que, en presencia de ligasa, se volverá a ligar y posteriormente se detectará. Como se muestra en la Figura 2H (Etapa 5), el producto de ligamiento sin escindir se amplifica en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos para las partes específicas de cebador en los extremos 5' y 3' del producto de ligamiento para formar productos de extensión adecuados para la detección. Los métodos adecuados para detectar el producto de ligamiento o sus productos de extensión se describen con más detalle en el presente documento.

Como se representa en las Figuras 2E y 2G, las segundas sondas oligonucleotídicas sin ligar forman una horquilla mediante hibridación entre las regiones complementarias en los extremos 5' y 3' de la sonda. Durante la amplificación por PCR de las secuencias de producto ligado (Etapa 5), las sondas sin ligar horquilladas se extienden en su extremo 3' mediante la polimerasa para bloquear la unión de, y la posterior extensión o amplificación, por el cebador secundario en la reacción (Figura 2I).

En una realización alternativa de este aspecto de la presente invención, las sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se unen entre sí para formar una sonda acoplada. Las Figuras 3A-3I y 3J-3P muestran variaciones del

proceso de reacción de ligamiento con nucleasas usando sondas acopladas. De acuerdo con esta realización, el extremo 5' de la primera sonda oligonucleotídica está acoplado al extremo 3' de la segunda sonda oligonucleotídica (Figuras 3B y 3K). La primera sonda oligonucleotídica tiene una G en su extremo 3' y la segunda sonda oligonucleotídica tiene una G en o cerca de su extremo 5'. La primera sonda oligonucleotídica puede contener además un grupo de bloqueo del extremo 3' escindible que evita la extensión de polimerasa (por ejemplo, 3'SpC3, 3'ddC, o 3' fosfato). Después de la hibridación de las partes específicas de diana de la sonda acoplada a su molécula de ácido nucleico diana, el nucleótido de aleta en el extremo 5' se escinde usando nucleasa (Etapa 2, Figuras 3C y 3L), y el grupo de bloqueo del extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica, si estuviera presente, se escinde usando RNasaH (en una base interna de ribonucleótidos), Endo IV de *Tth* o Endo IV de *E. coli* (en un sitio abásico interno), o Endo V de *Tth* o Endo V de *E. coli* (en un U interno emparejado con una G en el molde). La escisión del nucleótido de aleta en el extremo 5' de la segunda sonda oligonucleotídica y el grupo de bloqueo del extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica libera un 5' fosfato y 3'OH, respectivamente, que son adecuados para ligamiento.

La sonda acoplada se liga para formar un producto de ligamiento circular (Etapa 3, Figuras 3D y 3M). BstU1 escinde tanto el producto de ligamiento circular como la secuencia de ácidos nucleicos diana hibridada cuando la secuencia de ácidos nucleicos diana no está metilada. No se detectan productos escindidos (Etapa 4, Figuras 3G y 3O). BstU1 no escinde el producto de ligamiento circular cuando la secuencia de ácidos nucleicos diana está completamente metilada (Etapa 4, Figuras 3F y 3N). Si la molécula de ácido nucleico diana está parcialmente metilada, BstU1 escinde el producto de ligamiento circular (pero no la molécula de ácido nucleico diana), que, en presencia de ligasa, se volverá a ligar. La detección del producto de ligamiento circular indica la presencia de un sitio BstU1 metilado dentro de la molécula de ácido nucleico diana. Como se muestra en las Figuras 3H y 3P (Etapa 5), el producto de ligamiento circular sin escindir se amplifica por PCR para formar productos de extensión detectables. Los métodos adecuados para detectar los productos de extensión se describen con más detalle en el presente documento.

Para reducir la señal de falso positivo independiente de la diana que surge de las sondas sin ligar durante el proceso de reacción de las figuras 3A-3I, las sondas oligonucleotídicas acopladas se pueden diseñar de manera que las sondas sin ligar formen horquillas a menor temperatura y se extiendan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican y no se detectan (Figuras 3E y 3I). Para facilitar la formación de horquillas, la sonda oligonucleotídica acoplada comprende un segmento que es complementario con una parte del extremo 3' de la sonda como se muestra en la Figura 3E. En ausencia de ligamiento, la parte del extremo 3' de la sonda acoplada se hibrida con el segmento complementario para formar una sonda oligonucleotídica acoplada en espiral. La extensión de la parte del extremo 3' de la sonda oligonucleotídica horquillada acoplada durante la primera ronda de PCR posterior forma una sonda oligonucleotídica horquillada acoplada extendida que bloquea la unión de un cebador de PCR a su secuencia complementaria (Figura 3I). Un medio alternativo para reducir la generación de señales de falso positivo a partir de sondas sin ligar es incorporar una etapa de digestión con exonucleasa después del ligamiento como se describe en el proceso de las Figuras 3J-3P. En esta variación, no es necesario que las sondas acopladas contengan regiones complementarias requeridas para facilitar la formación de horquillas.

También se desvela 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 en uno o más restos metilados. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácido nucleico diana que contienen potencialmente uno o más restos metilados dentro de una o más secuencias de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación, y proporcionar uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas, comprendiendo cada conjunto de sondas (a) una primera sonda oligonucleotídica que tiene una parte específica de diana, y (b) una segunda sonda oligonucleotídica que tiene una parte específica de diana que contiene al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. La primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden en la molécula de ácido nucleico diana. La muestra y los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas se ponen en contacto en condiciones eficaces para que la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se hibriden de una manera específica de la base con su molécula de ácido nucleico diana correspondiente, si estuviera presente en la muestra, para formar productos de hibridación. El método además implica la mezcla de al menos una enzima de restricción sensible a la metilación con los productos de hibridación, si estuvieran presentes en la muestra, para formar una mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación. La mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación se somete a condiciones adecuadas para que la enzima de restricción sensible a la metilación se escinda de la segunda sonda oligonucleotídica de un producto de hibridación en su secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación si la molécula de ácido nucleico diana del producto de hibridación contiene uno o más restos metilados dentro de la secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación, liberando dicha escisión un 5' fosfato en la segunda sonda oligonucleotídica. La primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas se ligan juntas para formar productos de ligamiento. El método implica además detectar y distinguir los productos de ligamiento en la muestra, e identificar 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 basándose en dicha detección.

Las Figuras 4A-4D representan el proceso general de identificación de uno o más restos metilados dentro de una

secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación de una molécula de ácido nucleico diana usando el proceso acoplado de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-reacción de ligamiento de acuerdo con este método que se desvela. Como se muestra en la Figura 4A, este método implica al menos una primera y segunda sondas oligonucleotídicas. La segunda sonda oligonucleotídica tiene una parte específica de diana que contiene una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación sin metilar en el extremo 5' (representada como "RE") que se solapan mediante el extremo 3'OH de la primera sonda oligonucleotídica, que también tienen una parte específica de diana. Como se muestra en la Figura 4B, cuando la segunda sonda oligonucleotídica se hibrida con una molécula de ácido nucleico diana que contiene uno o más restos metilados dentro de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación (Representada como "RE*"), la escisión con enzima de restricción sensible a la metilación de la segunda sonda oligonucleotídica hibridada genera un 5' fosfato competente para ligamiento. Una ligasa sella los dos extremos libres de la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas (Figura 4C) formando una secuencia de producto ligado. En esta representación, la primera sonda oligonucleotídica tiene una parte específica de cebador en 5' y la segunda sonda oligonucleotídica tiene una parte específica de cebador en 3' que ayudan en la amplificación y detección del producto de ligamiento. La detección de la secuencia del producto ligado identificar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana metilada en la muestra. La Figura 4D muestra una reacción doble de enzima de restricción-ligamiento con la primera, segunda, y tercera (media) sondas oligonucleotídicas.

Las Figuras 5 y 6 representan aplicaciones de este método cuando se detecta metilación en una o más secuencias de reconocimiento de BstU1 dentro de una molécula de ácido nucleico diana. Las Figuras 5A-5H representan el método usando primera y segunda sondas oligonucleotídicas primera y segunda sin unirse, mientras que las Figuras 6A-6H y 6I-6N representan variaciones del método usando primera y segunda sondas oligonucleotídicas unidas o acopladas. Una primera etapa opcional de este método implica una etapa de digestión con BstU1 para escindir el ADN genómico total en la muestra (Etapa 1, Figuras 5A, 6A, y 6I). Como se señaló anteriormente, esta etapa bloquea esencialmente los sitios BstU1 sin metilar de un análisis posterior. Como se muestra en las Figuras 5B, 6B, y 6J el extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica contiene nucleótidos de citosina-guanina (CG) que son complementarios a una parte del sitio BstU1 en la molécula de ácido nucleico diana. La primera sonda oligonucleotídica puede contener además un grupo de bloqueo del extremo 3' escindible que evita la extensión de la polimerasa (por ejemplo, 3'SpC3, 3'ddC, o 3' fosfato). La segunda sonda oligonucleotídica, diseñada para que contenga toda la secuencia de reconocimiento de BstU1, también tiene nucleótidos CG en o cerca de su extremo 5'. La segunda sonda oligonucleotídica representada en la Figura 5B contiene además una región de aleta en su extremo 5' que es complementaria con una región 3' cadena abajo para facilitar la formación de horquillas en ausencia de ligamiento como se describió anteriormente. Las sondas oligonucleotídicas de las Figuras 5B, 6B, y 6J comprenden además partes específicas de cebador en los extremos 5' y 3' que ayudan en la amplificación y detección cadena abajo del producto de ligamiento.

De acuerdo con la presente divulgación, la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas se hibridan con su secuencia de ácidos nucleicos diana complementaria (Etapa 2, Figuras 5C, 6C, y 6K). La escisión con BstU1 de las bases nucleotídicas que se solapan en el extremo 5' y la aleta de la segunda sonda oligonucleotídica genera un 5' fosfato competente para ligamiento cuando la molécula de ácido nucleico diana está hemimetilada (Etapa 2, Figuras 5C, 6C, y 6K). Si la molécula de ácido nucleico diana está sin metilar, BstU1 escinde tanto la segunda sonda oligonucleotídica como la molécula de ácido nucleico diana hibridada, excluyéndola del análisis adicional (Figuras 5D, 6D, y 6L). Del mismo modo, si la molécula de ácido nucleico diana está totalmente metilada en el sitio BstU1, la escisión con BstU1 no se producirá, evitando el ligamiento y la detección de la sonda cadena abajo. Si el extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica se modifica para que contenga un grupo del bloqueo escindible, esta modificación se elimina como se describió anteriormente. La escisión del extremo 3' modificado de la primera sonda oligonucleotídica libera un 3'OH adecuado para ligamiento.

Después de la escisión con BstU1 del extremo 5' de la segunda sonda oligonucleotídica, el extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica se hibrida con la molécula de ácido nucleico diana generando de ese modo una unión de ligamiento entre la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas que se sella mediante una ligasa (Etapa 3, Figuras 5E, 6E, y 6M). Como se representa en las Figuras 5E, 6E, y 6M, el diseño de la primera sonda oligonucleotídica para que contenga una citosina metilada (C*) en su extremo 3' evita la reescisión con BstU1 después de la hibridación del extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica con la molécula de ácido nucleico diana. El producto de ligamiento lineal de la Figura 5G y los productos de ligamiento circulares de las Figuras 6G y 6N son adecuados para amplificación por PCR (Etapa 4) para generar productos de extensión que son adecuados para detección, identificando de ese modo la presencia de sitios BstU1 hemimetilados en las moléculas de ácido nucleicos diana de una muestra.

Para reducir la señal de falso positivo independiente de la diana que surge de las sondas sin ligar durante el proceso de reacción, se pueden diseñar sondas oligonucleotídicas de modo que las sondas sin ligar formen horquillas a menor temperatura y se extienden sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican y no se detectan (Figuras 5F y 5H y Figuras 6F y 6H). Como se representa en las Figuras 5F y 6F, las sondas sin ligar forman una horquilla mediante hibridación entre las regiones complementarias en los extremos 5' y 3'. Durante la amplificación por PCR de las secuencias de producto ligado (Etapa 4), las sondas sin ligar horquilladas se extienden en su extremo 3' mediante la polimerasa para bloquear la unión de, y la posterior extensión o amplificación, por el cebador

secundario en la reacción de PCR (Figuras 5H y 6H). Un medio alternativo para reducir la generación de señales de falso positivo a partir de sondas acopladas sin ligar es incorporar una etapa de digestión con exonucleasa después del ligamiento como se representa en el proceso de las Figuras 6I-6N. En esta variación, no es necesario que las sondas acopladas contengan regiones complementarias necesarias para facilitar la formación de horquillas.

Las Figuras 7 y 8 representan aplicaciones del método desvelado en el que se detecta metilación en una o más secuencias de reconocimiento de HinP1I (es decir, GCGC) dentro de una molécula de ácido nucleico diana. Las Figuras 7A-7H representan el método usando primera y segunda sondas oligonucleotídicas primera y segunda sin unirse, mientras que las Figuras 8A-8H y 8I-8N representan el método usando la primera y segunda sondas oligonucleotídicas acopladas. Una primera etapa opcional de este método implica una etapa de digestión con HinP1I para escindir el ADN genómico total en la muestra (Etapa 1, Figuras 7A, 8A, y 8I). Dado que HinP1I extiende el ADN en su secuencia de reconocimiento de GCGC sin metilar, esta etapa bloquea esencialmente los sitios HinP1I sin metilar del análisis adicional.

Como se muestra en las Figuras 7B, 8B, y 8J, el extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica contiene un nucleótido de G que es complementario con una parte del sitio HinP1I en la molécula de ácido nucleico diana. La primera sonda oligonucleotídica puede contener además un grupo de bloqueo del extremo 3' escindible que evita la extensión de la polimerasa (por ejemplo, 3'SpC3, a 3'ddC, o 3' fosfato). La segunda sonda oligonucleotídica, diseñada para que contenga toda la secuencia de reconocimiento HinP1I, también tiene nucleótido de G en acerca de su extremo 5'. La segunda sonda oligonucleotídica representada en la Figura 7B contiene además una región de aleta en su extremo 5' que es complementaria con una región en el extremo 3' cadena debajo de la sonda para facilitar la formación de horquillas en ausencia de ligamiento como se describió anteriormente. Las sondas oligonucleotídicas de las Figuras 7B, 8B, y 8J comprenden además partes específicas de cebador en los extremos 5' y 3' que ayudan en la amplificación y detección cadena abajo del producto de ligamiento.

De acuerdo con la presente divulgación, la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas se hibridan con su secuencia de ácidos nucleicos diana complementaria (Figuras 7C, 8C, y 8K). La escisión con HinP1I de la base nucleotídica que se solapa en 5' y la aleta de la segunda sonda oligonucleotídica genera un 5' fosfato competente para ligamiento cuando la molécula de ácido nucleico diana hibridada está metilada (Etapa 2, Figuras 7C, 8C, y 8K). Si la molécula de ácido nucleico diana está sin metilar, HinP1I escinde tanto la segunda sonda oligonucleotídica como la molécula de ácido nucleico diana hibridada, excluyéndola del análisis adicional (Figuras 7D, 8D, y 8L). Si el extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica se modifica para que contenga un grupo de bloqueo escindible, esta modificación se elimina usando una endonucleasa de restricción para cortar una hebra de oligonucleótido sin metilar hibridada con una hebra diana metilada, o cualquier otra enzima de escisión adecuada como se describió anteriormente. La escisión del extremo modificado en el extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica libera un 3'OH adecuado para ligamiento.

Después de la escisión con HinP1I del extremo 5' de la segunda sonda oligonucleotídica, el extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica se hibrida con la molécula de ácido nucleico diana generando de ese modo una unión de ligamiento entre la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas que se sella mediante una ligasa (Etapa 4, Figuras 7E, 8E, y 8M). HinP1I se puede inactivar térmicamente para evitar la reescisión después de la hibridación del extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica con la molécula de ácido nucleico diana y ligamiento con la segunda sonda oligonucleotídica. El producto de ligamiento lineal de la Figura 7G y los productos de ligamiento circulares de las Figuras 8G y 8N son adecuados para amplificación por PCR (Etapa 5) para generar productos de extensión que son adecuados para detección, identificando de ese modo la presencia de sitios HinP1I metilados en moléculas de ácido nucleico diana de una muestra.

Como se representa en las Figuras 7F y 8F, se pueden diseñar sondas oligonucleotídicas para formar una horquilla mediante hibridación entre las regiones 5' y 3' complementarias en ausencia de ligamiento. Durante la amplificación por PCR de las secuencias de producto ligado (Etapa 5), las sondas sin ligar horquilladas se extienden en su extremo 3' mediante la polimerasa para bloquear la posterior extensión o amplificación con el cebador secundario en la reacción de PCR (Figuras 7H y 8H). Un medio alternativo para reducir la generación de señales de falso positivo de las sondas acopladas sin ligar es incorporar una etapa de digestión con exonucleasa después de ligamiento como se representa en el proceso de las Figuras 8I-8N. En esta variación, no es necesario que las sondas acopladas contengan regiones complementarias necesarias para facilitar la formación de horquillas.

Las Figuras 9 y 10 representan una aplicación de la presente divulgación que es adecuada para detectar la metilación en sitios HinP1I adyacentes dentro de una molécula de ácido nucleico diana. Las Figuras 9A-9L representan métodos que usan una primera y segunda sondas oligonucleotídicas no acopladas, mientras que las Figuras 10A-10J representan métodos que usan una primera y segunda sondas oligonucleotídicas acopladas. Aunque no se representa, una digestión con HinP1I inicial de la muestra de ADN se puede llevar a cabo para enriquecer la muestra para sitios HinP1I metilados. Como se muestra en la Figura 9A y 9G, la primera sonda oligonucleotídica de un conjunto de sondas se diseña para que contenga una secuencia de reconocimiento de HinP1I sin metilar cerca de su extremo 3'. El extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica se bloquea de la extensión mediada por polimerasa mediante una horquilla (Figura 9A), un grupo de bloqueo escindible (Figura 9G) (por ejemplo, 3'SpC3, 3'ddC, o 3' fosfato), u otro medio adecuado, y el extremo 5' de la sonda contiene una parte

específica de cebador. La segunda sonda oligonucleotídica de un conjunto de sondas contiene la secuencia de reconocimiento HinP1I cerca de su extremo 5', una aleta en el extremo 5' opcional, y una parte específica de cebador en 3'. Cuando se usa un enfoque de sonda acoplada como se muestra en las Figuras 10A-10J, la primera sonda oligonucleotídica contiene una secuencia de reconocimiento HinP1I sin metilar cerca de su extremo 3'. El extremo 3' de la sonda en este ejemplo contiene una falta de coincidencia de nucleótidos con respecto a la secuencia de nucleótidos diana para evitar la extensión por polimerasa (Figuras 10A y 10G). Como alternativa, el extremo 3' de la primera sonda puede contener un grupo de bloqueo escindible como se describió anteriormente. La primera sonda oligonucleotídica de la sonda acoplada también contiene una parte específica de cebador en 5'. La segunda sonda oligonucleotídica de la sonda acoplada contiene una secuencia de reconocimiento HinP1I sin metilar cerca de su extremo 5' y una parte específica de cebador en 3' (Figuras 10A y 10G). La sonda acoplada en el proceso representado en las Figuras 10A-10F también contiene regiones de complementariedad en el extremo 3' y 5' (Figura 10A "Arriba"/"Arriba") para facilitar la formación de horquilla de la sonda en ausencia de ligamiento.

Después de la hibridación de las sondas oligonucleotídicas con una molécula de ácido nucleico diana metilada complementaria en los procesos de las Figuras 9 y 10, HinP1I escinde la primera sonda oligonucleotídica para generar un 3'OH competente para extensión y escinde la segunda sonda oligonucleotídica para generar un 5' fosfato competente para ligamiento (Etapa 2, Figuras 9B, 9H, 10B y 10H). Una polimerasa extiende el extremo 3' liberado de la primera sonda oligonucleotídica para generar una unión de ligamiento entre la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas, y una ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas creando un producto de ligamiento (Etapa 3, Figuras 9C, 9I, 10C, y 10I). La reescisión con HinP1I del producto de ligamiento se puede evitar incorporando una etapa de inactivación térmica o mediante la incorporación de nucleótidos modificados por polimerasa. Solo los productos de ligamiento de las moléculas de ácido nucleico diana metiladas se amplifican y detectan por PCR (Etapa 4, Figuras 9E, 9K, 10E y 10J). Las moléculas de ácido nucleico diana que contienen restos sin metilar en cualquier sitio HinP1I correspondiente a la primera o segunda sondas oligonucleotídicas se escinden mediante HinP1I junto con las sondas hibridadas, evitando de ese modo la extensión, el ligamiento y la detección posteriores.

Como se representa en las Figuras 9D y 10D, las segundas sondas oligonucleotídicas sin ligar y las sondas acopladas sin ligar forman una horquilla mediante hibridación entre las regiones complementarias 5' y 3'. Durante la amplificación por PCR de las secuencias de producto ligado (Etapa 4), las sondas sin ligar horquilladas se extienden en su extremo 3' mediante la polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación, por los cebadores oligonucleotídicos en la reacción de PCR (Figuras 9F y 10F). En el proceso de las Figuras 10G-10J, la sonda oligonucleotídica acoplada no forma una horquilla en ausencia de ligamiento. En la presente divulgación, una digestión con exonucleasa después del ligamiento elimina las sondas sin ligar del proceso de reacción.

Las Figuras 11A-11F demuestran 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 la Figura 9, para proporcionar una señal de control equivalente a la presencia de un 1% de ADN metilado. Se proporcionan dos primeras sondas oligonucleotídicas, conteniendo cada una un sitio HinP1I sin metilar y una región de horquilla en el extremo 3' o grupo de bloqueo, donde una de la primera sonda oligonucleotídica contiene una parte específica de cebador en 5' u otro marcador de amplificación y la otra primera sonda oligonucleotídica no contiene la parte específica de cebador en 5' o contiene un marcador no amplificador (Figura 11A). Se proporcionan las dos primeras sondas oligonucleotídicas en una mezcla en una proporción conocida, por ejemplo 1:99, respectivamente. La segunda sonda oligonucleotídica contiene un sitio HinP1I y una aleta en el extremo 5' como se describió anteriormente con referencia a la Figura 9. Las sondas oligonucleotídicas se hibridan con el ADN de control, la escisión de HinP1I se lleva a cabo para generar extremos 3' OH competentes para extensión en las primeras sondas oligonucleotídicas y un extremo 5' competente para ligamiento en la segunda sonda oligonucleotídica (Etapa 2, Figura 11B). La polimerasa extiende los extremos 3' liberados de las primeras sondas oligonucleotídicas para crear una unión de ligamiento con la segunda sonda oligonucleotídica, y una ligasa sella covalentemente los extremos libres de las sondas (Etapa 3, Figura 11C). La PCR amplifica solo los productos de ligamiento. Dado que un 99% de los productos de ligamiento contienen un marcador no amplificador, solo un 1% de los productos de ligamiento que contengan la parte específica de cebador en 5' se amplificarán y detectarán (Etapa 4, Figura 11D). La señal generada a partir de la reacción de control es equivalente a la señal que se podría generar a partir de una molécula de ácido nucleico diana metilada presente en un 1% de la muestra de ADN. Las sondas sin ligar forman horquillas que se extienden durante la amplificación por PCR de los productos de ligamiento (Figuras 11D y 11F).

Las Figuras 12A-12D representan un proceso de reacción de ligamiento con nucleasa de la presente divulgación para detectar la metilación en sitios HinP1I alejados en la misma molécula de ácido nucleico diana. De acuerdo con la presente solicitud, se usan primeras y segundas sondas acopladas junto con una tercera sonda o sonda media. El extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica de la sonda acoplada contiene un nucleótido G que es complementario con una parte de un primer sitio HinP1I en la molécula de ácido nucleico diana. El extremo 3' de la primera sonda también puede contener un grupo de bloqueo escindible como se describió anteriormente. El extremo 5' de la sonda media se diseña para que contenga toda la secuencia de reconocimiento de HinP1I que es complementaria con el primer sitio HinP1I en la molécula de ácido nucleico diana. El resto de nucleótido G de la secuencia de reconocimiento que está en oferta del extremo 5' de la sonda media se solapa con el resto de nucleótido G en el extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica. El extremo 3' de la sonda media se diseña para

que contenga un nucleótido G que es complementario con una parte de un segundo sitio HinP1I en la molécula de ácido nucleico diana que está alejado del primer sitio HinP1I. El extremo 3' de la sonda media también puede contener un grupo de bloqueo escindible como se describió anteriormente. La segunda sonda oligonucleotídica de la sonda acoplada se diseña para que contenga toda la secuencia de reconocimiento HinP1I que es complementaria con el segundo sitio HinP1I en la molécula de ácido nucleico diana. El resto de nucleótido G de la secuencia de reconocimiento que está en o cerca del extremo 5' de la segunda sonda se solapa con el resto de nucleótido G en el extremo 3' de la sonda oligonucleotídica media. La primera y segunda sondas oligonucleotídicas de la sonda acoplada también contienen partes específicas de cebador en los extremos 5' y 3'.

De acuerdo con la presente solicitud, las sondas oligonucleotídicas primera, media, y segunda se hibridan con su secuencia de ácidos nucleicos diana complementaria (Figura 12B). Cuando la molécula de ácido nucleico diana hibridada está metilada, HinP1I escinde la base nucleotídica que se solapa en 5' de las sondas oligonucleotídicas media y segunda, respectivamente, para generar extremos en 5' competentes para ligamiento en cada sonda (Etapa 2, Figura 12B). Si la molécula de ácido nucleico diana está sin metilar, HinP1I escinde la sonda oligonucleotídica tanto media como segunda así como la molécula de ácido nucleico diana hibridada, excluyéndola de ese modo del análisis adicional. Si el extremo 3' de la sonda primera y/o media contiene una modificación de bloqueo escindible, esta modificación se elimina usando una enzima de escisión adecuada como se describió anteriormente. La escisión del grupo de bloqueo en 3' de la primera sonda oligonucleotídica libera un 3'OH adecuado para ligamiento.

Después de la escisión con HinP1I del extremo 5' de la sonda oligonucleotídica media, el extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica se hibrida con la molécula de ácido nucleico diana generando de ese modo una unión de ligamiento entre las sondas oligonucleotídicas primera y media que se sella mediante una ligasa (Etapa 3, Figura 12C). Del mismo modo, después de la escisión con HinP1I del extremo 5' de la segunda sonda oligonucleotídica, el extremo 3' de la sonda oligonucleotídica media se hibrida con la molécula de ácido nucleico diana generando de ese modo una unión de ligamiento entre las sondas de nucleótidos media y segunda que se sella mediante una ligasa (Etapa 3, Figura 12C). HinP1I se puede inactivar térmicamente para evitar la reescisión después de la hibridación y el ligamiento de las sondas. El producto del ligamiento circular de la Figura 12D es adecuado para amplificación por PCR (Etapa 4) para generar productos de extensión que son adecuados para detección, identificando de ese modo la presencia de sitios HinP1I metilados alejados en la misma molécula de ácido nucleico diana.

Las Figuras 13 y 14 representan la utilización de un proceso de reacción de ligamiento con nucleasa de la presente invención para detectar sucesos de translocación génica en una molécula de ácido nucleico diana en la que se desconoce la posición precisa de la unión. Este método puede implicar el uso de tres sondas lineales como se representa en las Figuras 13A-13D o las sondas acopladas primera y segunda junto con una tercera sonda (media) como se muestra en las Figuras 14A-14D. En cualquiera variación, la primera sonda (marcada como "sonda cadena arriba" en las Figuras 13 y 14) contiene una parte específica de cebador en 5' y una parte específica de diana génica cadena arriba en su extremo 3'. El extremo 3' de la primera sonda puede ser un extremo competente para ligamiento o puede contener un grupo de bloqueo escindible (por ejemplo, 3'SpC3, 3'ddC, o 3' fosfato). La escisión del grupo de bloqueo en 3' de la primera sonda oligonucleotídica, por ejemplo, usando RNasaH (en una base de ribonucleótidos interna) o Endo IV de *Tth* o Endo IV de *E. coli* (en un sitio abásico interno), libera un extremo 3' competente para ligamiento.

El extremo 3' competente para ligamiento de la primera sonda se solapa con el extremo 5' de flanqueo de la sonda media que también contiene una parte específica de diana génica cadena arriba, cuando las sondas oligonucleotídicas primera y media se hibridan en posiciones adyacentes en la secuencia de nucleótidos diana génica cadena arriba (Figuras 13A y 14A). La sonda media también contiene una parte específica de diana génica cadena abajo en su extremo 3'. El extremo 3' competente para ligamiento de la sonda media se solapa con el extremo 5' de flanqueo de la segunda sonda oligonucleotídica que también contiene una parte específica de diana génica cadena abajo, cuando las sondas oligonucleotídicas media y segunda se hibridan en posiciones adyacentes en la secuencia de nucleótidos diana génica cadena abajo (Figuras 13A y 14A). La segunda sonda (marcada como sonda "cadena abajo" en las Figuras 13 y 14), también contiene una parte específica de cebador en 5'. En algunas realizaciones, las sondas primera o media se pueden extender mediante polimerasa en su extremo 3' de modo que la base más cercana al extremo 3' de la sonda primera o media se solape inmediatamente mediante el resto del extremo 5' de la sonda media o segunda, respectivamente.

La actividad de 5' nucleasa de la polimerasa escinde el nucleótido de aleta de solapamiento en el extremo 5' de la sonda media cuando es el mismo nucleótido que el nucleótido en 3' de terminación en la primera sonda, y escinde el nucleótido de aleta de solapamiento en el extremo 5' de la segunda sonda cuando es el mismo nucleótido que el nucleótido en 3' de terminación en la sonda media (Etapa 2, Figuras 13B y 14B). La escisión con nucleasa de las sondas media y segunda genera extremos en 5' competentes para ligamiento en cada sonda. Como las sondas primera y media se hibridan adyacentes entre sí, una ligasa sella la unión de ligamiento (Etapa 3, Figuras 13C y 14C). Del mismo modo, una ligasa sella la unión entre las sondas media y segunda hibridadas adyacentes (Etapa 3, Figuras 13C y 14C).

El producto de ligamiento lineal de la Figura 13D y el producto de ligamiento circular de la Figura 14D son adecuados para amplificación por PCR (Etapa 4) para generar productos de extensión que son adecuados para

detección, identificando de ese modo la presencia de una translocación génica dentro de una molécula de ácido nucleico diana de muestra.

Para reducir la señal de falso positivo independiente de diana que surge de las sondas sin ligar durante el proceso de reacción de ligamiento con nucleasa, la sonda cadena abajo en la Figura 13 y la sonda acoplada en la Figura 14 se pueden diseñar de manera que, en ausencia de ligamiento, formen horquillas a menor temperatura y se extiendan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican y no se detectan. Como alternativa, cuando se forman productos de ligamiento circulares, una etapa de digestión con exonucleasa después del ligamiento eliminará las sondas y la diana no ligadas del proceso de reacción.

Las Figuras 15 y 16 representan la utilización del proceso de reacción de ligamiento con nucleasa de la presente invención para detectar SNP alejados o sucesos de corte y empalme alternativos en una molécula de ácido nucleico diana, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico diana de ADN o ARNm. Este método puede implicar el uso de tres sondas lineales como se representa en las Figuras 15A-15D o la primera y segunda sondas acopladas usadas junto con una sonda tercera/media como se representa en las Figuras 16A-16D. En cualquier variación, la primera sonda ("sonda cadena arriba") contiene una parte específica de cebador en 5' y una parte específica de diana génica cadena arriba en su extremo 3'. El extremo 3' de la primera sonda puede ser un extremo competente para ligamiento o puede contener un grupo de bloqueo escindible (por ejemplo, 3'SpC3, 3'ddC, o 3' fosfato). La escisión del grupo de bloqueo en 3' de la primera sonda oligonucleotídica, por ejemplo, usando RNasaH (en una base de ribonucleótidos interna) o Endo IV de *Tth* o Endo IV de *E. coli* (en un sitio abásico interno), libera un extremo 3' competente para ligamiento.

El extremo 3' competente para ligamiento de la primera sonda se solapa con el extremo 5' de flanqueo inmediato de la sonda media que también contiene una parte específica de diana génica cadena arriba, cuando las sondas oligonucleotídicas primera y media se hibridan en posiciones adyacentes en la secuencia de nucleótidos diana génica cadena arriba (Figuras 15A y 16A). La sonda media también contiene una parte específica de diana génica cadena abajo en su extremo 3'. El extremo 3' competente para ligamiento de la sonda media se solapa con el extremo 5' de flanqueo inmediato de la segunda sonda oligonucleotídica que también contiene una parte específica de diana génica cadena abajo, cuando las sondas oligonucleotídicas media y segunda se hibridan en posiciones adyacentes en la secuencia de nucleótidos diana génica cadena arriba en la secuencia de nucleótidos diana génica cadena abajo (Figuras 15A y 16A). La segunda sonda ("sonda cadena abajo") también contiene una parte específica de cebador en 5'. En algunas realizaciones, las sondas primera o media se pueden extender con polimerasa en su extremo 3' de modo que la base más cercana al extremo 3' de la sonda primera o media se solapa inmediatamente mediante el resto en el extremo 5' de la sonda media o segunda, respectivamente.

La actividad de 5' nucleasa de la polimerasa escinde el nucleótido aleta solapado en el extremo 5' de la sonda media cuando es el mismo nucleótido que el nucleótido en 3' de terminación en la primera sonda, y escinde el nucleótido aleta solapado en el extremo 5' de la segunda sonda cuando es el mismo nucleótido que el nucleótido en 3' de terminación en la sonda media (Etapa 2, Figuras 15B y 16B). La escisión con nucleasa de las sondas media y segunda genera extremos 5' competentes para ligamiento en cada sonda. Dado que las sondas primera y media se hibridan adyacentes entre sí, una ligasa sella la unión de ligamiento (Etapa 3, Figuras 15C y 16C). Del mismo modo, una ligasa sella la unión entre las sondas media y segunda hibridadas adyacentes (Etapa 3, Figuras 15C y 16C).

El producto de ligamiento lineal de la Figura 15D y el producto de ligamiento circular de la Figura 16D son adecuados para amplificación por PCR (Etapa 4) para generar productos de extensión que son adecuados para detección, identificando de ese modo la presencia de SNP alejados o un suceso de corte y empalme alternativo dentro de una molécula de ácido nucleico diana de una muestra.

Para reducir la señal de falso positivo independiente de diana que surge de las sondas sin ligar durante el proceso de reacción de ligamiento con nucleasa, la sonda cadena abajo en la Figura 15 y la sonda acoplada en la Figura 16 se pueden diseñar de manera que, en ausencia de ligamiento, formen horquillas a menor temperatura y se extiendan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican y no se detectan como se describió anteriormente. Como alternativa, cuando se forman productos de ligamiento circulares, una etapa de digestión con exonucleasa después del ligamiento se puede usar para eliminar sondas y diana sin ligar del proceso de reacción.

Como se representa en las Figuras 3, 6, 8, 10, 12, y 16 las sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas adecuadas para llevar a cabo los procesos de ligamiento con nucleasa o reacción de digestión con enzima de restricción-ligamiento se pueden unir para formar una sonda acoplada o sonda circular. De acuerdo con la presente solicitud, el extremo 5' de la primera sonda oligonucleotídica (también denominada en el presente documento sonda cadena arriba) está acoplado al extremo 3' de la segunda sonda oligonucleotídica (también denominada en el presente documento son la cadena abajo). Después de la hibridación de las partes específicas de diana de la sonda acoplada a su molécula de ácido nucleico diana, y la escisión con nucleasa o enzima de restricción, la sonda acoplada se liga para formar una secuencia de producto ligado circular. Las Figuras 17A-17E muestran el proceso de digestión con enzima de restricción-ligamiento usando un diseño de sonda oligonucleotídica acoplada (es decir, una sonda circularizable). Una sonda oligonucleotídica acoplada que tiene una secuencia de reconocimiento sensible a la metilación sin metilar se une a una molécula de ácido nucleico diana complementaria (Figura 17A). La

enzima de restricción sensible a la metilación escinde la secuencia de reconocimiento solo de la sonda oligonucleotídica si la molécula de ácido nucleico diana hibridada está metilada (Figura 17B), pero escindiría tanto la sonda como la molécula de ácido nucleico diana hibridada si el ácido nucleico diana está sin metilar (Figura 17C). Después de la escisión de la sonda oligonucleotídica cuando la molécula de ácido nucleico diana está metilada, el

5 ligamiento sella el extremo 3' de la sonda circular con el extremo 5' de la sonda circular formando un producto resistente a exonucleasa (Figura 17D). Las sondas oligonucleotídicas no circulares sin ligar se pueden digerir usando, por ejemplo, las exonucleasas I y III (Figura 17E). Opcionalmente, las sondas oligonucleotídicas se pueden escindir internamente en un dominio de escisión (símbolo de Estrella), por ejemplo, un tramo dU dirigido por UNG + calor = estiramiento de fosfodiéster abásico lábil. Los rectángulos abiertos y sombreados de la sonda circular

10 representan sitios de cebador de PCR universales para amplificación por PCR del producto de ligamiento.

Las sondas acopladas se pueden diseñar para que incluyan todas las características descritas en el presente documento para las sondas sin acoplar, por ejemplo, regiones de cebador cadena arriba/cadena abajo, partes de Zipcode, partes de detección UniTaq y partes de cebador, partes marcadoras, etc.

15

Las sondas acopladas también pueden contener características de diseño que facilitan la linealización de un producto de ligamiento circularizado antes de la amplificación por PCR o facilitan la formación de productos de extensión linealizados. Estas características se diseñan para evitar la destrucción del producto de extensión por una polimerasa que contiene exonucleasa en 5'→3' durante la amplificación por PCR de un producto de ligamiento circularizado. Una de estas características de diseño es la inclusión de una secuencia espaciadora o enlace químico

20 en la sonda acoplada que bloquea la extensión con polimerasa a través de esa región, es decir, un bloqueador de polimerasa, evitando de ese modo la replicación de todo el producto ligado circularizado y permitiendo la formación de productos de extensión linealizados. La sonda acoplada se puede diseñar para que contenga una secuencia que está sujeta a escisión después de ligamiento como se describe en referencia a la Figura 17, por ejemplo, una base uracilo que está sujeta a escisión por una uracil ADN glicosilasa y, opcionalmente, endonucleasa AP, para linealizar un producto de ligamiento circularizado antes de la amplificación. Antes de la escisión del producto de ligamiento circularizado, las sondas acopladas sin ligar (así como el ADN molde de entrada) se eliminan mediante digestión con exonucleasa. El problema mencionado anteriormente de la destrucción del producto de extensión también se puede resolver utilizando, cuando sea posible, una polimerasa que carece de actividad de 5'→3' exonucleasa durante la

25 etapa inicial de amplificación del cebador universal, o usando cebadores oligonucleotídicos secundarios complementarios con el producto de ligamiento circular que contienen modificaciones en el extremo 5' para hacerlos resistentes a la actividad de 5'→3' exonucleasa de la polimerasa. Las modificaciones de ese tipo en 5' incluyen el uso de tiofosfato en la unión de la cadena principal y/o el uso de análogos de 2'-O-metil nucleótidos.

30

Como ya se describió anteriormente, las sondas oligonucleotídicas acopladas también pueden contener segmentos complementarios para facilitar la formación de sondas sin ligar antes de la amplificación de los productos de ligamiento. Para facilitar la formación de horquillas, la sonda oligonucleotídica acoplada comprende un segmento que es complementario con una parte del extremo 3' de la sonda. En ausencia de ligamiento, la parte del extremo 3' de la sonda acoplada se hibrida con el segmento complementario para formar una sonda oligonucleotídica acoplada

35 en espiral. La extensión de la parte del extremo 3' de la sonda oligonucleotídica horquillada acoplada durante la primera ronda de PCR posterior forma una sonda oligonucleotídica horquillada acoplada extendida que bloquea la unión del segundo cebador oligonucleotídico a su secuencia complementaria. La ventaja de este enfoque es que elimina las sondas acopladas sin ligar de los procesos de amplificación cadena abajo y detección sin requerir ninguna etapa de digestión adicional (por ejemplo, digestión con exonucleasa).

40

También se proporciona otro 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 en uno o más restos metilados. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácido nucleico diana que contienen potencialmente uno o más restos metilados dentro de una o más secuencias de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. Se proporcionan uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas, comprendiendo cada conjunto de sondas al menos una primera sonda oligonucleotídica que comprende una parte específica de diana configurada para hibridarse en la molécula de ácido nucleico diana y que contiene (i) al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación, (ii) un grupo de bloqueo en 3', horquilla, o región de aleta, y (iii) una parte específica de cebador en 5'. La muestra se pone en contacto con los uno

45 o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas en condiciones eficaces para que la al menos primera sonda oligonucleotídica de un conjunto de sondas se hibride de una manera específica de la base con una molécula de ácido nucleico diana correspondiente, si estuviera presente en la muestra, para formar productos de hibridación. El método además implica la mezcla de al menos una enzima de restricción sensible a la metilación con los productos de hibridación para formar una mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación, y someter la mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación a condiciones adecuadas para escindir la al menos primera sonda oligonucleotídica de un producto de hibridación cuando la molécula de ácido nucleico diana de dicho producto de hibridación contiene uno o más restos metilados dentro de una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación. La escisión libera un 3'-OH en la al menos primera sonda oligonucleotídica del producto de hibridación. El método además implica la extensión del 3'-OH liberado de la al menos primera sonda oligonucleotídica escindida del producto de hibridación usando una polimerasa para formar un producto de extensión hibridado. Se proporcionan uno o más conjuntos de cebadores oligonucleotídicos primarios,

50

55

60

65

comprendiendo cada conjunto de cebadores (i) un primer cebador oligonucleotídico primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que una región de la secuencia de la molécula de ácido nucleico diana, en donde dicha región está en el extremo 5' de la una o más secuencias de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación de la molécula de ácido nucleico diana, y una parte secundaria específica de cebador, y
 5 opcionalmente, (ii) un segundo cebador oligonucleotídico primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la parte específica de cebador en 5' de la al menos primera sonda oligonucleotídica en un conjunto de sondas. El método implica además mezclar los productos de extensión hibridados, los uno o más conjuntos de cebadores oligonucleotídicos primarios, y una polimerasa para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa, y someter la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa a uno o más ciclos de reacción en cadena
 10 de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación, y un tratamiento de extensión formando de ese modo productos de extensión primarios. Los productos de extensión primarios se detectan y se distingue, 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.

Las Figuras 18A-18G y 18H-18M representan aplicaciones de la presente divulgación que son adecuadas para detectar la metilación en sitios HinP1I adyacentes dentro de una molécula de ácido nucleico diana. Aunque no se representa, se puede llevar a cabo una digestión inicial con HinP1I de la muestra de ADN para enriquecer la muestra en sitios HinP1I metilados. Como se muestra en la Figura 18A y 18H, cada conjunto de sondas tiene al menos una
 20 primera sonda oligonucleotídica que contiene una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación de HinP1I sin metilar, un extremo 3' que no se puede extender con polimerasa, y una parte específica de cebador en 5'. Las sondas oligonucleotídicas adicionales, cada una conteniendo una secuencia de reconocimiento de HinP1I sin metilar y un extremo 3' que no se puede extender con polimerasa, se pueden usar para detectar la metilación de HinP1I en sitios adyacentes cadena abajo en la molécula de ácido nucleico diana. El extremo 3' de la primera sonda oligonucleotídica y cualquier sonda adicional puede tener una horquilla en 3' como se muestra en la Figura 18A, grupo de bloqueo como se muestra en la Figura 18H, una región de aleta en 3', o cualquier otra característica para evitar la extensión de la sonda con polimerasa. Después de la hibridación de la sonda o sondas oligonucleotídicas con una molécula de ácido nucleico diana complementaria, HinP1I escinde cada
 25 sonda oligonucleotídica hibridada a un ácido nucleico diana metilado para generar 3'OH competente para extensión (Etapa 3, Figuras 18B y 18I). Una polimerasa extiende el extremo 3' liberado de la primera sonda oligonucleotídica para crear un producto de extensión hibridado (Etapa 4, Figuras 18C y 18J). La escisión con HinP1I del producto de extensión hibridado resultante se puede evitar incorporando una etapa de inactivación térmica o mediante incorporación por polimerasa de nucleótidos modificados. Las moléculas de ácido nucleico que contienen restos sin metilar en un sitio HinP1I que se hibridan con una sonda oligonucleotídica primera o adicional se escinden con
 30 HinP1I (junto con las sondas hibridadas), evitando de ese modo la extensión, amplificación y detección posteriores.

En la Etapa 5 (Figuras 18E y 18K), un cebador oligonucleotídico que comprende una parte específica de diana que está en 5' de las secuencias de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación y una parte específica de cebador en 3' se añade sola o junto con otro cebador que es el mismo que la parte específica de
 40 cebador en 5' de la primera sonda oligonucleotídica para generar productos de extensión primarios que tienen partes específicas de cebador tanto en 5' como en 3'. Como se representa en la Figura 18K, el cebador oligonucleotídico específico de diana puede contener un grupo de bloqueo escindible. Por ejemplo el cebador puede contener un grupo de bloqueo con un solo resto de oligonucleótido en el extremo 3' para evitar la extensión del cebador con polimerasa. La hibridación del cebador solamente con una región específica de diana complementaria forma un sustrato para RNasa H2, que escinde el extremo 5' del cebador a la base de ribonucleótido eliminando de ese modo el grupo de bloqueo y generando un 3'-OH en el cebador que es capaz de extensión con polimerasa (Figuras 18K y 18L) (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)).

Los productos de extensión primarios de moléculas de ácido nucleico diana metiladas se pueden amplificar adicionalmente después de la adición de cebadores oligonucleotídicos específicos para las partes de cebador en 5' y
 50 3' de los productos de extensión primarios (Figuras 18F y 18M).

Como se representa en las Figuras 18D y 18G, la polimerasa extiende las sondas oligonucleotídicas horquilladas sin escindir durante la amplificación por PCR de los productos de extensión, para bloquear la unión de, y posterior
 55 extensión o amplificación, por los cebadores oligonucleotídicos en la reacción de PCR.

Las Figuras 19A-19G demuestran cómo se puede usar una región conocida de una molécula de ácido nucleico como control positivo en la misma mezcla de digestión con enzima de restricción-reacción de extensión mostrada en la Figura 18, para proporcionar una señal de control equivalente a la presencia de un 1 % de ADN metilado. Se proporcionan dos primeras sondas oligonucleotídicas, conteniendo cada una un sitio HinP1I sin metilar y una región horquillada en 3' o un grupo de bloqueo en 3', donde una de la primera sonda oligonucleotídica contiene una parte específica de cebador en 5' u otro marcador amplificador y la otra primera sonda oligonucleotídica no contiene la parte específica de cebador en 5' o contiene un marcador no amplificador (Figura 19A). Las dos primeras sondas
 60 oligonucleotídicas se proporcionan en una mezcla en una proporción conocida, por ejemplo 1:99, respectivamente. Las sondas oligonucleotídicas se hibridan con el ADN de control, la escisión con HinP1I se lleva a cabo para generar

extremos de 3'OH competentes para la extensión en las primeras sondas oligonucleotídicas (Etapa 2, Figura 19B). La polimerasa extiende los extremos 3' liberados de la primera sonda oligonucleotídica para crear un producto de extensión hibridado (Etapa 3, Figura 19C). En la Etapa 4, un cebador oligonucleotídico cadena abajo que comprende una parte específica de diana y una parte específica de cebador en 3' se añade solo o junto con un cebador cadena arriba que es el mismo que la parte específica de cebador en 5' para generar productos de extensión primarios que tienen partes específicas de cebador tanto en 5' como en 3' (Figura 19E). Dado que el 99 % de los productos de extensión hibridados no contienen una parte específica de cebador en 5', solo el 1 % de los productos de extensión hibridados que contienen la parte específica de cebador en 5' servirá como molde para la generación de productos de extensión primarios (Etapa 4, Figura 19E). Los productos de extensión primarios de moléculas de ácido nucleico diana metiladas se pueden amplificar adicionalmente mediante la adición de cebadores oligonucleotídicos específicos para las partes de cebador en 5' y 3' de los productos de extensión primarios (Etapa 4, Figura 19F). La señal generada a partir de la reacción de control es equivalente a la señal que se podría generar a partir de una molécula de ácido nucleico diana metilada presente en el 1 % de la muestra de ADN. Las sondas sin escindir horquilladas se extienden con polimerasa durante la amplificación por PCR y se apartan del análisis adicional (Figuras 19D y 19G).

Las Figuras 20A-20G y 20H-20M representan aplicaciones de este método que son adecuadas para detectar la metilación en sitios adyacentes de BstU1 con una molécula de ácido nucleico diana. Aunque no se representa, se puede realizar una digestión inicial de la muestra de ADN con BstU1 para enriquecer la muestra para sitios BstU1 metilados. Como se muestra en las Figuras 20A y 20H, cada conjunto de sondas tiene al menos una primera sonda oligonucleotídica que contiene una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación con BstU1 sin metilar, un extremo 3' no extensible y una parte específica de cebador en 5'. Se pueden emplear sondas oligonucleotídicas adicionales, conteniendo cada una secuencia de reconocimiento de BstU1 sin metilar y un extremo 3' no extensible, para detectar la metilación de BstU1 en sitios adyacentes cadena abajo en la molécula de ácido nucleico diana. El extremo 3' no extensible de las sondas oligonucleotídicas primera y adicionales de un conjunto de sondas puede tener una horquilla en 3' como se muestra en la Figura 20A, un grupo de bloqueo como se muestra en la Figura 20H, una región de aleta en 3' o cualquier otra característica adecuada para evitar la extensión de la sonda con polimerasa.

Después de la hibridación de la sonda o sondas oligonucleotídicas con una molécula de ácido nucleico diana complementaria, BstU1 escinde cada sonda oligonucleotídica que se hibrida con un ácido nucleico diana metilado para generar un 3'OH competente para extensión (Etapa 2, Figuras 20B y 20I). Una polimerasa extiende el extremo 3' liberado de la primera sonda oligonucleotídica para crear un producto de extensión hibridado (Etapa 3, Figura 20C y 20J). La posterior escisión de BstU1 del producto de extensión hibridado resultante se puede evitar mediante la incorporación de nucleótidos modificados por polimerasa. Las moléculas de ácido nucleico diana que contienen restos sin metilar en un sitio BstU1 que se hibrida con una sonda oligonucleotídica primera o adicionales se escinden con BstU1 (junto con la sonda hibridada), evitando de ese modo la extensión, amplificación y detección posteriores.

En la siguiente etapa, un cebador oligonucleotídico que comprende una parte específica de diana y una parte específica de cebador en 3' se añade solo o junto con un cebador que es igual a la parte específica de cebador 5' de la primera sonda oligonucleotídica para generar productos de extensión primarios que tienen partes específicas de cebador en los extremos 5' y 3' (Etapa 4, Figura 20E y Etapa 5, Figura 20K). Como se describió anteriormente y se muestra en la Figura 20K, el cebador específico de diana puede contener un grupo de bloqueo escindible en su extremo 3', por ejemplo, un sitio de escisión de restos de ribonucleótidos cerca del extremo 3' bloqueado del cebador. Después de la hibridación del cebador con su secuencia específica de diana complementaria, el grupo de bloqueo se escinde selectivamente, por ejemplo, usando RNasa H para escindir en el resto de ribonucleótido, para permitir que se produzca la extensión (Figura 20L). Los productos de extensión primarios de moléculas de ácido nucleico diana metiladas se pueden amplificar adicionalmente mediante la adición de cebadores oligonucleotídicos específicos para las partes de cebador en 5' y 3' de los productos de extensión primarios (Figuras 20F y 20M).

Como se representa en las Figuras 20D y 20G, la polimerasa extiende las sondas oligonucleotídicas horquilladas sin escindir durante la amplificación por PCR de los productos de extensión, para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación, por los cebadores oligonucleotídicos en la reacción de PCR.

Los productos de ligamiento o productos de extensión primarios formados de acuerdo con los diversos métodos se pueden detectar usando una variedad de métodos de detección conocidos en la técnica. Por ejemplo, los productos de ligamiento o extensión primarios se pueden detectar secuenciando los productos usando métodos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, los productos de ligamiento o extensión se pueden separar por tamaño y se pueden detectar. Para facilitar la detección mediante secuenciación o separación por tamaño, las sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas pueden comprender además uno o más marcadores detectables, partes de cebador u otras partes de detección. Una serie de partes de detección adecuadas y métodos de detección se ilustran en las figuras adjuntas y se describen con más detalle a continuación.

En una realización de la presente invención, la detección de los productos de ligamiento o productos de extensión primarios implica amplificación por PCR para generar productos de extensión primarios y productos de extensión secundarios, respectivamente. De acuerdo con esta realización, las sondas oligonucleotídicas de un conjunto de

sondas utilizadas en el proceso de ligamiento con FEN-digestión con enzima de restricción o el proceso de digestión con enzima de restricción-ligamiento de la presente invención comprenden una primera sonda oligonucleotídica que tiene una parte específica de cebador en 5' y una segunda sonda oligonucleotídica que tiene una parte específica de cebador 3' en como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 1-11. Los productos de ligamiento lineales o circulares resultantes comprenden la parte específica de cebador en 5', las partes específicas de diana, y la parte específica de cebador en 3'. Del mismo modo, los productos de extensión primarios formados en el proceso de digestión con enzima de restricción-extensión de la presente invención también comprenden una parte específica de cebador en 5', una parte específica de diana y una parte específica de cebador en 3' como se muestra en las Figuras 18-20.

Las partes específicas de cebador de los productos de ligamiento y productos de extensión primarios formados de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden ser secuencias de cebadores universales que permiten la amplificación universal posterior de todos los productos de ligamiento o extensión primarios formados en un solo conjunto de condiciones. Esto es particularmente útil cuando se detectan moléculas de nucleótidos diana de baja abundancia. En consecuencia, después de la formación del producto, se realiza una amplificación por PCR universal para amplificar proporcionalmente todos los productos de ligamiento o productos de extensión primarios en la muestra. Después de la PCR universal, los productos de extensión de los productos de ligamiento originales o los productos de extensión secundarios se detectan y cuantifican. Como alternativa, las partes específicas de cebador pueden ser específicas para la secuencia de nucleótidos diana. Además en otra realización, las partes específicas de cebador de los productos de ligamiento o productos de extensión primarios pueden comprender partes universales específicas de cebador en combinación con una o más partes específicas de cebador específicas de diana.

Para facilitar la amplificación por PCR de los productos de ligamiento o productos de extensión primarios generados usando los métodos de la presente invención, se proporciona una pluralidad de conjuntos de cebadores oligonucleotídicos. Cada conjunto de cebadores tiene un primer cebador oligonucleotídico que contiene la misma secuencia que la parte específica de cebador en 5' del producto de ligamiento o producto de extensión primario, y un segundo cebador oligonucleotídico complementario con la parte específica de cebador en 3' del producto de ligamiento o producto de extensión primario. Los productos de ligamiento o productos de extensión primarios se mezclan con uno o una pluralidad de conjuntos de cebadores oligonucleotídicos y la polimerasa para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de polimerasa que incluyen un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión. Durante el tratamiento de desnaturalización, las secuencias de ácido nucleico hibridadas se separan. El tratamiento de hibridación hace que los cebadores se hibriden con sus partes complementarias específicas de cebador de la secuencia del producto. Durante el tratamiento de extensión, los cebadores hibridados se extienden para formar productos de extensión complementarios para las secuencias con las que se hibridan los cebadores.

En casi todos los casos, es deseable bloquear las sondas oligonucleotídicas sin ligar o sin escindir de la muestra que contiene productos de ligamiento o productos de extensión primarios antes de amplificación por PCR para evitar que la extensión y/o amplificación de la sonda sin ligar o sin escindir pueda generar señales de falsos positivos. A continuación se describen varios medios para conseguir este objetivo.

En un enfoque, las sondas oligonucleotídicas sin ligar se bloquean de la extensión y amplificación posteriores diseñando sondas que pueden formar estructuras estables en horquilla en ausencia de ligamiento. Esta realización se representa en la Figura 21, y también se muestra en los procesos de las Figuras 2-3 y 5-11. De acuerdo con esta realización y en referencia a la Figura 21, la segunda sonda oligonucleotídica comprende además una aleta nucleotídica que está en el extremo 5' con respecto al nucleótido de solapamiento idéntico en la unión, en donde al menos una parte de la aleta nucleotídica (B₁' en la Figura 21) es complementaria con al menos una parte de la parte específica de cebador en 3' de la segunda sonda oligonucleotídica (B₁ en la Figura 21). En ausencia de ligamiento, las regiones complementarias de la aleta nucleotídica (B₁') y la parte específica de cebador en 3' (B₁') de las segundas sondas oligonucleotídicas sin ligar se hibridan entre sí para formar segundas sondas oligonucleotídicas (Figura 21, parte derecha). La parte específica de cebador en 3' (B₁) de la segunda sonda oligonucleotídica horquillada se extiende durante el primer ciclo de PCR para formar una segunda sonda oligonucleotídica horquillada extendida que bloquea la unión del segundo cebador oligonucleotídico con su secuencia complementaria. Como se muestra en la parte izquierda de la Figura 21, los productos de ligamiento que se forman se amplifican posteriormente usando PCR sin interferencia de las sondas sin ligar.

Este mismo enfoque también se puede utilizar para bloquear sondas oligonucleotídicas sin escindir utilizadas en el proceso de digestión con enzima de restricción-reacción de extensión de la presente invención. En consecuencia, la primera sonda oligonucleotídica se diseña para que comprenda además una aleta nucleotídica en 3' que está en la posición 3' con respecto a la parte específica de diana. Al menos una parte de la aleta nucleotídica en 3' es complementaria con al menos una parte de la parte específica de cebador en 5' de la primera sonda oligonucleotídica. En ausencia de escisión de sonda por una enzima de restricción sensible a la metilación, las regiones complementarias de la aleta nucleotídica en 3' y la parte específica de cebador en 5' se hibridan entre sí para formar las primeras sondas oligonucleotídicas horquilladas.

En otro enfoque, las sondas oligonucleotídicas sin escindir y sin ligar se pueden bloquear de la extensión y amplificación posteriores diseñando sondas que tengan un extremo 3' no extensible. Los diseños de sonda adecuados incluyen una secuencia en el extremo 3' que puede formar estructuras de horquilla estables como se muestra en las Figuras 18A-18G y en las Figuras 20A-20G. Como alternativa, la sonda oligonucleotídica se puede diseñar para que contenga un grupo de bloqueo en 3' que bloquee la extensión mediada por polimerasa, por ejemplo, un grupo fosforotioato (Nikiforow, *et al.*, "The Use of Phosphorothioate Primers and Exonuclease Hydrolysis for the Preparation of Single-stranded PCR Products and their Detection by Solid-phase Hybridization", PCR Methods and Applications, 3: p. 285-291 (1994)), como se muestra en las Figuras 18H-18M y en las Figuras 20H-20M.

Otro enfoque para eliminar secuencias de sonda sin ligar de una muestra después del proceso de ligamiento implica una etapa de digestión con exonucleasa antes de la amplificación (L-H Guo y R. Wu, *Methods in Enzymology* 100: 60-96 (1985)). Para incorporar digestión con la exonucleasa, es necesario proteger los productos de ligamiento de la digestión. En un enfoque, la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas comprenden primera y segunda partes marcadoras complementarias, respectivamente. La primera y segunda partes marcadoras de un conjunto de sondas oligonucleotídicas pueden, pero no tienen que, tener una secuencia diferente de las partes marcadoras de otros conjuntos de sondas oligonucleotídicas. La Figura 22A muestra un ejemplo donde la primera sonda oligonucleotídica contiene la parte marcadora C1' y la segunda sonda oligonucleotídica contiene la parte marcadora C1, donde C1' y C1 son complementarias entre sí. Después del ligamiento de la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas, la primera y segunda partes marcadoras, es decir, C1' y C1, se hibridan para formar una secuencia de producto ligado horquillado que es resistente a la digestión con exonucleasa (en este esquema A₁ y B₁ representan partes específicas de cebador para la reacción en cadena de la polimerasa cadena abajo). La posterior digestión con exonucleasa elimina las sondas sin ligar. Además, las moléculas ligadas de forma no específica, que llevan marcadores con faltas de coincidencias, permanecen total o parcialmente monocatenarias y también se digieren. Después de la digestión con exonucleasa, los productos de ligamiento horquillados se desnaturalizan y la amplificación por PCR se realiza usando conjuntos de cebadores oligonucleotídicos que tienen un primer cebador que es complementario con la parte específica de cebador en 3' del producto de ligamiento (es decir, B₁) y un segundo cebador que tiene la misma secuencia de nucleótidos que la parte específica de cebador en 5' del producto de ligamiento (es decir, A₁).

La Figura 22B muestra un diseño alternativo de sonda oligonucleotídica donde la segunda sonda oligonucleotídica contiene una región (A₁') que es complementaria con la parte específica de cebador en 5' de la primera sonda oligonucleotídica (A₁). Después del ligamiento de la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de este conjunto de sondas, A₁ y A₁' se hibridan para formar un producto de ligamiento horquillado. De nuevo, las sondas oligonucleotídicas sin ligar y las moléculas ligadas de forma no específica, que llevan marcadores no coincidentes, permanecen total o parcialmente monocatenarias, y se digieren posteriormente usando una enzima exonucleasa específica monocatenaria, por ejemplo, Exol. Como se señaló anteriormente para la Figura 22A, después de la digestión con exonucleasa, los productos de ligamiento horquillados se desnaturalizan, y se añaden cebadores oligonucleotídicos y una polimerasa para amplificar los productos de ligamiento desnaturalizados en ausencia de sondas sin ligar.

En una realización alternativa, las sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas pueden comprender restos de bloqueo en sus extremos que no están implicados en el ligamiento. Los restos de bloqueo adecuados incluyen un marcador detectable o un grupo fosforotioato (Nikiforow, *et al.*, "The Use of Phosphorothioate Primers and Exonuclease Hydrolysis for the Preparation of Single-stranded PCR Products and their Detection by Solid-phase Hybridization", PCR Methods and Applications, 3: p. 285-291 (1994)). Después del proceso de ligamiento, las sondas sin ligar se destruyen selectivamente por incubación de la mezcla de reacción con la exonucleasa, mientras que las sondas ligadas se protegen debido a la eliminación de extremos 3' terminales libres que son necesarios para iniciar la reacción de exonucleasa.

La Figura 22C muestra otro enfoque para separar productos de ligamiento de sondas oligonucleotídicas sin ligar que se basa en la selección de productos de ligamiento. En esta realización, la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas llevan marcadores complementarios específicos de alelo, C₁ y C₁', y además, la segunda sonda oligonucleotídica tiene un marcador universal L₁. Después del ligamiento, se forma una horquilla después de la hibridación de C₁ y C₁', teniendo esta horquilla una protrusión L1 en su extremo. Un oligonucleótido biotinilado universal (●) (L1') se liga con el producto horquillado en la misma reacción que permite la separación de los productos de ligamiento que contienen biotina de las sondas oligonucleotídicas sin ligar por selección de estreptavidina. Las sondas oligonucleotídicas también se pueden hacer lo suficientemente largas, por ejemplo, al incluir los llamados espaciadores entre los marcadores (C₁/C₁') y las partes específicas de cebador de los oligonucleótidos (A1/B1) para que el ligamiento del oligonucleótido biotinilado se produzca mientras que las partes de las sondas oligonucleotídicas se hibridan con la diana. Como alternativa, se puede aumentar la temperatura para hundir el producto ligado fuera de la diana, y a continuación bajar la temperatura para permitir la formación de horquillas del producto y el ligamiento del oligonucleótido biotinilado con el producto horquillado. En cualquier caso, los productos de ligamiento separados se amplifican posteriormente en presencia de un cebador de polimerasa y oligonucleótido como se describió anteriormente.

La característica fundamental para que funcionen los diseños de sonda oligonucleotídica que se muestran en Las

Figuras 22A-22C es que las horquillas intramoleculares son mucho más estables termodinámicamente que las interacciones bimoleculares entre sondas oligonucleotídicas. La temperatura y los tampones se seleccionan de modo que un porcentaje muy pequeño de las sondas oligonucleotídicas sin ligar con marcadores complementarios se hibriden entre sí, pero aproximadamente un 100 % de las moléculas ligadas formarán una estructura de horquilla.

En otra realización de la presente invención, las sondas oligonucleotídicas sin ligar o sin escindir se pueden eliminar usando filtración en gel (por ejemplo, Sephadex) o un método similar para separar productos ligados más largos, de peso molecular más elevado, de las sondas oligonucleotídicas sin ligar más cortas.

En otra realización de la presente invención, los productos de ligamiento o los productos de extensión primarios se detectan usando métodos de secuenciación de nueva generación. De acuerdo con esta realización, las sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas comprenden adicionalmente los marcadores o adaptadores de secuenciación apropiados requeridos para la plataforma Illumina® MiSeq™ o HiSeq™ (San Diego, CA), la plataforma Life Technologies™ Ion Torrent™ (Life Technologies, Carlsbad, CA), la plataforma Roche™ 454, u otra plataforma de secuenciación de nueva generación (es decir, pirosecuenciación, secuenciación por síntesis basada en fluorescencia, secuenciación por ligamiento basada en fluorescencia, secuenciación por síntesis basada en iones, y secuenciación por ligamiento basada en iones), todas las cuales se conocen bien en la técnica. No es necesario tener diferentes marcadores para diferentes cromosomas, ya que se pueden formar mapas de las propias secuencias inequívocamente para uno de los cromosomas en el genoma humano

Como se describe a continuación se pueden usar varios medios de detección de productos de la ligamiento o productos de extensión primarios amplificados por PCR.

En un primer enfoque, uno de los cebadores en un conjunto de cebadores oligonucleotídicos usados para la amplificación por PCR de los productos de ligamiento o productos de extensión primarios puede comprender adicionalmente un marcador detectable para crear productos de extensión primarios marcados que se pueden detectar e identificar. Este método de detección es adecuado cuando las partes específicas de cebador del producto de ligamiento o productos de extensión primarios son específicas del marcador. Los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 6.027.889, 6.797.470, 7.312.039, 7.320.865, 7.332.285, 7.166.434, 7.429.453, 8.283.121 todos de Barany, describen métodos para detectar diferencias en la secuencia de ácidos nucleicos usando una detección de ligamiento acoplado y reacciones en cadena de la polimerasa. 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, sin limitación, FAM, TET, JOE, VIC, HEX, CY3, TAMRA, Rojo Texas, CY5, y ROX.

En otra realización de la presente invención, la detección de los productos de ligamiento o productos de extensión primarios amplificados por PCR se facilita mediante una parte de Zipcode. De acuerdo con esta realización, la primera y/o la segunda sonda oligonucleotídica de un conjunto de sondas comprende además una parte de Zipcode. Como se usa en el presente documento, una Zipcode es una secuencia de nucleótidos corta, por ejemplo, con una longitud entre 16 y 24 nucleótidos, que no tiene identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos diana, y preferentemente, una pequeña parte o ninguna de la secuencia se identifica con ninguna secuencia de nucleótidos genómica. En una colección de Zipcodes, la secuencia de cada Zipcode se diferencia de la secuencia de otras Zipcodes en la colección en al menos un 25 %, sin embargo, todas las Zipcodes de una colección están diseñadas para que tengan temperaturas de fusión similares para facilitar la hibridación a oligonucleótidos de captura complementarios en condiciones de hibridación uniformes con poca o ninguna hibridación inespecífica con secuencias de oligonucleótidos de no captura. En una realización de la presente invención, la parte de Zipcode se usa para identificar y distinguir diferentes productos de ligamiento o productos de extensión primarios en una muestra, por lo tanto, la parte de Zipcode para cada producto 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 sin metilar en una región genómica particular, pero la identidad de los restos metilados o sin metilar particulares dentro de esa región no es crítica, la misma parte de Zipcode se puede usar para detectar diferentes productos. En cualquier realización, la incorporación de Zipcodes en las sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas permite la detección altamente multiplexada de varias secuencias diana simultáneamente.

Los métodos para diseñar colecciones de secuencias Zipcode y sus secuencias de oligonucleótidos de captura complementarias se describen con detalle en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 6.852.487, 7.455.965 y 6.506.594, todos de Barany *et al.*

La detección usando Zipcode se puede llevar a cabo usando la detección Taqman™ tradicional como se muestra en la Figura 23B (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.* Para la detección usando ensayos de Taqman, la primera o segunda sonda oligonucleotídica contiene una secuencia Zipcode. La Figura 23A ilustra la incorporación de una secuencia Zipcode en el proceso de digestión con enzima de restricción-reacción de ligamiento de la presente invención. Como se muestra en la Figura 23A, el producto de ligamiento generado en este proceso (Etapa 3) contiene la parte específica de cebador en 5' (U1), la parte de Zipcode (Z1), las partes específicas de diana y la parte específica de cebador en 3' (U2). Aunque no se representa, se entiende que la secuencia Zipcode

también se puede incorporar en los productos de ligamiento formados usando los procesos de ligamiento con FEN-digestión con enzima de restricción y digestión con enzima de restricción-extensión-ligamiento de la presente invención, y los productos de extensión primarios formados usando el proceso de digestión con enzima de restricción-extensión de la presente invención.

Una primera reacción de amplificación universal opcional se puede llevar a cabo usando cebadores de PCR universales para aumentar proporcionalmente el producto de ligamiento en la muestra (la etapa de PCR universal se muestra como Etapa 4 en la Figura 23A). Esto es particularmente adecuado cuando se detectan secuencias de Ácidos nucleicos diana de baja abundancia. Después de aproximadamente 8-20 ciclos de amplificación universal, la muestra se diluye de 10 a 100 veces y se añaden cebadores únicos que se solapan con parte o la totalidad de la secuencia de Zipcode única para cada producto. La sonda Taqman podría ser para la secuencia de unión tanto de la Zipcode como del ADN diana (como se muestra en la Figura 23B), o solo el ADN diana. El segundo cebador puede ser universal (U2) o, para mayor especificidad, se puede diseñar para que incluya algunas bases específicas del genoma (sin solapamiento con la sonda Taqman). La señal se genera por la actividad de 5' nucleasa de la polimerasa cuando extiende el segundo cebador. La extensión del cebador escinde el marcador detectable del oligonucleótido de captura que libera el marcador detectable de la molécula inhibidora, permitiendo la detección.

Como alternativa, para la detección usando matrices universales (Zipcode) como se muestra en la Figura 23C, el segundo cebador oligonucleotídico (U2') contiene un marcador indicador, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el primer cebador oligonucleotídico (U1) contiene un 5' fosfato, y la amplificación podría continuar durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. La digestión con lambda exonucleasa de la segunda hebra hace que el producto marcado con fluorescencia sea monocatenario y adecuado para la hibridación con una matriz universal (Zipcode) que contiene sondas oligonucleotídicas de captura que son complementarias con las partes de Zipcode del producto marcado con fluorescencia como se muestra en la Figura 23C.

Además, las construcciones mencionadas anteriormente pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) interna a los cebadores Universales (es decir, Unique Ai, Unique Bi), representado como sigue a continuación.

Cebador Univ. U1 - Unique Ai - Zipcode Zi - ADN Diana - Unique Bi - Cebador Univ. U2'

Para la detección usando ensayos de Zipcode Taqman, 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 solapan con las secuencias Unique Ai y Unique Bi para cada producto. La sonda Taqman también podría ser para la secuencia Zipcode.

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

Otro enfoque de detección que utiliza Zipcodes implica que la parte de Zipcode se separe en dos partes, que se pueden acercar entre sí usando una región corta de secuencia complementaria en ambos lados de las partes separadas. Para generar un producto de ligamiento que se pueda detectar usando este enfoque, la primera sonda oligonucleotídica podría comprender una primera parte de la Zipcode y una primera parte marcadora que está en la posición 3' con respecto a la primera parte de Zipcode, y la segunda sonda oligonucleotídica podría comprender una segunda parte de la Zipcode y una segunda parte marcadora que está en la posición 5' con respecto a la segunda parte de Zipcode. Para generar un producto de extensión primario a partir del proceso de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-extensión de la presente invención que se pueda detectar usando este enfoque, la primera sonda oligonucleotídica podría comprender una primera parte de la Zipcode y una primera parte marcadora que está en la posición 3' con respecto a la primera parte de Zipcode, y el segundo cebador oligonucleotídico del conjunto de cebadores oligonucleotídicos primarios podría comprender una segunda parte de la Zipcode y una segunda parte marcadora que está en la posición 5' con respecto a la segunda parte de Zipcode. La primera y segunda partes marcadoras de una sonda oligonucleotídica o conjunto de sondas/cebadores son complementarias entre sí, y tienen preferentemente entre aproximadamente 5 y 8 bases. Esto permite la formación transitoria de la horquilla del producto resultante en la región corta cuando las dos secciones están en la misma cadena de ADN, que se estabiliza hibridando ambas mitades de la secuencia de Zipcode con una secuencia de Zipcode complementaria de longitud completa en una matriz, o como alternativa como parte de un ensayo de Taqman.

La Figura 24 muestra un ejemplo de detección de horquilla de Zipcode separada por Taqman universal. En esta figura, y de acuerdo con los métodos que se describieron anteriormente, un producto de ligamiento (proceso de ligamiento con FEN-digestión con enzima de restricción sensible a la metilación o digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-ligamiento) o un producto de extensión primario (proceso de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-extensión) ya se ha formado. Los productos de ligamiento se forman usando Conjuntos de sondas oligonucleotídicas que comprenden una primera sonda oligonucleotídica que tiene (i) una primera parte específica de cebador universal en 5' (U1), (ii) una primera secuencia de identificación única corta (1-10 bases) (A1), (iii) una primera parte de una parte de Zipcode (Z1.1'), (iv) una primera parte marcadora (T1) que está en 3' con respecto a la primera parte de Zipcode, y (v) una parte específica de diana. La segunda sonda oligonucleotídica del conjunto de sondas tiene (i) una parte específica de cebador universal en 3' (U2'), (ii) una

segunda secuencia de identificación única corta (B1), (iii) una segunda parte de una parte de Zipcode (Z1.2'), (iv) una segunda parte marcadora (T1') que está en 5' con respecto a la segunda parte de Zipcode, y (v) una parte específica de diana. Del mismo modo, los productos de extensión primarios se forman usando una primera sonda oligonucleotídica como se describió anteriormente y un segundo cebador oligonucleotídico del conjunto de cebadores oligonucleotídicos primarios que comprende además (ii) una segunda secuencia de identificación única corta (B1), (iii) una segunda parte de una parte de Zipcode (Z1.2'), (iv) una segunda parte marcadora (T1') que está en 5' con respecto a la segunda parte de Zipcode. Los productos de ligamiento resultantes (o Productos de extensión de los productos de ligamiento) o productos de extensión primarios como se muestra en la Etapa 1 de la Figura 24, 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 del cebador específica de producto, única, (ii) la primera parte de Zipcode (Z1.V), (iii) la primera parte marcadora (T1), la parte del producto de digestión, la segunda parte marcadora (T1'), la segunda parte de la Zipcode (Z1.2'), y la segunda parte específica de cebador, B1-U2, en la que B1 es una parte del cebador específica de producto, única y U2 es una parte del cebador universal.

Como se muestra en Etapa 1 de la Figura 24, las secuencias únicas A1 y B1 sirven para facilitar una amplificación por PCR específica de diana de la secuencia del producto de ligamiento cuando los cebadores de PCR que se utilizan abarcan la parte del cebador universal y 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 utilizando cebadores que se hibridan con las partes específicas de cebador universal en 5' y 3'. Una primera reacción de amplificación universal es particularmente adecuada cuando se detectan secuencias de ácidos nucleicos diana de baja abundancia en una muestra.

Siguiendo la amplificación por PCR específica de diana de los productos de ligamiento (productos de extensión de los mismos) o productos de extensión primarios (Figura 24, Etapa 1), los productos de ADN bicatenario se desnaturalizan (Figura 24, Etapa 2). A medida que disminuye la temperatura, la primera y la segunda partes marcadoras (T1 y T1') se hibridan transitoriamente juntas, llevando la primera parte de la secuencia de Zipcode (Z1.1' de la primera sonda oligonucleotídica) cerca de la segunda secuencia de Zipcode (Z1.2' de la segunda sonda oligonucleotídica). La hibridación transitoria se estabiliza mediante la hibridación simultánea de un oligonucleótido de captura marcado (Z1) que es complementario con las secuencias de Zipcode colocadas adyacentes (Figura 24, Etapa 3). En una realización, el oligonucleótido de captura tiene una molécula inhibidora (Q) y un marcador detectable (F) que se separan entre sí, donde el marcador detectable se inactiva cuando está cerca de la molécula inhibidora. La señal se genera por la actividad de 5' nucleasa de una polimerasa a medida que extiende un cebador (es decir, el "cebador de digestión") que está unido a la parte universal específica de cebador (U2), la parte B1 única, o una combinación de las mismas, y escinde el oligonucleótido de captura hibridado. La extensión del cebador escinde el marcador detectable del oligonucleótido de captura que libera el marcador detectable de la molécula de desactivación, permitiendo la detección (Figura 24, Etapa 4). En cuanto la polimerasa ha atravesado Z1.2', el tallo corto entre Z1.2' y Z1.1' se desmorona y la polimerasa continúa extendiéndose para crear el producto de ADNbc. 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, los expertos en la materia también conocen moléculas desactivadoras, por ejemplo, MGB-NFQ, BHQ-[0123], el desactivador ZEN de IDT.

La Figura 25 muestra otro ejemplo de detección de horquilla de Zipcode de separación universal. En esta figura, y de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, un producto de ligamiento (proceso de ligamiento con FEN-digestión con enzima de restricción sensible a la metilación o digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-ligamiento) o un producto de extensión primario (proceso de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-extensión) ya se han formado. Los productos de ligamiento se forman usando conjuntos de sondas oligonucleotídicas (no se muestran) que comprenden una primera sonda oligonucleotídica que tiene (i) una primera parte específica de cebador universal en 5' (U1), (ii) una segunda parte específica de cebador (A1) que es una parte del cebador específica de producto de ligamiento, (iii) una primera parte de una parte de Zipcode

(Z1.1'), (iv) una primera parte marcadora (T1) que está en 3' con respecto a la primera parte de Zipcode, y (v) una parte específica de diana. La segunda sonda oligonucleotídica del conjunto de sondas tiene (i) una parte específica de cebador universal en 3' (U2'), (ii) una segunda parte de una parte de Zipcode (Z1.2'), (iii) una segunda parte marcadora (T1') que está en 5' con respecto a la segunda parte de Zipcode, y (iv) una parte específica de diana. Los productos de extensión primarios a partir de un proceso de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-extensión formados se forman usando una primera sonda oligonucleotídica que tiene una primera parte específica de cebador (U1 y A1), una primera parte de la Zipcode (Z1.1') y una primera parte marcadora (T1) que está en 3' con respecto a la primera parte de Zipcode. El segundo cebador oligonucleotídico del conjunto de cebadores oligonucleotídicos primarios comprende una segunda parte de la Zipcode (Z1.2'), una segunda parte marcadora (T1') que está en 5' con respecto a la segunda parte de Zipcode, y la segunda parte específica de cebador (U2). El producto de ligamiento resultante o producto de extensión primario como se muestra en la etapa 1 de la Figura 25, 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 del cebador específica de producto, única (es decir, una tercera parte del cebador), (ii) la primera parte de Zipcode (Z1.1'), (iii) la primera parte marcadora (T1), la parte del producto de digestión, la segunda parte marcadora (T1'), la segunda parte de la Zipcode (Z1.2'), y la segunda parte específica de

cebador (U2).

En la Etapa 1 de la Figura 25, los productos de ligamiento o productos de extensión primarios opcionalmente se amplifican inicialmente usando un conjunto de cebadores oligonucleotídicos universales, es decir, un primer cebador oligonucleotídico (U1) que tiene la misma secuencia que la parte específica de cebador universal en 5', y un segundo cebador oligonucleotídico (U2) que es complementario con la parte específica de cebador universal en 3'. El producto de ligamiento amplificado o los productos de extensión primarios amplificados formados a partir de la etapa de PCR universal primaria se someten a una etapa de PCR secundaria (Figura 25, Etapa 2) usando un conjunto de cebadores secundarios que incluye un primer cebador oligonucleotídico secundario que tiene (a) una secuencia de nucleótidos es la misma que la de la segunda parte específica de cebador de la primera sonda oligonucleotídica (A1), (b) una parte de oligonucleótidos de captura (Z1) que es complementaria con la primera y segunda partes de la Zipcode colocadas adyacentes a un conjunto de sondas oligonucleotídicas, (c) una molécula de inactivación (Q) y un marcador detectable (F) separado por dicha parte de oligonucleótidos de captura. El segundo cebador oligonucleotídico secundario (U2) del conjunto de cebadores tiene la misma secuencia de nucleótidos que el segundo cebador oligonucleotídico primarios de la PCR primaria (es decir, es complementario con la parte específica de cebador universal en 3' del producto de ligamiento). La molécula de inactivación del primer cebador secundario puede servir como un bloqueador de polimerasa para bloquear la extensión de la polimerasa de la hebra inferior. Como 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 la polimerasa se puede colocar en las proximidades del resto de inactivación. Los productos de ADN bicatenario (que se muestran en la Figura 25, 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 Z1.1'/Z1.2' (Figura 25, Etapa 4). La señal es generada por la actividad de 5' nucleasa de la polimerasa cuando extiende un "cebador de digestión" complementario con la parte específica de cebador universal en 5'. La extensión del cebador escinde el marcador detectable (F) o la molécula inhibidora (Q) del oligonucleótido de captura que libera el marcador detectable (F) de la molécula inhibidora (Q), permitiendo la detección (Figura 25, Etapa 5). En cuanto la polimerasa ha atravesado Z1.2', el tallo corto entre Z1.2 y Z1.1' se desmorona y la polimerasa continúa extendiéndose hasta que llega al bloqueador de polimerasa para crear un producto de ADNbc similar al de la etapa 1, pero que carece de la señal fluorescente D1.

Un enfoque alternativo para utilizar las secuencias de oligonucleótidos de Zipcode/captura para la detección implica el enfoque 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 "marcadoras" únicas cortas (1-10 nucleótidos), donde al menos una de las secuencias marcadoras únicas (Ai) está presente en la primera sonda oligonucleotídica, y la segunda y tercera partes marcadoras únicas (Bi y Ci) están en la secuencia de la segunda sonda oligonucleotídica. En el caso de productos de extensión primarios formados en un proceso de extensión con enzima de restricción sensible a la metilación, la segunda y tercera partes marcadoras únicas (Bi y Ci) están en la segunda secuencia de cebadores oligonucleotídicos. El producto de ligamiento resultante o los productos de extensión primarios de la presente invención contendrán la secuencia Ai-secuencias específicas de diana-secuencia Bi- secuencia Ci. La esencia del enfoque UniTaq es que es necesario que ambas sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas de ligamiento sean correctas para obtener una señal positiva, lo que permite la detección de ácido nucleico altamente multiplexado. Por ejemplo, y como se describe en el presente documento, esto se consigue al requerir la hibridación de dos partes, es decir, dos de los marcadores, entre sí.

En una realización de la presente invención, las partes marcadoras de UniTaq de un conjunto de sondas oligonucleotídicas o conjunto de sonda/cebador son "específicas de alelo" y se usan para identificar y distinguir secuencias del productos ligados individuales en una muestra. De acuerdo con esta realización, las partes de UniTaq para cada producto de ligamiento diferente o producto de extensión primario son diferentes. En una realización alternativa, donde el objetivo es simplemente detectar la presencia de una molécula de ácido nucleico diana metilada, se pueden usar las mismas partes marcadoras de UniTaq para detectar diferentes productos de ligamiento o productos de extensión primarios. En cualquier realización, la incorporación de las partes marcadoras de UniTaq en una de las sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas permite la detección altamente multiplexada de varias secuencias diana simultáneamente.

Las Figuras 26A-26C muestran diversas formas en las que el sistema marcador de UniTaq se puede incorporar en los diversos procesos de reacción con enzima de restricción sensible a la metilación de la presente invención. En el primer enfoque, que se muestra en la Figura 26A, el producto de ligamiento (o productos de extensión del mismo) o productos de extensión primarios que contienen Ai (una primera parte específica de cebador), B'i (una parte de detección de UniTaq) y C'i (una segunda parte específica de cebador) se ceban en ambas cadenas usando un cebador oligonucleotídico que tiene la misma secuencia de nucleótidos que Ai, y un segundo cebador oligonucleotídico que es complementario con C'i (es decir, Ci). El primer cebador oligonucleotídico también incluye una sonda de detección UniTaq (Bi) que tiene un marcador detectable D1 en un extremo y una molécula de desactivación (Q) en el otro extremo (D1-Bi-Q-Ai). Opcionalmente colocado proximal al desactivador 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. Es posible que no se requiera un bloqueador de polimerasa si la cola en 5' que se pliega en un tallo tiene una o más bases en el extremo 5' que no son

complementarias con la secuencia marcadora universal media, de modo que la horquilla formada por la cadena opuesta de ADN (con el extremo 3' al final del tallo) no se puede extender durante la PCR. También se puede diseñar una pequeña horquilla en la parte en 5' del cebador 100, de modo que el colorante y el desactivador se acerquen, de forma similar a los cebadores y sondas "Sunrise" para mejorar la desactivación y disminuir la fluorescencia de fondo. Por ejemplo, véanse los documentos de patentes de Estados Unidos N.^{os} 5.866.336 y 6.270.967.

La amplificación por PCR da como resultado un producto bicatenario (Figura 26A, Etapa 2). En este ejemplo, una unidad de bloqueo de polimerasa evita que una polimerasa copie la parte en 5' (Bi) del primer cebador universal, de modo que la hebra inferior del producto no puede formar una horquilla cuando se vuelve monocatenaria. La formación de una horquilla de ese tipo podría dar como resultado la hibridación del extremo 3' del tallo al amplicón de tal manera que la extensión de polimerasa de este extremo 3' podría terminar la reacción de PCR.

Los productos de PCR bicatenarios se funden (por ejemplo, aumentando la temperatura a aproximadamente 95 °C para separar la hebra superior de la hebra inferior, y cuando la temperatura disminuye posteriormente, la hebra superior del producto forma una horquilla que tiene un tallo entre la parte en 5' (Bi) del primer cebador oligonucleotídico y la parte B'i en el extremo opuesto de la hebra (Figura 26A, Etapa 3). También durante esta etapa, el segundo cebador oligonucleotídico se une a la parte específica de cebador en 5' (C'i). La formación de la horquilla intramolecular se produce rápidamente y está dirigida 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 (T_m) de la horquilla sea significativamente más alta (por ejemplo, aproximadamente 10 °C o superior) que la T_m del segundo cebador oligonucleotídico. De esta manera, cuando la temperatura disminuye, casi un 100 % de las moléculas formarán la horquilla antes de que el segundo cebador universal se hibride y se extienda. Después de la extensión del segundo cebador universal en la etapa 4, la actividad de 5' nucleasa de la polimerasa escinde el marcador detectable D1 o la molécula desactivadora del extremo 5' del amplicón, aumentando de ese modo la distancia entre el marcador y el colorante de FRET y permitiendo la detección del marcador. En la técnica se conoce una amplia variedad de colorantes fluorescentes y están disponibles en el mercado, por ejemplo, FAM, TET, JOE, VIC, HEX, CY3, TAMRA, Rojo Texas, CY5, ROX. De manera similar, los expertos en la materia conocen bien las moléculas de desactivación adecuadas, por ejemplo, MGB-NFQ, BHQ-[0123], desactivador de ZEN de IDT.

En el enfoque que se muestra en la Figura 26B, se usa un ensayo tradicional Taqman™ tradicional para detectar el producto de ligamiento o el producto de extensión primario. Este método implica proporcionar una sonda de detección de UniTaq (Bi) que sea complementaria con la parte de detección de UniTaq (B'i). La sonda de detección de UniTaq comprende una molécula de desactivación (Q) y un marcador detectable (D1) que están separados entre sí. La sonda de detección de UniTaq se hibrida con su parte de detección de UniTaq complementaria en el producto de ligamiento o producto de extensión primario al mismo tiempo que el segundo cebador oligonucleotídico (Ci) se hibrida con la parte específica de cebador en 5' C'i del producto de ligamiento durante la amplificación por PCR. La extensión del segundo cebador oligonucleotídico genera una señal por la escisión de 5' exonucleasa de D1 y la separación de D1 del desactivador.

Un ejemplo adicional de formato de detección que implica la formación de un círculo universal se ilustra esquemáticamente en la Figura 26C. Como se indicó anteriormente, el producto de ligamiento o el producto de extensión primario en la Figura 26C contiene Ai (una primera parte específica de cebador), partes específicas de diana, B'i (una parte de detección de UniTaq) y C'i (una segunda parte específica de cebador). El producto de ligamiento o el producto de extensión primario se amplifica usando un cebador oligonucleotídico (Ai) que tiene la misma secuencia de nucleótidos que la parte específica de cebador Ai del producto de ligamiento, y un segundo cebador oligonucleotídico que incluye (i) una primera parte de cebador (Ci) que es complementaria con la parte específica de cebador en 5' C'i del producto de ligamiento, (ii) una región espaciadora que contiene un bloqueador de polimerasa (x), (iii) una molécula de desactivación (Q), (iv) una sonda de detección de UniTaq (Bi), y (v) un marcador detectable (D1) que se desactiva cuando está cerca de la molécula de desactivación. Durante la PCR, la parte del cebador del segundo cebador oligonucleotídico (Ci) se hibrida con la parte específica de cebador del producto de ligamiento mientras que la sonda de detección UniTaq (Bi) se hibrida con su parte de detección complementaria de UniTaq del producto de ligamiento (Figura 26C, Etapa 1) En este ejemplo, la extensión del segundo cebador oligonucleotídico (Figura 26C, Etapa 2) escinde la sonda de detección de UniTaq hibridada (Bi) liberando de ese modo el marcador detectable. La liberación del marcador detectable de la molécula de desactivación genera una señal detectable.

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

El agravante del problema biológico es 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.

5 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 deseado, frente a la señal falsa generada a partir de ácidos nucleicos normales presentes en la muestra, frente a la señal falsa generada en ausencia del marcador de metilación de ácidos nucleicos específicos de la enfermedad.

10 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.

15 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 primarios aumentan exponencialmente. Por el contrario, para las sondas de LDR, se utilizan concentraciones bajas 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 de LDR con "colas" de secuencia universal de cebadores permite la posterior adición de concentraciones más altas de cebadores universales para lograr la amplificación proporcional de los productos iniciales de PCR o LDR. En el presente documento, el enfoque tradicional de LDR se invierte usando adaptadores de oligonucleótidos como moldes para capturar y añadir marcadores específicos a fragmentos de diana monocatenarios de muy baja abundancia.

25 El segundo tema se relaciona con las fluctuaciones en la señal debido a la baja entrada de ácidos nucleicos diana. A menudo, el ácido nucleico diana se origina 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 la pérdida de la señal por completo o informar un número de copias inexacto debido a la distribución de Poisson cuando se distribuyen pequeñas cantidades de moléculas de partida en pocillos individuales (para cuantificación por PCR digital o en tiempo real). Siempre y cuando 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 *droplet*) se minimiza. Si fuera necesario, la señal de arrastre se puede eliminar mediante la incorporación de uracilo estándar durante la etapa de amplificación universal, y utilizando UNG y endonucleasa AP en el procedimiento de tratamiento previo a la amplificación. Como 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.

40 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 del cebador con criterio. Para las reacciones de ligamiento, la actividad de 5' → 3' nucleasa de la polimerasa se puede usar para liberar el 5' fosfato del cebador de ligamiento cadena abajo (solo cuando se hibrida con la diana), por lo que es adecuado para el ligamiento. En la presente invención, la especificidad de las endonucleasas de restricción sensibles a metilo e insensibles a metilo se usa para generar grupos 5' fosfato y 3'OH competentes para la ligamiento en posiciones definidas en la diana.

45 El cuarto tema es la amplificación suprimida (reducida) o la amplificación incorrecta (falsa) debido a cebadores no utilizados en la reacción. Un enfoque para eliminar dichos cebadores no utilizados es capturar el ADN genómico sobre un soporte sólido, permitir que los cebadores de ligamiento se hibriden y se ligen, y después se eliminan los cebadores o productos que no se hibridan con el ADN genómico sobre un soporte sólido. Otro enfoque es eliminar las hebras adaptadoras de molde de oligonucleótidos, ya sea usando uracil ADN glicosilasa para digerir el molde artificial que contiene uracilo, o usando la actividad nucleasa 5' → 3' de polimerasa para digerir la hebra del molde de un producto ligado. Otro enfoque más es diseñar el adaptador de oligonucleótido de horquilla cadena arriba 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 cadena abajo para que comprenda una aleta en 5' que se extiende por la actividad de 5' → 3' nucleasa de la polimerasa cuando se hibrida con el fragmento cortado, pero la aleta sin cortar hibrida de nuevo con una región complementaria en el adaptador de modo que inhibe el cebado posterior de un oligonucleótido sin ligar. Otro enfoque más es incorporar un grupo de bloqueo dentro del oligonucleótido adaptador que interfiere con la extensión del extremo 3'. Otro enfoque más es usar un grupo de bloqueo que evite la extensión de un adaptador horquillado cadena arriba sin ligar más allá del grupo de bloqueo y, por lo tanto, evite generar un molde artificial competente para amplificación, pero dicho grupo de bloqueo no interfiere con la actividad de 5' → 3' nucleasa de polimerasa para digerir la hebra de molde de un producto ligado. Otro enfoque más es utilizar diseños de cebadores universales en cebadores de PCR u oligonucleótidos adaptadores, que son ligeramente más cortos que los cebadores universales. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más alta (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales se una preferentemente al producto deseado (en comparación con la PCR compuesta o los cebadores adaptadores de oligonucleótidos que se unen a productos incorrectos).

Los métodos de la presente invención descritos en el presente documento pueden 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 sin metilar. 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 sin metilar 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 las de las moléculas de ácido nucleico de baja abundancia 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 la de las moléculas de ácidos nucleicos de baja abundancia. En otras realizaciones de la presente invención, la una o más secuencias de nucleótidos diana de baja abundancia se cuantifican en la muestra. Esta cuantificación puede ser absoluta o relativa 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 que incluye, pero no se limita a, tejido, 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 la mujer embarazada, células tumorales circulantes, tumor, biopsia tumoral, y exosomas.

Con respecto a la detección precoz del cáncer, los métodos de la presente invención son adecuados para la detección de marcadores de metilación de alta sensibilidad para hipermetilación del promotor (cuando está presente de un 1 % a un 0,01 %) en ADN enriquecido con metilo, o incluso ADN sérico total, por ejemplo, hipermetilación del promotor en p16 y otros genes supresores tumorales, "islas" de CpG también, Sept9, Vimentina, etc. Este enfoque también permite la detección de marcadores sin metilar de alta sensibilidad para hipometilación del promotor (cuando está presente de un 1 % a un 0,1 %) en el ADN sérico total. Los métodos de la presente invención también son adecuados para detección de marcadores sin metilar de alta sensibilidad, por ejemplo, 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 "límite" de CpG también, pérdida de metilación en Alu u otras secuencias de repetición.

La presencia y ausencia de metilación en ciertas regiones genéticas tiene aplicaciones en diagnóstico y pronóstico prenatal. Por ejemplo, la metilación anómala en regiones de 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 diferencialmente, el ADN fetal sin células en el plasma materno puede proporcionar una fuente de ADN fetal, que se puede obtener de forma no invasiva y se puede utilizar para evaluar el estado de metilación de los cromosomas mencionados anteriormente. Dado que el ADN fetal sin células solo representa el 3-6 % del ADN total en la circulación materna durante el primer trimestre, los métodos de alta sensibilidad 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 presentes en suero normal, y/o usando PCR digital para cuantificar la metilación en regiones cromosómicas que están metiladas en ADN aislado de suero normal.

EJEMPLOS PROFÉTICOS

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

Ejemplo profético 1 - Detección de marcador de metilación de alta sensibilidad para hipermetilación del promotor (cuando está presente de un 1 % a un 0,01 %) en ADN enriquecido con metilo, o ADN plasmático total

La metilación del promotor desempeña un papel importante en la regulación de la expresión génica. Los promotores génicos a menudo tienen regiones de alto contenido de CpG conocidas como "Islas de CpG". Cuando los genes, como los genes supresores de tumores, con las islas de CpG del promotor, se desactivan, esto suele ir acompañado por la metilación de la mayoría de las secuencias de CpG dentro de las regiones promotora y del 1^{er} exón. Para detectar cambios de metilación ha habido dos enfoques tradicionales.

El primero aprovecha las enzimas de restricción sensibles a metilo, en donde el ADN genómico se escinde cuando está sin metilar, y esto va seguido por una amplificación por PCR usando cebadores que flanquean el sitio (o sitios). Si el ADN estaba metilado, se debería amplificar, si está sin metilar, no se debería amplificar. Esta técnica tiene la desventaja de que las digestiones no siempre se completan y, además, no es precisa para encontrar niveles bajos

de ADN metilado cuando la mayoría de la misma secuencia está sin metilar, como podría ser el caso con la detección de plasma.

El segundo enfoque se conoce como "PCR específica de metilo" y se basa en el tratamiento de ADN con bisulfito, que convierte las C sin metilar en U. Si la base está metilada, entonces no se convierte. La PCR específica de metilo se basa en el uso de cebadores y sondas Taqman que son específicas para la secuencia convertida resultante si estuviera metilada, pero no sin metilar. La PCR específica de metilo tiene la ventaja de poder detectar niveles muy bajos de ADN metilado. Una mejora adicional de esta técnica emplea un oligonucleótido de bloqueo que se hibrida con la secuencia del ADN sin metilar convertido con bisulfito, enriqueciendo de ese modo la amplificación del ADN metilado convertido con bisulfito. La desventaja es que el tratamiento con bisulfito destruye del 50 % al 90 % de la integridad original del ADN cortándolo. Al comenzar con el ADN del plasma (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 amplificaciones no específicas. Esto generalmente requiere un enfoque de PCR anidada, corre el riesgo de contaminación por arrastre y generalmente no es ideal para amplificaciones multiplexadas.

BstUI es una enzima termófila que reconoce la secuencia de 4 bases CG[^]CG, escindiéndose en la parte media para generar sitios terminales romos (véase el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.358.048 de Barany *et al.* Isosquizómeros termófilos similares incluyen Bsh1236I, BspFNI, BstFNI, FnuDII, y Thai. También se ha informado de un isosquizómero mesófilo (AcclI). A menudo el sitio de reconocimiento se encuentra en las islas de CpG y proporciona las CpG en tándem donde ninguna, una o ambas pueden estar metiladas. BstUI corta el ADN molde bicatenario en la hebra superior sin metilar, cuando hay una CpG simple metilada en la hebra inferior. Sin embargo, BstUI no corta el ADN molde bicatenario en la hebra superior sin metilar, cuando ambas CpG en la hebra inferior están metiladas. La enzima Hpy99I (secuencia de reconocimiento CGWCG[^]) puede tener propiedades similares a BstUI. (HpaII tampoco corta el ADN molde bicatenario en la hebra superior sin metilar, cuando su CpG simple en la hebra inferior está metilada).

Por el contrario, una enzima tal como HinP1I (secuencia de reconocimiento G[^]CGC, se escinde con un saliente en el extremo 5' de 2 bases), corta el ADN molde bicatenario en la hebra superior sin metilar, cuando la CpG en la hebra inferior está metilada. Las enzimas AclI = (secuencia de reconocimiento, C[^]CGC y G[^]CGG) y HpyCH4IV (secuencia de reconocimiento, A[^]CGT) pueden tener propiedades similares a HinP1I.

Descripción general del primer enfoque: ligamiento con nucleasa-digestión con enzima de restricción sensible a la metilación. Este enfoque depende de la fidelidad de tres enzimas: (i) la actividad de restricción de BstUI (ii) la 5'→3' nucleasa de polimerasa o enzima de escisión de aleta para discriminar una coincidencia de una falta de coincidencia en el lado 5' de la sonda cadena abajo, y (iii) la ligasa para discriminar una coincidencia de una falta de coincidencia en el lado 3' de la sonda cadena arriba. El ADN genómico aislado, o ADN enriquecido con metilo se trata con la enzima sensible a metilo BstUI. La hibridación de dos sondas a la diana permite la escisión de la aleta con polimerasa, y el ligamiento con ligasa solo si la segunda base de la secuencia de reconocimiento no cambia. Una vez que se ha producido un suceso de miento se añade BstUI recién preparado para escindir cualquier producto que no se haya metilado completamente (es decir, 5' C*GC*G 3') en el ADN genómico original. Esos productos que no se escinden se amplificarán en una etapa de amplificación por PCR posterior, y por lo tanto esta es la etapa discriminatoria fundamental.

Al insistir en que una endonucleasa genere el 5' fosfato, esto evita una señal falsa y también debería eliminar cualquier señal de ligamiento no específica. Por lo tanto, cualquier fragmento raro de ADN genómico que se fuera monocatenario después de la purificación, o que no se haya escindido no formará un sustrato productivo para amplificaciones por PCR posteriores, ya que el producto tiene secuencias no genómicas en ambos lados.

Para resumir los niveles de discriminación del enfoque mencionado anteriormente para detección de metilación de baja abundancia v1 (Véanse las Figuras 2A-2I):

1. Uso de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
2. Uso de actividad de 5'-3' nucleasa de polimerasa o nucleasa Fen en la sonda cadena abajo.
3. Uso de fidelidad de ligamiento en 3' de ligasa termoestable en la sonda cadena arriba.
4. Reutilización de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
5. Uso de secuencias en el extremo 5' de sondas cadena abajo, de modo que cuando no se escinden, formen horquillas a menor temperatura y se extiendan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

Una ventaja de este enfoque es que incluso si la diana está parcialmente metilada, y BstUI corta el sitio, las sondas pueden religarse y amplificarse sin embargo. Se pueden diseñar sondas que contengan grupos metilo no en la unión para evitar del corte de la hebra sonda en una posición incorrecta si la sonda no se liquidara a través de una o más secuencias de BstUI adyacentes que no se están sometiendo ensayo para estado de metilación.

Una desventaja de este enfoque es que en la posibilidad improbable de que el sitio BstUI esté mutado en una de las bases externas, se podría producir algún ligamiento incluso con una falta de coincidencia (no en la unión del ligamiento), y dado que el sitio estaba mutado, no se podría volver a escindir con BstUI. Sin embargo, podría dar una señal muy alta, que se marcaría inmediatamente como un falso positivo.

5 También se presenta un enfoque alternativo (véase a continuación), usando sondas acopladas cadena arriba y cadena abajo.

10 Hay que tener en cuenta dos variaciones. En la primera variación, (que se muestra en las Figuras 3A-3I), los cebadores acoplados se diseñan para formar horquillas a menor temperatura y que se extienden sobre sí mismos para formar productos que no se amplifican.

15 Para resumir los niveles de discriminación del primer enfoque usando cebadores acoplados para detección de cada sitio metilado BstUI (véanse las Figuras 3A-3I):

1. Uso de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
2. Uso de actividad de 5'-3' nucleasa de polimerasa o nucleasa Fen en la sonda cadena abajo.
- 20 3. Uso de fidelidad de ligamiento en 3' de ligasa termoestable en la sonda cadena arriba.
4. Reutilización de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
5. Uso de concentraciones menores de sonda para minimizar los sucesos independientes de la diana.
6. Uso de secuencias de cebadores acoplados, de modo que cuando no se ligan, forman horquillas a menor temperatura y se extienden sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

25 En la segunda variación (véanse las Figuras 3J-3P), los cebadores acoplados se ligan para formar un círculo cerrado en la diana, y los cebadores acoplados sin ligar (así como ADN molde de entrada) se eliminan mediante digestión con exonucleasa.

30 Para resumir los niveles de discriminación del primer enfoque usando cebadores acoplados para detección de cada sitio metilado BstUI:

1. Uso de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
- 35 2. Uso de actividad de 5'-3' nucleasa de polimerasa o nucleasa Fen en la sonda cadena abajo.
3. Uso de fidelidad de ligamiento en 3' de ligasa termoestable en la sonda cadena arriba.
4. Reutilización de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
5. Uso de concentraciones menores de sonda para minimizar los sucesos independientes de la diana.
- 40 6. Uso de exonucleasas para destruir la sonda y la diana sin ligar.

45 Como control para la cantidad total de ADN presente (no se muestra), se puede elegir una región diana cercana que esté metilada en el ADN normal del plasma o suero, y/o en un gen grabado en el que al menos un cromosoma siempre está metilado. La sonda oligonucleotídica cadena arriba que está ligada a la sonda cadena abajo es una mezcla de dos oligos: (i) Un oligonucleótido presente en 1 de 100 con la secuencia específica UniTaq correcta, y (ii) un oligonucleótido presente en 99 de 100 con una secuencia que no contiene la secuencia específica UniTaq correcta y que opcionalmente tiene aproximadamente 6-10 bases complementarias a su extremo 3'. El producto de ligamiento que contiene las secuencias UniTaq se amplifica y dará una señal equivalente en 1 de 100 del molde original. La mayor parte del producto de ligamiento carece de la secuencia universal en el extremo 5', y no se amplifica exponencialmente. La sonda cadena arriba sin ligar formará una horquilla sobre sí misma, y extenderá su propia secuencia en el extremo 3' sobre sí misma, sacándola de la competencia por formar parte de otro amplión de PCR.

55 Como control a la cantidad total de ADN presente, este enfoque también se puede usar con sondas acopladas, de nuevo en una región diana como se ha descrito anteriormente. Se usa una mezcla de dos oligonucleótidos: (i) Un oligonucleótido presente en 1 de 100 con la secuencia UniTaq y/u otra secuencia de marcado correctas, y (ii) un oligonucleótido presente en 99 de 100 con una secuencia que carece o que tiene secuencias de marcado incorrectas. El producto de ligamiento que contiene las secuencias UniTaq y/o de marcado se amplifica y dará una señal equivalente en 1 de 100 del molde original. La mayor parte del producto de ligamiento carece o tiene secuencias de marcado incorrectas, y no se amplifica exponencialmente.

60 **Protocolo detallado para detección de alta sensibilidad de marcador de metilación (cuando está presente de un 1 % a un 0,01 %):**

65 Etapa Opcional 1: Escindir ADN genómico aislado, o ADN enriquecido con metilo con la enzima sensible a metilo BstUI. Preferentemente, para determinar el estado de metilación se eligen dos o tres sitios por promotor. Esta

etapa también podría destruir cualquier amplicón de PCR de contaminación residual (que podría estar sin metilar)

Etapa 2: Desnaturalizar ADN genómico del plasma (94 °C 1 minuto) en presencia de sondas de LDR cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', seguido por UniTaq Ai, seguido por secuencia específica de diana, y la base G en el extremo 3'), sonda de LDR cadena abajo (en el extremo 5' de saliente extra de 20 bases, en el que 6-10 bases son complementarias con el extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', seguido por secuencia específica de diana -- UniTaq Bi' -- Cebador Univ. U2'), Taq polimerasa, y la ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). Realizar una o más reacciones de LDR.

Etapa 3: Añadir Cebador Universal U1, Cebador Universal U2, y BstUI de dNTP de inicio en caliente. Incubar a 55 °C (permite que BstUI escinda productos de ligamiento sin metilar, y activa los dNTP) para permitir que las sondas cadena abajo sin ligar formen autohorquilla con 6-10 bases que son complementarias con el extremo 3', que se extiende para crear horquillas más largas que hacen que estas sondas cadena abajo sean resistentes a una mayor amplificación. Después, permitir que la amplificación por PCR continúe durante 8-20 ciclos. En una variación, las colas de cebador universal U1 y U2 en las sondas de LDR compuestas son ligeramente más cortas que las de los cebadores universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más alta (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales U1 y U2 se unan preferentemente al producto deseado (en comparación con la unión de la sonda LDR compuesta 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 dímeros de cebador. Estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1- UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

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

F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

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

El esquema anterior se puede llevar a cabo usando la matriz Zipcode o detección Taqman tradicional. Por ejemplo, es necesario que la sonda cadena arriba solamente contenga un Cebador Univ. U1 en el extremo 5' seguido por una secuencia Zipcode seguido por secuencia cadena arriba específica de diana. Es necesario que la sonda cadena abajo contenga solamente 5' de saliente extra de 20 bases, en el que 6-10 bases son complementarias con el extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', seguido por secuencia cadena abajo específica de diana -- Cebador Univ. U2'. El producto resultante podría ser:

Cebador Univ. U1Pm- Zipcode Zi - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - Cebador Univ. U2'

Para la detección usando matrices universales (Zipcode), el Cebador Univ. U2 podría contener una marca indicadora, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 podría contener un 5' fosfato, y la amplificación podría continuar durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto podría permitir el uso de lambda exonucleasa para digerir la segunda hebra, haciendo que el producto marcado con fluorescencia fuera monocatenario y adecuado para hibridación en una matriz universal (Zipcode).

Para la detección usando ensayos de Taqman, 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 solapan con alguna parte o toda la secuencia Zipcode única para cada producto. La sonda Taqman podría ser para cualquiera la secuencia de unión de Zipcode como del ADN diana, o simplemente del ADN diana (sin solapamiento del cebador único en cualquier caso). El segundo cebador aún podría ser el Cebador Univ. U2, aunque para especificidad añadida, también por incluir algunas bases específicas del genoma (sin solapamiento a la sonda Taqman).

Además, las construcciones mencionadas anteriormente pueden incluir secuencias únicas (que varían de 0 a 10 bases) internas a los cebadores Universales (Unique Ai, Unique Bi), representados como sigue a continuación.
Cebador Univ. U1- Unique Ai- Zipcode Zi - Diana en el extremo 5'-CGCG-Diana Cadena Abajo - Unique Bi - Cebador Univ. U2'

Para la detección usando ensayos de Zipcode Taqman, 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 solapan con la secuencia de Unique Ai y Unique Bi para cada producto. La sonda Taqman podría ser la secuencia Zipcode.

La esencia del enfoque UniTaq es que es necesario que ambos cebadores de un suceso de ligamiento se corrijan con el fin de obtener una señal positiva. En la actualidad esto se consigue requiriendo hibridación de dos partes entre sí (en el ejemplo anterior, la región F1-UniTaq Bi- Q se hibrida con la secuencia de UniTaq Bi'). Sin embargo,

existen enfoques alternativos, usando cualquiera de matrices Zipcode o ensayos de Zipcode Taqman.

Un enfoque consiste en separar la secuencia Zipcode en dos partes, que se pueden acercar entre sí utilizando una región corta de secuencia complementaria en ambos lados de las partes separadas. En la realización preferente, esta región complementaria corta tiene de 5 a 8 bases. Esto permite la formación transitoria de horquillas en la región corta cuando las dos secciones están en la misma cadena de ADN, que se estabiliza hibridando ambas mitades de la secuencia en una secuencia Zipcode complementaria de longitud completa en una matriz, o como alternativa como parte de un ensayo de Taqman.

Este enfoque podría usar sondas cadena arriba que contienen un Cebador Univ. U1 en el extremo 5' seguido por una primera mitad de secuencia Zipcode Zi. 1 y una secuencia corta Ti seguido por la diana cadena arriba. Las sondas cadena abajo contienen una región diana cadena abajo en el extremo 5', una secuencia corta Ti' seguido por la segunda mitad de la secuencia Zipcode Zi.2 Cebador Univ. U2'. El producto resultante podría ser:

Cebador Univ. U1 - 1ª ½ Zipcode Zi. 1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2ª ½ Zipcode Zi.2 - Cebador Univ. U2'

Cuando la Ti Corta se hibrida de manera transitoria con la Ti' Corta, la secuencia 1ª ½ Zipcode Zi se acerca a la 2ª ½ Zipcode Zi, y la hibridación transitoria se puede estabilizar cuando se hibridan ambas mitades de secuencias Zipcode Zi con la secuencia Zipcode Zi' de longitud completa en una matriz Zipcode.

Cuando se usa un solo cebador que contiene el grupo fluorescente e desactivador, el diseño puede ser similar al usado con UniTaq. Por ejemplo, la secuencia de inicio podría tener la forma:

Cebador Univ. U1 - UniTaq Ai - 1ª ½ Zipcode Zi.1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2ª ½ Zipcode Zi.2 - Cebador Univ. U2'

Esto podría permitir el uso de F1-Zipcode Zi-Unique Ai y los cebadores U2 universales comunes para amplificación (véase la Figura 25.)

Además, las construcciones que se han mencionado anteriormente pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) interna a los cebadores Universales (Unique Ai, Unique Bi), representado como sigue a continuación.

Cebador Univ. U1 - Unique Ai - 1ª ½ Zipcode Zi.1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2ª ½ Zipcode Zi.2 - Unique Bi - Cebador Univ. U2'

Para la detección usando ensayos Zipcode Taqman, 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 solapan con las secuencias Unique Ai y Unique Bi para cada producto. La sonda Taqman podría ser para la secuencia Zipcode de longitud completa (véase la Figura 24).

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

Protocolo detallado para detección de alta sensibilidad de marcador de metilación (cuando está presente de un 1 % a un 0,01 %):

Un enfoque alternativo para este problema es el uso de sondas de LDR que se acoplan entre sí a través de sus extremos de no ligamiento. Esto permite el uso de concentraciones de cebador menores. Además, proporciona una forma sencilla de eliminar sondas sin ligar cadena arriba y cadena abajo de reacciones después de ligamiento.

Etapa Opcional 1: Escindir ADN genómico aislado, o ADN enriquecido con metilo con la enzima sensible a metilo BstUI. Preferentemente, para determinar el estado de metilación se eligen dos o tres sitios por promotor. Esta etapa también podría destruir cualquier amplicón de PCR de contaminación residual (que podría estar sin metilar).

Etapa 2: Desnaturalizar ADN genómico del plasma (94 °C 1 minuto) en presencia de sondas acopladas, que comprende las partes de sonda de LDR cadena arriba (Cebador Univ. U1 en el extremo 5' -- UniTaq Ai, seguido por secuencia específica de diana cadena arriba con una base G en el extremo 3'), acoplada a las partes de la sonda de LDR cadena abajo (base G en el extremo 5' o aleta que contiene la misma base G seguido por secuencia específica de diana cadena abajo -UniTaq Bi' -- Cebador Univ. U2'- y secuencia específica de diana de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' libre de la parte de la secuencia del cebador cadena arriba), Taq polimerasa, y la ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). La sonda anterior se puede volver a escribir como Aleta en (5' que contiene la base G seguido por secuencia específica de diana cadena abajo -- UniTaq Bi' -Cebador Univ. U2'- y secuencia específica de diana de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' libre de la parte de la secuencia del cebador cadena arriba, seguido por un espaciador opcional, acoplado a Cebador Univ. U1 -- UniTaq Ai, seguido por secuencia específica de diana cadena arriba con una base G en el extremo 3'). En esta variación, la sonda acoplada puede contener bases adicionales o simplemente espaciador, y puede contener opcionalmente una región que la polimerasa no copia.

Etapa 3: Añadir Cebador Universal U1, y Cebador Universal U2, y BstUI de dNTP de inicio en caliente. Incubar a 55 °C (permite que BstUI escinda productos de ligamiento sin metilar, y activa los dNTP) para permitir que las sondas acopladas cadena abajo sin ligar formen autohorquilla con las 6-10 bases que son complementarias con el extremo 3', que se extiende para crear horquillas más largas que hacen que estas sondas acopladas sean resistentes a una amplificación adicional. Después, permitir que la amplificación por PCR continúe durante 8-20 ciclos. En una variación, las colas de cebador universal U1 y U2 en las sondas de LDR compuestas son ligeramente más cortas que las de los cebadores universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más alta (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales U1 y U2 se unan preferentemente al producto deseado (en comparación con las sondas de LDR compuestas 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 dímeros de cebador. Estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1- UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

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

F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

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

En una variación de lo mencionado anteriormente, las partes coincidentes de la sonda de LDR cadena abajo, es decir, la base G en el extremo 5' o aleta que contiene la misma base G seguido por secuencia específica de diana -- UniTaq Bi' - no incluyen 6-10 bases de la secuencia específica diana complementaria con el extremo 3' libre de la parte de la secuencia de cebador cadena arriba. Este cebador se puede volver a escribir como (Aleta en el extremo 5' que contiene la base G seguido por secuencia específica de diana cadena abajo -- UniTaq Bi' -- Cebador Univ. U2', seguido por una base escindible opcional, acoplada a Cebador Univ. U1 -- UniTaq Ai, seguido por secuencia específica de diana cadena arriba con una base G en el extremo 3'). En esta versión, la región de conexión contiene una secuencia interna que no inhibe la digestión con exonucleasa, pero se puede escindir después de una etapa de digestión con exonucleasa, y antes de una etapa de amplificación de polimerasa. Un ejemplo de una secuencia de ese tipo es el uso de una base uracilo, que posteriormente se puede escindir con uracil ADN glicosilasa. En este ejemplo, después de la etapa de ligamiento, se añaden Exonucleasa I y Exonucleasa III para digerir toda la sonda acoplada sin ligar, así como todo el ADN diana de entrada. Después de destruir las exonucleasas con calor, se añade uracil ADN glicosilasa para linealizar los cebadores ligados para la posterior amplificación por PCR.

En ambas variaciones mencionadas anteriormente, las sondas acopladas se pueden sintetizar con una o ambas secuencias de Cebador Univ. U1 y/o Cebador Univ. U2', o partes de las mismas, necesitando de ese modo uno o dos cebadores usados como puente (Cebador Universal U1 - UniTaq Ai y Cebador Universal U2 - UniTaq Bi) durante la etapa de amplificación por PCR universal.

En ambas variaciones mencionadas anteriormente, las sondas acopladas se pueden sintetizar sin (i) un espaciador que la polimerasa no copia, o sin (ii) una secuencia interna que no inhibe la digestión con exonucleasa, pero que se puede escindir en una etapa posterior. Estas modificaciones diseñan para linealizar el producto de ligamiento circular inicial y/o para evitar que la polimerasa que contiene actividad de 5'→3' exonucleasa destruya su propio producto de extensión cuando se amplifica por PCR usando el cebador universal U2, o el conjunto de cebadores oligonucleotídicos secundarios que se hibridan con las sondas oligonucleotídicas acopladas primarias (o complementos de las mismas). El problema también se puede resolver usando, cuando sea posible, una polimerasa que carece de actividad de 5'-3' exonucleasa durante la etapa de amplificación del cebador universal inicial, o usando cebadores oligonucleotídicos secundarios complementarios con el producto de ligamiento circular que contienen modificaciones en el extremo 5' para hacerlos resistentes a la actividad de 5'→3' exonucleasa de la polimerasa. Las modificaciones de ese tipo en el extremo 5' incluyen el uso de tiofosfato en la unión de la cadena principal y/o el uso de análogos de 2'-O-metil nucleótidos.

La detección de metilación de alta sensibilidad se puede llevar a cabo usando matriz Zipcode, Zipcode Taqman o detección Taqman tradicional como se ha descrito anteriormente.

Este enfoque podría usar sondas de LDR cadena arriba (Zipcode Zi en el extremo 5', seguido por secuencia específica de diana con una base G en el extremo 3'), acopladas a los cebadores de LDR cadena abajo emparejados (base G en el extremo 5' seguido por secuencia específica de diana -- Cebador Univ. U2' -- y secuencia específica de diana de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' libre de la secuencia de cebador cadena arriba). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la

secuencia:

Cebador Univ. U1- Zipcode Zi - Diana Cadena Arriba- CGCG -Diana Cadena Abajo - Cebador Univ. U2'

5 Para la detección usando matrices universales (Zipcode), el Cebador Univ. U2 podría contener una marca indicadora, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 podría contener un 5' fosfato, y la amplificación podría continuar durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto podría permitir el uso de lambda exonucleasa para digerir la segunda hebra, haciendo que el producto marcado con fluorescencia fuera monocatenario y adecuado para hibridación en una matriz universal (Zipcode).

10 La detección de metilación de alta sensibilidad se puede llevar a cabo usando secuencias Zipcode de separación como se describió anteriormente.

15 Este enfoque podría usar sondas de LDR cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', una primera mitad de secuencia Zipcode Zi.1 y una secuencia corta Ti, seguido por secuencia específica de diana con una base G en el extremo 3'), acopladas a las sondas de LDR cadena abajo (base G en el extremo 5' seguido por secuencia específica de diana -- el complemento de la secuencia corta Ti', una segunda mitad de secuencia Zipcode Zi.2 - Cebador Univ. U2'- y secuencia específica de diana de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' libre de la secuencia de cebador cadena arriba). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

20 Cebador Univ. U1- 1^a ½ Zipcode Zi.1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2^a ½ Zipcode Zi.2 - Cebador Univ. U2'

25 Cuando la Ti Corta se hibrida transitoriamente con la Ti' Corta, la secuencia 1^a ½ Zipcode Zi.1 se acerca a la 2^a ½ Zipcode Zi.2, y la hibridación transitoria se puede estabilizar cuando se hibridan ambas mitades de secuencias Zipcode Zi con la secuencia Zipcode Zi' de longitud completa en una matriz Zipcode.

Además, las construcciones anteriores pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) interna a los cebadores Universales (Unique Ai, Unique Bi), representadas como sigue a continuación.

30 Cebador Univ. U1 - Unique Ai - 1^a ½ Zipcode Zi.1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2^a ½ Zipcode Zi.2 - Unique Bi - Cebador Univ. U2'

35 Para la detección usando ensayos de Zipcode Taqman, 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 solapan con las secuencias Unique Ai y Unique Bi para cada producto. La sonda Taqman podría ser para la secuencia Zipcode de longitud completa.

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

40 **Descripción general del segundo enfoque - Digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-ligamiento:** Este enfoque depende de la fidelidad de dos enzimas: (i) la actividad de restricción de BstUI, y (ii) la ligasa para discriminar una coincidencia de una falta de coincidencia en el lado en el extremo 3' del cebador cadena arriba. El ADN genómico aislado, o ADN enriquecido con metilo se trata con la enzima sensible a metilo BstUI. La hibridación de dos sondas con una diana hemimetilada (es decir, 5' CGC*G 3') permite la escisión de la aleta con BstUI recién preparado, seguido por ligamiento con ligasa. El uso opcional de C*G metilado en el extremo 3' evita la reescisión con BstUI. Si la diana no estaba metilada, BstUI escindirá ambas hebras, y la ligasa termoestable no volverá a sellar estos fragmentos. Esos productos que no se escinden se amplificarán en una etapa de amplificación por PCR posterior, y por lo tanto esta es la etapa discriminatoria fundamental.

50 Al insistir en que la endonucleasa de restricción genere el 5' fosfato, esto evita una señal falsa y también debería eliminar cualquier señal de ligamiento no específica. Por lo tanto, cualquier fragmento raro de ADN genómico que fuera monocatenario después de la purificación o que no se hubiera escindido no formará un sustrato productivo para posteriores amplificaciones por PCR, ya que el producto tiene secuencias no genómicas en ambos lados.

55 Para resumir los niveles de discriminación del enfoque mencionado anteriormente para detección de metilación de baja abundancia (véanse las Figuras 5A-5H):

- 60 1. Uso de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
2. Uso de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para cortar la diana bicatenaria en la sonda cadena abajo cuando el ADN genómico original estaba hemimetilado.
3. Uso de fidelidad de ligamiento en 3' de ligasa termoestable en la sonda cadena arriba.
4. Reutilización de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
- 65 5. Uso de secuencias en el extremo 5' de la sonda cadena abajo, de modo que cuando no se escinden, formen horquillas a menor temperatura y se extiendan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

Una ventaja de este segundo enfoque es que si a la diana le falta el sitio BstUI, la sonda cadena abajo no se cortará, por lo que el 5' fosfato no se desenmascara, de modo que no se produce ligamiento y, en consecuencia, no se puede producir una amplificación falsa.

5 Una desventaja de este segundo enfoque es que un alto porcentaje del sitio BstUI dado está completamente metilado, entonces habrá menos señal ya que la hebra diana totalmente metilada podría inhibir el corte de BstUI del cebador cadena abajo.

10 También se presenta un enfoque alternativo (véase a continuación), que usa sondas emparejadas acopladas cadena arriba y cadena.

15 Existen dos variaciones a tener en cuenta. En la primera variación (mostrada en las Figuras 6A-6H), las sondas acopladas se diseñan para que formen horquillas a menor temperatura y se extiendan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

Para resumir los niveles de discriminación de la primera variación usando cebadores acoplados para detección de cada sitio metilado BstUI:

- 20 1. Uso de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
2. Uso de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para cortar la diana bicatenaria en la sonda cadena abajo cuando el ADN genómico original estaba hemimetilado.
- 25 3. Uso de fidelidad de ligamiento en 3' de ligasa termoestable en la sonda cadena arriba.
4. Reutilización de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
5. Uso de concentraciones menores de sonda para minimizar los sucesos independientes de la diana.
6. Uso de secuencias en las sondas acopladas, de modo que cuando no se ligan, forman horquillas a menor temperatura y se extienden sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

30 En la segunda variación (Figuras 6I-6N), las sondas acopladas se ligan para formar un círculo cerrado en la diana, y las sondas acopladas sin ligar (así como el ADN molde de entrada) se eliminan mediante digestión con exonucleasa.

35 Para resumir los niveles de discriminación de la primera variación usando cebadores acoplados para detección de cada sitio metilado BstUI:

- 40 1. Uso de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
2. Uso de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para cortar la diana bicatenaria en la sonda cadena abajo cuando el ADN genómico original estaba hemimetilado.
3. Uso de fidelidad de ligamiento en 3' de ligasa termoestable en la sonda cadena arriba.
4. Reutilización de enzimas de restricción BstUI sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
- 45 5. Uso de concentraciones menores de sonda para minimizar los sucesos independientes de la diana.
6. Uso de exonucleasas para destruir la sonda y la diana sin ligar.

50 Como control de la cantidad total de ADN presente, se puede elegir una región diana cercana que esté metilada en el ADN normal del plasma o suero, y/o en un gen grabado en el que al menos un cromosoma siempre está metilado. La sonda oligonucleotídica cadena arriba que está ligada a la sonda cadena abajo es una mezcla de dos oligos: (i) Un oligonucleótido presente en 1 de 100 con la secuencia específica UniTaq correcta, y (ii) un oligonucleótido presente en 99 de 100 con una secuencia que no contiene la secuencia específica UniTaq correcta y que opcionalmente tiene aproximadamente 6-10 bases complementarias a su extremo 3'. El producto de ligamiento que contiene las secuencias UniTaq se amplifica y dará una señal equivalente en 1 de 100 del molde original. La mayor parte del producto de ligamiento carece de la secuencia universal en el extremo 5', y no se amplifica exponencialmente. La sonda cadena arriba sin ligar formará una horquilla sobre sí misma, y extenderá su propia secuencia en el extremo 3' sobre sí misma, sacándola de la competencia por formar parte de otro amplicón de PCR.

60 Como control de la cantidad total de ADN presente, este enfoque también se puede usar con sondas acopladas, de nuevo en una región diana como se ha descrito anteriormente. Se usa una mezcla de dos oligonucleótidos: (i) Un oligonucleótido presente en 1 de 100 con la secuencia UniTaq y/u otra secuencia de marcado correctas, y (ii) un oligonucleótido presente en 99 de 100 con una secuencia que carece o que tiene secuencias de marcado incorrectas. El producto de ligamiento que contiene las secuencias UniTaq y/o de marcado se amplifica y dará una señal equivalente en 1 de 100 del molde original. La mayor parte del producto de ligamiento carece o tiene secuencias de marcado incorrectas, y no se amplifica exponencialmente.

65 **Protocolo detallado para detección de alta sensibilidad de marcador de metilación (cuando está presente de**

un 1 % a un 0,01 %):

5 Etapa Opcional 1: Escindir ADN genómico aislado, o ADN enriquecido con metilo con la enzima sensible a metilo BstUI. Preferentemente, para determinar el estado de metilación se eligen dos o tres sitios por promotor. Esta etapa también podría destruir cualquier amplicón de PCR de contaminación residual (que podría estar sin metilar).

10 Etapa 2: Desnaturalizar ADN genómico del plasma (94 °C 1 minuto) en presencia de sondas de LDR cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', seguido por UniTaq Ai, seguido por secuencia específica de diana, y bases CpG en el extremo 3'), sondas de LDR cadena abajo (5' de saliente extra de 20 bases, en el que 6-10 bases son complementarias con el extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', la secuencia BstUI, seguido por secuencia específica de diana -- UniTaq Bi' -- Cebador Univ. U2') y permitir que las sondas se hibriden con la diana. Añadir BstUI y ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). Realizar una o más reacciones de LDR. El uso opcional de C*G metilado en el extremo 3' evita la reescisión con BstUI.

15 Etapa 3: Añadir Taq polimerasa, dNTP, Cebador Universal U1, y Cebador Universal U2. Activar la polimerasa. Incubar a 55 °C para permitir que las sondas cadena abajo sin ligar formen autohorquilla con 6-10 bases que son complementarias con el extremo 3', que se extiende para crear horquillas más largas que hacen que estas sondas cadena abajo sean resistentes a una amplificación adicional. Después, permitir que la amplificación por PCR continúe durante 8-20 ciclos. En una variación, las colas de cebador universal U1 y U2 en los cebadores de LDR compuestos son ligeramente más cortas que las de los cebadores universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más alta (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales U1 y U2 se unan preferentemente al producto deseado (en comparación con los cebadores de LDR 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 dímeros de cebador. Estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:
20 Cebador Univ. U1- UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

25 Etapa 4: Abrir el tubo, diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a pocillos Taqman, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos UniTaq del formato F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva con Inactivador Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:
30 F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

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

40 La detección de metilación de alta sensibilidad se puede llevar a cabo usando matriz Zipcode, Zipcode Taqman o detección Taqman tradicional como se describió anteriormente. Este enfoque podría usar sondas de LDR cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', seguido por Zipcode Zi, seguido por secuencia específica de diana con una base G en el extremo 3'), y sondas de LDR en el extremo 3' (5' de saliente extra de 20 bases, en el que 6-10 bases son complementarias con el extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', la secuencia BstUI, seguido por secuencia específica de diana -- Cebador Univ. U2'). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:
45 Cebador Univ. U1- Zipcode Zi - Diana Cadena Arriba- CGCG -Diana Cadena Abajo - Cebador Univ. U2'

50 Para la detección usando matrices universales (Zipcode), el Cebador Univ. U2 podría contener una marca indicadora, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 podría contener un 5' fosfato, y la amplificación podría continuar durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto podría permitir el uso de lambda exonucleasa para digerir la segunda hebra, haciendo que el producto marcado con fluorescencia sea monocatenario y adecuado a la hibridación en una matriz universal (Zipcode).

55 La detección de metilación de alta sensibilidad se puede llevar a cabo usando secuencias Zipcode de corte como se describió anteriormente. Este enfoque podría usar sondas de LDR cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', una primera mitad de secuencia Zipcode Zi.1 y una secuencia corta Ti, seguido por secuencia específica de diana con bases CpG en el extremo 3'), y sondas de LDR en el extremo 3' (5' de saliente extra de 20 bases, en el que 6-10 bases son complementarias con el extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', seguido por la secuencia BstUI, seguido por secuencia específica de diana - el complemento de la secuencia corta Ti', una segunda mitad de secuencia Zipcode Zi.2 - Cebador Univ. U2'). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:
60 Cebador Univ. U1- 1ª ½ Zipcode Zi. 1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba- CGCG -Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2ª ½ Zipcode Zi.2 -Cebador Univ. U2'

65 Cuando la Ti Corta se hibrida de forma transitoria con la Ti' Corta, la secuencia 1ª ½ Zipcode Zi.1 se pone en la cercanía de la 2ª ½ Zipcode Zi.2, y la hibridación transitoria se puede estabilizar cuando se hibridan ambas mitades de secuencias Zipcode Zi con la secuencia Zipcode Zi' de longitud completa en una matriz Zipcode.

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

Cebador Univ. U1 - Unique Ai- 1^a ½ Zipcode Zi.1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2^a ½ Zipcode Zi.2 - Unique Bi - Cebador Univ. U2'

Para la detección usando ensayos de Zipcode Taqman, 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 solapan con las secuencias Unique Ai y Unique Bi para cada producto. La sonda Taqman podría ser para la secuencia Zipcode 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 próxima generación.

Protocolo detallado para detección de alta sensibilidad de marcador de metilación (cuando está presente de un 1 % a un 0,01 %):

Un enfoque alternativo para este problema es el uso de sondas de LDR que se acoplan entre sí mediante sus extremos de no ligamiento. Esto permite el uso de concentraciones de sonda menores. Además, proporciona una forma sencilla para eliminar sondas sin llegar tanto cadenas arriba como cadena abajo de reacciones posteriores al ligamiento.

Etapa opcional 1: Escindir ADN genómico aislado, o ADN enriquecido con metilo con la enzima sensible a metilo BstUI. Preferentemente, para determinar el estado de metilación se eligen dos o tres sitios por promotor. Esta etapa también podría destruir cualquier amplicón de PCR de contaminación residual (que podría estar sin metilar).

Etapa 2: Desnaturalizar ADN genómico del plasma (94 °C 1 minuto) en presencia de sondas acopladas, que comprenden partes de sonda de LDR cadena arriba (Cebador Univ. U1 en el extremo 5' -- UniTaq Ai, seguido por secuencia específica de diana con bases CpG en el extremo 3'), acoplada a las partes de la sonda de LDR cadena abajo (región en el extremo 5' que contiene la secuencia BstUI, seguido por secuencia específica de diana -- UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2' - y secuencia específica de diana de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' libre de la parte de la secuencia del cebador cadena arriba), y permite que las sondas se hibriden con la diana. Añadir BstUI y ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). La sonda anterior se puede volver a escribir como región (5' que contiene la secuencia BstUI, seguido por secuencia específica de diana cadena abajo - UniTaq Bi' -- Cebador Univ. U2' - y secuencia específica de diana de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' libre de la parte de la secuencia del cebador cadena arriba, seguido por un espaciador opcional, acoplado a Cebador Univ. U1 - UniTaq Ai, seguido por secuencia específica de diana cadena arriba con un dinucleótido CpG en el extremo 3'). Realizar una o más reacciones de LDR. El uso opcional del dinucleótido C*G metilado o en el extremo 3' evita la reescisión con BstUI. En esta variación, la sonda acoplada puede contener bases adicionales o simplemente espaciador, y puede contener opcionalmente una región que la polimerasa no copia.

Etapa 3: Añadir Taq polimerasa, dNTP, Cebador Universal U1, y Cebador Universal U2. Activar la polimerasa. Incubar a 55 °C para permitir que las sondas acopladas sin ligar formen una autohorquilla con las 6-10 bases que son complementarias con el extremo 3', que se extiende para crear horquillas más largas que hacen que estas sondas acopladas sean resistentes a una amplificación adicional. Después, permitir que la amplificación por PCR continúe durante 8-20 ciclos. En una variación, las colas de cebador universal U1 y U2 en las sondas de LDR compuestas son ligeramente más cortas que las de los cebadores universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más alta (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales U1 y U2 se unan preferentemente al producto deseado (en comparación con las sondas de LDR compuestas 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 dímeros de cebador. Estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1 - UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

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

F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'.

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

En una variación de lo mencionado anteriormente, las partes coincidentes de la sonda de LDR cadena abajo, es decir, la base G en el extremo 5' o aleta que contiene la misma base G seguido por secuencia específica de diana -- UniTaq BI' - no incluyen 6-10 bases de la secuencia específica diana complementaria con el extremo 3' libre de la parte de la secuencia de cebador cadena arriba. Esta sonda se puede volver a escribir como región en (5' que contiene la secuencia BstUI, seguido por secuencia específica de diana cadena abajo -- UniTaq BI' -- Cebador Univ. U2', seguido por una base escindible opcional, acoplada a Cebador Univ. U1 -- UniTaq Ai, seguido por secuencia específica de diana cadena arriba con un dinucleótido CpG en el extremo 3'). El uso opcional de dinucleótido C*G metilado en el extremo 3' evita la reescisión con BstUI. En esta versión, la región de conexión contiene una secuencia interna que no inhibe la digestión con exonucleasa, pero se puede escindir después de una etapa de digestión con exonucleasa y antes de una etapa de amplificación de polimerasa. Un ejemplo de una secuencia de ese tipo es el uso de una base uracilo, que posteriormente se puede escindir con uracil ADN glicosilasa. En este ejemplo, después de la etapa de ligamiento, se añaden Exonucleasa I y Exonucleasa III para digerir toda la sonda acoplada sin ligar, así como todo el ADN diana de entrada. Después de destruir las exonucleasas con calor, se añade uracil ADN glicosilasa para linealizar los cebadores ligados para la posterior amplificación por PCR.

En ambas variaciones mencionadas anteriormente, los cebadores acoplados se pueden sintetizar sin una o ambas de las secuencias de Cebador Univ. U1 y/o Cebador Univ. U2', o partes de las mismas, siendo necesario por tanto uno o dos cebadores que actúen como puente (Cebador Universal U1-UniTaq Ai y Cebador Universal U2-UniTaq Bi) durante la etapa de amplificación por PCR universal.

En ambas variaciones mencionadas anteriormente, las sondas acopladas se pueden sintetizar sin (i) un espaciador que la polimerasa no copia, o sin (ii) una secuencia interna que no inhibe la digestión con exonucleasa, pero que se puede escindir en una etapa posterior. Estas modificaciones diseñan para linealizar el producto de ligamiento circular inicial y/o para evitar que la polimerasa que contiene actividad de 5'→3' exonucleasa destruya su propio producto de extensión cuando se amplifica por PCR usando el cebador universal U2, o el conjunto de cebadores oligonucleotídicos secundarios que se hibridan con las sondas oligonucleotídicas acopladas primarias (o complementos de las mismas). El problema también se puede resolver usando, cuando sea posible, una polimerasa que carece de actividad de 5'-3' exonucleasa durante la etapa de amplificación del cebador universal inicial, o usando cebadores oligonucleotídicos secundarios complementarios con el producto de ligamiento circular que contienen modificaciones en el extremo 5' para hacerlos resistentes a la actividad de 5'→3' exonucleasa de la polimerasa. Las modificaciones de ese tipo en el extremo 5' incluyen el uso de tiofosfato en la unión de la cadena principal y/o el uso de análogos de 2'-O-metil nucleótidos.

La detección de metilación de alta sensibilidad se puede llevar a cabo usando matriz Zipcode, Zipcode Taqman o detección Taqman tradicional como se describió anteriormente. Este enfoque podría usar cebadores de LDR cadena arriba (Zipcode Zi en el extremo 5', seguido por secuencia específica de diana con bases C*G en el extremo 3'), acoplados a los cebadores de LDR cadena abajo coincidentes (región en el extremo 5' que contiene la secuencia BstUI, seguido por secuencia específica de diana -- Cebador Univ. U2' -- y secuencia específica de diana de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' libre de la secuencia del cebador cadena arriba). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:
Cebador Univ. U1 - Zipcode Zi - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - Cebador Univ. U2'

Para la detección usando matrices universales (Zipcode), el Cebador Univ. U2 podría contener una marca indicadora, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 podría contener un 5' fosfato, y la amplificación podría continuar durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto podría permitir el uso de lambda exonucleasa para digerir la segunda hebra, haciendo que el producto marcado sea monocatenario y adecuado para hibridación en una matriz (Zipcode) universal.

La detección de metilación de alta sensibilidad se puede llevar a cabo usando secuencias Zipcode de separación como se describió anteriormente. Este enfoque podría usar sondas de LDR cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', una primera mitad de secuencia Zipcode Zi. 1 y una secuencia corta Ti, seguido por secuencia específica de diana con bases C*G en el extremo 3'), acopladas a los cebadores de LDR cadena abajo coincidentes (región en el extremo 5' que contiene la secuencia BstUI, seguido por secuencia específica de diana -- el complemento de la secuencia corta Ti', una segunda mitad de secuencia Zipcode Zi.2 - Cebador Univ. U2' - y secuencia específica de diana de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' libre de la secuencia del cebador cadena arriba). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:
Cebador Univ. U1 - 1ª ½ Zipcode Zi.1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - CGCG - Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2ª ½ Zipcode Zi.2 - Cebador Univ. U2'

Cuando la Ti Corta se hibrida de manera transitoria con la Ti' Corta, la secuencia 1ª ½ Zipcode Zi. 1 se pone cerca de la 2ª ½ Zipcode Zi.2, y la hibridación transitoria se puede estabilizar cuando se hibridan ambas mitades de secuencia Zipcode Zi con la secuencia Zipcode Zi' de longitud completa en una matriz Zipcode.

Además, las construcciones que se han mencionado anteriormente pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) interna a los cebadores Universales (Unique Ai, Unique Bi), representado como sigue a continuación.
Cebador Univ. U1 - Unique Ai - 1ª ½ Zipcode Zi - Ci Corta -Diana Cadena Arriba- CGCG - Diana Cadena Abajo - Ci'

Corta - 2ª ½ Zipcode Zi - Unique Bi - Cebador Univ. U2'

Para la detección usando ensayos Zipcode Taqman, 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 solapan con las secuencias Unique Ai y Unique Bi para cada producto. La sonda Taqman podría ser para la secuencia Zipcode 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 próxima generación.

Los mismos principios en el sitio BstUI también se pueden aplicar a otras endonucleasas de restricción que cortan la cadena sin metilar de un híbrido en el que la hebra diana genómica está metilada. A continuación se presentan algunos ejemplos de enzimas que pueden satisfacer este requisito.

Acil = cortador de 3,5 bases, C[^]CGC y G[^]CGG

HinP1I = 4 bases, G[^]CGC

HpyCH4IV = 4 bases, A[^]CGT

Las Figuras 7A-7H son similares a las Figuras 5A-5H, excepto por el uso de la enzima de restricción HinP1I. La otra diferencia es que HinP1I es una enzima de restricción mesofílica. Por lo tanto, se inactiva térmicamente durante el proceso de calentamiento del complejo diana de la sonda hibridada a aproximadamente 60 °C para la etapa de ligamiento. Por lo tanto, este enfoque no es adecuado para múltiples ciclos de ligamiento. Por otra parte, Por otro lado, el uso de una enzima de restricción mesofílica elimina la necesidad de modificar la sonda cadena arriba en el extremo 3' para que el producto de ligamiento sea resistente al nuevo corte. La otra diferencia es que BstUI proporciona una escisión roma de la diana sin metilar, mientras que HinP1I dejaba un saliente en el extremo 5' de 2 bases. Sin embargo, la ligasa termoestable no ligará ni el extremo roma ni el saliente de dos bases.

Las Figuras 8A-8H son similares a las Figuras 6A-6H, excepto por el uso de la enzima de restricción HinP1I. De nuevo, dado que la enzima es mesofílica, se inactiva durante la etapa de calentamiento de la reacción para condiciones óptimas de ligamiento.

En los dos ejemplos ilustrados en el presente documento, la sonda cadena abajo contiene un sitio de restricción que está cortado para liberar un extremo 5' competente para la ligamiento. Sin embargo, las sondas también se podrían diseñar para que un sitio de restricción escindible estuviera en el extremo 3' (que está bloqueado o no coincide), liberando un 3'-OH libre competente para ligamiento. Por último, se reconoce que ambas sondas pueden ser incompetentes para ligamiento, y los grupos reactivos se liberan secuencialmente usando la misma enzima en el ADN genómico metilado.

Descripción general del tercer enfoque: Reacción de digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-ligamiento: Este enfoque depende de la actividad de tres enzimas: (i) la actividad de restricción de HinP1I, (ii) la actividad de extensión de la polimerasa y (iii) la actividad de sellado de la ligasa. El ADN genómico aislado, o ADN enriquecido con metilo se trata con la enzima sensible a metilo HinP1I. La hibridación de dos sondas a una diana que contiene la secuencia HinP1I metilada adyacente (es decir, 5' GC*GC 3') permite la escisión de la horquilla en 3' de la primera sonda y la aleta en 5' de la segunda sonda por HinP1I. El 3'OH liberado del cebador cadena arriba se extiende con la polimerasa que carece de actividad de actividad de 5'-3' nucleasa o de desplazamiento de hebra, seguido por ligamiento al cebador cadena abajo con ligasa. Las sondas sin ligar forman horquillas mediante hibridación entre regiones complementarias, y se extienden mediante polimerasa para bloquear la unión de, y la posterior extensión o amplificación por, los cebadores secundarios.

Al insistir en que la endonucleasa de restricción genere tanto el fosfato 3'OH como en el extremo 5', esto evita una señal falsa y también debería eliminar cualquier señal de ligamiento no específica. Por lo tanto, cualquier fragmento raro de ADN genómico que fuera monocatenario después de la purificación, o que no se hubiera escindido no formará un sustrato productivo para posteriores amplificaciones por PCR, ya que el producto tiene secuencias no genómicas en ambos lados.

Para resumir los niveles de discriminación del enfoque mencionado anteriormente para detección de metilación de baja abundancia (véanse las Figuras 9A-9F):

1. Uso de enzimas de restricción HinP1I sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
2. Uso de enzimas de restricción HinP1I sensibles a la metilación para cortar la diana bicatenaria en ambas sondas cadena arriba y cadena abajo cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
3. Uso de fidelidad de ligamiento en 3' de ligasa termoestable en la sonda cadena arriba.
4. Reutilización de enzimas de restricción HinP1I sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
5. Uso de secuencias en el extremo 3' de la sonda cadena arriba y en el extremo 5' de la sonda cadena abajo, de modo que cuando no se escinden, formen horquillas a menor temperatura y se extiendan sobre sí mismas para

formar productos que no se amplifican.

Una ventaja de este enfoque es que si a la diana le falta cualquiera del sitio HinPII o como alternativa cualquiera está sin metilar, la sonda cadena arriba no se cortará, evitando que la polimerasa extienda el 3' OH liberado, o la sonda cadena abajo no se cortará, de modo que el 5' fosfato no se desenmascara, por lo tanto no se produce ligamiento, y en consecuencia no se puede producir una amplificación falsa.

También se presenta un enfoque alternativo (véase a continuación), usando sondas acopladas cadena arriba y cadena abajo coincidentes acopladas.

Hay que tener en cuenta dos variaciones. En la primera variación, (que se muestra en las Figuras 10A-10F), las sondas acopladas se diseñan para formar horquillas a menor temperatura y se extienden sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

Para resumir los niveles de discriminación de la primera variación usando cebadores acoplados para detección de cada sitio metilado HinPII:

1. Uso de enzimas de restricción HinP1I sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
2. Uso de enzimas de restricción HinP1I sensibles a la metilación para cortar la diana bicatenaria en ambas sondas cadena arriba y cadena abajo cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
3. Uso de fidelidad de ligamiento en 3' de ligasa termoestable en la sonda cadena arriba.
4. Reutilización de enzimas de restricción HinPII sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
5. Uso de concentraciones menores de sonda para minimizar los sucesos independientes de la diana.
6. Uso de secuencias en las sondas acopladas, de modo que cuando no se ligan, forman horquillas a menor temperatura y se extienden sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

En la segunda variación (Figuras 10G-10J), las sondas acopladas se ligan para formar un círculo cerrado en la diana, y los cebadores acoplados sin ligar (si como el ADN molde de entrada) se eliminan mediante digestión con exonucleasa.

Para resumir los niveles de discriminación de la segunda variación usando cebadores acoplados para detección de cada sitio metilado HinPII:

1. Uso de enzimas de restricción HinP1I sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
2. Uso de enzimas de restricción HinP1I sensibles a la metilación para cortar la diana bicatenaria en ambas sondas cadena arriba y cadena abajo cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
3. Uso de fidelidad de ligamiento en 3' de ligasa termoestable en la sonda cadena arriba.
4. Reutilización de enzimas de restricción HinPII sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
5. Uso de concentraciones menores de sonda para minimizar los sucesos independientes de la diana.
6. Uso de exonucleasas para destruir sondas sin ligar y diana.

Como control para la cantidad total de ADN presente (véanse las Figuras 11A-11F), se puede elegir una región diana cercana que esté metilada en el ADN normal del plasma o suero, y/o en un gen grabado en el que al menos un cromosoma siempre está metilado. La sonda oligonucleotídica cadena arriba que está ligada a la sonda cadena abajo es una mezcla de dos oligos: (i) Un oligonucleótido presente en 1 de 100 con la secuencia específica UniTaq correcta, y (ii) un oligonucleótido presente en 99 de 100 con una secuencia que no contiene la secuencia específica UniTaq correcta y que opcionalmente tiene aproximadamente 6-10 bases complementarias a su extremo 3'. El producto de ligamiento que contiene las secuencias UniTaq se amplifica y dará una señal equivalente en 1 de 100 del molde original. La mayor parte del producto de ligamiento carece de la secuencia universal en el extremo 5', y no se amplifica exponencialmente. La sonda cadena arriba sin ligar formará una horquilla sobre sí misma, y extenderá su propia secuencia en el extremo 3' sobre sí misma, sacándola de la competencia por formar parte de otro amplicón de PCR.

Como control para la cantidad total de ADN presente, este enfoque también se puede usar con sondas acopladas, de nuevo en una región diana como se ha descrito anteriormente. Se usa una mezcla de dos oligonucleótidos: (i) Un oligonucleótido presente en 1 de 100 con la secuencia UniTaq y/u otra secuencia de marcado correctas, y (ii) un oligonucleótido presente en 99 de 100 con una secuencia que carece o que tiene secuencias de marcado incorrectas. El producto de ligamiento que contiene las secuencias UniTaq y/o de marcado se amplifica y dará una señal equivalente en 1 de 100 del molde original. La mayor parte del producto de ligamiento carece o tiene secuencias de marcado incorrectas, y no se amplifica exponencialmente.

Protocolo detallado para detección de alta sensibilidad de marcador de metilación (cuando está presente de

un 1 % a un 0,01 %):

Etapa Opcional 1: Escindir ADN genómico aislado, o ADN enriquecido con metilo con la enzima sensible a metilo HinP1I. Preferentemente, para determinar el estado de metilación se eligen dos o tres sitios por promotor. Esta etapa también podría destruir cualquier amplicón de PCR de contaminación residual (que podría estar sin metilar).

Etapa 2: Desnaturalizar ADN genómico del plasma (94 °C 1 minuto) en presencia de sondas de LDR cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', seguido por UniTaq Ai, seguido por secuencia específica de diana, la secuencia HinP1I y una horquilla pequeña en el extremo 3'), sondas de LDR cadena abajo (5' de saliente extra de 20 bases, en el que 6-10 bases son complementarias con el extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', la secuencia HinP1I, seguido por secuencia específica de diana -- UniTaq Bi' -- Cebador Univ. U2') y permite que las sondas se hibriden con la diana. Añadir HinP1I, polimerasa termoestable con los dNTP que carece preferentemente de actividad de 5'-3' exonucleasa o de desplazamiento de hebra y ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). Después de escisión con HinP1I a 37 °C, aumentar la temperatura para desnaturalizar la endonucleasa mientras que se permite que la polimerasa se extienda y la ligasa selle covalentemente los dos extremos libres.

Etapa 3: Añadir Cebador Universal U1, Cebador Universal U2, y Taq Polimerasa opcional. Incubar a 55 °C para permitir que ambas sondas cadena arriba y cadena abajo sin ligar formen una autohorquilla con las 6-10 bases que son complementarias con el extremo 3', que se extiende para crear horquillas más largas que hacen que estas sondas cadena abajo sean resistentes a una mayor amplificación. A continuación permitir que la amplificación por PCR evolucione durante 8-20 ciclos. En una variación, las colas de cebador universal U1 y U2 en las sondas de LDR compuestas son ligeramente más cortas que las de los cebadores universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más alta (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales U1 y U2 se unan preferentemente al producto deseado (en comparación con las sondas de LDR compuestas 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 dímeros de cebador. Estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1 - UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - GCGC - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

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

F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba -GCGC - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

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

La detección de metilación de alta sensibilidad se puede llevar a cabo usando matriz Zipcode, Zipcode Taqman o detección Taqman tradicional como se describió anteriormente. Este enfoque podría usar sondas de LDR cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', seguido por Zipcode Zi, seguido por secuencia específica de diana, seguido por la secuencia HinP1I y una horquilla pequeña en el extremo 3'), y sondas de LDR en el extremo 3' (5' de saliente extra de 20 bases, en el que 6-10 bases son complementarias con el extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', la secuencia HinP1I, seguido por secuencia específica de diana -- Cebador Univ. U2'). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1 - Zipcode Zi - Diana Cadena Arriba - GCGC - Diana Cadena Abajo - Cebador Univ. U2'

Para la detección usando matrices universales (Zipcode), el Cebador Univ. U2 podría contener una marca indicadora, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 podría contener un 5' fosfato, y la amplificación podría continuar durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto podría permitir el uso de lambda exonucleasa para digerir la segunda hebra, haciendo que el producto marcado sea monocatenario y adecuado para hibridación en una matriz (Zipcode) universal.

La detección de metilación de alta sensibilidad se puede llevar a cabo usando secuencias Zipcode de separación como se describió anteriormente. Este enfoque podría usar sondas de LDR cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', una primera mitad de secuencia Zipcode Zi.1 y una secuencia corta Ti, seguido por secuencia específica de diana, seguido por la secuencia HinP1I y una horquilla pequeña en el extremo 3'), y cebadores de LDR cadena abajo (5' de saliente extra de 20 bases, en el que 6-10 bases son complementarias con el extremo 3' de la secuencia del Cebador Univ. U2', seguido por la secuencia HinP1I, seguido por secuencia específica de diana - el complemento de la secuencia corta Ti', una segunda mitad de secuencia Zipcode Zi.2 - Cebador Univ. U2'). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1- 1^a ½ Zipcode Zi.1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - GCGC -Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2^a ½ Zipcode Zi.2 -Cebador Univ. U2'

Cuando la Ti Corta se hibrida de manera transitoria con la Ti' Corta, la secuencia 1ª ½ Zipcode Zi.1 se acerca a la 2ª ½ Zipcode Zi.2, y la hibridación transitoria se puede estabilizar cuando se hibridan ambas mitades de secuencia Zipcode Zi con la secuencia Zipcode Zi' de longitud completa en una matriz Zipcode.

Además, las construcciones que se han mencionado anteriormente pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) interna a los cebadores Universales (Unique Ai, Unique Bi), representado como sigue a continuación.
Cebador Univ. U1 - Unique Ai - 1ª ½ Zipcode Zi.1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - GCGC - Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2ª ½ Zipcode Zi.2 - Unique Bi - Cebador Univ. U2'

Para la detección usando ensayos Zipcode Taqman, 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 solapan con las secuencias Unique Ai y Unique Bi para cada producto. La sonda Taqman podría ser para la secuencia Zipcode 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 próxima generación.

Protocolo detallado para detección de alta sensibilidad de marcador de metilación (cuando está presente de un 1 % a un 0,01 %):

Un enfoque alternativo es el uso de sondas de LDR que se acoplan entre sí mediante sus extremos de no ligamiento. Esto permite el uso de concentraciones de cebador más bajas. Además, proporciona una forma sencilla de eliminar ambas sondas sin ligar cadena arriba y cadena debajo de reacciones posteriores al ligamiento.

Etapa Opcional 1: Escindir ADN genómico aislado, o ADN enriquecido con metilo con la enzima sensible a metilo HinP1I. Preferentemente, para determinar el estado de metilación se eligen dos o tres sitios por promotor. Esta etapa también podría destruir cualquier amplicón de PCR de contaminación residual (que podría estar sin metilar).

Etapa 2: Desnaturalizar ADN genómico del plasma (94 °C 1 minuto) en presencia de sondas acopladas, que comprende las partes de sonda de LDR cadena arriba (Cebador Univ. U1 en el extremo 5' -- UniTaq Ai, seguido por secuencia específica de diana, la secuencia HinP1I, seguido por una o más bases que no tienen coincidencia con la diana en el extremo 3'), acoplada a las partes de la sonda de LDR cadena abajo (región en el extremo 5' que contiene la secuencia HinP1I, seguido por secuencia específica de diana -- UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2' - y secuencia de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' libre de la parte de la secuencia del cebador cadena arriba sin escindir, y opcionalmente secuencia específica de diana de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' liberado después de la escisión con HinP1I), y permitir que las sondas se hibriden con la diana. La sonda anterior se puede volver a escribir como (región en el extremo 5' que contiene la secuencia HinP1I, seguido por secuencia específica de diana cadena abajo -- UniTaq Bi' -- Cebador Univ. U2' - y secuencia de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' libre de la parte de la secuencia del cebador cadena arriba sin escindir, y opcionalmente secuencia específica de diana de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' liberado después de la escisión con HinP1I, seguido por un espaciador opcional, acoplado a Cebador Univ. U1 -- UniTaq Ai, seguido por secuencia específica de diana cadena arriba, la secuencia HinP1I, seguido por una o más bases que no tienen coincidencia con la diana en el extremo 3'). Añadir HinP1I, dNTPs, polimerasa termoestable que carece preferentemente de actividad de 5'-3' exonucleasa o de desplazamiento de hebra, y la ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D). Después de la escisión con HinP1I a 37 °C, aumentar la temperatura para desnaturalizar la endonucleasa mientras que se permite que la polimerasa se extienda y la ligasa selle covalentemente los dos extremos libres. En esta variación, la sonda acoplada puede contener bases adicionales o simplemente espaciador, y puede contener opcionalmente una región que la polimerasa no copia.

Etapa 3: Añadir Cebador Universal U1, Cebador Universal U2, y Taq Polimerasa opcional. Incubar a 55 °C para permitir que las sondas acopladas cadena abajo sin ligar formen autohorquilla con las 6-10 bases que son complementarias con el extremo 3', que se extiende para crear horquillas más largas que hacen que estas sondas acopladas sean resistentes a una amplificación adicional. Permitir que la amplificación por PCR se produzca durante 8-20 ciclos. En una variación, las colas de cebador universal U1 y U2 en las sondas de LDR compuestas son ligeramente más cortas que las de los cebadores universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más alta (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales U1 y U2 se unan preferentemente al producto deseado (en comparación con las sondas de LDR compuestas 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 dímeros de cebador. Estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1 - UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - GCGC - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

Etapa 4: Abrir el tubo, diluir de 10 a 100 veces y distribuir las alícuotas a pocillos Taqman, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos UniTaq del formato F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva con Inactivador Q). En estas

condiciones, se formará el siguiente producto:

F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - GCGC - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

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

10 En una variación de lo mencionado anteriormente, las partes coincidentes del cebador de LDR cadena abajo, es decir, la base G en el extremo 5' o aleta que contiene la misma base G seguido por secuencia específica de diana -- UniTaq Bi' - no incluyen 6-10 bases de la secuencia específica diana complementaria con el extremo 3' libre de la parte de la secuencia de cebador cadena arriba. Este cebador se puede volver a escribir como región en (5' Que contiene la secuencia HinPII, seguido por secuencia específica de diana cadena abajo -- UniTaq Bi' -- Cebador Univ. U2', seguido por una base escindible opcional, acoplada a Cebador Univ. U1 -- UniTaq Ai, seguido por secuencia

15 específica de diana cadena arriba, la secuencia HinPII, seguido por una o más bases que no se emparejan con la diana en el extremo 3'). En esta versión, la región de conexión contiene una secuencia interna que no inhibe la digestión con exonucleasa, pero que se puede escindir después de una etapa de digestión con exonucleasa, y antes de una etapa de amplificación con polimerasa. Un ejemplo de una secuencia de ese tipo es el uso de una base uracilo, que posteriormente se puede prescindir con uracil ADN glicosilasa. En este ejemplo, después de la etapa de

20 ligamiento, tanto la Exonucleasa I como la Exonucleasa III se añaden para digerir todas las sondas acopladas sin ligar, así como todo el ADN diana de entrada. Después de destruir las exonucleasas con calor, la uracil ADN glicosilasa se añade para linealizar los cebadores ligados para amplificación posterior por PCR.

25 En ambas variaciones mencionadas anteriormente, las sondas acopladas se pueden sintetizar sin una de las secuencias o ambas secuencias de Cebador Univ. U1 y/o Cebador Univ. U2', o partes de las mismas, siendo necesario de ese modo uno o dos cebadores usados como puente (Cebador Universal U1-UniTaq Ai y Cebador Universal U2-UniTaq Bi) durante la etapa de amplificación por PCR universal.

30 En ambas variaciones mencionadas anteriormente, las sondas acopladas se pueden sintetizar sin (i) un espaciador que la polimerasa no copia, o sin (ii) una secuencia interna que no inhibe la digestión con exonucleasa, pero que se puede escindir en una etapa posterior. Estas modificaciones diseñan para linealizar el producto de ligamiento circular inicial y/o para evitar que la polimerasa que contiene actividad de 5'→3' exonucleasa destruya su propio producto de extensión cuando se amplifica por PCR usando el cebador universal U2, o el conjunto de cebadores oligonucleotídicos secundarios que se hibridan con las sondas oligonucleotídicas acopladas primarias (o complementos de las mismas). El problema también se puede resolver usando, cuando sea posible, una polimerasa que carece de actividad de 5'-3' exonucleasa durante la etapa de amplificación del cebador universal inicial, o usando cebadores oligonucleotídicos secundarios complementarios con el producto de ligamiento circular que contienen modificaciones en el extremo 5' para hacerlos resistentes a la actividad de 5'→3' exonucleasa de la polimerasa. Las modificaciones de ese tipo en el extremo 5' incluyen el uso de tiofosfato en la unión de la cadena principal y/o el uso de análogos de 2'-O-metil nucleótidos.

35

40

45 La detección de metilación de alta sensibilidad se puede llevar a cabo usando matriz Zipcode, Zipcode Taqman o detección Taqman tradicional como se describió anteriormente. Este enfoque podría usar sondas de LDR cadena arriba (Zipcode Zi en el extremo 5', seguido por secuencia específica de diana con bases C*G en el extremo 3'), acopladas con las sondas de LDR cadena abajo coincidentes (región en el extremo 5' que contiene la secuencia BstUI, seguido por secuencia específica de diana -- Cebador Univ. U2' -- y secuencia específica de diana de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' libre de la secuencia del cebador cadena arriba). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

50 Cebador Univ. U1- Zipcode Zi - Diana Cadena Arriba - GCGC - Diana Cadena Abajo - Cebador Univ. U2'

55 Para la detección usando matrices universales (Zipcode), el Cebador Univ. U2 podría contener una marca indicadora, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 podría contener un 5' fosfato, y la amplificación podría continuar durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto podría permitir el uso de lambda exonucleasa para digerir la segunda hebra, haciendo que el producto marcado sea monocatenario y adecuado para hibridación en una matriz (Zipcode) universal.

60 La detección de metilación de alta sensibilidad se puede llevar a cabo usando secuencias Zipcode de separación como se describió anteriormente. Este enfoque podría usar sondas de LDR cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', una primera mitad de secuencia Zipcode Zi.1 y una secuencia corta Ti, seguido por secuencia específica de diana con bases C*G en el extremo 3'), acopladas con la sonda de LDR cadena abajo coincidente (región en el extremo 5' que contiene la secuencia BstUI, seguido por secuencia específica de diana -- el complemento de la secuencia corta Ti', una segunda mitad de secuencia Zipcode Zi.2 - Cebador Univ. U2'-y secuencia específica de diana de 6-10 bases complementaria con el extremo 3' libre de la secuencia del cebador cadena arriba). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

65 Cebador Univ. U1- 1ª ½ Zipcode Zi. 1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - GCGC -Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2ª ½ Zipcode Zi.2 - Cebador Univ. U2'

5 Cuando la Ti Corta se hibrida de manera transitoria con la Ti' Corta, la secuencia 1ª ½ Zipcode Zi.1 se pone cerca de la 2ª ½ Zipcode Zi.2, y la hibridación transitoria se puede estabilizar cuando se hibridan ambas mitades de secuencia Zipcode Zi con la secuencia Zipcode Zi' de longitud completa en una matriz Zipcode.

Además, las construcciones que se han mencionado anteriormente pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) interna a los cebadores Universales (Unique Ai, Unique Bi), representado como sigue a continuación. Cebador Univ. U1- Unique Ai - 1ª ½ Zipcode Zi.1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - GCGC - Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2ª ½ Zipcode Zi.2 - Unique Bi - Cebador Univ. U2'

10 Para la detección usando ensayos de Zipcode Taqman, 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 solapan con las secuencias Unique Ai y Unique Bi para cada producto. La sonda Taqman podría ser para la secuencia Zipcode de longitud completa.

15 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 próxima generación.

20 **Descripción general: Digestión con enzima de restricción sensible a la metilación-extensión.** Este enfoque depende de la actividad de dos enzimas: (i) la actividad de restricción de HinP1I, y (ii) la actividad de extensión de la polimerasa. El ADN genómico aislado, o ADN enriquecido con metilo se trata con la enzima sensible a metilo HinP1I. La hibridación de dos sondas a una diana que contiene la secuencia HinP1I metilada adyacente (es decir, 5' GC*GC 3') permite la escisión de la horquilla en 3' tanto de la primera como de la segunda sondas con HinP1I. El 3'OH liberado de la sonda cadena arriba se extiende con polimerasa, opcionalmente con cualquiera de actividad de 5'-3' nucleasa o de desplazamiento de hebra. Las sondas sin escindir forman horquillas y se extienden con polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, los cebadores secundarios.

25 Al insistir en que la endonucleasa de restricción genere la primera sonda en el extremo 3'OH, esto evita una señal falsa. Por lo tanto, cualquier fragmento raro de ADN genómico que fuera monocatenario después de la purificación o que no se hubiera escindido no formará un sustrato productivo para posteriores amplificaciones por PCR, ya que el producto tiene secuencias no genómicas en ambos lados.

30 Para resumir los niveles de discriminación del enfoque mencionado anteriormente para detección de metilación de baja abundancia (véanse las Figuras 18A-18G):

- 35 1. Uso de enzimas de restricción HinP1I sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
2. Uso de enzimas de restricción HinP1I sensibles a la metilación para cortar la diana bicatenaria en la sonda tanto cadena arriba como cadena abajo cuando el ADN genómico original estaba metilado.
- 40 3. Uso de actividad de extensión en el extremo 3' de la polimerasa.
4. Reutilización de enzimas de restricción HinP1I sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando el ADN genómico original no estaba metilado.
- 45 5. Uso de secuencias en el extremo 3' de las sondas cadena arriba y cadena abajo, de modo que cuando no se escinden, formen horquillas a menor temperatura y se extiendan sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.

50 Una ventaja de este enfoque es que si a la diana le falta cualquiera del sitio HinP1I o como alternativa cualquiera está sin metilar, la sonda cadena arriba no se cortará, evitando que la polimerasa extienda el 3' OH liberado, y en consecuencia no puede tener lugar una falsa amplificación.

55 Realmente el diseño actual solo depende del corte de la sonda cadena arriba. Funcionará con un solo sitio HinP1I metilado en el ADN genómico original. También funcionará con más de un sitio HinP1I metilado en el ADN genómico original, sin embargo, no podrá distinguir si hubo una mutación en el sitio HinP1I cadena abajo, lo que hace que sea resistente a la escisión (pero sin metilar).

60 Otras variaciones podrían limitar la amplificación si las secuencias cadena abajo contienen mutaciones. Por ejemplo, cuando se usa polimerasa que carece de la actividad de 5' nucleasa - 3', el diseño del fragmento en el extremo 3' de la sonda cadena arriba y ambos fragmentos en el extremo 3' y 5' de la sonda cadena abajo de manera que se desnaturalicen fácilmente de la diana después de la escisión por HinP1I permitirá que la polimerasa se extienda en un solo ciclo. Debe ser lo suficientemente rápido como para evitar la inhibición por una segunda hibridación de sonda cadena abajo. Sin embargo, este enfoque solo podría cambiar el rendimiento inicial del producto, ya que opcionalmente Los productos de ese tipo se podrían amplificar cuando incluso la sonda cadena abajo de longitud completa se desnaturalizara durante las etapas de ciclado por PCR.

65 Como control para la cantidad total de ADN presente (véanse las Figuras 19A-19G), se puede elegir una región diana cercana que esté metilada en el ADN normal del plasma o suero, y/o en un gen grabado en el que al menos

un cromosoma siempre está metilado. La sonda oligonucleotídica cadena arriba es una mezcla de dos oligos: (i) Un oligonucleótido presente en 1 de 100 con la secuencia específica UniTaq correcta, y (ii) un oligonucleótido presente en 99 de 100 con una secuencia que no contiene la secuencia específica UniTaq correcta y que opcionalmente tiene aproximadamente 6-10 bases complementarias a su extremo 3'. El producto de extensión que contiene las secuencias UniTaq se amplifica y dará una señal equivalente en 1 de 100 del molde original. La mayor parte del producto de extensión carece de la secuencia universal en el extremo 5', y no se amplifica exponencialmente. Las sondas sin escindir tienen horquilla en el extremo 3' que se extiende a su propia secuencia en el extremo 3' sobre sí misma, sacándola de la competencia por formar parte de otro amplicón de PCR.

Como control para la cantidad total de ADN presente, este enfoque también se puede usar con sondas acopladas, de nuevo en una región diana como se ha descrito anteriormente. Se usa una mezcla de dos oligonucleótidos: (i) Un oligonucleótido presente en 1 de 100 con la secuencia UniTaq y/u otra secuencia de marcado correctas, y (ii) un oligonucleótido presente en 99 de 100 con una secuencia que carece o que tiene secuencias de marcado incorrectas. El producto de extensión que contiene las secuencias UniTaq y/o de marcado se amplifica y dará una señal equivalente en 1 de 100 del molde original. La mayor parte del producto de ligamiento carece o tiene secuencias de marcado incorrectas, y no se amplifica exponencialmente.

Protocolo detallado para detección de alta sensibilidad de marcador de metilación (cuando está presente de un 1 % a un 0,01 %):

Etapa Opcional 1: Escindir ADN genómico aislado, o ADN enriquecido con metilo con la enzima sensible a metilo HinP1I. Preferentemente, para determinar el estado de metilación se eligen dos o tres sitios por promotor. Esta etapa también podría destruir cualquier amplicón de PCR de contaminación residual (que podría estar sin metilar)

Etapa 2: Desnaturalizar ADN genómico del plasma (94 °C 1 minuto) en presencia de son la cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', seguido por UniTaq Ai, seguido por secuencia específica de diana, la secuencia HinP1I y una horquilla pequeña en el extremo 3'), sondas cadena abajo (secuencia específica de diana, la secuencia HinP1I y una horquilla pequeña en el extremo 3') y permiten que las sondas se hibriden con la diana.

Etapa 3: Añadir cebador de PCR cadena abajo (Cebador Universal U2 en el extremo 5', seguido por UniTaq Bi, seguido por secuencia específica de diana), Cebador Universal U1, y Cebador Universal U2, HinP1I, dNTPs de inicio en caliente, polimerasa termoestable que tiene opcionalmente actividad de 5'-3' exonucleasa o de desplazamiento de hebra. Después de la escisión con HinP1I a 37 °C, aumentar la temperatura a 55 °C para desnaturalizar la endonucleasa, activar los dNTPs mientras que se permite que la polimerasa se extienda.

Continuar la incubación a 55 °C para permitir que las sondas tanto cadena arriba como cadena abajo sin escindir formen una autohorquilla, que se extiende para crear horquillas más largas que hacen que estas sondas sean resistentes a una amplificación adicional. Permitir que la amplificación por PCR se produzca durante 8-20 ciclos. En una variación, las colas de cebador universal U1 y U2 en las sondas son ligeramente más cortas que las de los cebadores universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclado más baja (es decir, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclado más alta (es decir, hibridación a 65 °C) de modo que los cebadores universales U1 y U2 se unan preferentemente al producto deseado. Además, los cebadores universales U1 y U2 contienen una secuencia corta en común (es decir, 6-10 bases) para evitar la formación de dímeros de cebador. En una variación opcional para minimizar amplificaciones independientes de diana, los cebadores de PCR cadena abajo contienen una base susceptible y con extremo 3' bloqueado, que se libera con una enzima que escinde la base susceptible cuando el cebador se hibrida con 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 11: 80 (2011)). Estas condiciones amplifican productos de la secuencia:

Cebador Univ. U1 - UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - GCGC - Diana Central - GCGC - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

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

F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana Cadena Arriba - GCGC - Diana Central - GCGC - Diana Cadena Abajo - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'

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

La detección de metilación de alta sensibilidad se puede llevar a cabo usando matriz Zipcode, Zipcode Taqman o detección Taqman tradicional como se describió anteriormente. Este enfoque podría usar cebadores de PCR cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', seguido por Zipcode Zi, seguido por secuencia específica de diana, seguido por la secuencia HinP1I y una horquilla pequeña en el extremo 3'), y cebadores de PCR cadena abajo (Cebador Univ. U2 en el extremo 5', seguido por secuencia específica de diana). Después de amplificación por PCR universal, estas

condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

Cebador Univ. U1 - Zipcode Zi - Diana Cadena Arriba - GCGC – Diana Central - GCGC - Diana Cadena Abajo - Cebador Univ. U2'

5 Para la detección usando matrices universales (Zipcode), el Cebador Univ. U2 podría contener una marca indicadora, es decir, un grupo fluorescente, mientras que el Cebador Univ. U1 podría contener un 5' fosfato, y la amplificación podría continuar durante un total de aproximadamente 30 a 40 ciclos. Esto podría permitir el uso de lambda exonucleasa para digerir la segunda hebra, haciendo que el producto marcado sea monocatenario y adecuado para hibridación en una matriz (Zipcode) universal.

10 La detección de metilación de alta sensibilidad se puede llevar a cabo usando secuencias Zipcode de separación como se describió anteriormente.

15 Este enfoque podría usar cebadores de PCR cadena arriba (Cebador Universal U1 en 5', una primera mitad de secuencia Zipcode Zi.1 y una secuencia corta Ti, seguido por secuencia específica de diana, seguido por la secuencia HinPII y una horquilla pequeña en el extremo 3'), y cebadores de PCR cadena abajo (Cebador Univ. U2 en el extremo 5', (el complemento de) una segunda mitad de secuencia Zipcode Zi.2, la secuencia corta Ti', seguido por secuencia cadena abajo específica de diana). Después de amplificación por PCR universal, estas condiciones amplifican fragmentos de la secuencia:

20 Cebador Univ. U1- 1^a ½ Zipcode Zi. 1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - GCGC - Diana Central - GCGC - Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2^a ½ Zipcode Zi.2 -Cebador Univ. U2'

25 Cuando la Ti Corta se hibrida de manera transitoria con la Ti' Corta, la secuencia 1^a ½ Zipcode Zi.1 se acerca a la 2^a ½ Zipcode Zi.2, y la hibridación transitoria se puede estabilizar cuando se hibridan ambas mitades de secuencia Zipcode Zi con la secuencia Zipcode Zi' de longitud completa en una matriz Zipcode.

30 Además, las construcciones que se han mencionado anteriormente pueden incluir una secuencia única (que varía de 0 a 10 bases) interna a los cebadores Universales (Unique Ai, Unique Bi), representado como sigue a continuación. Cebador Univ. U1 - Unique Ai - 1^a ½ Zipcode Zi.1 - Ti Corta - Diana Cadena Arriba - GCGC - Diana Central - GCGC - Diana Cadena Abajo - Ti' Corta - 2^a ½ Zipcode Zi.2 - Unique Bi - Cebador Univ. U2'

35 Para la detección usando ensayos Zipcode Taqman, 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 solapan con las secuencias Unique Ai y Unique Bi para cada producto. La sonda Taqman podría ser para la secuencia Zipcode 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 próxima generación.

40 El protocolo anterior también se puede usar para detectar sitios BstUI hemimetilados como se ilustra en las Figuras 20A-20G.

45 En estas condiciones, la enzima BstUI podría no inactivarse por calor incubando a 65 °C o incluso a 80 °C, y en consecuencia las condiciones que inactivan BstUI por calor (95 °C) también podrían desnaturalizar los cebadores escindidos antes de la extensión.

50 Para evitar esta dificultad potencial, se pueden utilizar dNTP que, cuando se incorporan al ADN generado mediante extensión de polimerasa, hacen que el sitio inicial BstUI sea resistente a la escisión. Estos incluyen la incorporación de 5-metil-dCTP, o el uso de dCTP que contiene un tiofosfato en la posición alfa. Cualquiera de estos nucleótidos modificados inhibe la escisión de BstUI del producto extendido, o los cebadores horquillados extendidos.

55 En la variación opcional para minimizar las amplificaciones independientes de diana, los cebadores de PCR que contienen secuencia específica de diana cadena abajo contienen la secuencia BstUI sin metilar susceptible y un extremo 3' bloqueado, que es liberado por BstUI cuando el cebador se hibrida con la diana que contiene el tiofosfato extendido (permitiendo el corte de la hebra del cebador, pero no la copia extendida de la hebra diana).

60 Para cada región promotora, habrá una, dos o tres posiciones de interrogación, de modo que cuando aparezca la señal (el valor de Ct indica la cantidad relativa de secuencia metilada o sin metilar), así como la intensidad de la señal total (es decir = 1, 2, o 3 sitios metilados o sin metilar para ese promotor). Para ampliar este concepto un poco más, la reacción UniTaq proporciona dos tipos de señal, el valor de Ct y el punto final, o la intensidad de la señal total. Durante la etapa de amplificación universal, el Cebador Universal U2 se usa en todos los amplicones, y debería estar en exceso, mientras que cada cebador específico UniTaq F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai se puede usar para proporcionar una potencia de señal específica. Por ejemplo, considerar que la escala es de 1.000 UF (unidades de fluorescencia). Al valorar los cebadores marcados con fluorescencia (F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai) y sin marcar (UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai) de la misma secuencia, la intensidad de la señal final se puede calibrar para un nivel particular, por ejemplo, 100 UF. Considerar los 3 puntos siguientes, metilación del promotor génico, control de

cuantificación de ADN y controles de ADN sin metilar, con un instrumento que puede detectar 5 señales fluorescentes, F1, F2, F3, F4 y F5 respectivamente. Los productos potenciales podrían ser:
Generación del promotor del gen 1

5 **Metilación del 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'

10

Metilación del 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'

15

Metilación del 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'

20

Control de Cuantificación de ADN (1:100)

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

25

Control de ADN sin metilar

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

30

(Los productos sin marcadores fluorescentes no se muestran para mayor claridad. Para cada producto fluorescente, en la siguiente ronda de amplificación, el grupo fluorescente se separa para crear señal).

En este ejemplo, un promotor se considera metilado si las señales 2/3 o 3/3 son positivas. Considerar los siguientes resultados después de 45 ciclos:

35

F1, Ct = 31,5, UF final = 220
F2, Ct = 38,5, UF final = 90
F3, Ct > 45
F4, Ct = 28,5, UF final = 110 F5,
Ct > 45

40

El resultado anterior sugiere que el Promotor del Gen 1 (señal F1) está totalmente 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 podría ser coherente con el ADNcf derivado de un tumor. El Promotor del Gen 2 (F2), por otro lado, dio alguna señal, sugiriendo 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 interrogados en la muestra de plasma y, por lo tanto, lo más probable es que represente metilación estocástica debido al envejecimiento. El Promotor del Gen 3 y los controles sin metilar no dieron señal.

45

50

Ejemplo Profético 2 - Cuantificación precisa de ARNm específico de tumor aislado de exosomas o células tumorales circulantes

Véanse el primer y segundo enfoques mencionados anteriormente. Cuando se aísla ADN de células tumorales circulantes, la cantidad total puede ser bastante baja. Por lo tanto, puede ser prudente usar más de un conjunto de sondas de LDR para una región de metilación del promotor dado, y tener la lectura en PCR digital. Continuar con las Etapas 1-3 como se ha descrito anteriormente para el primer enfoque, a continuación:

55

Etapa 4: Abrir el tubo, diluir de 10 a 100 veces y distribuir alícuotas a los pocillos para PCR digital, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador Universal U2 y cebadores específicos UniTaq del formato F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva con Inactivador Q). Cada pocillo contiene un conjunto de productos de ligamiento para una región promotora dada, así como para una región de control. En estas condiciones, se formará el siguiente producto, después de la PCR digital:

60

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

65

5 Esto formará una horquilla de modo que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el Cebador Universal U2 se une a la secuencia del Cebador Univ. U2', la actividad de 5'→3' exonucleasa de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente de F1. Las gotitas totales con señal fluorescente para la región diana se comparan con las gotitas totales con señal fluorescente para la región de control para determinar los niveles relativos de metilación.

Ejemplo Profético 3 - Aneuploidía mediante recuento del número de copias de metilación del promotor específico fetal (por ejemplo, Trisomía 21)

10 Descripción general: El trabajo reciente ha demostrado que el ADN fetal como porcentaje del ADN materno en el plasma es de aproximadamente un 6 %, un 20 % y un 26 % en el 1^{er}, 2^o y 3^{er} trimestres respectivamente. Debido a cómo se degrada el ADN, el ADN materno generalmente tiene aproximadamente 160 bases y todavía está asociado con la histona H1, mientras que el ADN fetal tiene aproximadamente 140 bases y no está asociado con la histona. Dependiendo de la necesidad clínica, y cuando el conocimiento proporcione la mejor atención, se pueden desarrollar ensayos con suficiente sensibilidad para detectar el ADN fetal en el trimestre apropiado.

15 Véase el primer enfoque como se describe en el Ejemplo Profético 1 así como en el Ejemplo Profético 2. Dado el requisito de distinguir la metilación del promotor específico fetal que aumenta de aproximadamente un 6 % del ADN cuando el cromosoma 21 fetal es diploide en un 9 % del ADN cuando el cromosoma 21 fetal es triploide (bajo la suposición de que el ADN materno en esos promotores está sin metilar), probablemente sería más prudente usar PCR digital en la última etapa.

REIVINDICACIONES

1. 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 en uno o más restos metilados, comprendiendo dicho método:

5 proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácido nucleico diana que contienen potencialmente uno o más restos metilados dentro de al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación;
 10 someter la muestra a una digestión con enzima de restricción sensible a la metilación para escindir moléculas de ácido nucleico diana en la muestra que tienen restos sin metilar dentro de la al menos una secuencia de enzima de restricción sensible a la metilación; proporcionar uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas, comprendiendo cada conjunto de sondas (a) una primera sonda oligonucleotídica que tiene una parte específica de diana, y (b) una segunda sonda oligonucleotídica que tiene una parte específica de diana, en donde la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden adyacentes entre sí en la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas, y en donde, en un conjunto de sondas, la parte específica de diana de la segunda sonda oligonucleotídica tiene un nucleótido de solapamiento idéntico en la unión con la primera sonda oligonucleotídica; poner en contacto la muestra y los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas en condiciones eficaces para que la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se hibriden en posiciones adyacentes de una manera específica de la base con su molécula de ácido nucleico diana correspondiente, si estuviera presente en la muestra, en donde después de la hibridación el nucleótido de solapamiento idéntico de la segunda sonda oligonucleotídica forma una aleta en la unión que comprende el nucleótido de solapamiento idéntico;
 25 escindir el nucleótido de solapamiento idéntico de la segunda sonda oligonucleotídica con una enzima que tiene actividad de 5' nucleasa, liberando de ese modo un 5' fosfato en la segunda sonda oligonucleotídica;
 30 ligar la primera y la segunda sondas oligonucleotídicas de los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas juntas en la unión para formar un producto de ligamiento hibridado con su molécula de ácido nucleico diana complementaria, en donde dicho producto de ligamiento y su molécula de ácido nucleico diana hibridada comprenden al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación;
 35 mezclar al menos una enzima de restricción sensible a la metilación con los productos de ligamiento hibridados para formar una mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación;
 40 someter la mezcla de reacción de enzima de restricción sensible a la metilación a condiciones adecuadas para la escisión del producto de ligamiento y su molécula de ácido nucleico diana hibridada si dicha molécula de ácido nucleico diana no contiene uno o más restos metilados dentro de la al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación, en donde dicha escisión no se producirá si dicha molécula de ácido nucleico diana contiene uno o más restos metilados dentro de la al menos una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción sensible a la metilación;
 45 detectar y distinguir productos de ligamiento sin escindir en la muestra; e
 50 identificar 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 basándose en dicha detección.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la primera sonda oligonucleotídica del conjunto de sondas comprende un grupo de bloqueo en 3' eliminable que evita la extensión y/o ligamiento, comprendiendo además dicho método:
 45 eliminar el grupo de bloqueo en 3' de la primera sonda oligonucleotídica usando una enzima de escisión adecuada, en donde dicha eliminación libera un 3' OH en la primera sonda oligonucleotídica adecuado para extensión y/o ligamiento.

3. El método de la reivindicación 1, en donde dicha detección comprende:
 50 secuenciar los productos de ligamiento en la muestra.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la primera sonda oligonucleotídica de un conjunto de sondas comprende además una parte específica de cebador en 5' y la segunda sonda oligonucleotídica en el conjunto de sondas comprende además una parte específica de cebador en 3', en donde cada secuencia de producto ligado comprende la parte específica de cebador en 5', las partes específicas de diana, y la parte específica de cebador en 3'.
 55

5. El método de la reivindicación 4 que comprende además:

60 proporcionar uno o más conjuntos de cebadores oligonucleotídicos, comprendiendo cada conjunto (a) un primer cebador oligonucleotídico que comprende la misma secuencia de nucleótidos que la parte específica de cebador en 5' de la secuencia de producto ligado y (b) un segundo cebador oligonucleotídico que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria con la parte específica de cebador en 3' de la secuencia de producto ligado;
 65 mezclar las secuencias de producto ligado, los uno o más conjuntos de cebadores oligonucleotídicos, y una ADN polimerasa para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa; y
 someter la 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 de extensión primarios, de modo que dicha detección implica la detección de productos de extensión primarios.

5 6. El método de la reivindicación 1, en donde la primera y segunda sondas oligonucleotídicas de los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas comprenden además una primera y segunda partes marcadoras, respectivamente, en donde la primera y segunda partes marcadoras de un conjunto de sondas oligonucleotídicas son complementarias entre sí, y en donde la primera y segunda partes marcadoras para cada conjunto de sondas oligonucleotídicas diferente tienen diferentes secuencias de nucleótidos, comprendiendo además dicho método:

10 someter la muestra, después de dicho ligamiento, a condiciones eficaces para que la primera y segunda partes marcadoras de una secuencia de producto ligado particular se hibriden, formando de ese modo secuencias de producto ligado horquillado; y
eliminar las sondas oligonucleotídicas sin ligar de la muestra después de dicho sometimiento.

15 7. El método de la reivindicación 4 que comprende además:
bloquear las sondas oligonucleotídicas sin ligar de la muestra que comprenden secuencias de producto ligado antes de dicho sometimiento para evitar la extensión o amplificación de la sonda oligonucleotídica sin ligar, opcionalmente:

20 a). en donde la segunda sonda oligonucleotídica comprende además una aleta nucleotídica que está en 5' con respecto a la parte específica de diana, en donde al menos una parte de la aleta nucleotídica es complementaria con al menos una parte de la parte específica de cebador en 3' de la segunda sonda oligonucleotídica, y en donde, en ausencia de escisión, regiones complementarias de la aleta nucleotídica y la parte específica de
25 cebador en 3' de segundas sondas oligonucleotídicas sin ligar se hibridan entre sí para formar segundas sondas oligonucleotídicas horquilladas, comprendiendo además opcionalmente:

extender la parte específica de cebador en 3' de la segunda sonda oligonucleotídica horquillada durante dicho sometimiento para formar una segunda sonda oligonucleotídica horquillada extendida que no se pueda hibridar con el segundo cebador oligonucleotídico; o

30 b) en donde la primera sonda oligonucleotídica comprende además una horquilla que está en 3' con respecto a la parte específica de diana, comprendiendo además opcionalmente:
extender la parte específica de cebador en 3' de la primera sonda oligonucleotídica horquillada durante dicho sometimiento para formar una primera sonda oligonucleotídica horquillada extendida que no se pueda hibridar con y extender en la diana u otros productos de extensión.

35 8. El método de la reivindicación 1, en donde los uno o más conjuntos de sondas oligonucleotídicas comprenden además una tercera sonda oligonucleotídica que tiene una parte diana específica de diana, en donde la segunda y tercera sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas se configuran para que se hibriden con la secuencia de nucleótidos diana, y en donde, en un conjunto de sondas, la parte específica de diana de la tercera sonda oligonucleotídica tiene una o más bases nucleotídicas que se eliminan durante dicha escisión o corte para permitir el
40 ligamiento entre la segunda y tercera sondas oligonucleotídicas en la unión para formar una secuencia de producto ligado que comprende la primera, segunda, y tercera sondas oligonucleotídicas de un conjunto de sondas.

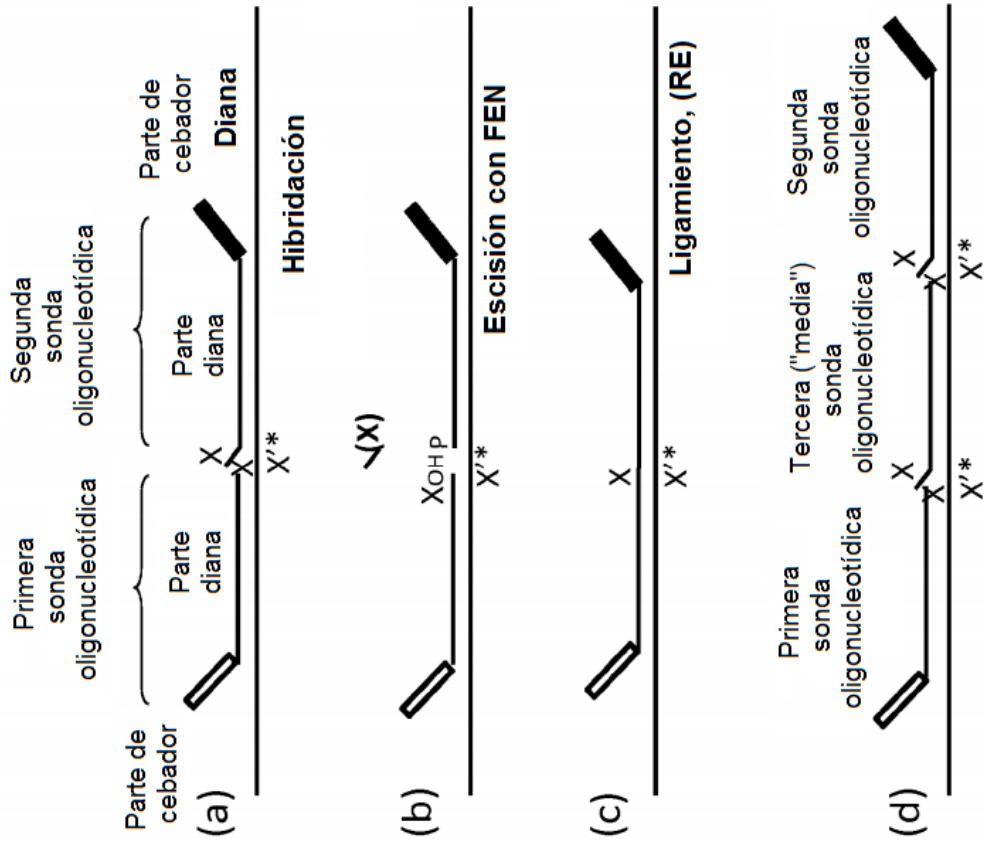
45 9. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra se selecciona entre el grupo que consiste en tejido, células, suero, sangre, plasma, líquido amniótico, esputo, orina, fluidos corporales, secreciones corporales, excreciones corporales, ácidos nucleicos circulantes sin células, ácidos nucleicos fetales circulantes sin células en la mujer embarazada, células tumorales circulantes, tumor, biopsia tumoral, y exosomas.

50 10. El método de la reivindicación 1, en donde las una o más secuencias de nucleótidos diana son moléculas de ácido nucleico de baja abundancia que comprenden una o más bases nucleotídicas metiladas.

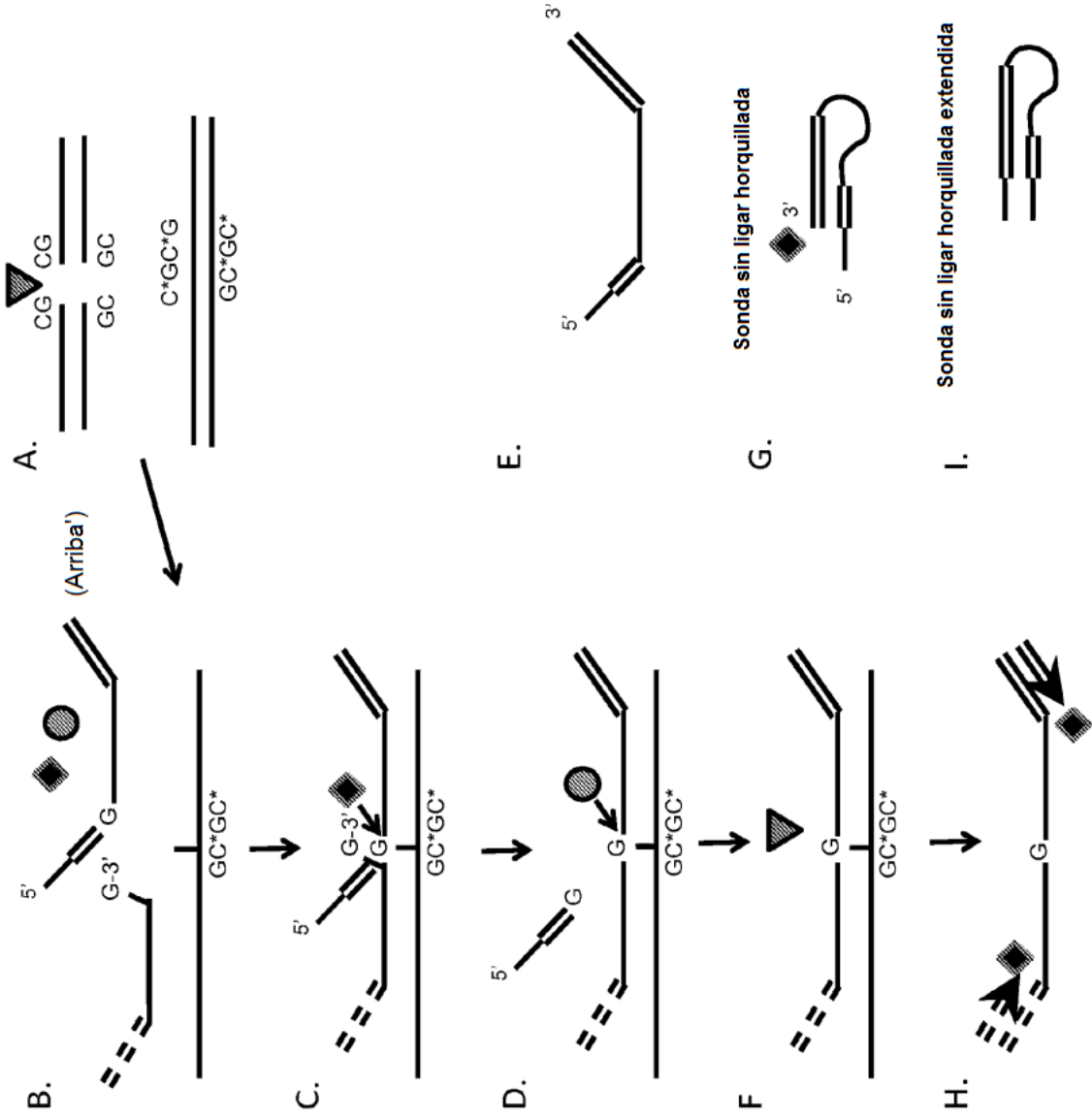
11. El método de la reivindicación 1, en donde se cuantifican las una o más secuencias de nucleótidos diana.

55 12. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
diagnosticar o pronosticar una patología basándose en dicha identificación.

13. El método de la reivindicación 1, que comprende además:
distinguir un genotipo o predisposición a enfermedad basándose en dicha identificación.

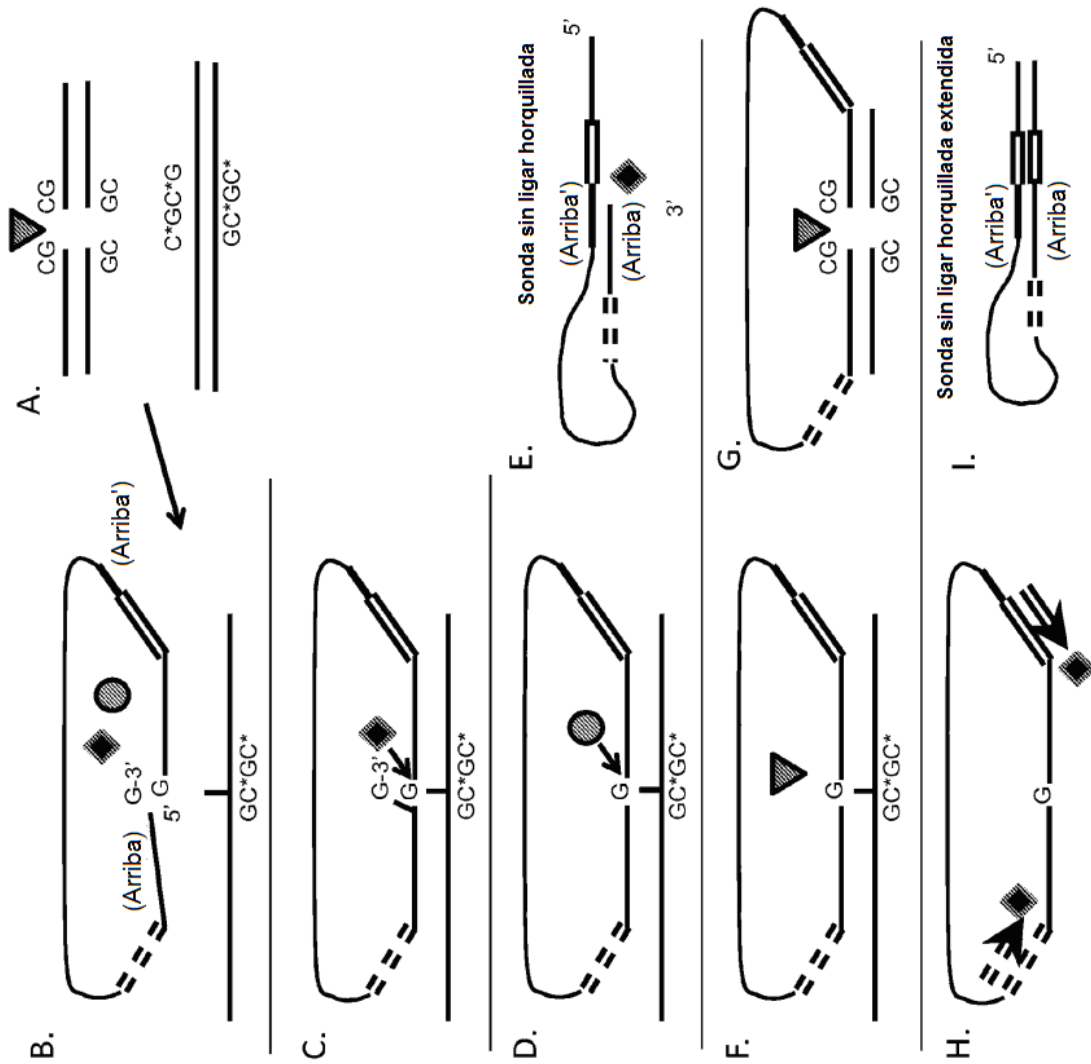


Figuras 1A-1D



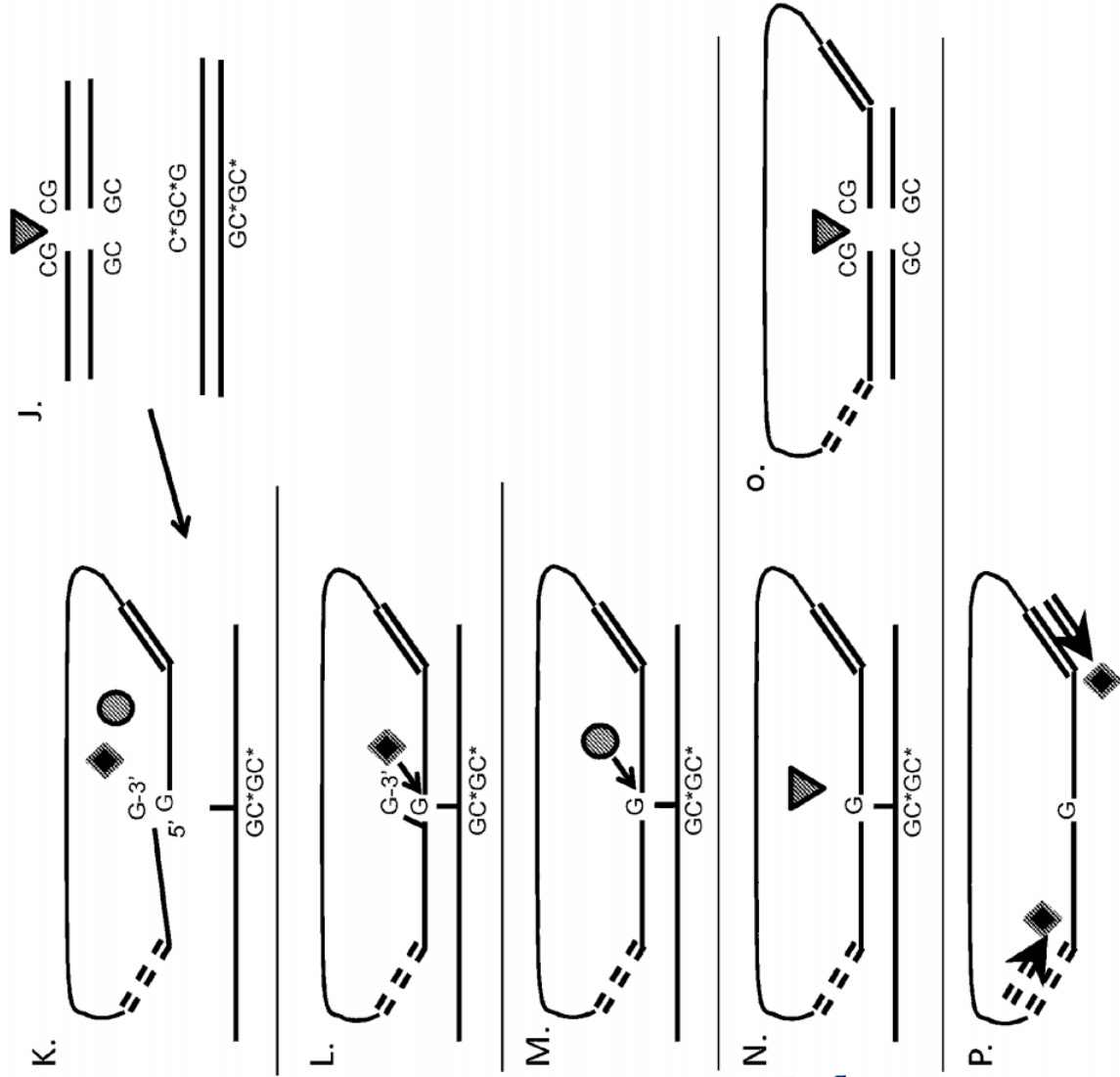
Figuras 2A-2I

1. Reacción de ligamiento con nucleasa-digestión con enzima de restricción para detectar metilación en sitios BstUI. Escindir ADN genómico con BstUI (CGCG) (Fig. 2A).
2. Los oligonucleótidos se hibridan con la diana, con escisión con 5'-nucleasa de emparejamiento de la base de solapamiento en 5' con la aleta, dejando 5'-fosfato competente para ligamiento (Fig. 2C). (La mutación de la 2ª base en la diana podría disminuir drásticamente la posibilidad tanto de escisión como de ligamiento).
3. La ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas cadena arriba (primera) y cadena abajo (segunda) para crear productos de ligamiento (Fig. 2D). Las sondas cadena abajo sin ligar forman horquillas mediante hibridación entre regiones complementarias (Fig. 2E y 2G).
4. BstUI escindirá ambas hebras solo si la diana estuviera sin metilar. El producto de escisión no se amplificará. BstUI cortará la hebra de la sonda si la hebra de la diana estuviera parcialmente metilada, pero las sondas cortadas se pueden volver a ligar y amplificar. La hebra diana totalmente metilada evita la escisión de las sondas ligadas (Fig. 2F).
5. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana metilada (Fig. 2H). Las sondas horquilladas sin ligar se extienden con polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, el cebador secundario (Fig. 2I).



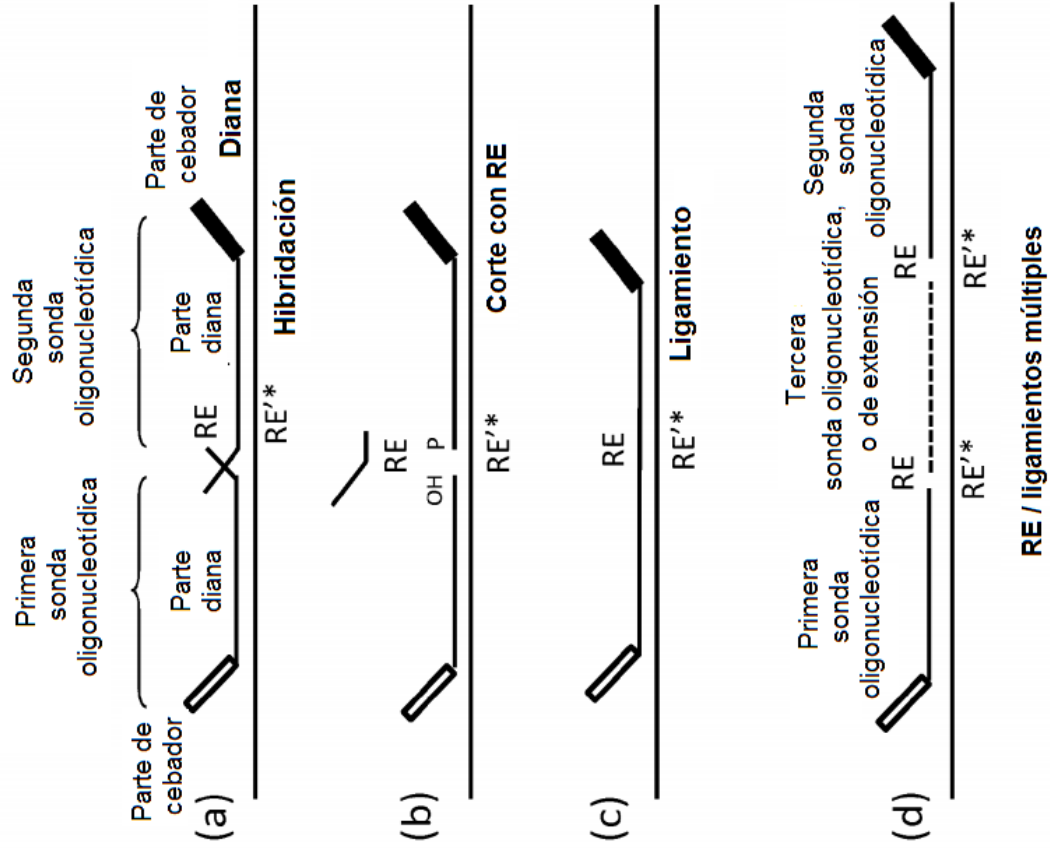
1. Reacción de ligamiento con nucleasa-digestión con enzima de restricción para detectar metilación en sitios BstUI. Escindir ADN genómico con BstUI (CGCG) (Fig. 3A). Las sondas oligonucleotídicas acopladas se hibridan con la molécula de ácido nucleico diana complementaria (Fig. 3B).
2. Después de la hibridación de la sonda, la escisión con 5'-nucleasa solo de emparejamiento de la base de solapamiento en 5' genera un 5'-fosfato competente para ligamiento (Fig. 3C). (La mutación de la 2ª base en la diana podría disminuir drásticamente la posibilidad tanto de escisión como de ligamiento).
3. La ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas acopladas para crear productos de ligamiento cerrados covalentemente (Fig. 3D). Las sondas sin ligar forman horquillas mediante hibridación entre regiones complementarias (Arriba) y (Arriba') (Fig. 3E).
4. BstUI escindiré ambas hebras solo si la diana estuviera sin metilar (Fig. 3G). El producto de escisión no se amplificará. BstUI cortará la hebra de la sonda si la hebra de la diana estuviera parcialmente metilada, pero las sondas cortadas se pueden volver a ligar y amplificar. La hebra diana totalmente metilada evita la escisión de las sondas ligadas (Fig. 3F).
5. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana metilada (Fig. 3H). Las sondas horquilladas sin ligar se extienden con polimerasa para boquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, el cebador secundario (Fig. 3I).

Figuras 3A-3I

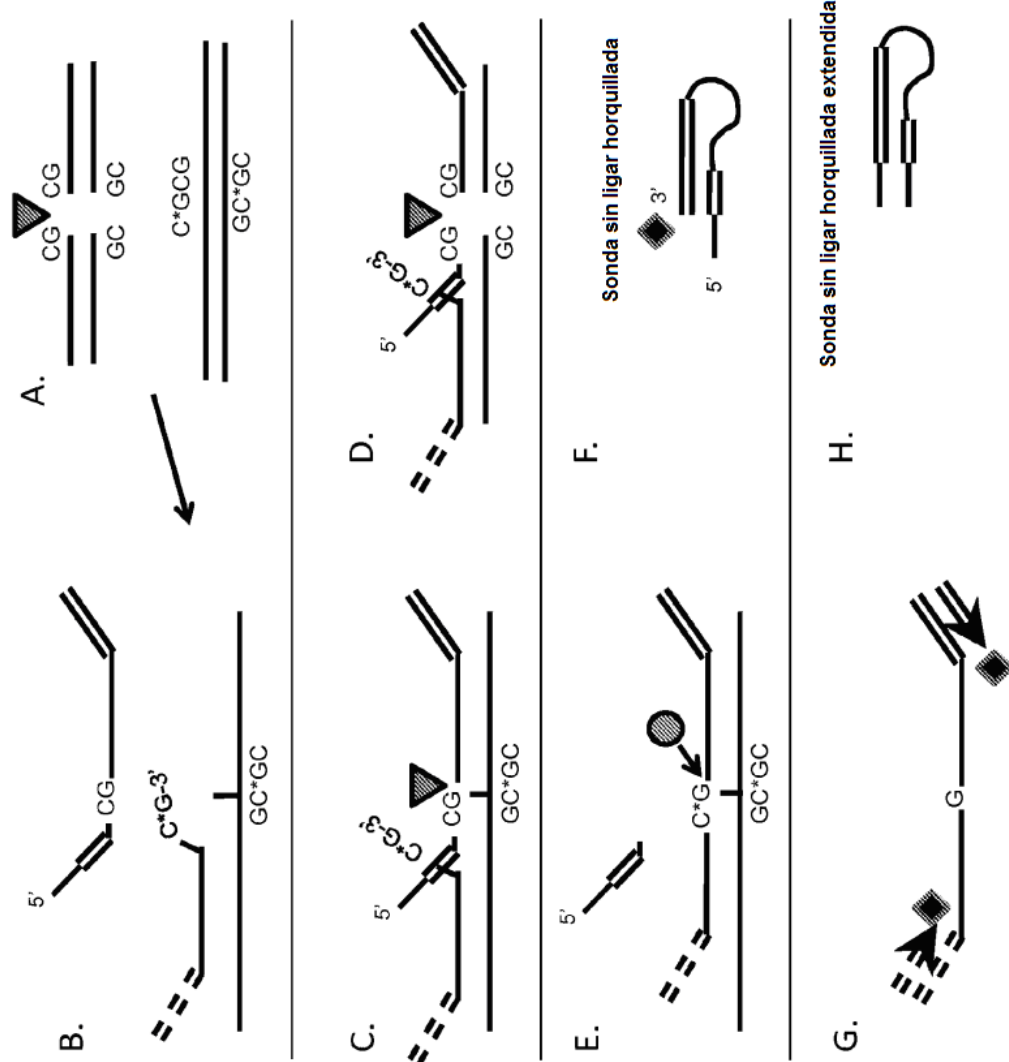


1. Reacción de ligamiento con nucleasa-digestión con enzima de restricción para detectar metilación en sitios BstUI. Escindir ADN genómico con BstUI (CGCG) (Fig. 3J). Las sondas oligonucleotídicas acopladas se hibridan con la molécula de ácido nucleico diana complementaria (Fig. 3K).
2. Después de la hibridación de la sonda, la escisión con 5'-nucleasa solo de emparejamiento de la base de solapamiento en 5' genera un 5'-fosfato competente para ligamiento (Fig. 3L). (La mutación de la 2ª base en la diana podría disminuir drásticamente la posibilidad tanto de escisión como de ligamiento).
3. La ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas acopladas para crear productos de ligamiento cerrados covalentemente (Fig. 3M).
4. BstUI escindiría ambas hebras solo si la diana estuviera sin metilar (Fig. 3O). El producto de escisión no se amplificará. BstUI cortará la hebra de la sonda si la hebra de la diana estuviera parcialmente metilada, pero las sondas cortadas se pueden volver a ligar y amplificar. La hebra diana totalmente metilada evita la escisión de las sondas ligadas (Fig. 3N). Después del ligamiento, la exonucleasa (o exonucleasas) digiere todos los cebadores y ADN diana sin ligar.
5. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana metilada (Fig. 3P).

Figuras 3J-3P

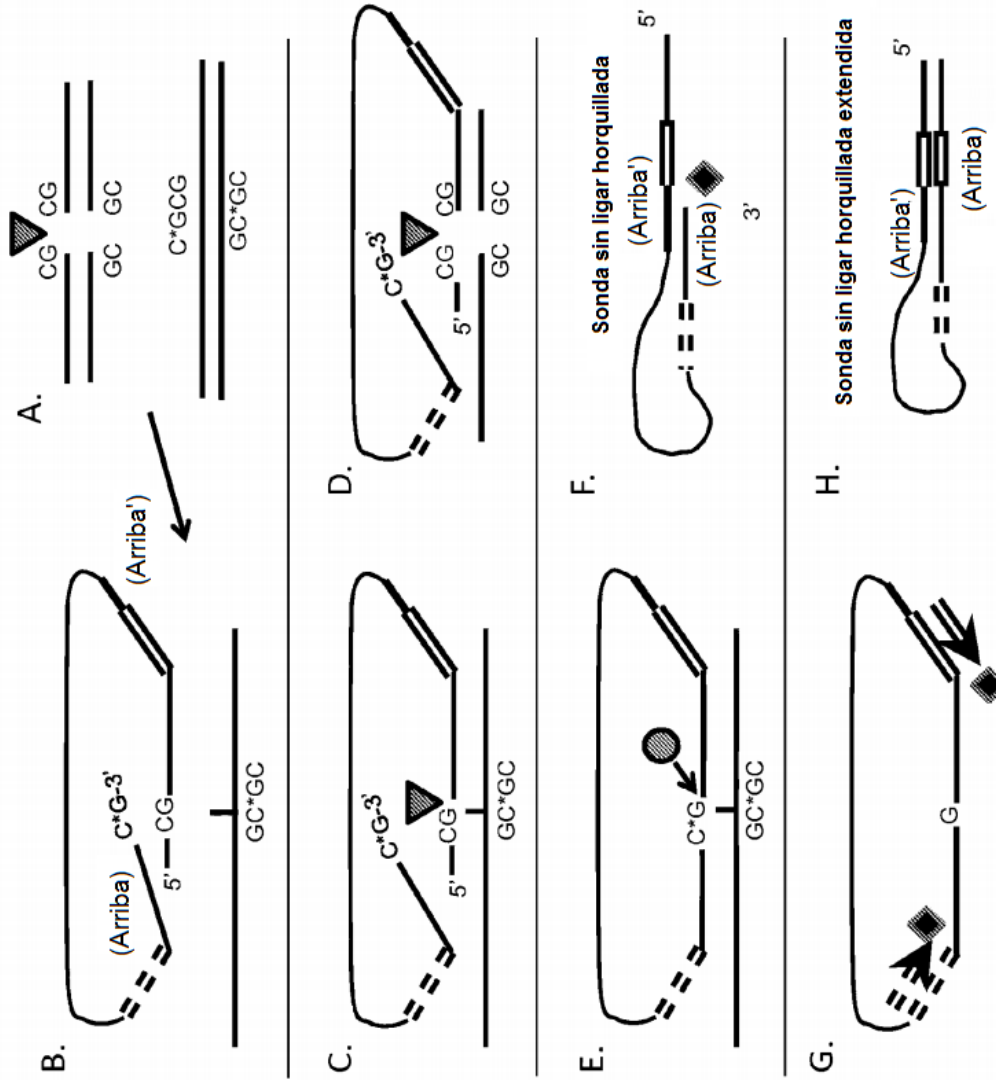


Figuras 4A-4D



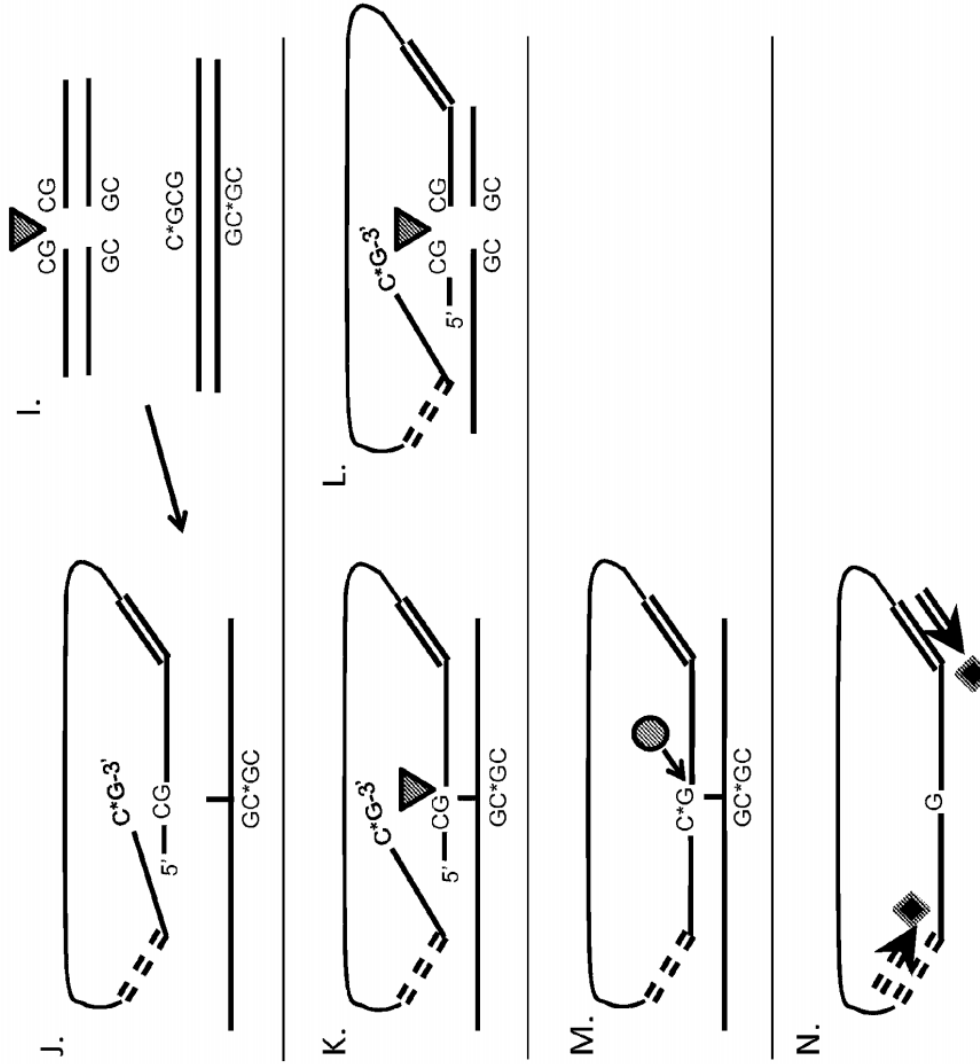
1. Reacción de digestión con enzima de restricción-ligamiento para detectar hemimetilación en sitios BstUI. Escindir ADN genómico con BstUI (CGCG) (Fig. 5A). Las sondas oligonucleotídicas se hibridan con la molécula de ácido nucleico diana complementaria (Fig. 5B).
2. Después de la hibridación de la sonda, BstUI corta el emparejamiento en el extremo 5' de la segunda sonda oligonucleotídica, dejando un 5'-fosfato competente para ligamiento, si el molde está hemimetilado en la secuencia BstUI (Fig. 5C). Si la diana estuviera sin metilar, BstUI escinde tanto la sonda como la diana (Fig. 5D).
3. La ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas cadena arriba (primera) y cadena abajo (segunda) para crear productos de ligamiento (Fig. 5E). El uso opcional de C*G metilado en el extremo 3' de la sonda cadena arriba evita la reescisión con BstUI. Las sondas cadena abajo sin ligar forman horquillas mediante hibridación entre regiones complementarias (Fig. 5F).
4. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana hemimetilada (Fig. 5G). Las sondas horquilladas sin ligar se extienden con polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, el cebador secundario (Fig. 5H).

Figuras 5A-5H



1. Reacción de digestión con enzima de restricción-ligamiento para detectar hemimetilación en sitios BstUI. Escindir ADN genómico con BstUI (CGCG) (Fig. 6A). Las sondas oligonucleotídicas acopladas se hibridan con la molécula de ácido nucleico diana complementaria (Fig. 6B).
2. Después de la hibridación de la sonda, BstUI corta el emparejamiento en el extremo 5', dejando un 5'-fosfato competente para ligamiento, si el molde está hemimetilado en la secuencia BstUI (Fig. 6C). Si la diana estuviera sin metilar, BstUI escindiría tanto la sonda como la diana (Fig. 6D).
3. La ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas acopladas para crear productos de ligamiento cerrados covalentemente. El uso opcional de C*G metilado en el extremo 3' evita la reescisión con BstUI (Fig. 6E). Las sondas sin ligar forman horquillas mediante hibridación entre regiones complementarias (Arriba) y (Arriba') (Fig. 6F).
4. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana hemimetilada (Fig. 6G). Las sondas horquilladas sin ligar se extienden con polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, el cebador secundario (Fig. 6H).

Figuras 6A-6H



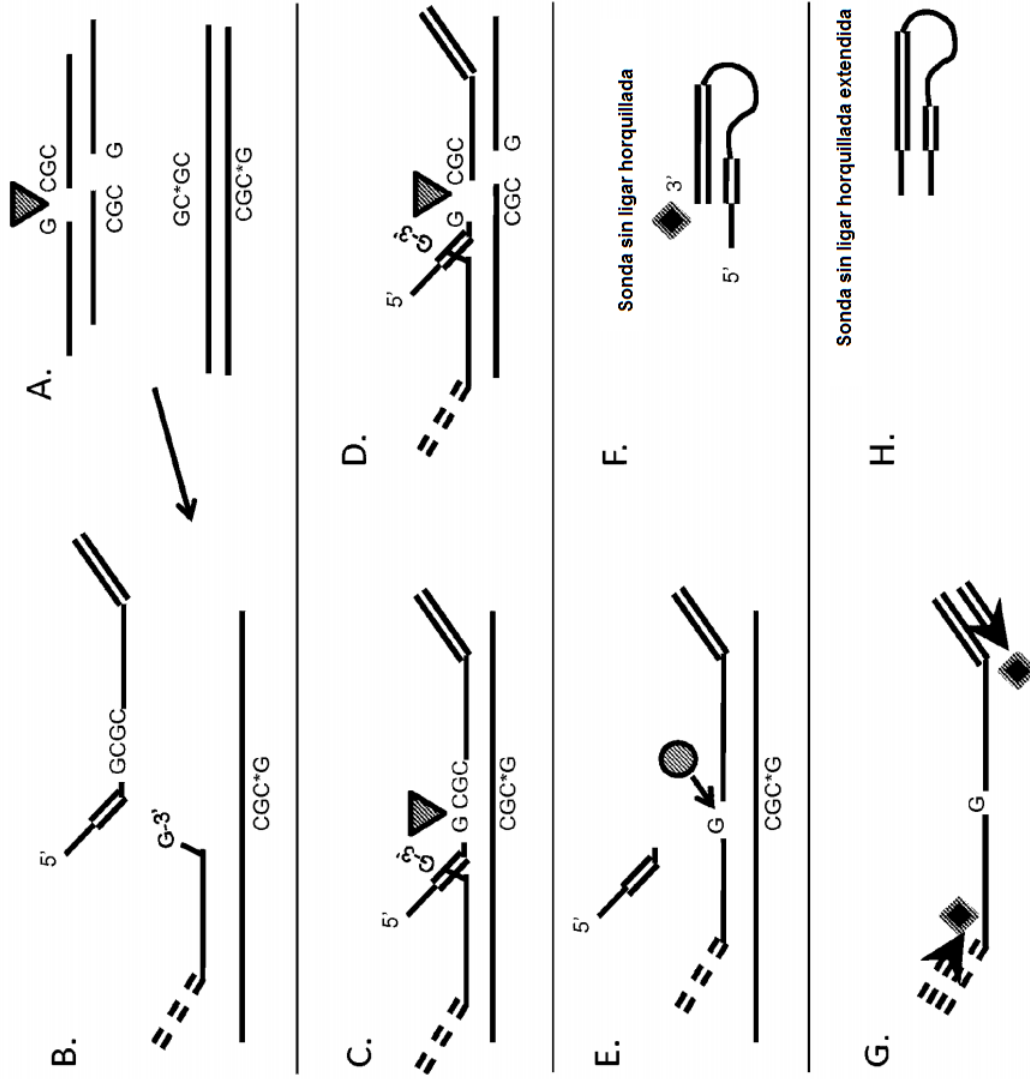
1. Reacción de digestión con enzima de restricción-ligamiento para detectar hemimetilación en sitios BstUI. Escindir ADN genómico con BstUI (CGCG) (Fig. 6I). Las sondas oligonucleotídicas acopladas se hibridan con la molécula de ácido nucleico diana complementaria (Fig. 6J).

2. Después de la hibridación de la sonda oligonucleotídica con la diana, BstUI corta el emparejamiento en el extremo 5', dejando un 5'-fosfato competente para ligamiento, si el molde está hemimetilado en la secuencia BstUI (Fig. 6K). Si la diana estuviera sin metilar, BstUI escindiría tanto la sonda como la diana (Fig. 6L).

3. La ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas acopladas para crear productos de ligamiento cerrados covalentemente. El uso opcional de C*G metilado en el extremo 3' evita la reescisión con BstUI (Fig. 6M). Después del ligamiento, la exonucleasa (o exonucleasas) digiere todos los cebadores y ADN diana sin ligar.

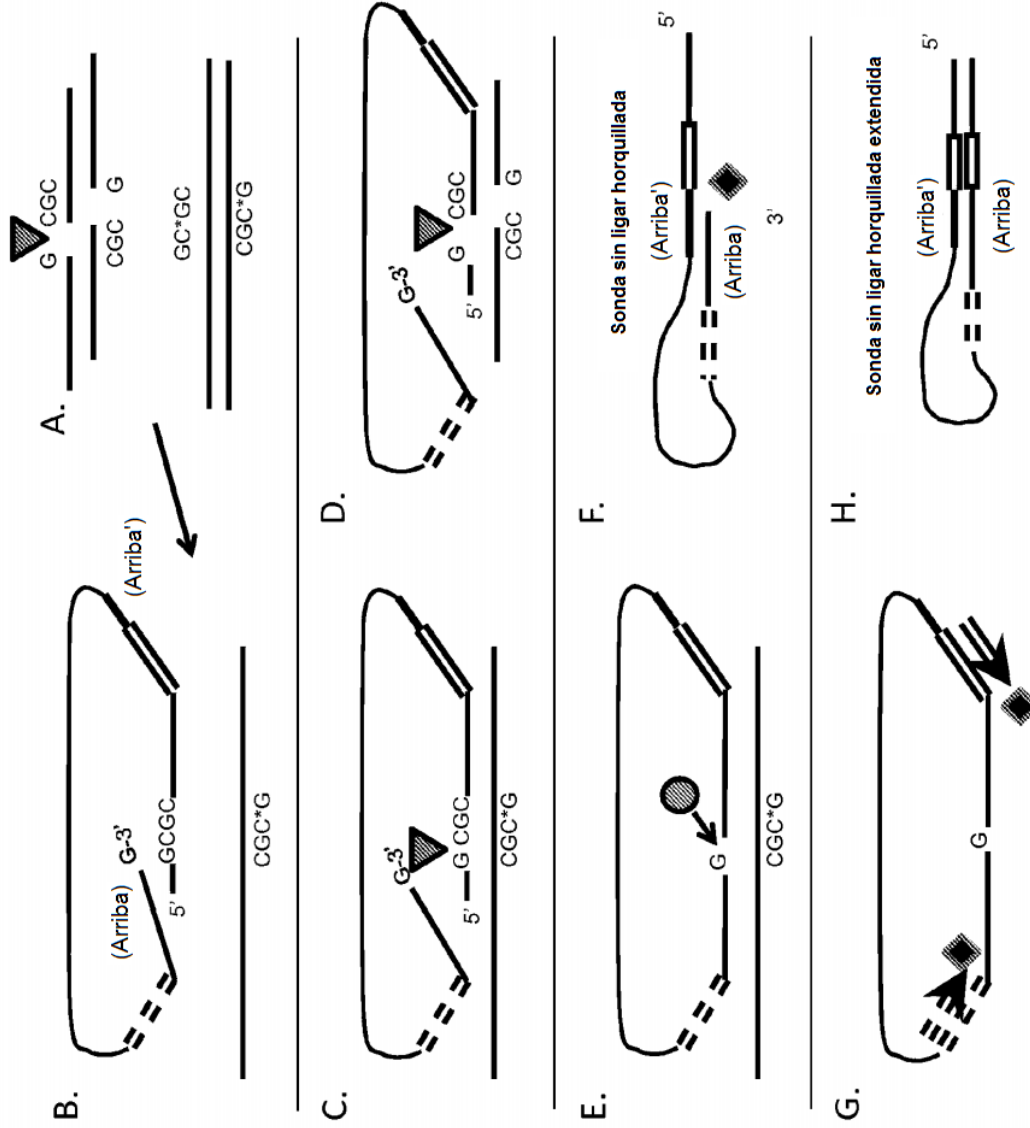
4. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana hemimetilada (Fig. 6N).

Figuras 6I-6N



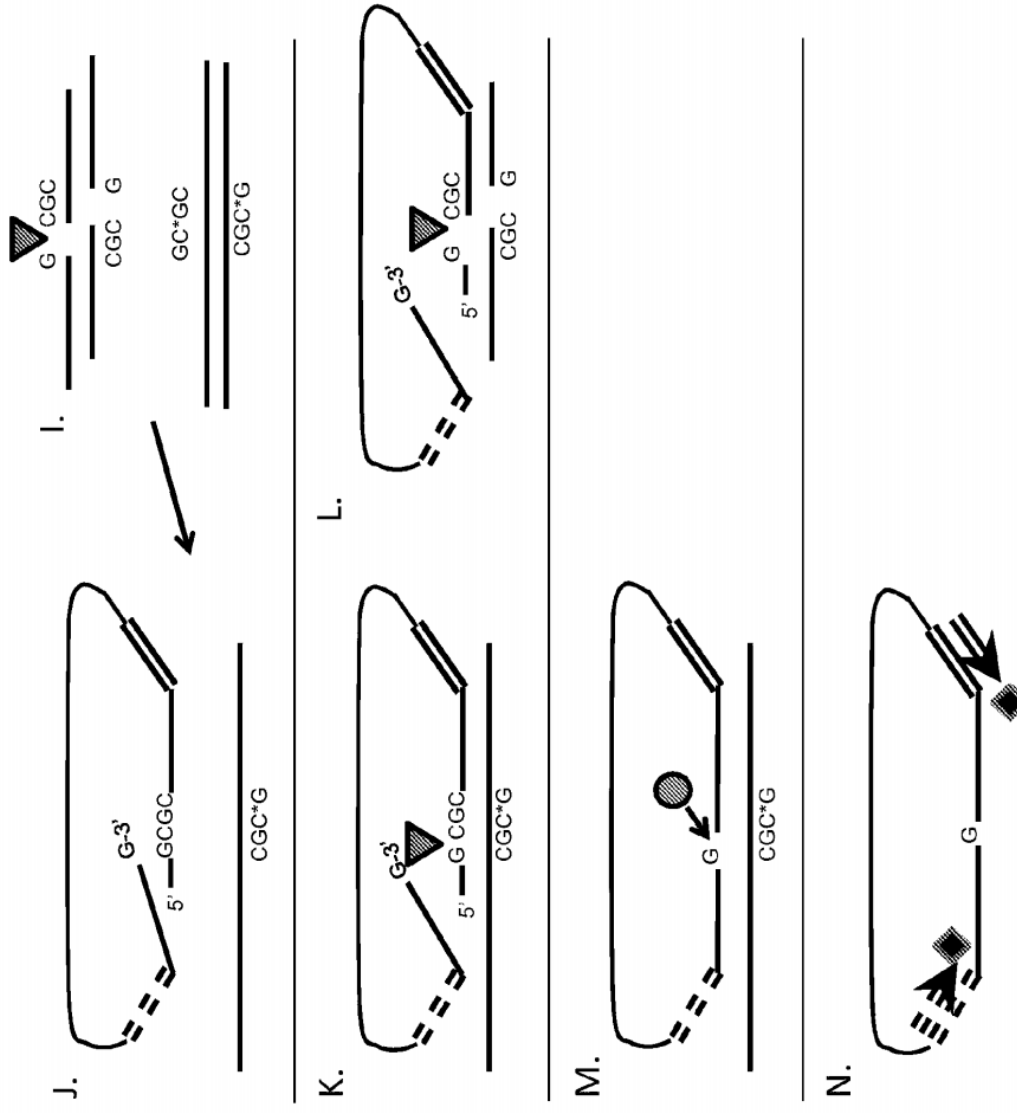
1. Reacción de digestión con enzima de restricción-ligamiento para detectar metilación en sitios HinP11. Escindir ADN genómico con HinP11 (GCGC) (Fig. 7A).
2. La sonda cadena arriba (primera) se diseña con una base G en el extremo 3'. La sonda cadena abajo (segunda) contiene una secuencia HinP11 sin metilar cerca del extremo 5', que contiene una aleta (Fig. 7B).
3. Los oligonucleótidos se hibridan con la diana, con HinP11 cortando el emparejamiento en el extremo 5', dejando un 5'-fosfato competente para ligamiento, si el molde está metilado en la secuencia HinP11 (Fig. 7C). Si la diana estuviera sin metilar, HinP11 escindiría tanto la sonda como la diana (Fig. 7D).
4. La ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas cadena arriba y cadena abajo para crear productos de ligamiento (Fig. 7E). La inactivación térmica anterior de HinP11 evita la reescisión con HinP11. Las sondas cadena abajo sin ligar forman horquillas complementarias (Fig. 7F).
5. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana metilada (Fig. 7G). Las sondas horquilladas sin ligar se extienden con polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, el cebador secundario (Fig. 7H).

Figuras 7A-7H



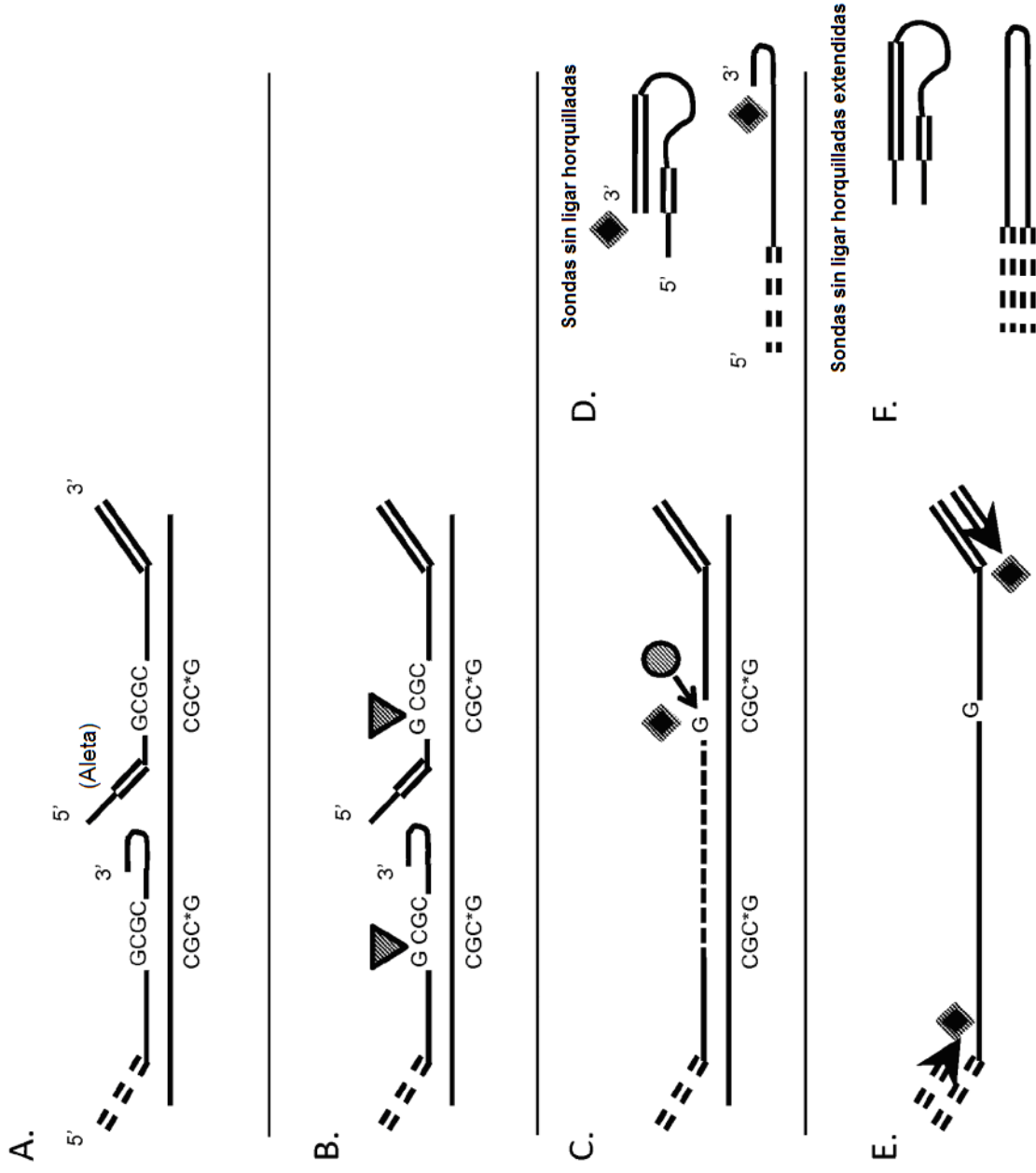
1. Reacción de digestión con enzima de restricción-ligamiento para detectar metilación en sitios HinP1I. Escindir ADN genómico con HinP1I (GCGC) (Fig. 8A).
2. Usar diseño de sonda acoplada con una base G en el extremo 3' de la sonda cadena arriba y con una secuencia HinP1I sin metilar cerca del extremo 5' de la sonda cadena abajo (Fig. 8B).
3. La sonda oligonucleotídica se hibrida con la diana, con HinP1I cortando el emparejamiento en el extremo 5', dejando un 5'-fosfato competente para ligamiento, si el molde está metilado en la secuencia HinP1I (Fig. 8C). Si la diana estuviera sin metilar, HinP1I escindiría tanto la sonda como la diana (Fig. 8D).
4. La ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas acopladas para crear productos de ligamiento cerrados covalentemente (Fig. 8E). La inactivación térmica anterior de HinP1I evita la reescisión con HinP1I. Las sondas sin ligar forman horquillas mediante hibridación entre regiones complementarias (Arriba) y (Arriba') (Fig. 8F).
5. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana metilada (Fig. 8G). Las sondas horquilladas sin ligar se extienden con polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, el cebador secundario (Fig. 8H).

Figuras 8A-8H



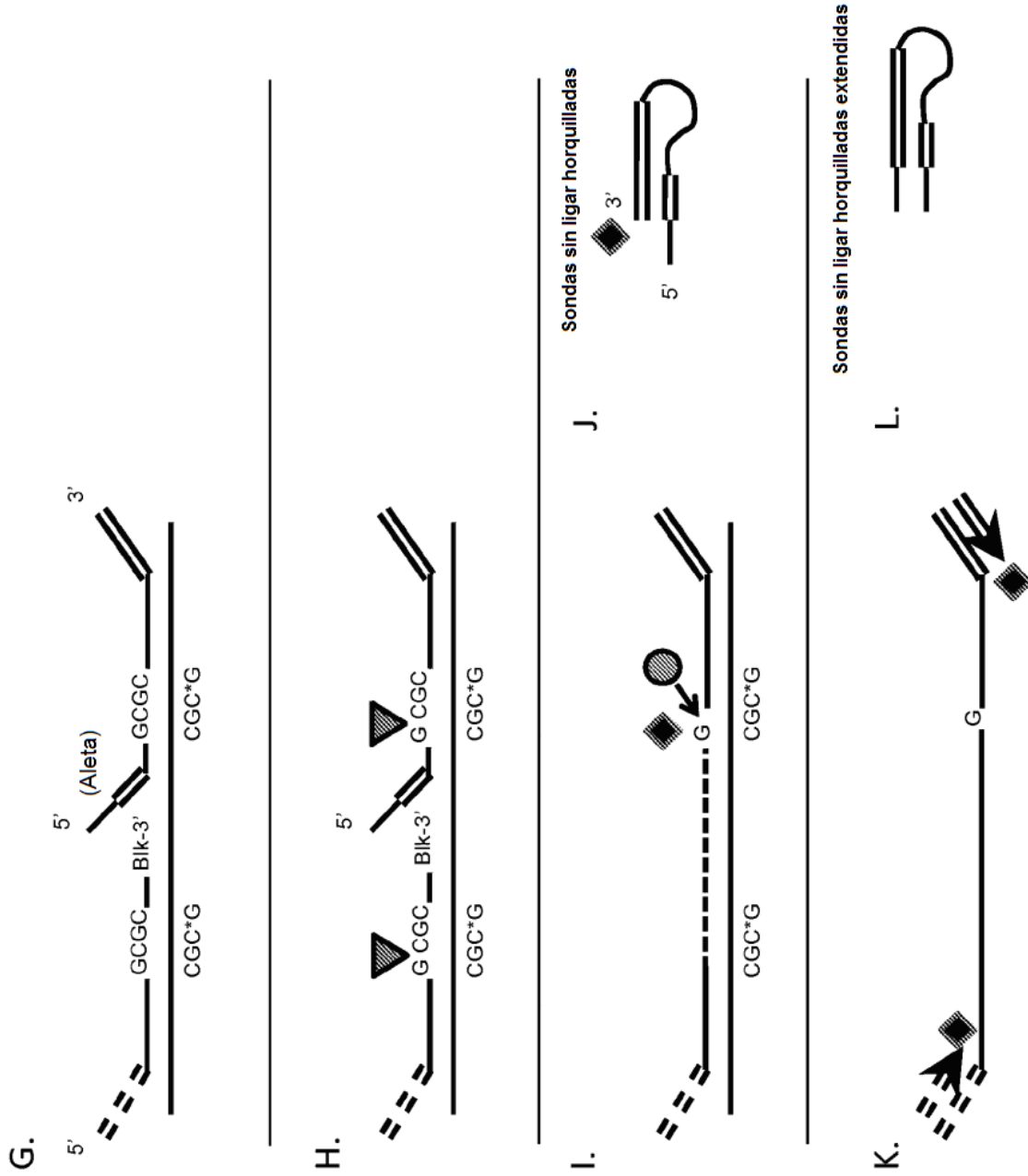
1. Reacción de digestión con enzima de restricción-ligamiento para detectar metilación en sitios HinP11. Escindir ADN genómico con HinP11 (GCGC) (Fig. 8I).
2. Usar diseño de sonda acoplada con una base G en el extremo 3' de la sonda cadena arriba y con una secuencia HinP11 sin metilar cerca del extremo 5' de la sonda cadena abajo (Fig. 8J).
3. El oligonucleótido se hibrida con la diana, con HinP11 cortando el emparejamiento en el extremo 5', dejando un 5'-fosfato competente para ligamiento, si el molde está metilado en la secuencia HinP11 (Fig. 8K). Si la diana estuviera sin metilar, HinP11 escindiría tanto la sonda como la diana (Fig. 8L).
4. La ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas acopladas para crear productos de ligamiento cerrados covalentemente (Fig. 8M). La inactivación térmica anterior de HinP11 evita la reescisión con HinP11. Después del ligamiento, la exonucleasa (o exonucleasas) digiere todos los cebadores y ADN diana sin ligar.
5. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana metilada (Fig. 8N).

Figuras 8I-8N



1. Reacción de digestión con enzima de restricción-extensión-ligamiento para detectar metilación en sitios HinP11 adyacentes. Escindir ADN genómico con HinP11 (GCGC).
2. Los oligonucleótidos se hibridan con la diana (Fig. 9A), con HinP11 cortando ambos sitios, dejando un 3' OH competente para extensión y un 5'-fosfato competente para ligamiento, con la condición de que el molde esté metilado en ambas secuencias HinP11 (Fig. 9B). Si la diana estuviera sin metilar, HinP11 escindiría tanto la sonda como la diana.
3. La polimerasa extiende el extremo 3' liberado, y la ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas cadena arriba y cadena abajo para crear productos de ligamiento (Fig. 9C). La inactivación térmica de HinP11, o la incorporación de polimerasa de nucleótidos modificados evita la reescisión con HinP11. Las sondas sin ligar forman horquillas mediante hibridación entre regiones complementarias (Fig. 9D).
4. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana metilada (Fig. 9E). Las sondas horquilladas sin ligar se extienden con polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, los cebadores secundarios (Fig. 9F).

Figuras 9A-9F



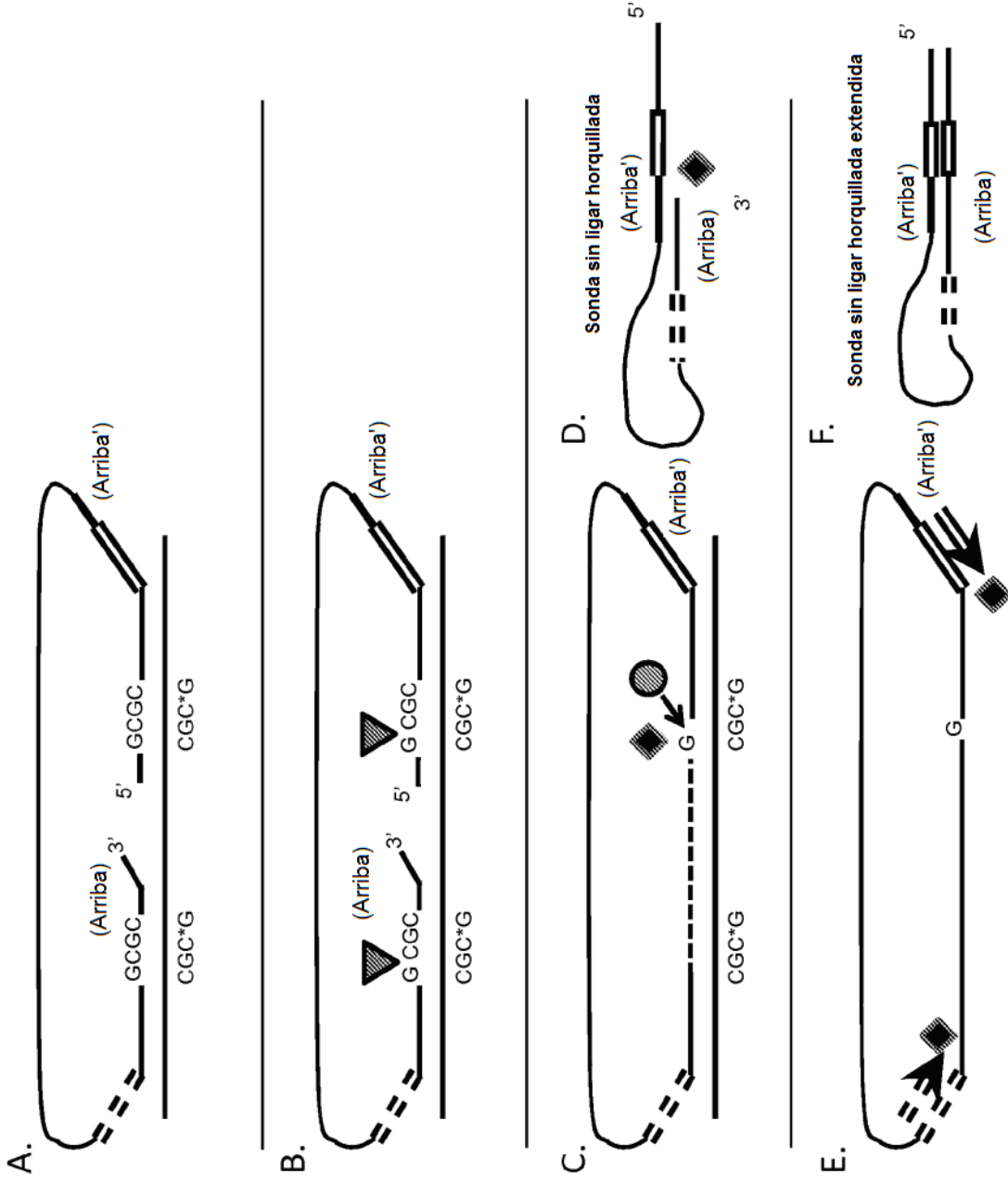
1. Reacción de digestión con enzima de restricción-extensión-ligamiento para detectar metilación en sitios HinP1I adyacentes. Escindir ADN genómico con HinP1I (GCGC).

2. Los oligonucleótidos se hibridan con la diana (Fig. 9G), con HinP1I cortando ambos sitios, dejando un 3' OH competente para extensión y un 5'-fosfato competente para ligamiento, con la condición de que el molde esté metilado en ambas secuencias HinP1I (Fig. 9H). Si la diana estuviera sin metilar, HinP1I escindiría tanto la sonda como la diana.

3. La polimerasa extiende el extremo 3' liberado, y la ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas cadena arriba y cadena abajo para crear productos de ligamiento (Fig. 9I). La inactivación térmica de HinP1I, o la incorporación de polimerasa de nucleótidos modificados evita la reescisión con HinP1I. Las sondas sin ligar forman horquillas mediante hibridación entre regiones complementarias (Fig. 9J).

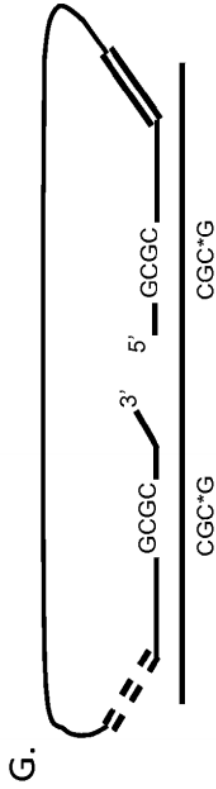
4. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana metilada (Fig. 9K). Las sondas horquilladas sin ligar se extienden con polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, los cebadores secundarios (Fig. 9L).

Figuras 9G-9L

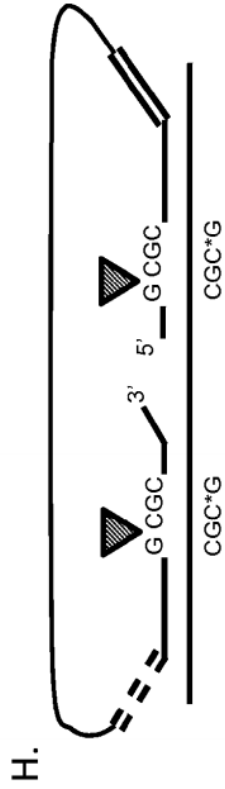


1. Reacción de digestión con enzima de restricción-extensión-ligamiento para detectar metilación en sitios HincPII adyacentes. Escindir ADN genómico con HincPII (GCGC).
2. El oligonucleótido se hibrida con la diana (Fig. 10A), con HincPII cortando ambos sitios, dejando un 3' OH competente para extensión y un 5'-fosfato competente para ligamiento, con la condición de que el molde esté metilado en ambas secuencias HincPII (Fig. 10B). Si la diana estuviera sin metilar, HincPII escindiría tanto la sonda como la diana.
3. La polimerasa extiende el extremo 3' liberado, y la ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas acopladas para crear productos de ligamiento cerrados covalentemente (Fig. 10C). La inactivación térmica de HincPII, o la incorporación de polimerasa de nucleótidos modificados evita la reescisión con HincPII. Las sondas sin ligar forman horquillas mediante hibridación entre regiones complementarias (Arriba) y (Abajo) (Fig. 10D).
4. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana metilada (Fig. 10E). Las sondas horquilladas sin ligar se extienden con polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, el cebador secundario (Fig. 10F).

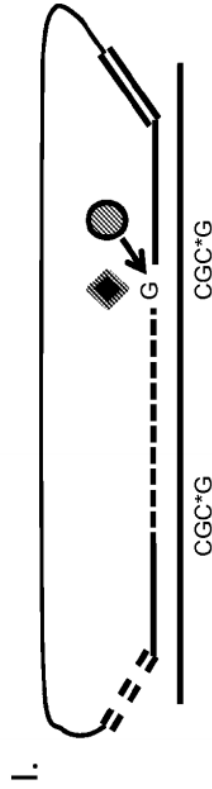
Figuras 10A-10F



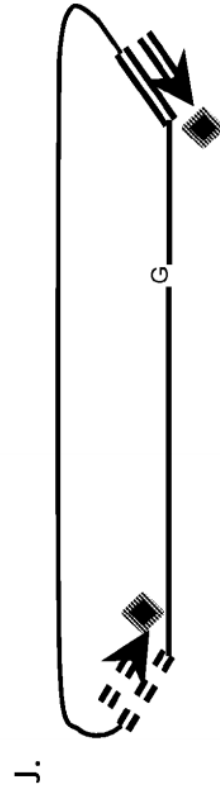
1. Reacción de digestión con enzima de restricción-extensión-ligamiento para detectar metilación en sitios HinP1I adyacentes. Escindir ADN genómico con HinP1I (GCGC).



2. El oligonucleótido se hibrida con la diana (Fig. 10G), con HinP1I cortando ambos sitios, dejando un 3' OH competente para extensión y un 5'-fosfato competente para ligamiento, con la condición de que el molde esté metilado en ambas secuencias HinP1I (Fig. 10H). Si la diana estuviera sin metilar, HinP1I escindiría tanto la sonda como la diana.

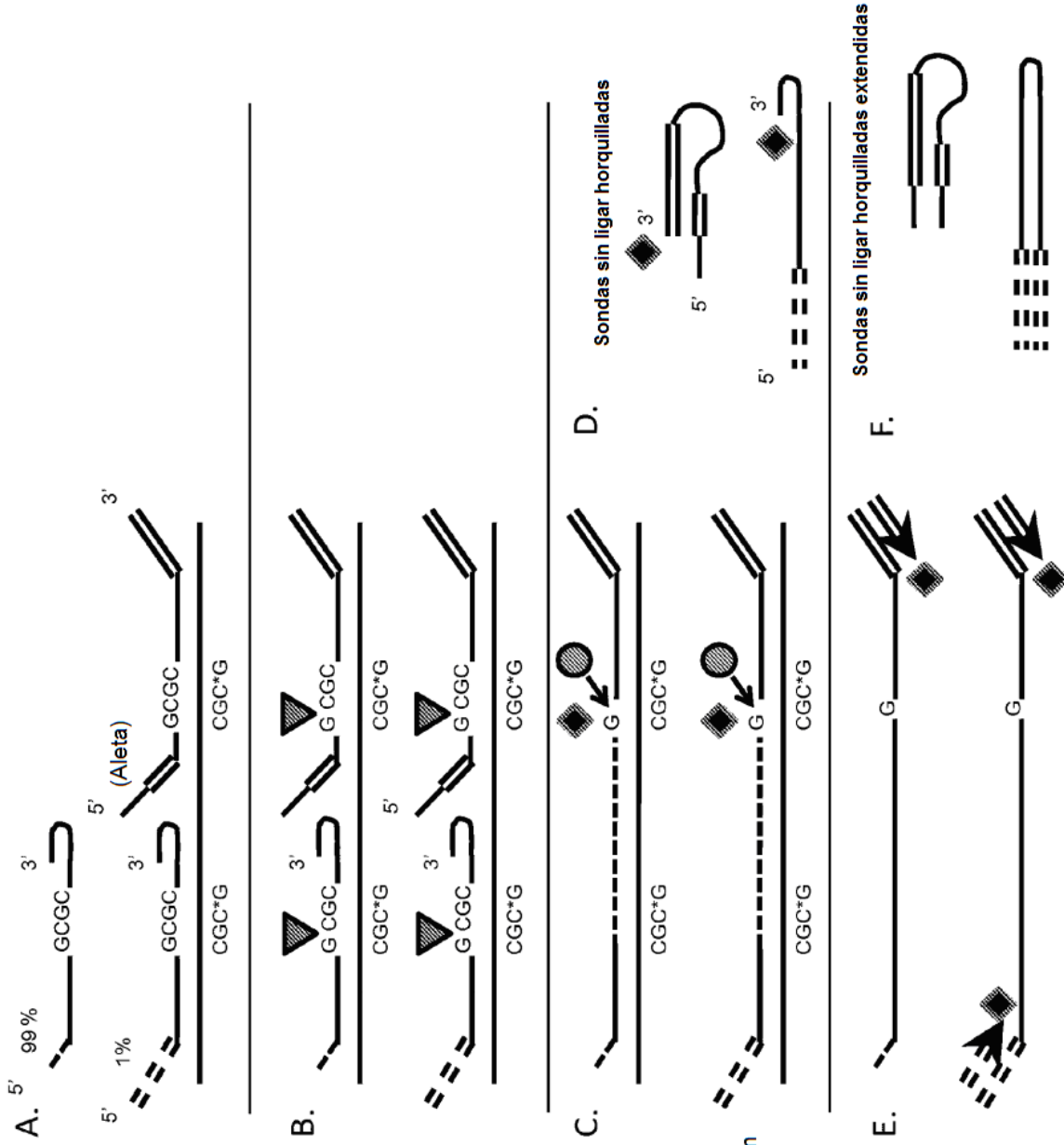


3. La polimerasa extiende el extremo 3' liberado, y la ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas acopladas para crear productos de ligamiento cerrados covalentemente (Fig. 10I). La inactivación térmica de HinP1I, o la incorporación de polimerasa de nucleótidos modificados evita la reescisión con HinP1I. Después del ligamiento, la exonucleasa (o exonucleasas) digiere todos los cebadores y ADN diana sin ligar.



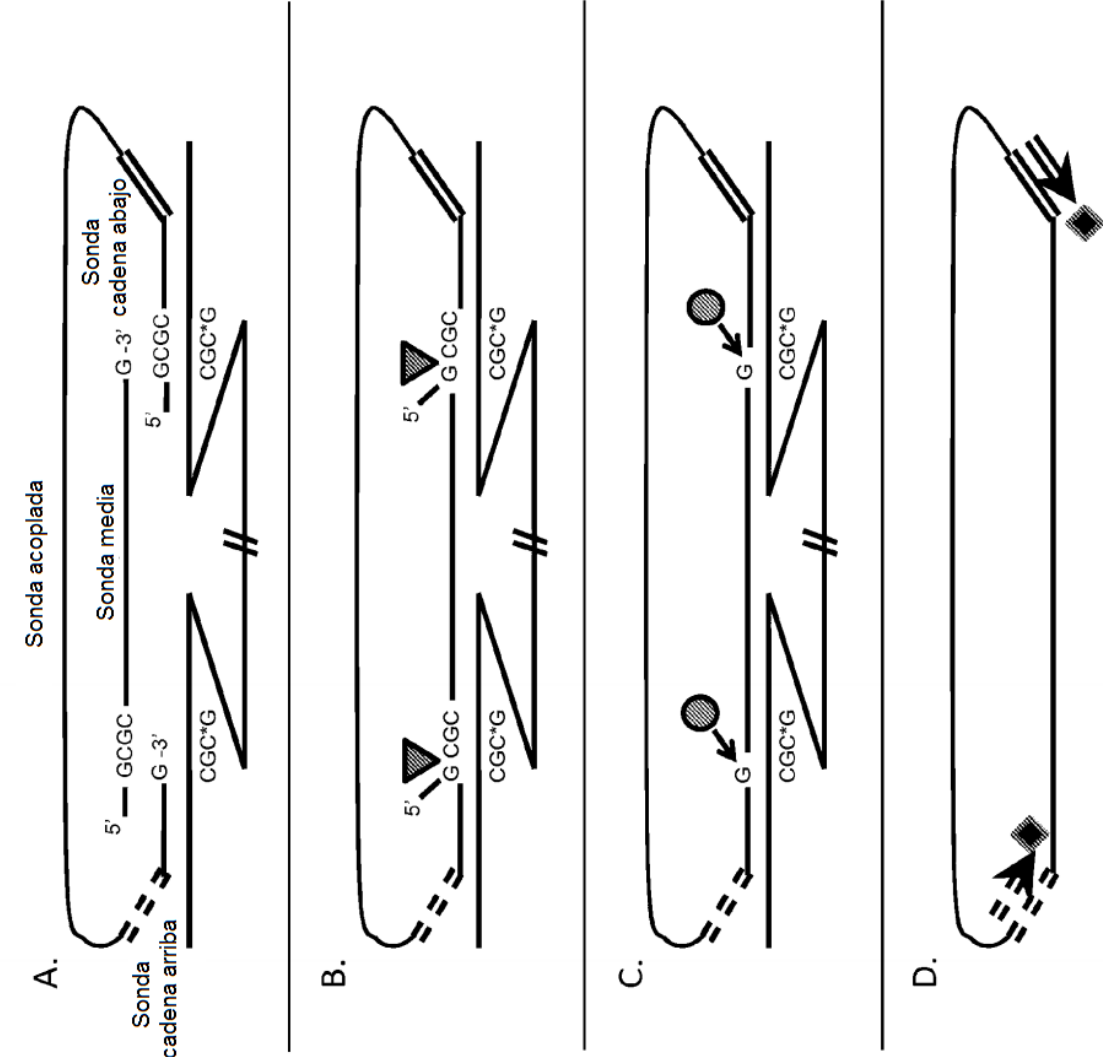
4. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana metilada (Fig. 10J).

Figuras 10G-10J



1. Reacción de digestión con enzima de restricción-extensión-ligamiento para cuantificar la metilación en sitios HinP1I adyacentes en ADN de control. Escindir ADN genómico con HinP1I (GCGC).
2. Los oligonucleótidos se hibridan con la diana (Fig. 11A), con HinP1I cortando ambos sitios, dejando un 3' OH competente para extensión y un 5'-fosfato competente para ligamiento, con la condición de que el molde esté metilado en ambas secuencias HinP1I (Fig. 11B). Si la diana estuviera sin metilar, HinP1I escindiría tanto la sonda como la diana.
3. La polimerasa extiende el extremo 3' liberado, y la ligasa sella covalentemente los dos extremos libres de las sondas cadena arriba y cadena abajo para crear productos de ligamiento (Fig. 11C). La inactivación térmica de HinP1I, o la incorporación de polimerasa de nucleótidos modificados evita la reescisión con HinP1I. Las sondas sin ligar forman horquillas mediante hibridación entre regiones complementarias (Fig. 11D).
4. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana metilada (Fig. 11E). Las sondas horquilladas sin ligar se extienden con polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, los cebadores secundarios (Fig. 11F). El 99 % del producto tiene marcador no amplificante; solamente un 1 % del ADN se amplifica indicando la señal generada a partir de un ADN metilado al 1 % equivalente.

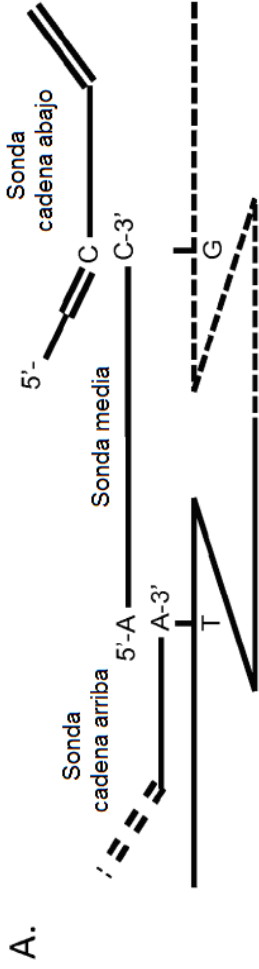
Figuras 11A-11F



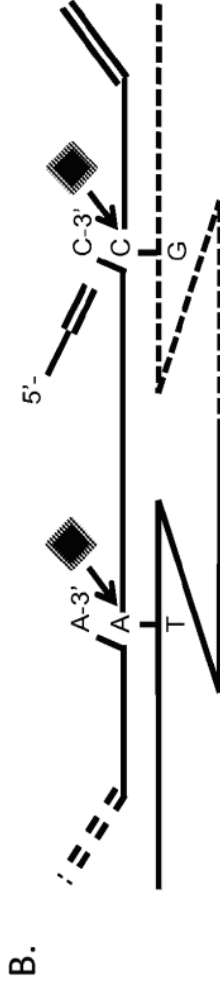
Figuras 12A-12D

1. Reacción de digestión con enzima de restricción-ligamiento para detectar metilación en sitios HinfI alejados en la misma molécula de ácido nucleico diana. La sonda acoplada contiene una primera sonda que tiene una secuencia marcadora cadena arriba y una región diana génica cadena arriba, así como una segunda sonda que tiene una región diana génica cadena abajo, y una secuencia marcadora cadena abajo complementaria. La sonda media contiene las regiones diana génica cadena arriba en 5' adyacente y diana génica cadena abajo en 3' adyacente (Fig. 12A).
2. Los oligonucleótidos se hibridan con la diana, con HinfI cortando ambos sitios, dejando dos 5'-fosfatos competentes para ligamiento, con la condición de que el molde esté metilado en ambas secuencias HinfI (Fig. 12B). Si la diana estuviera sin metilar, HinfI escindiría tanto la sonda como la diana.
3. La ligasa sella covalentemente los extremos libres de las sondas acopladas con la sonda media para crear productos de ligamiento cerrados covalentemente (Fig. 12C). La inactivación térmica de HinfI, o la incorporación de polimerasa de nucleótidos modificados evita la reescisión con HinfI. Después del ligamiento, la exonucleasa (o exonucleasas) digiere todos los cebadores y ADN diana sin ligar.
4. PCR amplifica solo los productos de ligamiento para la diana metilada (Fig. 12D).

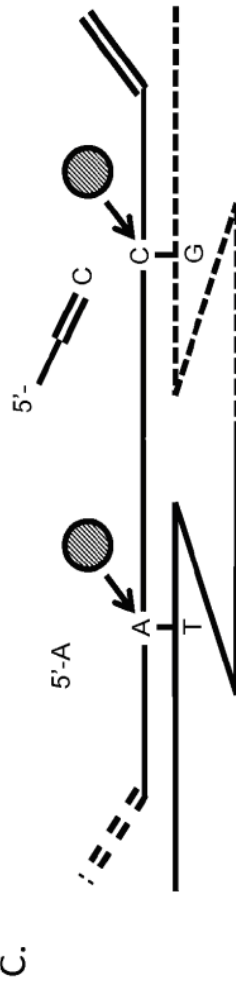
1. Reacción de nucleasa-ligamiento para detectar translocación génica cuando se desconoce la posición de unión precisa. La sonda cadena arriba (primera) contiene una secuencia marcadora cadena arriba y una región diana génica cadena arriba. La sonda media contiene las regiones diana génica cadena arriba en 5' adyacente y diana génica cadena abajo en 3' adyacente. La sonda cadena abajo (segunda) contiene una región diana génica cadena abajo, y una secuencia marcadora cadena abajo complementaria (Fig. 13A).



2. La actividad de 5'-nucleasa de la polimerasa escinde solo el emparejamiento de la base de solapamiento en 5' y la aleta adicional, dejando 5'-fosfato competente para ligamiento (Fig. 13B).



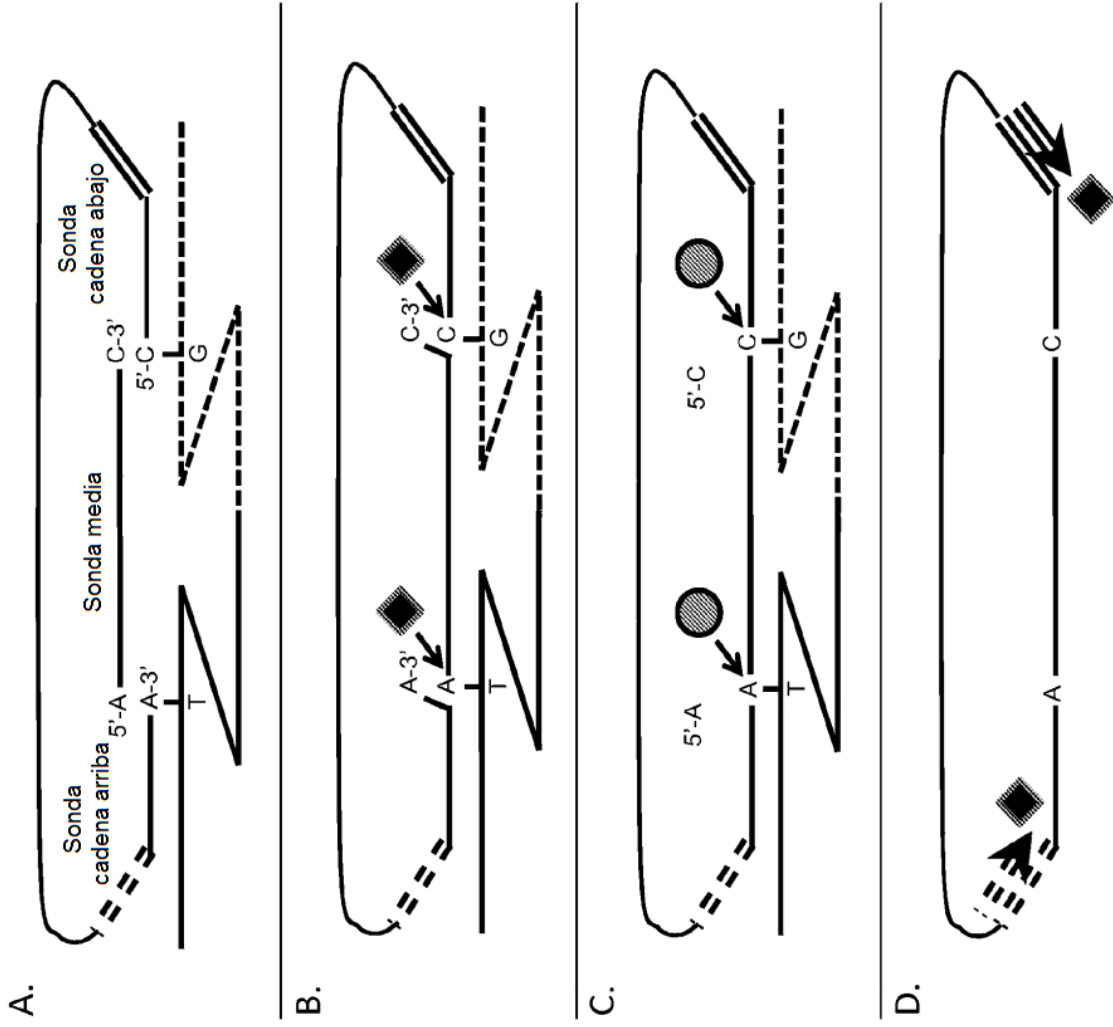
3. El ligamiento sella covalentemente las tres sondas juntas (Fig. 13C). Las sondas cadena abajo sin ligar forman una horquilla debido a regiones complementarias de la aleta en 5' y la parte específica de cebador en 3'.



4. PCR amplifica solo productos de ligamiento para la translocación génica (Fig. 13D).



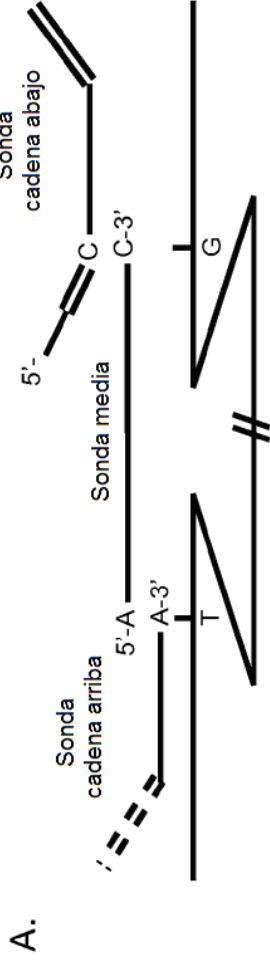
Figuras 13A-13D



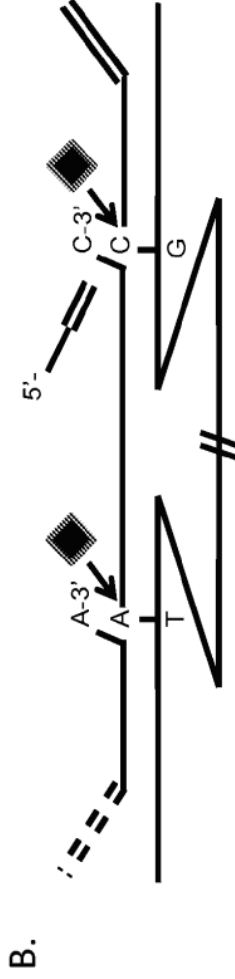
Figuras 14A-14D

1. Reacción de nucleasa-ligamiento para detectar translocación génica cuando se desconoce la posición de unión precisa. La sonda acoplada contiene una primera sonda que tiene una secuencia marcadora cadena arriba y una región diana génica cadena arriba, y una segunda sonda que tiene una región diana génica cadena abajo y una secuencia marcadora cadena abajo complementaria. La sonda media contiene las regiones diana génica cadena arriba en 5' adyacente y diana génica cadena abajo en 3' adyacente (Fig. 14A).
2. La actividad de 5'-nucleasa de la polimerasa escinde la base de solapamiento en 5' de las sondas media y segunda cuando se emparejan con el resto en 3' de las sondas primera y media, respectivamente, dejando extremos de 5'-fosfato competentes para ligamiento en las sondas medias y segunda (Fig. 14B).
3. El ligamiento sella covalentemente las sondas acoplada y media juntas. Después del ligamiento, la exonucleasa (o exonucleasas) digiere todos los cebadores y ADN diana sin ligar (Fig. 14C).
4. PCR amplifica solo productos de ligamiento para la translocación génica (Fig. 14D).

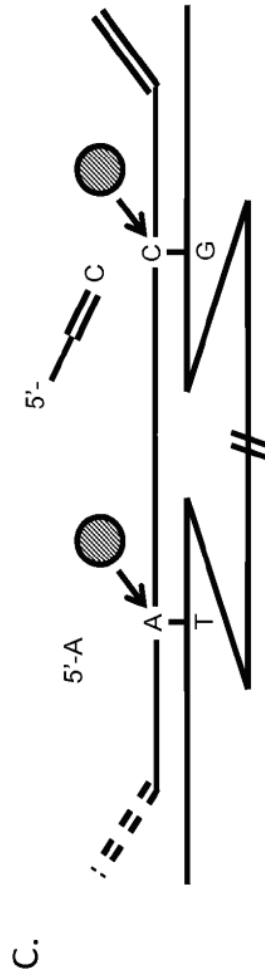
1. Reacción de nucleasa-ligamiento para detectar los SNP alejados o corte y empalme alternativo en ARNm. La primera sonda cadena arriba contiene una secuencia marcadora cadena arriba y una región diana génica cadena arriba. La sonda media contiene las regiones diana génica cadena arriba en 5' adyacente y diana génica cadena abajo en 3' adyacente. La segunda sonda cadena abajo contiene una región diana génica cadena abajo y una secuencia marcadora cadena abajo complementaria (Fig. 15A). (Si la diana es ARNm, hacer copia de ADNc con transcriptasa inversa).



2. La actividad de 5'-nucleasa de la polimerasa escinde solo el emparejamiento de la base de solapamiento en 5' y la aleta adicional, dejando 5'-fostato competente para ligamiento (Fig. 15B).



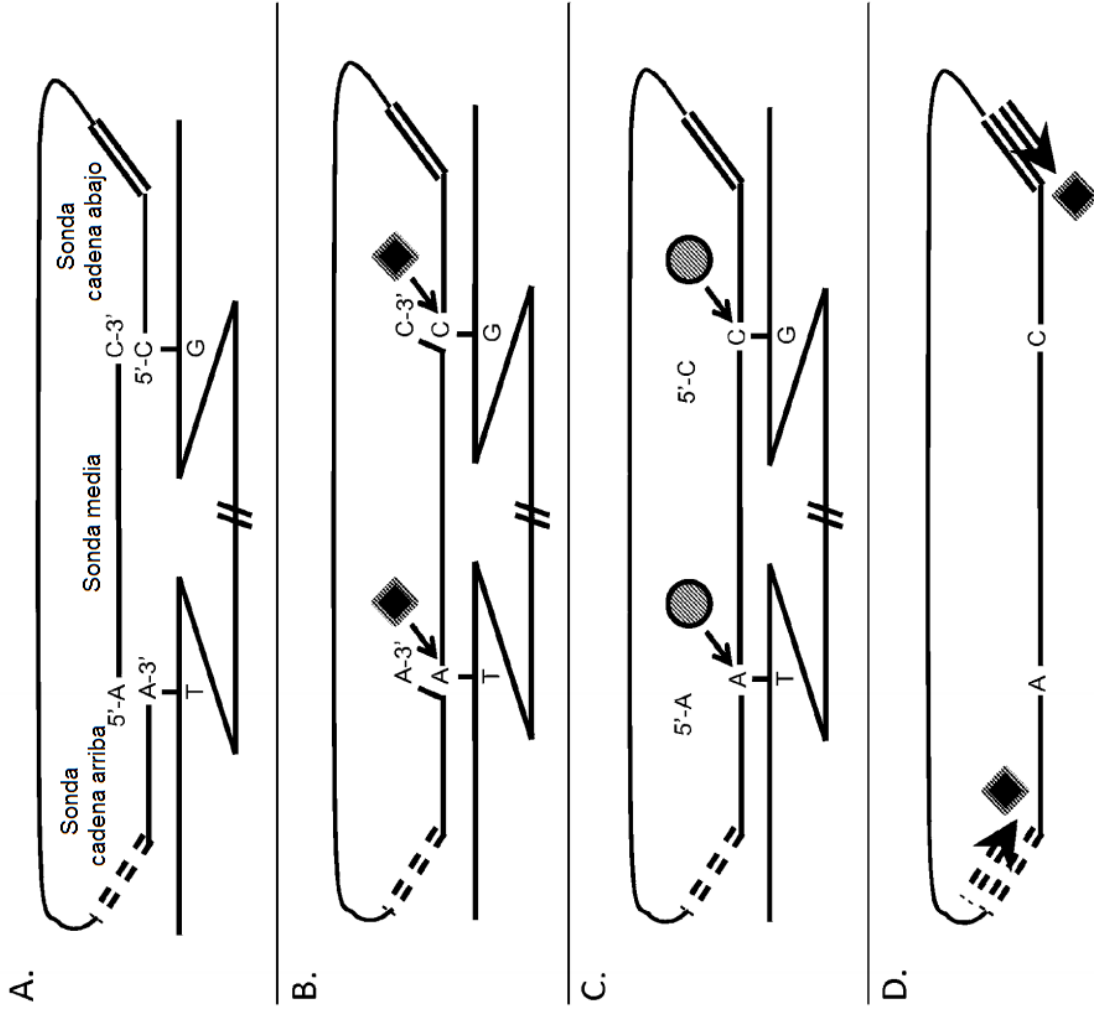
3. El ligamiento sella covalentemente las tres sondas juntas (Fig. 15C). Las sondas cadena abajo sin ligar forman una horquilla debido a regiones complementarias de la aleta en 5' y la parte específica de cebador en 3'.



4. PCR amplifica solo productos de ligamiento para los SNP específicos o corte y empalme alternativo en ARNm (Fig. 15D).



Figuras 15A-15D



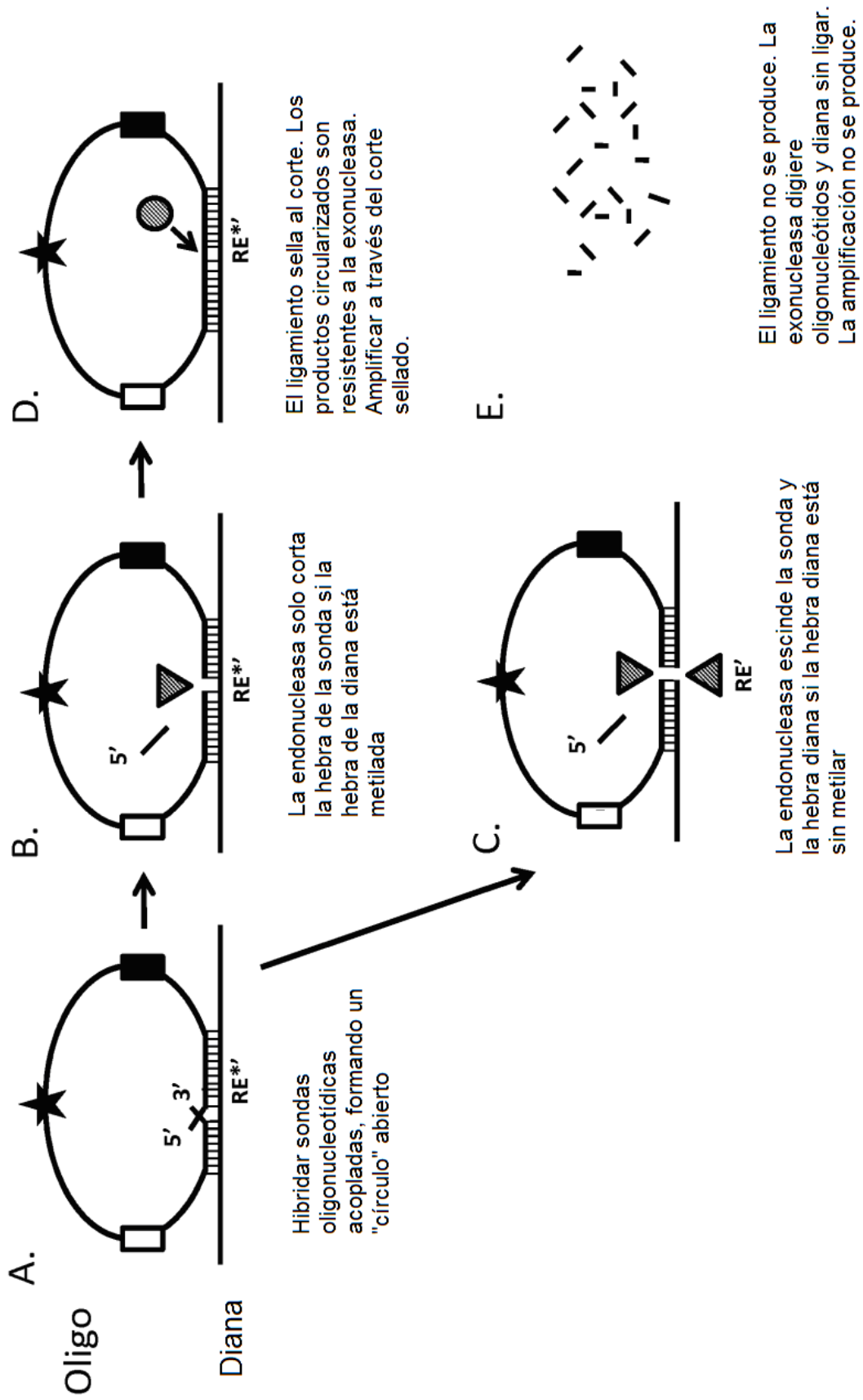
1. Reacción de nucleasa-ligamiento para detectar los SNP alejados o corte y empalme alternativo en ARNm. La sonda acoplada contiene una primera sonda que tiene una secuencia marcadora cadena arriba y una región diana génica cadena arriba, y una segunda sonda que tiene una región diana génica cadena abajo y una secuencia marcadora cadena abajo complementaria. La sonda media contiene las regiones diana génica cadena arriba en 5' adyacente y diana génica cadena abajo en 3' adyacente (Fig. 16A). (Si la diana es ARNm, hacer copia de ADNc con transcriptasa inversa).

2. La actividad de 5'-nucleasa de la polimerasa escinde la base de solapamiento en 5' de las sondas media y segunda cuando se emparejan con el resto en 3' de las sondas primera y media, respectivamente, dejando extremos de 5'-fosfato competentes para ligamiento en las sondas media y segunda (Fig. 16B).

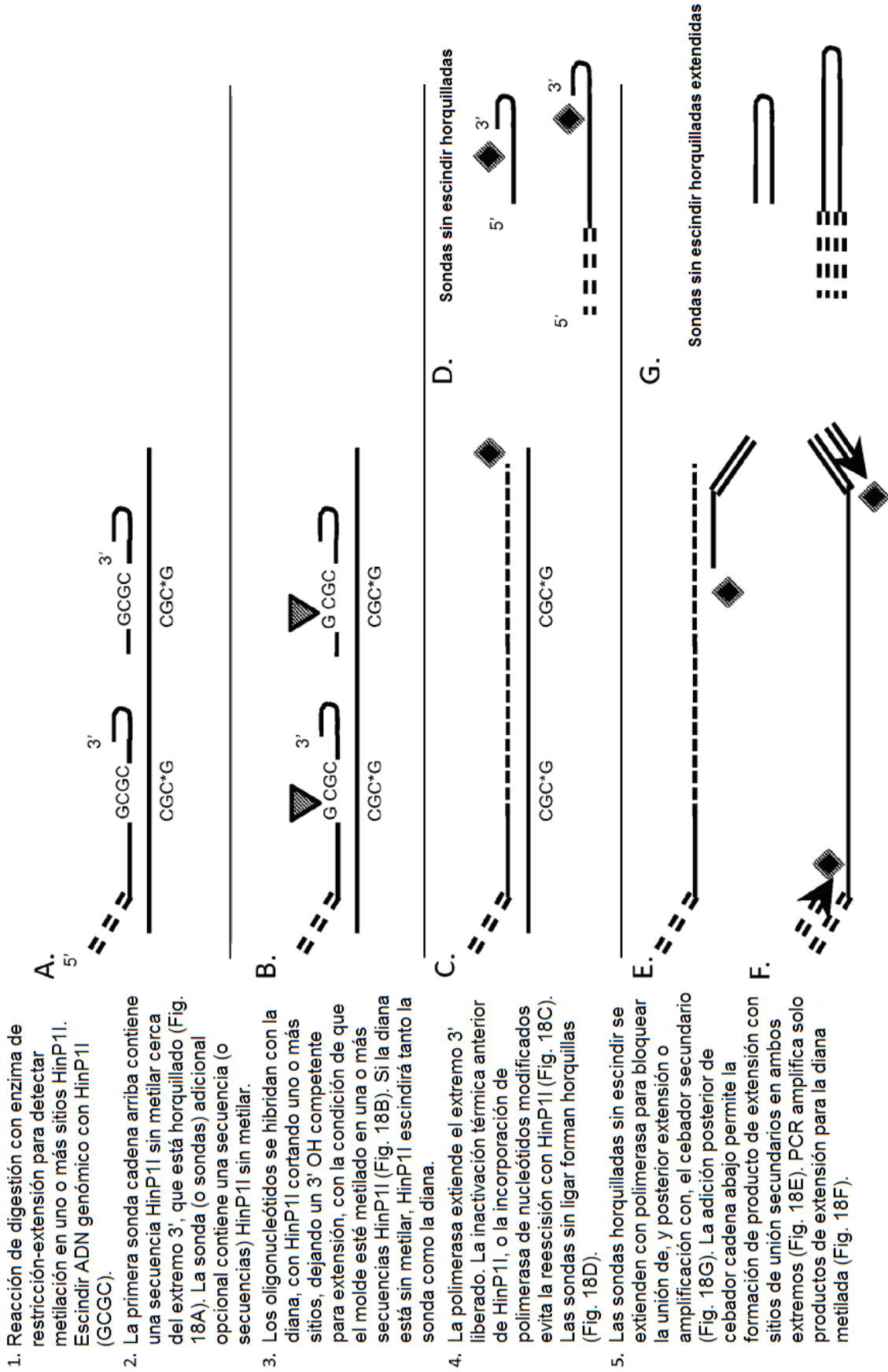
3. El ligamiento sella covalentemente las sondas acoplada y media juntas (Fig. 16C). Después del ligamiento, la exonucleasa (o exonucleasas) digiere todos los cebadores y ADN diana sin ligar.

4. PCR amplifica solo productos de ligamiento para los SNP específicos o corte y empalme alternativo en ARNm (Fig. 16D).

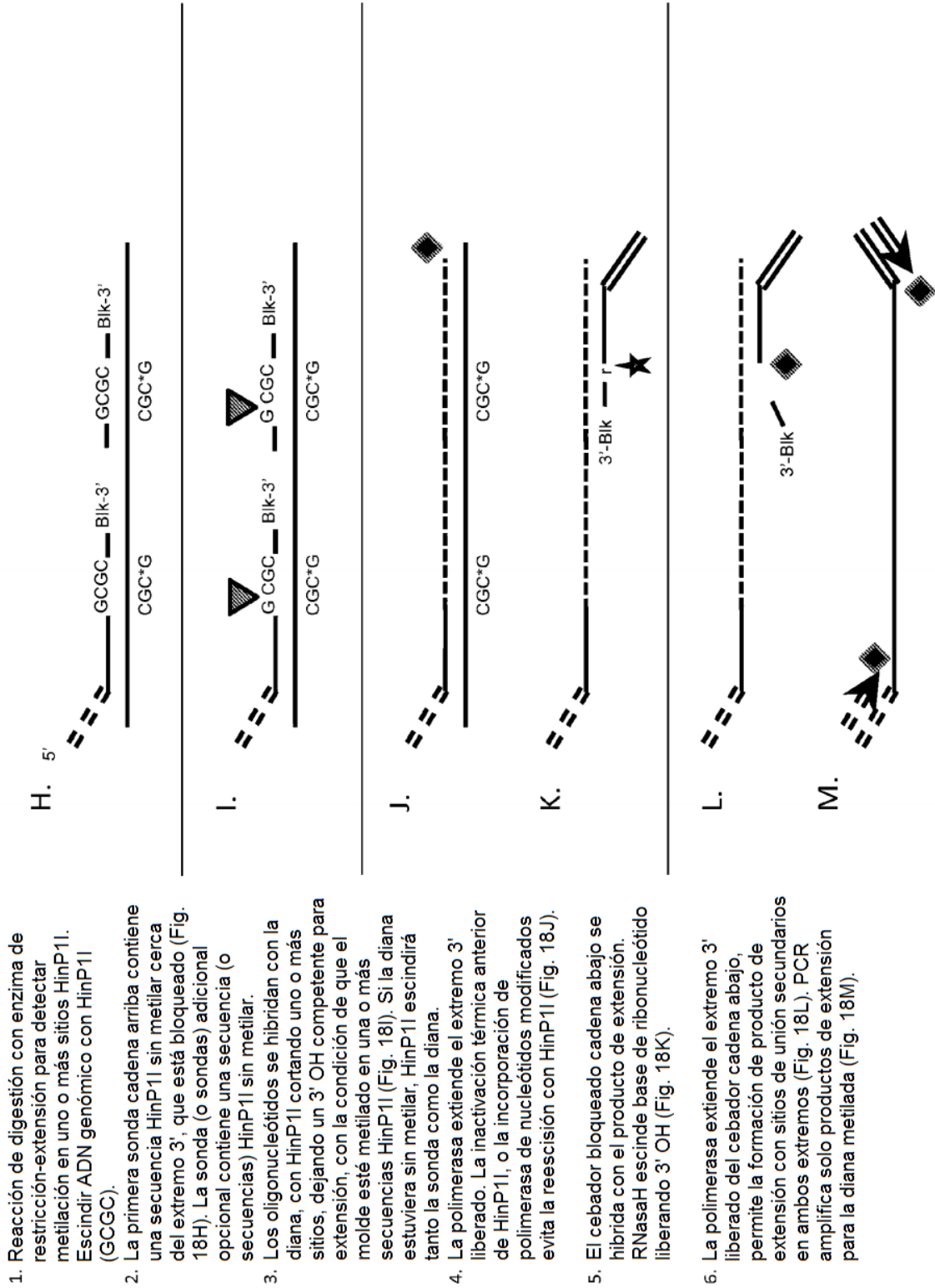
Figuras 16A-16D



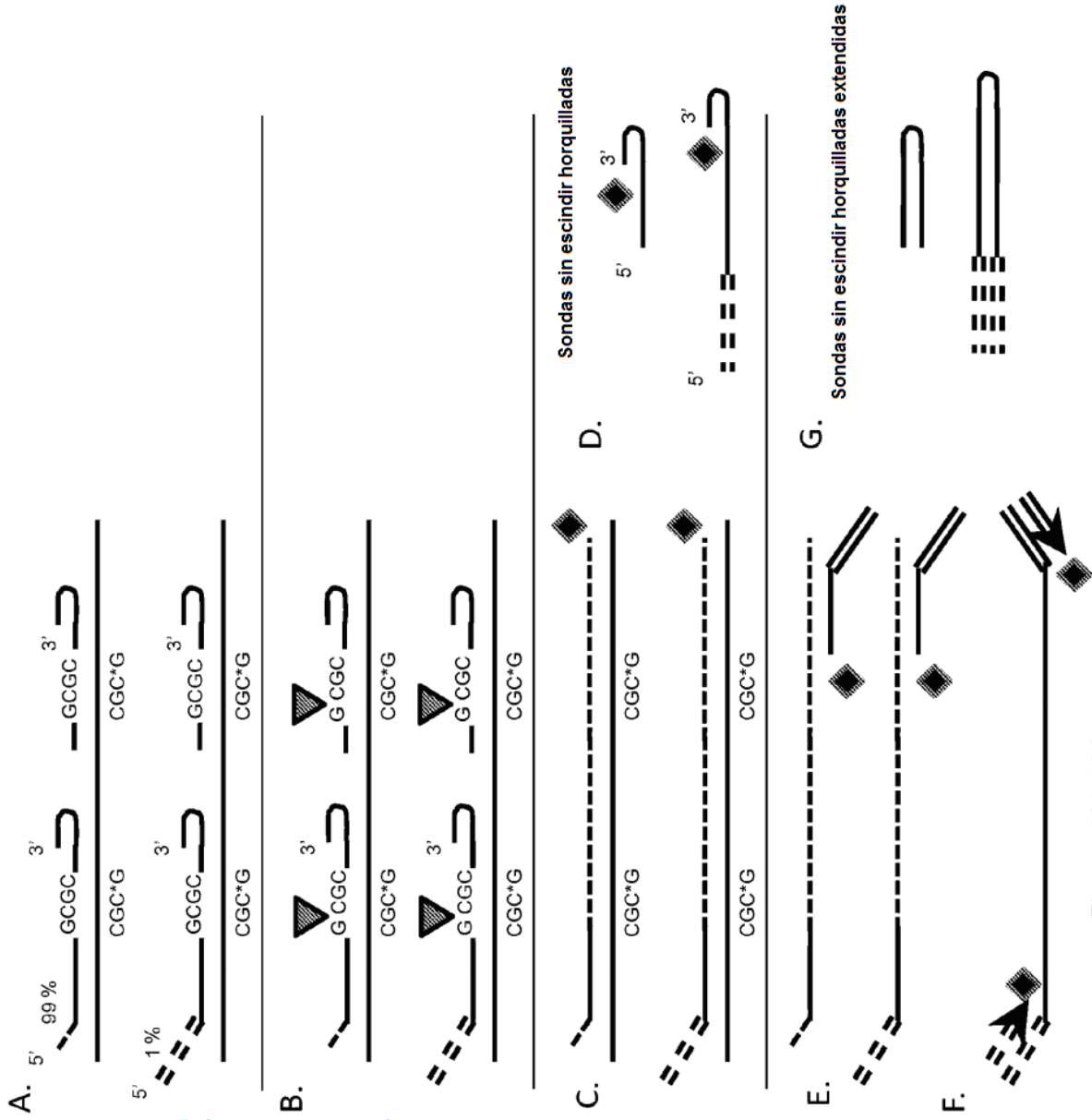
Figuras 17A-17E



Figuras 18A-18G

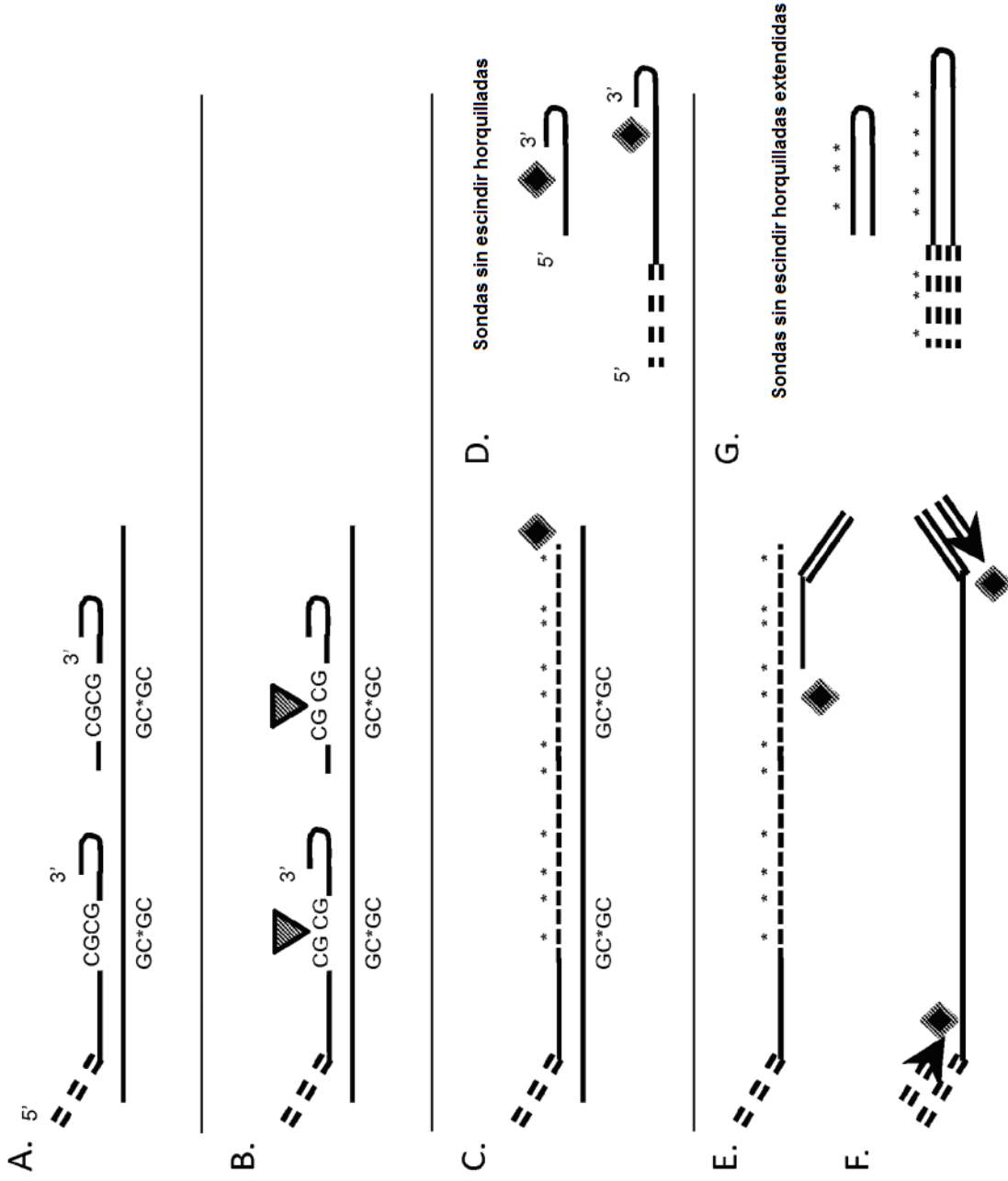


Figuras 18H-18M



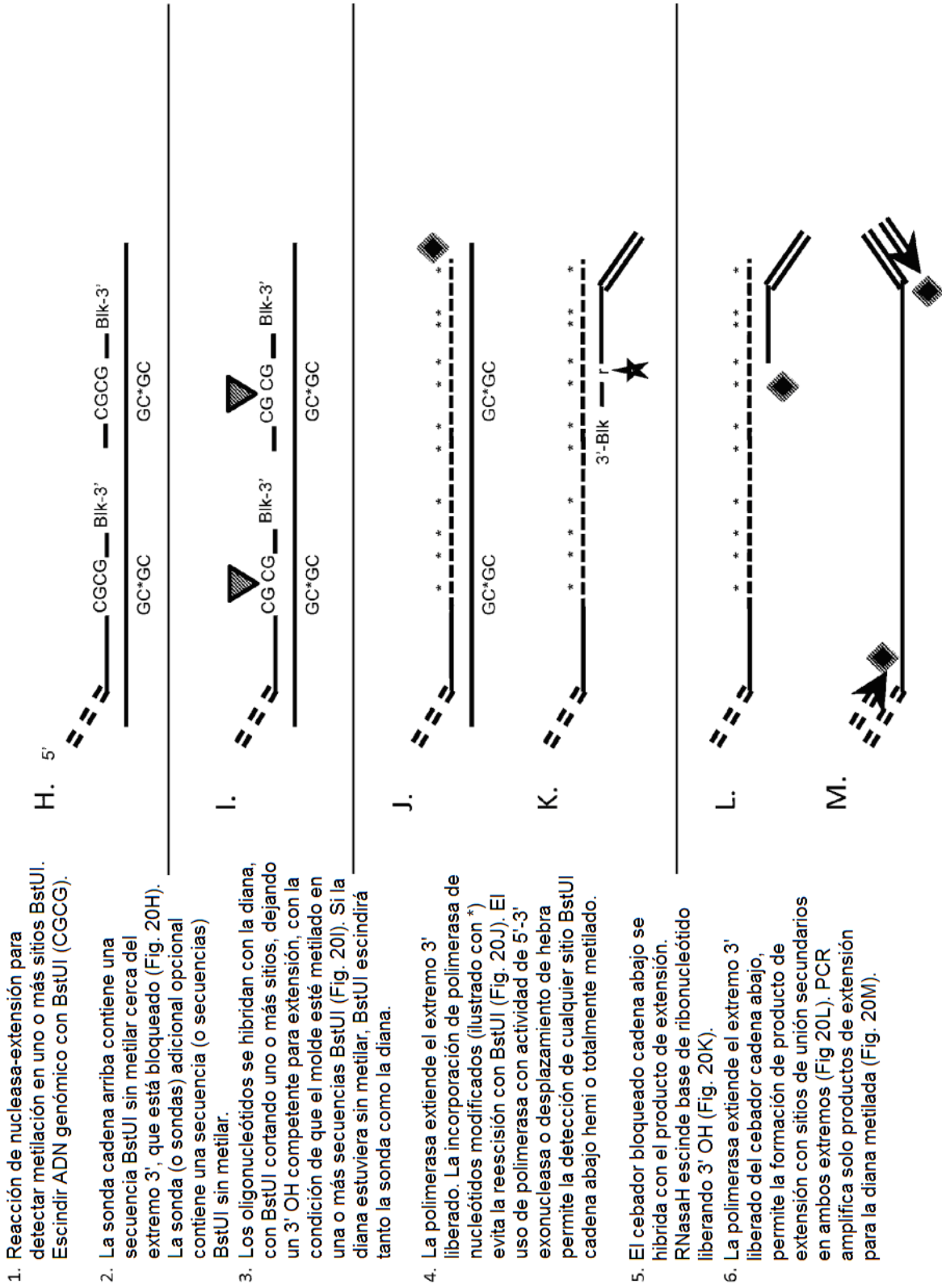
Figuras 19A-19G

1. Reacción de digestión con enzima de restricción-extensión para detectar metilación en uno o más sitios HinP1I en ADN de control. Escindir ADN genómico con HinP1I (GCGC).
2. Los oligonucleótidos se hibridan con la diana (Fig. 19A), con HinP1I cortando uno o más sitios, dejando un 3' OH competente para extensión, con la condición de que el molde esté metilado en una o más secuencias HinP1I (Fig. 19B). Si la diana estuviera sin metilar, HinP1I escindiría tanto la sonda como la diana.
3. La polimerasa extiende el extremo 3' liberado (Fig. 19C). La inactivación térmica anterior de HinP1I, o la incorporación de polimerasa de nucleótidos modificados evita la reescisión con HinP1I. Las sondas sin ligar forman horquillas (Fig. 19D).
4. Las sondas horquilladas sin escindir se extienden con polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, el cebador secundario (Fig. 19G). La adición posterior de cebador cadena abajo permite la formación de producto de extensión con sitios de unión secundarios en ambos extremos (Fig. 19E). PCR amplifica solo productos de extensión para la diana metilada (Fig. 19F). El 99 % del producto tiene marcador no amplificante; solamente un 1 % del ADN_g se amplifica indicando la señal generada a partir de un ADN metilado al 1 % equivalente.



1. Reacción de digestión con enzima de restricción-extensión para detectar hemimetilación en uno o más sitios BstUI. Escindir el ADN genómico con BstUI (CGCG).
2. Los oligonucleótidos se hibridan con la diana (Fig. 20A), con BstUI cortando uno o más sitios, dejando un 3' OH competente para extensión, con la condición de que el molde esté metilado en una o más secuencias BstUI (Fig. 20B). Si la diana estuviera sin metilar, BstUI escindiría tanto la sonda como la diana hibridada.
3. La polimerasa extiende el extremo 3' liberado. La incorporación de polimerasa de nucleótidos modificados (ilustrado con *) evita la reescisión con BstUI (Fig. 20C). El uso de polimerasa con actividad de 5'-3' exonucleasa o desplazamiento de hebra permite la detección de cualquier sitio BstUI cadena abajo hemi o totalmente metilado. Las sondas sin ligar forman horquillas (Fig. 20D).
4. Las sondas horquilladas sin escindir se extienden con polimerasa para bloquear la unión de, y posterior extensión o amplificación con, el cebador secundario (Fig. 20G). La adición posterior de cebador cadena abajo permite la formación de producto de extensión con sitios de unión secundarios en ambos extremos (Fig. 20E). PCR amplifica solo productos de extensión para la diana metilada (Fig. 20F).

Figuras 20A-20G



Figuras 20H-20M

1. Reacción de nucleasa-extensión para detectar metilación en uno o más sitios BstUI. Escindir ADN genómico con BstUI (CGCG).
2. La sonda cadena arriba contiene una secuencia BstUI sin metilar cerca del extremo 3', que está bloqueado (Fig. 20H). La sonda (o sondas) adicional opcional contiene una secuencia (o secuencias) BstUI sin metilar.
3. Los oligonucleótidos se hibridan con la diana, con BstUI cortando uno o más sitios, dejando un 3' OH competente para extensión, con la condición de que el molde esté metilado en una o más secuencias BstUI (Fig. 20I). Si la diana estuviera sin metilar, BstUI escindiría tanto la sonda como la diana.
4. La polimerasa extiende el extremo 3' liberado. La incorporación de polimerasa de nucleótidos modificados (ilustrado con *) evita la reescisión con BstUI (Fig. 20J). El uso de polimerasa con actividad de 5'-3' exonucleasa o desplazamiento de hebra permite la detección de cualquier sitio BstUI cadena abajo hemi o totalmente metilado.
5. El cebador bloqueado cadena abajo se hibrida con el producto de extensión. RNasaH escinde base de ribonucleótido liberando 3' OH (Fig. 20K).
6. La polimerasa extiende el extremo 3' liberado del cebador cadena abajo, permite la formación de producto de extensión con sitios de unión secundarios en ambos extremos (Fig 20L). PCR amplifica solo productos de extensión para la diana metilada (Fig. 20M).

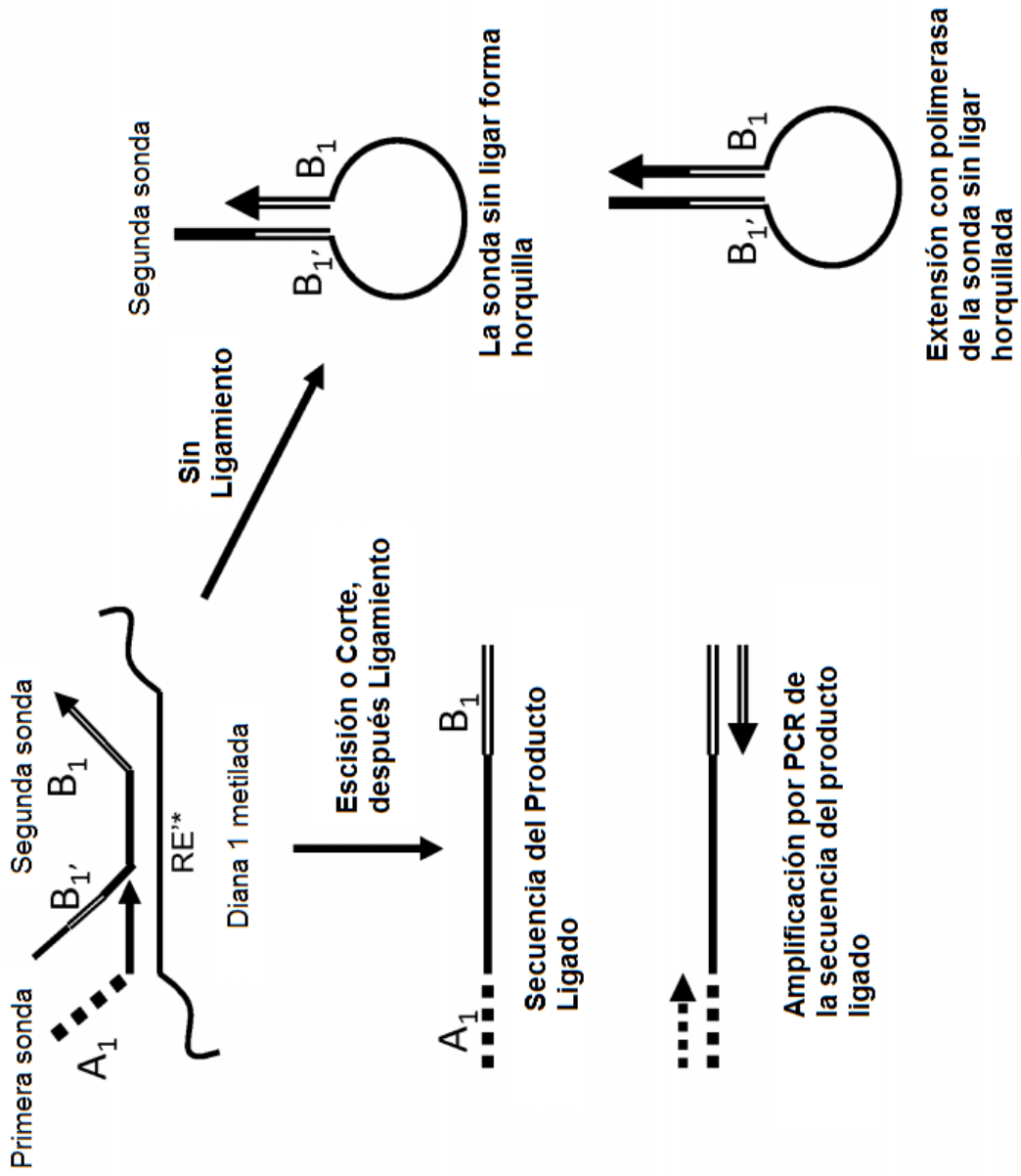
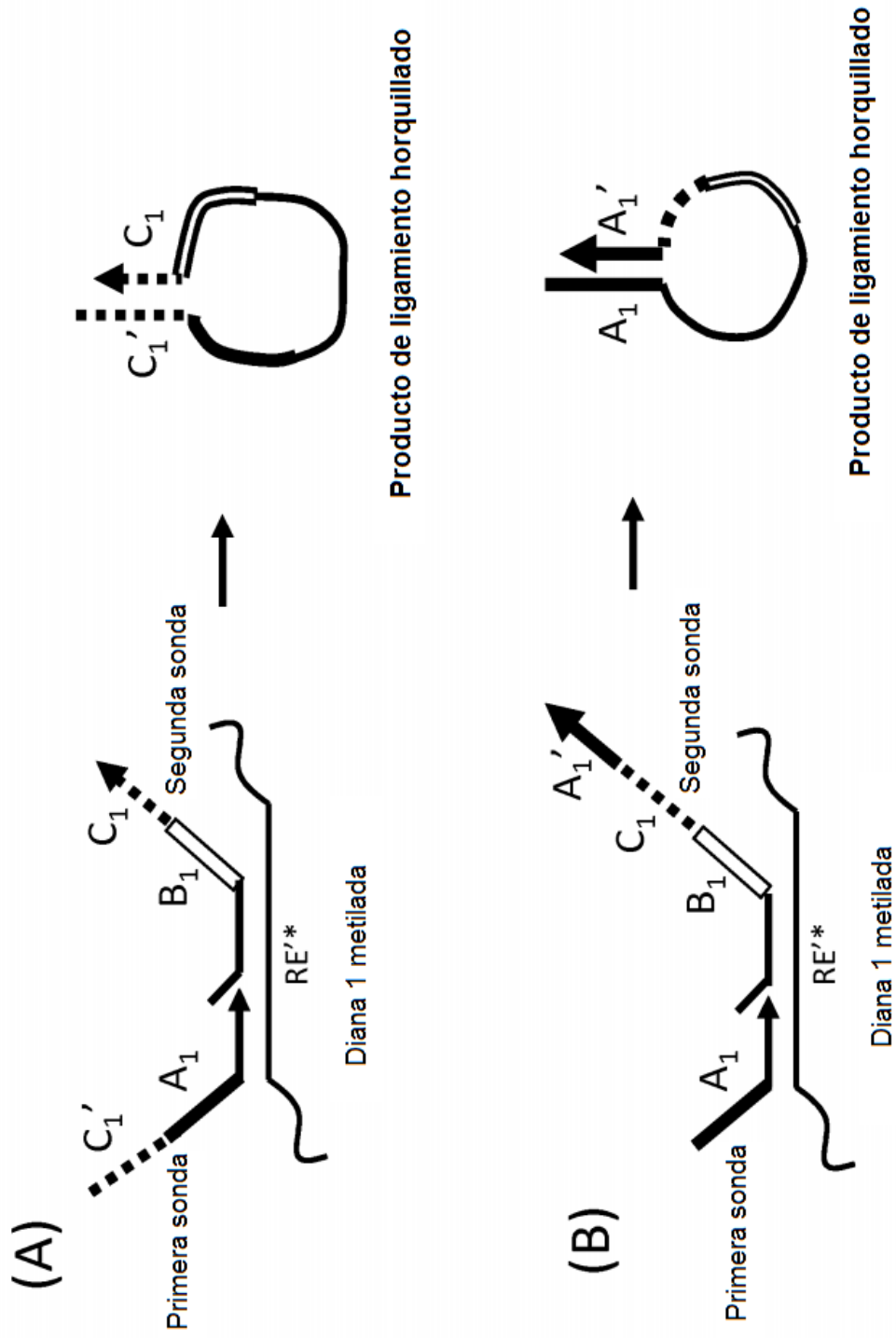


Figura 21



Figuras 22A-22B

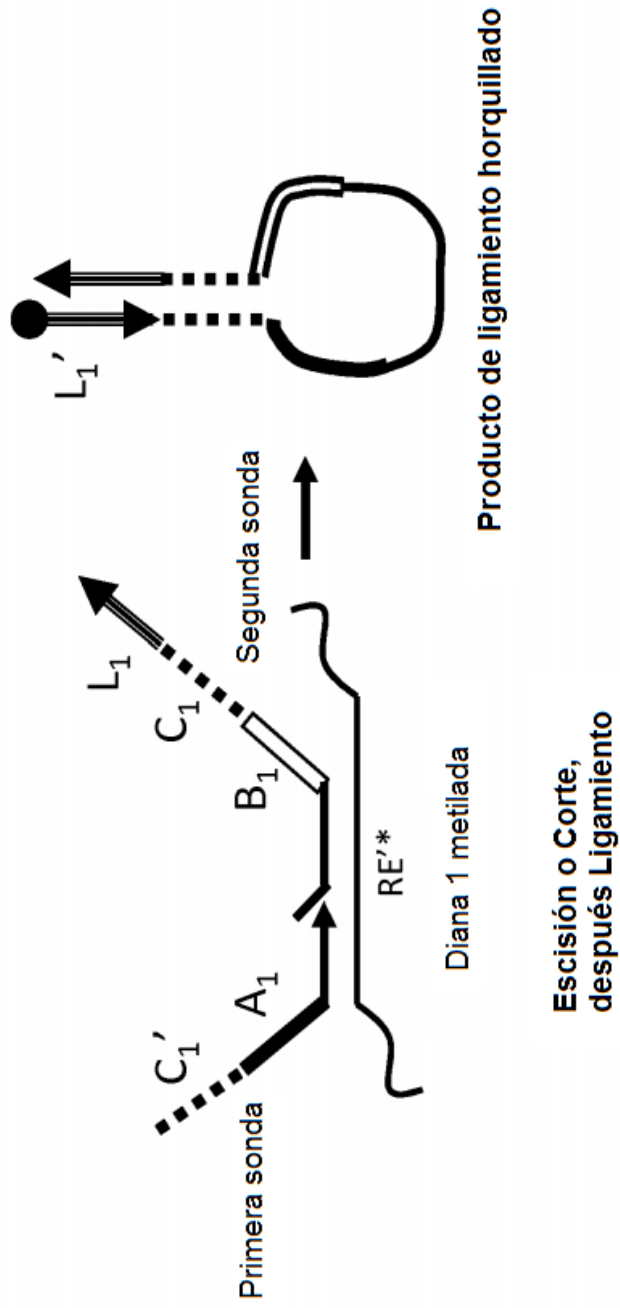
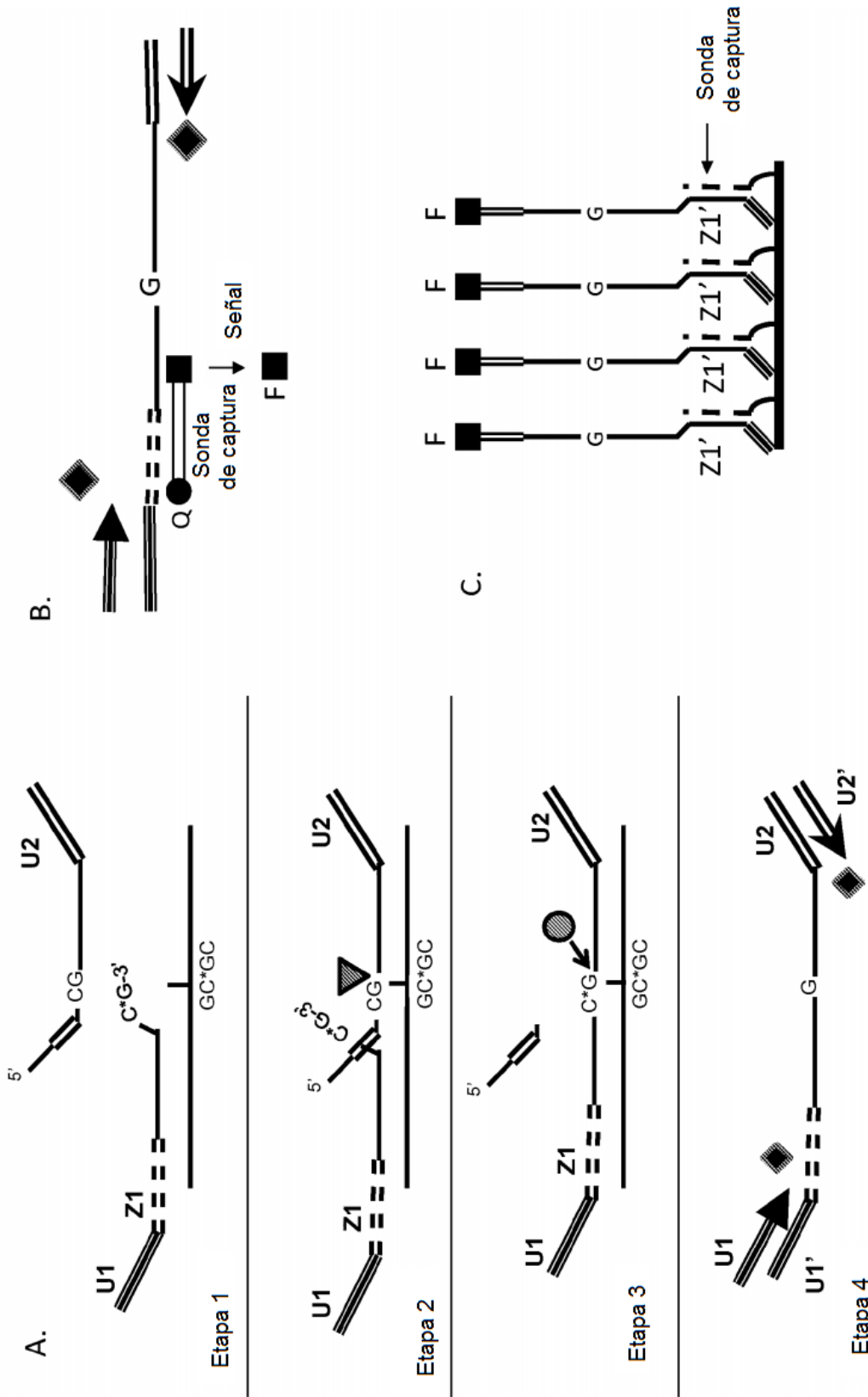
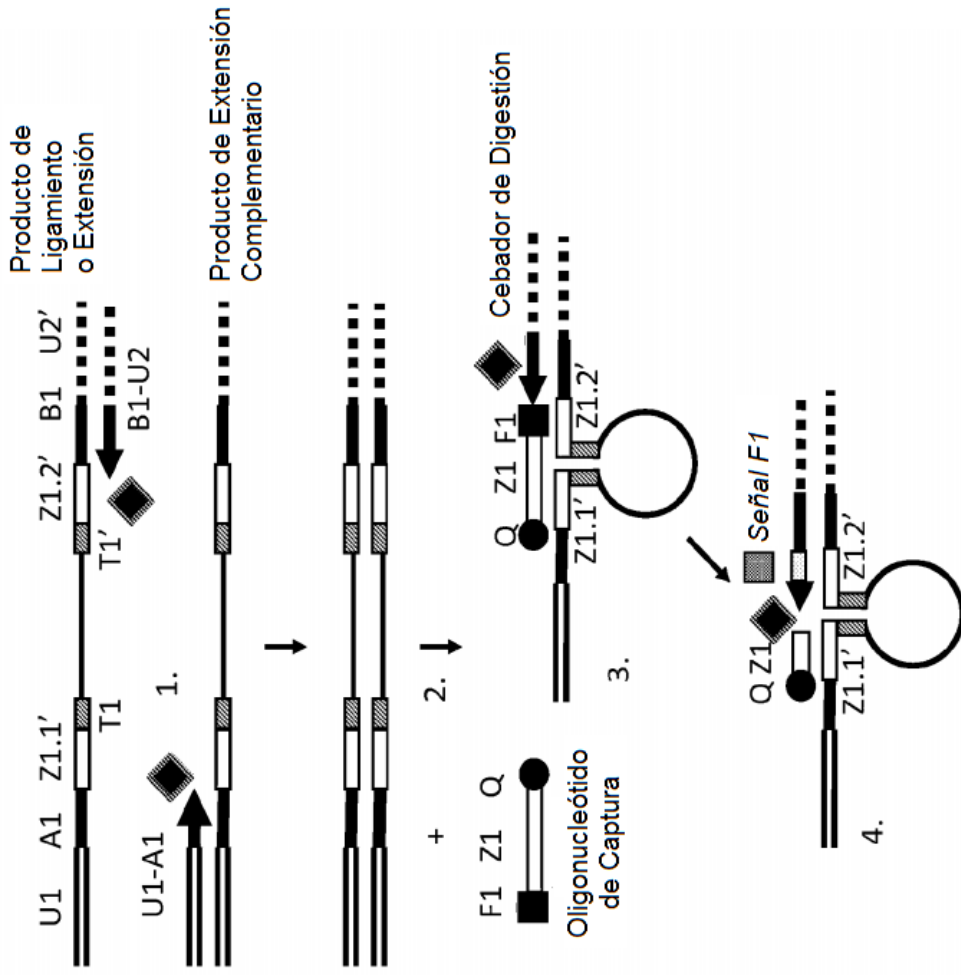


Figura 22C



Figuras 23A-23C



1. Cebado en el producto de ligamiento o extensión codificado con marcador (de la forma U1-A1-Z1.1'-T1-T1-secuencias diana-T1'-Z1.2'-B1-U2'), y el producto de extensión complementario del mismo.

2. Productos de ADNbc de PCR.

3. Formación de horquilla: después de fundir el ADNbc y disminuir la temperatura se forma la horquilla con el tallo entre Z1.1' + Z1.2'.

4. La señal se genera por la actividad de 5' nucleasa de polimerasa cuando extiende el cebador B1-U2, o U2, el "cebador de digestión". En cuanto la polimerasa ha atravesado Z1.2', el tallo corto entre Z1.2' y Z1.1' se desmorona y la polimerasa continúa extendiéndose para crear el producto de ADNbc.

Figura 24

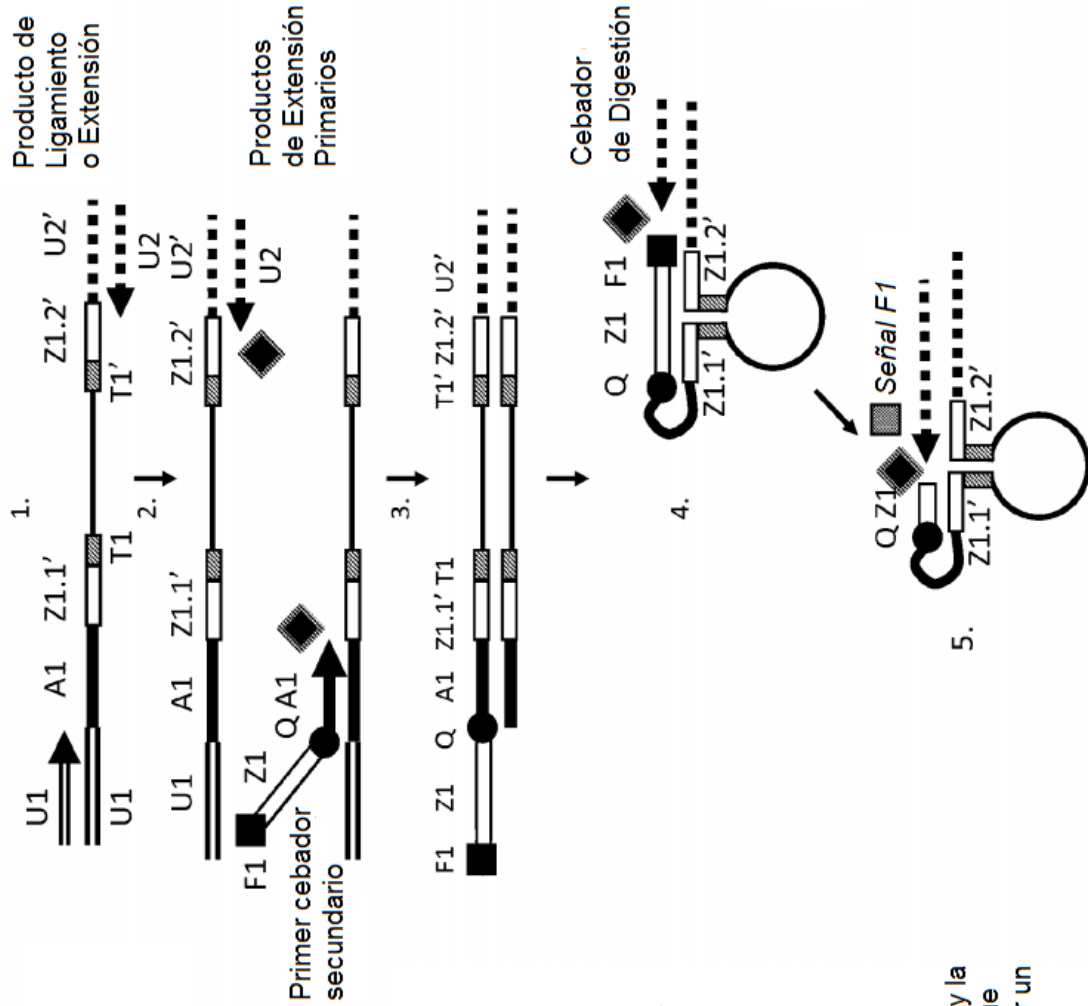


Figura 25

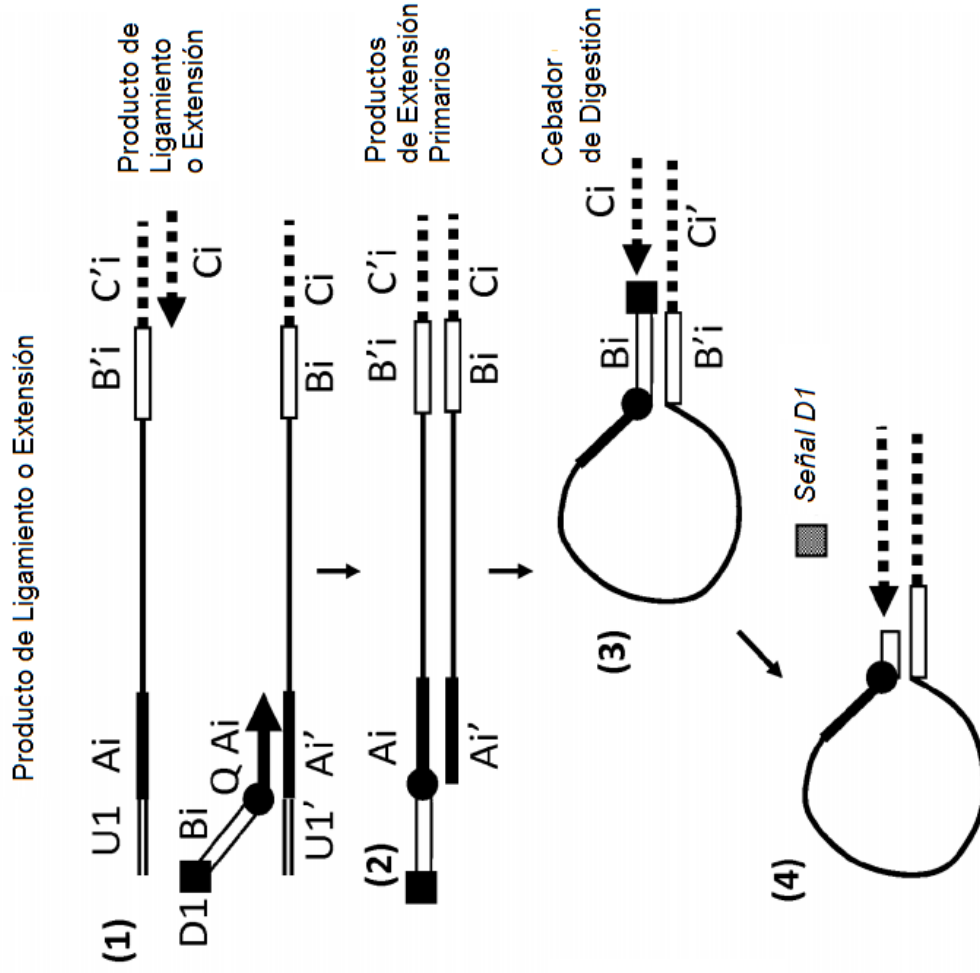
1. Amplificación por PCR universal de producto de ligamiento o extensión (de la forma U1-A1-Z1.1-T1-Z1.2-U2').

2. Cebado en ambas hebras de productos de extensión primarios de los productos de ligamiento.

3. Productos de ADNbc de PCR; el bloqueador de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

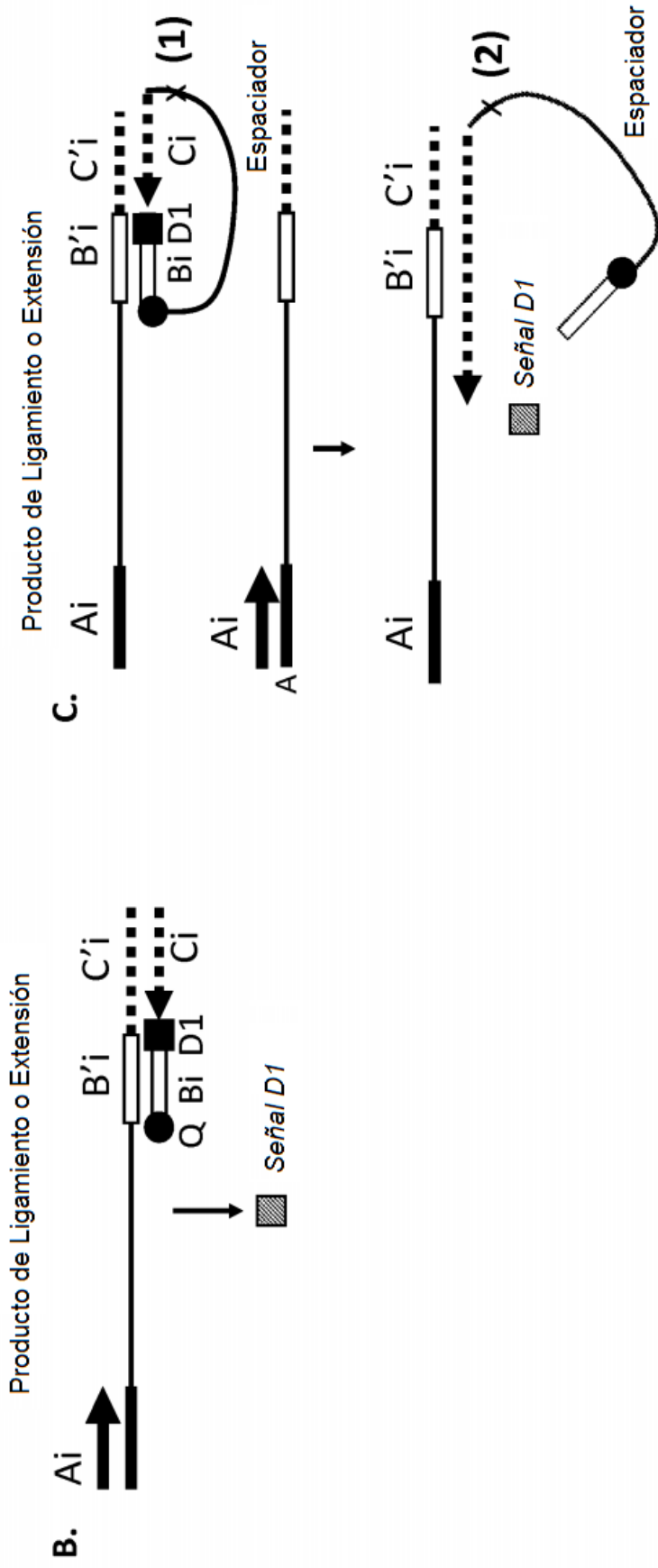
4. Formación de horquilla doble: después de fundir el ADNbc y disminuir la temperatura se forman dos horquillas con los tallos entre Z1 y Z1.1' + Z1.2'.

5. Se genera una señal por la actividad de 5' nucleasa de polimerasa cuando extiende el cebador U2, el "cebador de digestión". En cuanto la polimerasa ha atravesado Z1.2', el tallo corto entre Z1.2' y Z1.1' se desmorona y la polimerasa continúa extendiéndose hasta que llega al bloqueador de polimerasa para crear un producto de ADNbc.



1. Cebado en ambas hebras de los productos de extensión o ligamiento codificados con marcador (de la forma U1-Ai-secuencias diana-B'1-C'i).
2. Productos de ADNbc de PCR; el bloqueador de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.
3. Formación de horquilla: después de fundir el ADNbc y disminuir la temperatura se forma una horquilla con el tallo entre B1 y B1'.
4. Se genera una señal por la actividad de 5' nucleasa de polimerasa cuando extiende el cebador Ci, el "cebador de digestión".

Figura 26A



Figuras 26B-26C

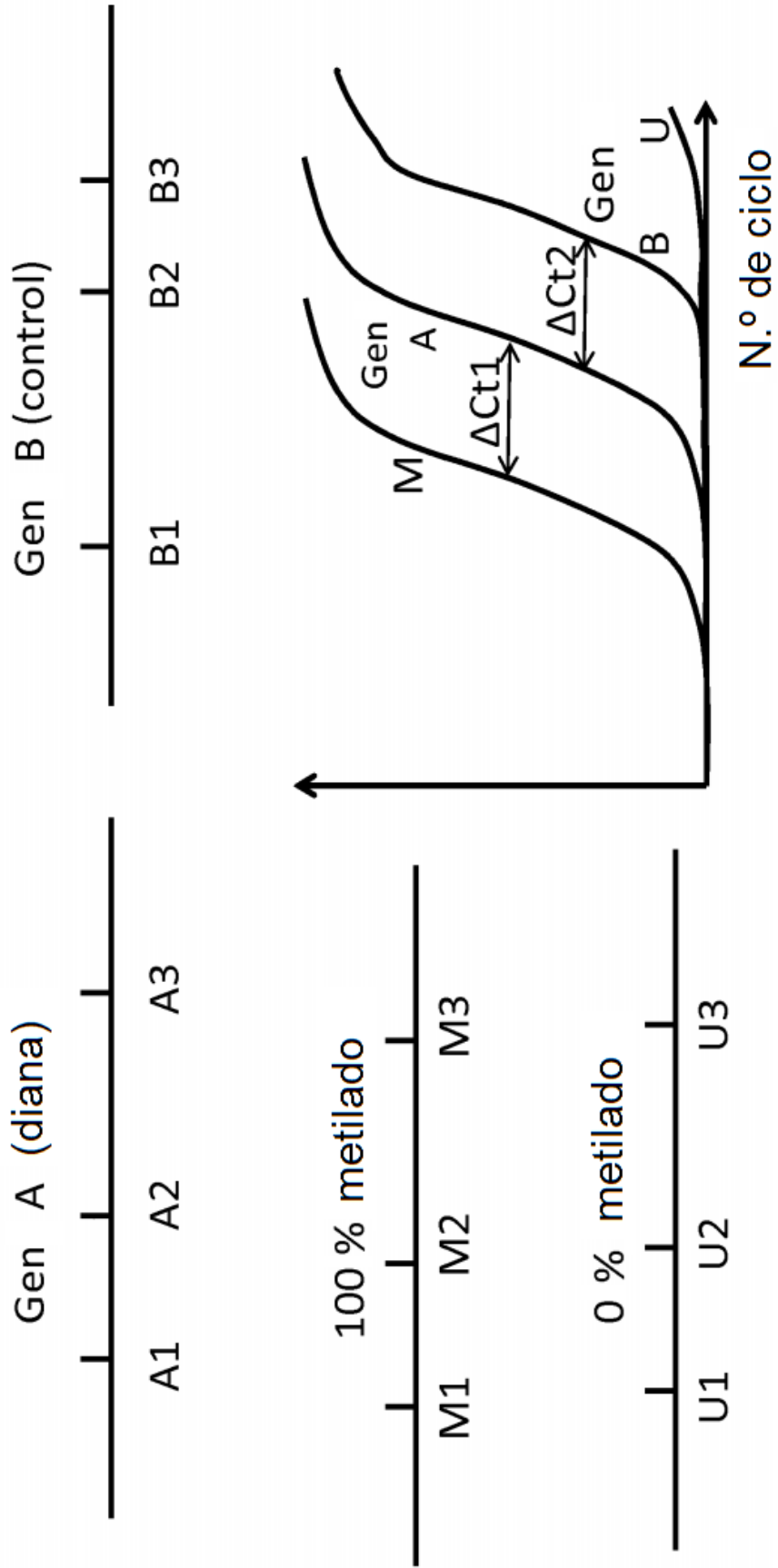


Figura 27