

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 904 816**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/6874 (2008.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2013 E 17202409 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.11.2021 EP 3321378**

54 Título: **Composiciones para recuento molecular**

30 Prioridad:

27.02.2012 US 201261603921 P

21.12.2012 US 201261745385 P

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

06.04.2022

73 Titular/es:

BECTON, DICKINSON AND COMPANY (100.0%)

1 Becton Drive

Franklin Lakes, NJ 07417, US

72 Inventor/es:

FU, GLENN, K.;

FODOR, STEPHEN, P.A. y

WILHELMY, JULIE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 904 816 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

Composiciones para recuento molecular

5 Campo de la invención

Se describen métodos y usos de recuento molecular. Las moléculas se pueden contar mediante secuenciación y registro de la cantidad de apariciones de una molécula diana. Las moléculas también se pueden contar mediante hibridación de la molécula con un soporte sólido y detección de las moléculas hibridadas. En algunos casos, las moléculas que se contarán se etiquetan. Las moléculas que se contarán también se pueden amplificar.

Antecedentes de la invención

La determinación precisa de la cantidad de ácidos nucleicos es necesaria en una amplia variedad de mediciones clínicas y de investigación. La concentración promedio de ácidos nucleicos (ARN o ADN), cuando se disuelven en una disolución, se puede determinar mediante espectrofotometría de absorbancia de luz UV o mediante manchas fluorescentes que se unen al ADN. Sin embargo, la medición requerida a menudo no es solo de la cantidad total de ácidos nucleicos presentes, sino específicamente de una o más especies de interés contenidas y mezcladas con todos los otros ácidos nucleicos en la muestra. En estos casos, la molécula de ácido nucleico de interés normalmente se distingue de todos los otros ácidos nucleicos a través de una secuencia de nucleótidos definida que es exclusiva de la especie de interés. Para su detección e identificación se puede utilizar un ribo o desoxirribonucleótido corto sintético con una secuencia complementaria al ácido nucleico de interés. Por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utiliza un par de estos oligonucleótidos para que sirvan como cebadores de apareamiento para ciclos repetidos de polimerización del ADN mediada por enzimas polimerasa de ADN. Las micromatrices de ADN son otro método de detección común donde los oligonucleótidos se inmovilizan sobre un soporte sólido para hibridarse con moléculas de ADN que llevan las secuencias complementarias. Aunque ambos métodos de PCR y micromatriz pueden proporcionar la detección específica, la determinación precisa de la cantidad de moléculas detectadas es difícil (especialmente cuando están presentes en escasa abundancia o cuando están contenidas dentro de un gran fondo de otros ácidos nucleicos). En el caso de la PCR (denominada también algunas veces PCR cuantitativa, qPCR, TaqMan o PCR en tiempo real), la cantidad de moléculas de ADN amplificadas representa una estimación de su concentración en la disolución de partida. En el caso de las micromatrices, la cantidad de ADN hibridado es una estimación de su concentración en la disolución. En ambos casos, solo se pueden hacer mediciones de concentración relativas y la cantidad absoluta de copias de ácido nucleico en la muestra no se puede predeterminar de manera precisa. Sin embargo, cuando se incluyen ácidos nucleicos de referencia con concentraciones predeterminadas en el ensayo, se pueden hacer comparaciones relativas con respecto a esta referencia estándar para estimar la cantidad absoluta de copias de ácidos nucleicos que se detectan.

La PCR digital es un método que se puede utilizar para determinar la cantidad absoluta de moléculas de ADN de una secuencia de nucleótidos específica (Sykes et al. *Biotechniques* 13: 444-449 (1992), Vogelstein et al. *Digital PCR. Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9236-9241 (1999)). En este método, la disolución de ácido nucleico se diluye y particiona de manera estocástica en recipientes individuales de tal manera que haya en promedio menos de una molécula cada dos recipientes. A continuación, se utiliza PCR para detectar la presencia de la molécula de ácido nucleico de interés en cada recipiente. Si se supone una partición cuantitativa, la cantidad de recipientes disponibles para la separación estocástica determina el intervalo dinámico. Se pueden utilizar la microfabricación y gotas de emulsión en picolitros para aumentar la cantidad de recipientes disponibles para extender, de esta manera, el intervalo dinámico de la medición (Fan et al. *Am J Obstet Gynecol* 200: 543 e541-547 (2009), Kalinina et al. *Nucleic Acids Res* 25: 1999-2004 (1997)). Debido a las restricciones físicas de la fabricación de grandes cantidades de recipientes separados y de llevar a cabo este gran número de reacciones, en la práctica, el método de PCR digital se limita a investigaciones con solo una pequeña cantidad de moléculas de ADN diferentes a la vez.

Recientemente, se exhibió un nuevo método para determinar la cantidad absoluta de moléculas de ADN, donde se pueden contar las copias idénticas de moléculas de ADN individuales después del acoplamiento estocástico de un conjunto de diversas etiquetas de ácido nucleico (Fu et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 9026-9031 (2011)). A diferencia de la PCR digital, se trata de un método muy paralelo capaz de contar muchas moléculas de ADN diferentes de manera simultánea. En este método, cada copia de una molécula se acopla de manera aleatoria con una etiqueta de ácido nucleico corta que se elige entre un gran reservorio no agotable de diversas etiquetas. La diversidad posterior de moléculas etiquetadas se rige por la estadística de la elección aleatoria y depende de la cantidad de copias de moléculas idénticas en la colección en comparación con la cantidad de tipos de etiquetas. Después de que se etiquetan las moléculas, se pueden amplificar para que se puedan utilizar métodos de detección simples con umbral presente/ausente para cada una. Contar la cantidad de dianas etiquetadas de manera distinta revela la cantidad original de moléculas de cada especie. A diferencia de la PCR digital, que expande de manera estocástica moléculas en el espacio físico, el método de etiquetado estocástico expande moléculas idénticas en el espacio químico. Una diferencia importante con respecto a la PCR digital es que el método de etiquetado

estocástico no requiere la dificultosa separación física de moléculas idénticas en recipientes físicos individuales. La estrategia es práctica, y después del etiquetado, se puede utilizar un simple dispositivo detector tal como una micromatriz con secuencias sonda complementarias a las etiquetas para identificar y contar la cantidad de etiquetas presentes. Además, cuando las etiquetas estocásticas se acoplan con moléculas de ADN que se preparan para lecturas de secuenciación de ADN, la secuencia de etiquetado puede servir como marcadores de conteo discretos para la cuantificación absoluta, o como identificadores exclusivos para distinguir cada plantilla marcada originalmente con respecto a sus moléculas de segunda generación amplificadas (Kinde et al. Proc Natl Acad Sci USA 108: 9530-9535 (2011)).

La DE102008025656 describe un método para la determinación cuantitativa de ácidos nucleicos en una muestra, especialmente para la determinación cuantitativa de transcripciones de genes, por ejemplo, ARNm, ADNc, microARN, ARN no codificante y marcadores para la conducción del método de análisis. La WO2010117620 describe métodos para preparar una biblioteca de ADNc a partir de células individuales liberando ARNm de cada célula individual para proporcionar una pluralidad de muestras de ARNm individuales, sintetizando el ADNc de las muestras de ARNm individuales, etiquetando el ADNc individual, agrupando las muestras de ADNc etiquetadas y amplificando las muestras de ADNc agrupadas para generar una biblioteca de ADNc. KIVIOJA T et al. (NATURE METHODS, 2012, vol. 9(1):72-74), describe el recuento de números absolutos de moléculas usando identificadores moleculares únicos. ISLAM S et al., (GENOME RESEARCH, 2011, vol. 21(7):1160-7) describe la caracterización del paisaje transcripcional unicelular mediante secuenciación de ARN multiplex. La JP 2001 078768 describe un método para analizar la proporción relativa de expresión génica.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

Se divulga un método de transcripción inversa digital que comprende: a) poner en contacto una muestra que comprende una pluralidad de moléculas de ARN con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos para producir una molécula de ARN etiquetada, en el que la pluralidad de moléculas de ARN comprende al menos 2 moléculas de ARNm de diferentes secuencias; la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende al menos 2 marcadores oligonucleotídicos de diferentes secuencias; y la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende una secuencia oligodT; b) llevar a cabo una reacción de síntesis de primera cadena al poner en contacto las moléculas de ARN etiquetadas con una enzima transcriptasa inversa para producir una molécula de ADNc etiquetada; y c) detectar la molécula de ADNc etiquetada al hibridar la molécula de ADNc etiquetada con un soporte sólido.

Se divulga un método de reacción en cadena de hibridación basado en etiquetas estocásticas que comprende etiquetar de manera estocástica una o más moléculas de ácido nucleico con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos horquillados, en donde el marcador oligonucleotídico horquillado comprende una prolongación; y la una o más moléculas de ácido nucleico actúan como iniciadores de una reacción en cadena de hibridación.

Al menos una porción del marcador oligonucleotídico horquillado puede hibridarse con al menos una porción de la una o más moléculas de ácido nucleico. El marcador oligonucleotídico horquillado puede comprender una secuencia oligodT. La una o más moléculas de ácido nucleico pueden comprender uno o más adaptadores. Al menos una porción del marcador oligonucleotídico horquillado puede hibridarse con al menos una porción del uno o más adaptadores. Al menos un marcador oligonucleotídico horquillado de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos horquillados puede comprender una o más etiquetas. Al menos un marcador oligonucleotídico horquillado de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos horquillados puede comprender dos o más etiquetas.

Cada marcador oligonucleotídico horquillado de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos horquillados puede comprender una o más etiquetas. Cada marcador oligonucleotídico horquillado de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos horquillados puede comprender dos o más etiquetas. En algunos casos, el marcador oligonucleotídico horquillado no comprende una etiqueta.

La pluralidad de marcadores oligonucleotídicos horquillados puede comprender uno o más marcadores oligonucleotídicos horquillados con una prolongación hacia 5', marcadores oligonucleotídicos horquillados con una prolongación hacia 3' o una combinación de estos.

La porción de tallo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de uno o más nucleótidos. La porción de tallo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de dos o más nucleótidos. La porción de tallo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de tres o más nucleótidos. La porción de tallo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de cuatro o más nucleótidos. La porción de tallo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de cinco o más nucleótidos. La porción de tallo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de seis o más nucleótidos. La porción de tallo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de siete o más nucleótidos. La porción de tallo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de ocho o más

nucleótidos. La porción de tallo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de nueve o más nucleótidos. La porción de tallo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de diez o más nucleótidos. La porción de tallo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos.

5 La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de uno o más nucleótidos. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de dos o más nucleótidos. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de tres o más nucleótidos. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de cuatro o más nucleótidos. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de cinco o más nucleótidos. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de seis o más nucleótidos. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de siete o más nucleótidos. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de ocho o más nucleótidos. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de nueve o más nucleótidos. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de diez o más nucleótidos. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede tener una longitud de 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos.

20 El marcador oligonucleotídico horquillado puede comprender una región identificadora exclusiva. La región identificadora exclusiva puede estar en la porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado. La región identificadora exclusiva puede estar en la porción de tallo del marcador oligonucleotídico horquillado. La región identificadora exclusiva puede estar en la porción de prolongación del marcador oligonucleotídico horquillado.

25 La etiqueta puede comprender una región identificadora exclusiva.

En algunas realizaciones, el marcador oligonucleotídico comprende, además, una región identificadora exclusiva. En algunas realizaciones, la región identificadora exclusiva tiene una longitud de al menos un nucleótido. En algunas realizaciones, el marcador oligonucleotídico comprende, además, un sitio de unión a un cebador universal. En algunas realizaciones, el marcador oligonucleotídico tiene una longitud de al menos un nucleótido.

30 En algunas realizaciones, el soporte sólido es una matriz. En algunas realizaciones, el soporte sólido es una matriz direccionable. En algunas realizaciones, el soporte sólido es una matriz de marcador Affymetrix 3K, una matriz impresa sin contacto Arrayjet o una matriz Applied Microarrays Inc (AMI). En algunas realizaciones, el soporte sólido es una perla.

35 También se divulga en la presente un método de análisis celular que comprende: a) poner en contacto una muestra con una pluralidad de moléculas con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos para producir una molécula etiquetada, en el que: la pluralidad de moléculas comprende al menos 2 moléculas de diferentes secuencias; la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende al menos 2 marcadores oligonucleotídicos de diferentes secuencias; y la muestra es de al menos una célula; y b) detectar la molécula etiquetada al hibridar la molécula etiquetada con un soporte sólido.

40 Se divulga un método de amplificación clonal que comprende: a) etiquetar de manera estocástica una pluralidad de moléculas con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos para producir una molécula etiquetada, en el que: la pluralidad de moléculas comprende al menos 2 moléculas de diferentes secuencias; la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende al menos 2 marcadores oligonucleotídicos de diferentes secuencias; b) amplificar las moléculas etiquetadas para producir un amplicón etiquetado; y c) detectar el amplicón etiquetado.

50 También se describe en la presente memoria un kit que comprende: a) una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos, en el que un marcador oligonucleotídico de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende: una región específica de diana; y una región identificadora exclusiva; y b) una enzima.

55 En algunas realizaciones, la enzima es una enzima transcriptasa inversa. En algunas realizaciones, la enzima es una ligasa. En algunas realizaciones, la enzima es una polimerasa. En algunas realizaciones, la enzima es una ribonucleasa. En algunas realizaciones, la enzima es una desoxinucleasa. En algunas realizaciones, la enzima es una endonucleasa.

60 En algunas realizaciones, el marcador oligonucleotídico tiene una longitud de al menos 25 nucleótidos. En algunas realizaciones, la región identificadora exclusiva tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, la región específica de diana tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, la región específica de diana comprende una secuencia oligodT. En algunas realizaciones, el marcador oligonucleotídico comprende, además, un sitio de unión a un cebador universal.

65 En algunas realizaciones, el kit comprende, además, un soporte. En algunas realizaciones, el soporte es un soporte semisólido. En algunas realizaciones, el soporte es un soporte sólido. En algunas realizaciones, el soporte

sólido es una matriz. En algunas realizaciones, el soporte es una matriz direccionable. En algunas realizaciones, el soporte es una matriz de marcador Affymetrix 3K, una matriz impresa sin contacto Arrayjet o una matriz Applied Microarrays Inc (AMI). En algunas realizaciones, el soporte es una perla.

5 En algunas realizaciones, el kit comprende, además, un cebador. En algunas realizaciones, el cebador es un cebador universal. En algunas realizaciones, el cebador se une al marcador oligonucleotídico. En algunas realizaciones, el cebador se une al sitio de unión a cebador universal del marcador oligonucleotídico.

10 En algunas realizaciones, el kit comprende, además, un oligo testigo. En algunas realizaciones, el oligo testigo comprende al menos 15 nucleótidos. En algunas realizaciones, el oligo testigo es un oligo testigo de hibridación brillante. En algunas realizaciones, el oligo testigo es un oligo testigo de plantilla de muestra añadida. En algunas realizaciones, el marcador oligonucleotídico comprende, además, una etiqueta.

15 En algunas realizaciones, el cebador comprende, además, una etiqueta. En algunas realizaciones, el oligo de control comprende, además, una etiqueta. En algunas realizaciones, la etiqueta es una etiqueta de tinte. En algunas realizaciones, la etiqueta es un tinte Cy3. En algunas realizaciones, la etiqueta es un tinte Tye563.

En algunas realizaciones, el kit comprende, además, un tampón.

20 En algunas realizaciones, el kit comprende, además, un vehículo.

En algunas realizaciones, el kit comprende, además, un detergente.

25 También se describe en la presente memoria un sistema para determinar la cantidad absoluta de una pluralidad de moléculas de ácido nucleico. El sistema puede comprender a) una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos; y b) un detector para detectar al menos una porción de los marcadores oligonucleotídicos.

30 El detector puede comprender un detector de matriz, un lector fluorescente, un detector no fluorescente, un lector CR o una unidad exploradora. En algunas realizaciones, el método comprende, además, que el lector fluorescente es un lector fluorescente Sensovation o AG. En algunas realizaciones, el método comprende, además, que la unidad exploradora es plana.

35 El sistema puede comprender, además, un termociclador. En algunas realizaciones, el sistema comprende, además, un secuenciador. En algunas realizaciones, el sistema comprende, además, una cámara de hibridación.

40 El sistema puede comprender, además, un ordenador. En algunas realizaciones, el ordenador comprende un dispositivo de memoria. En algunas realizaciones, el dispositivo de memoria es capaz de almacenar datos. En algunas realizaciones, el sistema comprende, además, un programa informático. En algunas realizaciones, el sistema comprende, además, un programa de lectura informática.

45 En algunas realizaciones, el marcador oligonucleotídico comprende, además, una región identificadora exclusiva. En algunas realizaciones, la región identificadora exclusiva tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, la región identificadora exclusiva no se puede hibridar con la molécula. En algunas realizaciones, el marcador oligonucleotídico comprende, además, un sitio de unión a un cebador universal. En algunas realizaciones, el marcador oligonucleotídico tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, el marcador oligonucleotídico comprende, además, una región específica de diana. En algunas realizaciones, la región específica de diana comprende una secuencia oligodT. En algunas realizaciones, la región específica de diana tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos. En algunas realizaciones, el método comprende, además, llevar a cabo una reacción de síntesis de primera cadena para producir una molécula de ADNc etiquetada.

50 En algunas realizaciones, amplificar la molécula etiquetada comprende llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa. Alternativamente, amplificar la molécula etiquetada puede comprender llevar a cabo una reacción de amplificación no basada en PCR. Amplificar la molécula etiquetada puede comprender la amplificación exponencial de la molécula etiquetada. Amplificar la molécula etiquetada puede comprender la amplificación lineal de la molécula etiquetada. Amplificar la molécula etiquetada puede comprender un método de amplificación basado en reacción en cadena de hibridación (HCR, por sus siglas en inglés).

55 Amplificar la molécula etiquetada puede comprender amplificar al menos la porción de etiqueta de la molécula etiquetada, la porción de molécula de la molécula etiquetada, o una combinación de estas.

60 En algunas realizaciones, el método comprende, además, llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en la molécula etiquetada o cualquier producto de esta para producir una molécula etiquetada bicatenaria. En algunas realizaciones, llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa comprende aparear un primer cebador específico diana con la molécula etiquetada o cualquier producto de esta. En algunas realizaciones, llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa comprende, además, aparear un cebador universal con el sitio

de unión a cebador universal del marcador oligonucleotídico. En algunas realizaciones, la reacción en cadena de la polimerasa comprende PCR absoluta, HD-PCR, Next Gen PCR, RTA digital o cualquier combinación de estos. En algunas realizaciones, el método comprende llevar a cabo una reacción PCR anidada con la molécula de ADNc etiquetada bicatenaria. En algunas realizaciones, llevar a cabo la reacción PCR anidada comprende desnaturalizar la molécula etiquetada o cualquier producto de esta para producir una molécula etiquetada monocatenaria desnaturalizada o cualquier producto de esta. En algunas realizaciones, llevar a cabo la reacción PCR anidada comprende, además, aparear un segundo cebador específico diana con la molécula etiquetada monocatenaria naturalizada o cualquier producto de esta. En algunas realizaciones, llevar a cabo la reacción PCR anidada comprende, además, aparear un cebador universal con el sitio de unión a cebador universal del marcador oligonucleotídico.

En algunas realizaciones, el método comprende, además, llevar a cabo una reacción de secuenciación para determinar la secuencia de al menos una porción del marcador oligonucleotídico, al menos una porción de la molécula etiquetada, un producto de esta, un complemento de esta, un complemento inverso de esta o cualquier combinación de estos.

En algunas realizaciones, detectar las moléculas etiquetadas o cualesquiera productos de estas comprende un detector de matriz, un lector fluorescente, un detector no fluorescente, un lector CR o una unidad exploradora. En algunas realizaciones, la molécula es una molécula de ácido nucleico.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARN. En algunas realizaciones, la molécula es un péptido. En algunas realizaciones, el péptido es un polipéptido.

En algunas realizaciones, la pluralidad de moléculas es de una célula. En algunas realizaciones, la muestra es de una única célula. En algunas realizaciones, la muestra es de menos de alrededor de 100 células. En algunas realizaciones, la muestra es de menos de alrededor de 50 células. En algunas realizaciones, la muestra es de menos de alrededor de 20 células. En algunas realizaciones, la muestra es de menos de alrededor de 10 células. En algunas realizaciones, la muestra es de menos de alrededor de 5 células. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero. En algunas realizaciones, la célula es una célula humana. En algunas realizaciones, la célula es de un sujeto que padece una enfermedad o afección. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es cáncer. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es una infección patógena. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección es un trastorno genético. En algunas realizaciones, la célula es de un sujeto sano. En algunas realizaciones, la célula es una célula enferma. En algunas realizaciones, la célula enferma es una célula cancerosa. En algunas realizaciones, la célula es una célula sana. En algunas realizaciones, la célula no es una célula enferma ni infectada. En algunas realizaciones, las moléculas etiquetadas se producen mediante etiquetado estocástico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El experto entenderá que los dibujos descritos a continuación se proporcionan solo con fines ilustrativos. No se pretende que los dibujos limiten el alcance de las presentes enseñanzas de ningún modo.

La Figura 1 muestra un esquema del etiquetado y detección de una molécula diana.

La Figura 2 muestra señales para la detección de etiquetas en moléculas hibridadas.

La Figura 3 muestra señales para la detección de etiquetas en moléculas hibridadas.

La Figura 4 muestra señales para la detección de etiquetas en moléculas hibridadas.

La Figura 5 muestra señales para la detección de etiquetas en moléculas hibridadas.

La Figura 6 muestra señales para la detección de etiquetas en moléculas hibridadas.

La Figura 7 muestra un esquema de detección de una molécula etiquetada mediante un detector de matriz.

La Figura 8 muestra un esquema de un etiquetado estocástico de una pluralidad de moléculas.

La Figura 9 muestra un cebador de PCR de ejemplo que consiste en una secuencia de PCR universal, una secuencia de etiqueta corta y una secuencia diana o específica para gen.

La Figura 10 muestra un esquema para la síntesis de marcadores oligonucleotídicos.

La Figura 11A muestra un esquema para la síntesis de marcadores oligonucleotídicos sin la secuencia específica de diana.

La Figura 11B-D muestra un esquema para la síntesis de marcadores oligonucleotídicos.

La Figura 12A-B representa marcadores oligonucleotídicos degenerados.

La Figura 13 muestra ejemplos adicionales de cebadores etiquetados. A) Cebador etiquetado sin la secuencia de cebador genérico. B) Cebador etiquetado con secuencia diana universal.

La Figura 14 muestra el protocolo de PCR absoluta.

La Figura 15 muestra la formación de dímeros de cebador.

La Figura 16 muestra el método para prevenir la formación de artefactos por cebador.

La Figura 17 muestra diferencias entre una matriz estándar y una matriz digital.

La Figura 18 muestra la detección de sondas de micromatriz digital utilizando una combinación de secuencias de

gen y etiqueta.

La Figura 19 muestra la cuantificación absoluta de moléculas de ARNm al contar moléculas de ADN individuales.

La Figura 20 muestra una micromatriz digital para la expresión de ARN.

La Figura 21 muestra una micromatriz digital para la cantidad de copias de ADN.

5 La Figura 22 muestra una micromatriz digital para microARN.

La Figura 23A muestra una micromatriz digital para diagnóstico genético con preimplantación de célula simple (PGD) (a) ciclo 0; (b) ciclo 5; (c) ciclo 10; (d) ciclo 15.

La Figura 23B muestra un esquema de un método para el diagnóstico genético con preimplantación de célula simple (PGD).

10 La Figura 24 muestra la micromatriz digital para medir la aneuploidía fetal en ácidos nucleicos en circulación maternos, p. ej., para Trisomía 21.

La Figura 25 muestra la cuantificación absoluta de moléculas de ARNm al contar moléculas de ADN individuales.

La Figura 26 muestra el etiquetado con un cebador «inerte».

15 La Figura 27 muestra la PCR en emulsión para prevenir artefactos a partir de ADNc compitiendo durante la amplificación.

La Figura 28A muestra un método que no depende de la generación de colas de homopolímero.

La Figura 29 muestra métodos de amplificación lineal.

La Figura 30 muestra el etiquetado con conmutación de cadena.

La Figura 31 muestra el etiquetado mediante imprimación aleatoria.

20 La Figura 32A-B muestra los resultados para la optimización de la síntesis de ADNc.

La Figura 33 muestra un esquema de etiquetado estocástico y posterior detección HCR de moléculas de ácido nucleico.

La Figura 34 muestra un esquema de etiquetado estocástico de oligonucleótidos HCR horquillados.

25 La Figura 35 muestra un esquema del esquema de dilución en serie para el experimento de titulación con diluciones en serie de kanamicina ARN.

La Figura 36A-H muestra los diagramas de dispersión de los resultados del experimento de titulación con diluciones en serie de kanamicina ARN.

La Figura 37 muestra el gráfico de correlación para el experimento de titulación con diluciones en serie de kanamicina ARN.

30 La Figura 38 muestra un esquema del esquema de dilución en serie para el experimento de titulación con diluciones en serie de ARN de hígado humano para medir la expresión de GAPDH.

La Figura 39A-H muestra los diagramas de dispersión de los resultados del experimento de titulación con diluciones en serie de ARN de hígado humano para medir la expresión de GAPDH.

35 La Figura 40 muestra el gráfico de correlación para el experimento de titulación con diluciones en serie de ARN de hígado humano para medir la expresión de GAPDH.

La Figura 41A-D muestra los diagramas de dispersión de los resultados para las mediciones precisas de genes bacterianos testigo.

La Figura 42 muestra el diagrama de dispersión para la validación de los recuentos de kanamicina mediante el experimento de PCR digital.

40 La Figura 43 muestra el esquema del método para la cuantificación absoluta de moléculas de ARNm directamente a partir de lisados celulares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 A continuación, se hará referencia en detalle a las realizaciones ejemplares de la invención. Si bien la invención se describirá junto con las realizaciones ejemplares, se entenderá que no se pretende limitar la invención a estas realizaciones.

50 La invención tiene muchas realizaciones preferidas y se apoya en muchas patentes, solicitudes y otras referencias para suministrar detalles conocidos para los expertos en la técnica.

Un individuo no se limita a un ser humano, sino que puede ser otros organismos que incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, plantas, bacterias o células derivadas de cualquiera de los anteriores.

55 A lo largo de la presente descripción, diversos aspectos de la invención se pueden presentar en formato de intervalo. Se entenderá que la descripción en formato de intervalo se hace meramente por ser conveniente y breve, y no se deberá interpretar como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un intervalo describe de forma específica todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro del intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6
60 debe considerarse que describe específicamente los subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como los números individuales dentro de dicho intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto tiene aplicación independientemente de la amplitud del intervalo.

65 En la presente se describen métodos, kits y sistemas para detectar y/o cuantificar moléculas en una muestra. En algunos casos, se proporcionan métodos, kits y sistemas para contar individualmente moléculas en una

muestra. De manera alternativa, se proporcionan métodos, kits y sistemas para determinar el nivel de expresión de un gen o producto génico. En algunos casos, los métodos comprenden el acoplamiento de un marcador oligonucleotídico a una molécula (p. ej., ARN, ADN, proteína) para formar una molécula etiquetada. El marcador oligonucleotídico puede comprender una región específica de diana, una región identificadora exclusiva, una región de unión a cebador universal, una región de etiqueta detectable o cualquier combinación de estos. En algunos casos, el acoplamiento del marcador oligonucleotídico con la molécula resulta en la formación de una unión única que comprende al menos una porción del marcador oligonucleotídico y al menos una porción de la molécula. Se puede determinar un nivel de expresión de un gen o producto génico al detectar y/o cuantificar al menos una porción de la molécula etiquetada (p. ej., unión única, marcador oligonucleotídico, molécula). La cantidad absoluta de una molécula diana también se puede determinar al detectar la cantidad de marcadores oligonucleotídicos exclusivos de las moléculas etiquetadas y/o la cantidad de uniones únicas en las moléculas etiquetadas.

También se describen en la presente memoria métodos de PCR absoluta para amplificar y/o cuantificar una o más moléculas. Un esquema del protocolo de PCR absoluta se representa en la Figura 14. Según se muestra en la Etapa 1 de la Figura 14, un marcador oligonucleotídico (1404) que comprende un sitio de unión a cebador universal (1401), una región identificadora exclusiva (1402) y una región específica de diana (1403) se hibrida con una molécula diana (1405). Según se muestra en la Etapa 2 de la Figura 14, el marcador oligonucleotídico (1404) puede actuar como cebador y se puede sintetizar una copia de la molécula diana (1405) por medio de la extensión del cebador mediante una polimerasa (p. ej., polimerasa de ADN) para producir un amplicón (1406). El amplicón (1406) puede comprender un sitio de unión a cebador universal (1401), una región identificadora exclusiva (1402) y un complemento de la molécula diana (1411). Según se muestra en la Etapa 3 de la Figura 14, un cebador inverso (1407) se puede aparear con el amplicón (1406). Según se muestra en la Etapa 4 de la Figura 14, el amplicón (1406) puede actuar como plantilla para sintetizar un segundo amplicón (1408). El segundo amplicón (1408) puede comprender una copia de la molécula diana (1411') y un complemento del sitio de unión a cebador universal (1401') y un complemento de la región identificadora exclusiva (1402'). Según se muestra en la Etapa 5 de la Figura 14, los amplicones (1406, 1408) pueden actuar como plantillas para la amplificación posterior con un cebador directo (1409) que comprende el sitio de unión a cebador universal y un cebador inverso (1410) que comprende una secuencia específica diana. Cada amplicón posterior comprende la región identificadora exclusiva (1402). Al incorporar la región identificadora exclusiva en cada amplicón, se puede determinar la eficacia de la amplificación y/o el sesgo de la amplificación. Además, se puede determinar la cantidad de las moléculas diana al contar la cantidad de regiones identificadoras exclusivas diferentes que están asociadas con cada molécula diana. El método de PCR absoluta se puede utilizar para el análisis posterior de las moléculas diana (Etapa 6 de la Figura 14). Por ejemplo, los amplicones producidos mediante el método de PCR absoluta se pueden utilizar para detectar y/o cuantificar una o más moléculas diana. Los marcadores oligonucleotídicos no incorporados se pueden retirar mediante la purificación de los amplicones.

I. Etiquetado de moléculas con marcadores oligonucleotídicos

A. Etiquetado estocástico de moléculas

Los métodos descritos en la presente memoria comprenden el acoplamiento de marcadores oligonucleotídicos con moléculas en una muestra. En algunos casos, el acoplamiento de los marcadores oligonucleotídicos con las moléculas comprende el etiquetado estocástico de las moléculas. Los métodos para etiquetar moléculas de manera estocástica se pueden encontrar, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Números 8.835.358 y 9.315.857. En general, el método de etiquetado estocástico comprende el acoplamiento aleatorio de una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos con una o más moléculas. La pluralidad de marcadores oligonucleotídicos se proporciona en exceso con respecto a la una o más moléculas que se etiquetarán. En el etiquetado estocástico, cada molécula individual que se etiquetará tiene una probabilidad individual de acoplarse con la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos. La probabilidad de cada molécula individual que se etiquetará de acoplarse con un marcador específico puede ser alrededor de la misma que la de cualquier otra molécula individual que se etiquetará. Por consiguiente, en algunos casos, se supone que la probabilidad de que cualquiera de las moléculas en una muestra halle cualquiera de los marcadores es igual, una suposición que se puede utilizar en cálculos matemáticos para estimar la cantidad de moléculas en la muestra. En algunas circunstancias, la probabilidad de acoplamiento se puede manipular, por ejemplo, al elegir marcadores con diferentes propiedades que aumentarán o disminuirán la eficacia de unión de dicho marcador a una molécula individual. Los marcadores oligonucleotídicos también pueden variarse en cantidad para alterar la probabilidad de que un marcador específico hallará una molécula de unión durante el etiquetado estocástico. Por ejemplo, un marcador puede estar sobrerrepresentado en una agrupación de marcadores y aumentar, de esta manera, las oportunidades de que el marcador sobrerrepresentado halle al menos una molécula de unión.

B. Métodos para acoplar un marcador oligonucleotídico a una molécula

El acoplamiento de un marcador oligonucleotídico a una molécula puede producirse mediante una variedad de métodos, que incluyen, pero no se limitan a, hibridación del marcador oligonucleotídico con la molécula. En algunos casos, el marcador oligonucleotídico comprende una región específica de diana. La región específica de

diana puede comprender una secuencia que es complementaria a al menos una porción de la molécula que se etiquetará. La región específica de diana se puede hibridar con la molécula para producir, de esta manera, una molécula etiquetada.

El acoplamiento de un marcador oligonucleotídico a una molécula puede producirse mediante ligadura. Las técnicas de ligadura comprenden ligadura a extremo romo y ligadura a extremo cohesivo. Las reacciones de ligadura pueden incluir ligasas de ADN tales como ligasa I de ADN, ligasa III de ADN, ligasa IV de ADN y ligasa de ADN de T4. Las reacciones de ligadura pueden incluir ligasas de ARN tales como ligasa I de ARN de T4 y ligasa II de ARN de T4.

Los métodos de ligadura se describen, por ejemplo, en Sambrook et al. (2001) y el catálogo New England BioLabs. Los métodos incluyen utilizar la ligasa de ADN de T4 que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos fosfato en 5' e hidroxilo en 3' yuxtapuestos en ADN o ARN de estructura doble con extremos romos y cohesivos; ligasa de ADN de Taq que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos fosfato en 5' e hidroxilo en 3' yuxtapuestos de dos oligonucleótidos adyacentes que están hibridados con un ADN diana complementario; ligasa de ADN de E. coli que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos fosfato en 5' e hidroxilo en 3' yuxtapuestos en ADN de estructura doble que contiene extremos cohesivos; y ligasa de ARN de T4 que cataliza la ligadura de un donante de ácido nucleico terminado en fosforilo en 5' a un aceptador de ácido nucleico terminado en hidroxilo en 3' a través de la formación de un enlace fosfodiéster 3'→5', los sustratos incluyen ARN y ADN monocatenario, así como dinucleósido pirofosfatos; o cualquier otro método descrito en la técnica. El ADN fragmentado se puede tratar con una o más enzimas, por ejemplo, una endonucleasa, antes de la ligadura de adaptadores a uno o ambos extremos para facilitar la ligadura al generar extremos que son compatibles con la ligadura.

En algunos casos, ambos extremos del marcador oligonucleotídico se acoplan a la molécula. Por ejemplo, ambos extremos del marcador oligonucleotídico se pueden hibridar y/o ligar con uno o más extremos de la molécula. En algunos casos, el acoplamiento de ambos extremos del marcador oligonucleotídico a ambos extremos de la molécula resulta en la formación de una molécula etiquetada circularizada. Ambos extremos del marcador oligonucleotídico también se pueden acoplar al mismo extremo de la molécula. Por ejemplo, el extremo en 5' del marcador oligonucleotídico se liga al extremo en 3' de la molécula y el extremo en 3' del marcador oligonucleotídico se hibrida con el extremo en 3' de la molécula que resulta en una molécula etiquetada con una estructura de horquilla en un extremo. En algunos casos, el marcador oligonucleotídico se acopla a la mitad de la molécula.

En algunos casos, el acoplamiento del marcador oligonucleotídico a las moléculas comprende el uso de uno o más adaptadores. Los adaptadores pueden comprender una región específica de diana en un extremo, que permite el acoplamiento del adaptador a la molécula, y una región específica de marcador oligonucleotídico en el otro extremo, que permite el acoplamiento del marcador oligonucleotídico al adaptador. Los adaptadores se pueden acoplar a la molécula y/o al oligonucleótido mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, hibridación y/o ligadura.

Los métodos para ligar adaptadores a fragmentos de ácido nucleico son conocidos. Los adaptadores pueden ser bicatenarios, monocatenarios o parcialmente monocatenarios. En aspectos preferidos, los adaptadores se forman a partir de dos oligonucleótidos que tienen una región de complementariedad, por ejemplo, alrededor de 10 a 30, o alrededor de 15 a 40 bases de complementariedad perfecta, de manera que cuando los dos oligonucleótidos se hibridan entre sí forman una región bicatenaria. Opcionalmente, cualquiera o ambos oligonucleótidos pueden tener una región que no es complementaria al otro oligonucleótido y forma una prolongación monocatenaria en uno o ambos extremos del adaptador. Las prolongaciones monocatenarias preferiblemente pueden tener alrededor de 1 a alrededor de 8 bases y, más preferiblemente, alrededor de 2 a alrededor de 4. La prolongación puede ser complementaria a la prolongación creada mediante la escisión con una enzima de restricción para facilitar la ligadura al «extremo cohesivo». Los adaptadores pueden incluir otras características, tales como sitios de unión a cebador y sitios de restricción. En algunos aspectos, el sitio de restricción puede ser para una enzima de restricción Tipo IIS u otra enzima que corta fuera de su secuencia de reconocimiento, tal como EcoP151 (véase, Mucke et al. J Mol Biol 2001, 312(4):687-698 y US 5.710.000).

El marcador oligonucleotídico se puede acoplar a cualquier región de una molécula. Por ejemplo, el oligonucleótido se puede acoplar al extremo en 5' o 3' de un polinucleótido (p. ej., ADN, ARN). Por ejemplo, la región específica de diana del marcador oligonucleotídico comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia en la región en 5' de la molécula. La región específica de diana del marcador oligonucleotídico también puede comprender una secuencia que es complementaria a una secuencia en la región en 3' de la molécula. En algunos casos, el marcador oligonucleotídico se acopla a una región dentro de un gen o producto génico. Por ejemplo, el ADN genómico se fragmenta y un marcador oligonucleotídico se acopla al ADN fragmentado. En otros casos, la molécula de ARN se empalma alternativamente y el marcador oligonucleotídico se acopla a las variantes alternativamente empalmadas. En otro ejemplo, el polinucleótido se digiere y el marcador oligonucleotídico se acopla al polinucleótido digerido. En otro ejemplo, la región específica de diana del marcador oligonucleotídico comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia dentro de la molécula.

II. Transcripción inversa

En algunos casos, los métodos descritos en la presente memoria comprenden el acoplamiento de un marcador oligonucleotídico a una molécula de ARN para producir una molécula de ARN etiquetada. Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender, además, la transcripción inversa de la molécula de ARN etiquetada para producir una molécula de ADNc etiquetada. En algunos casos, al menos una porción del marcador oligonucleotídico actúa como cebador para la reacción de transcripción inversa. Por ejemplo, según se muestra en la Figura 1, Etapas 1A-B, un marcador oligonucleotídico que comprende una secuencia oligodT se hibrida con la cola de poliA de una molécula de ARNm. La porción oligodT del marcador oligonucleotídico actúa como cebador para la síntesis de la primera cadena de la molécula de ADNc.

En algunos casos, la molécula de ADNc etiquetada se puede utilizar como una molécula para una nueva reacción de etiquetado estocástico. El ADNc etiquetado puede tener un primer marcador o conjunto de marcadores del acoplamiento al ARN antes de la transcripción inversa y un segundo marcador o conjunto de marcadores acoplados a la molécula de ADNc. Estas múltiples reacciones de etiquetado, por ejemplo, se pueden utilizar para determinar la eficacia de los acontecimientos que se producen entre el acoplamiento del primer y segundo marcadores, p. ej., una reacción de amplificación opcional o la reacción de transcripción inversa.

En otro ejemplo, un marcador oligonucleotídico se acopla al extremo en 5' de una molécula de ARN para producir una molécula de ARN etiquetada. La transcripción inversa de la molécula de ARN etiquetada puede producirse mediante la adición de un cebador de transcripción inversa. En algunos casos, el cebador de transcripción inversa es un cebador de oligodT, un cebador hexanucleotídico aleatorio o un cebador oligonucleotídico específico de diana. En general, los cebadores de oligo(dT) tienen una longitud de 12-18 nucleótidos y se unen a la cola poli(A)+ endógena en el extremo en 3' del ARNm de mamífero. Los cebadores hexanucleotídicos aleatorios pueden unirse al ARNm en una variedad de sitios complementarios. Los cebadores oligonucleotídicos específicos de diana ceban típicamente de forma selectiva el ARNm de interés.

En algunos casos, el método comprende transcribir inversamente de manera repetida la molécula de ARN etiquetada para producir múltiples moléculas de ADNc etiquetadas. Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender llevar a cabo al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 reacciones de transcripción inversa. El método puede comprender llevar a cabo al menos alrededor de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 reacciones de transcripción inversa.

III. Amplificación de moléculas etiquetadas

Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender la amplificación de moléculas etiquetadas para producir amplicones etiquetados. La amplificación de las moléculas etiquetadas puede comprender métodos basados en PCR y métodos no basados en PCR. La amplificación de las moléculas etiquetadas puede comprender la amplificación exponencial de las moléculas etiquetadas. La amplificación de las moléculas etiquetadas puede comprender la amplificación lineal de las moléculas etiquetadas.

En algunos casos, la amplificación de las moléculas etiquetadas puede comprender métodos no basados en PCR. Los ejemplos de métodos no basados en PCR incluyen, pero no se limitan a, amplificación por desplazamiento múltiple (MDA, por sus siglas en inglés), amplificación mediada por transcripción (TMA, por sus siglas en inglés), amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA, por sus siglas en inglés), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA, por sus siglas en inglés), SDA en tiempo real, amplificación por círculo rodante o amplificación de círculo a círculo.

La amplificación de las moléculas etiquetadas puede comprender métodos basados en reacción en cadena de hibridación (HCR) (Dirks and Pierce, PNAS, 2004; Zhang et al., Anal Chem, 2012). Los métodos basados en HCR pueden comprender HCR basada en ADN. Los métodos basados en HCR pueden comprender una o más sondas etiquetadas. La una o más sondas etiquetadas pueden comprender uno o más marcadores oligonucleotídicos descritos en la presente memoria.

En algunos casos, los métodos descritos en la presente memoria comprenden, además, llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en la molécula etiquetada (p. ej., ARN etiquetado, ADN etiquetado, ADNc etiquetado) para producir un amplicón etiquetado. El amplicón etiquetado puede ser una molécula bicatenaria. La molécula bicatenaria puede comprender una molécula de ARN bicatenaria, una molécula de ADN bicatenaria o una molécula de ARN hibridada con una molécula de ADN. Una o ambas cadenas de la molécula bicatenaria pueden comprender el marcador oligonucleotídico. Alternativamente, el amplicón etiquetado es una molécula monocatenaria. La molécula monocatenaria puede comprender ADN, ARN o una combinación de estos. Los ácidos nucleicos pueden comprender ácidos nucleicos sintéticos o alterados.

La reacción en cadena de la polimerasa se puede llevar a cabo mediante métodos tales como PCR, HD-

PCR, Next Gen PCR, RTA digital o cualquier combinación de estos. Los métodos de PCR adicionales incluyen, pero no se limitan a, PCR específica para alelos, PCR Alu, PCR de ensamblaje, PCR asimétrica, PCR en gota, PCR en emulsión, amplificación dependiente de helicasa HDA, PCR de arranque en caliente, PCR inversa, lineal después de exponencial (LATE)-PCR, PCR extensa, PCR múltiple, PCR anidada, PCR hemianidada, PCR cuantitativa, RT-PCR, PCR en tiempo real, PCR en célula simple y PCR de contacto.

En algunos casos, llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa comprende aparear un primer cebador específico diana con la molécula etiquetada. De manera alternativa o adicional, llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa comprende, además, aparear un cebador universal con una región de sitio de unión a cebador universal del marcador oligonucleotídico, en la que el marcador oligonucleotídico está en una molécula etiquetada o amplicón etiquetado. Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender, además, aparear un segundo cebador específico diana con la molécula etiquetada y/o amplicón etiquetado.

En algunos casos, el método comprende amplificar de manera repetida la molécula etiquetada para producir múltiples amplicones etiquetados. Los métodos descritos en la presente memoria comprenden llevar a cabo al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 reacciones de amplificación. Alternativamente, el método comprende llevar a cabo al menos alrededor de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 reacciones de amplificación.

Otros métodos de amplificación adecuados incluyen, la reacción en cadena de la ligasa (LCR, por sus siglas en inglés) (*por ejemplo*, Wu and Wallace, Genomics 4, 560 (1989), Landegren et al., Science 241, 1077 (1988) y Barringer et al. Gene 89:117 (1990)), amplificación por transcripción (Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173 (1989) y WO88/10315), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 1874 (1990) y WO90/06995), amplificación selectiva de secuencias polinucleotídicas diana (patente estadounidense n.º 6.410.276), reacción en cadena de la polimerasa imprimada con secuencia consenso (CP-PCR, por sus siglas en inglés) (patente estadounidense n.º 4.437.975), reacción en cadena de la polimerasa imprimada arbitrariamente (AP-PCR, por sus siglas en inglés) (patentes estadounidenses núms. 5.413.909, 5.861.245), amplificación por círculo rodante (RCA, por sus siglas en inglés) (por ejemplo, Fire and Xu, PNAS 92:4641 (1995) y Liu et al., J. Am. Chem. Soc. 118:1587 (1996)) y patente estadounidense n.º 5.648.245, amplificación por desplazamiento de cadena (véase Lasken and Egholm, Trends Biotechnol. 2003 21(12):531-5; Barker et al. Genome Res. mayo de 2004;14(5):901-7; Dean et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99(8):5261-6; Walker et al. 1992, Nucleic Acids Res. 20(7):1691-6, 1992 y Paez, et al. Nucleic Acids Res. 2004; 32(9):e71), Qbeta Replicase, descrita en la solicitud de patente PCT n.º PCT/US87/00880 y amplificación de secuencia basada en ácido nucleico (NABSA, por sus siglas en inglés). (Véanse, las patentes estadounidenses núms. 5.409.818, 5.554.517 y 6.063.603). Otros métodos de amplificación que se pueden utilizar se describen en las patentes estadounidenses núms. 6.582.938, 5.242.794, 5.494.810, 4.988.617 y la publicación estadounidense n.º 20030143599. El ADN también se puede amplificar mediante PCR específica para locus múltiples o utilizando ligadura por adaptador y PCR con cebador simple (véase Kinzler and Vogelstein, NAR (1989) 17:3645-53. También se pueden utilizar otros métodos de amplificación disponibles, tales como PCR equilibrada (Makrigiorgos, et al. (2002), Nat Biotechnol, tomo 20, pp.936-9).

Las sondas de inversión molecular («MIP», por sus siglas en inglés) también se pueden utilizar para la amplificación de dianas seleccionadas. Las MIP se pueden generar con el fin de que los extremos de la sonda precircular sean complementarios a regiones que flanquean la región que se amplificará. El hueco se puede cerrar mediante la extensión del extremo de la sonda para que el complemento de la diana se incorpore en la MIP antes de la ligadura de los extremos para formar un círculo cerrado. El círculo cerrado se puede amplificar y detectar mediante secuenciación o hibridación, según se describió anteriormente en Hardenbol et al., Genome Res. 15:269-275 (2005) y en la patente estadounidense n.º 6.858.412.

La amplificación de la molécula etiquetada puede comprender el uso de uno o más cebadores. La Figura 9 muestra cebadores directo e inverso de ejemplo. El cebador directo (901) puede comprender una secuencia de PCR universal (902), una secuencia identificadora exclusiva (903) y una secuencia diana (904). El cebador inverso (905) puede comprender una secuencia diana.

Los cebadores utilizados en el método se pueden diseñar con el uso de Primer 3, un programa informático que sugiere las secuencias de cebador en función de una secuencia de entrada definida por el usuario. También se pueden usar otros diseños de cebadores o se pueden seleccionar cebadores a ojo sin la necesidad de programas informáticos. Existen muchas opciones disponibles con el programa para adaptar el diseño del cebador a la mayoría de las aplicaciones. Primer3 toma en cuenta muchos factores que incluyen, pero no se limitan a, temperatura de fusión de oligo, longitud, contenido GC, estabilidad en 3', estructura secundaria estimada, la probabilidad de apareamiento con o la amplificación de secuencias no deseadas (por ejemplo, repeticiones intercaladas) y la probabilidad de la formación de dímeros de cebador entre dos copias del mismo cebador. En el diseño de pares de cebadores, Primer3 puede tomar en cuenta el tamaño del producto y la temperatura de fusión, la probabilidad de formación de dímeros de cebador entre dos cebadores en el par, la diferencia entre las temperaturas de fusión de los cebadores y la ubicación del cebador con respecto a regiones de interés específicas que se quieren evitar.

IV. Secuenciación

En algunos aspectos, los métodos descritos en la presente memoria comprenden, además, determinar la secuencia de la molécula etiquetada o cualquier producto de esta (p. ej., amplicones etiquetados, moléculas de ADNc etiquetadas). Determinar la secuencia de la molécula etiquetada o cualquier producto de esta puede comprender llevar a cabo una reacción de secuenciación para determinar la secuencia de al menos una porción del marcador oligonucleotídico, al menos una porción de la molécula de ADNc etiquetada, un complemento de esta, un complemento inverso de esta o cualquier combinación de estos. En algunos casos, solo se secuencia el marcador o una porción del marcador. Determinar la secuencia de la molécula etiquetada o cualquier producto de esta se puede llevar a cabo mediante métodos de secuenciación tales como secuenciación de molécula simple Helioscope™, secuenciación de ADN Nanopore, Secuenciación de distintivo paralela masiva (MPSS, por sus siglas en inglés) de Lynx Therapeutics, pirosecuenciación 454, secuenciación de molécula simple en tiempo real (RNAP, por sus siglas en inglés), secuenciación Illumina (Solexa), secuenciación SOLiD, Ion Torrent™, secuenciación semiconductora Ion, secuenciación de molécula simple SMRT(TM), secuenciación Polony, secuenciación de nanobalones de ADN y la estrategia de VisiGen Biotechnologies. Alternativamente, para determinar la secuencia de la molécula etiquetada o cualquier producto de esta se pueden utilizar plataformas de secuenciación que incluyen, pero no se limitan a, Genome Analyzer Iix, HiSeq y MiSeq ofrecida por Illumina, la tecnología Single Molecule Real Time (SMRT™), tal como el sistema PacBio RS ofrecido por Pacific Biosciences (California) y la tecnología Solexa Sequencer, True Single Molecule Sequencing (tSMS™) tal como HeliScope™ Sequencer ofrecida por Helicos Inc. (Cambridge, MA).

En algunos casos, determinar la secuencia de la molécula etiquetada o cualquier producto de esta comprende la secuenciación de extremo apareado, secuenciación con nanoporos, secuenciación de alto rendimiento, secuenciación al azar, secuenciación por terminador de tinte, secuenciación de ADN con múltiples cebadores, Primer Walking, secuenciación con didesoxi de Sanger, secuenciación de Maxim-Gilbert, pirosecuenciación, secuenciación de molécula simple verdadera o cualquier combinación de estos. Alternativamente, la secuencia de la molécula etiquetada o cualquier producto de esta se puede determinar mediante microscopía de electrones o una matriz de transistor de efecto de campo con sensibilidad química (chemFET).

En otro ejemplo, determinar la secuencia de moléculas etiquetadas o cualquier producto de estas comprende RNA-Seq o secuenciación de microARN. Alternativamente, determinar la secuencia de moléculas etiquetadas o cualquier producto de estas comprende técnicas de secuenciación tales como degradación de Edman, toma de huellas de masa peptídica, espectrometría de masas o digestión por proteasa.

La reacción de secuenciación, en algunas realizaciones, se puede producir sobre un soporte sólido o semisólido, en un gel, en una emulsión, sobre una superficie, sobre una perla, en una gota, en un flujo continuo, en una dilución o en uno o más volúmenes físicamente separados.

La secuenciación puede comprender secuenciar al menos alrededor de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos o pares de bases de la molécula etiquetada. En algunos casos, la secuenciación comprende secuenciar al menos alrededor de 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más nucleótidos o pares de bases de la molécula etiquetada. En otros casos, la secuenciación comprende secuenciar al menos alrededor de 1500; 2000; 3000; 4000; 5000; 6000; 7000; 8000; 9000; o 10 000 o más nucleótidos o pares de bases de la molécula etiquetada.

La secuenciación puede comprender al menos alrededor de 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más lecturas de secuenciación por pasada. En algunos casos, la secuenciación comprende secuenciar al menos alrededor de 1500; 2000; 3000; 4000; 5000; 6000; 7000; 8000; 9000; o 10 000 o lecturas de secuenciación por pasada.

V. Métodos de detección

Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender, además, la detección de moléculas etiquetadas y/o amplicones etiquetados. La detección de las moléculas etiquetadas y/o los amplicones etiquetados puede comprender la hibridación de las moléculas etiquetadas con una superficie, p. ej., un soporte sólido. De manera alternativa, o adicional, la detección de las moléculas etiquetadas comprende poner en contacto las moléculas etiquetadas y/o los amplicones etiquetados con una superficie, p. ej., un soporte sólido. En algunos casos, el método comprende, además, poner en contacto las moléculas etiquetadas y/o los amplicones etiquetados con una etiqueta detectable para producir una molécula etiquetada conjugada con una etiqueta detectable. Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender, además, detectar la molécula etiquetada conjugada con la etiqueta detectable. La detección de las moléculas etiquetadas o cualesquiera productos de estas (p. ej., amplicones etiquetados, molécula etiquetada conjugada con etiqueta detectable) puede comprender la detección de al menos una porción del marcador oligonucleotídico, molécula, etiqueta detectable, un complemento del marcador oligonucleotídico, un complemento de la molécula o cualquier combinación de estos.

La detección de las moléculas etiquetadas o cualesquiera productos de estas puede comprender una emulsión. Por ejemplo, las moléculas etiquetadas o cualesquiera productos de estas pueden estar en una emulsión. Alternativamente, la detección de las moléculas etiquetadas o cualesquiera productos de estas comprende una o más disoluciones. En otros casos, la detección de las moléculas etiquetadas comprende uno o más recipientes.

La detección de las moléculas etiquetadas o cualesquiera productos de estas (p. ej., amplicones etiquetados, molécula etiquetada conjugada con etiqueta detectable) puede comprender detectar cada molécula etiquetada o producto de esta. Por ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria comprenden secuenciar al menos una porción de cada molécula etiquetada para detectar, de esta manera, cada molécula etiquetada.

En algunos casos, la detección de las moléculas etiquetadas y/o amplicones etiquetados comprende métodos de electroforesis, espectroscopía, microscopía, quimioluminiscencia, luminiscencia, fluorescencia, inmunofluorescencia, colorimetría o electroquimioluminiscencia. Por ejemplo, el método comprende la detección de un tinte fluorescente. La detección de la molécula etiquetada o cualesquiera productos de esta puede comprender métodos colorimétricos. Por ejemplo, el método colorimétrico comprende el uso de un colorímetro o un lector colorimétrico. Una lista no limitante de colorímetros y lectores colorimétricos incluye Colorimetric Array Imaging Reader (CLAIR, por sus siglas en inglés) de Sensovation, ESEQuant Lateral Flow Immunoassay Reader, SpectraMax 340PC 38, SpectraMax Plus 384, SpectraMax 190, VersaMax, VMax y EMax.

Los métodos adicionales utilizados solos o en combinación con otros métodos para detectar las moléculas y/o amplicones etiquetados pueden comprender el uso de un detector de matriz, un lector de fluorescencia, un detector no fluorescente, un lector CR, un luminómetro o una unidad de exploración. En algunos casos, detectar las moléculas etiquetadas y/o los amplicones etiquetados comprende el uso de un detector de matriz. Los ejemplos de detectores de matriz incluyen, pero no se limitan a, detectores de matriz de diodos, detectores de matriz de fotodiodos, detectores de matriz de fotodiodos de HPLC, detectores de matriz de píxeles, detectores de matriz de germanio, detectores de matriz CMOS y CCD, detectores de matriz CCD lineales con compuerta, sistemas de matriz de fotodiodos InGaAs y sistemas CCD enfriados TE. El detector de matriz puede ser un detector de micromatriz. Los ejemplos no limitantes de detectores de micromatriz incluyen detectores de micromatriz de microelectrodos, plataformas de detección de micromatriz de ADN ópticas, detectores de micromatriz de ADN, detectores de micromatriz de ARN y detectores de micromatriz proteica.

En algunos casos, se utiliza un lector de fluorescencia para detectar las moléculas etiquetadas y/o los amplicones etiquetados. El lector de fluorescencia puede leer 1, 2, 3, 4, 5 o más micromatrices de fluorescencia de color u otras estructuras sobre biochips, sobre portaobjetos o en microplacas. En algunos casos, el lector de fluorescencia es un Sensovation Fluorescence Array imaging Reader (FLAIR). Alternativamente, el lector de fluorescencia es un lector de microplaca de fluorescencia tal como el lector de microplaca Gemini XPS Fluorescence, el lector de microplaca Gemini EM Fluorescence, el lector de microplaca de fluorescencia basado en el filtro Fluoroskan Finstruments®, el lector de microplaca PHERAstar, el lector de microplaca FIUOstar, el lector de microplaca POLARstar Omega, el lector de microplaca multimodal FLUOstar OPTIMA y el lector de microplaca multimodal POLARstar OPTIMA. Los ejemplos adicionales de lectores de fluorescencia incluyen los sistemas PharosFX™ y PharosFX Plus.

En algunos casos, la detección de la molécula etiquetada y/o el amplicón etiquetado comprende el uso de un lector de microplaca. En algunos casos, el lector de microplaca es un espectrofotómetro de absorbancia en microplaca xMark™, el lector de absorbancia en microplaca iMark, el lector de placa multimodal EnSpire®, el lector de placa multietiqueta EnVision Multilabel, el lector de placa multietiqueta VICTOR X, FlexStation, SpectraMax Paradigm, SpectraMax M5e, SpectraMax M5, SpectraMax M4, SpectraMax M3, SpectraMax M2-M2e, la serie F de FilterMax, Fluoroskan Ascent FL Microplate Fluoremeter y Luminometer, Fluoroskan Ascent Microplate Fluoremeter, Luminoskan Ascent Microplate Luminometer, Multiskan EX Microplate Photometer, Muliskan FC Microplate Photometer y Muliskan GO Microplate Photometer. En algunos casos, el lector de microplaca detecta la absorbancia, fluorescencia, luminiscencia, la fluorescencia de resolución temporal, la dispersión de la luz o cualquier combinación de estos. En algunas realizaciones, el lector de microplaca detecta la dispersión dinámica de la luz. El lector de microplaca, en algunos casos, puede detectar la dispersión estática de la luz. En algunos casos, la detección de las moléculas etiquetadas y/o los amplicones etiquetados comprende el uso de un generador de imágenes de microplaca. En algunos casos, el generador de imágenes de microplaca comprende el generador de imágenes de microplaca ViewLux uHTS y el sistema de generación de imágenes de microplaca BioRad.

La detección de las moléculas etiquetadas y/o productos de estas puede comprender el uso de un luminómetro. Los ejemplos de luminómetros incluyen, pero no se limitan a, SpectraMax L, el luminómetro de microplaca GloMax®-96, el luminómetro de tubo simple GloMax®-20/20, GloMax®-Multi+ con el programa informático Instinct™, el lector multimodal de tubo simple GloMax®-Multi Jr, el luminómetro LUMIstar OPTIMA, el luminómetro LEADER HC+, el luminómetro LEADER 450i y el luminómetro LEADER 50i.

En algunos casos, la detección de las moléculas etiquetadas y/o los amplicones etiquetados comprende el uso de una unidad de exploración. Las unidades de exploración incluyen unidades de exploración planas

proporcionadas por Cannon, Epson, HP, Fujitsu y Xerox. Los ejemplos adicionales de unidades de exploración planas incluyen las unidades de exploración y generación de imágenes de fluorescencia FMBIO® (p. ej., los sistemas FMBIO® II, III y III Plus). Las unidades de exploración pueden incluir unidades de exploración de microplaca tales como la unidad de exploración de microplaca y micromatriz Arrayit ArrayPix™. En algunos casos, la unidad de exploración es un sistema Personal Molecular Imager™ (PMI) proporcionado por Bio-rad.

La detección de la molécula etiquetada puede comprender el uso de una técnica analítica que mide la relación entre masa y carga de las partículas cargadas, p. ej., espectrometría de masas. En algunas realizaciones, la relación entre masa y carga de las partículas cargadas se mide en combinación con técnicas de separación cromatográfica. En algunas realizaciones, se utilizan reacciones de secuenciación en combinación con mediciones de la relación entre masa y carga de partículas cargadas. En algunas realizaciones, los marcadores comprenden isótopos. En algunas realizaciones, el tipo o relación de isótopo se controla o manipula en la biblioteca de marcadores.

La detección de la molécula etiquetada o cualesquiera productos de esta comprende el uso de partículas pequeñas y/o dispersión de luz. Por ejemplo, las moléculas amplificadas (p. ej., amplicones etiquetados) se acoplan a haptenos o directamente a partículas pequeñas y se hibridan con la matriz. Las partículas pequeñas pueden estar en un intervalo de tamaño de nanómetros a micrómetros. Las partículas se pueden detectar cuando se dispersa luz sobre su superficie.

Se puede utilizar un ensayo colorimétrico donde las partículas pequeñas se colorean o se pueden teñir haptenos con sistemas de detección colorimétricos. En algunos casos, se puede utilizar una unidad de exploración para detectar la luz dispersada a partir de las partículas o el desarrollo de materiales coloreados. Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender, además, el uso de un material que absorbe luz. El material que absorbe luz se puede utilizar para bloquear la dispersión o el reflejo de luz no deseado. El material que absorbe luz puede ser un colorante alimenticio u otro material. En algunos casos, la detección de la molécula etiquetada o cualesquiera productos de esta comprende poner en contacto la molécula etiquetada con una luz blanca fuera de eje.

La detección de la molécula etiquetada puede comprender reacción en cadena de hibridación (HCR). Según se representa en la Figura 33, una muestra que comprende una pluralidad de moléculas de ácido nucleico (3340) se etiqueta de manera estocástica con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos (3330). Los marcadores oligonucleotídicos (3330) comprenden una región identificadora exclusiva (3310) y una región de adaptador (3320). El etiquetado estocástico de las moléculas de ácido nucleico puede comprender el acoplamiento de uno o más marcadores oligonucleotídicos (3330) a uno o más extremos de la molécula de ácido nucleico (3340) para producir una o más moléculas etiquetadas (3345). La una o más moléculas etiquetadas se pueden poner en contacto con una pluralidad de sondas de HCR (3350). La pluralidad de sondas de HCR (3350) puede comprender moléculas horquilladas con una prolongación y una o más etiquetas (3360, 3390). La pluralidad de sondas de HCR (3350) puede comprender una mezcla de moléculas horquilladas con prolongaciones en 5' y moléculas horquilladas con prolongaciones en 3'. La pluralidad de sondas de HCR puede comprender un tallo (3370, 3380). La secuencia del tallo (3370, 3380) puede ser complementaria a al menos una porción del marcador oligonucleotídico. La secuencia del tallo (3370, 3380) puede ser complementaria a la región de adaptador (3320) del marcador oligonucleotídico. La región de adaptador (3320) del oligonucleótido puede actuar como iniciador de una reacción en cadena de hibridación. Según se muestra en la Figura 33, el tallo (3370) de la sonda de HCR (3350) se puede hibridar con la región de adaptador (3320) de la molécula etiquetada (3345). La hibridación del tallo (3370) de la sonda de HCR (3350) con la región de adaptador (3320) de la molécula etiquetada (3345) puede resultar en la apertura del tallo (p. ej., 3370 y 3380 del tallo ya no están apareadas) y la linealización de la sonda de HCR (3350), que resulta en la formación de una molécula etiquetada hibridada con una sonda de HCR (3355). La sonda de HCR linealizada luego puede actuar como iniciador para la posterior hibridación de otra sonda de HCR. El tallo de una segunda sonda de HCR se puede hibridar con la sonda de HCR linealizada que se ha hibridado con la molécula etiquetada, lo que resulta en la linealización de la segunda sonda de HCR y la formación de una molécula etiquetada que contiene dos sondas de HCR linealizadas. La segunda sonda de HCR linealizada puede actuar como iniciador de otra reacción de hibridación. Este proceso se puede repetir múltiples veces para producir una molécula etiquetada con múltiples sondas de HCR linealizadas (3375). Las etiquetas (3360, 3390) en la sonda de HCR pueden permitir la detección de la molécula etiquetada. Las etiquetas (3360, 3390) pueden ser de cualquier tipo de etiqueta (p. ej., fluoróforo, cromóforo, molécula pequeña, nanopartícula, hapteno, enzima, anticuerpo, imán). Las etiquetas (3360 y 3390) pueden comprender fragmentos de una etiqueta simple. Las etiquetas (3360, 3390) pueden generar una señal detectable cuando están en estrecha proximidad. Cuando la sonda de HCR es una horquilla, las etiquetas (3360 y 3390) pueden estar demasiado distanciadas para producir una señal detectable. Cuando la sonda de HCR está linealizada y se hibridan múltiples sondas de HCR linealizadas entre sí, las etiquetas (3360, 3390) pueden estar en una proximidad suficientemente estrecha para generar una señal detectable. Por ejemplo, una sonda de HCR (3350) puede comprender dos restos pireno como etiquetas (3360, 3390). Alternativamente, las etiquetas pueden ser nanopartículas. La HCR puede permitir el acoplamiento de múltiples sondas de HCR a una molécula etiquetada, que pueden resultar en la amplificación de señal. El etiquetado estocástico y posteriormente la HCR pueden aumentar la sensibilidad de detección, el análisis y/o la cuantificación de las moléculas de ácido

nucleico. El etiquetado estocástico y posteriormente la HCR pueden aumentar la precisión de la detección, el análisis y/o la cuantificación de una o más moléculas de ácido nucleico.

Los métodos y aparatos adicionales para la detección de señales y el procesamiento de datos de intensidad se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses núms. 5 143 854, 5 547 839, 5 578 832, 5 631 734, 5 800 992, 5 834 758, 5 856 092, 5 902 723, 5 936 324, 5 981 956, 6 025 601, 6 090 555, 6 141 096, 6 185 030, 6 201 639; 6 218 803; y 6 225 625, en las publicaciones de patentes estadounidenses núms. 20040012676 y 20050059062 y en la solicitud PCT PCT/US99/06097 (publicada como WO99/47964).

La detección y/o cuantificación de las moléculas etiquetadas puede comprender el uso de ordenadores o un programa informático. Los productos de programa informático pueden comprender un medio de lectura informática que tiene instrucciones ejecutables por ordenador para llevar a cabo las etapas lógicas del método de la invención. El medio de lectura informática adecuado incluye disco flexible, CD-ROM/DVD/DVD-ROM, unidad de disco duro, memoria rápida, ROM/RAM, cintas magnéticas, etc. Las instrucciones ejecutables por ordenador pueden estar escritas en un lenguaje informático adecuado o una combinación de diversos lenguajes. Los métodos de biología informática básicos se describen, por ejemplo, en Setubal and Meidanis et al., *Introduction to Computational Biology Methods* (PWS Publishing Company, Boston, 1997); Salzberg, Searles, Kasif, (Ed.), *Computational Methods in Molecular Biology*, (Elsevier, Amsterdam, 1998); Rashidi and Buehler, *Bioinformatics Basics: Application in Biological Science and Medicine* (CRC Press, Londres, 2000) y Ouelette and Bzevanis *Bioinformatics: A Practical Guide for Analysis of Gene and Proteins* (Wiley & Sons, Inc., 2ª ed., 2001). Véase también US 6 420 108.

Los productos de programa informático y programas informáticos se pueden utilizar para una variedad de fines, tales como el diseño de sondas, la gestión de datos, el análisis y la operación de instrumentos. Véanse las patentes estadounidenses núms. 5 593 839, 5 795 716, 5 733 729, 5 974 164, 6 066 454, 6 090 555, 6 185 561, 6 188 783, 6 223 127, 6 229 911 y 6 308 170. Los métodos informáticos relacionados con la genotipificación que utilizan análisis de micromatriz de alta densidad también se pueden utilizar en los presentes métodos, véanse, por ejemplo, las publicaciones de patentes estadounidenses núms. 20050250151, 20050244883, 20050108197, 20050079536 y 20050042654. Además, la presente descripción puede tener realizaciones preferidas que incluyen métodos para proporcionar información genética en redes tales como Internet, según se muestra en las publicaciones de patentes estadounidenses núms. 20030097222, 20020183936, 20030100995, 20030120432, 20040002818, 20040126840 y 20040049354.

La detección y/o cuantificación de las moléculas etiquetadas o cualesquiera productos de estas puede comprender el uso de uno o más algoritmos. De manera alternativa, o adicional, los métodos, kits y composiciones pueden comprender, además, un ordenador, programa informático, impresora y/o datos o información electrónicos.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender, además, la transmisión de datos/información. Por ejemplo, los datos/información derivados de la detección y/o cuantificación de las moléculas etiquetadas o cualesquiera productos de estas se pueden transmitir a otro dispositivo y/o instrumento. En algunos casos, la información obtenida de un algoritmo también se puede transmitir a otro dispositivo y/o instrumento. La transmisión de datos/información puede comprender la transferencia de datos/información desde una primera fuente a una segunda fuente. La primera y segunda fuentes pueden estar en la misma ubicación aproximada (p. ej., dentro de la misma habitación, edificio, manzana, campus). De manera alternativa, la primera y segunda fuentes están en múltiples ubicaciones (p. ej., múltiples ciudades, estados, países, continentes, etc.). En algunas realizaciones, se utiliza un medio de lectura informática no transitorio para almacenar o analizar datos generados utilizando métodos descritos en la presente memoria.

La transmisión de datos/información puede comprender la transmisión digital o la transmisión analógica. La transmisión digital puede comprender la transferencia física de datos (una corriente de bits digital) a través de un canal de comunicación de punto a punto o de punto a múltiples puntos. Los ejemplos de dichos canales son alambres de cobre, fibras ópticas, canales de comunicación inalámbricos y medios de almacenamiento. Los datos se pueden representar como una señal electromagnética, tal como un voltaje eléctrico, onda de radio, microonda o señal infrarroja.

La transmisión analógica puede comprender la transferencia de una señal analógica variable de forma continua. Los mensajes se pueden representar mediante una secuencia de impulsos por medio de un código de línea (transmisión de banda base), o mediante un conjunto limitado de formas de onda variables de forma continua (transmisión de banda de paso), utilizando un método de modulación digital. La modulación de banda de paso y la correspondiente desmodulación (también conocida como detección) se pueden llevar a cabo mediante un equipo de módem. Según la definición más común de señal digital, ambas señales de banda base y banda de paso, que representan corrientes de bits, se consideran transmisión digital, mientras que una definición alternativa considera como digital solo la señal de banda base y la transmisión de banda de paso de datos digitales como una forma de conversión de digital a analógico.

Las aplicaciones y usos de los sistemas y métodos descritos en la presente memoria pueden producir uno

o más resultados útiles para el diagnóstico de un estado de enfermedad de un individuo, por ejemplo, un paciente. En una realización, un método de diagnóstico de una enfermedad comprende revisar o analizar datos relacionados con la presencia y/o el nivel de concentración de una diana en una muestra. Se puede proporcionar una conclusión basada en la revisión o análisis de los datos a un paciente, un proveedor de atención sanitaria o un gestor de atención sanitaria. En una realización, la conclusión se basa en la revisión o análisis de datos relacionados con un diagnóstico de una enfermedad. Se contempla que, en otra realización, proporcionar una conclusión a un paciente, un proveedor de atención sanitaria o un gestor de atención sanitaria incluye la transmisión de datos a través de una red.

Por consiguiente, se proporcionan sistemas comerciales y métodos que utilizan los sistemas y métodos descritos en la presente memoria.

Un aspecto de la descripción es un método comercial que comprende someter a barrido las muestras de prueba del paciente para determinar la presencia o ausencia de un analito biológicamente activo para producir datos en relación con el analito, recopilar datos del analito, proporcionar los datos del analito a un paciente, un proveedor de atención sanitaria o un gestor de atención sanitaria para formular una conclusión basada en la revisión o análisis de los datos en relación con el diagnóstico de una enfermedad. En una realización, la conclusión se proporciona a un paciente, un proveedor de atención sanitaria o un gestor de atención sanitaria que incluye la transmisión de datos a través de una red.

Por consiguiente, la Figura 8 es un diagrama de bloques que muestra un dispositivo lógico de ejemplo representativo a través del cual se puede lograr la revisión o análisis de los datos relacionados con la presente invención. Dichos datos se pueden relacionar con una enfermedad, trastorno o afección en un individuo. La Figura 8 muestra un sistema informático (o dispositivo digital) 800 conectado a un aparato 820 para uso con el sistema de detección de la unidad de exploración 824 para, por ejemplo, producir un resultado. El sistema informático 800 se puede entender como un aparato lógico que puede leer instrucciones de medios 811 y/o un puerto de red 805, que opcionalmente se puede conectar a un servidor 809 que tiene medios fijos 812. El sistema que se muestra en la Figura 8 incluye un CPU (siglas en inglés para «unidad de procesamiento central») 801, unidades de disco 803, dispositivos de entrada opcionales tales como un teclado 815 y/o ratón 816 y un monitor 807 opcional. La comunicación de datos se puede lograr a través del medio de comunicación indicado hacia un servidor 809 en una ubicación local o remota. El medio de comunicación puede incluir cualquier medio para transmitir y/o recibir datos. El medio de comunicación puede comprender un medio de lectura informática no transitorio. Por ejemplo, el medio de comunicación puede ser una conexión a red, una conexión inalámbrica o una conexión a internet. Dicha conexión puede proporcionar una comunicación a través de la red de redes mundial. Se contempla que los datos se pueden transmitir a través de dichas redes o conexiones para recepción y/o revisión por una parte 822. La parte receptora 822 puede ser, pero no se limita a, un paciente, un proveedor de atención sanitaria o un gestor de atención sanitaria. En una realización, un medio de lectura informática incluye un medio adecuado para la transmisión de un resultado de un análisis de una muestra ambiental o biológica. El medio puede incluir un resultado en relación con una condición o estado de enfermedad de un sujeto, en el que dicho resultado se obtiene utilizando los métodos descritos en la presente memoria. Los medios de lectura informática pueden ser no transitorios.

Análisis de datos: En algunas realizaciones, el instrumento de unidad de exploración produce los valores de intensidad no procesados para cada posición en la matriz, así como la intensidad de fondo. Se pueden utilizar muchos métodos para calcular la cantidad de moléculas en la muestra. Por ejemplo, los valores para las posiciones testigo en la muestra se retiran del conjunto de datos y se genera un diagrama de dispersión para proporcionar una imagen de los datos. Esto se puede producir con o sin la intensidad de fondo restada de los datos sin procesar. Se puede establecer un valor de intensidad umbral a efectos de clasificar los puntos positivos y los puntos negativos. Todos los puntos positivos se suman para proporcionar un recuento total de etiquetas estocásticas exclusivas. Este proceso se puede automatizar en Microsoft Excel u otro programa informático.

Una alternativa a esta estrategia es el uso de algoritmos de aglomeración tales como la aglomeración k-means. La aglomeración k-means es un método de análisis de aglomeraciones que tiene el fin de dividir todas las observaciones en aglomeraciones, en donde cada observación pertenece a la aglomeración con la media más cercana. Los datos se pueden repartir en 2 o 3 aglomeraciones (o más, 3 aglomeraciones parecen producir las cifras más claras hasta el momento) y se puede sumar la cantidad de puntos de datos para determinar los recuentos.

VI. Moléculas diana

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria se pueden utilizar en el etiquetado estocástico de las moléculas. Tales moléculas incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos y polipéptidos. Según se usan en la presente memoria, los términos «polinucleótido» y «molécula de ácido nucleico» hacen referencia a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, ácidos nucleicos bloqueados (LNA, por sus siglas en inglés), o ácidos nucleicos peptídicos (PNA, por sus siglas en inglés), que comprende bases purina y pirimidina, u otras bases naturales, modificadas por vía química o bioquímica, no naturales o nucleotídicas derivadas. Un «polinucleótido» o «molécula de ácido nucleico» puede consistir en un único

nucleótido o par de bases. Alternativamente, el «polinucleótido» o «molécula de ácido nucleico» comprende dos o más nucleótidos o pares de bases. Por ejemplo, el «polinucleótido» o «molécula de ácido nucleico» comprende al menos alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos o pares de bases. En otro ejemplo, el polinucleótido comprende al menos alrededor de 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500 o 10 000 nucleótidos o pares de bases. La estructura del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato, como típicamente se pueden encontrar en el ARN o ADN, o azúcares o grupos fosfato modificados o sustituidos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos nucleotídicos. La secuencia de nucleótidos puede estar interrumpida por componentes no nucleotídicos. Por lo tanto, los términos nucleósido, nucleótido, desoxinucleósido y desoxinucleótido generalmente incluyen análogos tales como los descritos en la presente memoria. Estos análogos son las moléculas que tienen algunas características estructurales en común con un nucleósido o nucleótido de origen natural, de manera que cuando se incorporan a una secuencia de ácido nucleico o de oligonucleósidos permiten la hibridación con una secuencia de ácido nucleico de origen natural en disolución. Típicamente, estos análogos se derivan de nucleósidos y nucleótidos de origen natural al reemplazar y/o modificar la base, la ribosa o el resto fosfodiéster. Los cambios se pueden hacer a medida para estabilizar o desestabilizar la formación híbrida o potenciar la especificidad de la hibridación con una secuencia de ácido nucleico complementaria, según se desee. En algunos casos, las moléculas son ADN, ARN o híbridos ADN-ARN. Las moléculas pueden ser monocatenarias o bicatenarias. En algunos casos, las moléculas son moléculas de ARN, tales como ARNm, ARNr, ARNt, ARNnc, ARNinc, ARNip o miARN. Las moléculas de ARN se pueden poliadenilar. Alternativamente, las moléculas de ARNm no se poliadenilan. Alternativamente, las moléculas son moléculas de ADN. Las moléculas de ADN pueden ser ADN genómico. Las moléculas de ADN pueden comprender exones, intrones, regiones no traducidas o cualquier combinación de estos.

En algunos casos, las moléculas son polipéptidos. Según se usa en la presente, el término «polipéptido» hace referencia a una molécula que comprende al menos un péptido. En algunos casos, el polipéptido consiste en un péptido simple. Alternativamente, el polipéptido comprende dos o más péptidos. Por ejemplo, el polipéptido comprende al menos alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 péptidos. Los ejemplos de polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos, proteínas, péptidos, hormonas, oligosacáridos, lípidos, glicolípidos, fosfolípidos, anticuerpos, enzimas, cinasas, receptores, factores de transcripción y ligandos.

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria se pueden utilizar para etiquetar de manera estocástica apariciones individuales de moléculas idénticas o casi idénticas y/o moléculas diferentes. En algunos casos, los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria se pueden utilizar para etiquetar de manera estocástica moléculas idénticas o casi idénticas (p. ej., moléculas que comprenden secuencias idénticas o casi idénticas). Por ejemplo, las moléculas que se etiquetarán comprenden al menos alrededor de 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia. Las moléculas casi idénticas pueden diferir en menos de alrededor de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos o pares de bases. En algunos casos, las moléculas que se etiquetarán son variantes entre sí. Por ejemplo, las moléculas que se etiquetarán pueden contener polimorfismos nucleotídicos simples u otros tipos de mutaciones. En otro ejemplo, las moléculas que se etiquetarán son variantes de empalme. En algunos casos, al menos una molécula se etiqueta de manera estocástica. En otros casos, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 moléculas idénticas o casi idénticas se etiquetan de manera estocástica. Alternativamente, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 moléculas idénticas o casi idénticas se etiquetan de manera estocástica. En otros casos, al menos 1500; 2000; 2500; 3000; 3500; 4000; 4500; 5000; 6000; 7000; 8000; 9000; o 10 000 moléculas idénticas o casi idénticas se etiquetan de manera estocástica. En otros casos, al menos 15 000; 20 000; 25 000; 30 000; 35 000; 40 000; 45 000; 50 000; 60 000; 70 000; 80 000; 90 000; o 100 000 moléculas idénticas o casi idénticas se etiquetan de manera estocástica.

En otros casos, los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria se pueden utilizar para etiquetar de manera estocástica moléculas diferentes. Por ejemplo, las moléculas que se etiquetarán comprenden menos de 75 %, 70 %, 65 %, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % de identidad de secuencia. Las moléculas diferentes pueden diferir en al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos o pares de bases. En algunos casos, al menos una molécula se etiqueta de manera estocástica. En otros casos, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 moléculas diferentes se etiquetan de manera estocástica. Alternativamente, al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 moléculas diferentes se etiquetan de manera estocástica. En otros casos, al menos 1500; 2000; 2500; 3000; 3500; 4000; 4500; 5000; 6000; 7000; 8000; 9000; o 10 000 moléculas diferentes se etiquetan de manera estocástica. En otros casos, al menos 15 000; 20 000; 25 000; 30 000; 35 000; 40 000; 45 000; 50 000; 60 000; 70 000; 80 000; 90 000; o 100 000 moléculas diferentes se etiquetan de manera estocástica.

Las moléculas diferentes que se etiquetarán pueden estar presentes en la muestra a diferentes concentraciones o cantidades. Por ejemplo, la concentración o cantidad de una molécula es mayor que la concentración o cantidad de otra molécula en la muestra. En algunos casos, la concentración o cantidad de al

menos una molécula en la muestra es al menos alrededor de 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 o más veces mayor que la concentración o cantidad de al menos una otra molécula en la muestra. En otro ejemplo, la concentración o cantidad de una molécula es menor que la concentración o cantidad de otra molécula en la muestra. La concentración o cantidad de al menos una molécula en la muestra puede ser de al menos alrededor de 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 o más veces menor que la concentración o cantidad de al menos una otra molécula en la muestra.

En algunos casos, las moléculas que se etiquetarán están en una o más muestras. Las moléculas que se etiquetarán pueden estar en dos o más muestras. Las dos o más muestras pueden contener cantidades o concentraciones diferentes de las moléculas que se etiquetarán. En algunos casos, la concentración o cantidad de una molécula en una muestra puede ser mayor que la concentración o cantidad de la misma molécula en una muestra diferente. Por ejemplo, una muestra de sangre podría contener una cantidad mayor de una molécula específica que una muestra de orina. Alternativamente, una muestra simple se divide en dos o más submuestras. Las submuestras pueden contener cantidades o concentraciones diferentes de la misma molécula. La concentración o cantidad de al menos una molécula en una muestra puede ser de al menos alrededor de 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 o más veces mayor que la concentración o cantidad de la misma molécula en otra muestra. Alternativamente, la concentración o cantidad de una molécula en una muestra puede ser menor que la concentración o cantidad de la misma molécula en una muestra diferente. Por ejemplo, una muestra de tejido cardíaco podría contener una cantidad mayor de una molécula específica que una muestra de tejido pulmonar. La concentración o cantidad de al menos una molécula en una muestra puede ser de al menos alrededor de 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 o más veces menor que la concentración o cantidad de la misma molécula en otra muestra. En algunos casos, las diferentes concentraciones o cantidades de una molécula en dos o más muestras diferentes se denomina sesgo de muestra.

VII. Marcadores oligonucleotídicos

En algunas realizaciones, los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria comprenden una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos. Los marcadores oligonucleotídicos pueden comprender una región específica de diana, una región identificadora exclusiva, una región de adaptador, una región de sitio de unión a cebador universal o cualquier combinación de estos. La Figura 10-13 muestra marcadores oligonucleotídicos de ejemplo.

Según se muestra en la Figura 10, el marcador oligonucleotídico (1004) puede comprender un sitio de unión a cebador universal (1001), una región identificadora exclusiva (1002) y una región específica de diana (1003).

Según se muestra en la Figura 11A, el marcador oligonucleotídico (1107) puede comprender un sitio de unión a cebador universal (1102), una región identificadora exclusiva (1103) y una región específica de diana (1105). El sitio de unión a cebador universal (1102) puede comprender una ligadura de fosforotioato, según se representa mediante un «*» en la Figura 11A. Según se muestra en la Figura 11B, el marcador oligonucleotídico (1128) puede comprender un sitio de unión a cebador universal (1122), una región identificadora exclusiva (1123), un puente de soporte (1129) y una región específica de diana (1126). Según se muestra en la Figura 11C, el marcador oligonucleotídico (1158) puede comprender un sitio de unión a cebador universal (1151), una región identificadora exclusiva (1152), una secuencia de ligadura (1153) y una región específica de diana (1157). Según se muestra en la Figura 11D, el marcador oligonucleotídico (1177) puede comprender un sitio de unión a cebador universal (1171), una región identificadora exclusiva (1172), una secuencia de ligadura (1173) y una región específica de diana de ADN (1178).

Según se muestra en la Figura 12A, el marcador oligonucleotídico (1201) puede comprender un sitio de unión a cebador universal (1202), una región identificadora exclusiva que comprende una secuencia degenerada (1203) y una región específica de diana (1204). Según se muestra en la Figura 12B, el marcador oligonucleotídico (1210) puede comprender un sitio de unión a cebador universal (1211), una región identificadora exclusiva (1215) que comprende una secuencia degenerada (1213) flanqueada por dos secuencias flanqueadoras (1212 y 1214) y una región específica de diana (1216).

El marcador oligonucleotídico puede comprender una o más estructuras secundarias. Según se muestra en la Figura 13A, el marcador oligonucleotídico (1301) comprende una estructura de horquilla. El marcador oligonucleotídico (1301) puede comprender una región específica de diana (1302), un tallo escindible (1303, 1304) y una región identificadora exclusiva (1305).

El marcador oligonucleotídico puede comprender una región específica de diana que puede hibridarse con una pluralidad de moléculas diana diferentes. Por ejemplo, según se muestra en la Figura 13B, el marcador oligonucleotídico (1310) puede comprender un sitio de unión a cebador universal (1311), una región identificadora exclusiva (1312) y una región específica de diana universal (1313). La región específica de diana universal (1313)

puede comprender una secuencia oligodT que permite la hibridación con moléculas dianas que comprenden una secuencia de poliA o poliU.

Un método para sintetizar una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos se representa en la Figura 10. Según se muestra en la Figura 10, los marcadores oligonucleotídicos (1004) se pueden sintetizar por separado. Los marcadores oligonucleotídicos (1004) pueden comprender un sitio de unión a cebador universal (1001), una región identificadora exclusiva (1002) y una región específica de diana. Los marcadores oligonucleotídicos individuales se pueden agrupar para producir una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos (1005) que comprenden una pluralidad de regiones identificadoras exclusivas diferentes.

Un método para sintetizar una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos se representa en la Figura 11A. Según se muestra en la Figura 11A, los fragmentos oligonucleotídicos (1101) se pueden sintetizar por separado. Los fragmentos oligonucleotídicos (1101) pueden comprender un sitio de unión a cebador universal (1102) y una región identificadora exclusiva (1103). El sitio de unión a cebador universal (1102) puede comprender una ligadura de fosforotioato, según se representa mediante un «*» en la Figura 11A. Según se muestra en la Etapa 1 de la Figura 11A, los fragmentos oligonucleotídicos individuales (1101) se pueden mezclar para producir una pluralidad de fragmentos oligonucleotídicos (1104). La pluralidad de fragmentos oligonucleotídicos (1104) se puede acoplar a una región específica de diana (1105). Según se muestra en la Etapa 2 de la Figura 11A, la región específica de diana se puede ligar al marcador oligonucleotídico para producir un marcador oligonucleotídico que comprende una región específica de diana (1105). Se pueden agregar exonucleasas en 5' y 3' a la reacción para retirar los productos no ligados (1105, 1101). El marcador oligonucleotídico (1106) que comprende el sitio de unión a cebador universal (1102), una región identificadora exclusiva (1103) y una región específica de diana (1105) pueden ser resistentes a las exonucleasas en 5' y 3'. Según se muestra en la Etapa 3 de la Figura 11A, el grupo fosfato en 3' del marcador oligonucleotídico ligado (1106) se puede retirar para producir un marcador oligonucleotídico (1107) sin un grupo fosfato en 3'. El grupo fosfato en 3' se puede retirar de manera enzimática. Por ejemplo, se puede utilizar una polinucleótido cinasa de T4 para retirar el grupo fosfato en 3'.

Otro método para sintetizar marcadores oligonucleotídicos se representa en la Figura 11B. Según se muestra en la Figura 11B, un marcador oligonucleotídico (1128) se puede sintetizar al ligar dos fragmentos oligonucleotídicos (1121 y 1127). Un fragmento oligonucleotídico (1121) puede comprender un sitio de unión a cebador universal (1122), una región identificadora exclusiva (1123) y un soporte izquierdo (1123). El otro fragmento oligonucleotídico (1128) puede comprender un soporte derecho (1125) y una región específica de diana (1126). Una ligasa (p. ej., la ligasa de ADN de T4) se puede utilizar para unir los dos fragmentos oligonucleotídicos (1121 y 1127) para producir un marcador oligonucleotídico (1128). La ligadura bicatenaria del soporte izquierdo (1124) y el soporte derecho (1125) pueden producir un marcador oligonucleotídico (1128) con un soporte de puente (1129).

Un método alternativo para sintetizar un marcador oligonucleotídico al ligar dos fragmentos oligonucleotídicos se representa en la Figura 11C. Según se muestra en la Figura 11C, un marcador oligonucleotídico (1158) se puede sintetizar al ligar dos fragmentos oligonucleotídicos (1150 y 1158). Un fragmento oligonucleotídico (1150) puede comprender un sitio de unión a cebador universal (1151), una región identificadora exclusiva (1152) y una secuencia de ligadura (1153). El otro fragmento oligonucleotídico (1158) puede comprender una secuencia de ligadura (1154) que es complementaria a la secuencia de ligadura (1153) del primer fragmento oligonucleotídico (1150), un complemento de una región específica de diana (1155) y una etiqueta (1156). El fragmento oligonucleotídico (1159) también puede comprender un fosfato en 3' que evita la extensión del fragmento oligonucleotídico. Según se muestra en la Etapa 1 de la Figura 11C, las secuencias de ligadura (1153 y 1154) de los dos fragmentos oligonucleotídicos pueden aparearse y se puede utilizar una polimerasa para extender el extremo 3' del primer fragmento oligonucleotídico (1150) para producir un marcador oligonucleotídico (1158). El marcador oligonucleotídico (1158) puede comprender un sitio de unión a cebador universal (1151), una región identificadora exclusiva (1152), una secuencia de ligadura (1153) y una región específica de diana (1157). La secuencia específica de diana (1157) del marcador oligonucleotídico (1158) puede ser el complemento de la región específica de diana (1155) del segundo fragmento oligonucleotídico (1159). El fragmento oligonucleotídico que comprende la etiqueta (1156) se puede retirar de los marcadores oligonucleotídicos (1158). Por ejemplo, la etiqueta (1156) puede comprender biotina y los fragmentos oligonucleotídicos (1159) que comprenden la etiqueta de biotina (1156) se pueden retirar a través de captura por estreptavidina. En otro ejemplo, la etiqueta (1156) puede comprender un fosfato en 5' y los fragmentos oligonucleotídicos (1159) que comprenden el fosfato en 5' (1156) se pueden retirar a través de una exonucleasa (p. ej., la exonucleasa Lambda).

Según se representa en la Figura 11D, un primer fragmento oligonucleotídico (1170) que comprende un sitio de unión a cebador universal (1171), una región identificadora exclusiva (1172), una primera secuencia de ligadura (1173) se aparea con un segundo fragmento oligonucleotídico (1176) que comprende una segunda secuencia de ligadura (1174) y un complemento de ARN de la secuencia diana (1175). La Etapa 1 puede comprender aparear la primera y segunda secuencias de ligadura (1173 y 1174) y posteriormente someter a transcripción inversa el complemento de ARN de la secuencia diana (1175) para producir un marcador oligonucleotídico (1177) que comprende un sitio de unión a cebador universal (1171), una región identificadora exclusiva (1172), una primera secuencia de ligadura (1173) y una región específica de diana (1178). Los fragmentos

oligonucleotídicos que comprenden el complemento de ARN de la secuencia diana se pueden degradar de manera selectiva mediante tratamiento con ARNasa.

El marcador oligonucleotídico puede comprender al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos o pares de bases. En otro ejemplo, el marcador oligonucleotídico comprende al menos alrededor de 1500, 2000; 2500; 3000; 3500; 4000; 4500; 5000; 5500; 6000; 6500; 7000; 7500; 8000; 8500; 9000; 9500 o 10 000 nucleótidos o pares de bases.

Los marcadores pueden ser hexámeros, p. ej., hexámeros aleatorios. Los marcadores se pueden generar aleatoriamente a partir de un conjunto de mononucleótidos. Los marcadores se pueden ensamblar mediante incorporación aleatoria de mononucleótidos.

Los marcadores también se pueden ensamblar sin aleatoriedad, para generar una biblioteca de diferentes marcadores que no se generaron de manera aleatoria, pero que incluyen cantidades suficientes de marcadores diferentes para poner en práctica los métodos.

En algunas realizaciones, un marcador oligonucleotídico puede comprender un recorte en una molécula diana. El recorte puede ser, por ejemplo, una digestión enzimática de uno o ambos extremos de una molécula diana. El recorte se puede utilizar junto con la adición de marcadores oligonucleotídicos agregados. La combinación del recorte y los marcadores agregados puede contener información relacionada con la molécula de partida específica. Al agregar un recorte aleatorio al marcador, puede ser necesaria una diversidad más pequeña de marcadores agregados para contar la cantidad de moléculas diana cuando la detección permite la determinación del recorte aleatorio y los oligonucleótidos agregados.

El marcador oligonucleotídico puede comprender una región específica de diana. La región específica de diana puede comprender una secuencia que es complementaria a la molécula. En algunos casos, la molécula es una molécula de ARNm y la región específica de diana comprende una secuencia oligodT que es complementaria a la cola de poliA de la molécula de ARNm. La región específica de diana también puede actuar como cebador para la síntesis de ADN y/o ARN. Por ejemplo, la secuencia oligodT de la región específica de diana puede actuar como cebador para la síntesis de la primera cadena de una copia de ADNc de la molécula de ARNm. Alternativamente, la región específica de diana comprende una secuencia que es complementaria a cualquier porción de la molécula. En otros casos, la región específica de diana comprende una secuencia aleatoria que se puede hibridar o ligar con/a la molécula. La región específica de diana puede permitir el acoplamiento del marcador oligonucleotídico a la molécula. El acoplamiento del marcador oligonucleotídico se puede producir mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria (p. ej., hibridación, ligadura). En algunos casos, la región específica de diana comprende una secuencia que es reconocida por una o más enzimas de restricción. La región específica de diana puede comprender al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos o pares de bases. En otro ejemplo, la región específica de diana comprende al menos alrededor de 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500 o 10 000 nucleótidos o pares de bases. Preferiblemente, la región específica de diana comprende al menos alrededor de 5-10, 10-15, 10-20, 10-30, 15-30 o 20-30 nucleótidos o pares de bases.

En algunos casos, la región específica de diana es específica para un gen o producto génico específico. Por ejemplo, la región específica de diana comprende una secuencia complementaria a una región de un gen p53 o producto génico. Por lo tanto, los marcadores oligonucleotídicos solo se pueden acoplar a moléculas que comprenden la secuencia específica de p53. Alternativamente, la región específica de diana es específica para una pluralidad de genes o productos génicos diferentes. Por ejemplo, la región específica de diana comprende una secuencia oligodT. Por lo tanto, los marcadores oligonucleotídicos se pueden acoplar a cualquier molécula que comprenda una secuencia de poliA. En otro ejemplo, la región específica de diana comprende una secuencia aleatoria que es complementaria a una pluralidad de genes o productos génicos diferentes. Por consiguiente, el marcador oligonucleotídico se puede acoplar a cualquier molécula con una secuencia que es complementaria a la región específica de diana. En otros casos, la región específica de diana comprende una prolongación de sitio de restricción (p. ej., prolongación de extremo cohesivo EcoRI). El marcador oligonucleotídico se puede ligar a cualquier molécula que comprenda una secuencia complementaria a la prolongación del sitio de restricción.

El marcador oligonucleotídico descrito en la presente a menudo comprende una región identificadora exclusiva. La región identificadora exclusiva se puede utilizar para identificar de manera exclusiva apariciones de especies diana y marcar, de esta manera, cada especie con un identificador que se puede utilizar para distinguir entre dos dianas de otro modo idénticas o casi idénticas. La región identificadora exclusiva de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos puede comprender una colección de diferentes nanocristales semiconductores, compuestos metálicos, péptidos, oligonucleótidos, anticuerpos, moléculas pequeñas, isótopos, partículas o estructuras que tienen diferentes formas, colores, códigos de barra o patrones de difracción asociados a estas o integrados a estas, series de números, fragmentos aleatorios de proteínas o ácidos nucleicos, isótopos diferentes o

cualquier combinación de estos. La región identificadora exclusiva puede comprender una secuencia degenerativa. La región identificadora exclusiva puede comprender al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos o pares de bases. En otro ejemplo, la región identificadora exclusiva comprende al menos alrededor de 1500; 2000; 2500; 3000; 3500; 4000; 4500; 5000; 5500; 6000; 6500; 7000; 7500; 8000; 8500; 9000; 9500 o 10 000 nucleótidos o pares de bases. Preferiblemente, la región identificadora exclusiva comprende al menos alrededor de 10-30, 15-40 o 20-50 nucleótidos o pares de bases.

En algunos casos, el marcador oligonucleotídico comprende un sitio de unión a un cebador universal. El sitio de unión a cebador universal permite el acoplamiento de un cebador universal a la molécula etiquetada y/o el amplicón etiquetado. Los cebadores universales se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, -47F (M13F), alfaMF, AOX3', AOX5', BGH_r, CMV_-30, CMV_-50, CVM_f, LACrmt, lamgda gt10F, lambda gt 10R, lambda gt11F, lambda gt11R, M13 rev, M13Forward(-20), M13Reverse, male, p10SEQP_pQE, pA_-120, pet_4, pGAP Forward, pGL_RVpr3, pGLpr2_R, pKLAC1_4, pQE_FS, pQE_RS, puc_U1, puc_U2, revers_A, seq_IRES_tam, seq_IRES_zpet, seq_ori, seq_PCR, seq_pIRES-, seq_pIRES+, seq_pSecTag, seq_pSecTag+, seq_retro+PSI, SP6, T3-prom, T7-prom y T7-term_Inv. El acoplamiento de un cebador universal al sitio de unión a cebador universal se puede utilizar para la amplificación, detección y/o secuenciación de la molécula etiquetada y/o el amplicón etiquetado. El sitio de unión a cebador universal puede comprender al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos o pares de bases. En otro ejemplo, el sitio de unión a cebador universal comprende al menos alrededor de 1500; 2000; 2500; 3000; 3500; 4000; 4500; 5000; 5500; 6000; 6500; 7000; 7500; 8000; 8500; 9000; 9500 o 10 000 nucleótidos o pares de bases. Preferiblemente, el sitio de unión a cebador universal comprende 10-30 nucleótidos o pares de bases.

El marcador oligonucleotídico puede comprender una región de adaptador. La región de adaptador puede permitir la hibridación de una o más sondas. La región de adaptador puede permitir la hibridación de una o más sondas de HCR.

El marcador oligonucleotídico puede comprender una o más etiquetas.

El marcador oligonucleotídico puede actuar como iniciador de una reacción en cadena de hibridación (HCR). La región de adaptador del marcador oligonucleotídico puede actuar como iniciador para una HCR. El sitio de unión a cebador universal puede actuar como iniciador para una HCR.

En algunos casos, el marcador oligonucleotídico es monocatenario. En otros casos, el marcador oligonucleotídico es bicatenario. El marcador oligonucleotídico puede ser lineal. De manera alternativa, el marcador oligonucleotídico comprende una estructura secundaria. Según se usa en la presente memoria, «estructura secundaria» incluye estructuras terciarias, cuaternarias, etc. En algunos casos, la estructura secundaria es una horquilla, una estructura de tallo-lazo, un lazo interno, un lazo sobresaliente, una estructura ramificada o un pseudonudo, estructuras de múltiple tallo y lazo, estructuras de tipo hoja de trébol o cualquier estructura tridimensional. En algunos casos, la estructura secundaria es una horquilla. La horquilla puede comprender una secuencia de prolongación. La secuencia de prolongación de la horquilla puede actuar como cebador para una reacción en cadena de la polimerasa y/o una reacción de transcripción inversa. La secuencia de prolongación puede comprender una secuencia que es complementaria a la molécula a la cual se acopla el marcador oligonucleotídico y la secuencia de prolongación se hibrida con la molécula. La secuencia de prolongación se puede ligar a la molécula y actúa como plantilla para una reacción en cadena de la polimerasa y/o una reacción de transcripción inversa. En algunas realizaciones, el marcador comprende ácidos nucleicos y/o ácidos nucleicos sintéticos y/o ácido nucleico modificados.

Un marcador oligonucleotídico que comprende una horquilla puede actuar como sonda para una reacción en cadena de hibridación. También se describe en la presente memoria un método de reacción en cadena de hibridación (HCR) basado en etiquetas estocásticas que comprende etiquetar de manera estocástica una o más moléculas de ácido nucleico con un marcador oligonucleotídico, en donde el marcador oligonucleotídico es una horquilla y la una o más moléculas de ácido nucleico actúan como iniciadores de una reacción en cadena de hibridación. Un esquema de la reacción de hibridación basada en etiquetas estocásticas se representa en la Figura 34. Según se muestra en la Figura 34, una o más moléculas de ácido nucleico (3480) se etiquetan de manera estocástica con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos horquillados (3490) al iniciar una reacción en cadena de hibridación. Los marcadores oligonucleotídicos horquillados pueden comprender una o más etiquetas (3410, 3470), una prolongación (3420, 3420'), un tallo (3430, 3460) y un lazo (3450). La región de prolongación (3420) del marcador oligonucleotídico horquillado (3490) puede comprender una región específica de diana. La región de prolongación (3420) puede comprender una secuencia oligodT. La muestra que comprende la una o más moléculas de ácido nucleico se puede tratar con una o más nucleasas de restricción antes del etiquetado estocástico. La región de prolongación (3420) puede comprender una secuencia de reconocimiento de enzima de restricción. La muestra que comprende la una o más moléculas de ácido nucleico se puede poner en contacto con uno o más adaptadores antes del etiquetado estocástico para producir un híbrido de adaptador-molécula de ácido

nucleico. La región de prolongación (3420) y el tallo (3430) pueden ser complementarios al uno o más adaptadores. El lazo (3450) del marcador oligonucleotídico puede comprender una región identificadora exclusiva. La hibridación de un primer marcador oligonucleotídico horquillado (3490) con las moléculas de ácido nucleico (3480) puede resultar en la formación de una molécula etiquetada (3415), en donde el primer marcador oligonucleotídico horquillado se linealiza para producir un primer marcador oligonucleotídico linealizado. El primer marcador oligonucleotídico linealizado de la molécula etiquetada (3415) puede actuar como iniciador para la hibridación de un segundo marcador oligonucleotídico horquillado con la molécula etiquetada (3415) para producir una molécula etiquetada con dos marcadores oligonucleotídicos linealizados (3425). El segundo marcador oligonucleotídico linealizado puede actuar como iniciador de otra reacción de hibridación. Este proceso se puede repetir múltiples veces para producir una molécula etiquetada con múltiples sondas de HCR linealizadas (3435). Las etiquetas (3410, 3470) en la sonda de HCR pueden permitir la detección de la molécula etiquetada. Las etiquetas (3410, 3470) pueden ser de cualquier tipo de etiqueta (p. ej., fluoróforo, cromóforo, molécula pequeña, nanopartícula, hapteno, enzima, anticuerpo, imán). Las etiquetas (3360 y 3390) pueden comprender fragmentos de una etiqueta simple. Las etiquetas (3410, 3470) pueden generar una señal detectable cuando están en estrecha proximidad. Cuando el marcador oligonucleotídico es una horquilla, las etiquetas (3360 y 3390) pueden estar demasiado distanciadas para producir una señal detectable. Cuando el marcador oligonucleotídico horquillado se linealiza y se hibridan múltiples marcadores oligonucleotídicos horquillados linealizados entre sí, las etiquetas (3410, 3470) pueden estar en una proximidad suficientemente estrecha para generar una señal detectable. Por ejemplo, un marcador oligonucleotídico horquillado (3350) puede comprender dos restos pireno como etiquetas (3410, 3470). Alternativamente, las etiquetas pueden ser nanopartículas. La HCR basada en etiquetas estocásticas puede permitir el acoplamiento de múltiples marcadores oligonucleotídicos horquillados con una molécula etiquetada, que pueden resultar en la amplificación de señal. La HCR basada en etiquetas estocásticas puede aumentar la sensibilidad de detección, el análisis y/o la cuantificación de las moléculas de ácido nucleico. La HCR basada en etiquetas estocásticas pueden aumentar la precisión de la detección, el análisis y/o la cuantificación de una o más moléculas de ácido nucleico.

En algunos casos, la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende al menos alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 marcadores oligonucleotídicos diferentes. En otros casos, la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende al menos alrededor de 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000; 2000; 3000; 4000; 5000; 6000; 7000; 8000; 9000; o 10 000 marcadores oligonucleotídicos diferentes. Alternativamente, la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende al menos alrededor de 20 000; 30 000; 40 000; 50 000; 60 000; 70 000; 80 000; 90 000; o 100 000 marcadores oligonucleotídicos diferentes.

La cantidad de marcadores oligonucleotídicos en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos está a menudo en exceso con respecto a la cantidad de moléculas que se etiquetarán. En algunos casos, la cantidad de marcadores oligonucleotídicos en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos es al menos alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces mayor que la cantidad de moléculas que se etiquetarán.

La cantidad de marcadores oligonucleotídicos diferentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos está a menudo en exceso con respecto a la cantidad de moléculas diferentes que se etiquetarán. En algunos casos, la cantidad de marcadores oligonucleotídicos diferentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos es al menos alrededor de 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces mayor que la cantidad de moléculas diferentes que se etiquetarán.

En algunos casos, el etiquetado estocástico de una molécula comprende una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos, en donde la concentración de los diferentes marcadores oligonucleotídicos en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos es la misma. En tales casos, la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende cantidades iguales de cada marcador oligonucleotídico diferente. Además, la relación relativa entre los diferentes marcadores oligonucleotídicos y la pluralidad de oligonucleótido es 1:1:1...1.

En algunos casos, el etiquetado estocástico de una molécula comprende una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos, en donde la concentración de los diferentes marcadores oligonucleotídicos en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos es diferente. En tales casos, la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende cantidades diferentes de cada marcador oligonucleotídico diferente. Además, la relación relativa entre los diferentes marcadores oligonucleotídicos y la pluralidad de oligonucleótido no es 1:1:1...1. En algunos casos, algunos marcadores oligonucleotídicos están presentes a concentraciones más altas que otros marcadores oligonucleotídicos en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos. En algunos casos, el etiquetado estocástico con diferentes concentraciones de marcadores oligonucleotídicos extiende el intervalo dinámico de medición de la muestra sin aumentar la cantidad de etiquetas diferentes utilizada. Por ejemplo, en el caso de etiquetar de manera estocástica 3 moléculas de ácido nucleico con 10 marcadores oligonucleotídicos diferentes todos a la misma concentración. Se espera observar 3 etiquetas diferentes. En cambio, con 30 moléculas de ácido nucleico en lugar de 3 moléculas de ácido nucleico, se espera observar la totalidad de 10 etiquetas. En cambio, si todavía se utilizan 10 etiquetas estocásticas diferentes y se alteran las relaciones relativas de las etiquetas a 1:2:3:4...10, entonces con 3 moléculas de ácido nucleico se esperaría observar entre 1-3 etiquetas, pero con 30 moléculas se esperaría observar solo aproximadamente 5 etiquetas y extender, de esta manera, el intervalo de medición con la misma

cantidad de etiquetas estocásticas.

Las relaciones relativas de los marcadores oligonucleotídicos diferentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos puede ser de 1:X, donde X es al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100. Alternativamente, las relaciones relativas de «n» marcadores oligonucleotídicos diferentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos es 1:A:B:C:...Z_n, donde A, B, C...Z_n es al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100.

En algunos casos, la concentración de dos o más marcadores oligonucleotídicos diferentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos es la misma. Para «n» marcadores oligonucleotídicos diferentes, la concentración de al menos 2, 3, 4, ...n marcadores oligonucleotídicos diferentes es la misma. Alternativamente, la concentración de dos o más marcadores oligonucleotídicos diferentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos es diferente. Para «n» marcadores oligonucleotídicos diferentes, la concentración de al menos 2, 3, 4,...n marcadores oligonucleotídicos diferentes es diferente. En algunos casos, para «n» marcadores oligonucleotídicos diferentes, la diferencia en la concentración para al menos 2, 3, 4,...n marcadores oligonucleotídicos diferentes es al menos alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2, 2,25, 2,5, 2,75, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 veces.

En algunos casos, al menos alrededor de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de los marcadores oligonucleotídicos diferentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos tiene la misma concentración. Alternativamente, al menos alrededor de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de los marcadores oligonucleotídicos diferentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos tiene una concentración diferente.

Las secuencias de los marcadores oligonucleotídicos se pueden optimizar para minimizar la dimerización de los marcadores oligonucleotídicos. La Figura 15 representa la formación de dímeros de marcador oligonucleotídico cuando las secuencias de marcador oligonucleotídico no están optimizadas. Según se muestra en la Figura 15, cuando las secuencias de marcador oligonucleotídico no están optimizadas, un primer marcador oligonucleotídico (1507) que comprende un sitio de unión a cebador universal (1501), una primera región identificadora exclusiva (1502) y una primera región específica de diana (1503) se pueden aparear con un segundo marcador oligonucleotídico (1508) que comprende un sitio de unión a cebador universal (1501), una segunda región identificadora exclusiva (1504) y una segunda región específica de diana (1505). El dímero de marcador oligonucleotídico se puede amplificar y resultar en la formación de un amplicón (1506) que comprende dos sitios de unión a cebador universal en cada extremo del amplicón y una región específica de diana y una región identificadora exclusiva. Debido a que la concentración de los marcadores oligonucleotídicos es mucho mayor que la cantidad de plantillas de ADN, estos dímeros de marcador oligonucleotídico pueden competir con las moléculas de ADN etiquetadas en una reacción de amplificación. Los ADN no amplificados conducen a falsos negativos y los dímeros de marcador oligonucleotídico amplificados conducen a falsos positivos elevados. Por lo tanto, los marcadores oligonucleotídicos se pueden optimizar para minimizar la formación de dímeros de marcador oligonucleotídico. Alternativamente, los marcadores oligonucleotídicos que se dimerizan se descartan y se elimina, de esta manera, la formación de dímeros de marcador oligonucleotídico.

De manera alternativa, según se ilustra en la Figura 16, la formación de dímeros de marcador oligonucleotídico se puede eliminar o reducir mediante la incorporación de una o más modificaciones en la secuencia de marcador oligonucleotídico. Según se muestra en la Figura 16, un marcador oligonucleotídico (1610) que comprende un sitio de unión a cebador universal (1611), una región identificadora exclusiva (1612) y una región específica de diana (1613) que comprende uracilos y un grupo fosfato en 3' se aparea con una molécula diana (1616). La molécula diana (1616) puede ser un fragmento digerido por endonucleasa de restricción. La endonucleasa de restricción puede reconocer el sitio de restricción representado en la Figura 16. La amplificación por PCR puede comprender uno o más cebadores directos (1618 y 1618) y uno o más cebadores inversos (1614 y 1615). La amplificación por PCR puede comprender PCR anidada con un cebador directo (1618) específico para el sitio de unión a cebador universal (1611) del marcador oligonucleotídico y un cebador directo (1617) específico para la región específica de diana (1613) del marcador oligonucleotídico y cebadores inversos (1614 y 1615) que son específicos para la molécula diana. La molécula diana se puede amplificar utilizando ADN polimerasa Pfu, que no puede amplificar plantillas que comprenden uno o más uracilos. Por lo tanto, ningún marcador oligonucleotídico dimerizado se puede amplificar mediante ADN polimerasa Pfu.

VIII. Etiquetas detectables

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria comprenden, además, una etiqueta detectable. Los términos «etiqueta detectable» o «etiqueta» se pueden utilizar de modo intercambiable y hacen referencia a cualquier resto químico acoplado a un nucleótido, polímero nucleotídico o factor de unión de ácido

nucleico, en donde el acoplamiento puede ser covalente o no covalente. Preferiblemente, la etiqueta es detectable y hace que el nucleótido o polímero nucleotídico sea detectable para el que pone en práctica la invención. Las etiquetas detectables que se pueden utilizar en combinación con los métodos descritos en la presente memoria incluyen, por ejemplo, una etiqueta fluorescente, una etiqueta quimioluminiscente, un aplacador, una etiqueta radioactiva, biotina, resto pireno, oro o combinaciones de estos. Los ejemplos no limitantes de etiquetas detectables incluyen moléculas luminiscentes, fluorocromos, agentes de aplacamiento fluorescentes, moléculas coloreadas, radioisótopos o centelleantes.

En algunos casos, los métodos descritos en la presente memoria comprenden, además, acoplar una o más etiquetas detectables a la molécula etiquetada o cualquier producto de esta (p. ej., un amplicón etiquetado). Los métodos pueden comprender acoplar dos o más etiquetas detectables a la molécula etiquetada. De manera alternativa, el método comprende acoplar al menos alrededor de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 etiquetas detectables a una molécula etiquetada. En algunos casos, la etiqueta detectable es una etiqueta Cy™. La etiqueta Cy™ es una etiqueta de Cy3. De manera alternativa, o adicional, la etiqueta detectable es biotina. En algunas realizaciones, la etiqueta detectable se acopla a una sonda que se une a la molécula o molécula etiquetada. Esto se puede producir, por ejemplo, después de que la molécula o molécula etiquetada se ha hibridado con una matriz. En un ejemplo, la molécula se une a ligandos en una matriz. Después de la unión, una sonda que se puede unir a la molécula se une a las moléculas en la matriz. Este proceso se puede repetir con múltiples sondas y etiquetas para reducir la probabilidad de que una señal sea el resultado de una unión no específica de una etiqueta o la unión no específica de la molécula a la matriz.

En algunos casos, se puede utilizar un par de donante aceptador como las etiquetas detectables. El donante o el aceptador se puede acoplar a una sonda que se une a un ácido nucleico. La sonda puede ser, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico que se une a la molécula o la molécula etiquetada. El donante o aceptador correspondiente se puede agregar para provocar una señal.

En algunos casos, la etiqueta detectable es un tinte Freedom, tinte Alexa Fluor®, tinte Cy™, tinte de fluoresceína o LI-COR IRDyes®. En algunos casos, el tinte Freedom es fluoresceína (6-FAM™, 6-carboxifluoresceína), MAX (NHS Ester), TYE™ 563, TEX 615, TYE™ 665, TYE 705. La etiqueta detectable puede ser un tinte Alexa Fluor. Los ejemplos de tintes Alexa Fluor® incluyen Alexa Fluor® 488 (NHS Ester), Alexa Fluor® 532 (NHS Ester), Alexa Fluor® 546 (NHS Ester), Alexa Fluor® 594 (NHS Ester), Alexa Fluor® 647 (NHS Ester), Alexa Fluor® 660 (NHS Ester) o Alexa Fluor® 750 (NHS Ester). De manera alternativa, la etiqueta detectable es un tinte Cy™. Los ejemplos de tintes Cy™ incluyen, pero no se limitan a, Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 y Cy7. En algunos casos, la etiqueta detectable es un tinte de fluoresceína. Los ejemplos no limitantes de tintes de fluoresceína incluyen 6-FAM™ (Azide), 6-FAM™ (NHS Ester), Fluorescein dT, JOE (NHS Ester), TET™ y HEX™. En algunos casos, la etiqueta detectable es una LI-COR IRDyes®, tal como 5' IRDye® 700, 5' IRDye® 800 o IRDye® 800CW (NHS Ester). En algunos casos, la etiqueta detectable es TYE™ 563. De manera alternativa, la etiqueta detectable es Cy3.

La etiqueta detectable puede ser un tinte de rodamina. Los ejemplos de tintes de rodamina incluyen, pero no se limitan a, Rhodamine Green™-X (NHS Ester), TAMRA™, TAMRA™ (NHS Ester), Rhodamine Red™-X (NHS Ester), ROX™ (NHS Ester) y 5'TAMRA™ (Azide). En otros casos, la etiqueta detectable es un tinte WellRED. Los tintes WellRED incluyen, pero no se limitan a, el tinte WellRED D4, el tinte WellRED D3 y el tinte WellRED D2. En algunos casos, la etiqueta detectable es Texas Red®-X (NHS Ester), Lightcycler® 640 (NHS Ester) o Dy 750 (NHS Ester).

En algunos casos, las etiquetas detectables incluyen una molécula enlazadora. Los ejemplos de moléculas enlazadoras incluyen, pero no se limitan a, biotina, avidina, estreptavidina, HRP, proteína A, proteína G, anticuerpos o fragmentos de estos, Grb2, polihistidina, Ni²⁺, marcadores FLAG, marcadores myc. De manera alternativa, las etiquetas detectables incluyen metales pesados, donantes/aceptadores de electrones, ésteres de acridinio, tintes y sustratos calorimétricos. En otros casos, las etiquetas detectables incluyen enzimas tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa y luciferasa.

Un cambio en la masa se puede considerar como una etiqueta detectable, como es el caso de la detección por resonancia de plasmones superficiales. El experto reconocerá fácilmente las etiquetas detectables útiles que no se mencionan en la presente memoria, que pueden emplearse.

En algunos casos, las etiquetas detectables se utilizan como cebadores. Por ejemplo, el cebador universal se etiqueta con la etiqueta detectable (p. ej., cebador universal etiquetado con Cy3, cebador universal etiquetado con fluoróforo). De manera alternativa, el cebador específico de diana se etiqueta con la etiqueta detectable (p. ej., cebador específico de diana etiquetado con TYE 563). En otros casos, las etiquetas detectables se utilizan como marcadores oligonucleotídicos. Por ejemplo, el marcador oligonucleotídico se etiqueta con una etiqueta detectable (p. ej., marcador oligonucleotídico etiquetado con biotina). En otros casos, las etiquetas detectables se utilizan con la molécula plantilla de ácido nucleico. Las etiquetas detectables se pueden utilizar para detectar moléculas etiquetadas o amplicones etiquetados. De manera alternativa, las etiquetas detectables se utilizan para detectar la

molécula plantilla de ácido nucleico.

En algunos casos, la etiqueta detectable se acopla al cebador, marcador oligonucleotídico, molécula etiquetada, amplicón etiquetado, sonda, sonda de HCR y/o molécula no etiquetada. Los métodos para acoplar la etiqueta detectable al cebador, marcador oligonucleotídico, molécula etiquetada, amplicón etiquetado y/o molécula no etiquetada incluyen, pero no se limitan a, etiquetado químico y etiquetado enzimático. En algunos casos, la etiqueta detectable se acopla mediante etiquetado químico. En algunas realizaciones, las técnicas de etiquetado químico comprenden un grupo químicamente reactivo. Los ejemplos no limitantes de grupos reactivos incluyen ésteres de succinimidilo reactivos a amina tales como NHS-fluoresceína o NHS-rodamina, derivados de isotiocianato reactivos a amina que incluyen FITC y flúors activados por maleimida reactivos a sulfhidrilo tales como fluoresceína-5-maleimida. En algunas realizaciones, la reacción de cualquiera de estos tintes reactivos con otra molécula resulta en un enlace covalente estable formado entre un fluoróforo y el enlazador y/o agente. En algunas realizaciones, el grupo reactivo es isotiocianatos. En algunas realizaciones, una etiqueta se acopla a un agente a través de aminas primarias de cadenas laterales de lisina. En algunas realizaciones, el etiquetado químico comprende un método de química con NHS-éster.

De manera alternativa, la etiqueta detectable se acopla mediante etiquetado enzimático. Los métodos de etiquetado enzimático pueden incluir, pero no se limitan a, método de péptido aceptador de biotina/ligasa de biotina (AP/Bir A), proteína portadora de acilo/fosfopanteteína transferasa (ACP/PPTasa), O⁶-alquilguanina transferasa humana (hAGT), marcador Q/transglutaminasa (TGasa), marcador de aldehído/enzima generadora de formilglicina, deshalogenasa procarionte mutada (HaloTagTM) y motivo de farnesilación/proteína farnesiltransferasa (PFTasa). El etiquetado por afinidad puede incluir, pero no se limita a, métodos no covalentes utilizando dihidrofolato reductasa (DHFR) y el mutante Phe36Val de la proteína de unión a FK506 12 (FKBP12(F36V)) y métodos de quelación de metales.

Se pueden utilizar reactivos de reticulación para acoplar una etiqueta detectable al cebador, marcador oligonucleotídico, molécula etiquetada, amplicón etiquetado y/o molécula no etiquetada. En algunos casos, el reactivo de reticulación es glutaraldehído. El glutaraldehído puede hacer reacción con grupos amina para crear retículos mediante diversas vías. Por ejemplo, en condiciones de reducción, los aldehídos en ambos extremos del glutaraldehído se acoplan con aminas para formar ligaduras de amina secundarias.

En algunos casos, el acoplamiento de la etiqueta detectable al cebador, marcador oligonucleotídico, molécula etiquetada, amplicón etiquetado y/o molécula no etiquetada comprende la activación con periodato y posteriormente la aminación reductora. En algunos casos, se utiliza Sulfo-SMCC u otros reticuladores heterobifuncionales para conjugar la detectable al cebador, marcador oligonucleotídico, molécula etiquetada, amplicón etiquetado y/o molécula no etiquetada. Por ejemplo, se utiliza Sulfo-SMCC para conjugar una enzima con un fármaco. En algunas realizaciones, la enzima se activa y purifica en una etapa y luego se conjuga con el fármaco en una segunda etapa. En algunas realizaciones, la direccionalidad de la reticulación se limita a una orientación específica (p. ej., las aminas en la enzima con los grupos sulfhidrilo en el anticuerpo).

IX. Soportes

En algunos casos, los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria comprenden un soporte. Los términos «soporte» y «sustrato», según se usan en la presente memoria, se usan de manera intercambiable y hacen referencia a un material o grupo de materiales que tienen una superficie o superficies rígidas o semirrígidas. El soporte o sustrato puede ser un soporte sólido. De manera alternativa, el soporte es un soporte no sólido. El soporte o sustrato puede comprender una membrana, papel, plástico, superficie recubierta, superficie plana, vidrio, portaobjetos, chip o cualquier combinación de estos. En muchas realizaciones, al menos una superficie del soporte sólido será sustancialmente plana, aunque en algunas realizaciones puede ser deseable separar físicamente regiones de síntesis para diferentes compuestos con, por ejemplo, pocillos, regiones elevadas, clavijas, canales grabados o similares. Según otras realizaciones, el soporte sólido o los soportes sólidos tendrán forma de perlas, resinas, geles, microesferas u otras configuraciones geométricas. De manera alternativa, el soporte sólido o los soportes sólidos comprenden chips de sílice, micropartículas, nanopartículas, placas y matrices. Los métodos y técnicas aplicables para la síntesis de una matriz polimérica (incluida proteica) se han descrito en la publicación de patente estadounidense n.º 20050074787, WO 00/58516, las patentes estadounidenses núms. 5 143 854, 5 242 974, 5 252 743, 5 324 633, 5 384 261, 5 405 783, 5 424 186, 5 451 683, 5 482 867, 5 491 074, 5 527 681, 5 550 215, 5 571 639, 5 578 832, 5 593 839, 5 599 695, 5 624 711, 5 631 734, 5 795 716, 5 831 070, 5 837 832, 5 856 101, 5 858 659, 5 936 324, 5 968 740, 5 974 164, 5 981 185, 5 981 956, 6 025 601, 6 033 860, 6 040 193, 6 090 555, 6 136 269, 6 269 846 y 6 428 752, en la publicación PCT n.º WO 99/36760 y WO 01/58593. Las patentes que describen técnicas de síntesis en realizaciones específicas incluyen las patentes estadounidenses núms. 5 412 087, 6 147 205, 6 262 216, 6 310 189, 5 889 165 y 5 959 098. Las matrices de ácido nucleico se describen en muchas de las patentes mencionadas anteriormente, pero muchas de las mismas técnicas se pueden aplicar a matrices polipeptídicas. Los sustratos de ejemplo adicionales se describen en la patente estadounidense n.º 5.744.305 y las publicaciones de patente estadounidense núms. 20090149340 y 20080038559.

En algunos casos, el soporte sólido es una perla. Los ejemplos de perlas incluyen, pero no se limitan a, perlas de estreptavidina, perlas de agarosa, perlas magnéticas, Dynabeads®, microperlas MACS®, perlas conjugadas con anticuerpo (p. ej., microperla anti-inmunoglobulina), perlas conjugadas con proteína A, perlas conjugadas con proteína G, perlas conjugadas con proteína A/G, perlas conjugadas con proteína L, perlas conjugadas con oligo-dT, perlas de sílice, perlas similares a sílice, microperlas anti-biotina, microperlas anti-fluorocromo y perlas magnéticas con extremos carboxi BcMag™.

El soporte sólido puede ser una matriz o micromatriz. El soporte sólido puede comprender regiones diferenciadas. El soporte sólido puede ser una matriz direccionable. En algunos casos, la matriz comprende una pluralidad de sondas fijadas sobre una superficie sólida. La pluralidad de sondas permite la hibridación de la molécula etiquetada y/o el amplicón etiquetado con la superficie sólida. La pluralidad de sondas comprende una secuencia que es complementaria a al menos una porción de la molécula etiquetada y/o el amplicón etiquetado. En algunos casos, la pluralidad de sondas comprende una secuencia que es complementaria a la porción de marcador oligonucleotídico de la molécula etiquetada y/o el amplicón etiquetado. En otros casos, la pluralidad de sondas comprende una secuencia que es complementaria a la unión formada mediante el acoplamiento del marcador oligonucleotídico a la molécula.

La matriz puede comprender una o más sondas. Las sondas pueden estar en una variedad de formatos según se representan en la Figura 18. Según se muestra en las Figuras 18A-18C, 18G y 18H, la matriz (1801, 1806, 1811, 1828, 1832) puede comprender una sonda (1804, 1809, 1814, 1836, 1835) que comprende una secuencia que es complementaria a al menos una porción de la molécula diana (1802, 1807, 1813, 1829, 1833) y una secuencia que es complementaria a la región identificadora exclusiva de un marcador oligonucleotídico (1803, 1808, 1812, 1830, 1834). Según se muestra en las Figuras 18A-18B, 18G y 18H, la secuencia que es complementaria a al menos una porción de la molécula diana (1802, 1807, 1829, 1833) se puede acoplar a la matriz. Según se muestra en la Figura 18C, la secuencia que es complementaria a la región identificadora exclusiva (1812) se puede acoplar a la matriz. Según se muestra en las Figuras 18D-18F, la matriz (1816, 1820, 1824) puede comprender una primera sonda (1817, 1821, 1825) que comprende una secuencia que es complementaria a al menos una porción de la molécula diana y una segunda sonda (1819, 1823, 1827) que es complementaria a la región identificadora exclusiva. Las Figuras 18A-18H también representan los diversos modos en que una molécula etiquetada de manera estocástica (1805, 1810, 1815, 1818, 1822, 1826, 1831, 1837) se puede hibridar con las matrices. Por ejemplo, según se muestra en las Figuras 18A y 18C, la unión de la región identificadora exclusiva y la molécula diana de la molécula etiquetada de manera estocástica (1805, 1815) se puede hibridar con la sonda (1804, 1814) en la matriz. Según se muestra en las Figuras 18B, 18D-18H, puede haber un hueco en las regiones de la molécula etiquetada de manera estocástica (1810, 1818, 1822, 1826, 1831, 1837) que se puede hibridar con la sonda en la matriz. Según se muestra en las Figuras 18D-18F y 18H, diferentes regiones de la molécula etiquetada de manera estocástica (1818, 1822, 1826, 1837) se pueden hibridar con dos o más sondas en la matriz. Por lo tanto, las sondas de matriz pueden tener muchos formatos diferentes. Las sondas de matriz pueden comprender una secuencia que es complementaria a una región identificadora exclusiva, una secuencia que es complementaria a la molécula diana o una combinación de estas. La hibridación de la molécula etiquetada de manera estocástica con la matriz se puede producir en una variedad de modos. Por ejemplo, dos o más nucleótidos de la molécula etiquetada de manera estocástica se pueden hibridar con una o más sondas en la matriz. Los dos o más nucleótidos de la molécula etiquetada de manera estocástica que se hibridan con las sondas pueden ser nucleótidos consecutivos, nucleótidos no consecutivos o una combinación de estos. La molécula etiquetada de manera estocástica que se hibrida con la sonda se puede detectar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, las moléculas etiquetadas se pueden detectar directamente. La detección directa de la molécula etiquetada de manera estocástica puede comprender la detección de un fluoróforo, hapteno o etiqueta detectable. Las moléculas etiquetadas de manera estocástica se pueden detectar indirectamente. La detección indirecta de la molécula etiquetada de manera estocástica puede comprender la ligadura u otros métodos enzimáticos o no enzimáticos.

La matriz puede tener una variedad de formatos. Por ejemplo, la matriz puede estar en un formato de 16-, 32-, 48-, 64-, 80-, 96-, 112-, 128-, 144-, 160-, 176-, 192-, 208-, 224-, 240-, 256-, 272-, 288-, 304-, 320-, 336-, 352-, 368-, 384- o 400-. Alternativamente, la matriz está en un formato de 8x60 K, 4x180 K, 2x400 K, 1x1M. En otros casos, la matriz está en un formato 8x15 K, 4x44 K, 2x105 K, 1x244 K.

La matriz puede comprender una matriz simple. La matriz simple puede estar sobre un sustrato simple. Alternativamente, la matriz está sobre múltiples sustratos. La matriz puede comprender múltiples formatos. La matriz puede comprender una pluralidad de matrices. La pluralidad de matrices puede comprender dos o más matrices. Por ejemplo, la pluralidad de matrices puede comprender al menos alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 matrices. En algunos casos, al menos dos matrices de la pluralidad de matrices son idénticas. De manera alternativa, al menos dos matrices de la pluralidad de matrices son diferentes.

En algunos casos, la matriz comprende áreas compartimentadas simétricas. Por ejemplo, la matriz comprende áreas compartimentadas de 0,5 x 0,5 mm, 1 x 1 mm, 1,5 x 1,5 mm, 2 x 2 mm, 2,5 x 2,5 mm, 3 x 3 mm, 3,5 x 3,5 mm, 4x4 mm, 4,5 x 4,5 mm, 5 x 5 mm, 5,5 x 5,5 mm, 6x6 mm, 6,5 x 6,5 mm, 7x7 mm, 7,5 x 7,5 mm, 8 x 8

mm, 8,5 x 8,5 mm, 9x9 mm, 9,5 x 9,5 mm, 10 x 10 mm, 10,5 x 10,5 mm, 11 x 11 mm, 11,5 x 11,5 mm, 12 x 12 mm, 12,5 x 12,5 mm, 13 x 13 mm, 13,5 x 13,5 mm, 14 x 14 mm, 14,5 x 14,5 mm, 15 x 15 mm, 15,5 x 15,5 mm, 16 x 16 mm, 16,5 x 16,5 mm, 17 x 17 mm, 17,5 x 17,5 mm, 18 x 18 mm, 18,5 x 18,5 mm, 19 x 19 mm, 19,5 x 19,5 mm o 20 x 20 mm. En algunos casos, la matriz comprende áreas compartimentadas de 6,5 x 6,5 mm. De manera alternativa, la matriz comprende áreas compartimentadas asimétricas. Por ejemplo, la matriz comprende áreas compartimentadas de 6,5 x 0,5 mm, 6,5 x 1 mm, 6,5 x 1,5 mm, 6,5 x 2 mm, 6,5 x 2,5 mm, 6,5 x 3 mm, 6,5 x 3,5 mm, 6,5 x 4 mm, 6,5 x 4,5 mm, 6,5 x 5 mm, 6,5 x 5,5 mm, 6,5 x 6 mm, 6,5 x 6,5 mm, 6,5 x 7 mm, 6,5 x 7,5 mm, 6,5 x 8 mm, 6,5 x 8,5 mm, 6,5 x 9 mm, 6,5 x 9,5 mm, 6,5 x 10 mm, 6,5 x 10,5 mm, 6,5 x 11 mm, 6,5 x 11,5 mm, 6,5 x 12 mm, 6,5 x 12,5 mm, 6,5 x 13 mm, 6,5 x 13,5 mm, 6,5 x 14 mm, 6,5 x 14,5 mm, 6,5 x 15 mm, 6,5 x 15,5 mm, 6,5 x 16 mm, 6,5 x 16,5 mm, 6,5 x 17 mm, 6,5 x 17,5 mm, 6,5 x 18 mm, 6,5 x 18,5 mm, 6,5 x 19 mm, 6,5 x 19,5 mm o 6,5 x 20 mm.

La matriz puede comprender puntos de al menos alrededor de 1 µm, 2 µm, 3 µm, 4 µm, 5 µm, 6 µm, 7 µm, 8 µm, 9 µm, 10 µm, 15 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm, 35 µm, 40 µm, 45 µm, 50 µm, 55 µm, 60 µm, 65 µm, 70 µm, 75 µm, 80 µm, 85 µm, 90 µm, 95 µm, 100 µm, 125 µm, 150 µm, 175 µm, 200 µm, 225 µm, 250 µm, 275 µm, 300 µm, 325 µm, 350 µm, 375 µm, 400 µm, 425 µm, 450 µm, 475 µm o 500 µm. En algunos casos, la matriz comprende puntos de 70 µm.

La matriz puede comprender una separación de rasgos de al menos alrededor de 1 µm, 2 µm, 3 µm, 4 µm, 5 µm, 6 µm, 7 µm, 8 µm, 9 µm, 10 µm, 15 µm, 20 µm, 25 µm, 30 µm, 35 µm, 40 µm, 45 µm, 50 µm, 55 µm, 60 µm, 65 µm, 70 µm, 75 µm, 80 µm, 85 µm, 90 µm, 95 µm, 100 µm, 125 µm, 150 µm, 175 µm, 200 µm, 225 µm, 250 µm, 275 µm, 300 µm, 325 µm, 350 µm, 375 µm, 400 µm, 425 µm, 450 µm, 475 µm, 500 µm, 525 µm, 550 µm, 575 µm, 600 µm, 625 µm, 650 µm, 675 µm, 700 µm, 725 µm, 750 µm, 775 µm, 800 µm, 825 µm, 850 µm, 875 µm, 900 µm, 925 µm, 950 µm, 975 µm, 1000 µm. En algunos casos, la matriz comprende una separación de rasgos de 161 µm.

La matriz puede comprender una o más sondas. En algunos casos, la matriz comprende al menos alrededor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 sondas. De manera alternativa, la matriz comprende al menos alrededor de 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000 sondas. La matriz puede comprender al menos alrededor de 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500 o 10 000 sondas. En algunos casos, la matriz comprende al menos alrededor de 960 sondas. De manera alternativa, la matriz comprende al menos alrededor de 2780 sondas. Las sondas pueden ser específicas para la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos. Las sondas pueden ser específicas para al menos una porción de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos. Las sondas pueden ser específicas para al menos alrededor de 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de la cantidad total de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos. De manera alternativa, las sondas son específicas para al menos alrededor de 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de la cantidad total de marcadores oligonucleotídicos diferentes de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos. En otros casos, las sondas son sondas no específicas. Por ejemplo, las sondas pueden ser específicas para una etiqueta detectable que se acopla a la molécula etiquetada. La sonda puede ser estreptavidina.

La matriz puede ser una matriz impresa. En algunos casos, la matriz impresa comprende uno o más oligonucleótidos acoplados a un sustrato. Por ejemplo, la matriz impresa comprende oligonucleótidos modificados por amina en 5' acoplados a un sustrato de epoxi silano.

De manera alternativa, la matriz comprende un portaobjetos con uno o más pocillos. El portaobjetos puede comprender al menos alrededor de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 pocillos. De manera alternativa, el portaobjetos comprende al menos alrededor de 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1000 pocillos. En algunos casos, el portaobjetos comprende 16 pocillos. De manera alternativa, el portaobjetos comprende 96 pocillos. En otros casos, el portaobjetos comprende al menos alrededor de 80, 160, 240, 320, 400, 480, 560, 640, 720, 800, 880 o 960 pocillos.

En algunos casos, el soporte sólido es una matriz de marcador Affymetrix 3K, una matriz impresa sin contacto Arrayjet o una matriz Applied Microarrays Inc (AMI). De manera alternativa, el soporte comprende una impresora de contacto, una impresora de impacto, una impresora de puntos o una impresora de agujas.

El soporte sólido puede comprender el uso de perlas que se autoensamblan en micropocillos. Por ejemplo, el soporte sólido comprende la tecnología BeadArray de Illumina. De manera alternativa, el soporte sólido comprende la tecnología Bead Array de Abbott Molecular y el sistema FlexiPlex™ de Applied Microarray.

En otros casos, el soporte sólido es una placa. Los ejemplos de placas incluyen, pero no se limitan a, placas de múltiples matrices MSD, placas MSD Multi-Spot®, microplaca, microplaca ProteOn, AlphaPlate, placa DELFIA, IsoPlate y LumaPlate.

X. Enzimas

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria comprenden una o más enzimas. Los ejemplos de enzimas incluyen, pero no se limitan a, ligasas, transcriptasas inversas, polimerasas y nucleasas de restricción. En algunos casos, el acoplamiento del marcador oligonucleotídico a las moléculas comprende el uso de una o más ligasas. Los ejemplos de ligasas incluyen, pero no se limita a, ligasas de ADN tales como ligasa I de ADN, ligasa III de ADN, ligasa IV de ADN y ligasa de ADN de T4, y ligasas de ARN tales como ligasa I de ARN de T4 y ligasa II de ARN de T4.

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria comprenden, además, el uso de una o más transcriptasas inversas. En algunos casos, la transcriptasa inversa es una transcriptasa inversa de VIH-1, transcriptasa inversa de M-VLM, transcriptasa inversa de VMA y transcriptasa inversa de la telomerasa. En algunos casos, la transcriptasa inversa es transcriptasa inversa de M-VLM.

En algunos casos, los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria comprenden el uso de una o más polimerasas. Los ejemplos de polimerasas incluyen, pero no se limitan a, ADN polimerasas y ARN polimerasas. En algunos casos, la ADN polimerasa es una ADN polimerasa I, ADN polimerasa II, holoenzima de ADN polimerasa III y ADN polimerasa IV. Las ADN polimerasas disponibles en el mercado incluyen, pero no se limitan a, ADN Polimerasa Bst 2,0, ADN Polimerasa Bst 2,0 WarmStart™, ADN Polimerasa Bst, ADN Polimerasa IV Sulfolobus, ADN Polimerasa Taq, ADN Polimerasa 9°N™m, (exo-) ADN Polimerasa Deep VentR™, ADN Polimerasa Deep VentR™, Hemo KlenTaq™, Taq ADN Polimerasa LongAmp®, ADN Polimerasa OneTaq®, ADN Polimerasa Phusion®, ADN Polimerasa Q5™ High-Fidelity, Terminator™ y ADN Polimerasa, ADN Polimerasa Terminator™, ADN Polimerasa II Terminator™, ADN Polimerasa III Terminator™, ADN Polimerasa VentR®, (exo-) ADN Polimerasa VentR®, ADN Polimerasa Bsu, ADN Polimerasa phi29, ADN Polimerasa de T4, ADN Polimerasa de T7 y Transferasa terminal. De manera alternativa la polimerasa es una ARN polimerasa tal como ARN polimerasa I, ARN polimerasa II, ARN polimerasa III, polimerasa de *E. coli* Poli(A), ARN polimerasa (RdRp) de phi6, polimerasa Poli(U), ARN polimerasa de SP6 y ARN polimerasa de T7.

En algunos casos, los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria comprenden una o más enzimas de restricción. Las enzimas de restricción incluyen enzimas de restricción tipo I, tipo II, tipo III y tipo IV. En algunos casos, las enzimas Tipo I enzimas son enzimas de combinación restricción-y-modificación complejas, con múltiples subunidades que cortan el ADN de manera aleatoria lejos de sus secuencias de reconocimiento. En general, las enzimas tipo II cortan el ADN en posiciones definidas próximas o dentro de sus secuencias de reconocimiento. Pueden producir fragmentos de restricción diferenciados y patrones de unión a gel distintos. Las enzimas tipo III también son enzimas de combinación restricción-y-modificación grandes. A menudo escinden fuera de sus secuencias de reconocimiento y pueden necesitar dos de dichas secuencias en sentidos opuestos dentro de la misma molécula de ADN para lograr la escisión; rara vez proporcionan digeridos completos. En algunos casos, las enzimas tipo IV reconocen ADN modificado, típicamente metilado y se pueden ejemplificar mediante los sistemas McrBC y Mrr de *E. coli*.

XI. Componentes varios

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria pueden comprender uno o más reactivos. Los ejemplos de reactivos incluyen, pero no se limitan a, reactivos de PCR, reactivos de ligadura, reactivos de transcripción inversa, reactivos enzimáticos, reactivos de hibridación, reactivos de preparación de muestra y reactivos para la purificación y/o el aislamiento de ácido nucleico.

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria pueden comprender el uso de uno o más tampones. Los ejemplos de tampones incluyen, pero no se limitan a, tampones de lavado, tampones de ligadura, tampones de hibridación, tampones de amplificación y tampones de transcripción inversa. En algunos casos, el tampón de hibridación es un tampón disponible en el mercado, tal como la disolución TMAC Hyb, la disolución de hibridación SSPE y el tampón de hibridación ECONO™. Los tampones descritos en la presente memoria pueden comprender uno o más detergentes.

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria pueden comprender el uso de uno o más vehículos. Los vehículos pueden potenciar o mejorar la eficacia de una o más reacciones descritas en la presente memoria (p. ej., reacción de ligadura, transcripción inversa, amplificación, hibridación). Los vehículos pueden disminuir o prevenir la pérdida no específica de moléculas o cualesquiera productos de estas (p. ej., molécula etiquetada, molécula de ADNc etiquetada, amplicón etiquetado). Por ejemplo, el portador puede disminuir la pérdida no específica de una molécula etiquetada a través de la absorción en superficies. El vehículo puede disminuir la afinidad de la molécula, molécula etiquetada o cualquier producto de esta por una superficie o sustrato (p. ej., contenedor, matraz de eppendorf, punta de pipeta). De manera alternativa, el vehículo puede aumentar la afinidad de la molécula o cualquier producto de esta por una superficie o sustrato (p. ej., perla, matriz, vidrio, portaobjetos, chip). Los vehículos pueden proteger la molécula o cualquier producto de esta contra la degradación. Por ejemplo, los vehículos pueden proteger una molécula de ARN o cualquier producto de esta contra las ribonucleasas. De manera alternativa, los vehículos pueden proteger una molécula de ADN o cualquier producto de esta contra una

Dnasa. Los ejemplos de vehículos incluyen, pero no se limitan a, moléculas de ácido nucleico tales como ADN y/o ARN, o polipéptidos. Los ejemplos de vehículos de ADN incluyen plásmidos, vectores, ADN poliadenilado y oligonucleótidos de ADN. Los ejemplos de vehículos de ARN incluyen ARN poliadenilado, ARN de fago, ARN de fago MS2, ARN de *E.coli*, ARN de levadura, ARNt de levadura, ARN de mamífero, ARNt de mamífero, ribonucleótidos sintéticos poliadenilados cortos y oligonucleótidos de ARN. El vehículo de ARN puede ser ARN poliadenilado. De manera alternativa, el vehículo de ARN puede ser un ARN no poliadenilado. En algunos casos, el vehículo proviene de una bacteria, levadura o virus. Por ejemplo, el vehículo puede ser una molécula de ácido nucleico o un polipéptido derivado de una bacteria, levadura o virus. Por ejemplo, el vehículo es una proteína de *Bacillus subtilis*. En otro ejemplo, el vehículo es una molécula de ácido nucleico de *Escherichia coli*. De manera alternativa, el vehículo es una molécula de ácido nucleico o péptido de un mamífero (p. ej., humano, ratón, cabra, vaca, oveja, cerdo, perro o conejo), ave, anfibio o reptil.

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria pueden comprender el uso de uno o más agentes testigo. Los agentes testigo pueden incluir oligos testigo, enzimas inactivas, competidores no específicos. De manera alternativa, los agentes testigo comprenden testigos de hibridación brillantes, testigos de sonda brillantes, plantillas de ácido nucleico, plantillas de muestra añadida, testigos de amplificación por PCR. Los testigos de amplificación por PCR pueden ser testigos positivos. En otros casos, los testigos de amplificación por PCR son testigos negativos. Los testigos de plantilla de ácido nucleico pueden estar en concentraciones conocidas. Los agentes testigo pueden comprender una o más etiquetas.

Las plantillas de muestra añadida pueden ser plantillas que se agregan a una reacción o muestra. Por ejemplo, una plantilla de muestra añadida se puede añadir a una reacción de amplificación. La plantilla de muestra añadida se puede añadir a una reacción de amplificación en cualquier momento después del primer ciclo de amplificación. En algunos casos, la plantilla de muestra añadida se añade a la reacción de amplificación después del 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10º, 11º, 12º, 13º, 14º, 15º, 20º, 25º, 30º, 35º, 40º, 45º o 50º ciclo de amplificación. La plantilla de muestra añadida se puede añadir a la reacción de amplificación en cualquier momento antes del último ciclo de amplificación. La plantilla de muestra añadida puede comprender uno o más nucleótidos o pares de bases de ácido nucleico. La plantilla de muestra añadida puede comprender ADN, ARN o cualquier combinación de estos. La plantilla de muestra añadida puede comprender una o más etiquetas.

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria pueden comprender el uso de una o más puntas de pipeta y/o recipientes (p. ej., tubos, viales, placas con múltiples pocillos). En algunos casos, las puntas de pipeta son puntas de pipeta de unión reducida. De manera alternativa, o adicional, los recipientes pueden ser recipientes de unión reducida. Las puntas de pipeta de unión reducida y los recipientes de unión reducida pueden tener lixiviación y/o posterior degradación de muestra reducida asociada a puntas basadas en silicona y recipientes de unión no reducida. Las puntas de pipeta de unión reducida y los recipientes de unión reducida pueden tener unión a muestra reducida en comparación con puntas de pipeta y recipientes de unión no reducida. Los ejemplos de puntas de unión reducida incluyen, pero no se limitan a, puntas de unión reducida Corning® DeckWorks™ y puntas graduadas de unión reducida Avant Premium. Una lista no limitante de recipientes de unión reducida incluye tubos de microcentrífuga de unión reducida Corning® Costar® y tubos de PCR y tubos de microcentrífuga de unión reducida Cosmobrand.

XIII. Indicaciones

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para monitorizar la expresión génica, elaborar perfiles de transcritos, barrer bibliotecas, genotipificación, análisis epigenético, análisis de patrón de metilación, tipificación tumoral, farmacogenómica, agrigenética, elaboración de perfiles, detección y diagnóstico de patógenos. Los métodos de monitorización de la expresión génica y de elaboración de perfiles se han exhibido en las patentes estadounidenses núms. 5 800 992, 6 013 449, 6 020 135, 6 033 860, 6 040 138, 6 177 248 y 6 309 822. La genotipificación y los usos de esta se muestran en las publicaciones de patente estadounidense núms. 20030036069 y 20070065816 y las patentes estadounidenses núms. 5 856 092, 6 300 063, 5 858 659, 6 284 460, 6 361 947, 6 368 799 y 6 333 179. Otros usos se muestran en las patentes estadounidenses núms. 5 871 928, 5 902 723, 6 045 996, 5 541 061 y 6 197 506.

En la presente memoria se describen métodos, kits y composiciones para la detección, la monitorización y/o el pronóstico de una enfermedad o afección en un sujeto. En general, el método comprende (a) etiquetar de manera estocástica una molécula para producir una molécula etiquetada de manera estocástica; y (b) detectar y/o cuantificar la molécula etiquetada de manera estocástica para detectar, monitorizar y/o pronosticar, de esta manera, una enfermedad o afección en un sujeto. La detección de una enfermedad o afección puede comprender diagnosticar una enfermedad o afección.

Monitorizar una enfermedad o afección en un sujeto puede comprender, además, monitorizar un régimen terapéutico. Monitorizar un régimen terapéutico puede comprender determinar la eficacia de un régimen terapéutico. En algunos casos, monitorizar un régimen terapéutico comprende administrar, suspender, agregar o alterar un régimen terapéutico. Alterar un régimen terapéutico puede comprender aumentar o reducir la dosificación, frecuencia

de dosificación o modo de administración de un régimen terapéutico. Un régimen terapéutico puede comprender uno o más fármacos terapéuticos. Los fármacos terapéuticos pueden ser un fármaco anticanceroso, un fármaco antiviral, un fármaco antibacteriano, un fármaco antipatógeno o cualquier combinación de estos.

5 A. Cáncer

En algunos casos, la enfermedad o afección es un cáncer. Las moléculas que se etiquetarán de manera estocástica pueden ser de una célula o tejido canceroso. En algunos casos, el cáncer es un sarcoma, carcinoma, linfoma o leucemia. Los sarcomas son cánceres óseos, de cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido
10 conectivo o de soporte. Los sarcomas incluyen, pero no se limitan a, cáncer óseo, fibrosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, hemangioendotelioma maligno, schwannoma maligno, schwannoma bilateral vestibular, osteosarcoma, sarcomas de tejido blando (p. ej., sarcoma de parte blanda alveolar, angiosarcoma, quistosarcoma filoide, dermatofibrosarcoma, tumor desmoide, sarcoma epitelial, osteosarcoma extraesquelético, fibrosarcoma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, linfiosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, neurofibrosarcoma, rabdomiosarcoma y sarcoma sinovial).

Los carcinomas son cánceres que comienzan en las células epitelial, que son células que cubren la superficie del cuerpo, producen hormonas y componen las glándulas. A modo de ejemplo no limitante, los
20 carcinomas incluyen cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de recto, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer cerebral, cáncer de vagina, cáncer de vulva, cáncer de útero, cáncer bucal, cáncer de pene, cáncer de testículo, cáncer de esófago, cáncer de piel, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de las vías aéreas superiores, cáncer estromal gastrointestinal, adenocarcinoma, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer de la región anal, cáncer de intestino delgado, cáncer de sistema endócrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la
25 glándula paratiroides, cáncer de las glándulas suprarrenales, cáncer de uretra, cáncer de la pelvis renal, cáncer de uréter, cáncer de endometrio, cáncer de cuello de útero, cáncer de hipófisis, neoplasmas del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, glioma del tronco encefálico y tumores en el eje espinal. En algunos casos, el cáncer es un cáncer de piel, tal como un carcinoma basocelular, escamoso, melanoma, no melanoma o queratosis actínica (solar).

En algunos casos, el cáncer es un cáncer de pulmón. El cáncer de pulmón puede comenzar en las vías respiratorias que se ramifican desde la tráquea para suministrar a los pulmones (bronquios) o a los pequeños sacos de aire en los pulmones (alvéolos). Los cánceres de pulmón incluyen carcinoma pulmonar de células no pequeñas (CPCNP), carcinoma pulmonar de células pequeñas y mesotelioma. Los ejemplos de CPCNP incluyen carcinoma
35 de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes. El mesotelioma puede ser un tumor canceroso de la membrana que recubre el interior de los pulmones y la cavidad torácica (pleura) o la membrana que recubre el interior del abdomen (peritoneo). El mesotelioma puede deberse a exposición al amianto. El cáncer puede ser cáncer cerebral tal como un glioblastoma.

De manera alternativa, el cáncer puede ser un tumor del sistema nervioso central (SNC). Los tumores del SNC pueden clasificarse en gliomas o no gliomas. El glioma puede ser un glioma maligno, un glioma de grado elevado, un glioma pontino intrínseco difuso. Los ejemplos de gliomas incluyen astrocitomas, oligodendrogliomas (o
40 mezclas de elementos de oligodendrogliomas y astocitomas) y ependimomas. Los astrocitomas incluyen, pero no se limitan a, astrocitomas de grado bajo, astrocitomas anaplásicos, glioblastoma multiforme, astrocitoma pilocítico, xantastrocitoma pleomórfico y astrocitoma de células gigantes subependimarias. Los oligodendrogliomas incluyen oligodendrogliomas de bajo grado (o oligoastrocitomas) y oligodendriogliomas anaplásicos. Los no gliomas incluyen meningiomas, adenomas en la glándula pituitaria, linfomas primarios del SNC y meduloblastomas. En algunos casos, el cáncer es un meningioma.

La leucemia puede ser leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia linfocítica crónica o leucemia mielocítica crónica. Los tipos adicionales de leucemias incluyen leucemia de células pilosas, leucemia mielomonocítica crónica y leucemia mielomonocítica juvenil.

Los linfomas son cánceres de los linfocitos y pueden desarrollarse a partir de linfocitos B o T. Los dos tipos
55 principales de linfoma son el linfoma de Hodgkin, conocido anteriormente como enfermedad de Hodgkin, y el linfoma no hodgkiniano. El linfoma de Hodgkin se caracteriza por la presencia de las células de Reed-Sternberg. Los linfomas no hodgkinianos son todos linfomas que no son linfoma de Hodgkin. Los linfomas no hodgkinianos pueden ser linfomas de crecimiento lento y linfomas de crecimiento rápido. Los linfomas no hodgkinianos incluyen, pero no se limitan a, linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma folicular, linfoma de tejido linfoide asociado con mucosa (MALT, por sus siglas en inglés), linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de las células de manto, linfoma de Burkitt, linfoma mediastínico de células B grandes, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma nodal de zona
60 marginal de células B grandes (NMZL, por sus siglas en inglés), linfoma esplénico de zona marginal (SMZL, por sus siglas en inglés), linfoma nodal de zona marginal de células B, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusión primaria y granulomatosis linfomatoide.

B. Infección patógena

En algunos casos, la enfermedad o afección es una infección patógena. Las moléculas que se etiquetarán de manera estocástica pueden ser de un patógeno. El patógeno puede ser un virus, bacteria, hongo o protozooario. En algunos casos, el patógeno puede ser un protozooario, tal como *Acanthamoeba* (p. ej., *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*, *A. healyi*, *A. divionensis*), *Brachiola* (p. ej., *B. connori*, *B. vesicularum*), *Cryptosporidium* (p. ej., *C. parvum*), *Cyclospora* (p. ej., *C. cayetanensis*), *Encephalitozoon* (p. ej., *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*), *Entamoeba* (p. ej., *E. histolytica*), *Enterocytozoon* (p. ej., *E. bienewisi*), *Giardia* (p. ej., *G. lamblia*), *Isospora* (p. ej., *I. belli*), *Microsporidium* (p. ej., *M. africanum*, *M. ceylonensis*), *Naegleria* (p. ej., *N. fowleri*), *Nosema* (p. ej., *N. algerae*, *N. ocularum*), *Pleistophora*, *Trachipleistophora* (p. ej., *T. anthropophthera*, *T. hominis*) y *Vittaforma* (p. ej., *V. corneae*). El patógeno puede ser un hongo, tal como *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Pneumocystis* y *Stachybotrys*.

El patógeno puede ser una bacteria. Las bacterias de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, *Bordetella*, *Borrelia*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Chlamydophila*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Legionella*, *Leptospira*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Vibrio* o *Yersinia*.

El virus puede ser un virus de transcripción inversa. Los ejemplos de virus de transcripción inversa incluyen, pero no se limitan a, virus de TI de ARN monocatenario (TI de ARNmc) y virus de TI de ADN bicatenario (TI de ADNbc). Los ejemplos no limitantes de virus de TI de ARNmc incluyen retrovirus, alfarretrovirus, betarretrovirus, gammaretrovirus, deltaretrovirus, epsilon-retrovirus, lentivirus, espuma virus, metavirus y pseudovirus. Los ejemplos no limitantes de virus de TI de ARNbc incluyen hepadenovirus y caulimovirus. De manera alternativa, el virus es un virus de ADN o virus de ARN. El virus de ADN puede ser un virus de ADN bicatenario (ADNbc). En algunos casos, el virus de ADNbc es un adenovirus, virus del herpes o virus de la viruela. Los ejemplos de adenovirus incluyen, pero no se limitan a, adenovirus y virus de la hepatitis canina infeccioso. Los ejemplos de virus del herpes incluyen, pero no se limitan a, virus del herpes simple, virus de la varicela zóster, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr. Una lista no limitante de virus de la viruela incluye virus de la viruela, virus de la viruela vacuna, virus de la viruela bovina, virus de la viruela del mono y virus de la vacuna de la viruela. El virus de ADN puede ser un virus de ADN monocatenario (ADNmc). El virus de ADNmc puede ser un parvovirus. Los ejemplos de parvovirus incluyen, pero no se limitan a, parvovirus B19, parvovirus canino, parvovirus de ratón, parvovirus porcino, panleucopenia felina y virus de la enteritis del visón.

De manera alternativa, el virus es un virus de ARN. El virus de ARN puede ser un virus de ARN bicatenario (ARNbc), virus de ARN monocatenario efector (+) (ARNmc(+)) o virus de ARN monocatenario efector (-) (ARNmc(-)). Una lista no limitante de virus de ARNbc incluye reovirus, ortorreovirus, cipovirus, rotavirus, virus de la fiebre catarral y fitorreovirus. Los ejemplos de virus de ARNmc (+) incluyen, pero no se limitan a, picornavirus y togavirus. Los ejemplos de picornavirus incluyen, pero no se limitan a, enterovirus, rinovirus, hepatovirus, cardiovirus, aftovirus, poliovirus, parecovirus, erbovirus, kobuvirus, tescovirus y coxsackie. En algunos casos, el togavirus es un virus de la rubéola, virus de Sindbis, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalitis equina occidental, virus de la encefalitis equina venezolana, virus del río Ross, virus O'nyong'nyong, Chikungunya o virus del bosque Semliki. Una lista no limitante de virus de ARNmc (-) incluye virus ortomixovirus y rabdovirus. Los ejemplos de ortomixovirus incluyen, pero no se limitan a, virus de la influenza A, virus de la influenza B, virus de la influenza C, isavirus y togotavirus. Los ejemplos de rabdovirus incluyen, pero no se limitan a, citorhabdovirus, dicorhabdovirus, efemerovirus, lisavirus, novirhabdovirus y vesiculovirus.

C. Trastornos fetales

En algunos casos, la enfermedad o afección es el embarazo. Los métodos descritos en la presente memoria comprenden diagnosticar una afección fetal en un sujeto que cursa embarazo. Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender identificar mutaciones o anomalías genéticas fetales. Las moléculas que se etiquetarán de manera estocástica pueden ser de una célula o tejido fetal. De manera alternativa, o adicional, las moléculas que se etiquetarán de manera estocástica pueden ser del sujeto que cursa un embarazo.

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria se pueden utilizar en el diagnóstico, predicción o monitorización de trisomías autosómicas (p. ej., trisomía 13, 15, 16, 18, 21 o 22). En algunos casos, la trisomía se puede asociar a una probabilidad aumentada de aborto espontáneo (p. ej., trisomía 15, 16 o 22). En otros casos, la trisomía que se detecta es una trisomía en un nacido vivo que puede indicar que el bebé nacerá con anomalías congénitas (p. ej., Trisomía 13 (síndrome de Patau), Trisomía 18 (síndrome de Edwards) y Trisomía 21 (síndrome de Down)). La anomalía también puede estar en un cromosoma sexual (p. ej., XXY (síndrome de Klinefelter), XYY (síndrome de Jacobs) o XXX (Trisomía X)). La molécula o moléculas que se etiquetarán pueden estar en uno o más de los siguientes cromosomas: 13, 18, 21, X o Y. Por ejemplo, la molécula está en el cromosoma 21 y/o en el cromosoma 18 y/o en el cromosoma 13.

Las afecciones fetales adicionales que se pueden determinar en función de los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria incluyen monosomía de uno o más cromosomas (monosomía de cromosoma X, también conocida como síndrome de Turner), trisomía de uno o más cromosomas (13, 18, 21 y X), tetrasomía y pentasomía de uno o más cromosomas (que en humanos se observa más comúnmente en los cromosomas sexuales, p. ej., XXXX, XXY, XXYY, XXXY, XXXX, XXXXY, XXXYY, XXXYY, XXXYY y XXXYY), monoploidía, triploidía (tres de cada cromosoma, p. ej., 69 cromosomas en humanos), tetraploidía (cuatro de cada cromosoma, p. ej., 92 cromosomas en humanos), pentaploidía y multiploidía.

REALIZACIONES DE EJEMPLO

En la presente memoria se describen, en algunas realizaciones, métodos, kits y sistema para la transcripción inversa digital de una molécula de ARN. En algunos casos, el método comprende (a) producir una molécula de ARN etiquetada al poner en contacto una muestra que comprende una pluralidad de moléculas de ARN con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos, (i) en el que la pluralidad de moléculas de ARN comprende dos o más moléculas de ARN que comprenden al menos dos secuencias diferentes; y (ii) la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende dos o más marcadores oligonucleotídicos que comprenden dos o más secuencias identificadoras exclusivas diferentes; (b) llevar a cabo una reacción de síntesis de primera cadena al poner en contacto las moléculas de ARN etiquetadas con una enzima transcriptasa inversa para producir una molécula de ADNc etiquetada; y (c) detectar la molécula de ADNc etiquetada al hibridar la molécula de ADNc etiquetada con un soporte sólido.

Producir una molécula de ARN etiquetada puede comprender acoplar el marcador oligonucleotídico a la molécula de ARN. En algunos casos, el marcador oligonucleotídico se acopla a la molécula de ARN mediante hibridación. En algunos casos, el marcador oligonucleotídico se acopla a la molécula de ARN mediante ligadura. El acoplamiento del marcador oligonucleotídico puede comprender el uso de una enzima ligasa. El marcador oligonucleotídico se puede acoplar a cualquier porción de la molécula de ARN. Por ejemplo, el marcador oligonucleotídico se puede acoplar al extremo 5' de la molécula de ARN. De manera alternativa, el marcador oligonucleotídico se acopla al extremo 3' de la molécula de ARN. En otros casos, el marcador oligonucleotídico se acopla a una región interna de la molécula de ARN. El acoplamiento del marcador oligonucleotídico a la molécula de ARN puede comprender el uso de una o más moléculas adaptadoras.

En algunos casos, el marcador oligonucleotídico comprende una región específica de diana. La región específica de diana puede permitir el acoplamiento de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos a al menos una molécula de ARN. La región específica de diana puede permitir el acoplamiento de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos a dos o más moléculas de ARN diferentes. En algunos casos, la región específica de diana permite el acoplamiento de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos a al menos alrededor de 3, 4 o 5 moléculas de ARN diferentes. De manera alternativa, la región específica de diana permite el acoplamiento de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos a al menos alrededor de 6, 7, 8, 9 o 10 moléculas de ARN diferentes. En otros casos, la región específica de diana permite el acoplamiento de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos a al menos alrededor de 11, 12, 13, 14 o 15 moléculas de ARN diferentes. La región específica de diana puede comprender una secuencia oligodT. De manera alternativa, la región específica de diana comprende una secuencia aleatoria que se puede acoplar a cualquier porción de la molécula de ARN.

En algunos casos, el marcador oligonucleotídico comprende, además, una región de cebador universal. La región identificadora exclusiva se puede colocar entre la región de cebador universal y la región específica de diana. El marcador oligonucleotídico puede tener una longitud de al menos un nucleótido. La región identificadora exclusiva puede tener una longitud de al menos un nucleótido. La región específica de diana puede tener una longitud de al menos un nucleótido. La región de cebador universal puede tener una longitud de al menos un nucleótido. El marcador oligonucleotídico puede comprender uno o más restos nucleotídicos. De manera alternativa, o adicional, el marcador oligonucleotídico comprende uno o más restos no nucleotídicos.

En algunos casos, producir la molécula de ARN etiquetada comprende, además, una mezcla dNTP, un tampón de apareamiento, ligasa, tampón de ligadura o cualquier combinación de estos. Llevar a cabo la reacción de síntesis de primera cadena puede comprender, además, un tampón de primera cadena, ditiotreitól (DTT), inhibidor de ribonucleasa, ADN polimerasa o cualquier combinación de estos.

La reacción de síntesis de primera cadena puede comprender, además, un termociclador. La reacción de síntesis de primera cadena puede comprender, además, un programa de termociclador que comprende 1 ciclo de 50 °C durante 60 minutos, posteriormente 3 ciclos de 94 °C durante 2 minutos, 58 °C durante 2 minutos y 68 °C durante 2 minutos, posteriormente 1 ciclo de 4 °C durante al menos 2 minutos. Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender, además, poner en contacto la molécula de ADNc etiquetada con un cebador específico de diana. El cebador específico de diana puede ser un cebador de ADN que contiene uracilo. El cebador específico de diana se puede hibridar con la molécula de ADNc etiquetada y se puede llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa para producir una molécula de ADNc etiquetada bicatenaria.

La muestra se puede tratar, además, con una o más enzimas para retirar o degradar moléculas de ARN, moléculas de ARN etiquetadas, marcadores oligonucleotídicos no unidos y/o cebadores específicos de diana no unidos. Por ejemplo, la muestra se puede tratar con una enzima ribonucleasa para retirar las moléculas de ARN (moléculas de ARN etiquetadas y/o no unidas) de la muestra. De manera alternativa, la muestra se puede tratar con una uracil ADN glicosilasa (UDG, por sus siglas en inglés) para hidrolizar el uracilo del ADN.

El método puede comprender, además, llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para producir amplicones etiquetados. En algunos casos, la reacción en cadena de la polimerasa es una PCR anidada. La PCR anidada puede comprender llevar a cabo una primera PCR que comprende mezclar la molécula de ADNc etiquetada bicatenaria con una primera mezcla de PCR que comprende un primer cebador de PCR específico de diana, un cebador de PCR universal, un tampón de polimerasa, ADN polimerasa, mezcla dNTP o cualquier combinación de estos. La primera PCR se puede llevar a cabo en el termociclador. La primera PCR puede comprender un programa de termociclador que comprende 1 ciclo de 94 °C durante 2 minutos, posteriormente 30 ciclos de 94 °C durante 20 segundos, 58 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 20 segundos, posteriormente 1 ciclo de 68 °C durante 4 minutos y 1 ciclo de 4 °C durante al menos 2 minutos. La PCR anidada puede comprender llevar a cabo una segunda PCR que comprende mezclar al menos una porción de los amplicones producidos en la primera reacción PCR con una segunda mezcla de PCR que comprende un segundo cebador de PCR específico de diana, un cebador de PCR universal etiquetado, un tampón de polimerasa, ADN polimerasa, mezcla dNTP o cualquier combinación de estos. El segundo cebador específico de diana se puede hibridar con una región en la molécula etiquetada que está después del primer cebador específico de diana. El cebador de PCR universal etiquetado se etiqueta con una etiqueta detectable. En algunos casos, el cebador de PCR universal etiquetado es un cebador de PCR universal etiquetado con Cy3. De manera alternativa, el cebador de PCR universal etiquetado es un cebador de PCR universal etiquetado con TYE 563. La segunda PCR se puede llevar a cabo en el termociclador. La segunda PCR puede comprender un programa de termociclador que comprende 1 ciclo de 94 °C durante 2 minutos, posteriormente 30 ciclos de 94 °C durante 20 segundos, 58 °C durante 20 segundos y 68 °C durante 20 segundos, posteriormente 1 ciclo de 68 °C durante 4 minutos y 1 ciclo de 4 °C durante al menos 2 minutos. La segunda PCR de la PCR anidada puede producir un amplicón etiquetado que comprende la molécula de ADNc, el marcador oligonucleotídico y la etiqueta detectable. En algunos casos, la molécula de ADNc etiquetada de la etapa 1c es el amplicón etiquetado producido mediante la segunda PCR de la PCR anidada.

En algunos casos, detectar la molécula de ADNc etiquetada comprende hibridar al menos una porción de la muestra que comprende los amplicones etiquetados que comprenden la molécula de ADNc, el marcador oligonucleotídico y la etiqueta detectable con un soporte sólido. Hibridar al menos una porción de la muestra que comprende los amplicones etiquetados puede comprender una mezcla de hibridación que comprende al menos una porción de la muestra que comprende los amplicones etiquetados producidos en la segunda PCR de la PCR anidada, el oligo testigo, el tampón de hibridación o cualquier combinación de estos. El oligo testigo puede comprender una etiqueta detectable conjugada con un oligonucleótido. La etiqueta detectable es igual a la etiqueta detectable en el amplicón etiquetado. Por ejemplo, el amplicón etiquetado comprende una etiqueta Cy3 y el oligo testigo comprende un oligonucleótido etiquetado con Cy3. Los amplicones etiquetados en la mezcla de hibridación se desnaturalizan. En algunos casos, desnaturalizar los amplicones etiquetados comprende incubar la mezcla de hibridación a 95 °C. En algunos casos, la mezcla de hibridación se incuba a 95 °C durante al menos alrededor de 1, 2, 3, 4 o 5 minutos. Después de la desnaturalización de los amplicones etiquetados, la mezcla de hibridación se incuba a 4 °C durante al menos 2 minutos. La hibridación del amplicón etiquetado con el soporte puede comprender agregar al menos una porción de la mezcla de hibridación al soporte sólido. En algunos casos, la hibridación del amplicón etiquetado con el soporte sólido comprende agregar al menos una porción de la mezcla de hibridación a un pocillo de un portaobjetos de matriz AMI. El amplicón etiquetado se puede hibridar con el soporte durante al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 o 48 horas. El amplicón etiquetado se puede hibridar con el soporte durante al menos alrededor de 4 horas. El amplicón etiquetado se puede hibridar con el soporte durante toda la noche. De manera alternativa, el amplicón etiquetado se hibrida con el soporte durante alrededor de 12-14 horas. En otros casos, el amplicón etiquetado se hibrida con el soporte durante alrededor de 3-5 horas, 4-6 horas, 6-8 horas, 8-10 horas, 9-11 horas, 13-15 horas, 14-16 horas, 17-19 horas o 18-20 horas. La hibridación del amplicón etiquetado con el soporte puede comprender poner en contacto el soporte con el amplicón etiquetado e incubar el amplicón etiquetado y el soporte a una temperatura de hibridación. En algunos casos, la temperatura de hibridación es de al menos alrededor de 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 32 °C, 34 °C, 36 °C, 38 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C.

El soporte sólido puede comprender una pluralidad de sondas. La pluralidad de sondas puede comprender una secuencia que es complementaria a al menos una porción de la molécula de ADNc etiquetada y/o el amplicón etiquetado. La pluralidad de sondas se puede disponer sobre el soporte sólido en regiones diferenciadas, en donde una región diferenciada sobre el soporte sólido comprende sondas de secuencias idénticas o casi idénticas. En algunos casos, dos o más regiones diferenciadas sobre el soporte sólido comprende dos sondas diferentes que comprenden secuencias complementarias a la secuencia de dos regiones identificadoras exclusivas diferentes del marcador oligonucleotídico.

El método comprende, además, cubrir el portaobjetos de matriz con un adhesivo para producir un portaobjetos de matriz sellado. El portaobjetos de matriz sellada se puede incubar a 37 °C. El portaobjetos de matriz sellada se puede incubar a 37 °C durante toda la noche. En algunos casos, la matriz sellada se incuba a 37 °C durante al menos alrededor de 12-14 horas. Después de incubar la matriz sellada a 37 °C, el método puede comprender, además, retirar la matriz sellada de los 37 °C. La mezcla de hibridación se puede retirar de cada pocillo. La mezcla de hibridación se puede almacenar a -20 °C. De manera alternativa, la mezcla de hibridación se descarta.

El método puede comprender, además, lavar los pocillos con un primer tampón de lavado. El lavado de los pocillos comprende agregar tampón de lavado al pocillo y luego aspirar el tampón de lavado. Además, se puede llevar a cabo un segundo lavado con el mismo o un segundo tampón de lavado. Después de que se han aspirado los tampones de lavado de los pocillos, el portaobjetos de matriz se puede someter a exploración. En algunos casos, el portaobjetos de matriz se somete a exploración en seco (p. ej., se retira el fluido de los pocillos). De manera alternativa, el portaobjetos de matriz se somete a exploración en húmedo (p. ej., con fluido en los pocillos). El portaobjetos de matriz se puede someter a exploración mediante una unidad de exploración.

El método puede comprender la fragmentación de los productos de amplificación (p. ej., los amplicones etiquetados) para producir amplicones etiquetados fragmentados. Los amplicones etiquetados fragmentados se puede acoplar al soporte sólido. Los métodos descritos en la presente memoria comprenden, además, acoplar una etiqueta detectable a las moléculas etiquetadas, amplicones etiquetados o amplicones etiquetados fragmentados. La etiqueta detectable se puede acoplar a las moléculas etiquetadas, amplicones etiquetados o amplicones etiquetados fragmentados antes del acoplamiento de las moléculas etiquetadas, amplicones etiquetados o amplicones etiquetados fragmentados al soporte sólido. De manera alternativa, la etiqueta detectable se acopla a las moléculas etiquetadas, amplicones etiquetados o amplicones etiquetados fragmentados después del acoplamiento de las moléculas etiquetadas, amplicones etiquetados o amplicones etiquetados fragmentados al soporte sólido. Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender acoplar dos o más etiquetas detectables a las moléculas etiquetadas, amplicones etiquetados o amplicones etiquetados fragmentados. En algunos casos, una etiqueta detectable es la molécula de ADNc etiquetada y la etiqueta detectable se incorpora al amplicón etiquetado. Por ejemplo, un cebador de PCR universal Cy3 se acopla a la molécula de ADNc etiquetada. La amplificación de la molécula de ADNc etiquetada con el cebador de PCR universal Cy3 puede producir amplicones etiquetados con Cy3. Los métodos descritos en la presente memoria comprenden, además, acoplar una segunda etiqueta detectable a la primera molécula etiquetada de forma detectable. Por ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender acoplar biotina a los amplicones etiquetados con Cy3 para producir amplicones etiquetados con biotina/Cy3.

En algunos casos, detectar la molécula de ADNc etiquetada comprende un lector fluorescente. El lector fluorescente puede ser un instrumento Sensovation FLAI.

En algunos casos, los datos de la unidad de exploración se almacenan en un ordenador. De manera alternativa, o adicional, los datos de la unidad de exploración se exportan. En algunos casos, los datos de la unidad de exploración se transmiten de manera electrónica. La exportación y/o transmisión de los datos puede comprender una o más redes informáticas.

En la presente se describen, además, métodos, kits y sistemas para etiquetar de manera estocástica una molécula. En general, el método comprende poner en contacto una muestra que comprende una pluralidad de moléculas con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos y acoplar de manera aleatoria uno o más marcadores oligonucleotídicos de la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos a una o más moléculas en la muestra. La pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende marcadores oligonucleotídicos que comprenden dos o más regiones identificadoras exclusivas diferentes.

En algunos casos, los métodos, kits y sistemas comprenden concentraciones de marcadores oligonucleotídicos diferentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos. Por ejemplo, los diferentes marcadores oligonucleotídicos están presentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos en la misma concentración. De manera alternativa, la concentración de al menos un marcador oligonucleotídico en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos es mayor que la concentración de al menos un otro marcador oligonucleotídico en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos. La concentración de al menos un marcador oligonucleotídico en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos es de al menos alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces mayor que la concentración de al menos un otro marcador oligonucleotídico en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos. En algunos casos, la concentración de al menos un marcador oligonucleotídico en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos es menor que la concentración de al menos un otro marcador oligonucleotídico en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos. La concentración de al menos un marcador oligonucleotídico en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos es de al menos alrededor de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces menor que la concentración de al menos un otro marcador oligonucleotídico en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos. En algunos casos, al

menos alrededor de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de los marcadores oligonucleotídicos diferentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos están presentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos en la misma concentración o similar. De manera alternativa, al menos alrededor de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 % o 100 % de los marcadores oligonucleotídicos diferentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos están presentes en la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos en diferentes concentraciones.

Los marcadores oligonucleotídicos pueden comprender, además, una región específica de diana, un sitio de unión a cebador universal o cualquier combinación de estos. En algunos casos, la región identificadora exclusiva está entre la región específica de diana y el sitio de unión a cebador universal. Los marcadores oligonucleotídicos se pueden acoplar a las moléculas mediante hibridación, ligadura o cualquier combinación de estos. En algunos casos, uno o más marcadores oligonucleotídicos se acoplan a una molécula. El marcador oligonucleotídico se puede acoplar al extremo 5' de la molécula, al extremo 3' de la molécula, a un sitio interno dentro de la molécula o cualquier combinación de estos. Uno o ambos extremos del marcador oligonucleotídico se pueden acoplar a la molécula.

La molécula puede ser un polinucleótido. El polinucleótido puede comprender ARN, ADN o cualquier combinación de estos. La molécula puede ser una molécula de ARN. La molécula de ARN puede ser un ARNm. La molécula puede estar poliadenilada. De manera alternativa, la molécula no está poliadenilada.

En la presente se describen, además, métodos de preamplificación digitales para aumentar la cantidad de molécula de ácido nucleico en una muestra. En general, el método comprende (a) etiquetar de manera estocástica una molécula de ácido nucleico en una muestra mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria para producir una molécula de ácido nucleico etiquetada, en donde la molécula de ácido nucleico etiquetada comprende un marcador oligonucleotídico acoplado a la molécula de ácido nucleico; y (b) amplificar la molécula de ácido nucleico etiquetada para producir una pluralidad de amplicones etiquetados, en donde un amplicón etiquetado en la pluralidad de amplicones etiquetados es una copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada. La molécula de ácido nucleico etiquetada de la etapa (a) se puede amplificar de manera repetida para aumentar la cantidad de la molécula de ácido nucleico en la muestra. El marcador oligonucleotídico comprende una región identificadora exclusiva que se puede utilizar para distinguir moléculas de ácido nucleico idénticas o casi idénticas.

El etiquetado estocástico de la molécula de ácido nucleico antes de la amplificación puede permitir la identificación de moléculas replicadas clonalmente que se originan a partir de la molécula original de plantilla de muestra. El etiquetado estocástico de la molécula de ácido nucleico antes de la amplificación puede permitir la amplificación controlada de la molécula de ácido nucleico, en donde la amplificación de una molécula de ácido nucleico individual se puede rastrear y monitorizar mediante la etiqueta oligonucleotídica. El método de preamplificación digital puede explicar los verdaderos niveles de abundancia de las moléculas de ácido nucleico en una muestra. Este método puede ser particularmente útil para muestras que comprenden cantidades limitadas de una molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, este método se puede utilizar para aumentar la cantidad de una molécula de ácido nucleico a partir de una célula simple. El etiquetado estocástico de la molécula de ácido nucleico en la célula y la posterior amplificación de las moléculas de ácido nucleico etiquetadas puede permitir mediciones cuantitativas más precisas de las moléculas de ácido nucleico.

En algunos casos, las moléculas de ácido nucleico etiquetadas en la muestra se amplifican al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico etiquetadas en la muestra se amplifican al menos alrededor de 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces.

La preamplificación digital de las moléculas de ácido nucleico puede permitir el muestreo repetido de las moléculas de ácido nucleico en la muestra sin que se agote la muestra original. El muestreo repetido de las moléculas de ácido nucleico en la muestra puede comprender llevar a cabo una o más mediciones y/o experimentos con los amplicones etiquetados producidos a partir de la amplificación o reacciones de amplificación repetidas llevadas a cabo con las moléculas de ácido nucleico etiquetadas. El muestro repetido de las moléculas de ácido nucleico en la muestra puede comprender mediciones para detectar y/o cuantificar una molécula de ácido nucleico. El muestro repetido de la molécula de ácido nucleico en la muestra puede comprender llevar a cabo una experimentación adicional con las moléculas de ácido nucleico en la muestra.

En algunas realizaciones, se describen métodos, kits y sistemas para la detección de moléculas etiquetadas específicas de gen. Los métodos, kits y sistemas se pueden utilizar para aumentar la especificidad de detección de uno o más genes de interés. Un esquema del método se representa en la Figura 7. En general, el método comprende: a) hibridar al menos una molécula diana con un soporte sólido; e b) hibridar un oligo específico de gen etiquetado con la molécula diana para producir una molécula diana etiquetada.

En la presente se describen, además, métodos, kits y sistemas para la cuantificación absoluta de una o

más moléculas. La Figura 17 representa una comparación de la cuantificación de dos genes (gen A y gen B). La cuantificación de los dos genes mediante una lectura de matriz estándar puede proporcionar una cuantificación relativa de los genes A y B. En la lectura de matriz estándar, los genes se amplifican y los amplicones se hibridan con una matriz. Las cantidades relativas de genes A y B se pueden detectar mediante fluorescencia y la intensidad (p. ej., el brillo) de la señal se puede utilizar para determinar que la cantidad del gen B es mayor que la cantidad del gen A. El método de amplificación digital descrito en la presente se puede utilizar para proporcionar una cuantificación absoluta de los genes A y B. El método de cuantificación absoluta puede comprender (a) etiquetar de manera estocástica dos o más genes con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos para producir una molécula etiquetada de manera estocástica, en donde la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos comprende dos o más regiones identificadoras exclusivas diferentes; (b) amplificar la molécula etiquetada de manera estocástica para producir uno o más amplicones etiquetados de manera estocástica; y (c) detectar la cantidad de regiones identificadoras exclusivas diferentes asociadas a cada uno de los amplicones etiquetados de manera estocástica para determinar, de esta manera, la cantidad absoluta de dos o más moléculas. Según se muestra en la Figura 17B, detectar la región identificadora exclusiva comprende hibridar los amplicones etiquetados de manera estocástica con un soporte sólido (p. ej., matriz). Los amplicones etiquetados de manera estocástica se pueden hibridar con ubicaciones diferenciadas sobre el soporte sólido y se puede determinar la cantidad de regiones identificadoras exclusivas diferentes al contar la cantidad de ubicaciones diferenciadas según se detectan mediante fluorescencia.

La Figura 19 representa un esquema de un método de cuantificación absoluta de una o más moléculas de ARN. Según se muestra en la Etapa 1 de la Figura 19, la síntesis de ADNc de una o más moléculas de ARN diana comprende aparear las secuencias oligodT (p. ej., la región específica diana, 1920) de un marcador oligonucleotídico (1920) con la cola de poliA de una molécula de ARNm (1910). El marcador oligonucleotídico (1920) comprende, además, una región identificadora exclusiva (1940) y un sitio de unión a cebador universal (1950). La región identificadora exclusiva (1940) puede comprender una secuencia predeterminada. De manera alternativa, la región identificadora exclusiva (1940) comprende una secuencia aleatoria. La molécula de ADNc resultante (1960) comprende una copia de la molécula de ARNm, la región identificadora exclusiva (1940) y el sitio de unión a cebador universal (1950). Según se muestra en la Etapa 2, la molécula de ADNc (1960) se puede amplificar mediante PCR anidada que comprende un primer cebador directo (1980), un segundo cebador directo (1990) y un cebador inverso que comprende el cebador universal (1970) para producir uno o más amplicones etiquetados (p. ej., amplicones que comprenden la región identificadora exclusiva). Los cebadores directos (1980, 1990) pueden ser cebadores específicos de genes. Los amplicones etiquetados se pueden detectar mediante cualquier método conocido en la técnica. La cuantificación absoluta de las moléculas de ARNm se puede producir mediante la detección y recuento de diferentes regiones identificadoras exclusivas diferentes.

La Figura 20 representa otro método para cuantificar una o más moléculas. El método puede comprender (a) transcribir de forma inversa una o más moléculas de ARN utilizando una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos (2030) que comprende dos o más marcadores oligonucleotídicos (2020) que comprenden una región específica de diana (2050), una región identificadora exclusiva (2060) y un sitio de unión a cebador universal (2070) para producir una o más copias de ADNc etiquetadas de manera estocástica, en donde las copias de ADNc etiquetadas de manera estocástica comprenden la región identificadora exclusiva. La región identificadora exclusiva puede comprender una secuencia aleatoria. El método puede comprender, además, amplificar las copias de ADNc etiquetadas de manera estocástica para producir uno o más amplicones etiquetados de manera estocástica. La amplificación puede comprender amplificación por PCR y T7. Los amplicones etiquetados de manera estocástica pueden comprender la región identificadora exclusiva. El método puede comprender, además, detectar las copias de ADNc etiquetadas de manera estocástica o los amplicones etiquetados de manera estocástica. Detectar las moléculas etiquetadas de manera estocástica puede comprender hibridar las moléculas etiquetadas de manera estocástica con una o más matrices digitales para determinar la cantidad de etiquetas distintas para cada gen de interés. La hibridación puede requerir la presencia de la secuencia de ARNm, con mayor probabilidad, un segmento en el exón en 3' del gen y la región identificadora exclusiva. La matriz puede comprender 7 millones de rasgos. La una o más moléculas pueden estar en una muestra. La muestra puede comprender 20 000 secuencias de ARNm diferentes. El método puede comprender determinar la cantidad de copias de cada ARNm presente en la muestra. La pluralidad de marcadores oligonucleotídicos puede comprender 350 o más marcadores oligonucleotídicos. En algunos casos, se puede aplicar un subconjunto de los 350 marcadores oligonucleotídicos a una concentración más baja para aumentar el intervalo dinámico eficaz de la medición.

La Figura 25 representa otro método de cuantificación absoluta de moléculas de ARNm. Según se muestra en la Figura 25, el método comprende (a) llevar a cabo una reacción de transcripción inversa con un marcador oligonucleotídico (2560) para producir una molécula de ADNc etiquetada de manera estocástica (2520), en donde la molécula de ADNc etiquetada de manera estocástica comprende una copia de ADNc de una molécula de ARNm (2510), una región identificadora exclusiva (2540) y un sitio de unión a cebador universal (2550); y (b) detectar la molécula de ADNc etiquetada de manera estocástica. El marcador oligonucleotídico (2560) puede servir como cebador para la reacción de transcripción inversa. El marcador oligonucleotídico (2560) puede comprender una región específica de diana (2530), una región identificadora exclusiva (2540) y un sitio de unión a cebador universal (2550). El método puede comprender, además, cuantificar de manera absoluta las moléculas de ARNm en función

de la detección de las moléculas de ADNc etiquetadas de manera estocástica. La detección de las moléculas de ADNc etiquetadas de manera estocástica puede comprender contar la cantidad de regiones identificadoras exclusivas diferentes que están asociadas con cada tipo de molécula de ADNc. El método puede comprender, además, amplificar las moléculas de ADNc etiquetadas de manera estocástica antes de dicha detección para producir uno o más amplicones etiquetados de manera estocástica.

En la presente se describen, además, métodos, kits y sistemas para determinar la cantidad de copias de ADN. Un esquema general del método se representa en la Figura 21. Según se muestra en la Etapa 1 de la Figura 21, un ADN genómico (2110) se puede fragmentar para producir un fragmento de ADN (2130). La fragmentación del ADN genómico se puede producir mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la fragmentación puede comprender cizallamiento mecánico. De manera alternativa, la fragmentación puede comprender digestión del ADN genómico con una o más nucleasas de restricción. Según se muestra en la Etapa 2 de la Figura 21, los fragmentos de ADN (2120) se pueden etiquetar de manera estocástica con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos (2140) para producir una molécula etiquetada de manera estocástica (2170). El marcador oligonucleotídico (2140) puede comprender una secuencia adaptadora (2150) y una región identificadora exclusiva (2160). La secuencia adaptadora (2150) puede permitir el acoplamiento del marcador oligonucleotídico (2140) a los fragmentos de ADN. La secuencia adaptadora (2150) puede comprender uno o más nucleótidos que se aparean con los fragmentos de ADN. Cada molécula etiquetada de manera estocástica (2170) puede comprender uno o más marcadores oligonucleotídicos (2150). El método puede comprender, además, amplificar las moléculas etiquetadas de manera estocástica (2170) para producir uno o más amplicones etiquetados de manera estocástica. El método puede comprender, además, retirar uno o más fragmentos de ADN antes de la amplificación. Retirar uno o más fragmentos de ADN puede comprender digerir los fragmentos de ADN con una o más enzimas de restricción antes de la amplificación para evitar la replicación de determinados fragmentos. El método puede comprender, además, detectar las moléculas etiquetadas de manera estocástica. La detección puede comprender la hibridación con matrices digitales que detectan la cantidad de regiones identificadoras exclusivas distintas ligadas a cada fragmento de ADN.

En la presente se describen, además, métodos, kits y sistemas para analizar una o más moléculas de ARN. Las moléculas de ARN pueden ser moléculas de ARN pequeñas. La molécula de ARN pequeña puede ser un microARN. La Figura 22 representa el método general para analizar una molécula de ARN pequeña. Según se muestra en la Etapa 1 de la Figura 22, una o más moléculas de miARN (2210) se etiquetan de manera estocástica con una primera pluralidad de marcadores oligonucleotídicos (2230). Los marcadores oligonucleotídicos (2230) pueden comprender una secuencia adaptadora (2240) y una región identificadora exclusiva (2250). La secuencia adaptadora (2240) puede permitir el acoplamiento del marcador oligonucleotídico (2230) a la molécula de miARN (2220) para producir un miARN etiquetado de manera estocástica en 3' (2260). Según se muestra en la Etapa 2 de la Figura 22, el método puede comprender, además, etiquetar de manera estocástica el microARN etiquetado de manera estocástica en 3' (2260) con una segunda pluralidad de marcadores oligonucleotídicos (2270). La segunda pluralidad de marcadores oligonucleotídicos (2270) puede comprender una secuencia adaptadora (2290) y una región identificadora exclusiva (2280). La secuencia adaptadora (2290) puede permitir el acoplamiento del marcador oligonucleotídico (2270) a la molécula de miARN etiquetado de manera estocástica en 3' (2260) para producir un miARN etiquetado de manera estocástica en 5' y 3' (2295). El método puede comprender, además, transcribir de manera inversa el miARN etiquetado de manera estocástica, amplificar el miARN etiquetado de manera estocástica, detectar el miARN etiquetado de manera estocástica, cuantificar el miARN al detectar el miARN etiquetado de manera estocástica, hibridar el miARN etiquetado de manera estocástica con una matriz o una combinación de estos. La matriz puede ser una matriz digital. La molécula de miARN puede comprender cualquiera de las secuencias de miARN. Por ejemplo, la molécula de miARN puede comprender una secuencia descrita en miRBase 18 <http://www.mirbase.org/>, que se presentó en noviembre de 2011 y comprende 1921 miARN humanos maduros únicos. Una matriz de 2 millones de rasgos puede detectar de manera adecuada 1000 etiquetas ligadas a los 1921 miARN.

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria se pueden utilizar para diagnóstico genético. Por ejemplo, los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria se pueden utilizar para diagnóstico genético preimplantación de célula simple (PGD, por sus siglas en inglés). Los principales desafíos de los ensayos de amplificación de ADN genómico de célula simple pueden relacionarse con pérdida de alelos y sesgo de replicación. Según se muestra en el análisis de modelado de cómputos representado en la Figura 23A donde cada molécula tiene una probabilidad de replicación de 0,8, las moléculas de relaciones de copia iniciales 1:1 se pueden distorsionar fácilmente hasta 1:10 o más apenas después de unos pocos ciclos de replicación. Sin embargo, cuando las etiquetas se aplican primero antes de la amplificación, el recuento de etiquetas para determinar la cantidad de copias no se ve afectado por el sesgo de replicación, siempre que se produzca la replicación. La determinación de la aneuploidía y grandes regiones de supresión o amplificación se pueden determinar de manera fácil y precisa mediante el método de etiquetado estocástico descrito en la presente memoria. La Figura 23B representa un esquema del método general. Según se muestra en la Etapa 1 de la Figura 23B, el método puede comprender fragmentar un ADN genómico (ADNg, 2310) para producir una o más moléculas fragmentadas (2320). La fragmentación del ADNg (2310) puede comprender cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la fragmentación puede comprender llevar a cabo una reacción de digestión por restricción. Según se muestra en la

Etapa 2 de la Figura 23B, el ADN fragmentado (2320) se puede etiquetar de manera estocástica con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos (2380) para producir una o más moléculas etiquetadas de manera estocástica (2330). La molécula etiquetada de manera estocástica (2330) puede comprender uno o más marcadores oligonucleotídicos (2380). Los marcadores oligonucleotídicos (2380) pueden comprender una secuencia identificadora exclusiva (2350) y un sitio de unión a cebador universal (2340). La molécula etiquetada de manera estocástica (2380) se puede amplificar utilizando uno o más cebadores (2360, 2370) que se pueden hibridar con el sitio de unión a cebador universal (2340) para producir uno o más amplicones etiquetados de manera estocástica. Según se muestra en la Etapa 3 de la Figura 23B, las moléculas etiquetadas de manera estocástica (2330) se pueden detectar mediante un detector GeneChip (2395). La molécula etiquetada de manera estocástica (2330) se puede hibridar con una sonda (2390) en el detector GeneChip (2395).

Los métodos, kits y sistemas descritos en la presente memoria se pueden utilizar para diagnóstico fetal. El método puede comprender (a) fragmentar una molécula de ácido nucleico en una muestra para producir uno o más fragmentos de ácido nucleico; (b) etiquetar de manera estocástica el uno o más fragmentos de ácido nucleico con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos que comprenden una región identificadora exclusiva para producir una o más moléculas etiquetadas de manera estocástica; y (c) detectar las moléculas etiquetadas de manera estocástica al contar la cantidad de regiones identificadoras exclusivas. El método puede comprender, además, diagnosticar un trastorno genético fetal en función de la detección de las moléculas etiquetadas de manera estocástica.

La Figura 24 representa un esquema general para utilizar el método de etiquetado estocástico en el diagnóstico fetal. En 100 nanogramos de ADN en circulación puede haber alrededor de 10 000 equivalentes de genoma. El primer trimestre de plasma materno, la concentración total de ADN fetal puede ser de alrededor de 10 % del ADN total en la muestra de plasma materno. El método, según se ilustra en la Figura 24, puede comprender fragmentar las moléculas de ADN (2410). La fragmentación puede comprender el uso de un cortador de enzima de restricción de 4 bases. Las moléculas de ADN fragmentadas se pueden etiquetar de manera estocástica con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos (2420). El etiquetado estocástico puede comprender ligar uno o más marcadores oligonucleotídicos a las moléculas de ADN fragmentadas para producir una o más moléculas etiquetadas de manera estocástica. Las moléculas etiquetadas de manera estocástica se pueden amplificar en una reacción múltiple (2430) para producir uno o más amplicones etiquetados de manera estocástica. Los amplicones etiquetados de manera estocástica se pueden detectar en una matriz (2440). La matriz puede comprender 5 millones de rasgos. El diagnóstico de un trastorno genético fetal (p. ej., trisomía 21) se puede basar en la detección de los amplicones etiquetados de manera estocástica (2450, 2460). Los 100 000 marcadores oligonucleotídicos se pueden sintetizar como se describe en: Methods for screening factorial chemical libraries, Stephen P. A. Fodor et al, patente estadounidense número: 5541061, emitida el 30 de julio de 1996.

La Figura 26 representa un esquema para el etiquetado estocástico de una o más moléculas con un cebador inerte. El método puede comprender (a) transcribir de forma inversa una molécula de ARNm (2610) con un cebador (2620) que comprende una secuencia oligodU para producir una copia de ADNc de la molécula de ARNm (2630), en donde la copia de ADNc comprende una cola de poliA en 3' y una secuencia oligodT en 5'; y (b) etiquetar de manera estocástica la copia de ADNc (2620) con un marcador oligonucleotídico (2640) que comprende un sitio de unión a cebador universal (2650), una región identificadora exclusiva (2660) y una secuencia oligodU (2670) para producir una molécula de ADNc etiquetada de manera estocástica (2680). El método puede comprender, además, una segunda etapa de etiquetado estocástico para producir una molécula de ADNc etiquetada de manera estocástica, en donde ambos extremos de la molécula de ADNc están etiquetados de manera estocástica con un marcador oligonucleotídico. El método puede comprender, además, tratar la muestra con uracil ADN glicosilasa (UDG) para retirar el cebador de oligodU (2620) y los marcadores oligonucleotídicos que comprenden la secuencia oligodU. El método puede comprender, además, amplificar la molécula de ADNc etiquetada de manera estocástica para producir uno o más amplicones etiquetados de manera estocástica.

La Figura 27 representa un esquema para analizar una o más moléculas. El método puede comprender (a) transcribir de forma inversa una molécula de ARNm (2710) con un marcador oligonucleotídico (2720) que comprende una secuencia oligodU (2730), una región identificadora exclusiva (2740) y un sitio de unión a cebador universal (2750) para producir una copia de ADNc (2760) de la molécula de ARNm, en donde la copia de ADNc (2760) comprende la región identificadora exclusiva (2740) y el sitio de unión a cebador universal (2750); y (b) amplificar la copia de ADNc con un primer cebador (2790) que comprende una secuencia oligodU y un segundo cebador (2780) que comprende la secuencia de cebador universal para producir amplicones etiquetados de manera estocástica. El método puede comprender tratar las moléculas con una o más enzimas de restricción. El método puede comprender, además, llevar a cabo una reacción de PCR en emulsión con las moléculas etiquetadas de manera estocástica.

Los métodos representados en las Figuras 26-27 pueden depender de la generación de cola de homopolímero. La Figura 28 representa un método que no depende de la generación de cola de homopolímero. Según se representa en la Figura 28, el método puede comprender transcribir de forma inversa una molécula de ARNm para producir una copia de ADNc. La transcripción inversa de la molécula de ARNm se puede llevar a cabo

sobre una superficie de perla. El método puede comprender digestión por ribonuclease H de la molécula de ARNm. El método puede comprender etiquetar de manera estocástica la copia de ADNc con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos para producir una o más moléculas de ADNc etiquetadas de manera estocástica. El marcador oligonucleotídico puede comprender una estructura secundaria. La estructura secundaria puede ser una horquilla. El marcador oligonucleotídico puede comprender un sitio de unión a cebador universal, una región identificadora exclusiva, un sitio de reconocimiento de enzima de restricción, una región específica de diana o cualquier combinación de estos. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede comprender una secuencia de unión a cebador universal. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede comprender una región identificadora exclusiva. La porción de lazo del marcador oligonucleotídico horquillado puede comprender un sitio de reconocimiento de enzima de restricción. El marcador oligonucleotídico puede ser monocatenario. El marcador oligonucleotídico puede ser bicatenario. El método puede comprender, además, amplificar la molécula de ADNc etiquetada de manera estocástica para producir uno o más amplicones etiquetados de manera estocástica. El método puede comprender, además, digerir los amplicones etiquetados de manera estocástica con una nucleasa de restricción para producir un amplicón etiquetado de manera estocástica digerido. El método puede comprender, además, ligar uno o más cebadores al amplicón etiquetado de manera estocástica digerido para producir un amplicón etiquetado de manera estocástica con cebador. El cebador puede ser un cebador de secuenciación. El método puede comprender, además, secuenciar el amplicón etiquetado de manera estocástica con cebador. Este método puede reducir o prevenir la incorporación no prevista de marcadores oligonucleotídicos durante la amplificación por PCR. Este método puede mejorar la secuenciación de las moléculas etiquetadas de manera estocástica en comparación con la secuenciación de las moléculas etiquetadas de manera estocástica de una reacción basada en colas de homopolímero. Este método puede reducir o prevenir errores de secuenciación. El marcador oligonucleotídico puede comprender un fosfato en 3'. El fosfato en 3' puede evitar la extensión del extremo 3' durante una reacción de PCR y reducir o prevenir, de esta manera, la amplificación no específica.

La Figura 29 representa un método de amplificación lineal. El método puede comprender transcribir de forma inversa una o más moléculas de ARNm al etiquetar de manera estocástica una o más moléculas de ARN con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos para producir una o más copias de ADNc de las moléculas de ARNm, en donde las copias de ADNc comprenden el marcador oligonucleotídico. El marcador oligonucleotídico puede comprender un sitio de unión a cebador universal, una región identificadora exclusiva y una secuencia oligodT. El método puede comprender, además, sintetizar una copia de ADN de la molécula de ARNm mediante síntesis de una segunda cadena. El método puede comprender amplificación lineal de la molécula de ADNc etiquetada de manera estocástica. La amplificación lineal puede comprender amplificar la molécula de ADNc etiquetada de manera estocástica mediante ARN polimerasa de T7, síntesis de desplazamiento de cadena por enzima de corte o RiboSPIA (NuGEN). El método puede comprender, además, acoplar uno o más cebadores de secuenciación a la molécula etiquetada de manera estocástica. El método puede comprender, además, amplificar la molécula etiquetada de manera estocástica para producir uno o más amplicones etiquetados de manera estocástica. El método puede comprender, además, secuenciar los amplicones etiquetados de manera estocástica. Este método puede comprender un nivel bajo de amplificación inicial y posteriormente PCR exponencial. Este método puede ser independiente con respecto a la ligadura. Este método puede reducir o prevenir los artefactos generados mediante PCR.

La Figura 30 representa un método de etiquetado estocástico de una o más moléculas mediante conmutación de cadenas. El método puede comprender transcribir de forma inversa una síntesis de primera cadena en presencia de un oligonucleótido de conmutación de cadena para producir una molécula de ADNc etiquetada de manera estocástica. El método puede comprender, además, amplificar la molécula de ADNc etiquetada de manera estocástica.

La Figura 31 representa un método de etiquetado estocástico de una o más moléculas mediante imprimación aleatoria. El método puede comprender transcribir de forma inversa una molécula de ARNm para producir una copia de ADNc etiquetada de manera estocástica. La transcripción inversa puede comprender etiquetar de manera estocástica una o más moléculas con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos, en donde el marcador oligonucleotídico comprende una secuencia oligodU, una secuencia identificadora exclusiva y una secuencia de cebador universal. El marcador oligonucleotídico puede comprender, además, un sitio de reconocimiento de enzima de restricción. El método puede comprender, además, retirar las moléculas de ARNm con ribonucleasa H. El método puede comprender, además, llevar a cabo una reacción de síntesis de segunda cadena con un segundo conjunto de marcadores oligonucleotídicos. El segundo conjunto de marcadores oligonucleotídicos puede comprender un sitio de unión a cebador universal, un sitio de reconocimiento de enzima de restricción y una región identificadora exclusiva. El método puede comprender, además, tratar la muestra con UDG para retirar los marcadores oligonucleotídicos que comprenden uno o más uracilos. El método puede comprender, además, amplificar las moléculas etiquetadas de manera estocástica. El método puede comprender, además, acoplar uno o más adaptadores a las moléculas etiquetadas de manera estocástica. El marcador oligonucleotídico puede comprender cualesquiera tres nucleótidos (p. ej., C, G, T -no A; C, G, A -no T). El marcador oligonucleotídico puede comprender cualesquiera dos nucleótidos (p. ej., G, T -no A, C; A, C -no G, T). Según se muestra en la Figura 31, el método puede comprender la síntesis de ADNc de primera cadena con un marcador oligonucleotídico con oligo dT (o dU para retirada posterior con UDG) que lleva 12 nucleótidos de etiqueta variables (C/G/T - A se excluyó para

evitar la autoimprimación falsa con la cadena T/U). Sin embargo, en lugar de usar colas de TdT para generar el segundo sitio de imprimación de PCR, se utilizó un marcador oligonucleotídico que contenía una cadena casi aleatoria y una secuencia de PCR.

La Figura 43 representa el esquema del método para la cuantificación absoluta de una o más moléculas directamente a partir de uno o más lisados celulares. Según se muestra en la Figura 43, célula intacta (4310) que comprende una o más moléculas de ADN (4320), moléculas de ARN (4330), proteínas (4340), o una combinación de estas se lisa para producir célula lisada (4350). La una o más moléculas de ADN (4320), moléculas de ARN (4330) y/o proteínas (4340) se pueden liberar de la célula. La cantidad de una o más moléculas de ARNm (4330) se puede determinar al etiquetar de manera estocástica las moléculas de ARNm con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos (4390). El marcador oligonucleotídico puede comprender una región específica de diana (4360), una región identificadora exclusiva (4370) y un sitio de unión a cebador universal (4380).

En algunos casos, la molécula diana es una molécula de ADN. De manera alternativa, la molécula diana es una molécula de ARN. En algunos casos, los métodos descritos en la presente memoria comprenden, además, transcribir de forma inversa la molécula de ARN. El oligo específico de gen etiquetado puede comprender uno o más nucleótidos. El uno o más nucleótidos pueden ser un desoxinucleótido. De manera alternativa, o adicional, el uno o más nucleótidos son un desoxirribonucleótido. El uno o más nucleótidos pueden ser un nucleótido sintético. El oligo específico de gen etiquetado puede comprender al menos alrededor de 5 nucleótidos. De manera alternativa, el oligo específico de gen etiquetado comprende al menos alrededor de 10 nucleótidos. De manera alternativa, el oligo específico de gen etiquetado comprende al menos alrededor de 12 nucleótidos. El oligo específico de gen etiquetado puede comprender al menos alrededor de 15 nucleótidos. El oligo específico de gen etiquetado puede comprender al menos alrededor de 17 nucleótidos. El oligo específico de gen etiquetado puede comprender al menos alrededor de 20 nucleótidos. En algunos casos, el oligo específico de gen etiquetado comprende al menos alrededor de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 nucleótidos.

El oligo específico de gen etiquetado puede comprender una región específica de diana. La región específica de diana del oligo específico de gen etiquetado puede ser al menos parcialmente complementaria a al menos una porción de la molécula diana. En algunos casos, la región específica de diana comprende al menos alrededor de 5 nucleótidos que son complementarios a al menos una porción de la molécula diana. De manera alternativa, la región específica de diana comprende al menos alrededor de 10 nucleótidos que son complementarios a al menos una porción de la molécula diana. En algunos casos, la región específica de diana comprende al menos alrededor de 12 nucleótidos que son complementarios a al menos una porción de la molécula diana. La región específica de diana puede comprender al menos alrededor de 15 nucleótidos que son complementarios a al menos una porción de la molécula diana. La región específica de diana puede comprender al menos alrededor de 17 nucleótidos que son complementarios a al menos una porción de la molécula diana. La región específica de diana puede comprender al menos alrededor de 20 nucleótidos que son complementarios a al menos una porción de la molécula diana. La región específica de diana puede comprender al menos alrededor de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96 o 100 nucleótidos que son complementarios a al menos una porción de la molécula diana. La región específica de diana puede comprender una secuencia que es al menos alrededor de 60 % complementaria a al menos una porción de la molécula diana. De manera alternativa, la región específica de diana comprende una secuencia que es al menos alrededor de 70 % complementaria a al menos una porción de la molécula diana. La región específica de diana puede comprender una secuencia que es al menos alrededor de 80 % complementaria a al menos una porción de la molécula diana. La región específica de diana puede comprender una secuencia que es al menos alrededor de 85 % complementaria a al menos una porción de la molécula diana. La región específica de diana puede comprender una secuencia que es al menos alrededor de 90 % complementaria a al menos una porción de la molécula diana. La región específica de diana puede comprender una secuencia que es al menos alrededor de 95 % complementaria a al menos una porción de la molécula diana. La región específica de diana puede comprender una secuencia que es al menos alrededor de 97 % complementaria a al menos una porción de la molécula diana. La región específica de diana puede comprender una secuencia que es al menos alrededor de 98 % complementaria a al menos una porción de la molécula diana.

El oligo específico de gen etiquetado puede comprender cualquier etiqueta descrita en la presente memoria. En algunos casos, la etiqueta es un fluoróforo. De manera alternativa, la etiqueta es un tinte de cianina (p. ej., Cy3, Cy5).

El soporte sólido puede ser cualquier soporte sólido descrito en la presente memoria. En algunos casos, el soporte sólido es una matriz detectora. La matriz detectora puede comprender una pluralidad de sondas. La molécula diana se puede hibridar con una o más sondas de la pluralidad de sondas en la matriz detectora.

El método puede comprender, además, amplificar la molécula diana antes de la hibridación con el soporte sólido. Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender, además, secuenciar las moléculas diana hibridadas con el soporte sólido. Los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para evitar la detección de falsos positivos de ADN amplificados por PCR que no contienen el gen de interés.

El método puede comprender, además, detectar las moléculas diana etiquetadas. Los métodos para detectar la molécula diana pueden comprender cualesquiera de los métodos e instrumentos de detección descritos en la presente memoria. En algunos casos, detectar la molécula diana etiquetada comprende detectar la etiqueta. Detectar la molécula diana etiquetada puede comprender un fluorómetro. De manera alternativa, detectar la molécula diana etiquetada puede comprender un luminómetro. En otros casos, detectar la molécula diana etiquetada puede comprender un lector de placa.

En la presente se describen, además, métodos, kits y sistemas para capturar y/o enriquecer una población de moléculas diana. La Figura 8 muestra un esquema del método. En general, el método comprende: a) etiquetar de manera estocástica una o más moléculas de ácido nucleico en una muestra para producir una molécula etiquetada de manera estocástica; y b) capturar una o más moléculas etiquetadas de manera estocástica para producir una molécula capturada, en donde la molécula capturada comprende una molécula diana.

Capturar la molécula etiquetada de manera estocástica puede comprender el uso de uno o más oligos específicos de gen. Los oligos específicos de gen pueden acoplarse a una molécula etiquetada de manera estocástica específica para producir una molécula enlazada a oligo. En algunos casos, los métodos descritos en la presente memoria comprenden, además, aislar la molécula enlazada a oligo de la muestra. El oligo específico de gen puede comprender una etiqueta o marcador. La etiqueta o marcador puede permitir el aislamiento de la molécula enlazada a oligo.

De manera alternativa, capturar la molécula etiquetada de manera estocástica puede comprender poner en contacto la muestra que comprende las moléculas etiquetadas de manera estocástica con un soporte sólido. En algunos casos, la molécula etiquetada de manera estocástica que comprende la molécula diana se hibrida con el soporte sólido para capturar, de esta manera, la molécula etiquetada de manera estocástica. De manera alternativa, la molécula etiquetada de manera estocástica que se hibrida con el soporte sólido no comprende la molécula diana y capturar la molécula etiquetada de manera estocástica comprende recoger cualesquiera moléculas etiquetadas de manera estocástica no unidas (p. ej., moléculas etiquetadas de manera estocástica que no se hibridaron con el soporte sólido). El soporte sólido puede ser cualesquiera de los soportes sólidos descritos en la presente memoria. En algunos casos, el soporte sólido es una matriz. En otros casos, el soporte sólido es una perla. La perla puede ser una perla magnética. En algunos casos, capturar la molécula etiquetada de manera estocástica comprende el uso de un imán.

El método puede comprender, además, la amplificación de la molécula etiquetada de manera estocástica y/o la molécula capturada. La amplificación de la molécula etiquetada de manera estocástica y/o la molécula capturada puede comprender cualesquiera de los métodos de amplificación descritos en la presente memoria. En algunos casos, la amplificación de la molécula etiquetada de manera estocástica y/o la molécula capturada comprende PCR.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender, además, secuenciar la molécula capturada. La secuenciación puede comprender cualesquiera de los métodos de secuenciación descritos en la presente memoria. En algunos casos, las moléculas capturadas se secuencian directamente sobre el soporte sólido.

En la presente se describen, además, métodos, kits y sistemas para la detección y/o cuantificación digital de una molécula de ácido nucleico. En general, los métodos, kits y sistemas comprenden (a) etiquetar de manera estocástica una molécula de ácido nucleico con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos para producir una molécula de ácido nucleico etiquetada de manera estocástica; y (b) detectar y/o cuantificar la molécula de ácido nucleico etiquetada de manera estocástica. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN. La molécula de ácido nucleico puede ser de una célula. De manera alternativa, la molécula de ácido nucleico es una molécula libre de célula. La molécula de ácido nucleico puede derivar de un sujeto. De manera alternativa, la molécula de ácido nucleico puede derivar de un sujeto foráneo. El sujeto foráneo puede ser un patógeno (p. ej., virus, bacterias, hongo).

El método puede comprender, además, amplificar las moléculas de ácido nucleico etiquetadas de manera estocástica para producir amplicones de molécula de ácido nucleico etiquetados de manera estocástica. Las moléculas de ácido nucleico etiquetadas de manera estocástica o cualesquiera productos de estas (p. ej., amplicones de molécula de ácido nucleico etiquetados de manera estocástica) se pueden amplificar de manera repetida.

En algunos casos, el método comprende, además, acoplar una o más etiquetas detectables a la molécula de ácido nucleico etiquetada de manera estocástica o cualesquiera productos de estas. En algunos casos, al menos una etiqueta detectable se acopla a las moléculas de ácido nucleico etiquetadas de manera estocástica o productos de estas. De manera alternativa, al menos dos etiquetas detectables se acoplan a las moléculas de ácido nucleico etiquetadas de manera estocástica o productos de estas. La etiqueta detectable puede ser biotina. De manera alternativa, la etiqueta detectable es un tinte fluorescente. El tinte fluorescente puede ser un tinte CyTM o un tinte TYE 563. El tinte CyTM puede ser Cy3.

El método puede comprender, además, la hibridación de las moléculas de ácido nucleico etiquetadas de manera estocástica o cualesquiera productos de estas con un soporte sólido. El soporte sólido puede ser una perla. De manera alternativa, el soporte sólido es una matriz.

El método puede comprender, además, llevar a cabo una reacción de secuenciación para determinar la secuencia de al menos una porción de la molécula de ácido nucleico etiquetada de manera estocástica o producto de esta. En algunos casos, al menos una porción del marcador oligonucleotídico de la molécula de ácido nucleico etiquetada de manera estocástica o producto de esta es secuencias. Por ejemplo, al menos una porción de la región identificadora exclusiva del marcador oligonucleotídico se secuencia. En otro ejemplo, al menos una porción de la región específica de diana del marcador oligonucleotídico se secuencia. De manera alternativa, o adicional, al menos una porción de la molécula de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico etiquetada de manera estocástica se secuencia.

La detección y/o cuantificación de las moléculas de ácido nucleico etiquetadas de manera estocástica puede comprender la detección y/o cuantificación de las copias de ADNc etiquetadas de manera estocástica y/o los amplicones de molécula de ácido etiquetados de manera estocástica. La detección y/o cuantificación de las moléculas de ácido nucleico etiquetadas de manera estocástica puede comprender, además, la detección de una o más etiquetas detectables acopladas a las moléculas de ácido nucleico etiquetadas de manera estocástica o productos de estas. La detección y/o cuantificación de las moléculas de ácido nucleico etiquetadas de manera estocástica o productos de estas puede comprender cualesquiera de los métodos de detección y/o cuantificación descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se puede utilizar un lector de fluorescencia para detectar y/o cuantificar las moléculas de ácido nucleico etiquetadas de manera estocástica o productos de estas. De manera alternativa, se puede utilizar un lector de micromatriz para detectar y/o cuantificar las moléculas de ácido nucleico etiquetadas de manera estocástica o productos de estas.

En la presente se describen, además, métodos, kits y sistemas para la detección digital y/o cuantificación digital de moléculas virales. En general, los métodos, kits y sistemas comprenden (a) etiquetar de manera estocástica una o más moléculas virales con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos para producir una molécula viral etiquetada de manera estocástica; y (b) detectar y/o cuantificar la molécula viral etiquetada de manera estocástica. En algunos casos, las moléculas virales son moléculas de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico puede ser ADN o ARN.

El método puede comprender, además, llevar a cabo una reacción de transcripción inversa para producir una copia de ADNc etiquetada de manera estocástica de la molécula viral etiquetada de manera estocástica (p. ej., molécula de ARN viral etiquetada de manera estocástica). La molécula viral etiquetada de manera estocástica se puede transcribir de forma inversa repetidas veces para producir múltiples copias de ADNc etiquetadas de manera estocástica de la molécula viral etiquetada de manera estocástica. Los métodos pueden comprender, además, amplificar las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica o cualesquiera productos de estas (p. ej., copia de ADNc etiquetada de manera estocástica) para producir amplicones de molécula viral etiquetados de manera estocástica. Las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica se pueden amplificar de manera repetida. De manera alternativa, los productos de las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica se pueden amplificar de manera repetida. En algunos casos, los productos de las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica son las copias de ADNc etiquetadas de manera estocástica de la molécula viral etiquetada de manera estocástica. De manera alternativa, los productos de las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica son los amplicones virales etiquetados de manera estocástica.

En algunos casos, el método comprende, además, acoplar una o más etiquetas detectables a las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica o productos de estas. En algunos casos, al menos una etiqueta detectable se acopla a las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica o productos de estas. De manera alternativa, al menos dos etiquetas detectables se acoplan a las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica o productos de estas. La etiqueta detectable puede ser biotina. De manera alternativa, la etiqueta detectable es un tinte fluorescente. El tinte fluorescente puede ser un tinte CyTM o un tinte TYE 563. El tinte CyTM puede ser Cy3.

El método puede comprender, además, la hibridación de las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica o cualesquiera productos de estas con un soporte sólido. El soporte sólido puede ser una perla. De manera alternativa, el soporte sólido es una matriz.

El método puede comprender, además, llevar a cabo una reacción de secuenciación para determinar la secuencia de al menos una porción de la molécula viral etiquetada de manera estocástica o producto de esta. En algunos casos, al menos una porción del marcador oligonucleotídico de la molécula viral etiquetada de manera estocástica o producto de esta es secuencias. Por ejemplo, al menos una porción de la región identificadora exclusiva del marcador oligonucleotídico se secuencia. En otro ejemplo, al menos una porción de la región específica de diana del marcador oligonucleotídico se secuencia. De manera alternativa, o adicional, al menos una

porción de la molécula viral de la molécula viral etiquetada de manera estocástica se secuencian.

La detección y/o cuantificación de las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica puede comprender la detección y/o cuantificación de las copias de ADNc etiquetadas de manera estocástica y/o los amplicones virales etiquetados de manera estocástica. La detección y/o cuantificación de las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica puede comprender, además, la detección de una o más etiquetas detectables acopladas a las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica o productos de estas. La detección y/o cuantificación de las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica o productos de estas puede comprender cualesquiera de los métodos de detección y/o cuantificación descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se puede utilizar un lector de fluorescencia para detectar y/o cuantificar las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica o productos de estas. De manera alternativa, se puede utilizar un lector de micromatriz para detectar y/o cuantificar las moléculas virales etiquetadas de manera estocástica o productos de estas.

En algunos casos, la detección digital y/o la cuantificación digital de las moléculas virales se puede utilizar para determinar la carga viral en un sujeto que padece una infección viral. De manera alternativa, la detección digital y/o la cuantificación digital de las moléculas virales se puede utilizar para el diagnóstico y/o pronóstico de una infección viral. En algunos casos, la detección digital y/o la cuantificación digital de las moléculas virales se puede utilizar para monitorizar un régimen terapéutico antiviral.

En la presente se describen, además, métodos, kits y sistemas para la detección y/o cuantificación digital de un biomarcador. Los métodos, kits y sistemas se pueden utilizar para cuantificar un biomarcador. En general, los métodos, kits y sistemas comprenden (a) etiquetar de manera estocástica un biomarcador con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos para producir un biomarcador etiquetado de manera estocástica; y (b) detectar y/o cuantificar el biomarcador etiquetado de manera estocástica. El biomarcador puede ser un biomarcador de cáncer. El biomarcador puede ser una molécula de ácido nucleico o una proteína. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ADN. De manera alternativa, la molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ARN. El biomarcador puede derivar de un sujeto. De manera alternativa, el biomarcador puede derivar de un sujeto foráneo. El sujeto foráneo puede ser un patógeno (p. ej., virus, bacterias, hongo).

El método puede comprender, además, llevar a cabo una reacción de transcripción inversa para producir una copia de ADNc etiquetada de manera estocástica del biomarcador etiquetado de manera estocástica (p. ej., molécula de ARN de biomarcador etiquetada de manera estocástica). El biomarcador etiquetado de manera estocástica se puede transcribir de forma inversa repetidas veces para producir múltiples copias de ADNc etiquetadas de manera estocástica del biomarcador etiquetado de manera estocástica. Los métodos pueden comprender, además, amplificar los biomarcadores etiquetados de manera estocástica o cualesquiera productos de estos (p. ej., copia de ADNc etiquetada de manera estocástica) para producir amplicones de biomarcador etiquetados de manera estocástica. Los biomarcadores etiquetados de manera estocástica se pueden amplificar de manera repetida. De manera alternativa, los productos de los biomarcadores etiquetados de manera estocástica se pueden amplificar de manera repetida. En algunos casos, los productos de los biomarcadores etiquetados de manera estocástica son las copias de ADNc etiquetadas de manera estocástica del biomarcador etiquetado de manera estocástica. De manera alternativa, los productos de los biomarcadores etiquetados de manera estocástica son los amplicones de biomarcador etiquetados de manera estocástica.

En algunos casos, el método comprende, además, acoplar una o más etiquetas detectables a los biomarcadores etiquetados de manera estocástica o productos de estos. En algunos casos, al menos una etiqueta detectable se acopla a los biomarcadores etiquetados de manera estocástica o productos de estos. De manera alternativa, al menos dos etiquetas detectables se acoplan a los biomarcadores etiquetados de manera estocástica o productos de estos. La etiqueta detectable puede ser biotina. De manera alternativa, la etiqueta detectable es un tinte fluorescente. El tinte fluorescente puede ser un tinte CyTM o un tinte TYE 563. El tinte CyTM puede ser Cy3.

El método puede comprender, además, la hibridación de los biomarcadores etiquetados de manera estocástica o cualesquiera productos de estos con un soporte sólido. El soporte sólido puede ser una perla. De manera alternativa, el soporte sólido es una matriz.

El método puede comprender, además, llevar a cabo una reacción de secuenciación para determinar la secuencia de al menos una porción del biomarcador etiquetado de manera estocástica o producto de este. En algunos casos, al menos una porción del marcador oligonucleotídico del biomarcador etiquetado de manera estocástica o producto de este es secuencias. Por ejemplo, al menos una porción de la región identificadora exclusiva del marcador oligonucleotídico se secuencian. En otro ejemplo, al menos una porción de la región específica de diana del marcador oligonucleotídico se secuencian. De manera alternativa, o adicional, al menos una porción del biomarcador del biomarcador etiquetado de manera estocástica se secuencian.

La detección y/o cuantificación de los biomarcadores etiquetados de manera estocástica puede comprender la detección y/o cuantificación de las copias de ADNc etiquetadas de manera estocástica y/o los amplicones de biomarcador etiquetados de manera estocástica. La detección y/o cuantificación de los biomarcadores etiquetados

de manera estocástica puede comprender, además, la detección de una o más etiquetas detectables acopladas a los biomarcadores etiquetados de manera estocástica o productos de estos. La detección y/o cuantificación de los biomarcadores etiquetados de manera estocástica o productos de estos puede comprender cualesquiera de los métodos de detección y/o cuantificación descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se puede utilizar un lector de fluorescencia para detectar y/o cuantificar los biomarcadores etiquetados de manera estocástica o productos de estos. De manera alternativa, se puede utilizar un lector de micromatriz para detectar y/o cuantificar los biomarcadores etiquetados de manera estocástica o productos de estos.

En algunos casos, la detección digital y/o la cuantificación digital de los biomarcadores se puede utilizar para diagnosticar o pronosticar una afección en un sujeto que lo necesita. En algunos casos, la detección digital y/o la cuantificación digital de los biomarcadores se puede utilizar para monitorizar un régimen terapéutico.

La afección puede ser un cáncer. El cáncer puede ser un sarcoma, carcinoma, leucemia o linfoma.

De manera alternativa, la afección es una infección patógena. La infección patógena puede ser una infección bacteriana o viral.

En la presente se describen, además, métodos, kits y sistemas para contar o determinar una cantidad de moléculas de ácido nucleico en una muestra. El método puede comprender: (a) proporcionar una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos en donde un marcador oligonucleotídico comprende una secuencia identificadora exclusiva, una secuencia diana y una secuencia de cebador de PCR opcional; (b) combinar una muestra que comprende moléculas de ácido nucleico con la pluralidad de cebadores etiquetados para formar una molécula de ácido nucleico etiquetada, en donde cada molécula de ácido nucleico diana es capaz de acoplarse a un marcador oligonucleotídico con una secuencia identificadora exclusiva; y (c) detectar (i) la molécula de ácido nucleico, un complemento de la molécula de ácido nucleico, un complemento inverso de la molécula de ácido nucleico, o una porción de esta, y (ii) el marcador oligonucleotídico, un complemento del marcador oligonucleotídico, un complemento inverso del marcador oligonucleotídico o una porción de este para determinar el recuento o cantidad de moléculas de ácido nucleico etiquetadas diferentes y contar o determinar, de esta manera, una cantidad de moléculas de ácido nucleico en la muestra. El método puede comprender contar o determinar una cantidad de 10 o más moléculas de ácido nucleico diferentes. El método puede comprender contar o determinar una cantidad de 20 o más moléculas de ácido nucleico diferentes. Las moléculas de ácido nucleico diferentes pueden diferir en 1 o más nucleótidos o pares de bases. Los ácidos nucleicos diferentes se pueden contar de manera simultánea. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico diferentes se pueden contar de manera secuencial.

El método para contar o determinar una cantidad de moléculas de ácido nucleico en una muestra puede comprender: (a) proporcionar una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos en donde un marcador oligonucleotídico comprende una secuencia identificadora exclusiva, una secuencia diana y una secuencia de cebador de PCR opcional; (b) combinar una muestra que comprende moléculas de ácido nucleico con la pluralidad de cebadores etiquetados para formar una molécula de ácido nucleico etiquetada, en donde el acoplamiento de la molécula de ácido nucleico con el marcador oligonucleotídico forma una unión entre molécula-marcador única; y (c) detectar la unión de molécula-marcador única, un complemento de la unión de molécula-marcador única, un complemento inverso de la unión de molécula-marcador única, o una porción de esta para determinar el recuento o cantidad de moléculas de ácido nucleico etiquetadas diferentes y contar o determinar, de esta manera, una cantidad de moléculas de ácido nucleico en la muestra. El método puede comprender contar o determinar una cantidad de 10 o más moléculas de ácido nucleico diferentes. El método puede comprender contar o determinar una cantidad de 20 o más moléculas de ácido nucleico diferentes. Las moléculas de ácido nucleico diferentes pueden diferir en 1 o más nucleótidos o pares de bases. Los ácidos nucleicos diferentes se pueden contar de manera simultánea. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico diferentes se pueden contar de manera secuencial.

El método para contar o determinar una cantidad de moléculas de ácido nucleico en una muestra puede comprender: (a) proporcionar una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos, en donde el marcador oligonucleotídico comprende una secuencia específica de diana, una secuencia identificadora exclusiva que comprende un ácido ribonucleico y una secuencia de cebador de PCR opcional; (b) combinar una muestra que comprende moléculas de ácido nucleico con la pluralidad de cebadores etiquetados para formar una molécula de ácido nucleico etiquetada, en donde una molécula de ácido nucleico diana es capaz de acoplarse a marcadores oligonucleotídicos con diferentes secuencias identificadoras exclusivas; (c) sintetizar una copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada, en donde la copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada comprende una copia de la molécula de ácido nucleico y una copia del marcador oligonucleotídico y el ácido ribonucleico de la secuencia identificadora exclusiva comprende reemplazo con un ácido desoxirribonucleico; y (d) detectar la copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento de la copia de una molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento inverso de la molécula de ácido nucleico etiquetada o una porción de esta para determinar un recuento de las copias de la molécula de ácido nucleico etiquetada y para contar o determinar, de esta manera, una cantidad de moléculas de ácido nucleico en la muestra. El método puede comprender contar o determinar una cantidad de 10 o más moléculas de ácido nucleico diferentes. El método puede comprender contar o determinar una cantidad de 20 o más moléculas de ácido nucleico diferentes. Las moléculas de ácido nucleico diferentes pueden

diferir en 1 o más nucleótidos o pares de bases. Los ácidos nucleicos diferentes se pueden contar de manera simultánea. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico diferentes se pueden contar de manera secuencial.

El método para contar o determinar una cantidad de moléculas de ARN en una muestra puede comprender: (a) combinar una muestra que comprende moléculas de ARN con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos, en donde el marcador oligonucleotídico comprende una secuencia específica de ARN, una secuencia identificadora exclusiva y una secuencia de cebador de PCR opcional; (b) sintetizar una copia de una molécula de ARN al acoplar un marcador oligonucleotídico a la molécula de ARN para formar una molécula de ADN etiquetada, en donde cada molécula de ARN es capaz de acoplarse a marcadores oligonucleotídicos con secuencias identificadoras exclusivas diferentes y cada molécula de ADN etiquetada comprende una copia de la molécula de ARN y una copia del marcador oligonucleotídico; y (c) detectar la copia de la molécula de ADN etiquetada, un complemento de la molécula de ADN etiquetada, un complemento inverso de la molécula de ADN etiquetada o una porción de esta para determinar un recuento de la molécula de ADN etiquetada y para contar o determinar, de esta manera, una cantidad de moléculas de ARN en la muestra.

El método para contar o determinar una cantidad de moléculas de ARN en una muestra puede comprender: (a) proporcionar una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos, en donde el marcador oligonucleotídico comprende una secuencia específica de ARN, una secuencia identificadora exclusiva que comprende un ácido ribonucleico y una secuencia de cebador de PCR opcional; (b) combinar una muestra que comprende moléculas de ARN con la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos para formar una molécula de ARN etiquetada, en donde la molécula de ARN etiquetada es capaz de acoplarse a marcadores oligonucleotídicos con diferentes secuencias identificadoras exclusivas; (c) sintetizar una copia de una molécula de ARN etiquetada para formar una molécula de ADN etiquetada, en donde cada molécula de ADN etiquetada comprende una copia de la molécula de ARN y una copia del marcador oligonucleotídico y el ácido ribonucleico de la secuencia identificadora exclusiva comprende reemplazo con un ácido desoxirribonucleico; y (d) detectar la copia de la molécula de ADN etiquetada, un complemento de la molécula de ADN etiquetada, un complemento inverso de la molécula de ADN etiquetada o una porción de esta para determinar un recuento de la molécula de ADN etiquetada y para contar o determinar, de esta manera, una cantidad de moléculas de ARN en la muestra.

El método para contar o determinar una cantidad de moléculas de ARN en una muestra puede comprender: (a) combinar una muestra que comprende moléculas de ARN con una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos para formar una molécula de ARN etiquetada, en donde cada molécula de ARN diana es capaz de acoplarse a una etiqueta diferente; (b) opcionalmente acoplar un segundo marcador oligonucleotídico a la molécula de ARN etiquetada para formar una molécula de ARN doblemente etiquetada; (c) sintetizar una copia de la molécula de ARN etiquetada o la molécula de ARN doblemente etiquetada para formar una molécula de ADN etiquetada o una molécula de ADN doblemente etiquetada, en donde la molécula de ADN etiquetada y la molécula de ADN doblemente etiquetada comprenden una copia del marcador oligonucleotídico y una copia de la molécula de ARN; y (d) detectar la molécula de ADN etiquetada, un complemento de la molécula de ADN etiquetada, un complemento inverso de la molécula de ADN etiquetada, la molécula de ADN doblemente etiquetada, un complemento de la molécula de ADN doblemente etiquetada, un complemento inverso de la molécula de ADN doblemente etiquetada o una porción de estas para contar o determinar la cantidad de moléculas de ADN etiquetadas o moléculas de ADN doblemente etiquetadas y para contar o determinar, de esta manera, una cantidad de moléculas de ARN en la muestra.

El método para contar o determinar una cantidad de moléculas de ARN en una muestra puede comprender: (a) combinar una muestra que comprende moléculas de ARN con una pluralidad de etiquetas para formar una molécula de ARN etiquetada, en donde cada molécula de ARN diana es capaz de acoplarse a una etiqueta diferente; (b) opcionalmente acoplar una segunda etiqueta a la molécula de ARN etiquetada para formar una molécula de ARN doblemente etiquetada; y (c) detectar la molécula de ARN etiquetada, un complemento de la molécula de ARN etiquetada, un complemento inverso de la molécula de ARN etiquetada, la molécula de ARN doblemente etiquetada, un complemento de la molécula de ARN doblemente etiquetada, un complemento inverso de la molécula de ARN doblemente etiquetada o una porción de estas para contar o determinar la cantidad de moléculas de ARN etiquetadas o moléculas de ARN doblemente etiquetadas y para contar o determinar, de esta manera, una cantidad de moléculas de ARN en la muestra.

El método para contar o determinar una cantidad de moléculas de ARNm en una muestra puede comprender: (a) proporcionar una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos, en donde el marcador oligonucleotídico comprende una secuencia específica de diana, una secuencia identificadora exclusiva y una secuencia de cebador de PCR opcional; (b) combinar una muestra que comprende moléculas de ARNm con la pluralidad de marcadores oligonucleotídicos para formar una molécula de ARNm etiquetada, en donde cada molécula de ARNm diana es capaz de acoplarse a un marcador oligonucleotídico diferente; (b) sintetizar una copia de la molécula de ARNm etiquetada para formar una molécula de ADN etiquetada, en donde la molécula de ADN etiquetada comprende una copia de la molécula de ARNm y un marcador oligonucleotídico o una copia del marcador oligonucleotídico; y (c) detectar la molécula de ADN etiquetada, un complemento de la molécula de ADN etiquetada,

un complemento inverso de la molécula de ADN etiquetada o una porción de esta para determinar un recuento de las moléculas de ADN etiquetadas diferentes y para contar o determinar, de esta manera, una cantidad de moléculas de ARNm en la muestra.

En un aspecto, el ARN poliadenilado de una célula simple se analiza mediante los métodos descritos en la presente memoria. Después de la lisis celular, el ARN de poliA se puede enriquecer mediante captura en un soporte sólido, tal como una perla, que tiene oligo dT acoplado o la amplificación se puede llevar a cabo con el lisado. Se produce una copia de ADNc etiquetada del ARN al hibridar un cebador que tiene una región oligo dT y una región de etiqueta-marcador. La región etiqueta-marcador está en dirección a 5' de la región oligo dT. Preferiblemente, hay una secuencia de amplificación que está en dirección a 5' de la región de etiqueta-marcador de manera que la región etiqueta-marcador, que es variable entre cebadores, esté entre una secuencia de cebador de amplificación común en 5' y una región de oligo dT en 3'. A continuación, se sintetiza el ADNc de segunda cadena utilizando métodos estándares, por ejemplo, el uso de ribonucleasa H y ADN polimerasa. El ADNbc resultante luego se puede amplificar de manera lineal dependiendo de la secuencia de cebador de amplificación. Por ejemplo, si la secuencia de cebador de amplificación es una secuencia promotora de ARN de T7, se puede generar ARN no codificante mediante IVT utilizando ARN pol de T7. Si la secuencia de cebador de amplificación incluye un sitio para la enzima de corte *s* (p. ej., Nt. BspQI), se puede utilizar desplazamiento de cadena por enzima de corte para generar copias de ADN de las dianas de ARN. A continuación, se pueden modificar las copias para incluir cebadores de secuenciación en uno o ambos extremos y los productos se pueden secuenciar. La información de secuencia se recoge para el marcador y suficiente de la secuencia adyacente para proporcionar una identificación de la diana.

En algunos casos, el marcador oligonucleotídico comprende un ácido rinonucleico. El marcador oligonucleotídico puede comprender un ácido ribonucleico que es uracilo. El marcador oligonucleotídico puede comprender un ácido ribonucleico que es citosina. El marcador oligonucleotídico puede comprender un ácido ribonucleico que es adenina. El marcador oligonucleotídico puede comprender un ácido ribonucleico que es guanosina.

La secuencia identificadora exclusiva puede comprender una secuencia predeterminada. La secuencia identificadora exclusiva puede comprender una secuencia aleatoria.

La secuencia específica de diana del marcador oligonucleotídico puede ser específica para una pluralidad de dianas. En algunos aspectos, la secuencia específica de diana del marcador oligonucleotídico comprende una secuencia oligo dT. En algunos aspectos, la secuencia específica de diana del marcador oligonucleotídico puede comprender una secuencia oligo dU. En algunos aspectos, la secuencia específica de diana no comprende una secuencia oligo dT ni oligo dU.

La copia de la molécula de ADN etiquetada se puede sintetizar mediante una enzima transcriptasa inversa. La enzima transcriptasa inversa se puede seleccionar de una transcriptasa inversa retroviral, una ADN polimerasa de fago o una ADN polimerasa.

El método puede comprender, además, sintetizar una copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada para reemplazar un ácido ribonucleico con un ácido desoxirribonucleico.

En algunos aspectos, la etapa de detección comprende detectar la copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento de la copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento inverso de la copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada o una porción de esta. En algunos aspectos, la etapa de detección puede comprender la hibridación de la porción de la molécula de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento de la porción de la molécula de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento inverso de la porción de la molécula de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico etiquetada, el marcador oligonucleotídico de la molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento del marcador oligonucleotídico de la molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento inverso del marcador oligonucleotídico de la molécula de ácido nucleico etiquetada, una porción de esta o cualquier combinación de estos con un soporte sólido. En algunos aspectos, la etapa de detección puede comprender la hibridación de la porción de la molécula de ácido nucleico de la copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada, la porción de marcador oligonucleotídico de la copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento de esta, un complemento inverso de esta, una porción de esta o cualquier combinación de estos con un soporte sólido.

En algunos aspectos, la etapa de detección comprende detectar la copia del marcador oligonucleotídico, un complemento de la copia del marcador oligonucleotídico, un complemento inverso de la copia del marcador oligonucleotídico o una porción de esta.

La etapa de detección puede comprender la hibridación de la unión molécula-marcador única, un complemento de la unión molécula-marcador única, un complemento inverso de la unión molécula-marcador única o una porción de esta con un soporte sólido. La etapa de detección puede comprender la hibridación de una copia de la unión molécula-marcador única, un complemento de la copia de la unión molécula-marcador única, un

complemento inverso de la copia de la unión molécula-marcador única o una porción de esta con un soporte sólido.

En algunos aspectos, el soporte sólido comprende una matriz. La matriz puede comprender sondas acopladas a la superficie. La matriz puede comprender, además, un rasgo de sonda para cada combinación de molécula de ácido nucleico etiquetada posible. En otro aspecto, el soporte sólido puede comprender una perla.

En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la secuenciación de (i) la porción de molécula de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento de esta, un complemento inverso de esta o una porción de esta, y (ii) la porción de marcador oligonucleotídico de la molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento de esta, un complemento inverso de esta o una porción de esta. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la secuenciación de (i) la porción de molécula de ácido nucleico de la copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento de esta, un complemento inverso de esta o una porción de esta, y (ii) la porción de marcador oligonucleotídico de la copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada, un complemento de esta, un complemento inverso de esta o una porción de esta.

En algunos aspectos, la etapa de detección puede comprender la secuenciación de la unión marcador oligonucleotídico-ADN única, un complemento de la unión marcador oligonucleotídico-ADN única, un complemento inverso de la unión marcador oligonucleotídico-ADN única o una porción de esta. En algunos aspectos, la etapa de detección puede comprender la secuenciación de la copia de la unión marcador oligonucleotídico-ADN única, un complemento de la copia de la unión marcador oligonucleotídico-ADN única, un complemento inverso de la copia de la unión marcador oligonucleotídico-ADN única o una porción de esta.

En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico etiquetada se amplifica. En otro aspecto, la copia de la secuencia de ácido nucleico etiquetada se amplifica. La amplificación de la molécula de ácido nucleico etiquetada o la copia de la molécula de ácido nucleico etiquetada puede comprender un método basado en PCR. El método basado en PCR puede comprender qPCR. El método basado en PCR puede comprender RT-PCR. El método basado en PCR puede comprender PCR en emulsión. La amplificación del conjugado etiquetado con molécula de ácido nucleico puede comprender un método no basado en PCR. El método no basado en PCR puede comprender amplificación por desplazamiento múltiple. El método no basado en PCR puede comprender imprimación aleatoria mediante una polimerasa de desplazamiento de cadena.

En otro aspecto, la muestra es de al menos una célula simple. De manera alternativa, la muestra es de una pluralidad de células. La muestra puede ser de menos de alrededor de 100 células.

En algunos aspectos, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN. En otro aspecto, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ARN. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ARNm. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ARN no codificante. La molécula de ARN no codificante puede ser una molécula de ARN no codificante pequeña. La molécula de ARN no codificante puede ser una molécula de ARN no codificante larga. La molécula de ARN no codificante puede ser una molécula de microARN. En algunos aspectos, el marcador oligonucleotídico se acopla a la molécula de ácido nucleico mediante ligadura. En otro aspecto, el marcador oligonucleotídico se acopla a la molécula de ácido nucleico mediante hibridación.

En otro aspecto se trata de un método para contar o determinar una cantidad de moléculas de ADN en una muestra que comprende: (a) proporcionar una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos en donde un marcador oligonucleotídico comprende una secuencia identificadora exclusiva, una secuencia diana y una secuencia de cebador de PCR opcional; (b) combinar una muestra que comprende moléculas de ADN con la pluralidad de cebadores etiquetados para formar una molécula de ADN etiquetada, en donde la molécula de ADN etiquetada comprende una molécula de ADN y un marcador oligonucleotídico y cada molécula de ADN diana es capaz de acoplarse a un marcador oligonucleotídico diferente; y (c) detectar (i) la molécula de ADN, un complemento de la molécula de ADN, un complemento inverso de la molécula de ADN, o una porción de esta, y (ii) el marcador oligonucleotídico, un complemento del marcador oligonucleotídico, un complemento inverso del marcador oligonucleotídico o una porción de este para determinar el recuento o cantidad de moléculas de ADN etiquetadas diferentes y contar o determinar, de esta manera, una cantidad de moléculas de ADN en la muestra.

En otro aspecto se trata de un método para contar o determinar una cantidad de moléculas de ADN en una muestra que comprende: (a) proporcionar una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos en donde un marcador oligonucleotídico comprende una secuencia identificadora exclusiva, una secuencia diana y una secuencia de cebador de PCR opcional; (b) combinar una muestra que comprende moléculas de ADN con la pluralidad de cebadores etiquetados para formar una molécula de ADN etiquetada, en donde el acoplamiento de la molécula de ADN con el marcador oligonucleotídico forma una unión entre molécula-marcador única; y (c) detectar la unión de molécula-marcador única, un complemento de la unión de molécula-marcador única, un complemento inverso de la unión de molécula-marcador única, o una porción de esta para determinar el recuento o cantidad de moléculas de ADN etiquetadas diferentes y contar o determinar, de esta manera, una cantidad de moléculas de ADN en la muestra.

En otro aspecto se trata de un método para determinar una cantidad de copias de un ADN diana en una muestra que comprende: (a) proporcionar una pluralidad de adaptadores, en donde los adaptadores comprenden una secuencia identificadora exclusiva y cada adaptador es capaz de acoplarse a una pluralidad de moléculas de ADN diferentes; (b) fragmentar una muestra que comprende ADN genómico para producir una muestra que comprende fragmentos de ADN; (c) combinar una pluralidad de adaptadores con la muestra que comprende los fragmentos de ADN para formar un conjugado adaptador-fragmento de ADN, en donde sustancialmente todos los fragmentos de ADN están acoplados de manera aleatoria con un adaptador con una secuencia identificadora exclusiva; y (d) detectar el adaptador, un complemento del adaptador, un complemento inverso del adaptador o una porción de este para determinar la cantidad de conjugados de adaptador-fragmento de ADN diferentes y para determinar, de esta manera, la cantidad de copias de ADN diana.

En otro aspecto se trata de un método para determinar una cantidad de copias de una molécula de ADN diana en una muestra que comprende: (a) proporcionar una pluralidad de adaptadores, en donde los adaptadores comprenden una secuencia identificadora exclusiva y los adaptadores son capaces de acoplarse a una pluralidad de moléculas de ADN diferentes; (b) fragmentar una muestra que comprende ADN genómico para producir una muestra que comprende fragmentos de ADN; (c) acoplar los adaptadores con los fragmentos de ADN, en donde sustancialmente todos los fragmentos de ADN son capaces de estar acoplados de manera aleatoria con un adaptador con una secuencia identificadora exclusiva y el acoplamiento del adaptador al fragmento de ADN forma una unión adaptador-ADN única; y (d) detectar la unión adaptador-ADN única, un complemento de la unión adaptador-ADN única, un complemento inverso de la unión adaptador-ADN única o una porción de esta para determinar el recuento o la cantidad de uniones adaptador-ADN únicas y para determinar, de esta manera, una cantidad de copias de ADN diana.

En algunos aspectos, el adaptador comprende un ácido ribonucleico. En algunos aspectos, el ácido ribonucleico es uracilo. En algunos aspectos, el ácido ribonucleico es citosina. En algunos aspectos, el ácido ribonucleico es adenina. En algunos aspectos, el ácido ribonucleico es guanina.

En algunos aspectos, el método comprende, además, sintetizar una copia del conjugado adaptador-fragmento de ADN para reemplazar una secuencia de ácido ribonucleico en el adaptador con una secuencia de ácido desoxirribonucleico.

En algunos aspectos, la etapa de detección comprende detectar la copia de la unión adaptador-ADN única, un complemento de la copia de la unión adaptador-ADN única, un complemento inverso de la copia de la unión adaptador-ADN única o una porción de esta. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende detectar la copia del adaptador, un complemento de la copia del adaptador, un complemento inverso de la copia del adaptador o una porción de esta.

En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la hibridación de la unión adaptador-ADN única, un complemento de la unión adaptador-ADN única, un complemento inverso de la unión adaptador-ADN única o una porción de esta con un soporte sólido. En otro aspecto, la etapa de detección comprende la hibridación de la copia de la unión adaptador-ADN única, un complemento de la copia de la unión adaptador-ADN única, un complemento inverso de la copia de la unión adaptador-ADN única o una porción de esta con un soporte sólido.

En algunos aspectos, el soporte sólido comprende una matriz. En algunos aspectos, la matriz comprende sondas acopladas a la superficie. En algunos aspectos, la matriz comprende un rasgo de sonda para cada unión adaptador-ADN única. En algunos aspectos, la matriz comprende un rasgo de sonda para cada copia de la unión adaptador-ADN única. En otro aspecto, el soporte sólido comprende una perla. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la secuenciación de la unión adaptador-ADN única, un complemento de la unión adaptador-ADN única, un complemento inverso de la unión adaptador-ADN única o una porción de esta. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende secuenciar la copia de la unión adaptador-ADN única, un complemento de la copia de la unión adaptador-ADN única, un complemento inverso de la copia de la unión adaptador-ADN única o una porción de esta.

En algunos aspectos, la etapa de detección comprende secuenciar la copia del adaptador, un complemento de la copia del adaptador, un complemento inverso de la copia del adaptador o una porción de esta. En algunos aspectos, se amplifica el conjugado adaptador-fragmento de ADN.

En algunos aspectos se trata de un método para determinar la presencia o ausencia de anomalías genéticas que comprende: (a) proporcionar una pluralidad de marcadores oligonucleotídicos en donde un marcador oligonucleotídico comprende una secuencia identificadora exclusiva, una secuencia diana y una secuencia de cebador de PCR opcional; (b) combinar una muestra que comprende ADN genómico con la pluralidad de cebadores etiquetados para formar un conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, en donde cada ADN genómico es capaz de acoplarse a un marcador oligonucleotídico con una secuencia identificadora exclusiva; y (c) detectar el conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, un complemento del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, un complemento inverso del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, o una porción

de este para contar o determinar una cantidad de conjugados ADN genómico-marcador oligonucleotídico y determinar, de esta manera, la presencia o ausencia de anomalías genéticas.

5 En algunos aspectos, la etapa de detección comprende detectar el ADN genómico, un complemento del ADN genómico, un complemento inverso del ADN genómico o una porción de este. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende detectar el marcador oligonucleotídico, un complemento del marcador oligonucleotídico, un complemento inverso del marcador oligonucleotídico o una porción de este.

10 En algunos aspectos, la anomalía genética comprende una aneuploidía. La aneuploidía puede ser monosomía. La monosomía puede ser monosomía de cromosoma sexual. La aneuploidía puede ser trisomía. La trisomía puede ser trisomía 21. La trisomía puede ser trisomía 18. La trisomía puede ser trisomía 13. La aneuploidía puede ser tetrasomía. La aneuploidía puede ser pentasomía. En algunos aspectos, el método comprende, además, diagnosticar una anomalía genética. En algunos aspectos, el método puede comprender, además, diagnosticar el síndrome de Turner. En algunos aspectos, el método puede comprender, además, diagnosticar el síndrome de Edwards. En algunos aspectos, el método puede comprender, además, diagnosticar el síndrome de Patau. En algunos aspectos, la anomalía genética comprende una supresión en el ADN genómico. En algunos aspectos, la anomalía genética comprende un polimorfismo. En algunos aspectos, la anomalía genética comprende trastornos de un gen simple. En algunos aspectos, la anomalía genética comprende una translocación cromosómica.

20 En algunos aspectos, la muestra es de un embrión. En algunos aspectos, la muestra comprende al menos una célula del embrión.

25 En algunos aspectos, el método comprende, además, determinar un estado de implantación del embrión en función de la etapa de detección. En algunos aspectos, el ADN genómico se fragmenta antes del acoplamiento de los marcadores oligonucleotídicos.

30 En algunos aspectos, el ADN genómico se fragmenta mediante una enzima de restricción. En algunos aspectos, el ADN genómico se fragmenta mediante una enzima de restricción específica de alelo.

35 En algunos aspectos, el marcador oligonucleotídico comprende un ácido rinonucleico. En algunos aspectos, el ácido ribonucleico es uracilo. En algunos aspectos, el ácido ribonucleico es citosina. En algunos aspectos, el ácido ribonucleico es adenina. En algunos aspectos, el ácido ribonucleico es guanina. En algunos aspectos, el método comprende, además, sintetizar una copia del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico para reemplazar una secuencia de ácido ribonucleico en el marcador oligonucleotídico con una secuencia de ácido desoxirribonucleico.

40 En algunos aspectos, la etapa de detección comprende detectar la copia del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, un complemento de la copia del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, un complemento inverso de la copia del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico o una porción de esta.

45 En algunos aspectos, la copia del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico se sintetiza mediante una enzima transcriptasa inversa.

50 En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la hibridación del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, un complemento del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, un complemento inverso del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico o una porción de este con un soporte sólido. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la hibridación del ADN genómico, un complemento del ADN genómico, un complemento inverso del ADN genómico o una porción de este con un soporte sólido. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la hibridación del marcador oligonucleotídico, un complemento del marcador oligonucleotídico, un complemento inverso del marcador oligonucleotídico o una porción de este con un soporte sólido. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la hibridación de la copia del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, un complemento de la copia del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, un complemento inverso de la copia del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico o una porción de esta con un soporte sólido. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la hibridación de la copia del ADN genómico, un complemento de la copia del ADN genómico, un complemento inverso de la copia del ADN genómico o una porción de esta con un soporte sólido. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la hibridación de la copia del marcador oligonucleotídico, un complemento de la copia del marcador oligonucleotídico, un complemento inverso de la copia del marcador oligonucleotídico o una porción de esta con un soporte sólido.

65 En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la secuenciación del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, un complemento del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, un complemento inverso del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico o una porción de este. En algunos

aspectos, la etapa de detección comprende la secuenciación del ADN genómico, un complemento del ADN genómico, un complemento inverso del ADN genómico o una porción de este. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la secuenciación del marcador oligonucleotídico, un complemento del marcador oligonucleotídico, un complemento inverso del marcador oligonucleotídico o una porción de este. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la secuenciación de la copia del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, un complemento de la copia del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico, un complemento inverso de la copia del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico o una porción de esta. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la secuenciación de la copia del ADN genómico, un complemento de la copia del ADN genómico, un complemento inverso de la copia del ADN genómico o una porción de esta. En algunos aspectos, la etapa de detección comprende la secuenciación de la copia del marcador oligonucleotídico, un complemento de la copia del marcador oligonucleotídico, un complemento inverso de la copia del marcador oligonucleotídico o una porción de esta.

En algunos aspectos, se amplifica el conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico. En algunos aspectos, se amplifica la copia del conjugado ADN genómico-marcador oligonucleotídico.

En la presente memoria se describen, además, kits y composiciones para etiquetar de manera estocástica una molécula (p. ej., ácidos nucleicos tales como moléculas de ADN y ARN, o polipéptidos tales como proteínas y enzimas). En algunos casos, los kits y composiciones se utilizan para etiquetar de manera estocástica una molécula poliadenilada. La molécula poliadenilada puede ser una molécula de ARN poliadenilada. De manera alternativa, los kits y composiciones se utilizan para etiquetar de manera estocástica una molécula de ADN.

En algunos casos, los kits comprenden un cebador de etiqueta estocástica, cebador de PCR universal, cebador etiquetado con tinte, transcriptasa inversa, enzima UDG, polimerasa, tampones, dNTP, matriz, cebadores específicos de gen, cebadores específicos de diana, oligo testigo o cualquier combinación de estos. De manera alternativa, los kits comprenden a) un cebador de PCR universal; b) un cebador de PCR universal etiquetado con Cy3; c) un Cy3 TrueTag Grid; y d) una matriz. La matriz puede ser una matriz de 2x8. Los kits descritos en la presente memoria pueden comprender, además, un cebador de etiqueta estocástica, un vehículo, oligo testigo, transcriptasa inversa, enzima UDG, polimerasa, cebadores específicos de gen, cebadores específicos de diana, dNTP o cualquier combinación de estos.

El cebador de etiqueta estocástica puede comprender un cebador acoplado a un marcador oligonucleotídico, en donde el marcador oligonucleotídico comprende una secuencia oligo dT, una región identificadora exclusiva y un sitio de unión a cebador universal, y en donde el sitio de unión a cebador universal puede permitir el apareamiento del cebador de PCR universal del kit con el cebador de etiqueta estocástica. En algunos casos, un cebador oligo dT de etiqueta estocástica es un marcador oligonucleotídico acoplado a un cebador oligo dT.

El cebador etiquetado con tinte puede comprender un cebador etiquetado con un tinte. El cebador puede ser un cebador de PCR universal. De manera alternativa, el cebador es un cebador específico de diana. El tinte puede ser un tinte fluorescente. En algunos casos, el tinte es un tinte CyTM. En algunos casos, el tinte CyTM es un tinte Cy3.

Los kits y composiciones que se describen en la presente pueden comprender, además, una pluralidad de sondas. En algunos casos, la pluralidad de sondas se hibrida con la matriz. La pluralidad de sondas puede permitir la hibridación de la molécula etiquetada con la matriz. La pluralidad de sondas puede comprender una secuencia que es complementaria al oligo dT de etiqueta estocástica. De manera alternativa, o adicional, la pluralidad de sondas comprende una secuencia que es complementaria a la molécula.

Los kits y composiciones descritos en la presente memoria pueden comprender, además, uno o más reactivos para retirar las moléculas no etiquetadas, cebadores en exceso o marcadores oligonucleotídicos en exceso (o cebadores de etiqueta estocástica) de la muestra que comprende moléculas etiquetadas.

En algunos casos, los kits y composiciones comprenden una enzima transcriptasa inversa. La transcriptasa inversa puede ser transcriptasa inversa de MMLV.

Los kits y composiciones pueden comprender una enzima polimerasa. La polimerasa puede ser una polimerasa Taq. Por ejemplo, la polimerasa Taq es una polimerasa *Titatum* Taq.

En algunos casos, los kits y composiciones comprenden una enzima. La enzima puede ser una enzima ribonucleasa. Alternativamente, la enzima es UDG. En otros casos, la enzima es una enzima de restricción. La enzima puede ser una proteasa. En algunos casos, la enzima es una desoxinucleasa. Alternativamente, la enzima es una ligasa. Los kits y composiciones pueden comprender uno o más reactivos que pueden desactivar una enzima descrita en la presente memoria.

En algunos casos, el kit comprende, además, una sustancia vehículo. La sustancia vehículo puede aumentar la eficacia de una reacción (p. ej., amplificación, transcripción inversa, ligadura, hibridación). La sustancia vehículo puede ser una molécula de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ARN. La molécula de ARN puede ser un ARN poliadenilado o un ARN de fago. El ARN de fago puede ser un ARN de un fago MS2. De manera alternativa, la molécula de ácido nucleico es un plásmido.

El kit puede comprender, además, un soporte sólido. El soporte sólido puede ser una perla. La perla se puede hibridar con la molécula etiquetada. La perla puede permitir la detección de la molécula etiquetada. La perla puede ser una perla de estreptavidina o una perla etiquetada con biotina.

El kit puede comprender, además, un algoritmo para detectar y/o cuantificar la molécula etiquetada. De manera alternativa, o adicional, el kit comprende un programa informático para detectar y/o cuantificar la molécula etiquetada. En algunos casos, los kits comprenden, además, un termociclador. Los kits pueden comprender, además, uno o más componentes para secuenciar la molécula etiquetada. El uno o más componentes para secuenciación pueden comprender un secuenciador, uno o más cebadores para secuenciación, perlas para secuenciación o cualquier combinación de estos. El kit puede comprender, además, uno o más componentes para detectar y/o cuantificar la molécula etiquetada. El uno o más componentes para detectar y/o cuantificar la molécula etiquetada pueden comprender un detector de matriz, un lector de matriz, un detector de perla, una unidad de exploración, un fluorómetro o cualquiera de los instrumentos o componentes descritos en la presente memoria.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Protocolo de recuento absoluto

Parte 1. Transcripción inversa y etiquetado estocástico

En esta etapa, las etiquetas estocásticas se aparean con el ARN poliA. Para aumentar la eficacia general de la posterior reacción de transcripción inversa, también se agrega una gran cantidad de ARN a la muestra.

En algunos casos, se utilizan puntas con propiedades de unión a ácido nucleico reducidas cuando se pipetea concentraciones extremadamente bajas de ARN. Estas puntas especiales se pueden utilizar para pipetear la muestra de ARN en la mezcla maestra de apareamiento. Si se necesita una dilución del ARN, también se pueden utilizar tubos de unión reducida. Después de que se ha agregado el ARN a la mezcla maestra de apareamiento, se pueden utilizar tubos/puntas normales.

Hacer una mezcla maestra combinando los reactivos indicados a continuación:

Agua	7,8µl
ARN total de K562 (1µg/µl)	1µl
10mM de dNTP	1µl
Cebador dUTP específico de gen (10/µM)	0,4µl
Etiquetas estocásticas (10µM)*	0,4µl
Total	10,6µl

Agregar 2µl de la muestra de ARN que se analizará.

Mezclar bien mediante pipeteo y hacer girar brevemente.

Incubar a 65° durante 5 minutos (Programa 1) y luego colocar los tubos sobre hielo durante al menos 1 minuto.

En esta etapa, el ADNc bicatenario se crea para el gen específico de interés. Cada molécula de ADNc contendrá ahora un sitio de cebador para la etapa de PCR posterior. Combinar lo indicado a continuación para hacer una mezcla maestra para la transcripción inversa:

ES 2 904 816 T3

5X de tampón de primera cadena	4µl
0,1M de DTT	1µl
SuperRNaseIn (20U/µl)	1µl
MMLV RT	1µl
Polimerasa NEB Taq	0,4µl

El uso de MMLV RT y Polimerasa NEB Taq en lugar de Superscript III y Titanium Taq se puede utilizar de manera alternativa

5 Agregar 7,4µl de mezcla maestra a cada tubo y mezclar mediante pipeteo suave. Hacer girar brevemente.

Ejecutar el siguiente programa (Programa 2) en el termociclador:

10 37° durante 60 minutos
3 ciclos de:
94° durante 2 minutos
55° durante 2 minutos
68° durante 2 minutos
Luego 4° infinitamente

15 Después de la reacción de PCR, se debe digerir la muestra con Uracil ADN Glicosilasa (UDG) para evitar que el cebador no incorporado se amplifique en la PCR específica de gen.

20 A cada reacción, agregar 0,5µl de UDG. Mezclar muy bien por pipeteo. Transferir todo el líquido a un nuevo tubo de PCR para garantizar que no haya ningún residuo de muestra sin mezclar.

Incubar a 37° durante 30 minutos, luego a 4 °.

25 Parte 2. PCR específica de gen inicial

Combinar los reactivos indicados a continuación para hacer una mezcla maestra para la PCR:

Agua libre de nucleasa	10,9µl
10X de tampón NEB Taq	1,5µl
10mM de dNTP	0,3µl
Cebador específico de gene (1µM)	1µl
Cebador de PCR universal (1µM)*	1µl
Polimerasa NEB Taq	0,3µl
Total	15µl

30 La concentración final de 0,05µM de cebador aumenta la especificidad de los productos.

Agregar 5µl de producto etiquetado de la etapa anterior a un nuevo tubo de PCR. Agregar 15µl de mezcla maestra de PCR a cada muestra.

35 Mezclar bien mediante pipeteo y hacer girar brevemente.

Ejecutar el siguiente programa (Programa 4) en el termociclador:

40 94° durante 2 minutos
30 ciclos de:
94° durante 2 minutos
55° durante 2 minutos
68° durante 2 minutos
Luego 68° durante 4 minutos
4° infinitamente

45 Parte 3. Segunda PCR anidada

Preparar la mezcla maestra para la segunda PCR anidada en el área de prePCR.

ES 2 904 816 T3

Agua libre de nucleasa	39,5µl
10X de tampón NEB Taq	5µl
10mM de dNTP	1µl
Cebado anidado específico de gen (10µM)	1µl
Cebador de PCR universal etiquetado con 5Tye563 (10µM)*	1µl
Polimerasa NEB Taq	0,5µl
Total	48µl

Alícuota de 48µl de mezcla maestra a un nuevo tubo de PCR.

- 5 Agregar 2µl de la primera reacción de PCR al tubo en una habitación separada designada para el procesamiento posamplificación para evitar la contaminación del área prePCR. Llevar a cabo todas las etapas posteriores en esta área.

Mezclar bien mediante pipeteo y hacer girar brevemente.

- 10 Ejecutar el siguiente programa (Programa 4) en el termociclador:

94° durante 2 minutos
 30 ciclos de:
 94° durante 2 minutos
 15 55° durante 2 minutos
 68° durante 2 minutos
 Luego 68° durante 4 minutos
 4° infinitamente

- 20 Etapa opcional: Ejecutar 4ul de producto de PCR en un gradiente poliacrilamida 4-20% gel TBE para evaluar el tamaño y pureza

Parte 4. Hibridación de diana

- 25 Encender horno de hib a 37°.

Preparar las muestras para hibridación para un portaobjetos de matriz Applied Microarray Inc. Agregar lo que se indica a continuación en un tubo de PCR de 0,2mL:

Lavado A (6X SSPE+0,01 % Triton X-100)	55µl
Oligo testigo Cy3 (760pM)*	1µl
Producto de PCR	20µl
Total	76µl

- 30 Mezclar mediante pipeteo y hacer girar brevemente.

Incubar lo tubos a 95° para desnaturalizar y luego colocar sobre hielo.

- 35 Retirar el sello de adhesivo del portaobjetos de matriz AMI. Pipetear cada cóctel de hibridación en un pocillo del portaobjetos de matriz AMI. Tomar notas del orden en que se agregan las dianas. Cubrir el portaobjetos con una segunda tira de adhesivo (incluido).

Colocar el portaobjetos de matriz sellado en una cámara de humedad y ponerlo en el horno de hibridación. Incubar a 37° durante toda la noche.

- 40 Parte 5. Lavado de matriz y exploración

Después de la hibridación durante toda la noche, sacar el portaobjetos de matriz del horno de hibridación y retirar la cubierta de adhesivo. Retirar por pipeteo el cóctel de hibridación restante y almacenar a -20°, si se desea.

- 45 Dispensar 150µl de Lavado A en cada pocillo. Aspirar el líquido y dispensar 150µl de Lavado B (0,6X SSPE+0,01 % Triton X-100) en cada pocillo. Aspirar el líquido y llevar el portaobjetos de matriz a la unidad de exploración ya que las matrices se explorarán en seco.

Encender el instrumento Sensovation FLAIR. Esperar 10 minutos para que la máquina se caliente.

5 Abrir el programa informático y hacer clic en «Abrir bandeja». Colocar el portaobjetos de matriz en el soporte de 4 portaobjetos. Asegurarse de apoyar el portaobjetos de manera adecuada. En el programa informático, hacer clic en «Cerrar bandeja».

10 Hacer clic en el ícono de «Explorar». Aparece una ventana con información sobre la exploración que se llevará a cabo. Modificar el nombre de la exploración, si se desea, y seleccionar los pocillos adecuados que se explorarán al hacer clic en el ícono «...» en el campo «posiciones de exploración». Hacer clic en cada pocillo que se explorará. El programa informático marcará con un círculo cada pocillo seleccionado en amarillo. Hacer clic en «ok».

15 La ventana de vista general de la placa aparecerá mostrando el progreso de la exploración. Luego de explorar un pocillo, el color en la pantalla pasará de gris a verde si se ha detectado el patrón de referencia y se ha posicionada la rejilla. Si no se ha detectado el patrón de referencia, el pocillo se volverá rojo. Si ninguna de las exploraciones detecta la referencia, la rejilla se puede alinear manualmente al hacer clic en el botón de «reanalizar» en la parte superior de la pantalla. Esto exhibirá la rejilla, que se puede posicionar de manera adecuada. Hacer clic el botón verde de «aceptar análisis» en la parte superior de la pantalla.

20 Luego de que se hayan alineado todas las rejillas, se pueden exportar los datos. Para obtener la funcionalidad de Windows, presione la tecla «windows» en el teclado y la «D» de manera simultánea. Ubicar los resultados de la exploración en la carpeta «Mis documentos» en `ArrayReader/sensovation/arrayreader.scanresults`. Abrir la carpeta de exploración adecuada y copiar las imágenes TIFF y los archivos de resultado .csv en una unidad rápida o transferirlos a través de la red.

25 Proceder al análisis de datos ya sea manualmente o con un paquete de programa informático.

Ejemplo 2. Cuatro experimentos donde se agregaron 120 moléculas de ARN a una muestra de ARN total de fondo

30 Se agregaron 240 copias de un fragmento de ácido nucleico poliadenilado a una reacción de 10 µL que contenía 1X tampón de ADN polimerasa titanium Taq, 0,2 µM de dNTPs, 0,2 µM de una aglomeración de 960 etiquetas estocásticas oligo (dT), 0,2 µM de un cebador de ADNc de segunda cadena y 0,2 µL de ADN polimerasa Taq. En algunas reacciones, también se agregó una cantidad adicional de fragmentos de ADN poliadenilados con secuencias no relacionadas con las 240 copias de fragmento de ácido nucleico de prueba. En la reacción A, se
35 agregaron 1×10^{10} de moléculas de ADN poliadeniladas de fondo a la reacción. En la reacción B, se agregaron 1×10^9 de moléculas de ADN poliadeniladas de fondo a la reacción. En la reacción C, se agregaron 1×10^6 de moléculas de ADN poliadeniladas de fondo a la reacción. Y, en la reacción D, no se agregaron moléculas de ADN poliadeniladas de fondo a la reacción. Se sometieron a prueba 10 ng, 1ng o 1pg de ADN genómico humano fragmentado y poliadenilado de manera aleatoria. Después de 3 ciclos de incubación a 94 °C durante 2 min, 45 °C durante 2 min y
40 65 °C durante 5 min, se agrega 1 unidad de Uracil ADN glicosilasa y la reacción se incuba durante 30 min a 37 °C. A continuación, se agrega la mitad de la reacción a una reacción de PCR de 20 µL que consiste en 1X tampón Titanium, 0,2 µM de dNTP, 0,2 µM de cebador directo específico de gen, 0,2 µM de cebador inverso universal y 0,3 µL de polimerasa Titanium Taq. Las condiciones de PCR fueron 94°C durante 2 min, luego 30 ciclos de 94 °C durante 20 seg, 58 °C durante 20 seg y 68 °C durante 20 seg. Se llevó a cabo una incubación final a 68 °C durante
45 4 min. Se lleva a cabo una PCR anidada siguiendo las mismas condiciones que para el primera PCR, excepto por el uso de un cebador directo anidado. Se utilizaron 2µL de una dilución 1:25 de la PCR inicial como plantilla para la PCR anidada. Los productos de PCR se fragmentaron de manera aleatoria con desoxirribonucleasa, se etiquetaron con biotina con enzima transferasa terminal y luego se hibridaron con una matriz detectora durante 12 horas a 37 °C. Las señales de los ADN hibridados se detectaron a través de tinción con estreptavidina conjugada con ficoeritrina y se generaron imágenes mediante una unidad de exploración de micromatriz. La Figuras 2A-D muestran las señales de los ADN hibridados de las reacciones A-D, respectivamente. La cantidad de etiquetas presentes en el ADN
50 hibridado se cuenta y utiliza para determinar la cantidad de copias originales de fragmentos de ácido nucleico.

Reacción	n.º de etiquetas	n.º de copias originales
A	122	130
B	116	124
C	109	114
D	115	122

Ejemplo 3. Comparación con PCR digital

Se determinó la concentración de un ARN transcrito in vitro utilizando un instrumento bioanalizador Agilent.

Se mezclaron 0,5 µg del ARN con 2 µg de ARN total de línea celular K562 que se utilizó como vehículo. La mezcla de ARN en 3 µL se agregó a 1 µL de una disolución de dNTP 10 mM y 2 µL de una aglomeración 10 µM de 960 etiquetas oligo (dT) y 7 µL de agua. Esta mezcla se incubó a 65 °C durante 5 min y se enfrió inmediatamente sobre hielo. Se agregaron 4 µL de un tampón de reacción de primera cadena (250 mM de Tris-HCl (pH 8,3 a 25 °C), 375 mM KCl), 1 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de inhibidor de ribonucleasa (20 unidades) y 1 µL de transcriptasa inversa superscript II (200 unidades) y la reacción se incubó a 50 °C durante 60 min y luego a 70 °C durante 15 min. Se agregó 1 µL de ribonucleasa H (2 unidades) y la reacción se incubó a 37 °C durante 20 min. Se utilizó PCR digital para cuantificar la cantidad de copias de ADNc sintetizadas a partir del ARN transcrito in vitro. La muestra también se sometió a prueba mediante PCR con etiquetado estocástico. Se agregaron 90 copias del ADNc (según se determinó mediante PCR digital) a una reacción de 10 µL que contenía 1X de tampón de PCR titanium, 0,2 µM de dNTP y 0,2 µL de polimerasa titanium taq. La reacción se incubó durante 3 ciclos a 94 °C durante 2 min, 55 °C durante 2 min y 68 °C durante 2 min. Se agregó 1 unidad de uracil ADN glicosilasa y la reacción se incubó a 37 °C durante 30 min. La primera PCR y la anidada, la fragmentación, el etiquetado con biotina y la detección de la matriz se llevaron a cabo según se describió en el Ejemplo 2. La Figura 3 muestra las señales de las etiquetas en el ADN hibridado. La cantidad de etiquetas presentes en el ADN hibridado se cuenta y utiliza para determinar la cantidad de copias originales de fragmentos de ácido nucleico. Había 40 etiquetas presentes en el ADN hibridado y 41 copias se determinaron mediante etiquetado estocástico, en comparación con 43 copias que se determinaron mediante PCR digital. Estos resultados demuestran que el etiquetado estocástico es un método eficaz para determinar el recuento de una molécula y su precisión es comparable con la de la PCR digital.

Ejemplo 4. Rendimiento de RT aumentado con vehículos de reacción

Para evaluar la eficacia de los ARN vehículo en la mejora del rendimiento de la transcripción inversa y como medio para reducir las pérdidas de ARN y ADNc no específicos durante las reacciones, se sometieron a prueba copias de un ARN poliadenilado transcrito in vitro con etiquetado estocástico siguiendo el protocolo descrito en el ejemplo 2. Además, se agregaron ARN total aislado de células de mamífero, levadura o *E. coli*, ribonucleótido sintético poliadenilado corto, ARNt de levadura o ARN de fago MS2 a la mezcla de reacción. Cada reacción utilizó alrededor de entre 0,5 µg y 2 µg de ARN vehículo. La cantidad de moléculas de ARN transcritas de forma inversa en ADNc se determinó mediante la cantidad de etiquetas observadas detectadas en la matriz y, en cada caso, se pudo determinar con facilidad la eficacia de cada ARN vehículo. La Figuras 4A-D muestran las etiquetas observadas para las reacciones A-D, respectivamente.

Reacción	n.º de moléculas de entrada	ARN vehículo	Ribonucleasa H	n.º de etiquetas
A	188	ARN total de X	--	158
B	188	ARN de fago MS2	--	165
C	188	ARNt de levadura	--	1
D	188	--	Ribonucleasa H	154

Ejemplo 5. Comparación de MMLV y ribonucleasa H menos transcriptasa inversa de MMLV

El rendimiento de la transcriptasa inversa de MMLV natural se comparó con la versión mutante menos ribonucleasa H (Superscript III) de la enzima. Se agregaron 375 copias de un ARN poliadenilado transcrito in vitro a un vehículo de 1 µg de un ARN total de línea celular K562. Los ARN se agregaron a una reacción de 12,6 µL que contenía 1 µL de una disolución de dNTP 10 mM, 0,4 µL de un cebador de segunda cadena 10 µM, 0,4 µL de una agrupación de 960 etiquetas oligo(dT) 10µM. La reacción se incubó a 65 °C durante 5 min para desnaturalizar el ARN y luego se enfrió rápidamente sobre hielo. Se agregaron 4 µL de 5X de tampón de primera cadena, 1 µL de DTT 0,1M, 1 µL de inhibidor de ribonucleasa superase (20 unidades) y 0,4 µL de ADN polimerasa Taq (2 unidades). Además, en la reacción A, se agregó 1 µL (200 unidades) del mutante menos ribonucleasa H (Superscript III). Y, en la reacción B, se agregó 1 µL (200 unidades) de la transcriptasa inversa de MMLV natural. Las reacciones se incubaron a 42 °C durante 60 min, luego siguieron 3 ciclos de 94 °C durante 2 min, 55 °C durante 2 min y 68 °C durante 2 min. Se agregó 1 unidad de uracil ADN glicosilasa y la reacción se mezcló y se pasó a un nuevo tubo y se incubó a 37 °C durante 30 min. A continuación, se agregaron 5 µL de la reacción a una reacción de PCR de 20 µL que consistía en 1X tampón Titanium, 0,2 µM de dNTP, 0,2 uM de cebador directo específico de gen, 0,2 µM de cebador inverso universal y 0,3 µL de polimerasa Titanium Taq. Las condiciones de PCR fueron 94°C durante 2 min, luego 30 ciclos de 94 °C durante 20 seg, 58 °C durante 20 seg y 68 °C durante 20 seg. Se llevó a cabo una incubación final a 68 °C durante 4 min. Se lleva a cabo una PCR anidada siguiendo las mismas condiciones que para la primera PCR, excepto por el uso de un cebador directo anidado. Se utilizaron 2 µL de una dilución 1:25 de la PCR inicial como plantilla para la PCR anidada. Los productos de PCR se fragmentaron de manera aleatoria con desoxirribonucleasa, se etiquetaron con biotina con enzima transferasa terminal y luego se hibridaron con una matriz detectora durante 12 horas a 37 °C. Las señales de los ADN hibridados se detectaron a través de tinción con estreptavidina conjugada con ficoeritrina y se generaron imágenes mediante una unidad de exploración de

micromatriz. Las Figuras 5A-B muestran las etiquetas presentes en el ADN hibridado en las reacciones A y B, respectivamente. La cantidad de etiquetas presentes en el ADN hibridado se cuenta y utiliza para determinar la cantidad de copias originales de fragmentos de ácido nucleico.

Reacción	n.º de moléculas de ARN de entrada	Transcriptasa inversa	n.º de etiquetas
A	188	Superscript III	159
B	188	MMLV	124

Ejemplo 6. Comparación de polimerasas para la síntesis de segunda cadena

Se comparó el rendimiento de la polimerasa Taq con la polimerasa Titanium Taq. Se agregaron 1875 copias de un ARN poliadenilado transcrito in vitro a la reacción A. Se agregaron 188 copias de un ARN poliadenilado transcrito in vitro a la reacción B. Se agregaron 1875 copias de un ARN poliadenilado transcrito in vitro a la reacción C. Y, se agregaron 188 copias de un ARN poliadenilado transcrito in vitro a la reacción D. Se agregó 1 µg de ARN vehículo de una línea celular K562 a cada una de las mezclas de reacción. Los ARN se agregaron a una reacción de 12,6 µL que contenía 1 µL de una disolución de dNTP 10 mM, 0,4 µL de un cebador de segunda cadena 10 µM, 0,4 µL de una agrupación de 960 etiquetas oligo(dT) 10 µM. Las reacciones se incubaron a 65 °C durante 5 min para desnaturar el ARN y luego se enfriaron rápidamente sobre hielo. Se agregaron 4 µL de 5X de tampón de primera cadena, 1 µL de DTT 0,1M, 1 µL de inhibidor de ribonucleasa superase (20 unidades), transcriptasa inversa y 0,4 µL de ADN polimerasa Taq (2 unidades) a cada reacción. Las reacciones se incubaron a 42 °C durante 60 min, luego siguieron 3 ciclos de 94 °C durante 2 min, 55 °C durante 2 min y 68 °C durante 2 min. Se agregó 1 unidad de uracil ADN glicosilasa y la reacción se mezcló y se pasó a un nuevo tubo y se incubó a 37 °C durante 30 min. Se mezclaron 5 µL de las reacciones A y B con una reacción de PCR de 20 µL que consistía en 1X tampón Taq, 0,2 µM de dNTP, 0,2 uM de cebador directo específico de gen, 0,2 µM de cebador inverso universal y 0,3 µL de polimerasa Taq. Se mezclaron 5 µL de las reacciones C y D con una reacción de PCR de 20 µL que consistía en 1X tampón Titanium, 0,2 µM de dNTP, 0,2 uM de cebador directo específico de gen, 0,2 µM de cebador inverso universal y 0,3 µL de polimerasa Titanium Taq. Las condiciones de PCR fueron 94°C durante 2 min, luego 30 ciclos de 94 °C durante 20 seg, 58 °C durante 20 seg y 68 °C durante 20 seg. Se llevó a cabo una incubación final a 68 °C durante 4 min. Se lleva a cabo una PCR anidada siguiendo las mismas condiciones que para la primera PCR, excepto por el uso de un cebador directo anidado. Se utilizaron 2µL de una dilución 1:25 de la PCR inicial como plantilla para la PCR anidada. Los productos de PCR se fragmentaron de manera aleatoria con desoxirribonucleasa, se etiquetaron con biotina con enzima transferasa terminal y luego se hibridaron con una matriz detectora durante 12 horas a 37 °C. Las señales de los ADN hibridados se detectaron a través de tinción con estreptavidina conjugada con ficoeritrina y se generaron imágenes mediante una unidad de exploración de micromatriz. Las Figuras 6A-D muestran las etiquetas presentes en el ADN hibridado en las reacciones A-D, respectivamente. La cantidad de etiquetas presentes en el ADN hibridado se cuenta y utiliza para determinar la cantidad de copias originales de fragmentos de ácido nucleico.

Reacción	n.º de moléculas de ARN de entrada	Polimerasa	n.º de etiquetas
A	1875	Taq	--
B	188	Taq	157
C	1875	Titanium Taq	--
D	188	Titanium Taq	129

Ejemplo 7. Cuantificación absoluta de ARNm al contar moléculas de ADN individuales

Las moléculas de ARNm se pueden cuantificar mediante la adición de etiquetas antes de la amplificación de las moléculas de ADNc (Figura 19). Se forman moléculas de ADNc etiquetadas mediante síntesis de ADNc de una molécula de ARNm mediante la adición de un cebador desoxi-oligonucleótido con (1) una secuencia oligo dT para aparearse con la cola de ARN de poli-A; (2) una colección de marcadores de etiqueta de secuencia predeterminada o aleatoria; y (3) una secuencia de cebador de PCR común o universal. Las moléculas de ADNc etiquetadas se amplificaron utilizando cebadores específicos de gen y un cebador de PCR común o universal. Después de la amplificación, se puede detectar fácilmente la cantidad de diferentes composiciones de secuencia mediante hibridación, secuenciación u otros métodos de detección. La difícil tarea de contar la cantidad de moléculas de ARNm individuales en disolución se transforma en la tarea simple de determinar la cantidad de tipos de etiquetas diferentes, donde cada una está presente a concentraciones elevadas después de la amplificación, siempre que la diversidad de secuencia de etiqueta inicial sea suficientemente mayor que la cantidad de moléculas presentes. Cualquier otro método adecuado también se puede utilizar para incorporar etiquetas en moléculas de ARN o ADNc antes o durante la amplificación. Cualquier otro método de PCR o distinto de PCR también se puede utilizar para amplificar las moléculas de ARN o ADNc. Aunque es útil en estos ejemplos, la

amplificación de las moléculas etiquetadas puede no requerir detección.

Ejemplo 8. Micromatriz digital para la expresión de ARN

El ARNm se transcribe de forma inversa utilizando una aglomeración de cebadores de etiqueta de n oligo-dT (también se pueden utilizar cebadores aleatorios con etiquetas) (Figura 20). El ADNc se puede amplificar opcionalmente con métodos tales como amplificación por PCR y T7. Las etiquetas se amplifican junto con cada molécula de ADNc. Los ADNc se hibridan con matrices digitales para determinar la cantidad de etiquetas distintas para cada gen de interés. La hibridación requiere la presencia de la secuencia de gen, con mayor probabilidad, un segmento en el exón en 3' del gen y una de las secuencias de etiqueta. Una matriz con 7 millones de rasgos es suficiente para detectar una colección de 350 etiquetas aplicadas a una muestra con 20 000 secuencias de ARNm diferentes para determinar la cantidad de copias de cada ARNm presente en la muestra. Un subconjunto de los 350 cebadores de etiqueta se puede aplicar a una concentración más baja para aumentar el intervalo dinámico eficaz de la medición. Este método es específicamente ventajoso para muestrear cantidades limitadas de material de partida, tales como en células simples.

Ejemplo 9. Micromatriz digital para la cantidad de copias de ADN

El ADN genómico se digiere en pequeños fragmentos en una o más reacciones utilizando una o más enzimas de restricción. Los adaptadores con secuencias de etiqueta se ligan a los fragmentos de ADN (Figura 21). Los fragmentos ligados se amplifican opcionalmente. Los fragmentos ligados se pueden digerir opcionalmente con una o más enzimas de restricción antes de la amplificación para evitar la replicación de determinados fragmentos, que es útil en la amplificación selectiva de fragmentos de interés solo. La hibridación con matrices digitales detecta la cantidad etiquetas distintas ligadas a cada fragmento restringido. Con el uso de 350 secuencias de etiqueta, una matriz de 7 millones de rasgos puede someter a prueba 20 000 fragmentos en el genoma, que representa intervalos promedio de 150kb en humanos. Además, algunos fragmentos específicos de alelo se pueden someter a ensayo al elegir enzimas de restricción (p. ej., cortadores de 4 bases) para un alelo de interés.

Ejemplo 10. Micromatriz digital para microARN

Se acoplan etiquetas a los extremos 3' y 5' de microARN mediante ligadura u otros medios (Figura 22). El complejo etiqueta-microARN se transcribe de forma inversa para generar etiqueta-productos de ADN. Los etiqueta-productos de ADN se amplifican opcionalmente. Los etiqueta-productos de ADN se hibridan en una matriz digital para detectar la cantidad de etiquetas por microARN. miRBase 18 (<http://www.mirbase.org/>) se lanzó en noviembre de 2011 y comprende 1921 miARN humanos maduros únicos. Una matriz de 2 millones de rasgos puede detectar de manera adecuada 1000 etiquetas ligadas a los 1921 miARN.

Ejemplo 11. Micromatriz digital para el diagnóstico genético con preimplantación de célula simple (PGD)

El principal desafío de los ensayos de amplificación de ADN genómico de célula simple se relaciona con la pérdida de alelos y el sesgo de replicación. Según se muestra en el análisis de modelado de cómputos en la Figura 43 donde cada molécula tiene una probabilidad de replicación de 0,8, las moléculas de relaciones de copia iniciales 1:1 se pueden distorsionar fácilmente hasta 1:10 o más apenas después de unos pocos ciclos de replicación.

Sin embargo, cuando las etiquetas se aplican primero antes de la amplificación, el recuento de etiquetas para determinar la cantidad de copias no se ve afectado por el sesgo de replicación, siempre que se produzca la replicación. Aunque, esto no resuelve el problema de las pérdidas de alelos, la determinación de la aneuploidía y grandes regiones de supresión o amplificación se pueden determinar de manera fácil y precisa. Esto es particularmente útil para aplicaciones PGD.

Ejemplo 12. Micromatriz digital para medir la aneuploidía fetal en ácidos nucleicos en circulación maternos

Se puede utilizar la micromatriz digital para medir la aneuploidía fetal en ácidos nucleicos en circulación maternos. Se proporciona una muestra que comprende ácidos nucleicos en circulación maternos. El ADN se fragmenta utilizando un cortador de 4 bases. Las etiquetas se acoplan al ADN fragmentado. Se procede a PCR circular y múltiple para amplificar 40 marcadores del cromosoma 21 y 10 marcadores cromosómicos testigo. Detectar la etiqueta-productos de ADN amplificados en la matriz de 5 millones de rasgos. La cantidad de copias del cromosoma 21 se puede utilizar para determinar la aparición de aneuploidía fetal (Figura 24).

Ejemplo 13. Cuantificación absoluta de ARNm al contar moléculas de ADN individuales

Las moléculas de ARNm se pueden cuantificar mediante la incorporación de etiquetas durante la síntesis de ADNc de primera cadena (Figura 25). Se forman moléculas de ADNc etiquetadas mediante síntesis de ADNc de una molécula de ARNm mediante la adición de un cebador desoxi-oligonucleótido con (1) una secuencia oligo dT para aparearse con la cola de ARN de poli-A; (2) una colección de marcadores de etiqueta de secuencia

predeterminada o aleatoria; y (3) una secuencia de cebador de PCR común o universal. Después de la síntesis del ADNc de primera cadena, se puede detectar fácilmente la cantidad de etiquetas de diferente composición de secuencia mediante hibridación, secuenciación u otros métodos de detección. La difícil tarea de contar la cantidad de moléculas de ARNm individuales en disolución se transforma en la tarea simple de determinar la cantidad de tipos de etiquetas diferentes, donde cada una está presente a concentraciones elevadas después de la amplificación, siempre que la diversidad de secuencia de etiqueta inicial sea suficientemente mayor que la cantidad de moléculas presentes. Cualquier otro método adecuado también se puede utilizar para incorporar etiquetas en moléculas de ARN o ADNc antes o durante la síntesis de ADNc de primera cadena.

Ejemplo 14: Experimento de titulación con diluciones en serie de ARN kanamicina

Se generó una curva de titulación al llevar a cabo diluciones en serie de ARN kanamicina para ilustrar el intervalo dinámico amplio del protocolo de recuento absoluto. Cada una de las 9 diluciones en serie se normalizó hasta una concentración de 0,25 fg/μl de 2,5 pg/μl, 1,25 pg/μl, 0,25 pg/μl, 0,125 pg/μl, 0,025 pg/μl, 12,5 fg/μl, 2,5 fg/μl, 1,25 fg/μl y 0,25 fg/μl. Todas las diluciones se hicieron utilizando una disolución de dilución de 1 ng/μl de ARN total de E. Coli en tubos preenjuagados con una disolución de 10 ng/μl de ARN de levadura para impedir la adhesión del ARN de muestra a las paredes del tubo. Las muestras se agregaron a una reacción de 12,6 μl que contenía 1 μg de ARN total de E. Coli, 1 μl de una disolución de dNTP 10 mM, 0,4 μl de un cebador dU específico para kanamicina 10 uM dU y 0,4 μl de una agrupación de 960 etiquetas dT oligo 10 μM. La reacción se incubó a 65 °C durante 5 min para desnaturalizar el ARN y luego se enfrió rápidamente sobre hielo. Se agregaron 4 μL de 5X de tampón de primera cadena, 1 μL de DTT 0,1M, 1 μL de inhibidor de ribonucleasa superase (20 unidades), 1 μL (200 unidades) de transcriptasa inversa de MMLV natural y 0,4 μL de ADN polimerasa Taq (2 unidades). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 60 min, luego siguieron 3 ciclos de 94 °C durante 2 min, 55 °C durante 2 min y 72 °C durante 2 min. Se agregó 1 unidad de uracil ADN glicosilasa y la reacción se mezcló y se pasó a un nuevo tubo y se incubó a 37 °C durante 30 min. A continuación, se agregaron 5 μL de la reacción a una reacción de PCR de 20 μL que consistía en 1X tampón Taq Reaction, 0,2 μM de dNTP, 0,05 uM de cebador directo específico de gen, 0,05 μM de cebador inverso universal y 0,3 μL de polimerasa Taq. Las condiciones de PCR fueron 94°C durante 2 min, luego 30 ciclos de 94 °C durante 20 seg, 58 °C durante 20 seg y 72 °C durante 20 seg. Se llevó a cabo una incubación final a 72 °C durante 4 min. Se llevó a cabo una PCR anidada utilizando un cebador directo anidado y el cebador inverso universal con una etiqueta Cy3 acoplada. Se utilizaron 0,5μL de la PCR inicial como plantilla para la PCR anidada. Las condiciones de PCR fueron las mismas que para la primera PCR excepto que la etapa a 58 °C se llevó a cabo a 55 °C. Las muestras se hibridaron con una matriz detectora a 37 °C durante toda la noche y se exploraron el día siguiente utilizando un lector de fluorescencia para detectar qué posiciones en la matriz contenían la etiqueta Cy3. La cantidad de puntos positivos se utilizó para determinar la concentración inicial de la muestra. La Figura 35 muestra el esquema de dilución. Las Figuras 36A-H muestran los diagramas de dispersión de los resultados y la Tabla 1 muestra los resultados. La Figura 37 muestra el gráfico de correlación.

Tabla 1

Figura	Concentración inicial	Factor de dilución	Recuento esperado	Recuento real
36A	2,5 pg/μL	10000	130	199
36B	1,25 pg/μL	5000	130	178
36C	0,25 pg/μL	1000	130	170
36D	0,125 pg/μL	500	130	153
36E	1,025 pg/μL	50	130	154
36F	12,5 fg/μL	10	130	117
36G	2,5 fg/μL	5	130	95
36H	1,25 fg/μL	1	130	137

Ejemplo 15: Experimento de titulación con diluciones en serie de ARN de hígado humano para medir la expresión de GAPDH.

Se generó una curva de titulación al llevar a cabo diluciones en serie de ARN total de hígado humano para ilustrar la capacidad del protocolo de etiquetado estocástico para detectar los niveles de expresión génica. Cada una de las 8 diluciones en serie se normalizó hasta una concentración de 1,25 pg/μl de 5000 pg/μl, 1250 pg/μl, 500 pg/μl, 125 pg/μl, 50 pg/μl, 12,5 pg/μl, 5 pg/μl y 1,25 pg/μl. Todas las diluciones se hicieron utilizando una disolución de dilución de 1 ng/μl de ARN total de E. Coli en tubos preenjuagados con una disolución de 10 ng/μl de ARN de levadura para impedir la adhesión del ARN de muestra a las paredes del tubo. Las muestras se agregaron a una reacción de 12,6 μl que contenía 1 μg de ARN total de E. Coli, 1 μl de una disolución de dNTP 10 mM, 0,4 μl de un cebador dU específico para GAPDH 10 uM dU y 0,4 μl de una agrupación de 960 etiquetas dT oligo 10 μM. La

reacción se incubó a 65 °C durante 5 min para desnaturalizar el ARN y luego se enfrió rápidamente sobre hielo. Se agregaron 4 µL de 5X de tampón de primera cadena, 1 µL de DTT 0,1M, 1 µL de inhibidor de ribonucleasa superase (20 unidades), 1 µL (200 unidades) de transcriptasa inversa de MMLV natural y 0,4 µL de ADN polimerasa Taq (2 unidades). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 60 min, luego siguieron 3 ciclos de 94 °C durante 2 min, 55 °C durante 2 min y 72 °C durante 2 min. Se agregó 1 unidad de uracil ADN glicosilasa y la reacción se mezcló y se pasó a un nuevo tubo y se incubó a 37 °C durante 30 min. A continuación, se agregaron 5 µL de la reacción a una reacción de PCR de 20 µL que consistía en 1X tampón Taq Reaction, 0,2 µM de dNTP, 0,05 uM de cebador directo específico de gen, 0,05 µM de cebador inverso universal y 0,3 µL de polimerasa Taq. Las condiciones de PCR fueron 94°C durante 2 min, luego 30 ciclos de 94 °C durante 20 seg, 58 °C durante 20 seg y 72 °C durante 20 seg. Se llevó a cabo una incubación final a 72 °C durante 4 min. Se llevó a cabo una PCR anidada utilizando un cebador directo anidado y el cebador inverso universal con una etiqueta Cy3 acoplada. Se utilizaron 0,5 µL de la PCR inicial como plantilla para la PCR anidada. Las condiciones de PCR fueron las mismas que para la primera PCR excepto que la etapa a 58 °C se llevó a cabo a 55 °C. Las muestras se hibridaron con una matriz detectora a 37 °C durante toda la noche y se exploraron el día siguiente utilizando un lector de fluorescencia para detectar qué posiciones en la matriz contenían la etiqueta Cy3. La cantidad de puntos positivos se utilizó para determinar la concentración inicial de la muestra. La Figura 38 muestra el esquema de dilución. La Figura 39 muestra los diagramas de dispersión de los resultados y la Tabla 2 muestra los resultados. La Figura 40 muestra el gráfico de correlación.

Tabla 2.

Figura	Concentración inicial	Factor de dilución	Recuento real
39 ^a	5000 pg/µL	4000	73
39B	1250 pg/µL	1000	63
39C	500 pg/µL	400	69
39D	125 pg/µL	100	46
39E	50 pg/µL	40	65
39F	12,5 pg/µL	10	38
39G	5 pg/µL	4	53
39H	1,25 pg/µL	1	37

Ejemplo 16: Mediciones de genes bacterianos testigo

El protocolo se validó utilizando ARN testigo bacterianos Poli A (Lys, Thr, Dap y Phe), así como ARN del gen de resistencia a la kanamicina. Se utilizaron 4 diluciones diferentes de cada testigo para validar la precisión de los recuentos. Las muestras se agregaron a una reacción de 12,6 µl que contenía 1 µg de ARN total de E. Coli, 1 µl de una disolución de dNTP 10 mM, 0,4 µl de un cebador dU específico para gen 10 uM dU y 0,4 µl de una agrupación de 960 etiquetas dT oligo 10 µM. La reacción se incubó a 65 °C durante 5 min para desnaturalizar el ARN y luego se enfrió rápidamente sobre hielo. Se agregaron 4 µL de 5X de tampón de primera cadena, 1µL de DTT 0,1 M, 1 µL de inhibidor de ribonucleasa superase (20 unidades), 1 µL (200 unidades) de transcriptasa inversa de MMLV natural y 0,4 µL de ADN polimerasa Taq (2 unidades). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 60 min, luego siguieron 3 ciclos de 94 °C durante 2 min, 55 °C durante 2 min y 72 °C durante 2 min. Se agregó 1 unidad de uracil ADN glicosilasa y la reacción se mezcló y se pasó a un nuevo tubo y se incubó a 37 °C durante 30 min. A continuación, se agregaron 5 µL de la reacción a una reacción de PCR de 20 µL que consistía en 1X tampón Taq Reaction, 0,2 µM de dNTP, 0,05 uM de cebador directo específico de gen, 0,05 µM de cebador inverso universal y 0,3 µL de polimerasa Taq. Las condiciones de PCR fueron 94°C durante 2 min, luego 30 ciclos de 94 °C durante 20 seg, 58 °C durante 20 seg y 72 °C durante 20 seg. Se llevó a cabo una incubación final a 72 °C durante 4 min. Se llevó a cabo una PCR anidada utilizando un cebador directo anidado y el cebador inverso universal con una etiqueta Cy3 acoplada. Se utilizaron 0,5 µL de la PCR inicial como plantilla para la PCR anidada. Las condiciones de PCR fueron las mismas que para la primera PCR excepto que la etapa a 58 °C se llevó a cabo a 55 °C. Las muestras se hibridaron con una matriz detectora a 37 °C durante toda la noche y se exploraron el día siguiente utilizando un lector de fluorescencia para detectar qué posiciones en la matriz contenían la etiqueta Cy3. La cantidad de puntos positivos se utilizó para determinar la concentración inicial de la muestra. La Figura 41 muestra los diagramas de difracción de los resultados de las diluciones de la concentración más baja y la Tabla 3 muestra una tabla de resumen de los resultados.

Tabla 3.

La Figuras	Gen	Copias en la reacción (fabricante)	Copias medidas (CR)	Copias medidas (PCR digital)
41A	Lys (<i>B. subtilis</i>)	190	195	
41B	Dap (<i>B. subtilis</i>)	137	119	
41C	Phe (<i>B. subtilis</i>)	162	116	
41D	Thr (<i>B. subtilis</i>)	189	108	
42	Gen de resistencia a Kanamicina (plásmido)	750	608	520

Ejemplo 17: Comparación de la cuantificación del ARN de kanamicina mediante etiquetado estocástico y PCR digital

Los recuentos de ARN de kanamicina generados mediante etiquetado estocástico se compararon con los recuentos obtenidos a partir de PCR digital como otro ejemplo de validación. Se agregaron 5 µg de ARN de kanamicina a una reacción de 13 µg que contenía 2 µg de ARN total de *E. Coli*, 1 µl de una disolución de dNTP 10 mM y 2 µl de una disolución de 960 etiquetas dT oligo 10 uM. La muestra se calentó hasta alcanzar 65 °C durante 5 minutos, luego se enfrió sobre hielo. Se agregaron 4 µL de 5X de tampón de primera cadena, 1 µL de un DTT 0,1M, 1µL de inhibidor de ribonucleasa superase (20 unidades), 1 µL (200 unidades) de transcriptasa inversa Superscript III a la reacción. La muestra se incubó a 50 °C durante 60 minutos, luego se calentó hasta alcanzar 70 °C durante 15 minutos, luego se enfrió hasta alcanzar 4 °C. Se agregaron 2 unidades de ribonucleasa H y la muestra se incubó a 37 °C durante 20 minutos. Se agregaron 29 µl de TE después de la incubación final. Se llevó a cabo una dilución en serie 50 millones de veces y se utilizó 1 ul en setenta y cinco reacciones de PCR digital de 15 ul. Cada una de estas reacciones contenía 7,5 µl de un 2X SYBR a mezcla maestra de PCR, 0,13 µl de un cebador directo para kanamicina 10 uM y 0,13 µl de un cebador inverso para kanamicina 10 uM. Las condiciones de PCR incluyeron una incubación inicial a 95°C durante 30 segundos, luego 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 58 °C durante 60 segundos. A continuación de la PCR procedió un programa de curva de fusión a los efectos de validar los resultados. La Figura 42 muestra los diagramas de dispersión de los resultados y la Tabla 3 muestra el resumen de los recuentos para kanamicina. La Figuras 42 muestra los resultados de dPCR de 0,0002 pg de ARN de Kanamicina utilizando los reactivos de qPCR SYBR verde. Según se muestra en la Figura 42, se observaron 50 pocillos positivos en 75 reacciones, n=104 moléculas presentes en 0,0002pg (520 moléculas presentes en 0,001pg).

Ejemplo 18: Mediciones de expresión génica en ARN hepático

Los valores de expresión génica de las dianas de abundancia variable se midieron utilizando etiquetado estocástico. En función de los supuestos anteriores de la abundancia de transcritos, se utilizaron diferentes concentraciones de ARN total de hígado humano para evaluar cada uno de 9 genes; GAPDH, B2M, RPL19, SDHA, GUSB, TUBB, ABCF1, G6PD y TBP. Las cantidades de ARN en cada reacción se diseñaron para dirigirse al intervalo de recuento ideal de 1-300 moléculas y fueron 0,625 pg, 1,25 pg, 1,25 pg, 125 pg, 12,5 pg, 12,5 pg, 2500 pg, 650 pg y 650 pg, respectivamente. Las muestras se agregaron a una reacción de 12,6 µl que contenía 1 µg de ARN total de *E. Coli*, 1 µl de una disolución de dNTP 10 mM, 0,4 µl de un cebador dU específico para gen 10 uM dU y 0,4 µl de una agrupación de 960 etiquetas dT oligo 10 µM. La reacción se incubó a 65 °C durante 5 min para desnaturalizar el ARN y luego se enfrió rápidamente sobre hielo. Se agregaron 4 µL de 5X de tampón de primera cadena, 1µL de 0,1 µL de DTT 0,1M, 1 µL de inhibidor de ribonucleasa superase (20 unidades), 1 µL (200 unidades) de transcriptasa inversa de MMLV natural y 0,4 µL de ADN polimerasa Taq (2 unidades). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 60 min, luego siguieron 3 ciclos de 94 °C durante 2 min, 55 °C durante 2 min y 72 °C durante 2 min. Se agregó 1 unidad de uracil ADN glicosilasa y la reacción se mezcló y se pasó a un nuevo tubo y se incubó a 37 °C durante 30 min. A continuación, se agregaron 5 µL de la reacción a una reacción de PCR de 20 µL que consistía en 1X tampón Taq Reaction, 0,2 µM de dNTP, 0,05 uM de cebador directo específico de gen, 0,05 µM de cebador inverso universal y 0,3 µL de polimerasa Taq. Las condiciones de PCR fueron 94°C durante 2 min, luego 30 ciclos de 94 °C durante 20 seg, 58 °C durante 20 seg y 72 °C durante 20 seg. Se llevó a cabo una incubación final a 72 °C durante 4 min. Se llevó a cabo una PCR anidada utilizando un cebador directo anidado y el cebador inverso universal con una etiqueta Cy3 acoplada. Se utilizaron 0,5 µL de la PCR inicial como plantilla para la PCR anidada. Las condiciones de PCR fueron las mismas que para la primera PCR excepto que la etapa a 58 °C se llevó a cabo a 55 °C. Las muestras se hibridaron con una matriz detectora a 37 °C durante toda la noche y se exploraron el día siguiente utilizando un lector de fluorescencia para detectar qué posiciones en la matriz contenían la etiqueta Cy3. La cantidad de puntos positivos se utilizó para determinar la concentración inicial de la muestra. La Tabla 4 muestra un resumen de los recuentos para los 9 genes.

Tabla 4.

ADN de hígado	Gen	Copias medidas mediante CR
10 picogramos (~ 1 célula)	B2M	304
	RPL19	200
	GAPDH	376
10 picogramos (~ 1 célula)	SDHA	82
	GUSB	19
	TUBB	34
100 picogramos (~ 10 células)	GP6D	30
	ABCF1	3
	TBP	15

Ejemplo 19: Cuantificación absoluta de moléculas de ARNm directamente a partir de lisados celulares.

5 Este ejemplo describe un método para generar recuentos de transcritos directamente a partir de lisados celulares. Un intervalo de 40-100 células de la línea celular Ramos (RA1) lavadas en PBS se colocó en un tubo de PCR con los siguientes reactivos: 1µl Triton X-100 5 %, 1µg de ARN total de E. Coli, 1µl de una disolución de dNTP 10mM, 0,4µl de un cebador dU específico de gen y 0,4µl de una aglomeración de 960 Oligos dT 10uM. Las muestras se calentaron hasta alcanzar 70 °C durante 10 minutos y se enfriaron sobre hielo para lisar las células y permitir que los cebadores se apareen. Se agregaron 4 µL de 5X de tampón de primera cadena, 1µL de un DTT 0,1M, 1 µL de inhibidor de ribonucleasa superase (20 unidades), 1 µL (200 unidades) de transcriptasa inversa de MMLV natural y 0,4 µL de ADN polimerasa Taq (2 unidades). Las muestras testigo también se llevaron a cabo con la misma cantidad de células sin la transcriptasa inversa. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 60 min, luego siguieron 3 ciclos de 94 °C durante 2 min, 55 °C durante 2 min y 72 °C durante 2 min. Se agregó 1 unidad de uracil ADN glicosilasa y la reacción se mezcló y se pasó a un nuevo tubo y se incubó a 37 °C durante 30 min. A continuación, se agregaron 5 µL de la reacción a una reacción de PCR de 20 µL que consistía en 1X tampón Taq Reaction, 0,2 µM de dNTP, 0,05 uM de cebador directo específico de gen, 0,05 µM de cebador inverso universal y 0,3 µL de polimerasa Taq. Las condiciones de PCR fueron 94°C durante 2 min, luego 30 ciclos de 94 °C durante 20 seg, 58 °C durante 20 seg y 72 °C durante 20 seg. Se llevó a cabo una incubación final a 72 °C durante 4 min. Se llevó a cabo una PCR anidada utilizando un cebador directo anidado y el cebador inverso universal con una etiqueta Cy3 acoplada. Se utilizaron 0,5µL de la PCR inicial como plantilla para la PCR anidada. Las condiciones de PCR fueron las mismas que para la primera PCR excepto que la etapa a 58 °C se llevó a cabo a 55 °C. Las muestras se hibridaron con una matriz detectora a 37 °C durante toda la noche y se exploraron el día siguiente utilizando un lector de fluorescencia para detectar qué posiciones en la matriz contenían la etiqueta Cy3. La cantidad de puntos positivos se utilizó para determinar la concentración del transcrito RPL19 en las células. La Figura 43 muestra un diagrama que resume la adaptación del protocolo de etiquetado estocástico directamente a las células.

Ejemplo 20. Optimización de la síntesis de ADNc.

30 Se llevaron a cabo tres síntesis de ADNc. La composición de las tres reacciones se describe a continuación.

Reacción 1: Est. = ARN testigo + 10 nM dT24 + Transcriptasa Inversa

Reacción 2: Chum = ARN testigo +10 ng ARN vehículo poli A + 10 nM dT24 + Transcriptasa inversa

35 Reacción 3: Perla = ARN testigo + 1 x 10⁶ perlas dT40 + Transcriptasa inversa

Las reacciones se incubaron durante 1 hora a 42 °C, luego de diluyeron con la cantidad indicada de copias de ARN de entrada durante 35 ciclos de PCR. Los productos de PCR de cada reacción se muestran en la Figura 32. Según se muestra en la Figura 32A, la conversión del ARN en ADNc es mayor en las perlas que en la disolución.

40 Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de capacidad de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> CELLULAR RESEARCH, INC.

<120> COMPOSICIONES Y KITS PARA RECuento MOLECULAR

<140> EP 13755319.4
 <141> 2013-02-27
 5 <150> PCT/US2013/028103
 <151> 2013-02-27
 <150> 61/745,385
 <151> 2012-12-21
 10 <150> 61/603,921
 <151> 2012-02-27
 <160> 61
 15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 20 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 1
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 21
 30 <210> 2
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)..(24)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro
 45 <400> 2
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnntttttt tttttttt tttt 45
 <210> 3
 <211> 50
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> fuente
 55 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
 <400> 3
 cgactacgac gactacgca catcgactac gaatgatacg actagcggat 50
 60 <210> 4
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>

<221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

5 <400> 4
 gatgcatcat gtggtg 17

10 <210> 5
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 5
 cgactacgac gactacg 17

20 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 6
 atgatacgac tagcgat 18

35 <210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

40 <400> 7
 cgactacgac gactacgca catcgactac gagtcggt 38

45 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 8
 aatgctatga tacgactagc ggat 24

55 <210> 9
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

65 <400> 9
 cgactacgac gactacgca catcgactac gagtcggtaa tgctatgata cgactagcgg 60

at 62

5 <210> 10
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <400> 10
agcattaccg ac 12

20 <210> 11
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 11
atccgctagt cgtatcatatcgac 24

35 <210> 12
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

45 <400> 12
cgactacgac gactacgcga catcgactac gagtcggtat gatacgacta gcggat 56

50 <210> 13
<211> 24
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

60 <400> 13
auccgcuagu cgaucauac cgac 24

65 <210> 14
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<220>
<221> base_modificada
<222> (18)..(29)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 14

cgactacgac gactacgnnn nnnnnnnnna tgatacgact agcggat 47

5 <210> 15
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <220>
<221> base_modificada
<222> (25)..(30)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

20 <400> 15
cgactacgac gactacgtac ggtnnnnnn ccttagcatg atacgactag cggat 55

25 <210> 16
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<221> base_modificada
<222> (53)..(55)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

35 <400> 16
gatagcatcg actacgacta gcgcgctagg tacgactacg tacgcctagc gcnnn 55

40 <210> 17
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

50 <400> 17
cgactacgac gactacgcga catcgactac gattttttt tttttttt tt 52

55 <210> 18
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

65 <400> 18
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 24

<210> 19
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
 5 <400> 19
 tttttttt ttttttv 18

 <210> 20
 <211> 26
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 15 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

 <400> 20
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 26
 20 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

 <400> 21
 30 tttttttt tttttttt ttttt 25

 <210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
 40 <400> 22
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 22

 <210> 23
 45 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
 50 <400> 23
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 29
 55 <210> 24
 <211> 15
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
 65 <400> 24

uuuuuuuuuu uuuuu 15

<210> 25
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(12)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

```
<400> 25
nnnnnnnnnnn nntttttttt tttt 24
```

<210> 26
<211> 54
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

```
<220>  
<221> base_modificada  
<222> (28)..(35)  
<223> a, c, u, g, desconocido u otro
```

<400> 26
agcagcagac agccugaug cggccgcnnn nnnnnuuuuu uuuuuuuuuu uuuu 54

<210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

```
<400> 27
ttttttttt ttttttttt 20
```

<210> 28
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

```
<220>  
<221> base_modificada  
<222> (10)..(17)  
<223> a, c, t, g, desconocido u otro
```

<400> 28
 aaaaaaaaaan nnnnnnnngcg gccgcatcag gcgtctgtcg tgct 44

5
 <210> 29
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (28)..(35)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

20
 <400> 29
 agcacgacag acgcctgatg cggccgcnnn nnnntttt ttt 44

25
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

35
 <400> 30
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 20

40
 <210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

50
 <400> 31
 attatgagca cgacagacgc ctgat 25

55
 <210> 32
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

60
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

65
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (28)..(35)

<223> a, c, u, g, desconocido u otro
 <400> 33
 agcacgacag acgccugaug cggccgcnnn nnnnnuuuuu uuuuuuuuuu uuv 53
 5
 <210> 34
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 10
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
 15
 <400> 34
 uuuuuuuuuu uuuuuuuv 18
 <210> 35
 <211> 45
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
 25
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20) .. (27)
 <223> a, c, u, g, desconocido u otro
 30
 <400> 35
 agcacgacag acgccugaun nnnnnnnuuu uuuuuuuuuu uuuuv 45
 35
 <210> 36
 <211> 57
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
 45
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20) .. (27)
 <223> a, c, u, g, desconocido u otro
 50
 <400> 36
 agcacgacag acgccugaun nnnnnnnuuu uuuuuuuuuu uuuuvaaaaa aaaaaaa 57
 <210> 37
 <211> 36
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
 60
 <400> 37
 agcacgacag acgccugauu uuuuuuuuuu uuuuv 36
 65
 <210> 38
 <211> 48

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

 10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(10)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

 15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (46)..(48)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

 20 <400> 38
 gacgaagann gcggccgcgt ctgtcgtgct cataatcttc gtcggnnn 48

 25 <210> 39
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (10)..(17)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (53)..(55)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

 40 <400> 39
 ccgacgaagn nnnnnnngcg gccgcgtctg tcgtgctcat aatcttcgtc ggann 55

 45 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

 55 <400> 40
 attatgagca cgacagacgc 20

 60 <210> 41
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 65 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

 <400> 41
 aaaaaaaaaa aaaa 14

5 <210> 42
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <220>
<221> base_modificada
<222> (1)..(8)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 42
nnnnnnnnntt tttttttt tttttt 27

20 <210> 43
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <220>
<221> base_modificada
<222> (22)..(22)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

35 <400> 43
tttttttt tttttttt vn 22

40 <210> 44
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 44
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 31

50 <210> 45
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

60 <220>
<221> base_modificada
<222> (64)..(64)
<223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 45

65 tgtgttggtt gtgtttggcg gccgcbbbb bbbbbbbttt tttttttttt tttttttttt 60
ttvn 64

5 <210> 46
 <211> 64
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (64)..(64)
 <223> a, c, u, g, desconocido u otro

<400> 46

20 uguguugggu guguuuggcg gccgcbbbb bbbbbbbuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu 60

uuvn 64

25 <210> 47
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

35 <400> 47
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuu 25

40 <210> 48
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

45 <400> 48
 tgtgtgggt gtgttggcg cgccbbbbb bbbbbbtt 38

50 <210> 49
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (37)..(38)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

<400> 49
 tgtgtgggt gtgttggcg cgccbbbbb bbbbbbnn 38

65 <210> 50

<211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

10

<400> 50
 tgtgttgggt gtgtttggcg cgckkkkkk kkkkkkt 38

15

<210> 51
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (37)..(38)
 <223> a, c, t, g, desconocido u otro

30

<400> 51
 tgtgttgggt gtgtttggcg cgckkkkkk kkkkkkn 38

35

<210> 52
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

45

<400> 52
 tgtgttgggt gtgtttgg 18

50

<210> 53
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

60

<400> 53
 ggccagatcg gaagagcggg tcagcaggaa tgccgag 37

65

<210> 54
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 54
 caagcagaag acggcatatcg agatcgggtct cggcattcct gctgaaccgc tcttccgatc
 t

60

61

5 <210> 55
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

15 <400> 55
 aatgatacgg cgaccaccga gatctacact cttccctac acgacgtct tccgatct 58

20 <210> 56
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

30 <400> 56
 cgcgagatcg gaagagcgtc gtgtagggaa agagtgt 37

35 <210> 57
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

45 <400> 57
 aatgatacgg cgaccaccga ga 22

50 <210> 58
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

60 <400> 58
 caagcagaag acggcatacg aga 23

65 <210> 59
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

70 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

75 <400> 59
 aaaaaaaaaa aaaaaa 16

80 <210> 60
 <211> 24

	<212> ADN
	<213> Secuencia Artificial
5	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
10	<400> 60 ttttttttt ttttttttt tttt 24
15	<210> 61 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial
20	<220> <221> fuente <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"
	<400> 61 ttttttttt ttttttttt ttttttttt ttttttttt 40

REIVINDICACIONES

1. Una composición para contar el número de apariciones de una primera molécula diana de ARNm que comprende: una pluralidad de primeras moléculas de ADN de cadena doble marcadas que corresponden a copias de una primera molécula diana de ARNm,

en donde cada una de la pluralidad de primeras moléculas de ADN de cadena doble marcadas se produce mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada, y comprende

una secuencia específica diana que comprende una secuencia de oligo dT, una secuencia de identificación única, una secuencia de cebador de PCR universal, y una copia de la primera molécula diana de ARNm, un complemento de la misma, un complemento inverso de la misma, o una porción de cualquiera de los anteriores, en donde cada una de la pluralidad de primeras moléculas de ADN de cadena doble marcadas se produce mediante PCR anidada usando la secuencia del cebador de PCR universal y un cebador específico de la diana, en donde la secuencia de identificación única identifica de manera única las apariciones de la molécula diana de ARNm, y

en donde el número de diferentes secuencias de identificación únicas de la pluralidad de primeras moléculas de ADN de cadena doble marcadas indica el número de apariciones de la primera molécula diana de ARNm.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde la secuencia de identificación única tiene por lo menos 5 nucleótidos de longitud.

3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cada secuencia de identificación única comprende una secuencia aleatoria o una secuencia predeterminada.

4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el número de primeras moléculas de ADN de cadena doble marcadas de la pluralidad de primeras moléculas de ADN de cadena doble marcadas con diferentes secuencias de identificación única es por lo menos 100.

5 La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además: una pluralidad de segundas moléculas de ADN de cadena doble marcadas correspondientes a copias de segundas moléculas diana de ARNm,

en donde cada una de la pluralidad de segundas moléculas de ADN de cadena doble marcadas se produce mediante PCR anidada, y comprende

la secuencia específica de la diana que comprende la secuencia oligo dT, una secuencia de identificación única, la secuencia del cebador de PCR universal, y una copia de una de las segundas moléculas diana de ARNm, un complemento de la misma, un complemento inverso de la misma, o una parte de cualquiera de los anteriores, en donde cada una de la pluralidad de segundas moléculas de ADN de cadena doble marcadas se produce mediante PCR anidada usando la secuencia de cebador de PCR universal y un cebador específico de la diana, en donde las secuencias de identificación única identifican de manera única las apariciones de las segundas moléculas diana de ARNm, y

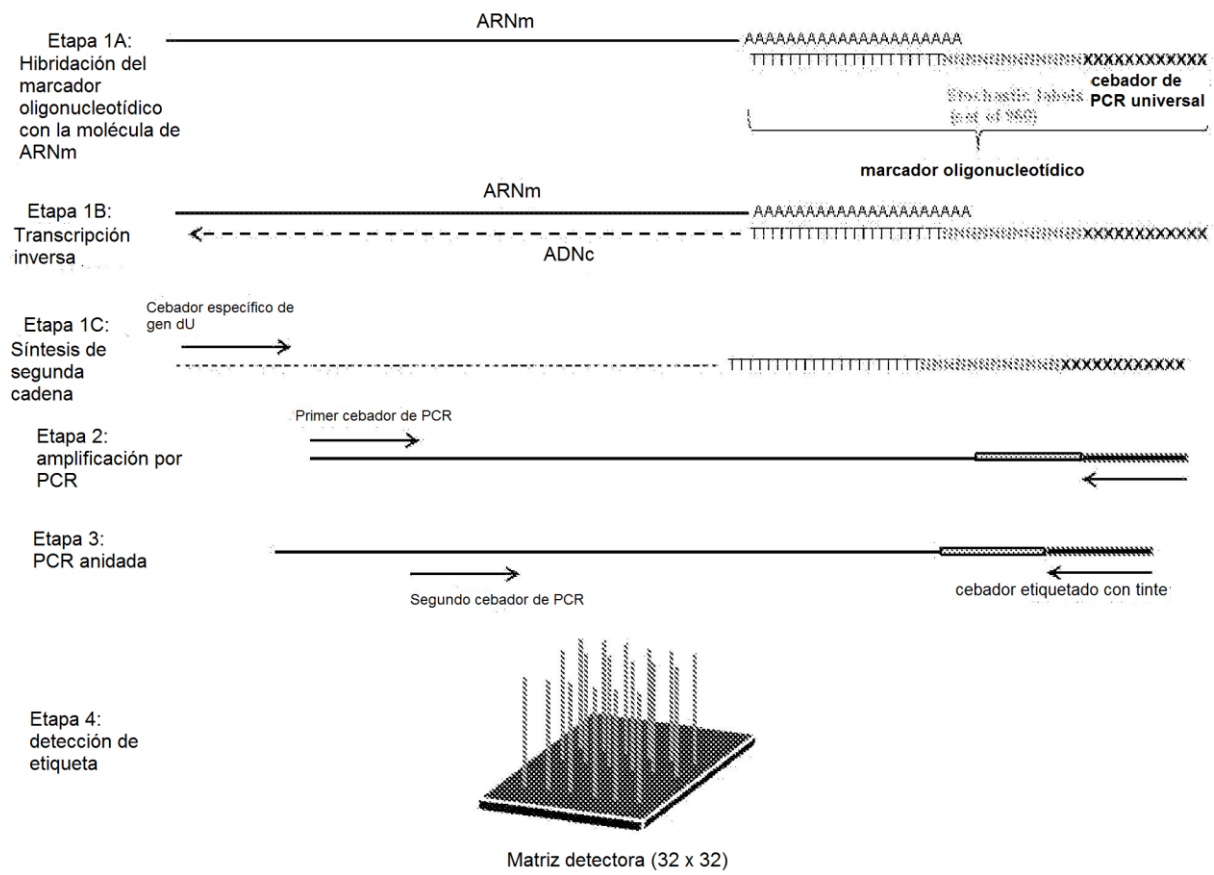
en donde el número de diferentes secuencias de identificación únicas de la pluralidad de segundas moléculas de ADN de cadena doble marcadas indica el número de apariciones de la segunda molécula diana de ARNm.

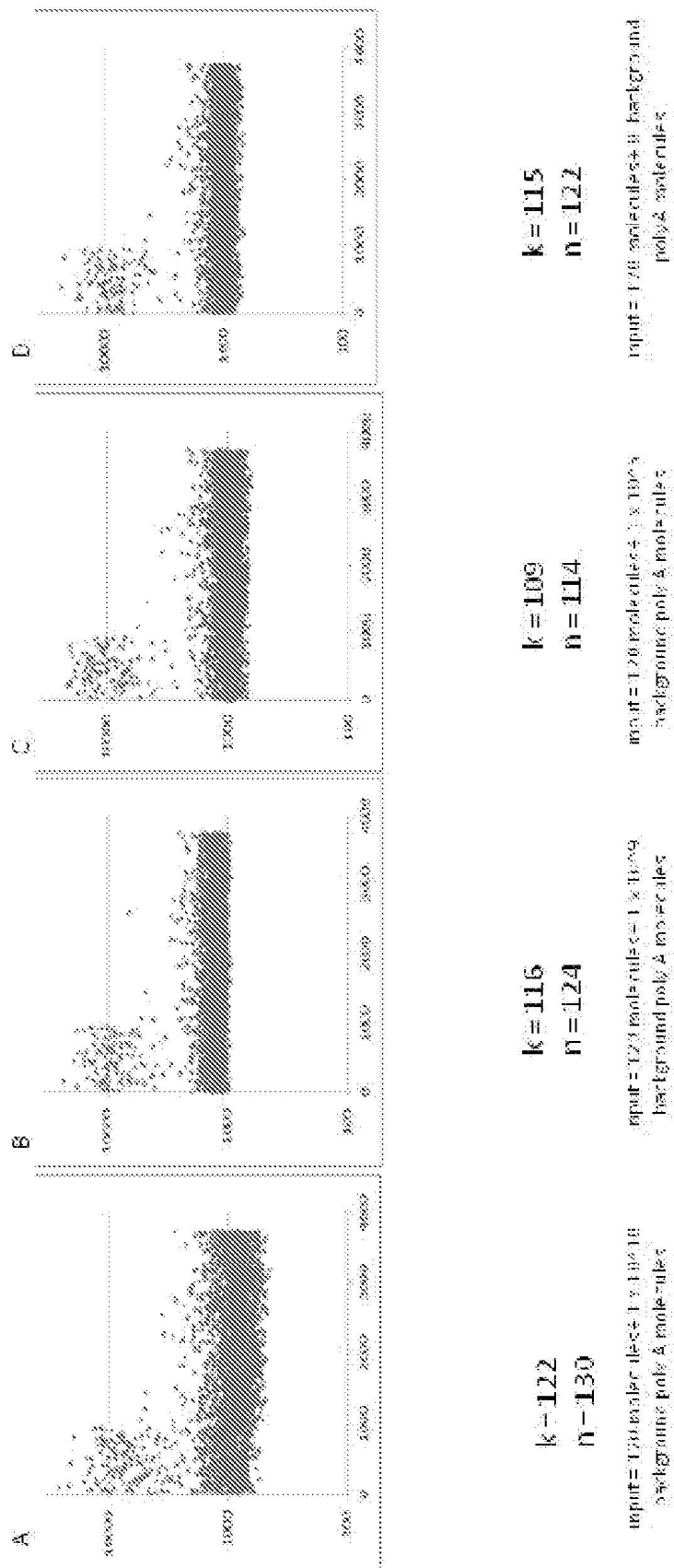
6. La composición de la reivindicación 5, en donde el número de segundas moléculas de ADN de cadena doble marcadas de la pluralidad de segundas moléculas de ADN de cadena doble marcadas con diferentes secuencias de identificación única es de por lo menos 1000.

7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en donde la primera molécula diana de ARNm y las segundas moléculas diana de ARNm comprenden moléculas diana de ARNm de una sola célula.

8. Una composición que comprende productos amplificados de la pluralidad de primeras moléculas de ADN de cadena doble marcadas de cualquier reivindicación anterior, o porciones de las mismas.

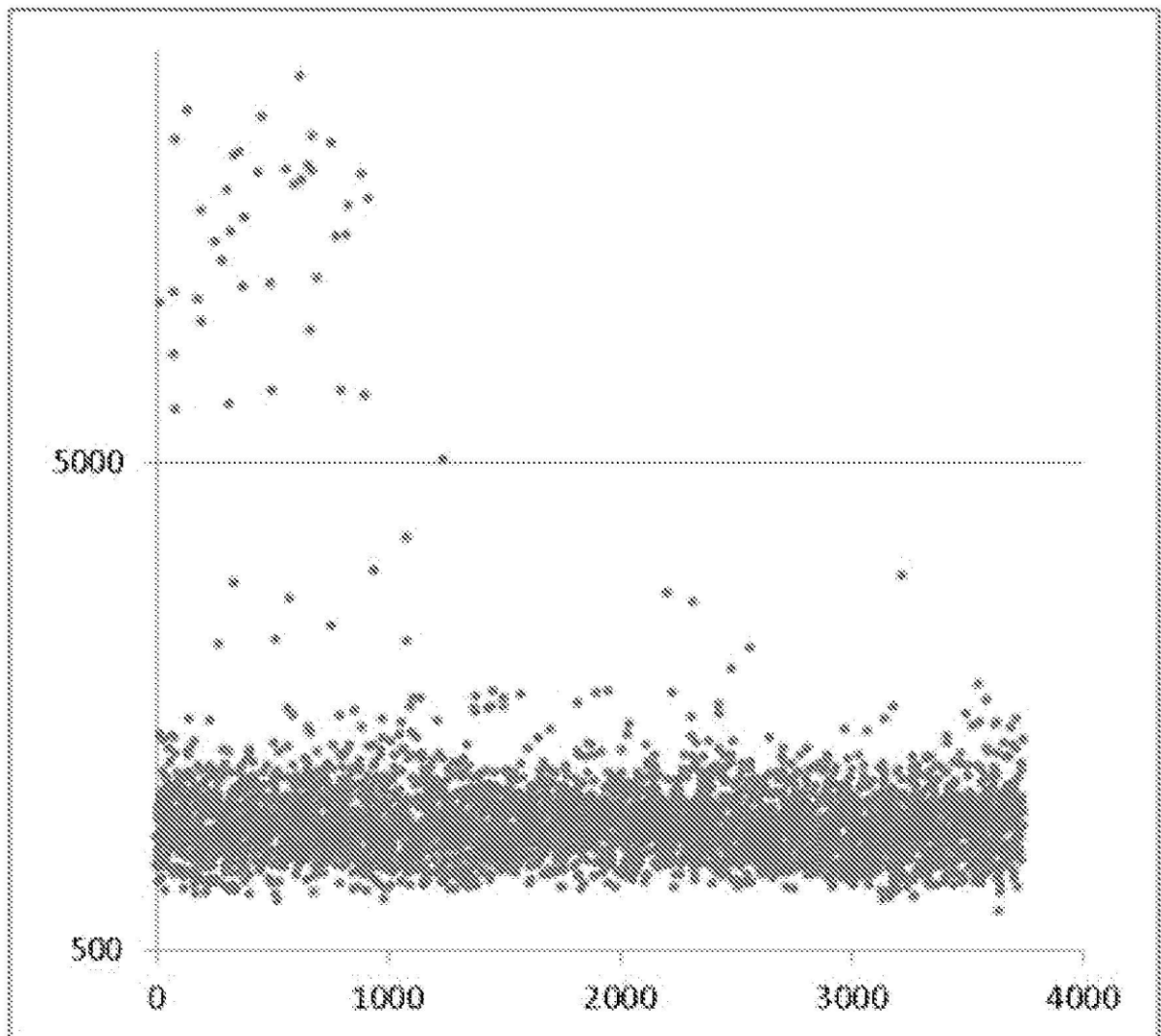
FIG. 1





k es un recuento de la cantidad de etiquetas detectadas (como puntos brillantes) y n es la cantidad de moléculas de ARN medida en función de k

FIG. 3.



Entrada = 188 moléculas

FIG. 4

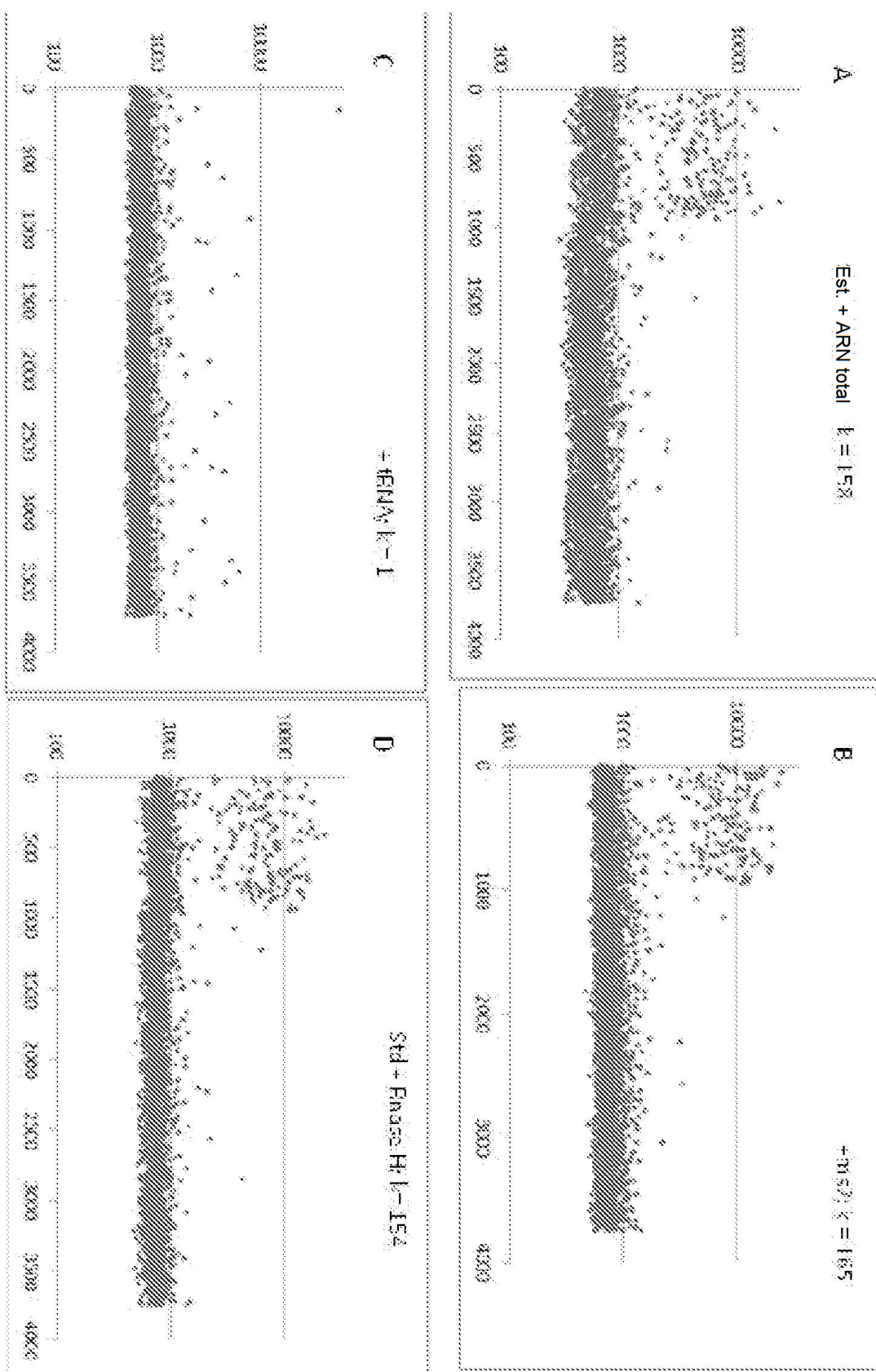


FIG. 5.

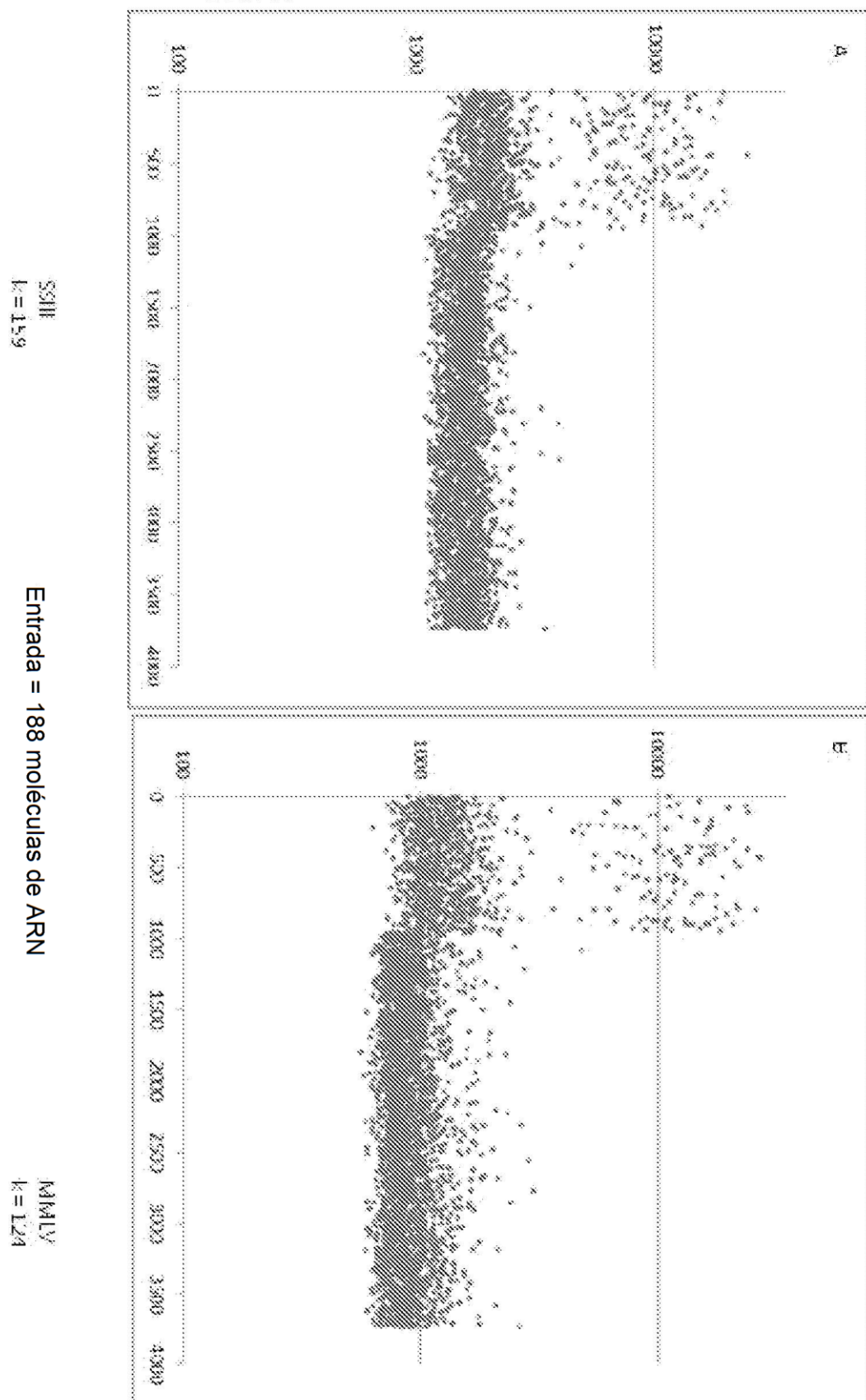


FIG. 6.

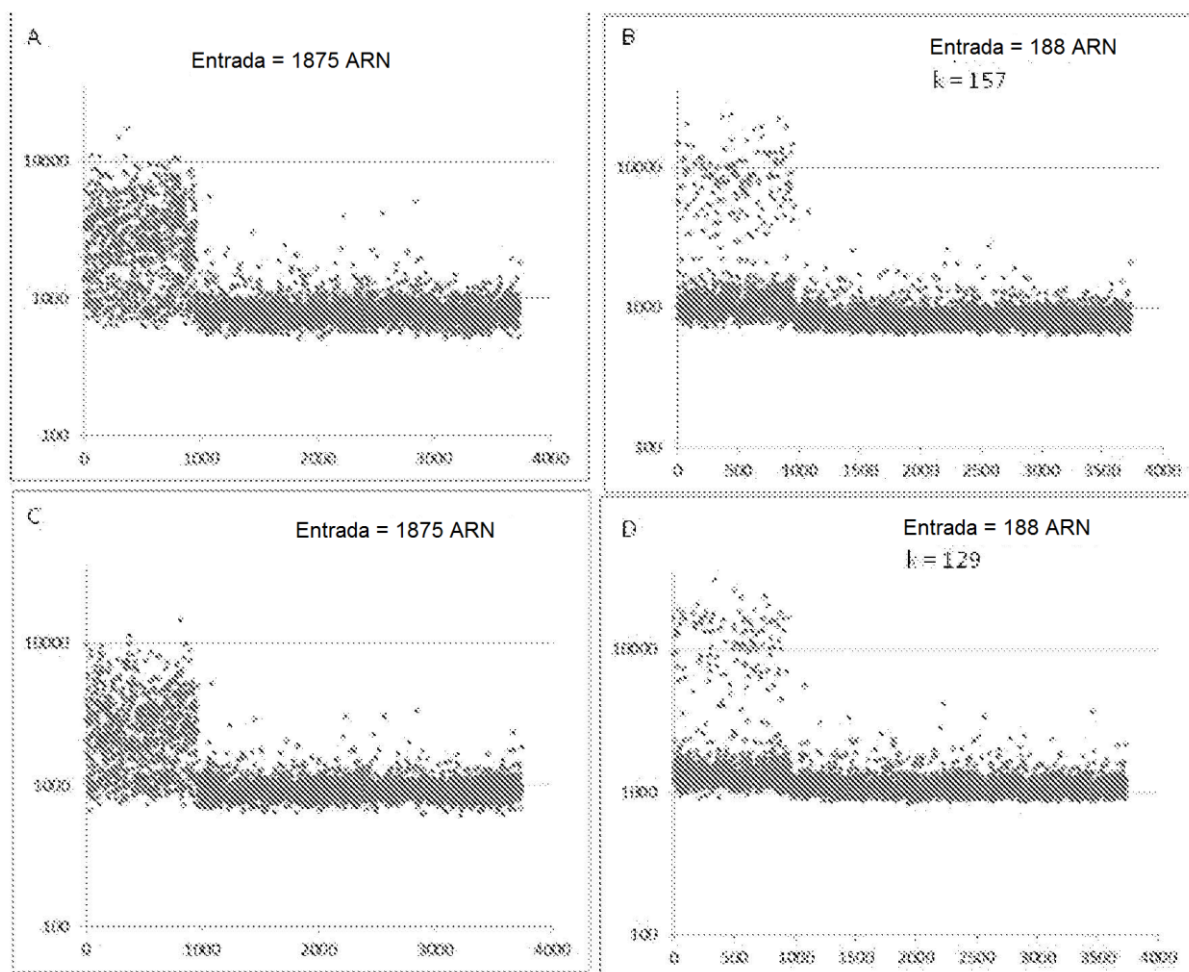


FIG. 7.

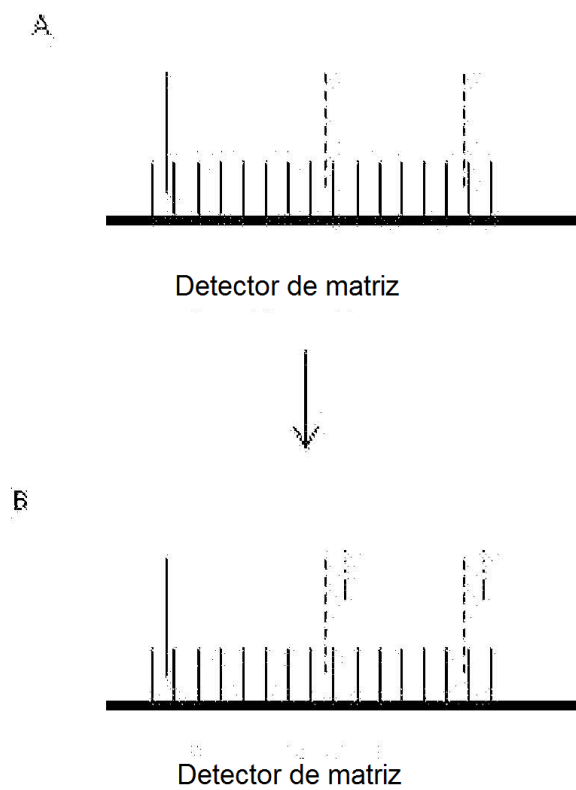


FIG. 8.

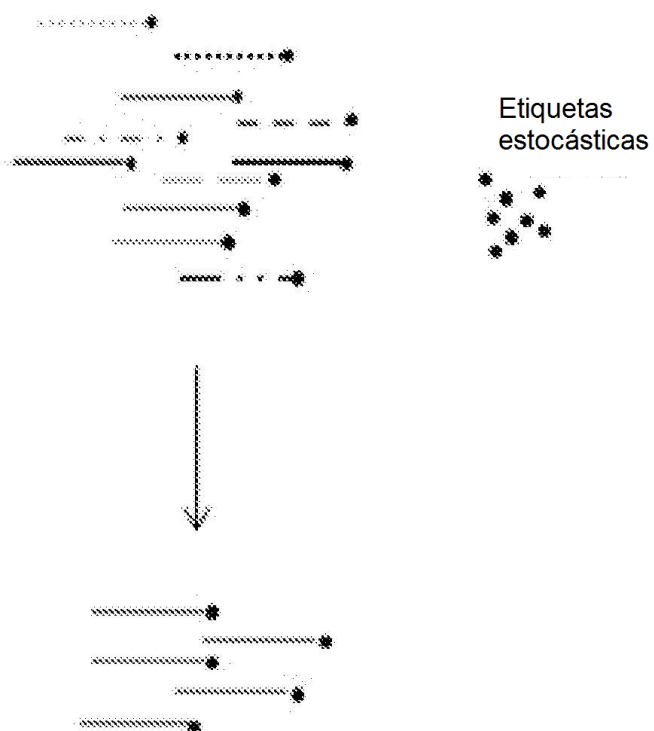


FIG. 9

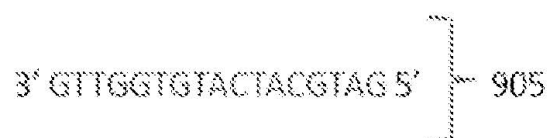
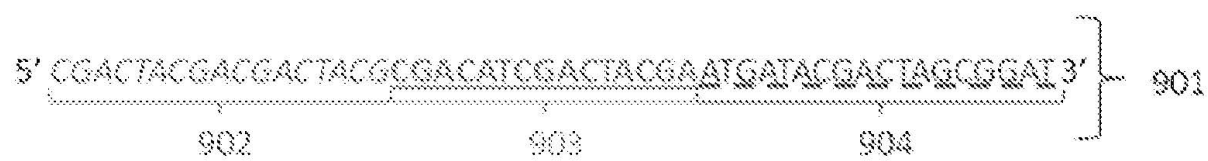
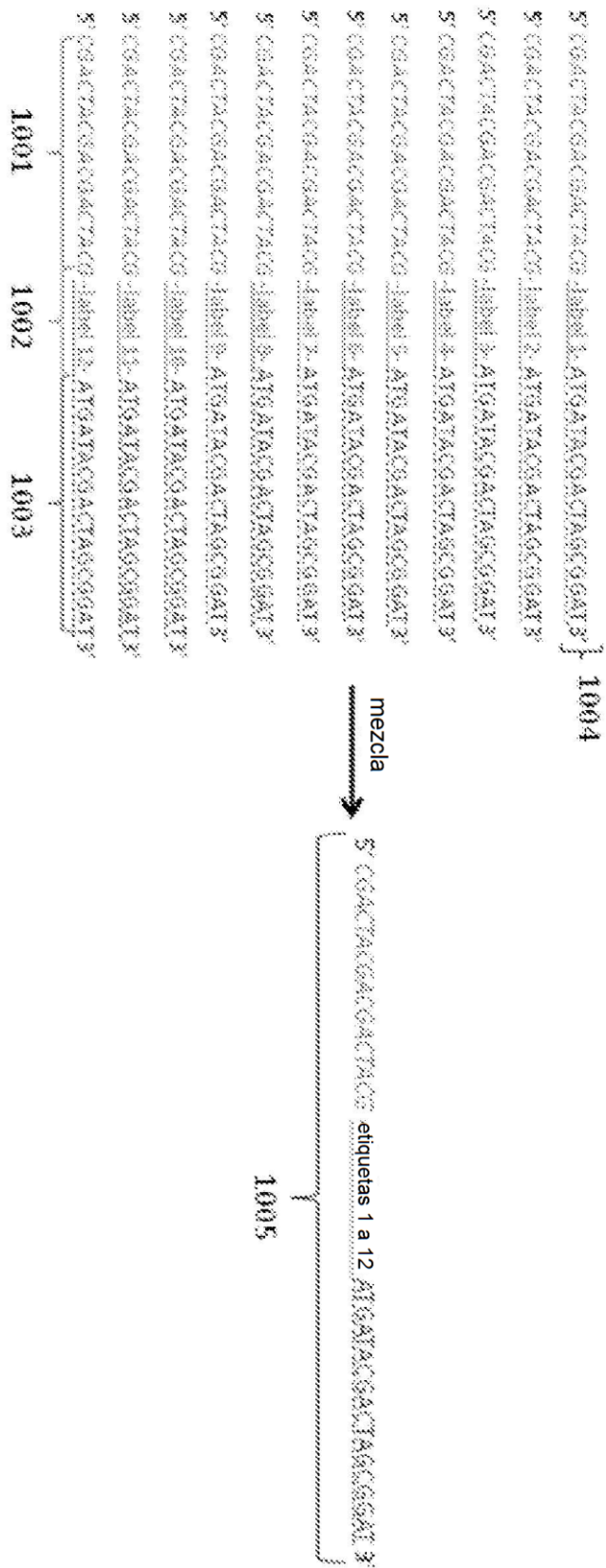


FIG. 10



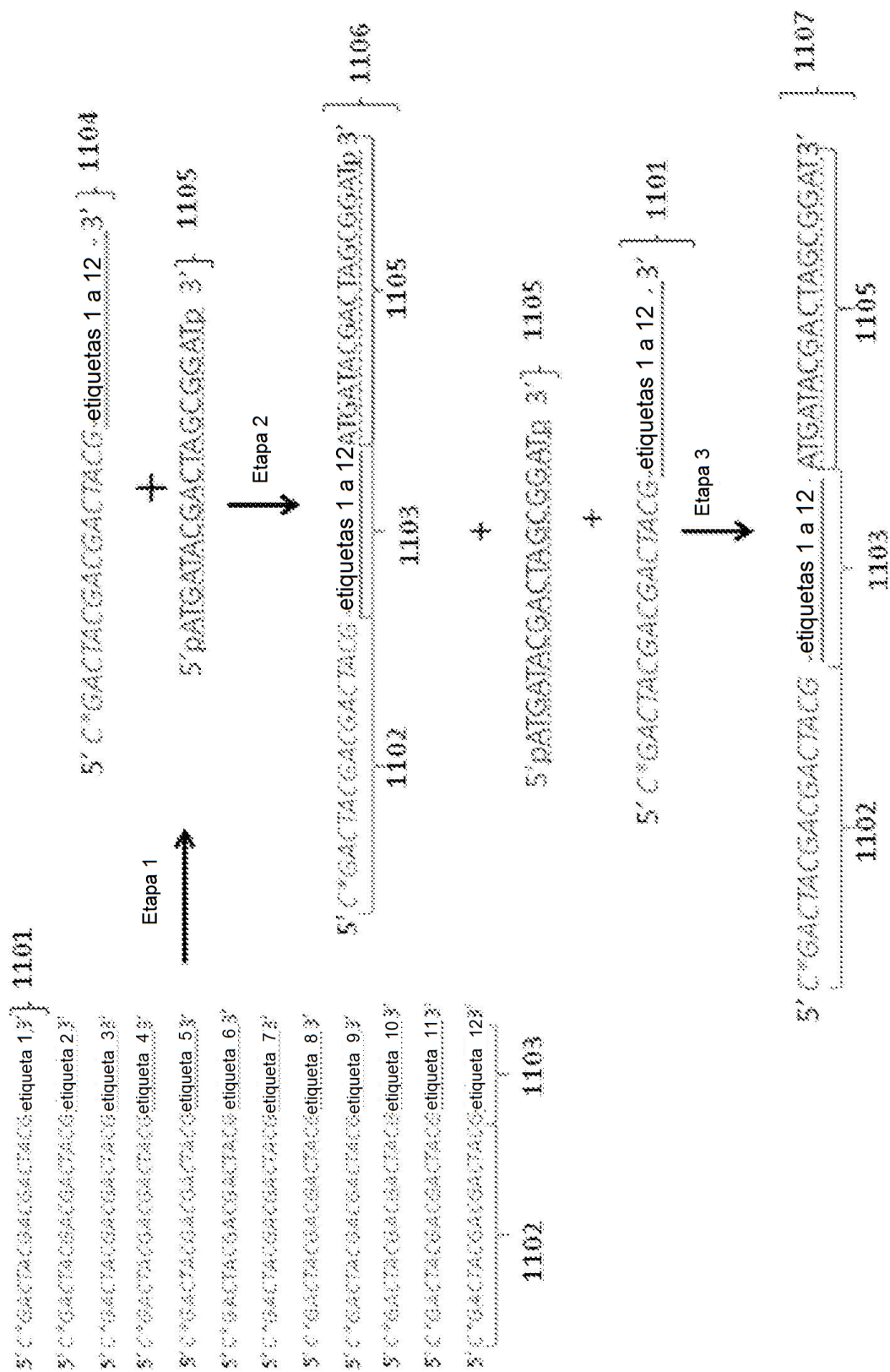
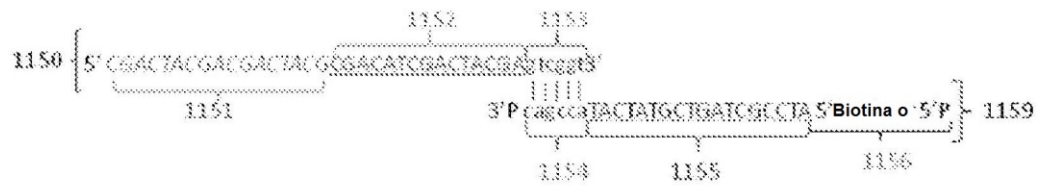


FIG. 11A

FIG. 11B



FIG. 11C



Etapa 1

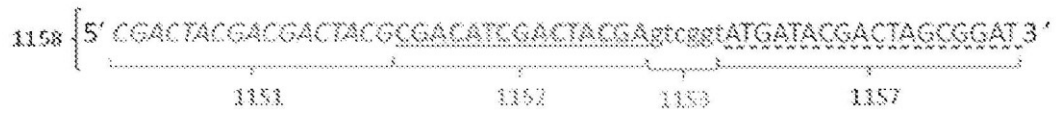
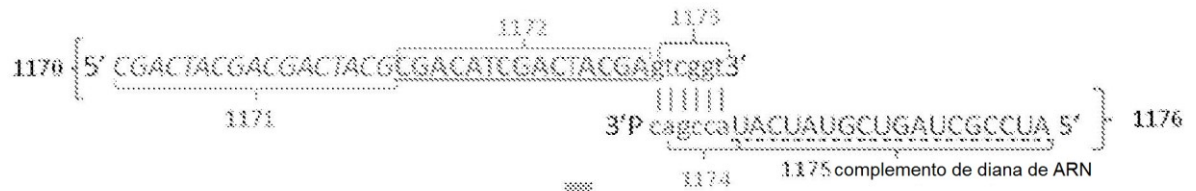


FIG. 11D



Etapa 1 Transcriptasa inversa

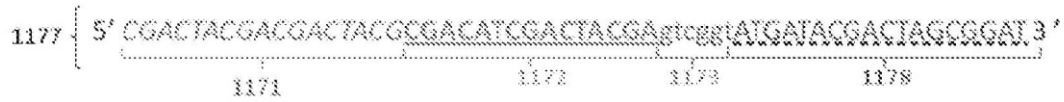


FIG. 12

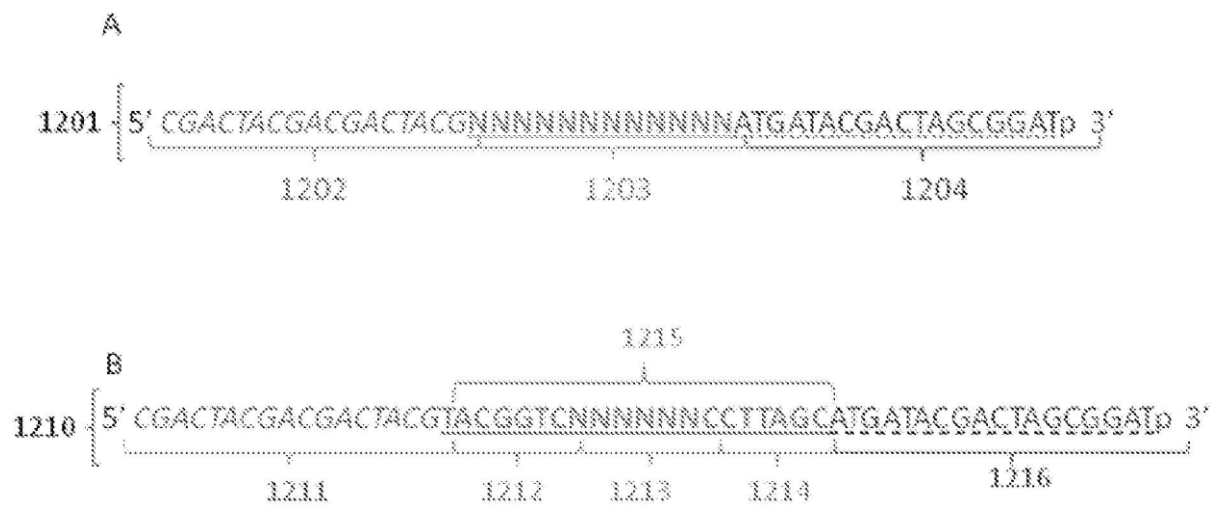
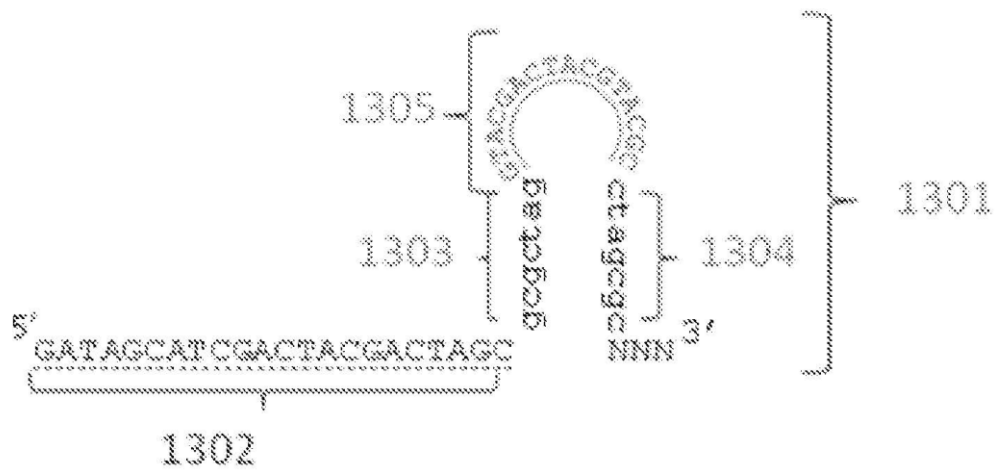
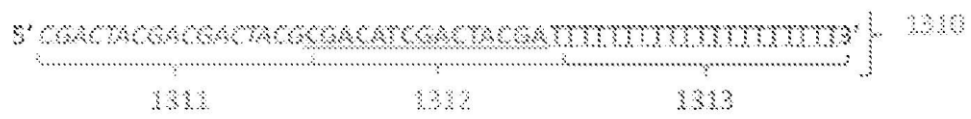


FIG. 13



A.



B.

FIG. 14

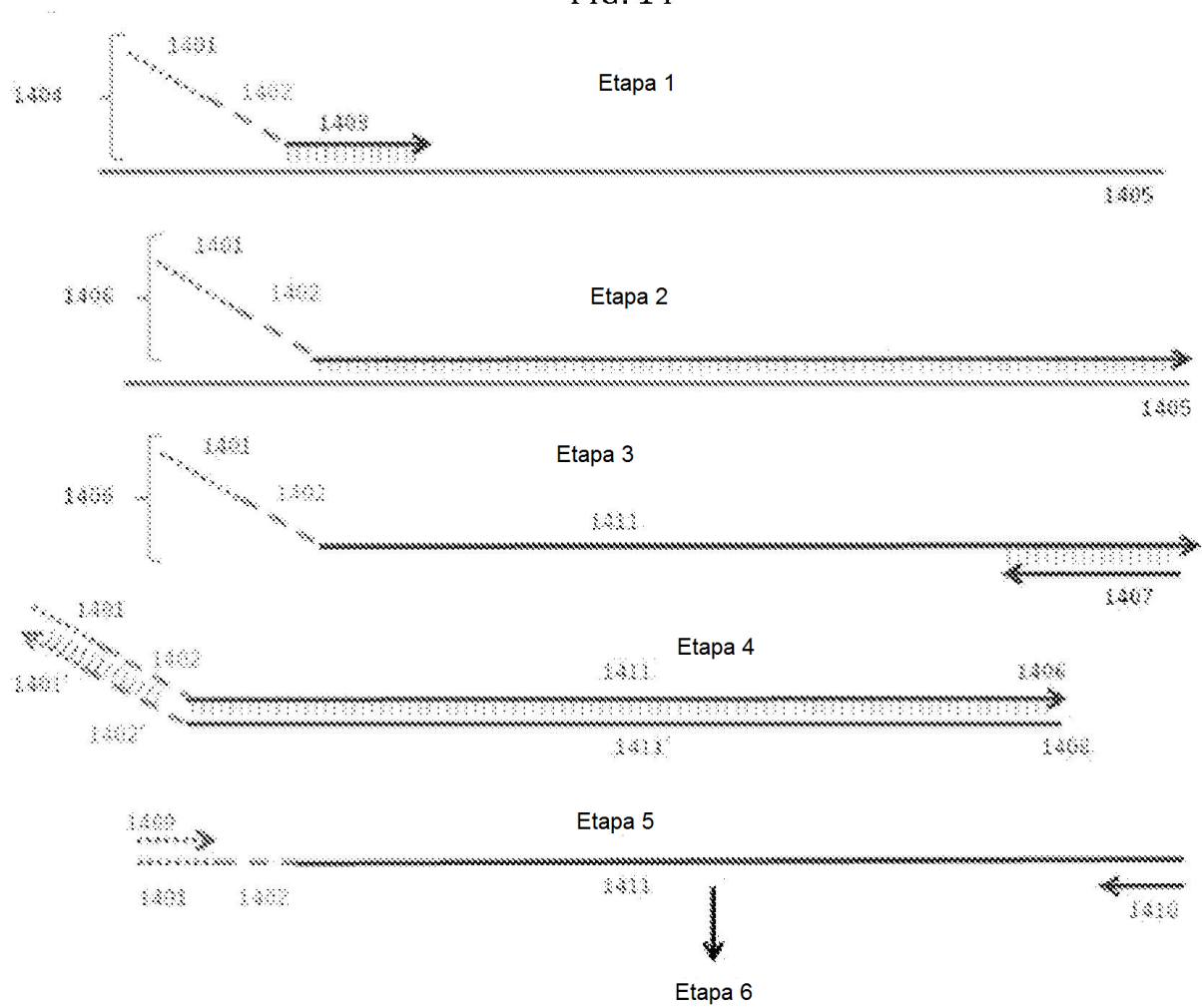


FIG. 15

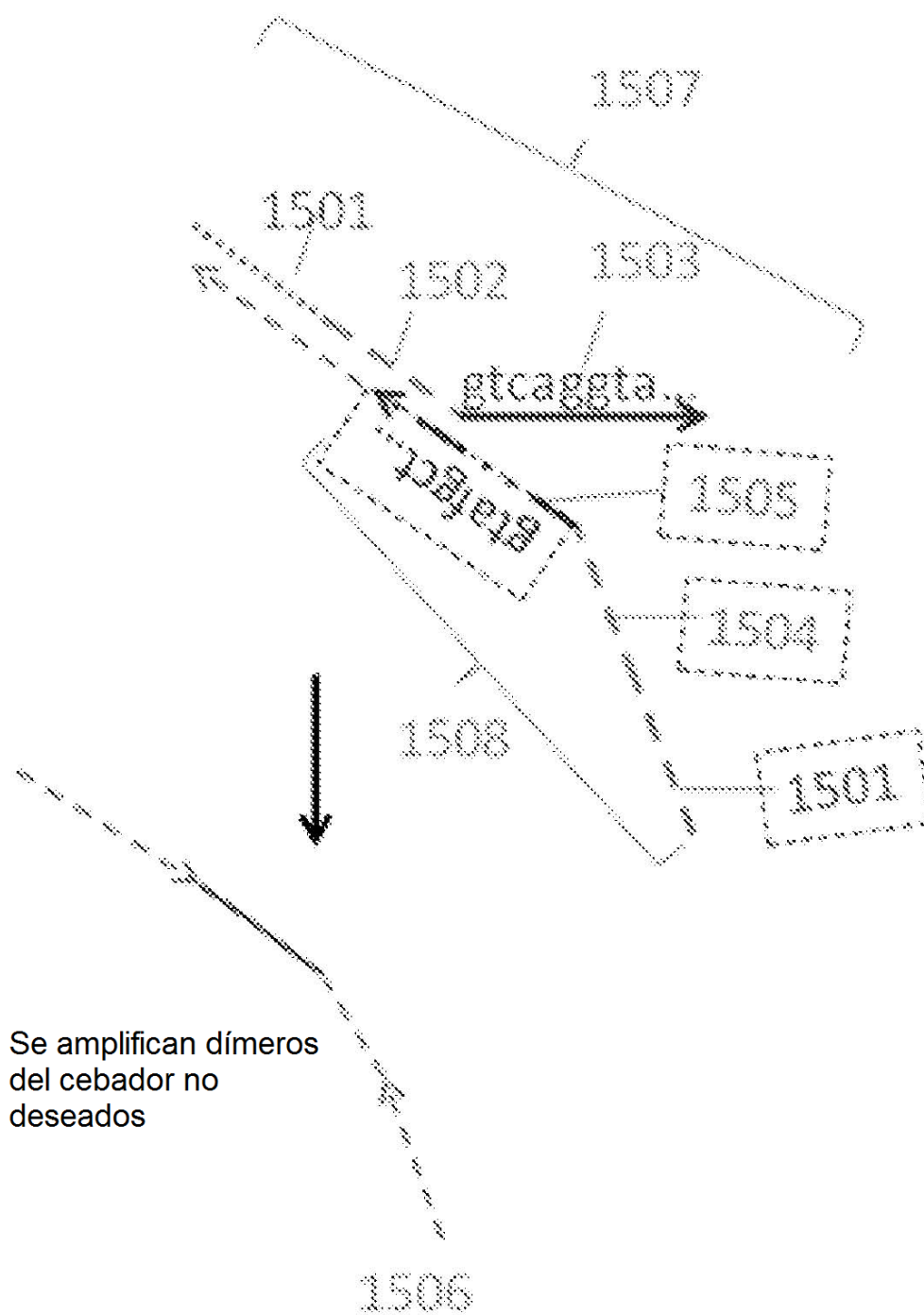
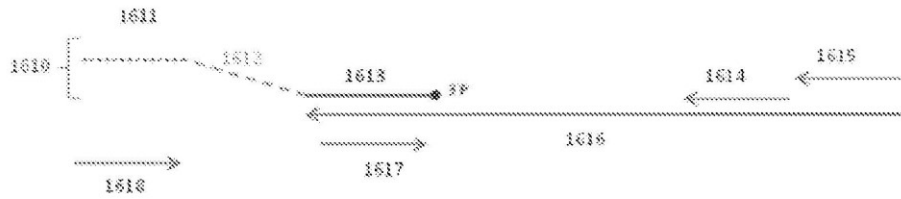


FIG. 16



Sitio de reconocimiento:

5'...GATC...3'
3'...CTAG...5'

FIG. 17

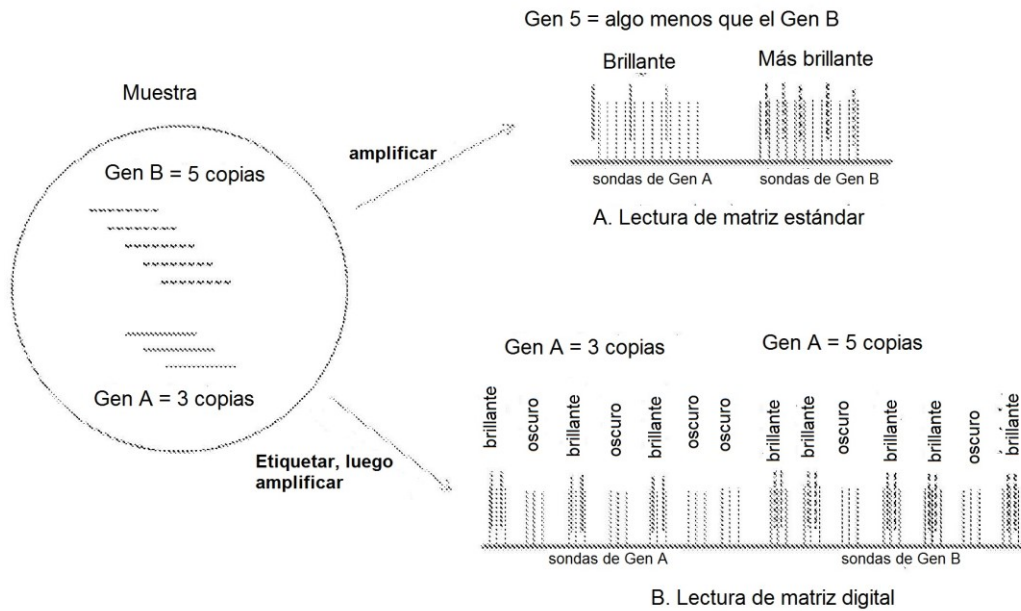


FIG. 18

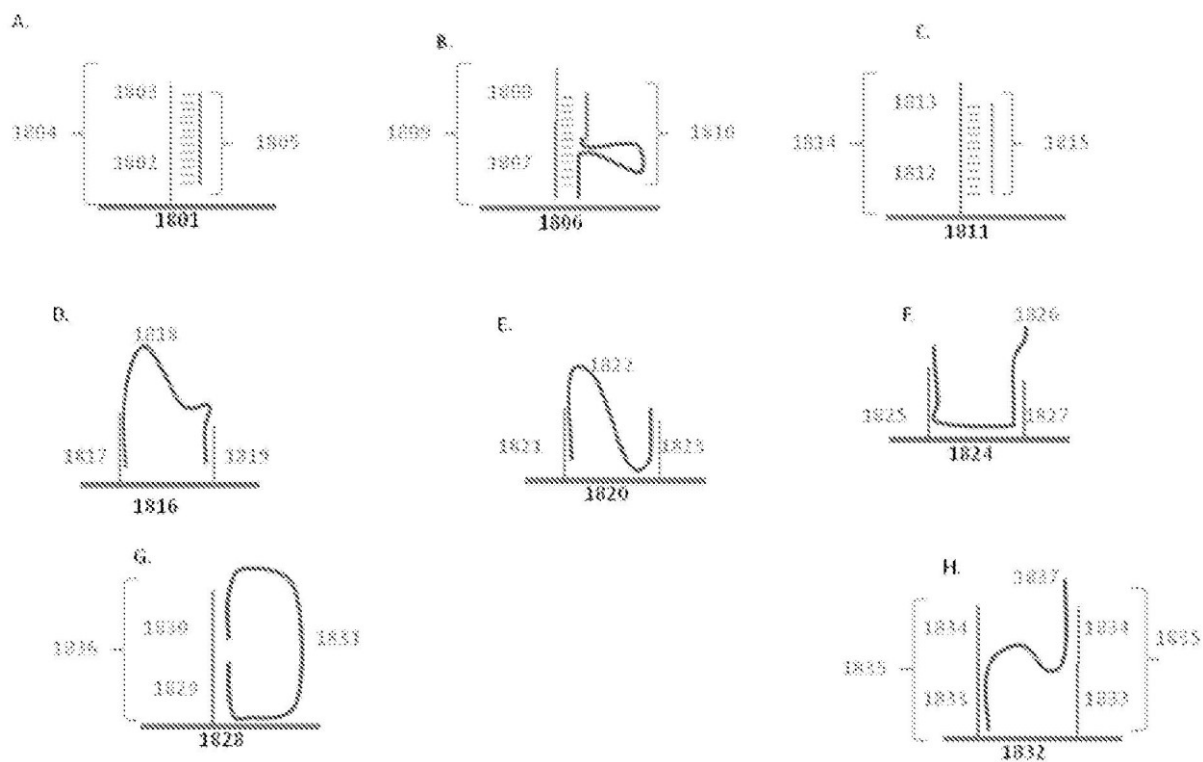


FIG. 19

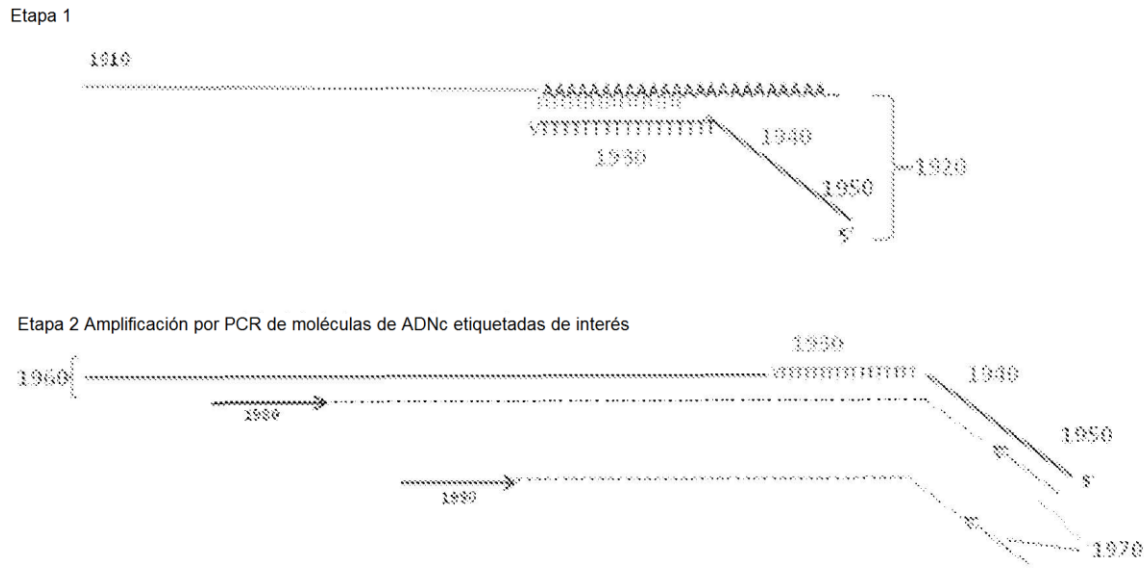


FIG. 20



FIG. 21

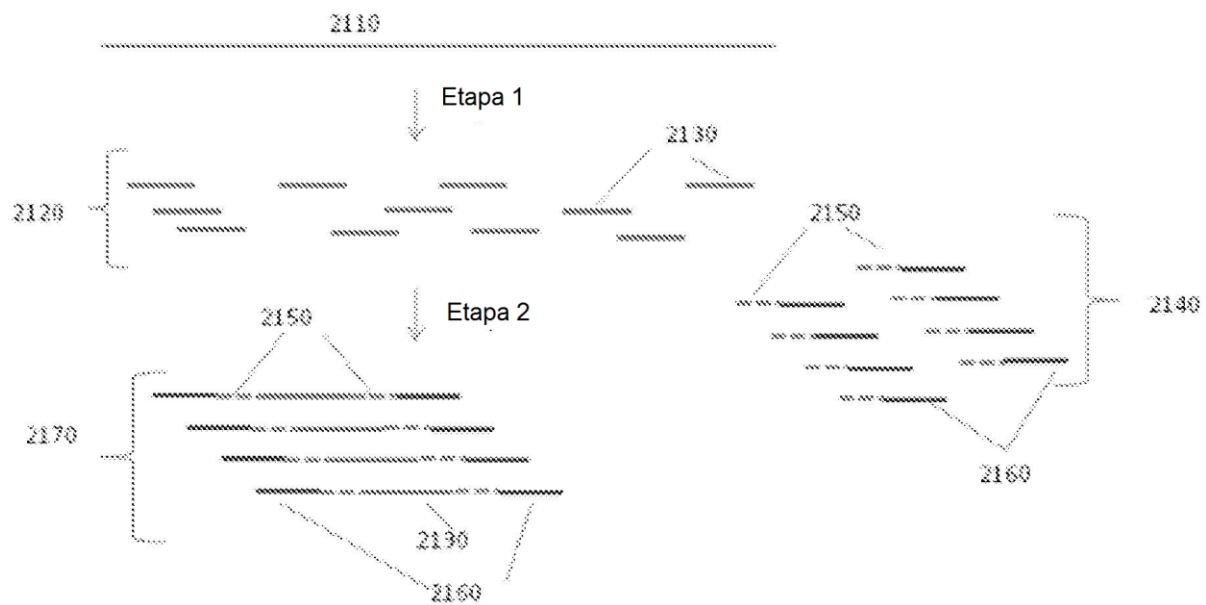


FIG. 22

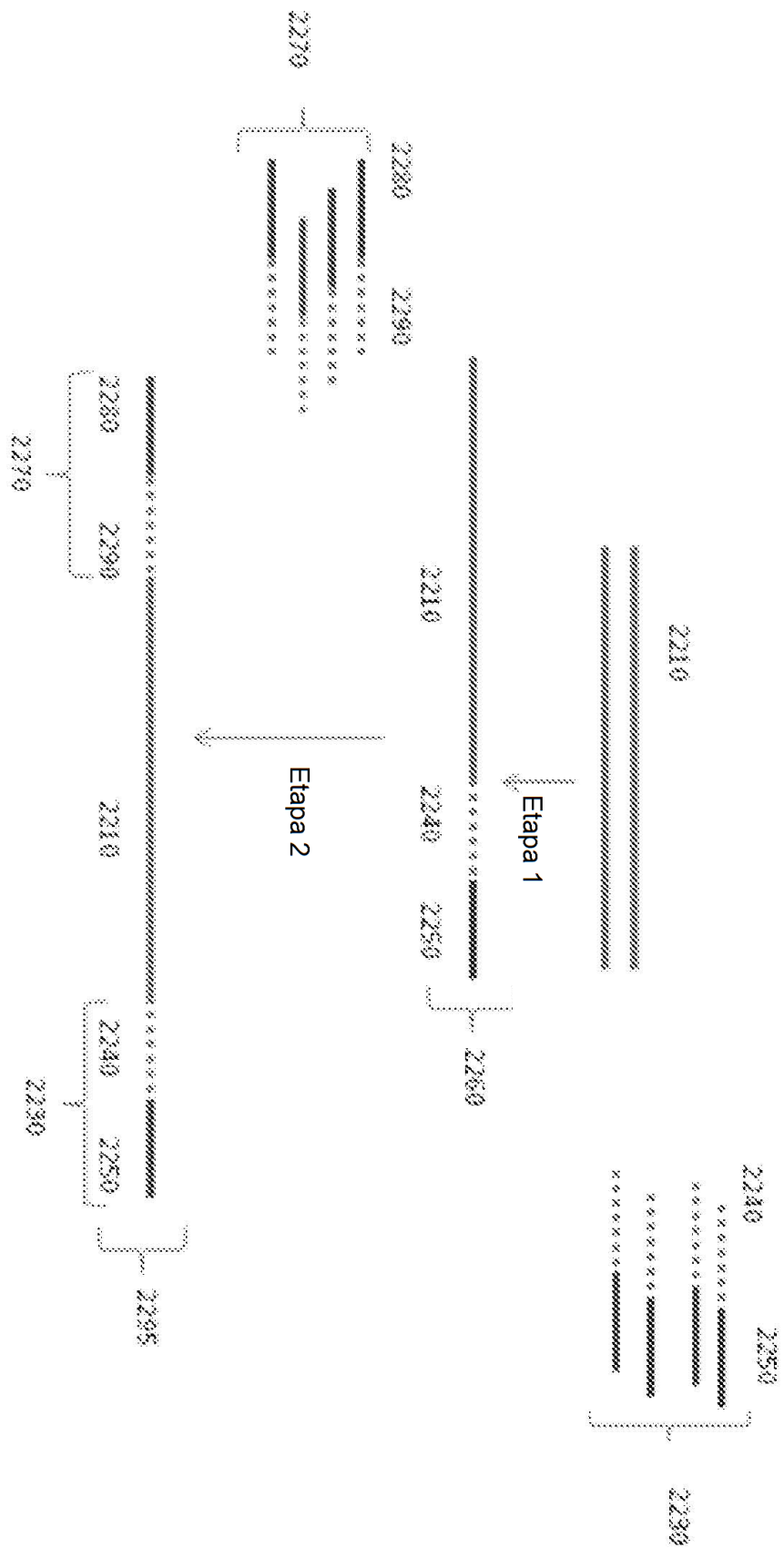


FIG. 23A

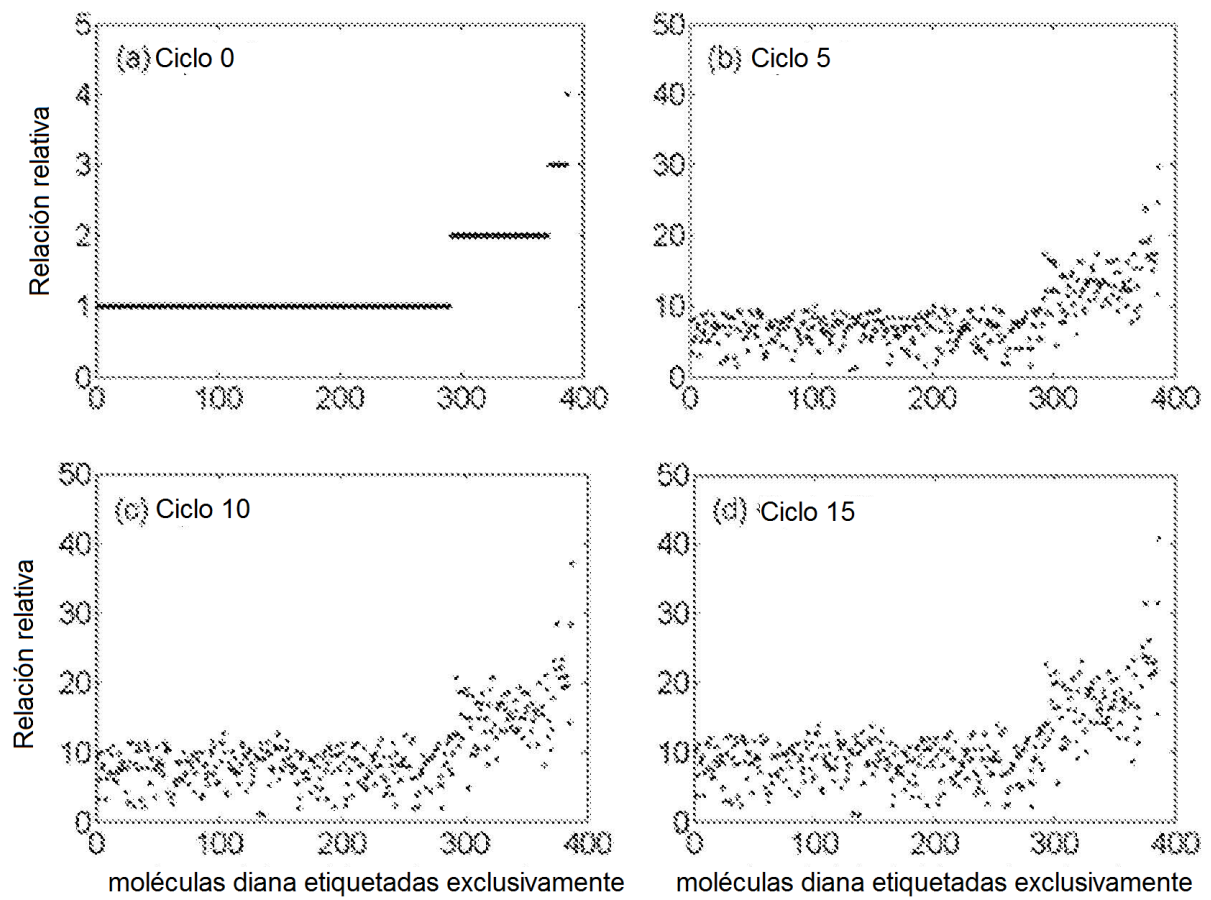
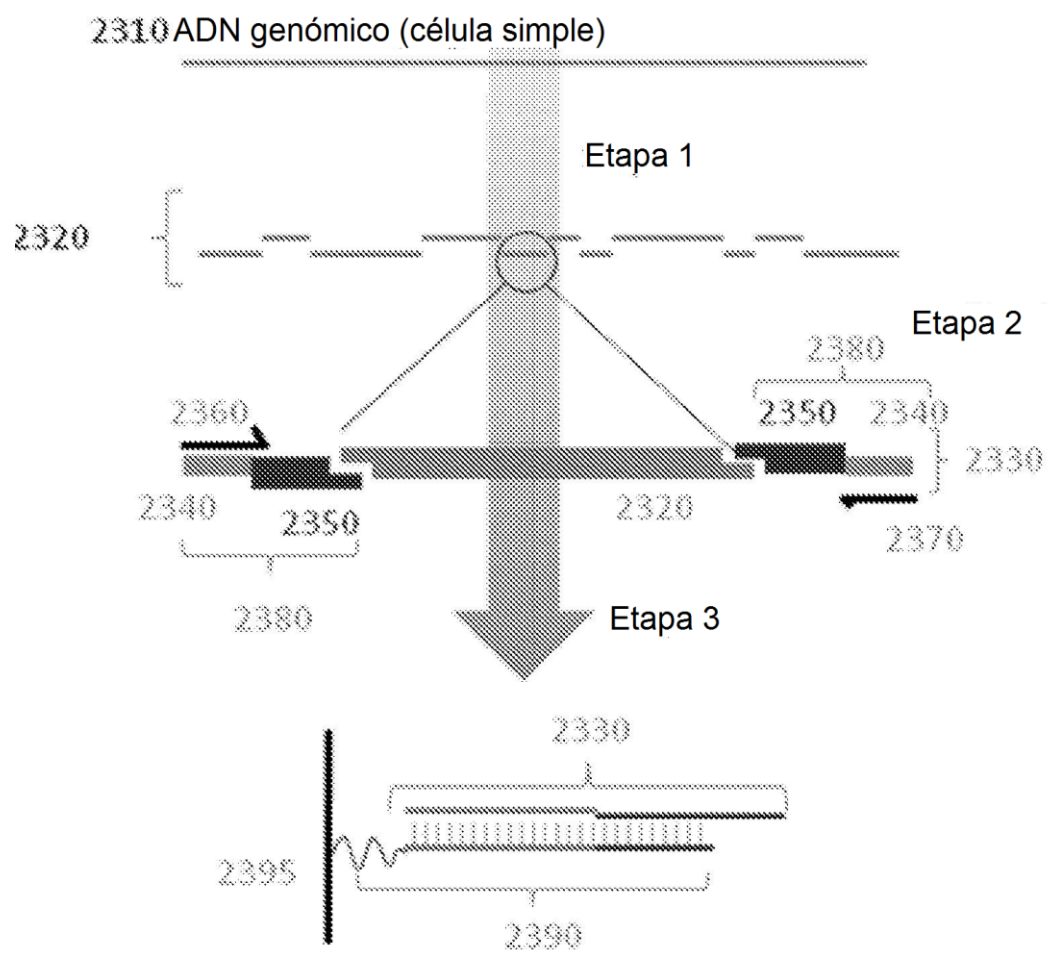


FIG. 23B



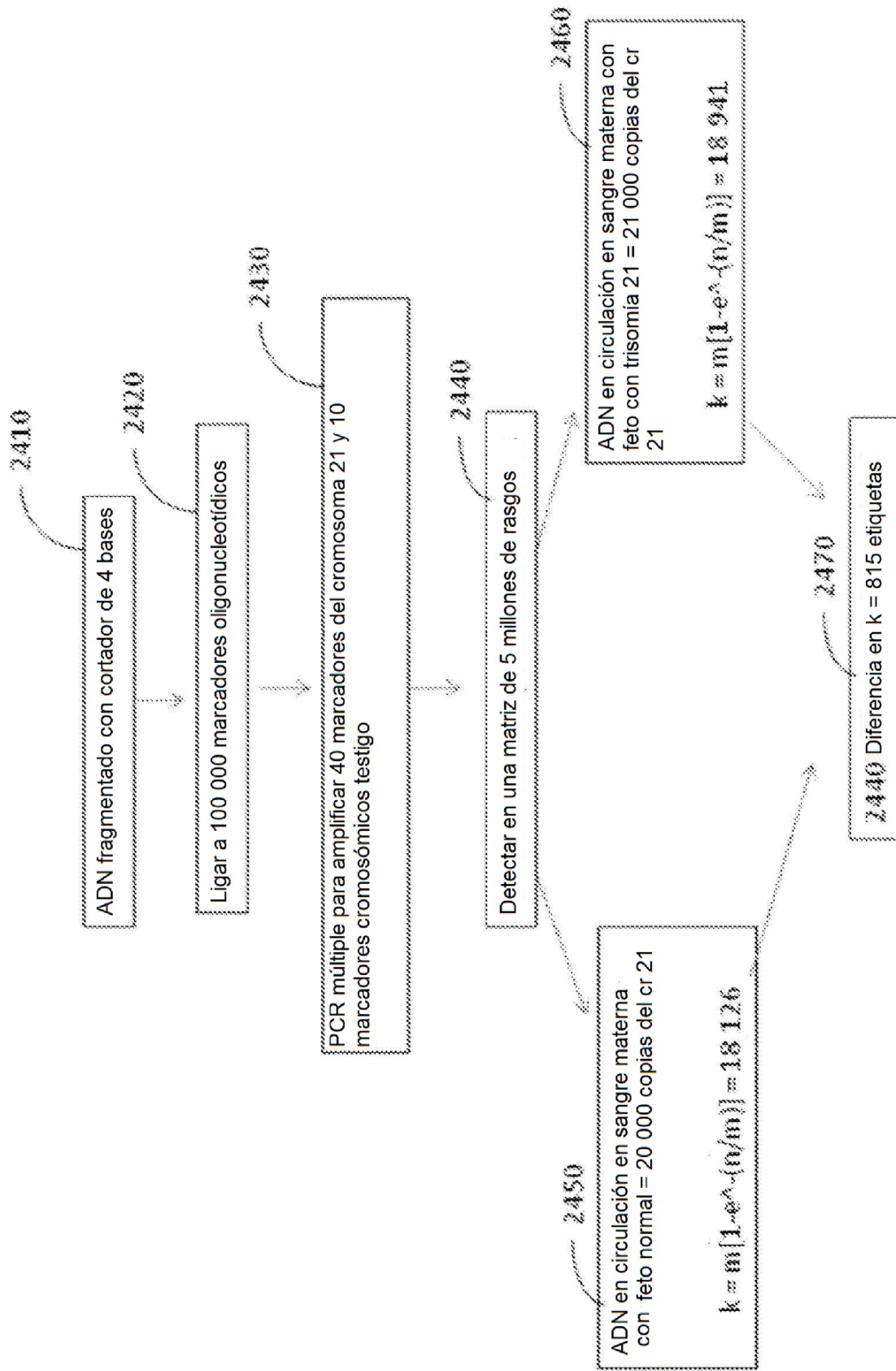
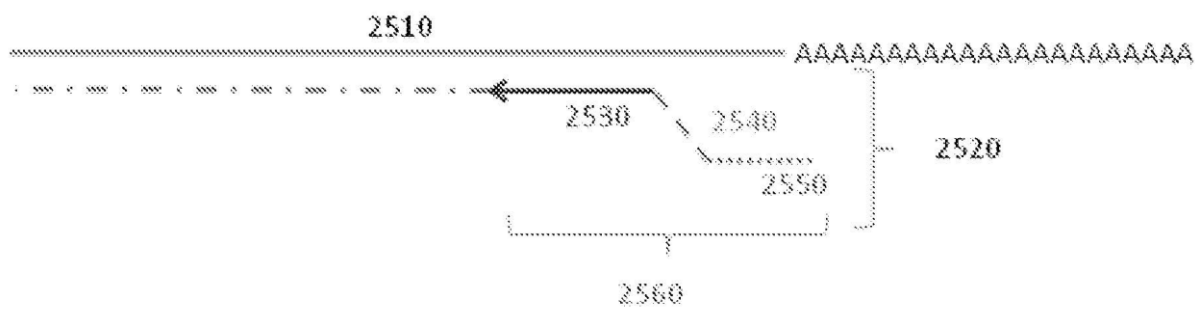


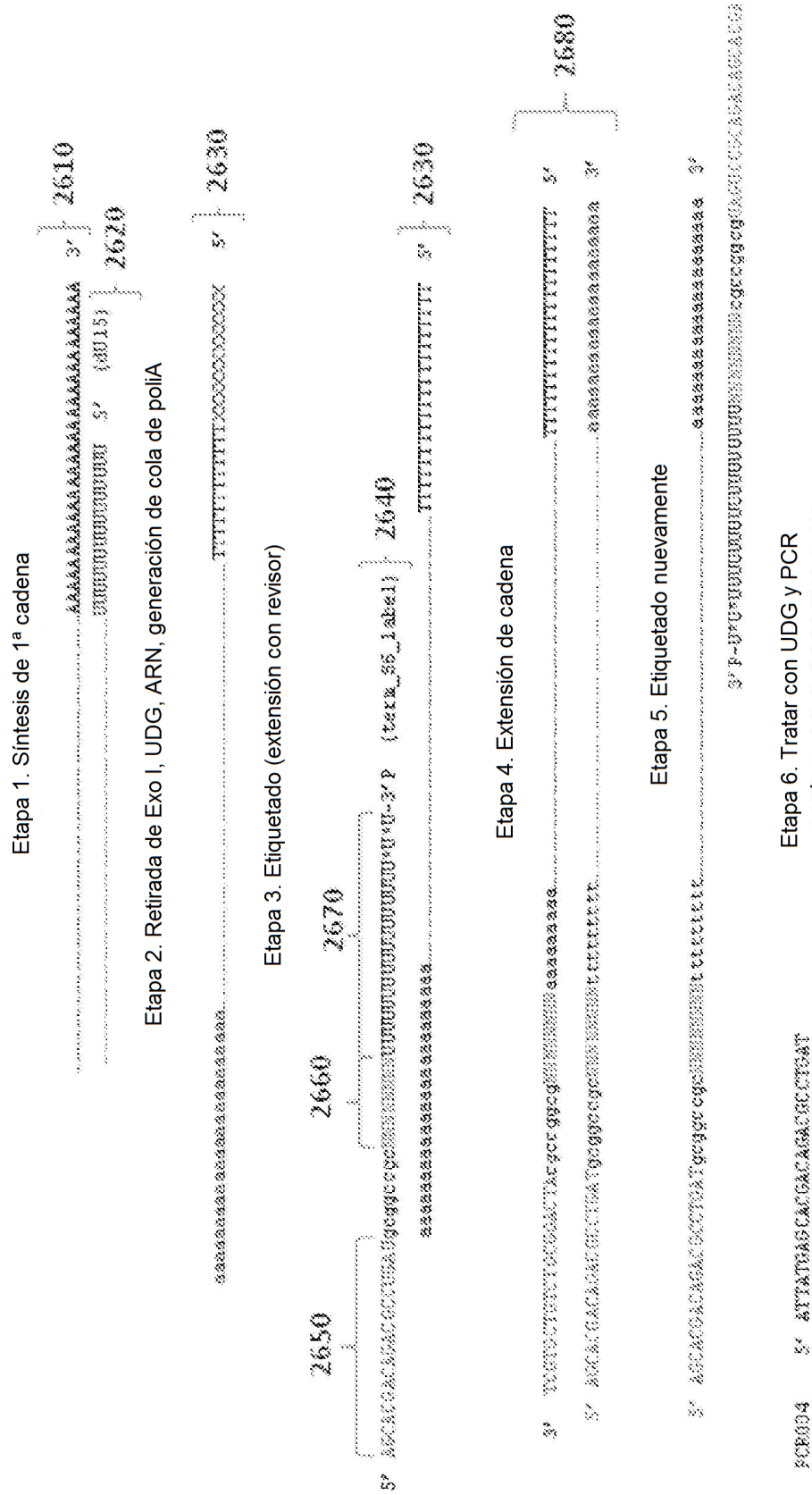
FIG. 24

FIG. 25

Etapa 1



Etapa 2. Detección de las moléculas de ADNc etiquetadas



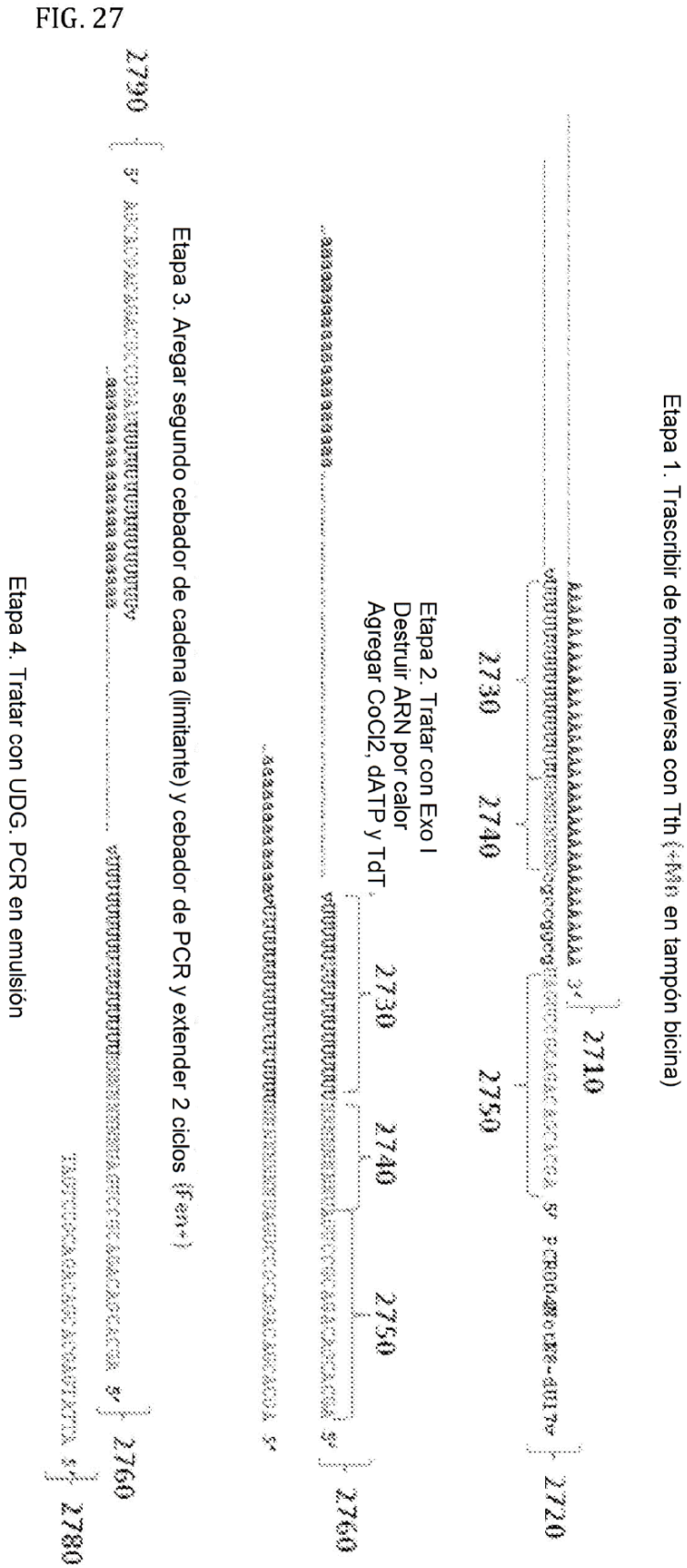


FIG. 27

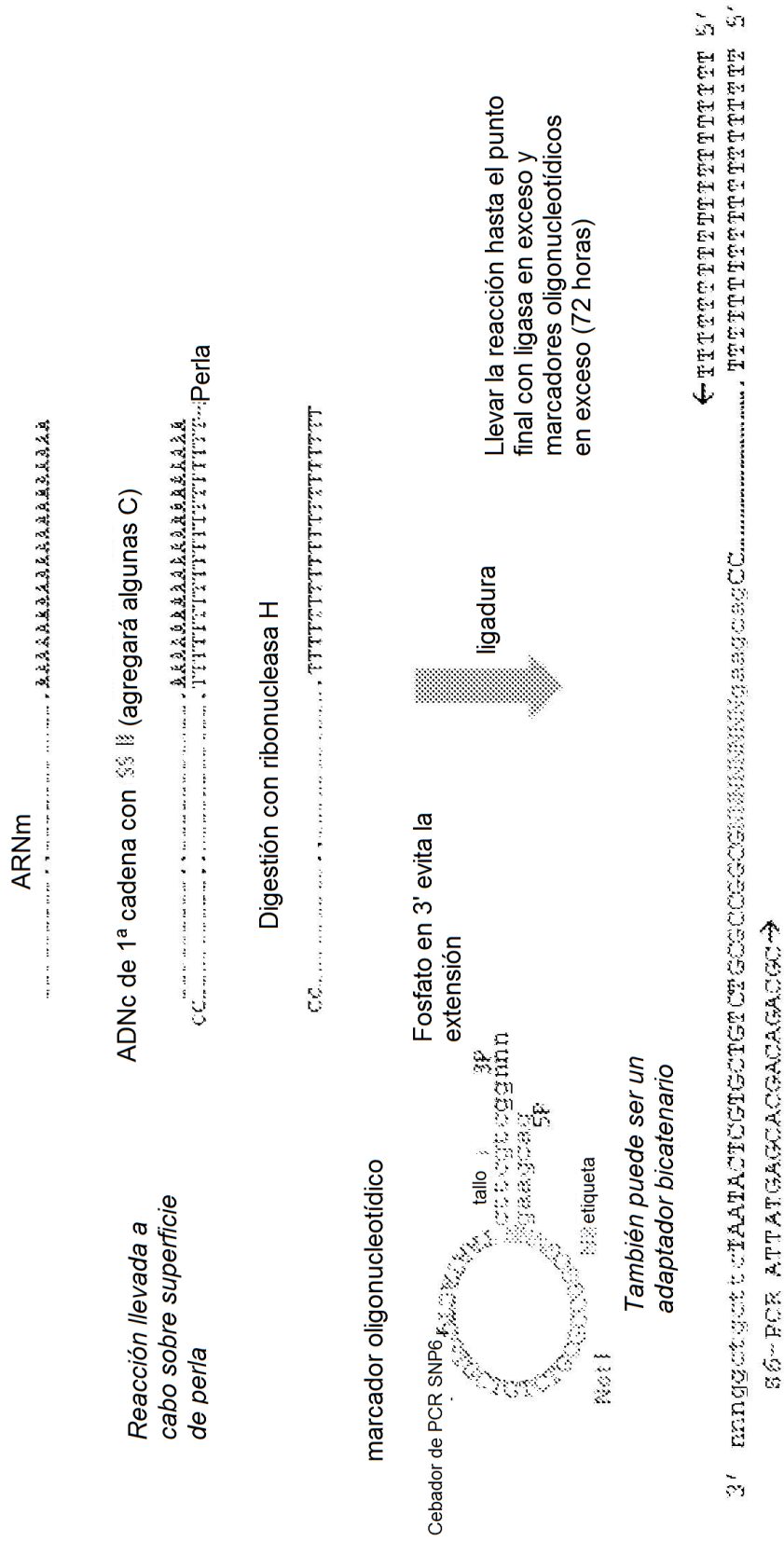
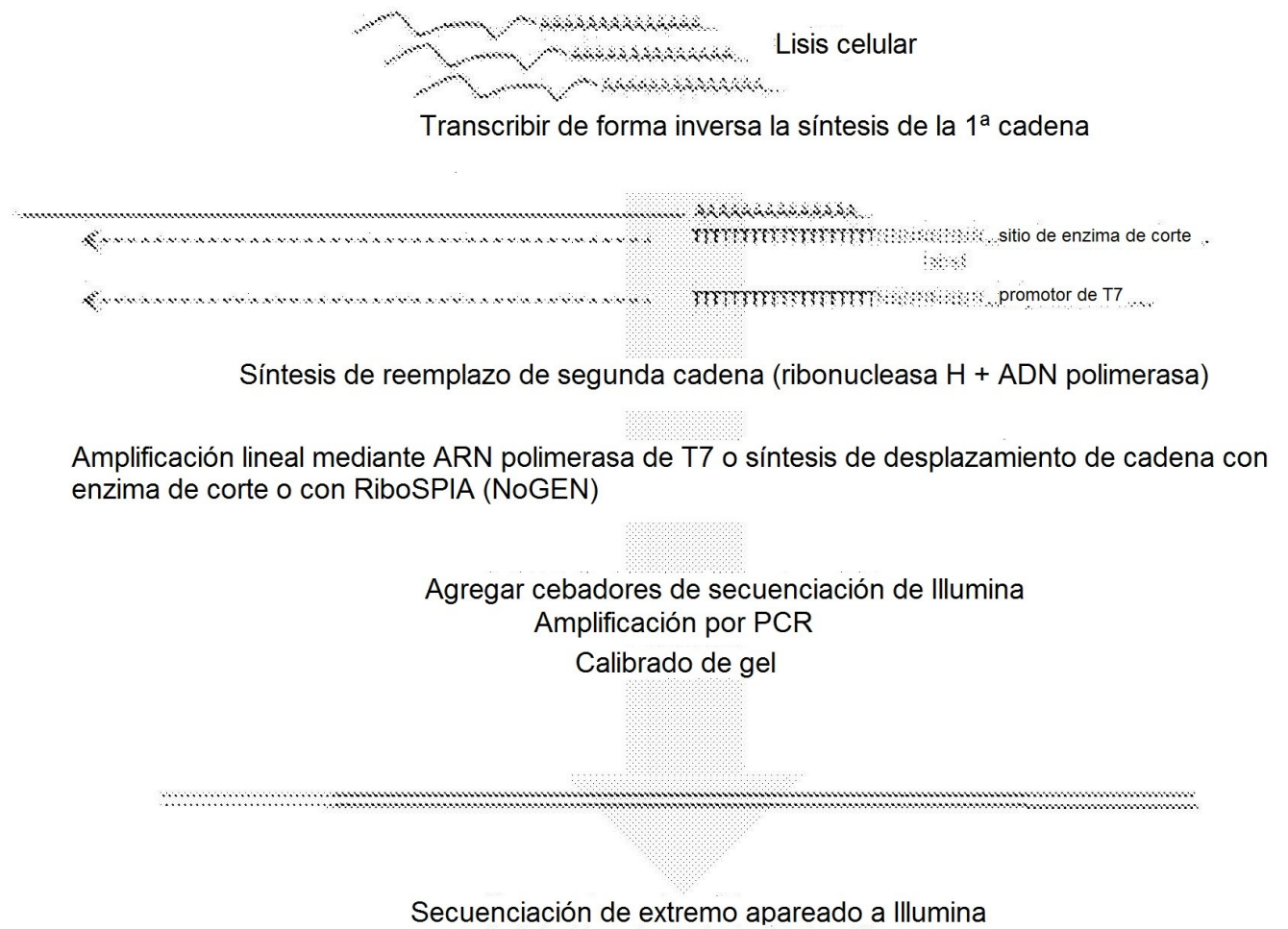


FIG. 28

FIG. 29



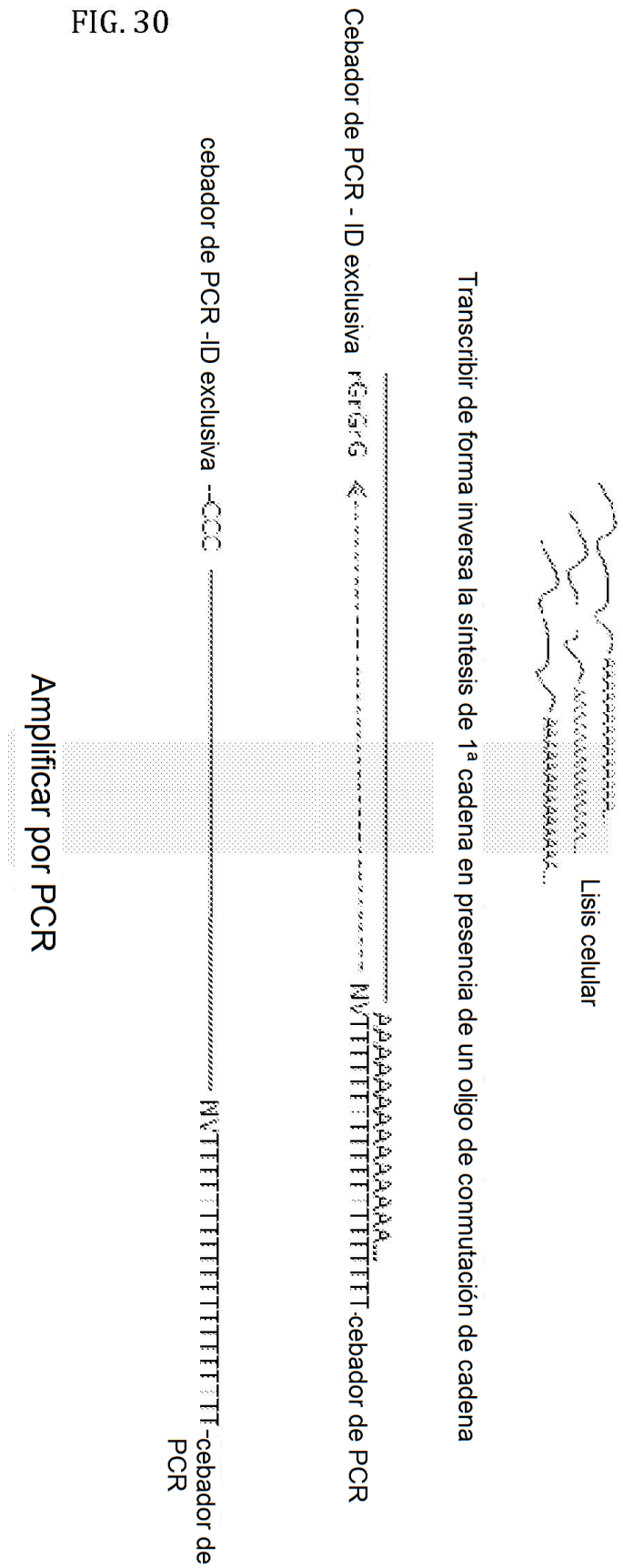
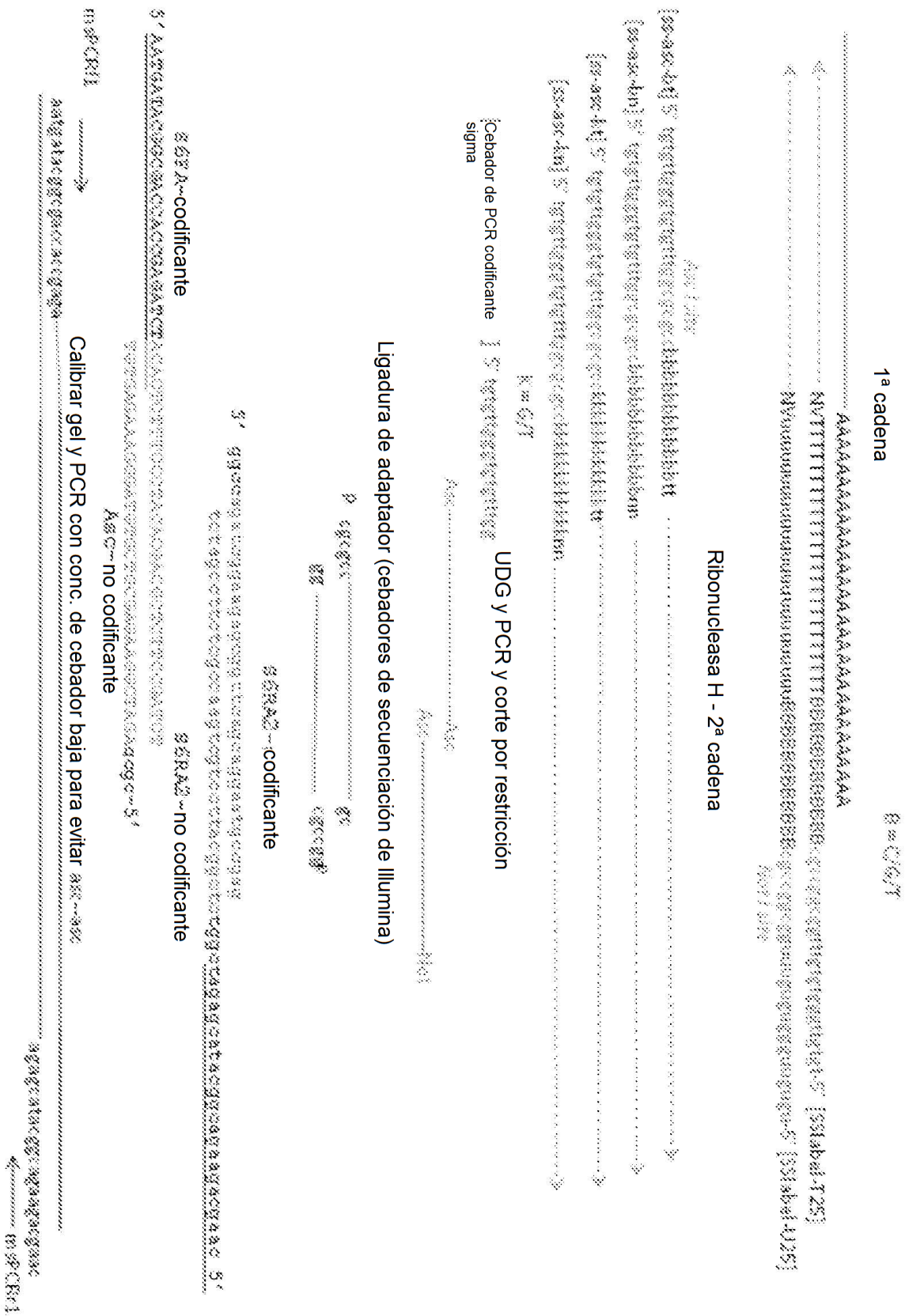


FIG. 31



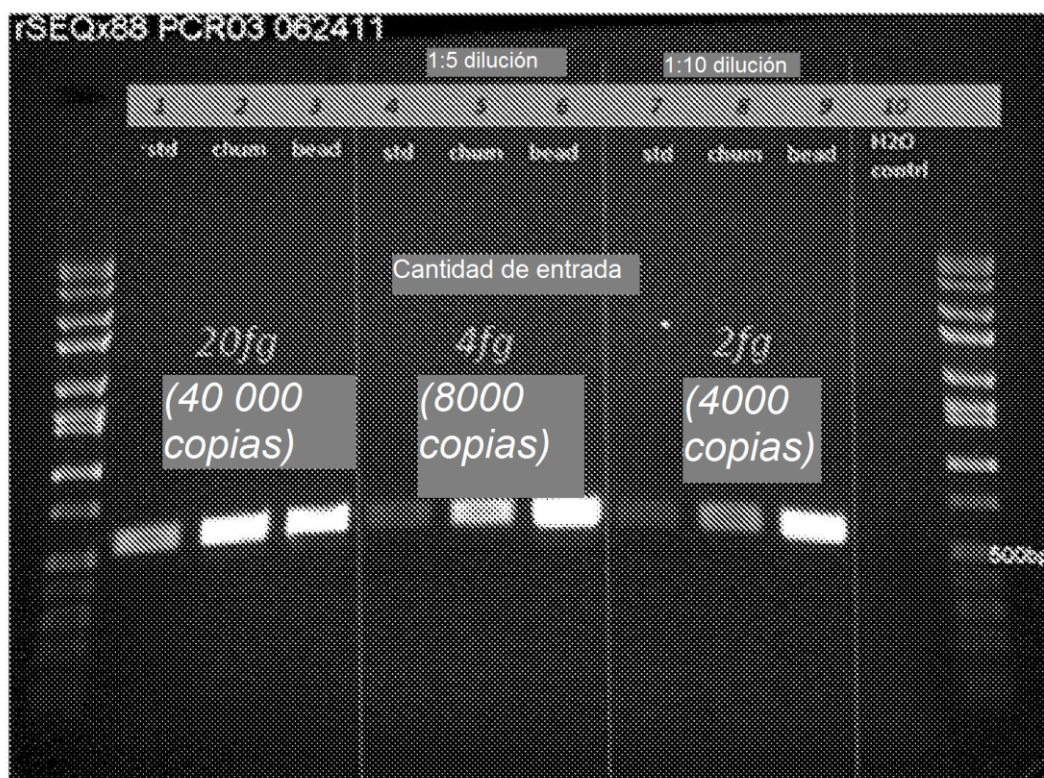


FIG. 32

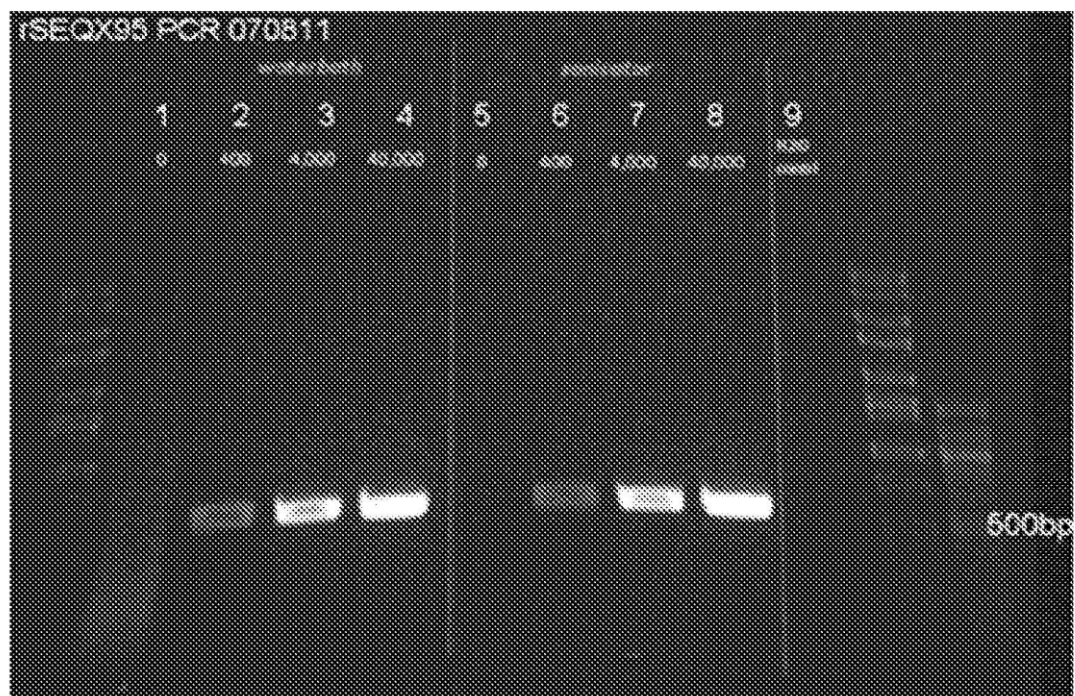


FIG. 33

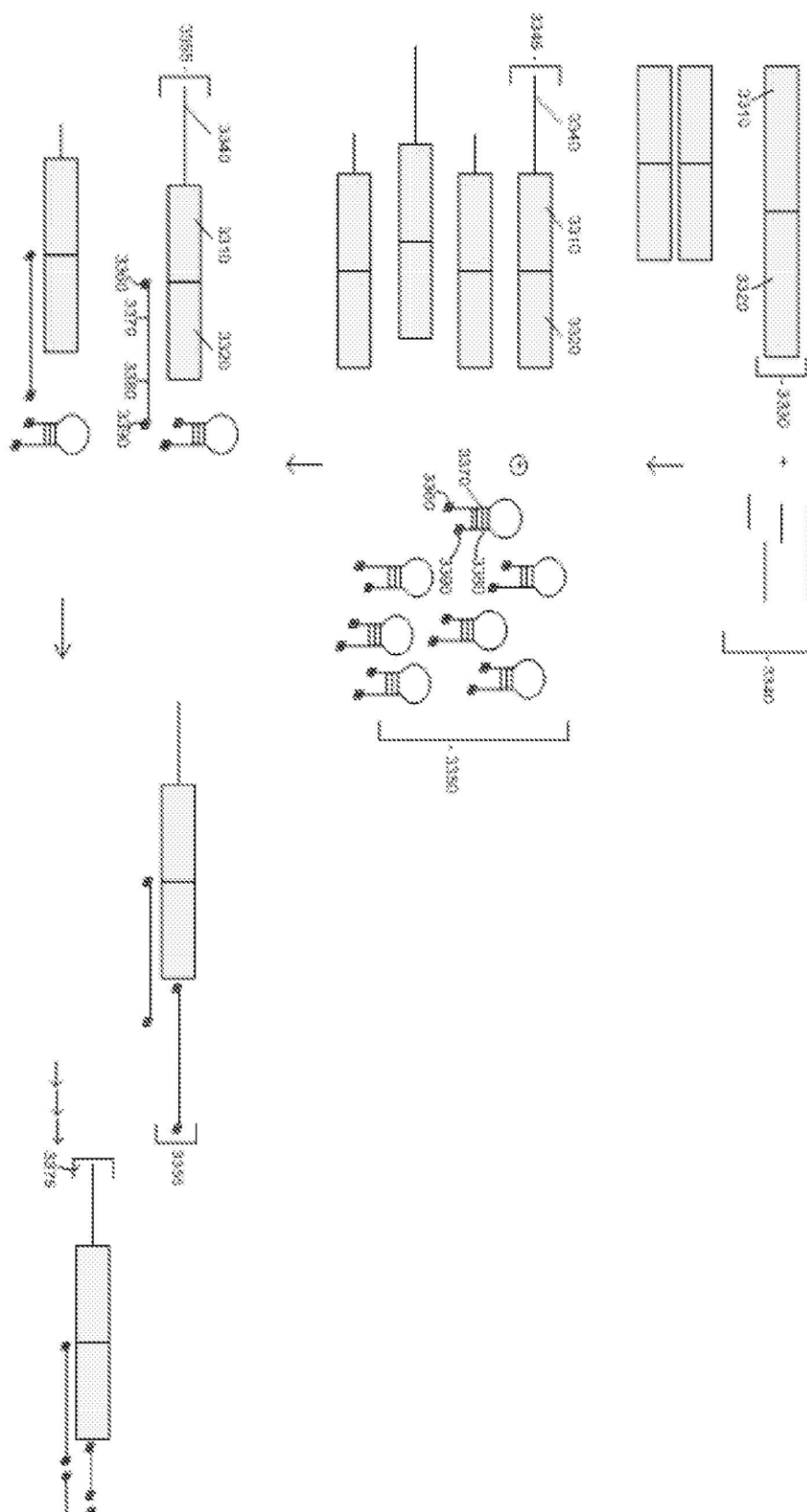
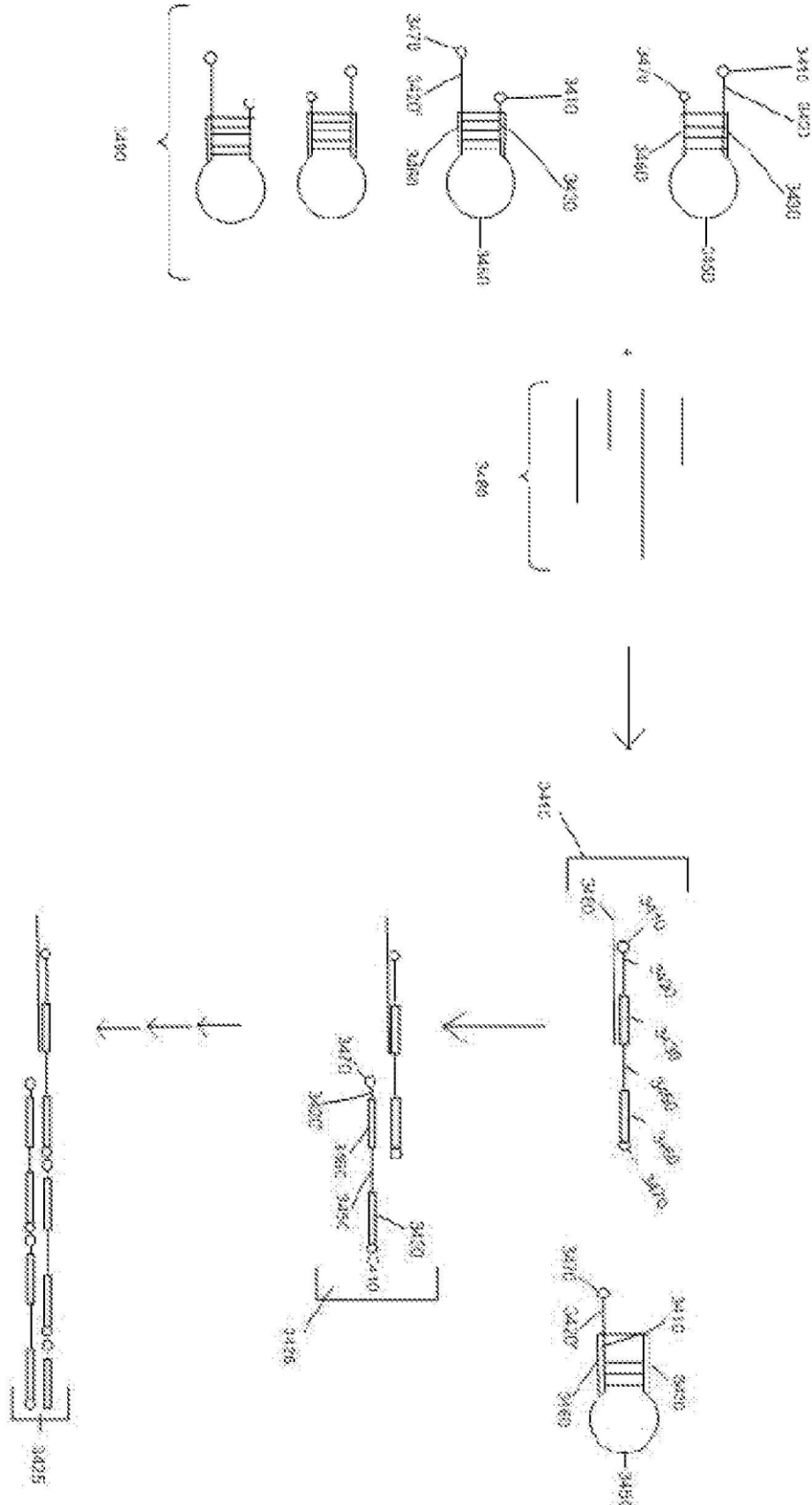


FIG. 34



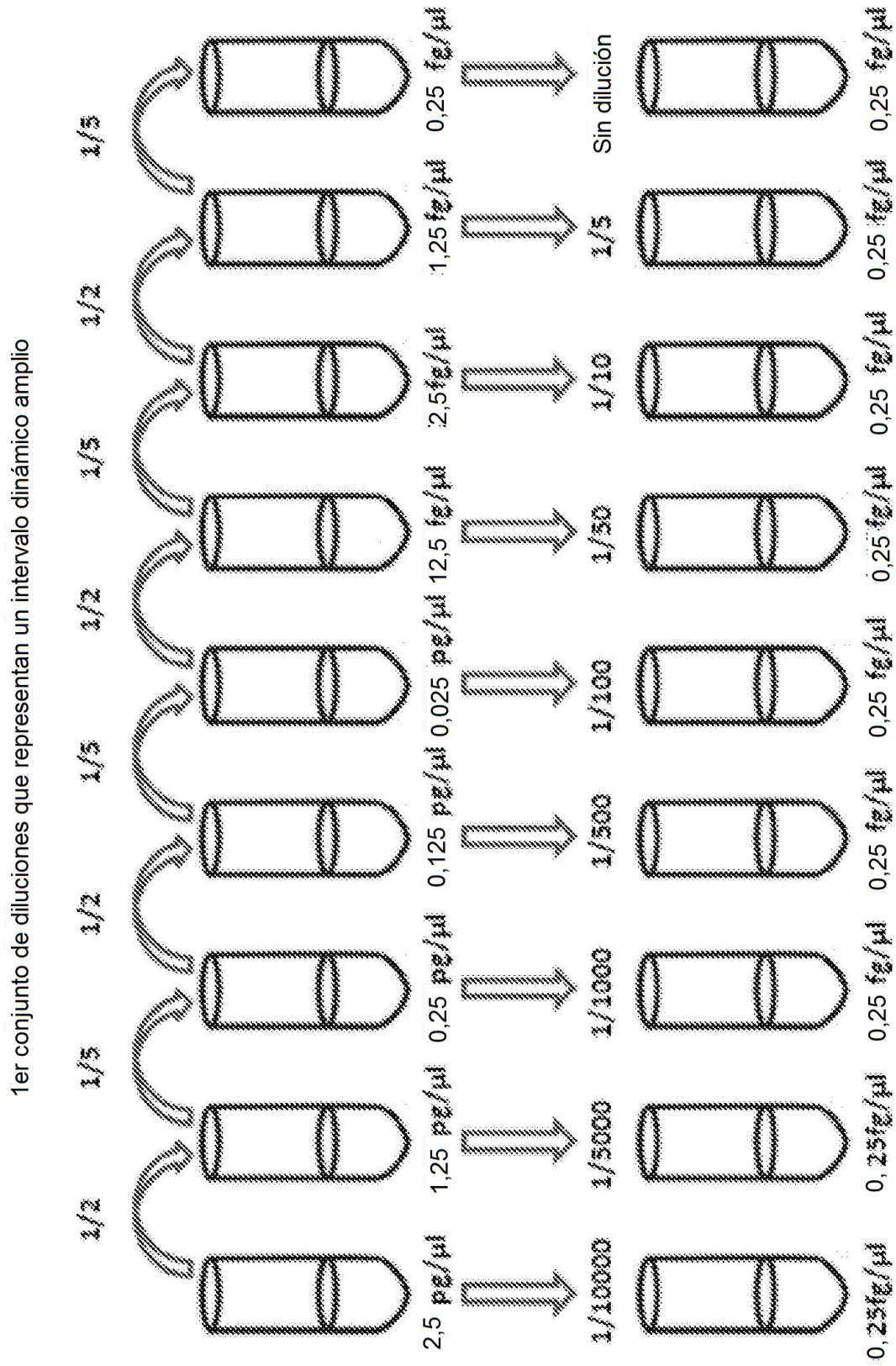


FIG. 35

FIG. 36

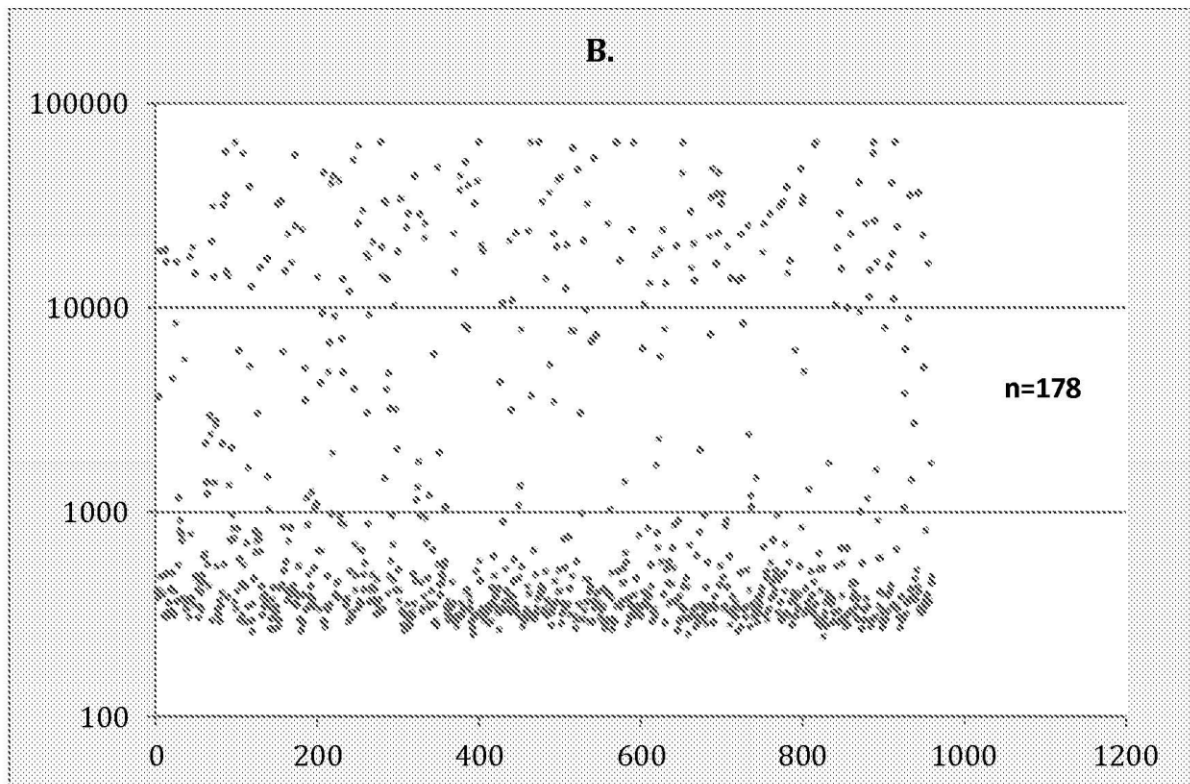
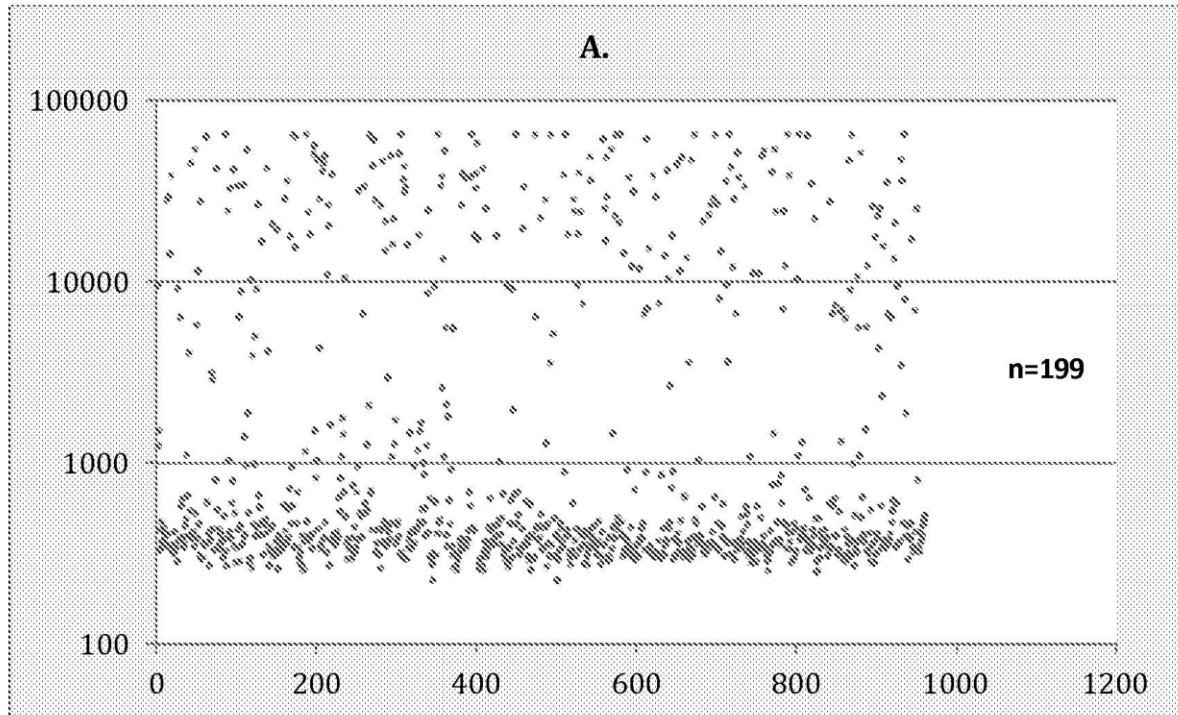


FIG. 36

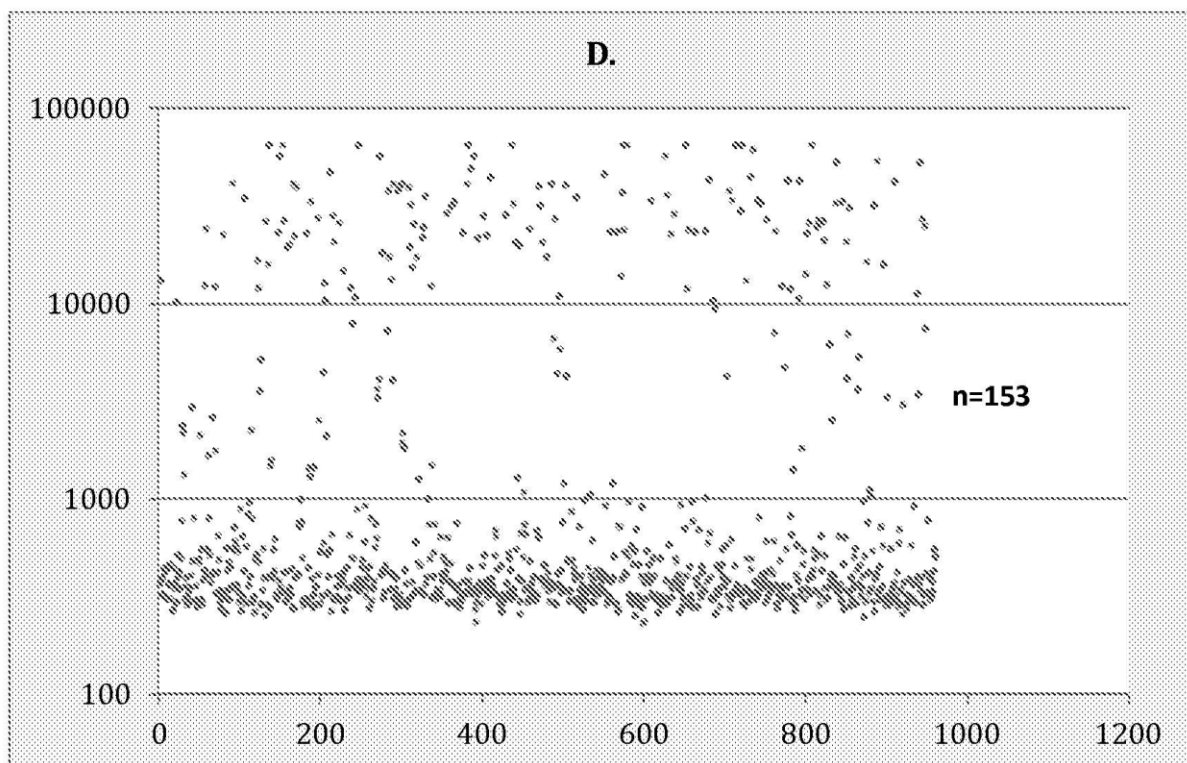
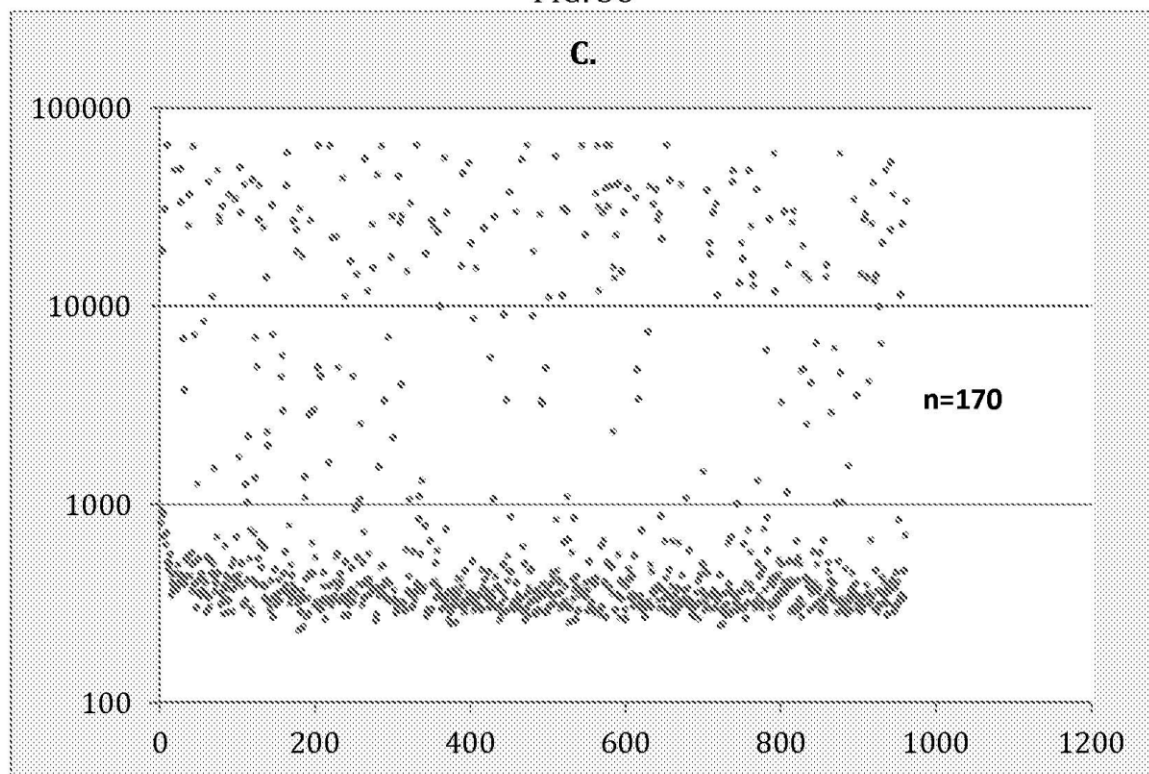


FIG. 36

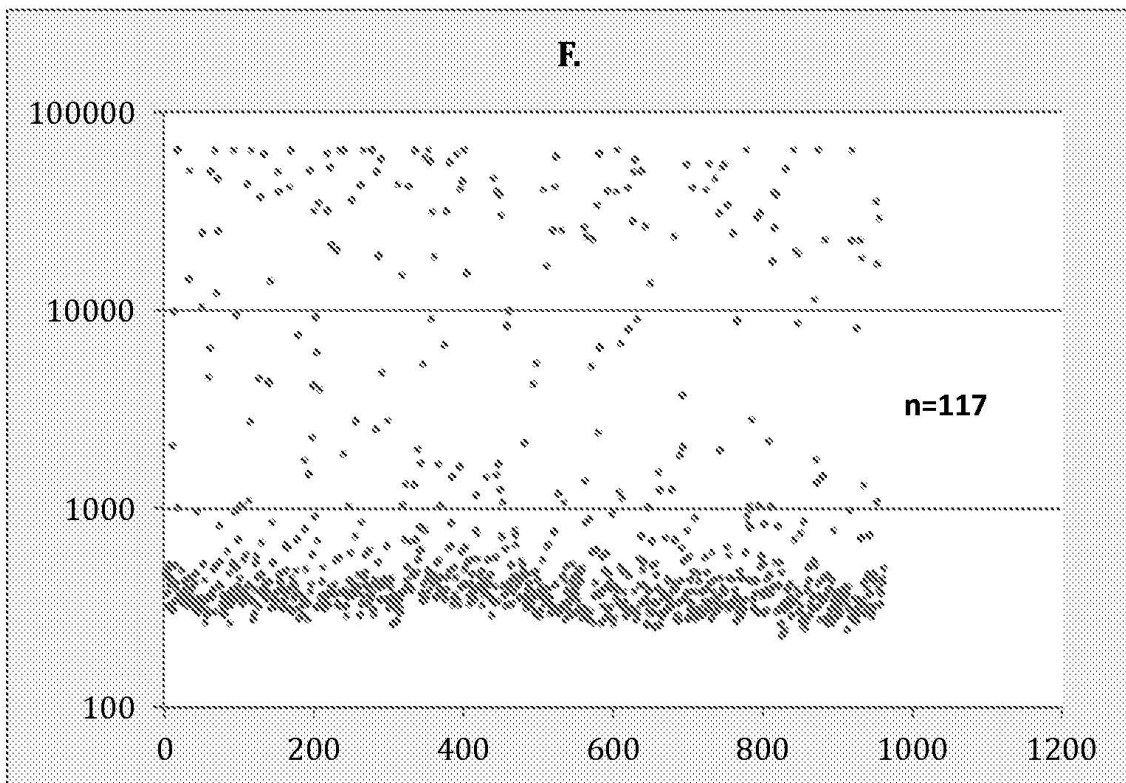
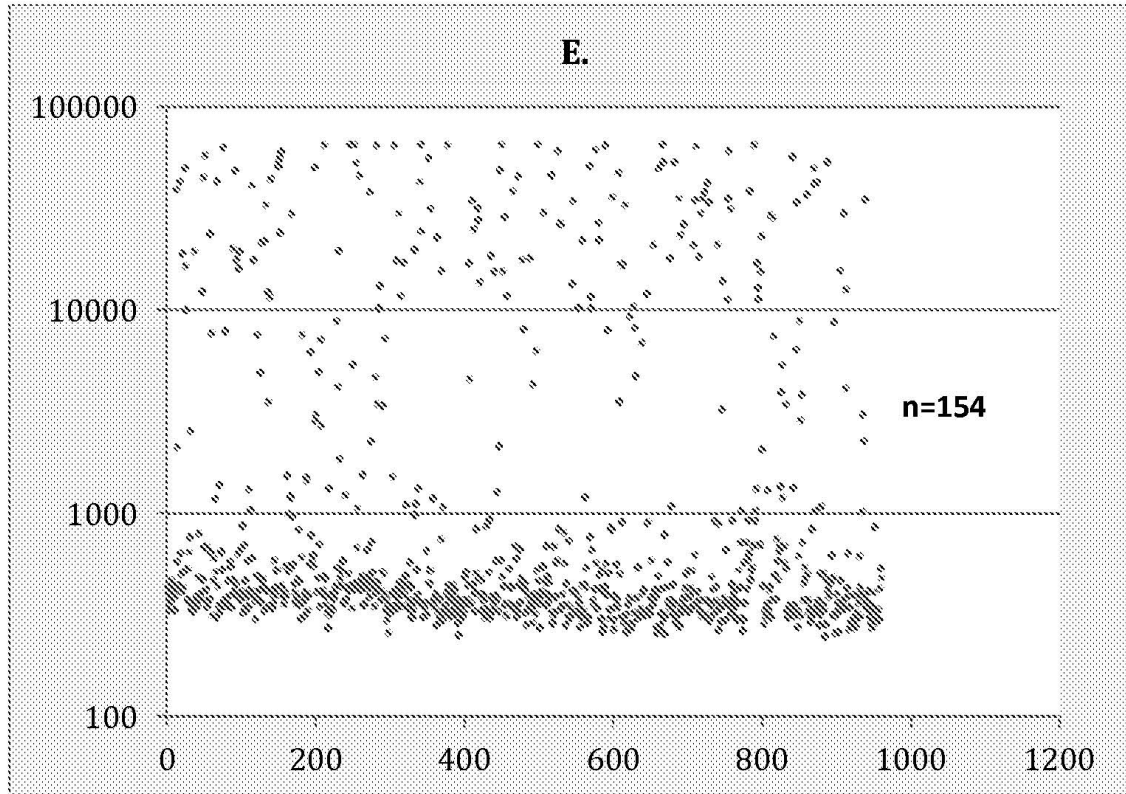


FIG. 36

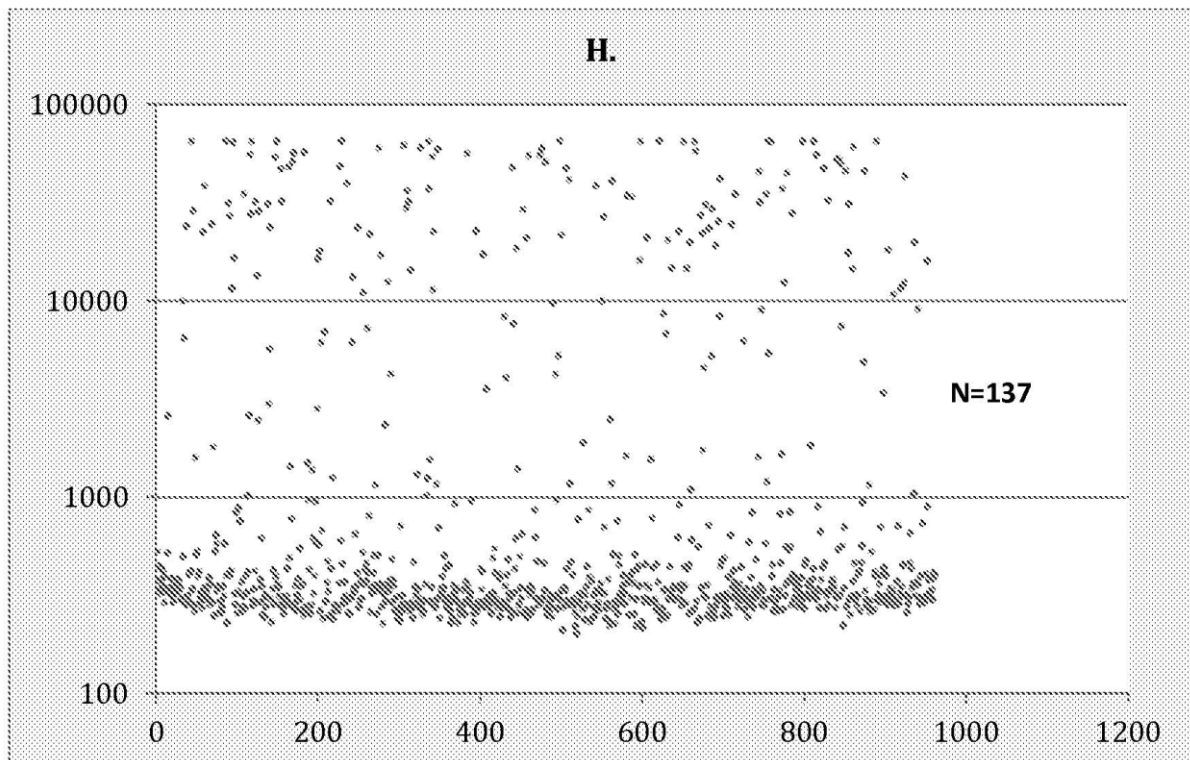
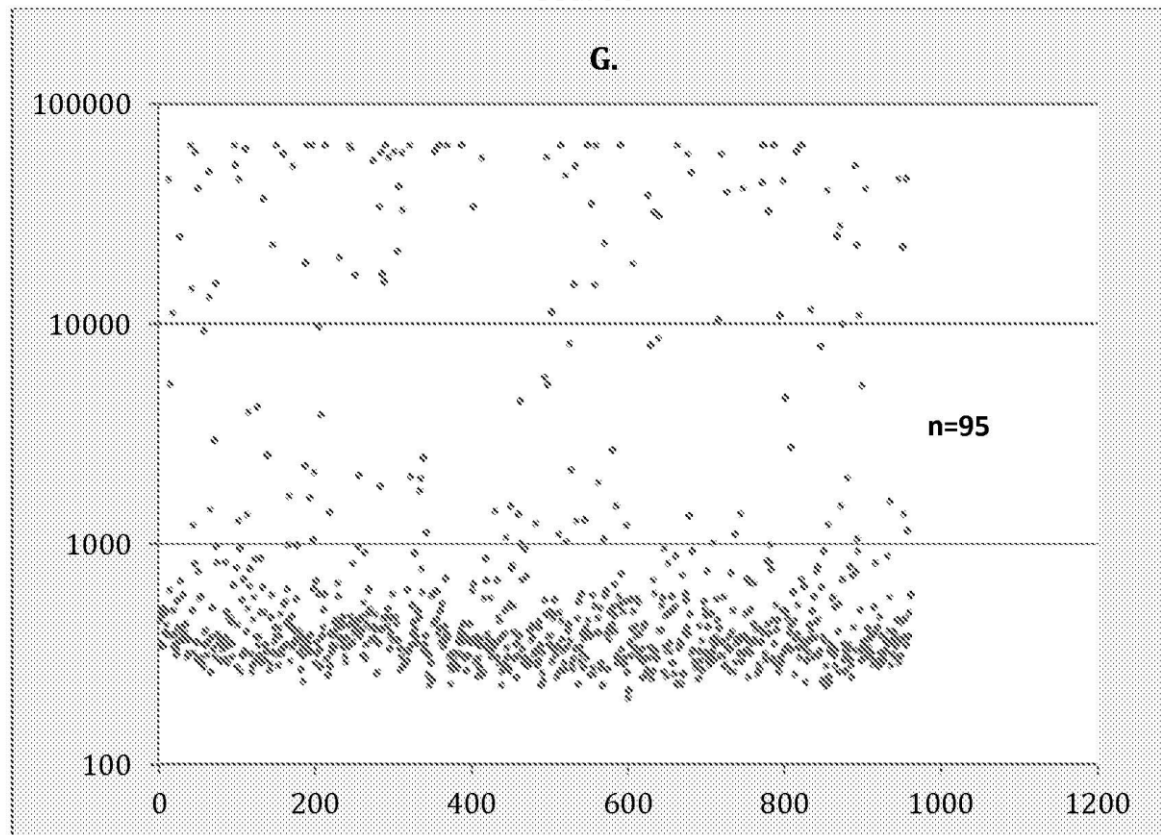
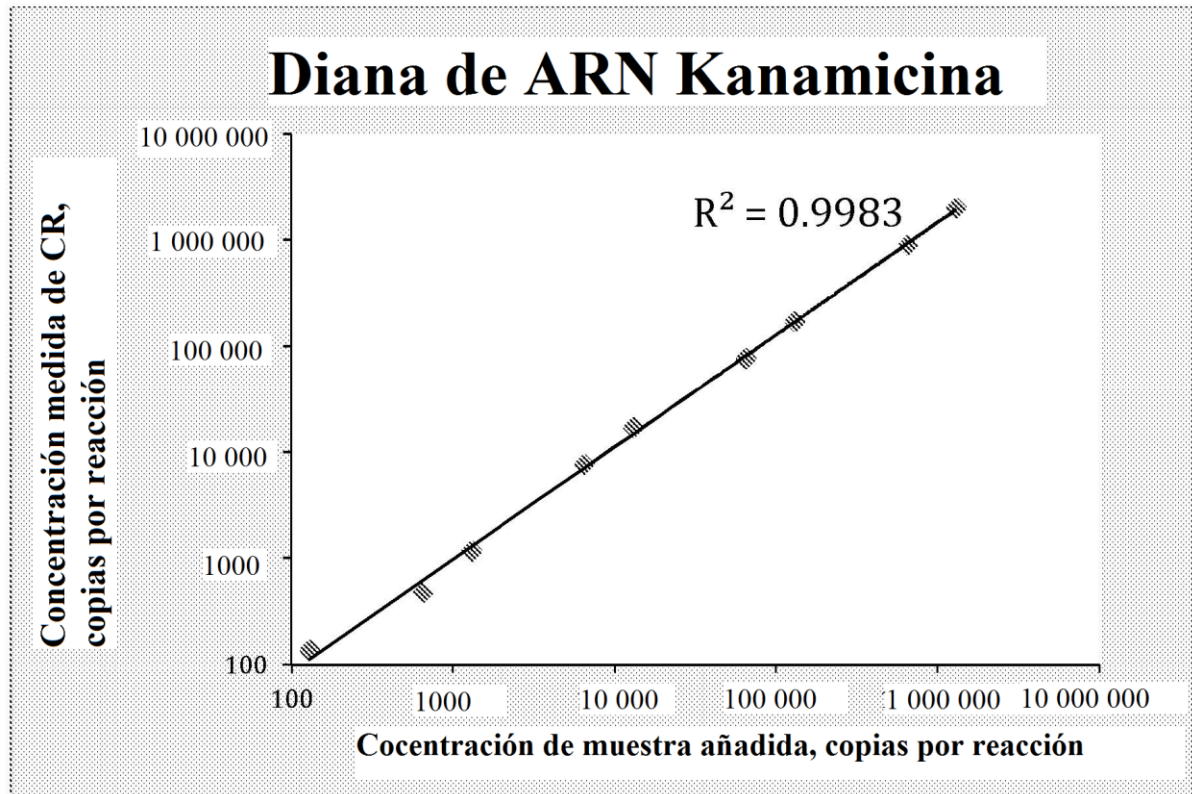


FIG. 37



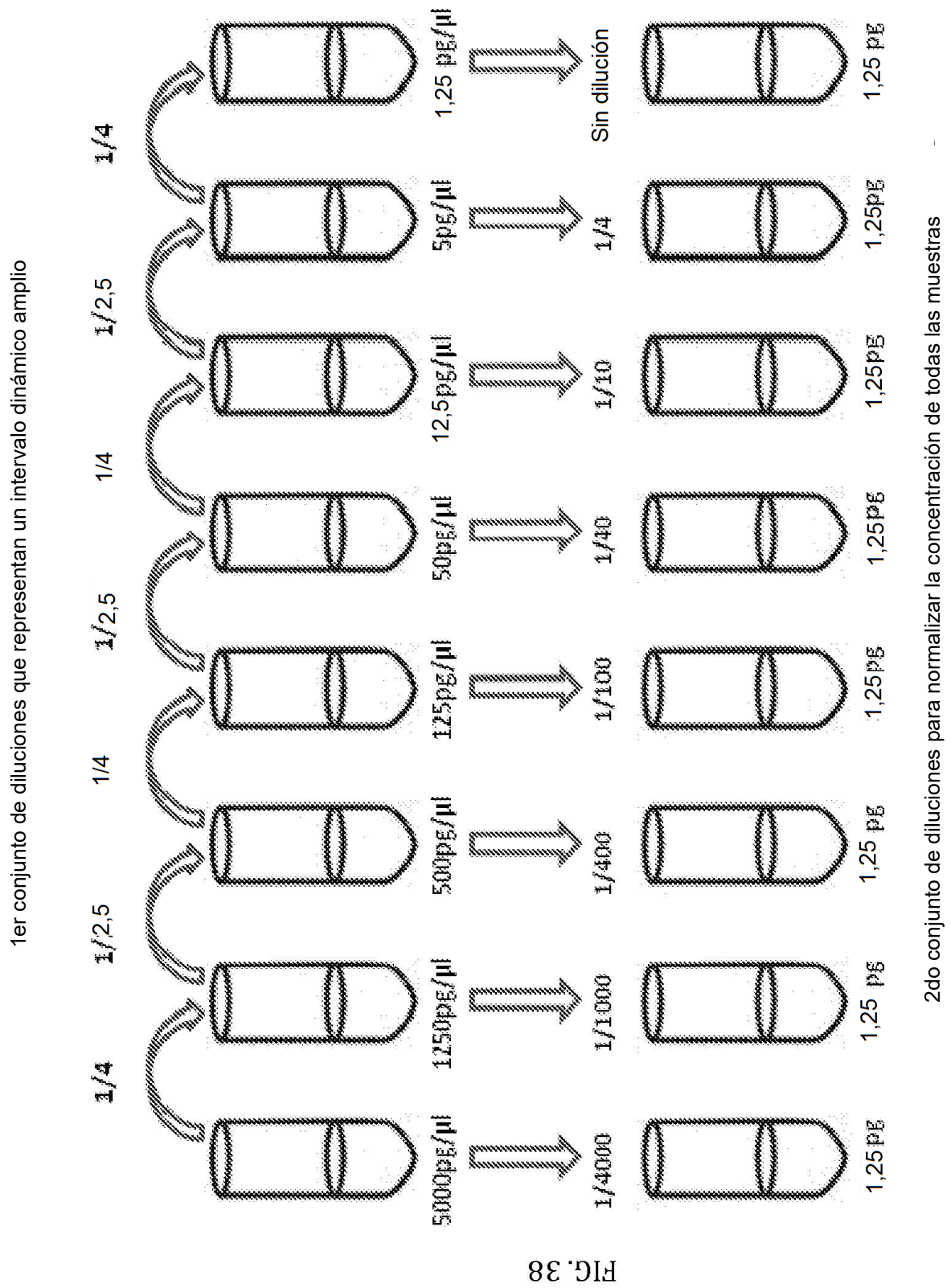


FIG. 38

FIG. 39

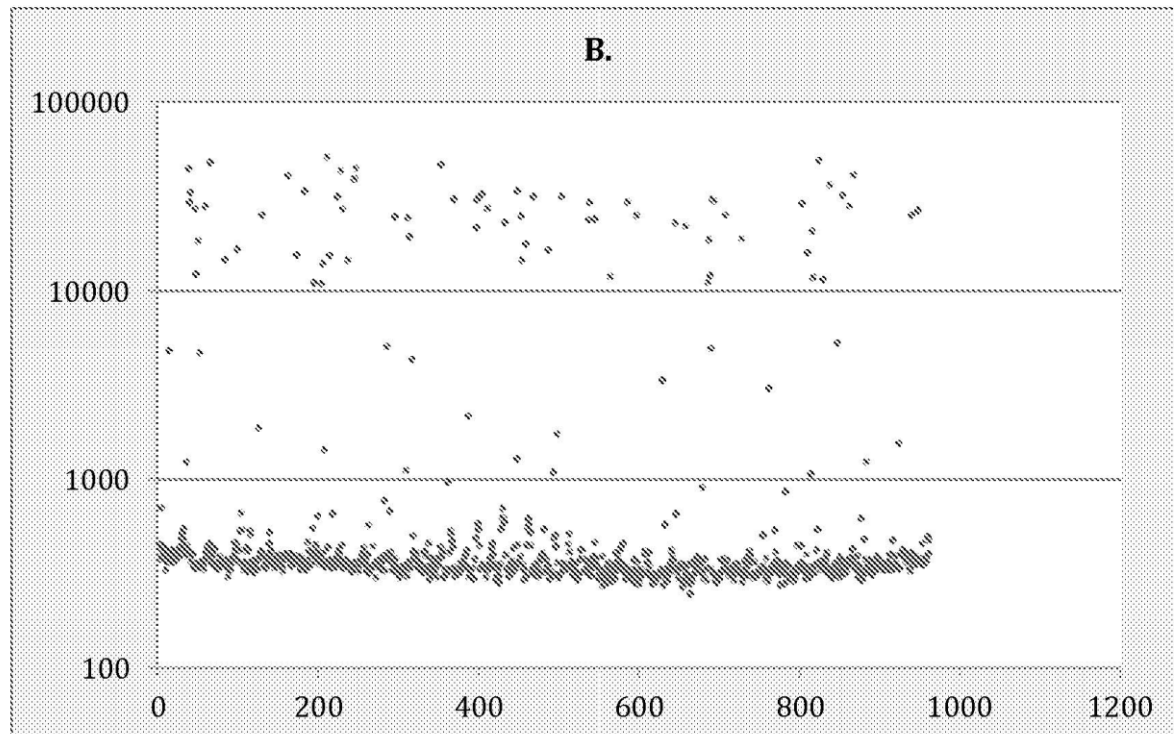
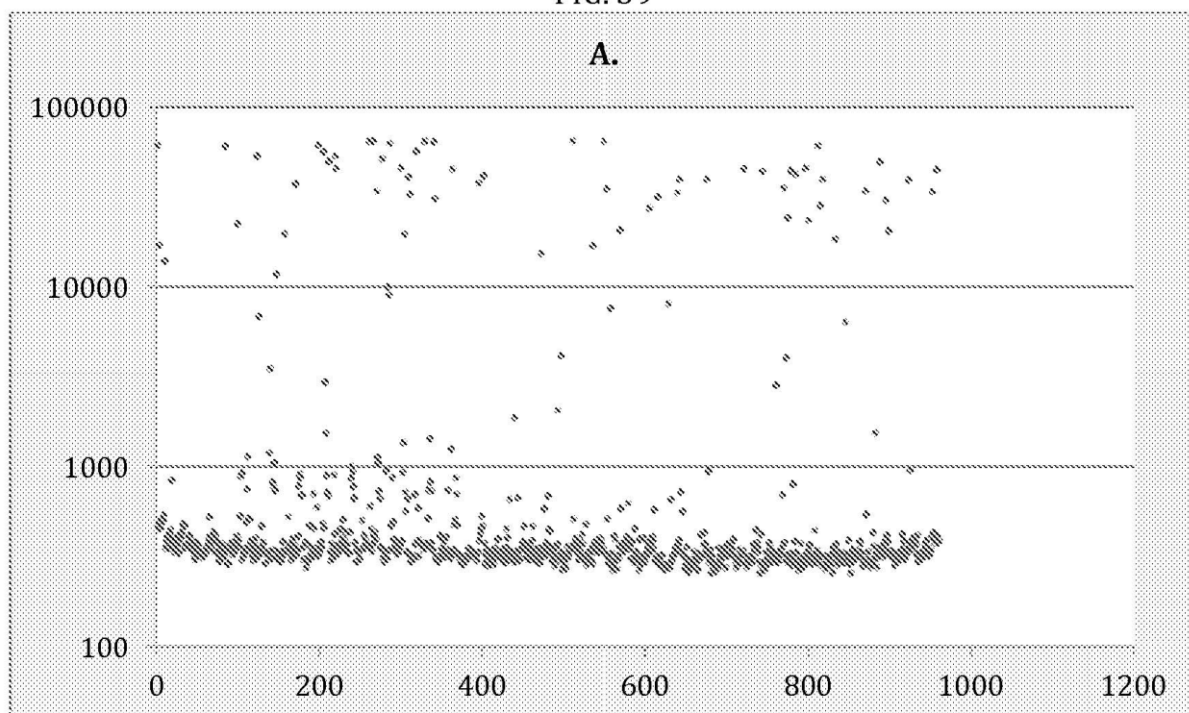


FIG. 39

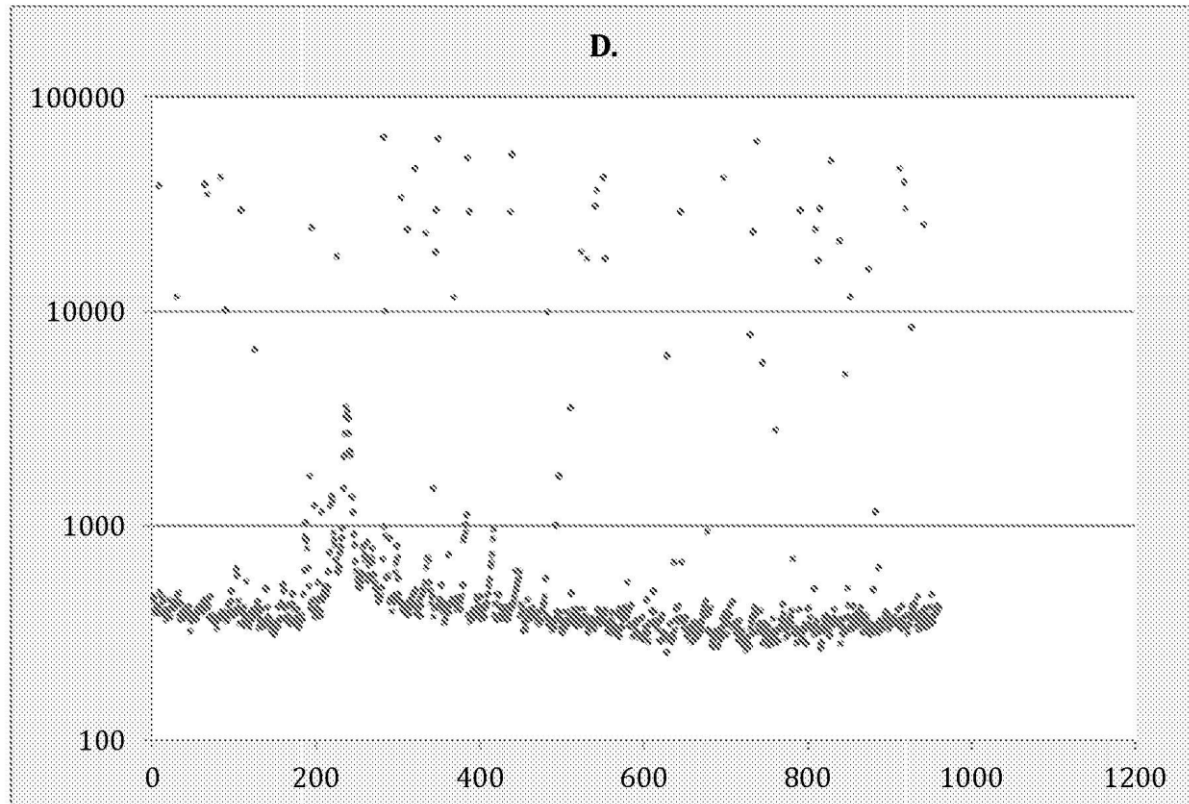
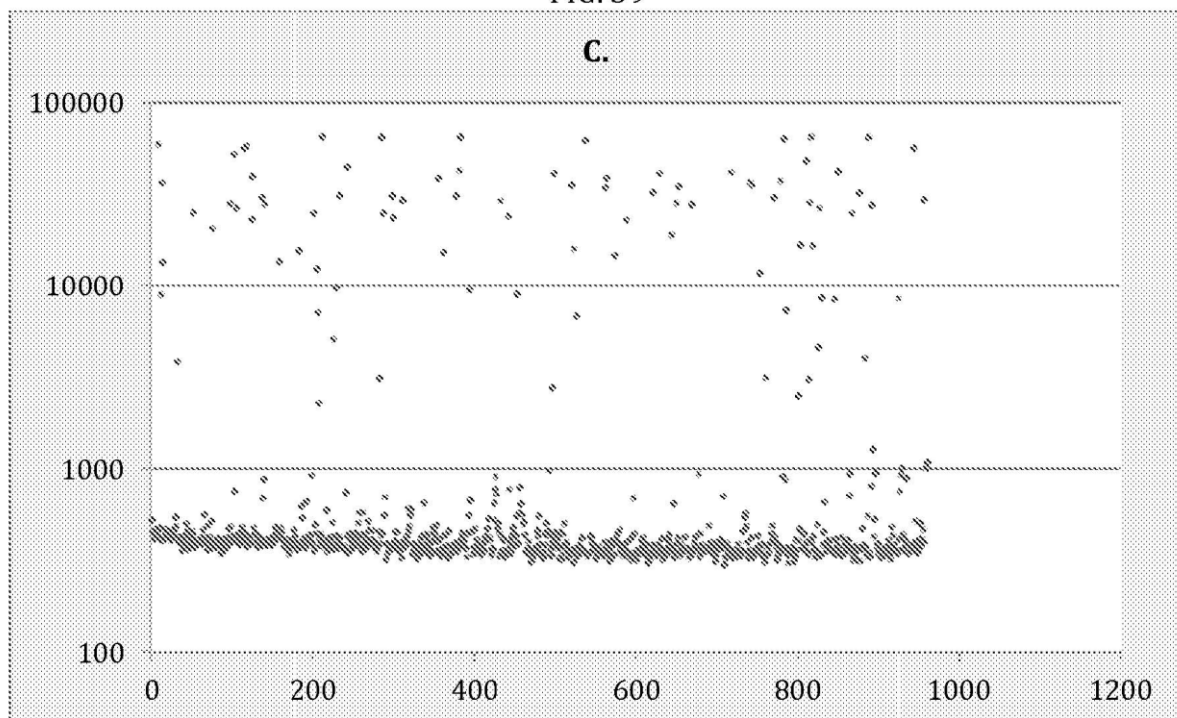


FIG. 39

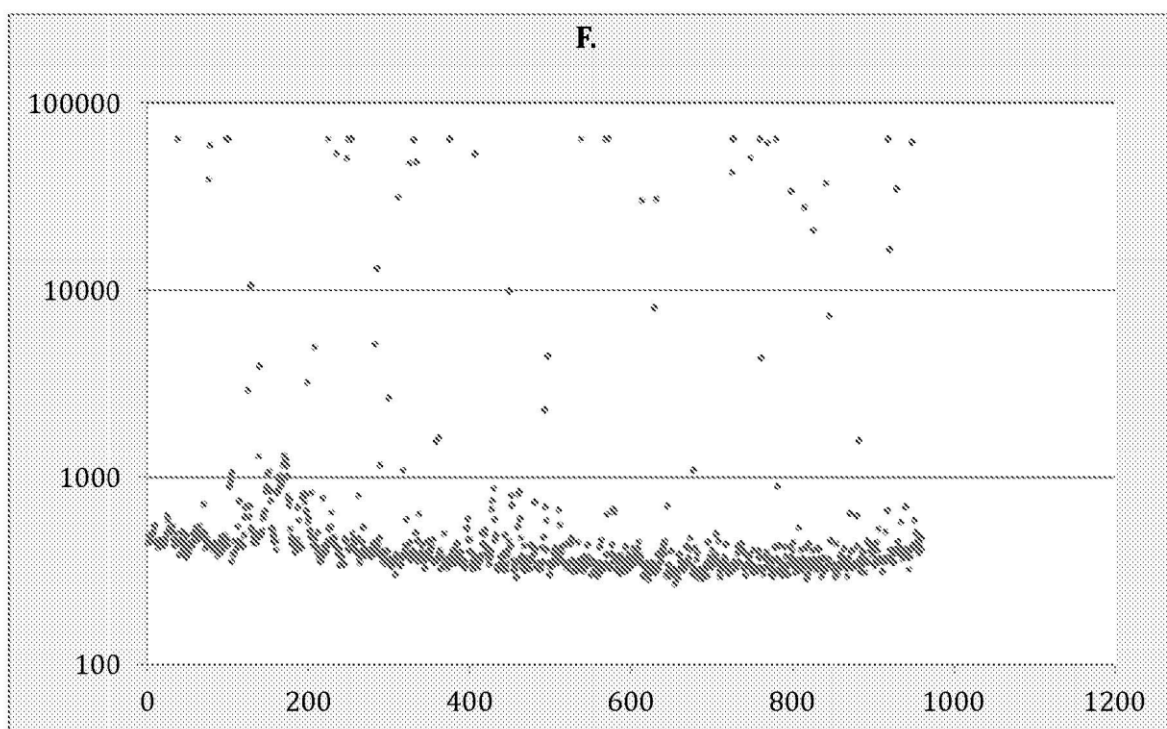
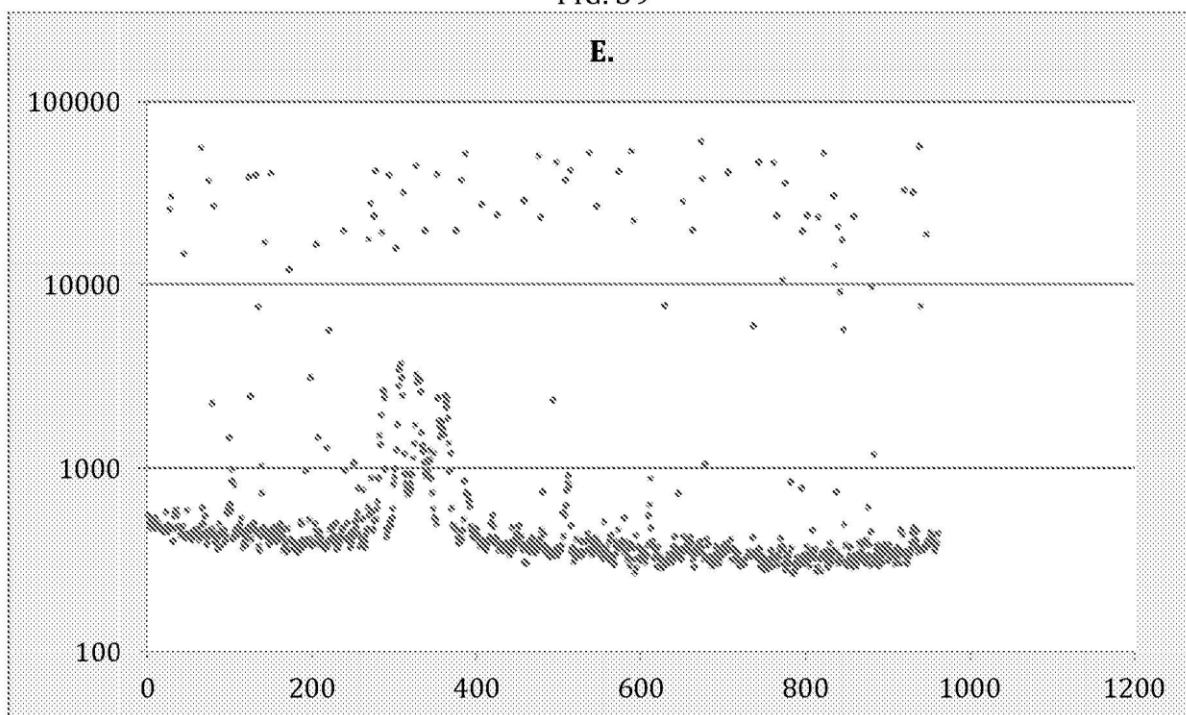


FIG. 39

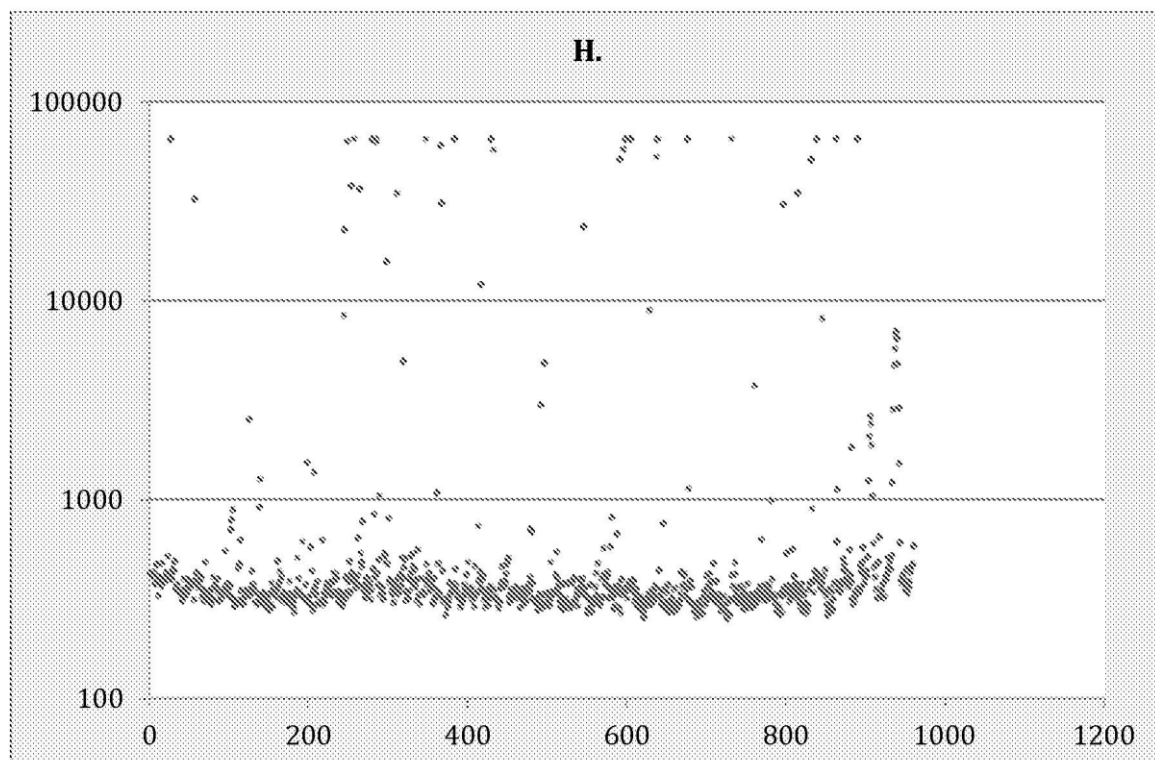
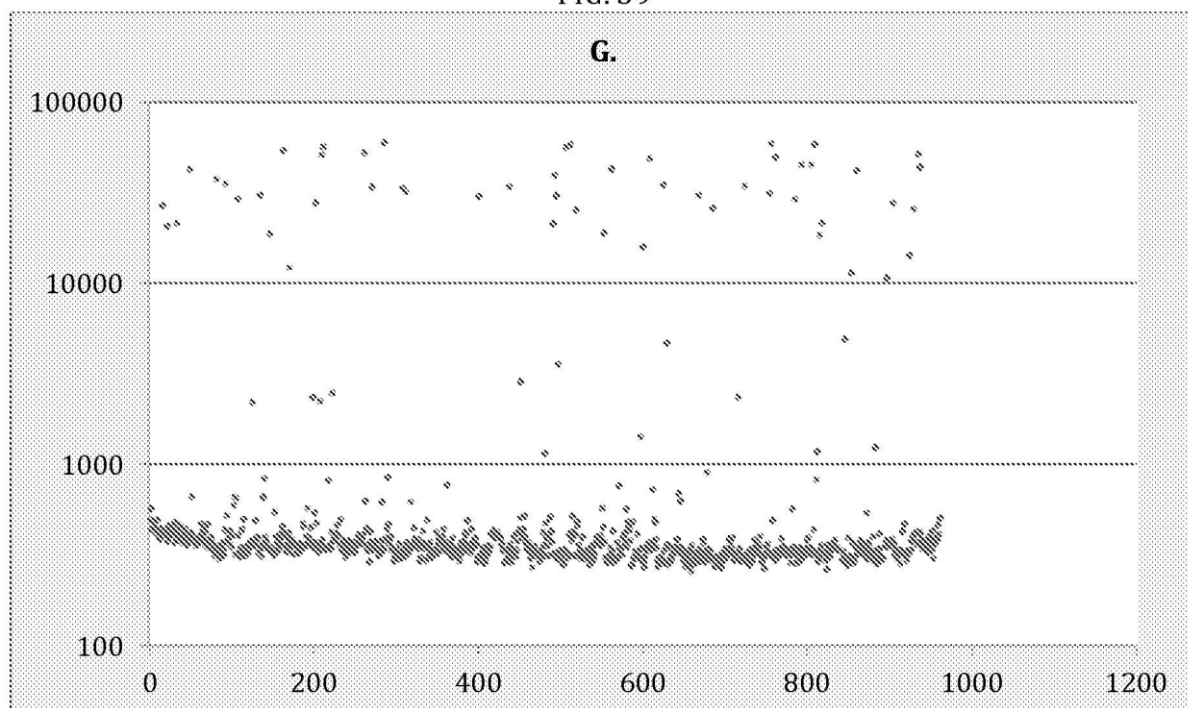


FIG. 40

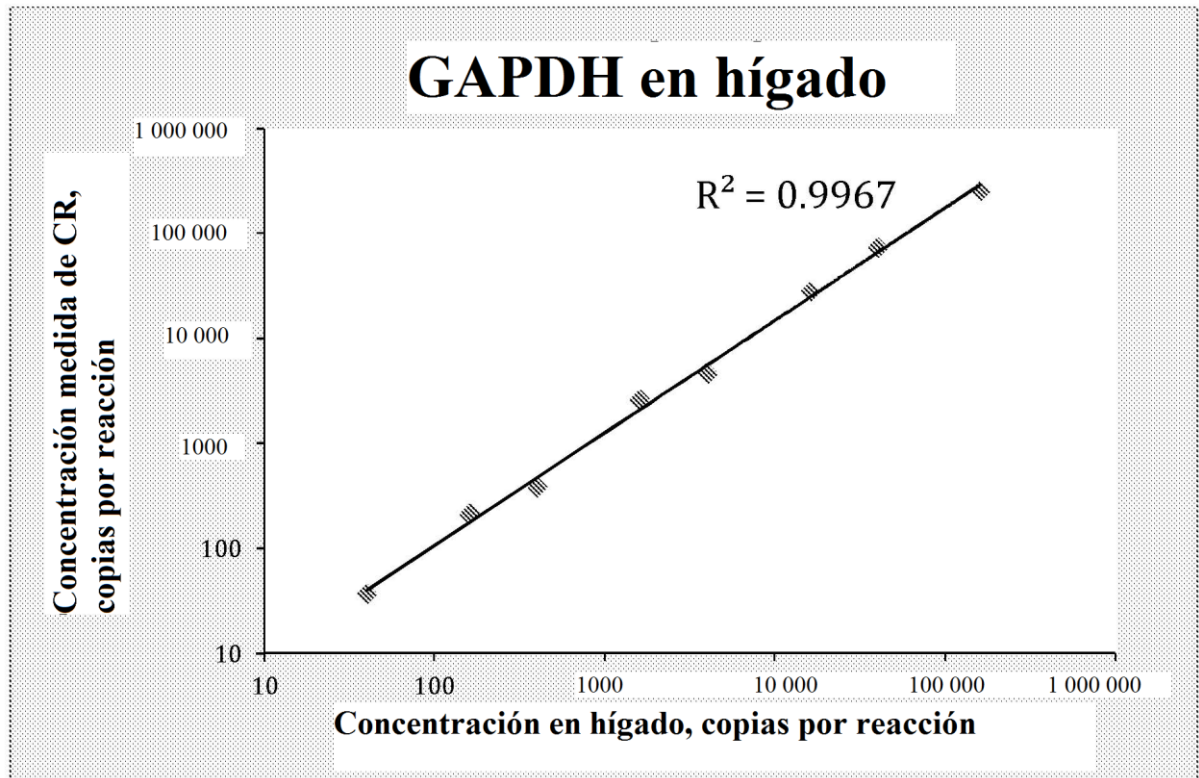


FIG. 41

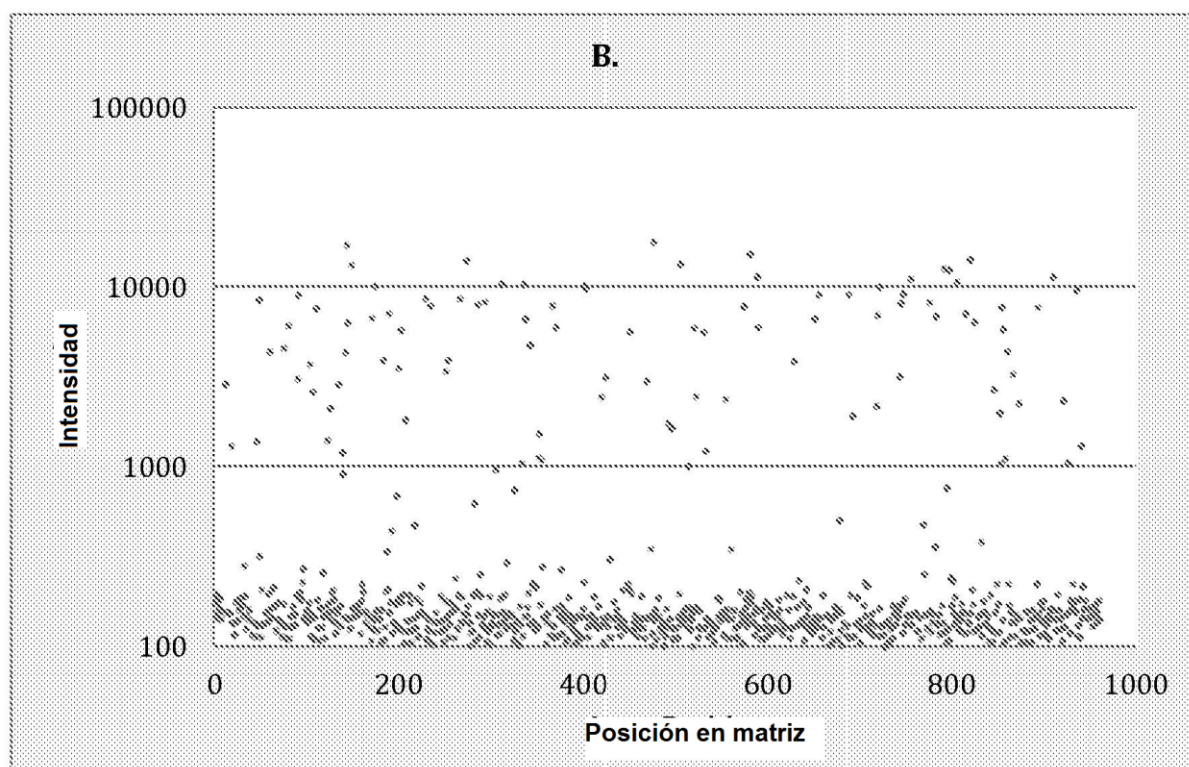
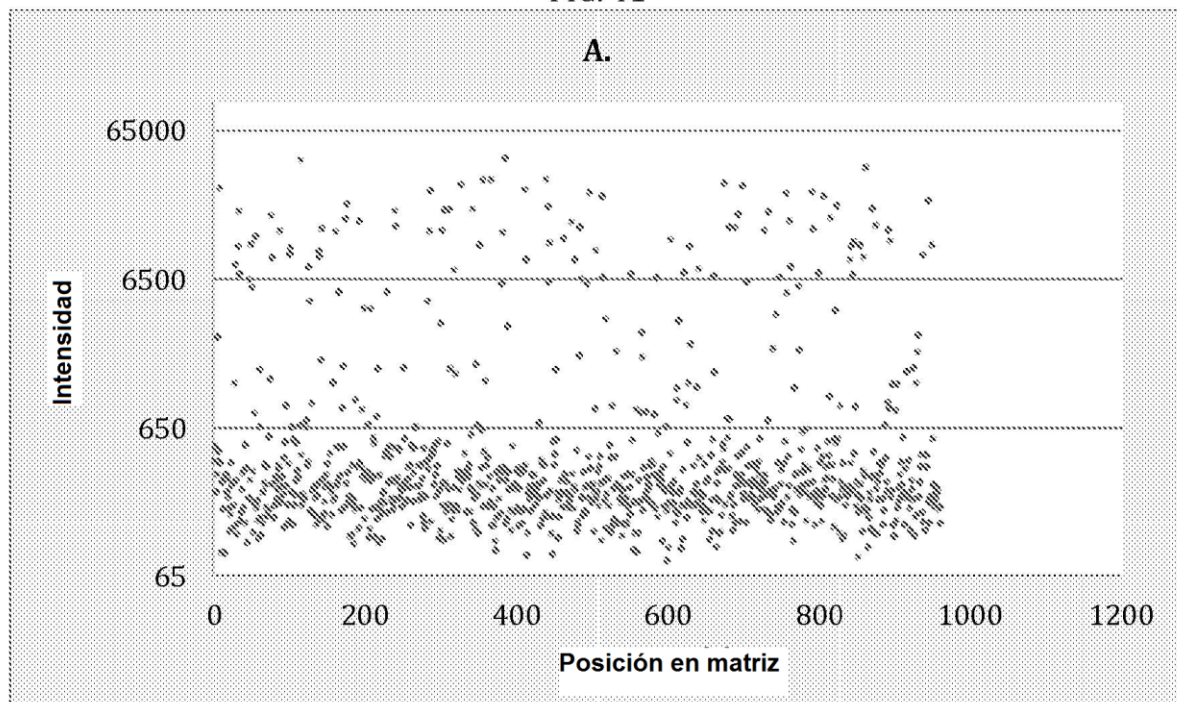


FIG. 41

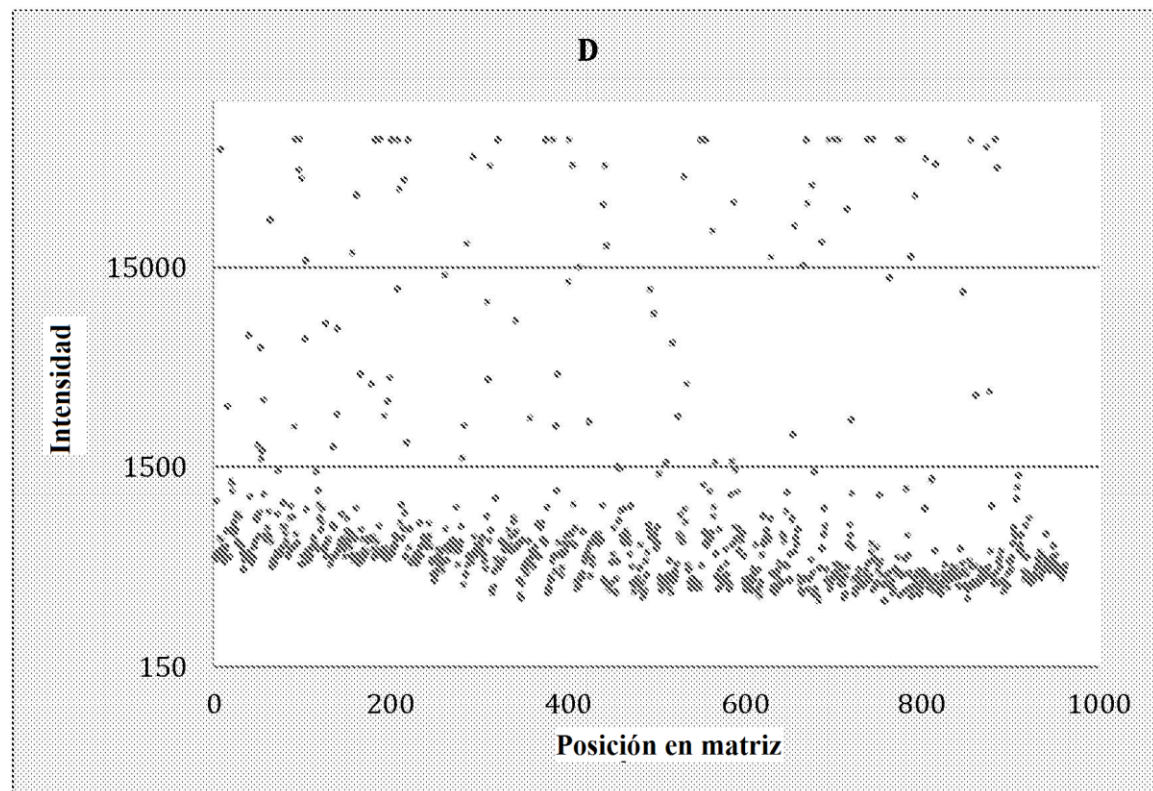
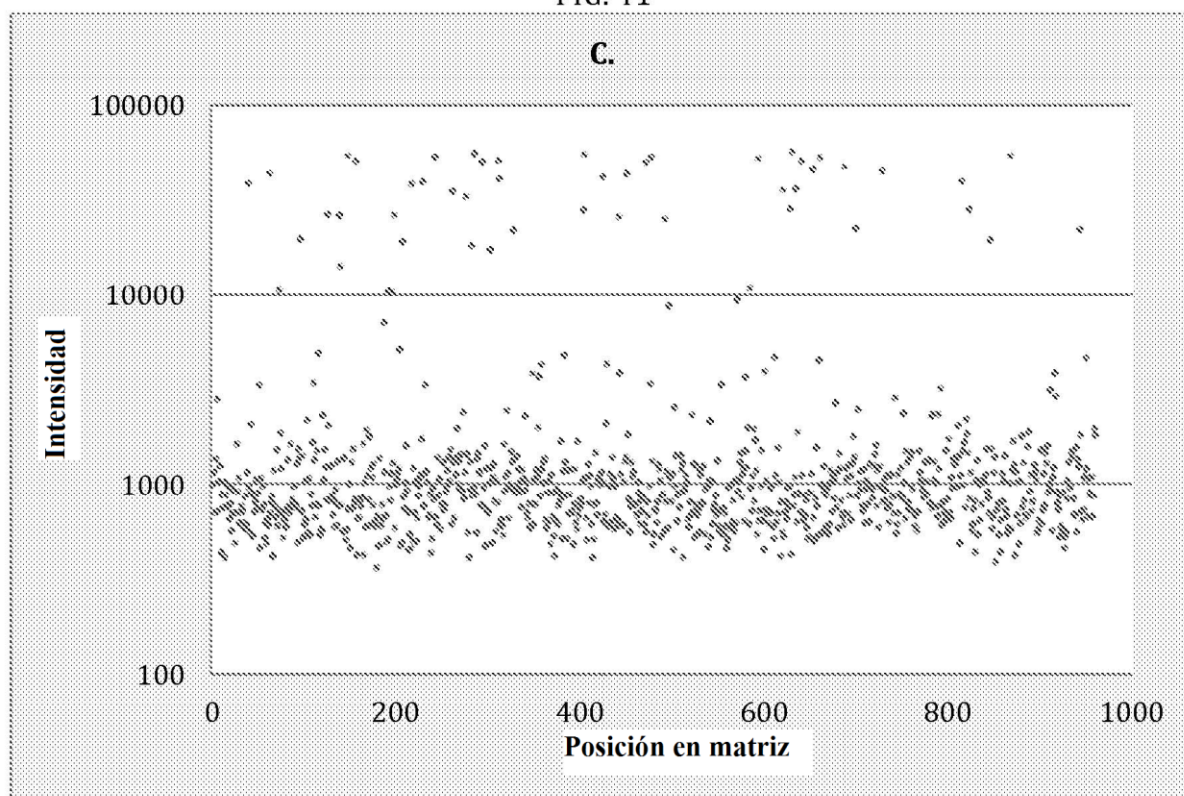


FIG. 42

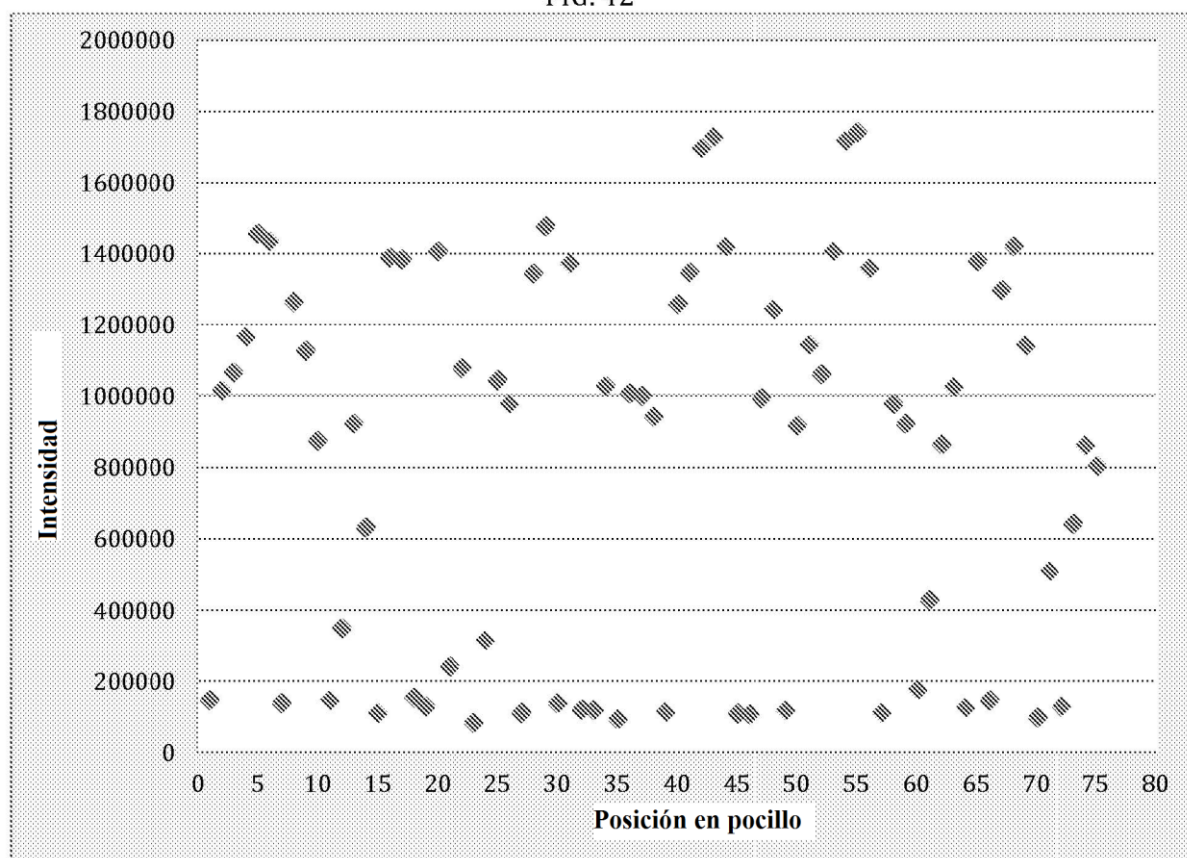


FIG. 43

