



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0614994-4 A2**

(22) Data de Depósito: 16/08/2006
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/00

(54) Título: **QUANTIFICAÇÃO DA HIBRIDIZAÇÃO DE SUSPENSÃO DE MICRO ESFERAS E USOS DAS MESMAS**

(30) Prioridade Unionista: 16/08/2005 US 60/708,734

(73) Titular(es): THE CHILDREN'S MERCY HOSPITAL

(72) Inventor(es): HEATHER NEWKIRK, JOAN KNOLL, PETER ROGAN

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2006032693 de 16/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/022530 de 22/02/2007

(57) **Resumo:** QUANTIFICAÇÃO DA HIBRIDIZAÇÃO DE SUSPENSÃO DE MICROESFERAS E USOS DA MESMA. A presente invenção refere-se a novo ensaio de hibridização de suspensão que foi usado para a determinação de número de cópia de ácido nucléico através de citometria de fluxo. O ensaio foi validado com produtos de baixa cópia (lo) variando em comprimento a partir de 100 até 2304 pares de base conjugados a microesferas de polietileno espectralmente separadas. No exemplo provido aqui essas microesferas conjugadas foram usadas como sondas de hibridização multiplex para detectar seqüências homólogas em ONA genômico extraído a partir de péletes de células citogênicas e marcadas com biotina-dUTP. A hibridização foi detectada com estreptavidina marcada com ficoeritrina e analisada através de citometria de fluxo. As diferenças em número de cópia puderam ser distinguidas através da comparação das intensidades médias de fluorescência das sondas de teste com uma sonda de referência diplóide em DNA genômico de amostras de pacientes e linhas de células anormais. O ensaio é capaz de distinguir um único alelo e três alelos no local do teste a partir de uma seqüência bialélica de referência, sem levar em conta o contexto cromossômico. O ensaio é um aperfeiçoamento de métodos precedentes que requerem a amplificação antecipada do DNA-alvo específico para a localização, devido a que, as sondas 1c proporcionam uma especificidade e sensibilidade adequada para uma determinação, precisa do número da cópia de homólogos-alvo. Devido a sua elevada sensibilidade e precisão, o ensaio é útil para a determinação do número de cópia de um ácido nucléico com relação a uma variedade de aplicações, incluindo a determinação do número de cópia genômico em seres humanos, modelos animais de doenças e na solução, medição de níveis de transcritos, análise de DNA em medicina legal e análise de controle de qualidade na agricultura.

Tabela 1 Características da sonda de hibridização

Gene	Sonda	Comprimento (bp)	Intensidade de Fluorescência	Composições	Quantidade (pg 10)
HOXB1	HoxB1a	2286	51	17	43965662-43967948
	HoxB1b	1343	45	17	43962053-43963388
	HoxB1c	102	50	17	43964237-43964330
ABL1	16-1a	2304	45	9	130623551-130625854
	16-1b	100	60	9	130624671-130624771
	16-2a	1381	48	9	130627853-130628735
	16-2b	101	50	9	130627353-130627454
TEK3	TEK3	98	50	17	15149108-15149206
PMP22	PMP22	101	50	17	15073475-15073576

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"QUANTIFICAÇÃO DA HIBRIDIZAÇÃO DE SUSPENSÃO DE MICROESFERAS E USOS DA MESMA"**.

REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDO DE PATENTE RELACIONADO

- 5 Este pedido de patente reivindica os benefícios do pedido de patente provisório anteriormente depositado Nº de Série 60/708.734, depositado em 16 de agosto de 1005, o qual fica incorporado aqui por referência.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIAS

- 10 Uma Listagem de Seqüências impressa, incorporada aqui por referência acompanha este pedido de patente, e também foi submetida com teores idênticos na forma de um arquivo ASCH, legível por computador em um disquete flexível.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

15 1. Campo da Invenção

- A presente invenção refere-se a materiais e métodos para a detecção de anormalidades cromossômicas com a utilização de sondas de hibridização de ácido nucléico de baixa cópia. Mais especificamente, a presente invenção refere-se a quantificação de anormalidades cromossômicas em seqüências de ácido nucléico através da hibridização de sondas de ácido nucléico conjugadas com microesferas, de baixa cópia para ácido nucléico-alvo marcado. Ainda mais especificamente a presente invenção diz respeito à conjugação de uma microesfera codificada de forma espectral a uma sonda de ácido nucléico de baixa cópia ou de cópia única, hibridizando a sonda para um alvo marcado com fluorcromo preparado diretamente a partir de ácido nucléico derivado de sujeito, detectando o produto da reação de hibridização, e quantificando a resposta detectada através de comparação da resposta detectada com uma resposta detectada gerada através de uma sonda de referência hibridizada de modo similar.

30 2. Descrição da Técnica Anterior.

 O diagnóstico ou a predisposição com relação a doenças humanas quase sempre depende da quantificação das seqüências

específicas de ácido nucléico no genoma ou no transcriptoma. Os métodos atuais para a detecção das anormalidades cromossômicas numéricas ou estruturais incluem a fixação de faixas cromossômicas, hibridização de fluorescência in situ (FISH), hibridização genômica comparativa por conjunto (aCGH) e outras técnicas de microconjuntos, hibridização de sonda multiplex amplificável (MAPH), hibridização dependente de ligação multiplex (MLPA), análise Southern e reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR). A quantificação da expressão de gene através de hibridização de cDNA é tipicamente executada através da análise de microconjuntos (Brown et al.,
5 Science 270: 467-470, 1995).

As anormalidades numéricas são detectáveis com facilidade pela formação de faixas cromossômicas, porém, as anormalidades estruturais tais como os cancelamentos ou duplicações necessitam ser maiores (-3 -5 Mb) e na realidade rompem o padrão de formação de faixas com finalidade de ser detectada com confiabilidade através da formação de
15 faixas cromossômicas. FISH e análises Southern requerem uma grande quantidade de material do paciente, envolvem procedimentos experimentais consumidores de tempo, e o nível de detecção conseguido é de -20 kb até 650 kb. A resolução de um aCGH está limitada ao tamanho e a densidades dos clones da sonda (~ 40 kb para a amplificação de uma seqüência, e de 7-
20 a 130 kb para cancelamentos) ((Shaffer and Bejjani, Hum. Reprod Update, 10(3): 221 a 6 (2004)) e a capacidade de variação do sinal fluorescente pode afetar a precisão da interpretação (Oostlander et al., Clin. Genet, 66(6): 448 a 95 (2004)). O MAPH tem uma resolução de aproximadamente 50 kb (Ar-
25 mour et al., Nucleic Acid Res., 28(2):605-09 (2000)) e embora o MLPA tenha uma resolução mais elevada do que as outras técnicas, ele é consumidor de tempo, e sensível a poliformismos de nucleotídio único em ou próximo aos sítios de ligação o que pode levar a resultados negativos falsos. A qPCR, da mesma forma, deve ser tomada com cuidado para impedir a contaminação
30 (Schouten et al., Nucleic Acid Res., 30(12) :e57 (2002)) e nenhuma das técnicas é multiplexada com facilidade (isto é, combinando múltiplos conjuntos de sondas em uma única reação).

As suspensões de microesferas de poliestireno modificadas de forma espectral, acopladas a seqüências sintéticas de DNA, podem ser hibridizadas com relação a uma seqüência-alvo de ácido nucléico e detectada através de citometria de fluxo convencional como descrita nas Patentes U.S. 5.736.330, 5.981.180, e 6.057.107. Esses ensaios utilizam de 10 a 50 sondas de nucleotídeo de oligonucleotídeo para a hibridização com relação ao DNA -alvo. Outras aquisições de dados multiplexados e plataformas de análise para a análise de citometria de fluxo de análises com base em microesferas foram descritas (Fulton et al., Clin. Chem., 43(9):1749 a 56 (1997)). As análises padronizadas de hibridização de ácido nucléico são bem-conhecidas na técnica e envolvem a utilização de uma sonda de ácido nucléico marcada para identificar as moléculas de DNA ou de RNA -alvo no interior de uma mistura complexa de moléculas de ácido nucléico não marcadas. A hibridização por microesferas tem mostrado ser tanto precisa como sensível para a quantificação da abundância de seqüências de ribossomo a partir de microorganismos em amostras ambientais (Spiro et al. Applied and Environmental Microbiology, 2000, p.4258 - 4265, Vol. 66, No. 10). No entanto, as análises atuais requerem a amplificação do DNA -alvo antes da hibridização com a sonda, e as sondas atuais não proporcionam especificidade e sensibilidade adequadas para quantificar de forma precisa o número de cópias genômicas diretamente a partir de amostras de DNA do paciente. A amplificação através da reação em cadeia de polimerase do DNA -alvo antes da análise pode levar até 5 horas para ser completada com relação a cada seqüência detectada, e quando a análise FISH é usada, os processos de hibridização, detecção e análise podem levar até 2 dias por sonda por amostra. Além disso, a etapa de amplificação exigida pode complicar a estimativa do número de cópias cromossômicas das seqüências -alvo devido a que a amplificação é inerentemente logarítmica e difícil de ser controlada. No entanto, tentativas anteriores com relação à análise direta de DNA genômico não amplificado não tiveram sucesso (Borucki et al., J. Clin. Microbiol., 43(7):3255- 59 (2005)).

A técnica anterior que se segue é diferente da presente inven-

ção, uma vez que em todos os métodos abaixo, a amplificação antecipada da amostra -alvo foi necessária, e as sondas acopladas as microesferas foram oligonucleotídeos que não foram definidos como de cópia única ou de baixa cópia em todos os casos. Seqüências altamente reiteradas no genoma ou na transcrição não exigem necessariamente amplificação para uma detecção confiável, porém seqüências de cópia única ou de pouco número de cópias em grandes genomas complexos tem esta estipulação com a finalidade de ser obtida uma sensibilidade adequada para a detecção. O que se segue é uma relação de trabalhos publicados e de patente que envolve a hibridização em suspensão de microesferas. As patentes relacionadas abaixo são distintas da presente invenção, uma vez que elas são capazes em termos da quantificação direta do número de cópias de seqüências no ácido nucléico -alvo.

a. Análises de analito de conjugado de microesfera codificado de modo espectral; Patentes U.S. 6.649.414, 6.449.562, 6.395.470

b. Detecção de PCR e DNA com a utilização de oligonucleotídeos: Patentes U.S. 6.057.107, 6.060.240, 5.981.180, 5.736.330, 6.916.661, e 5.981.18

c. Técnica de hibridização por conjunto de suspensão de microesferas envolvendo a hibridização de seqüências de oligonucleotídeos com relação a DNA amplificado por PCR: Patentes U.S. 5.736.330 & 6.057.107 e Fulton et al. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system, Clin Chem 1997 Sep; 43(9): 1749-56.

d. A Patente U.S. Nº 5.981.180 descreve um método para a utilização de contas codificadas por cor em conjunto com citometria de fluxo para a execução de análise biológica multiplexada.

e. Um método para análise multiplexada de fragmentos de DNA ligados a microesferas e quantificação de ácido nucléico com a utilização de marcador ativado por luz fixado ao ácido nucléico -alvo foi patenteado por Dattagupta e Nanibhushan, 2001; Patente U.S. 6.620.586.

f. Se seguem patentes pertinentes à fixação de oligonucleotídeos a microesferas, e detecção de produtos da PCR, detecção de polimorfismo

ou metilação em análises de hibridização. As tecnologias que se seguem podem ser usadas com aquela da presente invenção, porém estão separadas da mesma. "Nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and uses therefor": Patentes U.S. Nos. 6.903.207, 6.902.895, 6.878.814, 5 6.861.221, 6.828.432, 6.818.753, 6.812.334, 6.777.186, 6.773.884, 6.767.702, 6.759.199, 6.750.016, 6.740.491, 6.730.269, 6.720.411, 6.720.147, 6.709.825, 6.682.895, 6.677.122, 6.673.548, 6.645.721, 6.610.491, 6.506.564, 6.495.324, 6.417.340, 6.361.944.

g. Outros conjuntos de sondas de microesferas conjugadas para 10 a detecção de seqüências específicas de oligonucleotídeos: Patentes U.S. 6.890.741, 6.858.394, 6.919.206.

h. Triagem de mutação com a utilização de PCR com relação à amplificação -alvo: Patentes U.S. 6.528.261, 6.340.566

i. Triagem de mutação com a utilização de extensão de iniciadores: 15 Patente U.S. 6.537.748

j. Detecção de patógenos com a utilização de microesferas usando objetivos amplificados: Patentes U.S. 6.858.387, 6.620.586, 6.821.754, 6.821.519, 6.818.397.

Por consequência, o que é necessário na técnica são métodos 20 para determinar rapidamente seqüências de domínios aneuploides e aneusômicos com a utilização de pequenas quantidades de amostras ou de material do paciente. O que é também necessário são métodos para a determinação de tais seqüências que sejam mais precisos e que não exijam as etapas complexas e de consumo de tempo dos outros métodos atuais. O que é 25 ainda necessário são métodos para a determinação de anormalidades numéricas de seqüências de ácido nucléico genômicas ou cromossômicas que não exijam a amplificação do DNA -alvo antes da hibridização com uma sonda.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

30 A presente invenção supera os problemas esboçados acima e proporciona um novo método para a identificação de anormalidades cromossômicas com base na medição de número de cópias genômicas. Ele tam-

bém pode ser usado para determinar a concentração de DNA (ou de RNA) de uma solução ou para a determinação de níveis de um ou mais transcritos em um complexo de mistura de ácidos nucleicos. Falando em geral, o método da presente invenção inclui a análise de hibridização de uma solução de microesferas utilizando sondas de hibridização genômica de baixa cópia de uma seqüência específico com relação a uma seqüência de referência ou uma curva padrão. É alcançada uma precisão suficiente para separar o número normal de cópias que é em geral duas para os autossomas a partir da homozigossidade ou a partir de três ou mais alelos. Essa análise permite a análise direta do DNA (ou RNA) genômico total, com a utilização de citometria de fluxo, e se necessário, pode seguir a rotina da análise citogenética sem a exigência de grande quantidade de amostras do paciente, retiradas adicionais de sangue, métodos de amplificações específicas com relação ao local, ou de purificação genômica consumidores de tempo. Pode ser notado, por esse motivo que a determinação do número de cópias em um único local pode ser realizada sem um antecedente complexo de seqüência que consiste no genoma completo. Esse nível requintado de discriminação também pode ser usado para a determinação do número de cópias de transcritos raros contra o pano de fundo do "transcriptoma" completo, ou para a detecção de seqüências específicas de ácido nucleico extremamente diluídas ou de baixa concentração no interior de soluções heterogêneas de ácidos nucleicos.

Ao contrário das análises de hibridização correntes com sondas de oligonucleotídios, a amplificação antecipada do DNA-alvo específico para o local não é necessária devido a que às sondas de hibridização de baixa cópia mais longas da presente invenção proporcionam a especificidade aumentada necessária para a detecção direta das seqüências genômicas-alvo, únicas, homólogas. Por exemplo, a presente invenção pode ser usada para detectar ganhos ou perdas em número de cópias nas amostras genômicas do paciente com menos de 90 minutos, de mais preferência em menos do que uma hora, ainda de mais preferência em menos do que 50 minutos, de mais preferência em menos do que 45 minutos, ainda de mais preferência,

em menos do que 35 minutos e ainda de mais preferência em menos do que cerca de 30 minutos sem manipulação de tempo de laboratório, sem levar em conta o número de sondas presente em cada reação por amostra. Além disso, podem ser combinados conjuntos múltiplos de microesferas conjugadas com a sonda, de baixa cópia independentes na mesma análise de hibridização para a medição de forma independente das mudanças múltiplas no número de cópias. A análise multiplexada não diminui somente a quantidade necessária da amostra por análise, quando comparado com o FISH, porém também diminui o tempo da análise e o custo total por amostra testada.

10 Em formas preferidos, a presente invenção utiliza sondas de hibridização de cópia baixa ou cópia única projetadas especialmente para se hibridizar a um único local na seqüência haplóide do genoma com alta especificidade. O método para a seleção da sonda está descrito na Patente U.S. No. 6.828.097 e no pedido de patente U.S. pendente Nº de Série 09/854.867
15 (Publicação de Patente U.S. No. 2005/0064449), os ensinamentos e o conteúdo da qual é incorporado aqui, por referência. Como podem ser observadas, essas etapas iniciais exigem o conhecimento das seqüências de ambas as repetições-alvo e genômicas, informação que está crescentemente disponível devido ao Projeto do Genoma Humano e estudos de bioinformática a
20 ele relacionados. Além do mais, é usado um software de computador facilmente disponível para a derivação das seqüências de cópia baixa necessárias.

De preferência, pelo menos são selecionadas e sintetizadas duas seqüências de sonda diferentes. Pelo menos um conjunto de sondas deve ser selecionado e sintetizado para o reconhecimento de uma seqüência
25 de ácido nucléico específico na qual a anormalidade, se presente, poderia estar (sonda de teste), e outro conjunto de sondas deve ser selecionado e sintetizado para o reconhecimento de uma seqüência de referência (sonda de referência). As sondas de cópia baixa devem ter pelo menos cerca de 60
30 pares de bases em geral não mais do que 2500 pares de base em tamanho. De preferência, as sondas são de entre 60 e 1000 pares de base, de mais preferência entre cerca de 80 a 500 pares de base e de maior preferência

entre cerca de 90 a 110 pares de base. Foi descoberto que as microesferas conjugadas a sondas de cópia baixa de cerca de 100 pares de base produziram distribuições de fluorescência média bem-definidas, e de forma consistente valores de intensidade média de fluorocromo secundários mais altos, e desse modo refletiram com precisão os números reais de cópias. Os conjugados de sondas mais curtos também são mais estáveis e podem ser usados nas reações de hibridização durante mais do que dois meses depois da conjugação quando armazenados de forma apropriada, de preferência no escuro e a cerca de 4°C. Isso resulta em menos variação de lote para lote em estoques de microesferas marcadas, reduzindo desse modo o esforço necessário para conjugar, quantificar e qualificar as microesferas conjugadas às sondas. As sondas conjugadas mais longas mostraram uma eficácia de hibridização degradada dentro de duas semanas depois da conjugação.

Durante a síntese, as sondas podem ser marcadas com amina, dependendo da reação de conjugação específica, para a conjugação a microesferas distintas de forma espectral. De preferência as sondas são conjugadas às microesferas através de reação de carbodiimida modificada (como descrita no Exemplo 1), na qual as microesferas foram carboxiladas. Outros métodos para o acoplamento de ácidos nucleicos às microesferas tem sido desenvolvidos que são equivalentes em âmbito aos do método presente. Outro método comum para a conjugação de DNA a microesferas liga contas revestidas com estreptavidina a sondas que contém um nucleotídeo modificado com uma parte de biotina no terminal 5'. Nanopartículas de ouro foram conjugadas a ácidos nucleicos modificados com tiol na U.S. 6.361.944. Ácidos nucleicos e proteína foram conjugados a contas nas U.S. 6.468.546, 6.838.243, 6.833.246, 6.828.146, 6.828.142. A conjugação de oligonucleotídeos a microesferas também foi executada através de um cordão eletrófilo, a saber o reagente N-cloroacetamido-hexil fosforamidita (Guzaev, et al Bioorg Med Chem Lett. 1998 Dec 15; 8(24):3671 a 6). O DNA também foi conjugado a partículas semicondutoras microcristalinas (Taylor, J.R., Fang, M.M., & Nie, S. M. Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles. Anal. Chem. 72, 1979 a 1986, 2000; W. Z.

Guo, J. J. Li, Y. A. Wang, X. G. Peng, Conjugation chemistry and bioapplications of semiconductor box nanocrystals prepared via dendrimer bridging. Chem. Mater. 15, 3125 a -3133 (2003), e a Patente U.S. No. 6.630.307). Em uma modalidade de preferência as microesferas são secadas internamente,
5 contas de poliestireno, fluorescentes com diversos endereços espectrais, são conjugadas a sondas de cópia baixa de tal forma que resultam diversas combinações de contas conjugadas com sondas de cópia baixa, nas quais as sondas de referência são designadas com um endereço espectral separado. Os endereços espectrais diferentes são reconhecidos pelo citômetro
10 de fluxo e permite, as reações multiplexadas com diversas sondas de cópia baixa ligadas a conjuntos de microesferas diferentes.

A seqüência-alvo de ácido nucléico é em seguida preparada a-para a hibridização. Ao contrario de outros métodos, a seqüência -alvo não é pré-selecionada ou amplificada, de tal forma que, na presente invenção uma
15 cópia total do genoma (ou do transcriptoma) pode ser hibridizada para a análise. Dependendo da origem e da condição da amostra, o DNA (ou o RNA) é extraído a partir das células e, se necessário, pode ser replicado *in vitro* com a utilização de qualquer método convencional. De preferência, o ácido nucléico é replicado *in vitro* com a utilização do GenomiPhi kit (Qiagen,
20 Valencia CA), que utiliza menos do que um ng do ácido nucléico da amostra e requer menos do que 20 minutos de tempo de manipulação. O DNA é em seguida marcado através de um dispositivo convencional, de preferência através de uma etapa de marcação direta durante a replicação *in vitro* ou através de um sistema de marcação indireta consistindo em um marcador e
25 um nucleotídio de informação que tenha uma afinidade com relação aquele marcador. O ácido nucléico -alvo é marcado com um marcador de identificação tal como um fluoróforo, um conjugado enzimático, ou um selecionado a partir do grupo que consiste em biotina ou nas partes reconhecidas pela avidina, estreptavidina ou anticorpos específicos. Existem vários tipos de marcadores de identificação não isotópicos. Um tipo é um marcador que está
30 quimicamente ligado ao ácido nucléico -alvo e serve como o dispositivo para a identificação direta. Um exemplo disso poderia ser uma parte de fluorcro-

mo, que quando da aplicação de radiação dos comprimentos de onda apropriados se tornará excitado dentro de um estado de alta energia e emitirá luz fluorescente. Os nucleotídeos fluorescente diretamente marcados tais como o Cy3-dUTP são conhecidos na técnica e poderiam ser adequados para a

5 marcação do DNA -alvo para uso na presente invenção. Outros métodos de marcação direta do DNA também poderão ser adequados (um exemplo poderia ser o marcador de amino-alila comercializado como o método Ulysses (Kreatech, Holanda)), no entanto nesses casos o DNA do genoma poderia ser fragmentado (pela DNase 1, cisalhamento ou outra digestão enzimática)

10 até um tamanho adequado para a hibridização antes da adição do alvo marcado à sonda de microesferas conjugadas. Em uma modalidade de preferência, o ácido nucléico -alvo é marcado, de preferência através de translação de entalhe com a utilização de um nucleotídeo modificado ou marcado diretamente (Rigby et al., J. Mol Biol., 113: 237 a 251, 1977) da maneira

15 convencional com a utilização de um reagente compreendendo o marcador de identificação de escolha (porém não limitado a) conjugado a um nucleotídeo tal como o dUTP ou dATP. Os fragmentos, ou são marcados diretamente com um nucleotídeo marcado com um fluoróforo ou marcados indiretamente através da ligação do duplex marcado a um anticorpo marcado de forma flu-

20 orescente que reconheça o nucleotídeo modificado que está incorporado dentro do fragmento como descrito abaixo. As translações de entalhe (100 µl) utilizam a DNA polimerase I isenta de endonuclease (Roche Molecular Biochemicals e DNase I (Worthington Chemical)). Cada fragmento é combinado com a DNA polimerase 1 (4 unidades/micrograma de DNA), DNase

25 (0,01 a 3 microgramas/100 µl de reação), nucleotídeo marcado (0,05 mm final) e tampão de translação de entalhe. A reação é executada á 15°C durante 60 minutos e produz uma variedade de fragmentos de sonda marcados de tamanhos de nucleotídeo diferentes em uma faixa de tamanhos de ~ 300 até 1000 pb. De forma alternativa, a biotina-dUTP ou a digoxigenina-dUTP po-

30 dem ser incorporadas durante o procedimento de replicação in vitro e a amostra marcada resultante pode ser tratada com DNase 1 ou cisalhada através de algum outro método para produzir fragmentos de ~ 300 pb até 1 kb

de comprimento. Outros métodos para a marcação e a detecção de ácidos nucleicos em uso comum podem ser aplicados para a detecção do conjugados de microesferas de DNA de cópia baixa do presente método. Esses métodos incluem marcadores de fluorocromo e composições fluorescentes tais como grupos de transferência de energia, proteínas conjugadas, anticorpos, ou antígenos.

As condições para a reação de hibridização irão depender da composição específico do nucleotídeo e o comprimento de cada sonda de cópia baixa, e são determinadas com facilidade por aqueles versadas na técnica. Para a hibridização a sequência de amostra é diluída em uma solução de um tampão de hibridização que contenha as microesferas conjugadas com a sonda de cópia baixa. A quantidade de microesferas conjugadas com a sonda a ser utilizada irá depender da quantidade de amostra testada. De preferência, cerca de 5 pg até 1 µg de amostra, de mais preferência cerca de 25 a 100 ng de amostra, ainda de mais preferência cerca de 30 a 70 ng, ainda de mais preferência cerca de 40 a 60 ng de amostra e de maior preferência cerca de 50 ng de amostra, são analisadas por reação de hibridização. Por consequência, a solução de tampão contém de preferência cerca de 2.000 a 10.000 microesferas conjugadas com a sonda, de mais preferência de 2.000 a 6.000 microesferas conjugadas com a sonda, ainda de mais preferência cerca de 4.500 a 5.500 microesferas conjugadas com a sonda, e de maior preferência cerca de 5.000 microesferas conjugadas com a sonda com relação a cada conjunto a ser hibridizado. Uma vez diluída, a reação de hibridização é desnaturada com calor, de preferência à cerca de 95°C e em seguida hibridizada de um dia para o outro em uma temperatura de hibridização adequada, de preferência, a cerca de 45 até 51°C dependendo da composição e do comprimento do nucleotídeo da sonda. As microesferas hibridizadas são em seguida lavadas e centrifugadas para a remoção da sequência -alvo hibridizada.

O sobrenadante é removido e a amostra hibridizada é manchada ou marcada com uma quantidade de uma molécula de informação modificada ou outro marcador adequado, de preferência um que atue como um fluor-

cromo secundário, para detectar a amostra hibridizada marcada às microesferas conjugadas com a sonda de cópia baixa. As moléculas de informação de preferência são a estreptavidina marcada com ficoeritrina ou fluoresceína antidigoxigenina, que detectam e se ligam às marcações da seqüência -alvo de preferência, biotina e digoxigenina, respectivamente. A amostra hibridizada e marcada/manchada é incubada na mesma temperatura usada para a reação de hibridização, durante um período de tempo suficiente para a molécula de informação detectar e se ligar à seqüência -alvo marcada. As seguir, a mostra é lavada para a remoção da mancha residual. As amostras são centrifugadas, o sobrenadante é removido e as microesferas hibridizadas manchadas são ressuspensas em uma quantidade de tampão de hibridização.

Antes da análise através de citometria de fluxo, as amostras hibridizadas podem ser diluídas dependendo das instruções do fabricante do citômetro de fluxo. De preferência, cerca de 2.000 a 6.000 microesferas de cada conjunto são analisadas por reação, de mais preferência cerca de 4.500 até 5.500 microesferas, e de maior preferência cerca de 5.000 microesferas por conjunto são analisadas por reação. No entanto, a quantidade da amostra a ser analisada pode depender do citômetro de fluxo específico a ser usado para a análise. Será observado que a calibração e os ajustes de operação para o citômetro de fluxo podem ser modificados em uma quantidade de modos sem experimentação indevida, por aqueles versados na técnica, para a determinação das faixas ótimas para a medição de uma análise específico de hibridização. Esses parâmetros também irão depender do software empregado para a análise. Os padrões para contas fluorescentes estão amplamente disponíveis e podem ser usados para a calibração da intensidade de canais diferentes de detecção de fluorocromo do citômetro de fluxo. O instrumento também pode ser calibrado com padrões de referência fluorescente com base em contas com a superfície marcada calibradas em moléculas de unidades de fluorocromo solúvel equivalentes (MESF). Os ajustes da voltagem do tubo fotomultiplicador e os limites com relação à dispersão adiante, dispersão lateral, velocidade de fluxo e vários canais de detec-

ção devem, de preferência ser otimizados para minimizar as diferenças entre as intensidades de fluorescência de duas sondas hibridizadas diferentes com relação a uma amostra de um único paciente com um genótipo normal. Os parâmetros de voltagem não ótimos são facilmente aparentes e resultam em picos de fluorescência amplos ou dados não lineares, enquanto que os parâmetros ótimos resultam, de preferência em microesferas intimamente agrupadas com endereços de espectro diferentes quando visualizadas com a utilização de um gráfico de dispersão lateral. De preferência esses ajustes são determinados a partir de medições de fluorescência derivadas de média aritmética, média geométrica, e canal médio e de pico.

Foi descoberto que a maioria das sondas de cópia baixa da presente invenção não exige uma otimização significativa com relação à composição, devido a que a qualidade da sonda depende em sua maioria da natureza da cópia baixa da seqüência usada para a designação da mesma. Além dos métodos de projeto de sondas de cópia baixa descritos na U.S. Nº 6.828.097. os pares de sondas de teste e de referência foram otimizados com relação à estabilidade térmica equivalente por seqüências iguais de comprimento similar, e se possível, composições (especificamente, a percentagem de nucleotídeos G e C) em um esforço para mitigar a formação de estruturas secundárias na, ou próxima à temperatura de hibridização de cada uma das sondas. As seqüências que são parálogas a outro local genômico produzem proporções de intensidade de fluorescência que excedem os intervalos de confiança estabelecidos com relação aos genótipos conhecidos. A presente invenção supera essa limitação através do uso de sondas de cópia baixa que são estritamente não homólogas a outros segmentos genômicos.

As amostras hibridizadas são em seguida analisadas por citometria de fluxo, de preferência com a utilização de detecção de laser duplo, por meio do qual o citômetro co-seleciona com relação aos endereços de espectro das microesferas e o fluorcromo ligado às seqüências de amostra com a finalidade de identificar e quantificar as sondas hibridizadas. As diferenças em número de cópias podem ser distinguidas através da comparação das

intensidades medias de fluorescência das sondas de teste com as intensidades da sonda dissômica de referência. Especificamente, o sinal de cada sequência de amostra, hibridizada da sua microesfera conjugada com a sonda complementar é determinado para quantificar a intensidade de fluorescência do fluorcromo secundário ligado à sequência da amostra. Por exemplo, a sonda de referência serve como uma referência interna através da qual uma cópia (cancelamento) pode ser distinguida de outras duas (normais) e duas cópias podem ser distinguidas a partir de três (duplicação) com base nas diferenças em intensidade de fluorescência. Os endereços de espectro da microesfera são selecionados para minimizar a sobreposição com os comprimentos de onda da emissão de qualquer um dos fluorcromos secundários não ligados (molécula de informação). Isso pode ser confirmado através da comparação com os resultados obtidos a partir de outras microesferas idênticas não conjugadas e não hibridizadas. Um controle negativo também pode ser mantido com a utilização de um tubo de reação que contenha todos os componentes exceto com relação ao ácido nucléico da amostra com a finalidade de determinar a fluorescência de fundo no canal secundário de detecção de fluorcromo. De preferência, o sistema é descarregado com água destilada entre as rodadas para a remoção de quaisquer microesferas residuais.

De preferência a média geométrica ou a proporção de fluorescência mediana é usada para a medição de número de cópias na presente análise de hibridização devido a que ela proporciona os menores intervalos de confiança (95%) e residuais com relação a todos os genótipos sem superposição entre os genótipos. Em seqüências que contêm um cancelamento, os valor previsto com relação a média geométrica ou a proporção de fluorescência mediana da sonda de teste com relação à intensidade da sonda de referência é de cerca de 0,5, o que reflete uma diferença de um número de cópias genômicas de uma versus duas. Em seqüências que contêm uma duplicação (ou inserção) a proporção é prevista para ser de cerca de 1,5, o que reflete uma diferença no número de cópias genômicas de três versus duas. Proporções maiores do que 1,7 tipicamente indicam aumentos em números de cópia de até cinco cópias adicionais de uma seqüência. E em

seqüências normais a proporção é prevista para ser de cerca de 1,0, o que reflete o número de cópias diplóides normais para ambos os genótipos. Na prática da presente invenção, o desvio a partir dessas proporções previstas é de preferência minimizado, de tal forma que as proporções fiquem dentro de um intervalo de confiança de cerca de 80%, ainda de mais preferência dentro de cerca de 90% . Na modalidade de preferência, essas proporções não devem ser de menos do que 95% de intervalo de confiança e não deve haver sobreposição entre os genótipos, permitindo dessa forma uma determinação mais precisa do número de cópias. As proporções de preferência que refletem um cancelamento devem ser de cerca de 0,2 a 0,75, de mais preferência de cerca de 0,40 a 0,60, ainda de mais preferência entre cerca de 0,45 e 0,55, e de maior preferência de cerca de 0,49 a 0,51. As proporções que refletem tanto as inserções como as duplicações devem, de preferência ser de cerca de 1,25 a 1,75, de mais preferência de cerca de 1,40 a 1,60, ainda de mais preferência entre cerca de 1,45 e 1,55, e de maior preferência entre cerca de 1,49 e 1,51. As proporções que refletem genótipos normais devem de preferência ser de cerca de 0,75 a 1,25, de mais preferência de cerca de 0,90 a 1,10, ainda de mais preferência entre cerca de 0,95 e 1,05, e de maior preferência entre cerca de 0,99 e 1,01.

Foi descoberto que a presente invenção distingue as diferenças do número de cópias entre uma seqüência diplóide de referência e um cancelamento cromossômico (alelo único), inserção, trinomia ou duplicação (três alelos), bem como aumentos no número de cópias de até cinco cópias adicionais (cinco alelos). Essa análise pode detectar seqüências de cópia muito baixa ou rara, mesmo se a seqüência de teste específico está somente presente em uma cópia por genoma haplóide. O grau do rearranjo do ácido nucleico pode ser definido dentro de 62 pb, o que é significativamente mais preciso do que CGH de aglomeração, análise Southern e é comparável a precisão do MLPA. A análise de hibridização da conta de microesfera da presente invenção aumenta a resolução, aumenta o sinal para a proporção de ruído e é facilmente receptivo a multiplexação, fazendo do mesmo uma abordagem de alto rendimento. A capacidade das sondas multiplexadas

conserva a amostra ou o material do paciente disponível e diminui o tempo necessário para fazer o diagnóstico. Ainda, a contaminação de seqüências genômicas heterólogas foi mostrada como não impactando a eficiência da hibridização da análise. Em consequência, a plataforma de hibridização de microesferas pode ser mais apropriada em algumas situações de diagnóstico no lugar da FISH, CGH de aglomeração (aCGH), expressão ou revestimento de micro aglomerações, análise Southern, hibridização de sonda multiplex amplificável (MAPH), hibridização de sonda multiplex de ligação (MLPA) e PCR quantitativa (qPCR).

- 10 Este ensaio é facilmente receptivo com relação a aplicações de alto rendimento. Por exemplo, com arranjos genômicos de sondas de hibridização de baixa cópia conjugadas com suspensão de microesferas, deve ser viável determinar e/ou definir com rapidez seqüências cromossômicas anormais com base em diferenças em número de cópias com relação a uma ou
- 15 mais locais de referência conservados cujo número de cópias é essencialmente não variante entre indivíduos diferentes. A hibridização de um conjunto denso de sondas de cópias baixas que se espalham em uma região do cromossomo pode ser usada para uma triagem inicial com relação aos limites dos domínios aneussômicos. Estudos FISH subseqüentes podem em
- 20 seguida prover um contexto cromossômico com relação a essas alterações genéticas. Podem ser previstas aplicações de alto rendimento, devido a que aproximadamente 3840 produtos diferentes podem ser analisados em uma única placa de microtitulação de alta densidade com a utilização do conjunto atual de 10 contas codificadas espectralmente distintas em cada cavidade.
- 25 Com os citômetros de fluxo disponíveis, presumindo uma resolução mínima de sonda de 200 kb, uma única placa pode prover a determinação do número de cópias de alta resolução com relação a um domínio de 200 kb dentro de 90 minutos a partir do tempo da aquisição dos dados.

- Devido a que esta invenção é tanto mais sensível e mais precisa
- 30 do que outras tecnologias relacionadas com a técnica, ela pode ser usada para outras aplicações diagnósticas (além daquelas apresentadas nos Exemplos 1 e 2, dados aqui), que tenham anteriormente necessitado de son-

das altamente reiteradas ou com sondas que necessitam de amplificação prévia do alvo.

Um aspecto da presente invenção proporciona a detecção de desequilíbrio cromossômico. Uma das implicações mais significativas da detecção de cancelamentos no paciente (e bem como a possibilidade de heranças trialélicas) é o desequilíbrio resultante dos alelos observados. Isto é, enquanto a insuficiência haplóide ou a expressão exagerada de uma sequência genômica transcrita pode contribuir para a doença, a presença de um único alelo mutante que não esteja marcado por um cancelamento do alelo do tipo natural (ou uma proporção de 2:1 de alelos do tipo mutante para o natural) pode ser como uma ou mais determinantes importantes de alguns fenótipos clínicos anormais. A seleção judiciosa de intervalos de baixa cópia pode não somente detectar essas regiões de desequilíbrio do cromossomo, porém também irão permitir a detecção de mutações ou os SNP que são encontrados no interior desses domínios. Devido aos esforços de consórcio de mapeamento dos haplótipos, as localizações genômicas detalhadas e as frequências de população de milhões de SNP estão agora disponíveis. Com base no trabalho de alguns dos inventores do presente pedido de patente, alguns dos mesmos estão associados com vários distúrbios congênitos.

As sondas 1c (cópias baixas) usadas para a detecção de desequilíbrio do cromossomo com a utilização do ensaio com microesferas podem ser selecionados com base no conhecimento anterior das localizações de sequências polimórficas ou mutações publicadas. Depois que uma anormalidade no cromossomo é detectada com a utilização do ensaio, a microesfera hibridizada é em seguida recuperada, e a sequência derivada a partir do paciente é derretida, as contas são centrifugadas e o sobrenadante que contém o filamento derretido é em seguida usado na etapa que se segue. Essa sequência pode em seguida ser analisada diretamente, isto é, com um ensaio de PCR fluorescente tal como a Taqman (Applied Biosystems) ou com ensaio de feixe molecular, ou amplificadas e sequenciadas diretamente para a determinação do genótipo do alelos ou dos alelos hibridizados. Dúpliques compostos pelas amostras do paciente enriquecidas com sondas 1c conju-

gadas porém ser aparados para extremidades rombudas com a utilização de uma nuclease (por exemplo, S1 ou Exonuclease I), em seguida tratados com Cleavase (Third Wave Technologies) para digerir o DNA em sítios não igu-
5 lados, e os fragmentos separados tanto por dHPLC (usando um Wave Sys-
tem, Transgenomic) ou eletroforese. Dois fragmentos mais curtos cujos
comprimentos somados ao comprimento da sonda poderiam ser previstos
(isso poderia exigir a conjugação das contas a uma sonda 1c derivada a par-
tir de um homozigoto conhecido com relação ao ESN ao invés do que uma
mistura de DNA genômicos, que é a fonte atual de gabaritos para a síntese
10 de sondas).

Outro procedimento de determinação de genótipo também pode
usar a hibridização de microesferas na qual os fragmentos recuperados po-
deriam ser usados nos ensaios subseqüentes de hibridização de microesfe-
ras. As microesferas carboxiladas são acopladas a sondas marcadas com
15 amino 5' (50 a 70 nucleotídios) nas quais a SNP está situada no meio da
seqüência. Uma vez que a seqüência dessas sondas é determinada através
da localização do SNP, as suas seqüências não são necessariamente de
baixa cópia ou de cópia única. Duas microesferas separadas são emprega-
das, uma acoplada a seqüência do tipo natural (sonda de referência), e a
20 outra consistindo da seqüência variante de SNP (sonda de teste). A hibridi-
zação é executada como descrita anteriormente, exceto em que o tempo de
hibridização é reduzido para 15 até 30 minutos devido à redução da comple-
xidade da seqüência -alvo. A sonda que contém a base desigual é desesta-
bilizada através de lavagens rigorosas seguida pela hibridização e dissocia-
25 dos. A microesfera que contém uma seqüência exata irá produzir uma inten-
sidade de seqüência média mais forte. A Patente U.S. 6.355.431 e as paten-
tes relacionadas descrevem que a hibridização com base em microesferas
pode ser usada para a iniciação da formação de genótipos, no entanto essas
patentes antecipam que o DNA capturado através da hibridização foi anteri-
30 ormente obtido através da amplificação de objetivo. A presente invenção
elimina as exigências com relação à amplificação do objetivo antes da hibri-
dização.

Pelo menos no caso dos cancelamentos, os tipos haplóides de SNP intimamente ligados (a fase) no mesmo ácido nucléico marcado podem ser determinados com este ensaio. A novidade aqui é que a mutação ou mutações e o cancelamento são detectadas de forma eficaz em um único ensaio.

Um outro aspecto da presente invenção pode ser utilizado no teste animais de criação. As regiões duplicadas ou canceladas podem estar associadas com o Quantitative Trait Loci (QTLs) (Montaldo et al. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. Animal Biotechnology Volume 1. No 2. August 15, 1998, 83 a 89), que são atualmente analisados através de métodos tais como os ensaios PCR e pPCR com relação a gado ou a ovelhas. Devido a sua natureza de alto rendimento, o ensaio com microesferas com relação aos marcadores de cancelamento ou duplicação de QTL com a utilização da presente invenção é mais adequada para ser usada em rebanhos grandes do que os testes de PCR ou de qPCR. As sondas de teste específicas com relação a uma série de locais QTL podem ser conjugadas a microesferas espectralmente distintas e as eficiências de hibridização dessas sondas podem ser comparadas a sondas de referência padrão, mesmo HOXB1 no caso de espécies de animais de criação, em um esforço para discernir proporções acima ou abaixo de 1 que indicam duplicações ou cancelamentos dos QTL respectivamente. Os métodos de análise estão de acordo com aqueles descritos acima.

Em outro aspecto da presente invenção, camundongos transgênicos ou derrubados (ou outros organismos) podem ser testados com relação a inserção/cancelamento de seqüências mais rapidamente em um núcleo transgênico com a utilização da presente invenção. Os métodos atuais envolvem PCR ou qPCR, tais como aqueles descritos em Nature Genetics 21, 249 - 251, Modeling cancer in the mouse (1999). As sondas de teste com relação as seqüência transgênica ou derrubada (sondas de teste) podem ser conjugadas a microesferas espectralmente distintas bem como a seqüência adjacente ao genoma adjacente a seqüência transgênica ou derrubada (sonda de referência). O DNA genômico ou o DNA complementar a partir do

animal transgênico ou derrubado é em seguida extraído e marcado como descrito precedentemente. A hibridização e o cancelamento dos testes e das sondas de referência também são previamente observados. Se a proporção de MFI do teste para a sonda de referência for maior do que 1, então a sequência de teste foi inserida com sucesso no interior do animal transgênico. Se a proporção de MFI for de 0,5, então uma cópia da sequência de teste foi derrubada com sucesso ou cancelada do genoma do animal. Se a sonda de teste falhar em se hibridizar, isso poderia indicar que ambas as cópias da sequência da sonda de teste foram canceladas a partir do animal derrubado testado.

Outro aspecto da presente invenção proporciona a detecção de níveis de lavouras geneticamente modificadas. Os métodos com base em PCR se tornaram uma das abordagens padronizadas para a quantificação do conteúdo de organismos geneticamente modificados (GMO) em lavouras (ver, por exemplo: Zimmermann A., Hemmer W., Liniger M., Luthy J., Pauli U. *Lebensmittel-Wissenschaftl. und -Technologie*, 31(7): 664-667, 1998; Studer E., Rhyner C, Lüthy J., Hübner P. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*.207(3): 207-213, 1998; Hoist- Jensen, Sissel B. Rønning, Astrid Løvseth, Knut G. Berdal . *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Volume 375, Number 8, 985 - 993, 2003), no entanto esses métodos tem algumas limitações. Eles são especificamente suscetíveis a resultados positivos falsos com baixos níveis de contaminação e nos limites da sensibilidade (< 2%), esses métodos podem dar resultados variáveis incluindo descobertas negativas falsas (Ahmed F., *Trends in Biotech.* 20: 215 a 223, 2002). As análises de qPCR existentes que a USDA utiliza são especificamente variáveis no limite de 1% de detecção. Uma melhoria comercial na confiabilidade das análises GMO no limite poderia ser valioso uma vez que a União Européia fixa esse valor como o seu limite superior com relação as importações agrícolas. Uma sonda de teste específico para a modificação genética específico pode ser conjugada a uma microesfera espectralmente distinta. Uma sonda de referência de um número de copiar conhecido no genoma da lavoura específico que esta sendo investigada também poderia

ser conjugada a uma microesfera espectralmente distinta. Todos os procedimentos experimentais poderiam ser como os descritos anteriormente. Uma proporção MFI de teste para a sonda de referência de 0,5 poderia indicar que o organismo geneticamente inserido tinha sido inserido em uma cópia, uma proporção de 1 poderia indicar duas cópias, e uma proporção de 1,5 ou maior poderia indicar duas ou mais cópias do GMO. Se a sonda de teste falhar em se hibridizar, isso poderia indicar a ausência do GMO no genoma da lavoura.

Com a utilização dos métodos da presente invenção, as sensibilidades conseguidas na quantificação de seqüências de baixa cópia do DNA genômico humano são consideravelmente melhores do que aquelas atualmente obtidas com a utilização de PCR com relação ao baixo nível de detecção do conteúdo de GMO. Além do mais, os métodos da presente invenção não são suscetíveis à detecção positiva falsa devido ao baixo nível de contaminação, uma vez que a amplificação da seqüência -alvo não é necessária. Com base na capacidade para a discriminação das diferenças no número de cópias em baixo nível demonstradas com a presente invenção, uma pessoa versada na técnica poderia observar que a análise de hibridização por solução de microesferas poderia ser um teste superior com relação a contaminação de GMO.

Outro aspecto da presente invenção proporciona métodos para a medição de níveis de transcritos em cDNA ou em coleções relativas a equivalentes de transcritos padronizados ou a um gene de referência doméstico interno. Os métodos atuais para a detecção da presença de transcritos específicos em cDNA ou em coleções são tipicamente testados com a utilização de qPCR (Physiol Genomics. 2003; 16(1):90-8), or PCR (Development. 1992; 116(3):555-61), ou hibridização de microesferas (Patente U.S. 6.875.568). Os métodos atuais de PCR e de hibridização de microesferas não quantificam os níveis de transcritos, e somente detectam a presença ou a ausência do transcrito. A presente invenção pode habilitar a detecção e a quantificação de seqüências de mRNA de cópia baixa ou rara (~ 5 cópias por reação de hibridização) no cDNA. (Nota: 5 cópias foi o número determi-

nado de forma experimental no Exemplo 1 durante a detecção de seqüências em um ambiente genômico heterólogo). A metodologia usada está de acordo com os métodos descritos acima.

Outro aspecto da presente invenção proporciona métodos para a
5 medição de mudanças nos níveis de transcritos em resposta a estímulo (perturbação ambiental ou química) ou com o passar do tempo. Os métodos atuais são baseados a saber em PCR (J. Immunol. 2001. Mar 15: 166(6):3663-71), ou em RTPCR (Biomaterials. 2003 Jul;24(15):2561-73). Uma sonda específico para o transcrito de interesse pode ser conjugada a
10 microesferas e a sua intensidade de fluorescência comparada a um transcrito de nível de expressão conhecida, tal como um gene doméstico. Se o nível do transcrito aumenta depois do estímulo, então a proporção MTI do teste com relação a sonda de referência seria maior do que 1. Se o nível do transcrito diminui então a proporção poderia ser de menos do que 1. Os protocolos
15 padrão poderiam ser usados para a hibridização e detecção.

Outro aspecto da presente invenção proporciona métodos para a detecção quimerismo ou o mosaicismo dentro de uma população mista de células em uma amostra. O quimerismo é definido como um indivíduo ou uma amostra de tecido composta de células derivadas a partir de dois zigos
20 geneticamente diferentes. O mosaicismo é definido como um indivíduo ou uma amostra de tecido com pelo menos 2 ou mais linhas de células diferentes em complemento de genótipo ou cromossômico derivados a partir de um único zigoto. Por exemplo, uma sonda específica para um cromossomo X ou Y a partir da região não pseudo - somática pode ser usada para a de-
25 tecção de quimerismo, mosaicismo consistindo em células a partir de duas linhas de células diferenciadas de sexos opostos (por exemplo, XX vs XY) ou de complementos de cromossomo de sexos diferentes (isto é, 45,X vs 46,XX). Essas sondas poderiam demonstrar a diferença em número de cópias quando comparada a um linha de células de referência que seja não
30 mosaica ou não quimérica. Usando uma sonda de referência autossômica, por exemplo, um indivíduo 45,X mostrará uma proporção média de fluorescência de ~0,5 e um indivíduo 46,XX terá uma proporção de ~1,0. Os indivi-

- duos com constituição mosaica ou quimérica terá uma proporção de entre 0,5 e 1,0 de a quimera for do sexo oposto ou mosaica se for de complementos de cromossomo de sexo diferente. Os exemplos de quimerismo em seres humanos incluem a troca de células tronco hematopoiéticas por gêmeos dizigóticos no útero, fusão de dois zigotos dentro de um indivíduo no útero; e transplante de órgão ou de tecido. O quimerismo é atualmente detectado através de métodos tais como o FISH de interfase e citogenética no caso de transplantes de células de sexo não combinadas em determinados cânceres (Bernasconi P, Cavigliano PM, Genini E, Alessandrino EP, Colombo A, Klersy C, Malcovati L, Biaggi G, Martinelli G, Calatroni S, Caresana M, Boni M, Astori C, Beraasconi C, Leukemia. 1997 Nov;1(11): 1989 a -90; Smith A, Robson LG, Sharma P, Shaw PJ. Pathology. 1999 Feb; 31(1): 25 a 28; Ng IO, Chan KL, Shek WH, Lee JM, Fong DY, Lo CM, Fan ST. Hepatology. 2003 Oct; 38(4): 989 a 98), ou resultante de gravidez (O'Donoghue K, Chan J, de la Fuente J, Kennea N, Sandison A, Anderson JR, Roberts IA, Fisk NM. Lancet. 2004 Jul. 10 - 16; 364(9429): 179 a 182), e através de estudos de polimorfismo de DNA tais como a detecção de microssatélite em células únicas (Yu N, Kruskall MS, Yunis JJ, Knoll JH, Uh I L, Alosco S, Ohashi M, Clavijo O, Husain Z, Yunis EJ, Yunis JJ, Yunis EJ. N Engl J Med. 2002 May 16;346(20):1545 a 52.). O mosaicismo é frequentemente detectado através de métodos tais como o FISH e citogenéticos, porém é aceitável a detecção deste genótipo com outros métodos com base em DNA (Lomax et al., Hum Genet. 1994 Mar;93(3):243 a 7; Krishnamoorthy et al, J Perinatol. 1995 Jan-Feb;15(1):47 a 50; Chen et al., Prenat Diagn. 2004 Oct;24(10):767 a 73).
- Em outro aspecto da presente invenção, a quantificação de carga virótica ou bacteriana em tecidos ou no plasma através da comparação com uma sequência de referência é possível. Os métodos correntes somente detectam a presença ou a ausência de tais contaminantes bacterianos ou viróticos através de ELISA, PCR ou qPCR (Comp Med 2001 Oct;51(5): 406-12. Evaluation of diagnostic methods for Helicobacter bilis infection in laboratory mice., Hodzic, E et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 nov 20;98(24):13687-92; J Clin Microbiol. 2005 Feb;43(2):716-20; Arch Dermatol

Res. 2005 Feb;296(8):345-52. Epub 2005 Jan 4; J Virol Methods. Jul 7, 2005). Um método para a detecção de patógenos envolve aglomerado de suspensões (J Microbiol Methods, 2005 Jun 24, e as Patentes U.S. 6.821.754, 6.821.519, 6.818.397, 6.790.611, 6.709.812, 6.632.607, 6.627.198), no entanto em cada desses casos, a amplificação por PCR do patógeno específico é exigida antes da hibridização. Com a utilização da análise de ensaio de suspensões, as sondas de teste específicas para o vírus ou a bactéria de interesse podem ser conjugadas a microesferas e testada com uma sonda de referência, tal como a HOXB1.

10 Ainda um outro aspecto da presente invenção provê a medição diretamente das concentrações de ácidos nucleicos, incluindo outros ácidos nucleicos que não o DNA, em solução pela hibridização e comparação à uma amostra em uma concentração conhecida com a utilização das metodologias acima descritas. Alguns métodos correntes para a medição da concentração do RNA se apóiam na hibridização a contas ligadas a um suporte de superfície sólida (Genome Research 14:2347-2356, 2004), PCR e qPCR. Os métodos de conjuntos de suspensões de microesferas patenteados destinados a quantificar ligações de ácidos nucleicos envolve a amplificação antecipada dos produtos (Patentes U.S.: 6.620.586, 6.812.005, 6.355.431 e 20 6.858.387).

Outro aspecto da presente invenção permite a determinação de diferenças em número de cópias em locais genômicos polimorfos para o estabelecimento da relação com relação a estudos de predisposição forenses e genéticos. A instabilidade da duplicação de segmentos de seqüências genômicas é comum no genoma humano. Este fenômeno pode levar a doenças (usualmente constitucionais ou congênitas) que resultam na insuficiência haplóide ou no número aumentado de cópias de genes no interior das regiões flanqueadas por essas duplicações. O exemplo CMT1A da presente invenção foi um dos exemplos mais antecipados conhecidos de instabilidade do número de cópias que levam à doença.

Algumas duplicações instáveis de segmentos não são estritamente patogênicas. Um subconjunto de diferenças em número de cópias

- entre indivíduos ($n = 119$) está associado com a variação normal ou o polimorfismo no genoma ((Segmental duplications and copy-number variation in the human genome: Sharp AJ, Locke DP, McGrath SD, Cheng Z, Bailey JA, Vallente RU, Pertz LM, Clark RA, Schwartz S, Segraves R, Oseroff VV, Albertson DG, Pinkel D, Eichler EE. *Am J Hum Genet.* 2005 Jul;77(1):78 a 88.2005). A variação de cópias desses locais polimórficas não está confinada a uma única população, sugerindo que elas tanto eventos genéticos recorrentes, tendo ocorrido separadamente em fundadores múltiplos, ou estavam presentes antes da migração humana a partir de África.
- 10 Através da seleção apropriada de sondas genômicas a partir de intervalos duplicados de forma segmentada, a presente invenção pode determinar como o genótipo do número de cópia varia entre os indivíduos. Uma impressão digital de DNA de um indivíduo pode ser obtida por conter a determinação do número de cópias com um número suficientemente grande de
- 15 tais sondas conjugadas a microesferas espectralmente distintas. A frequência de polimorfismo no número de cópias com relação a essas sondas é relativamente alta, sugerindo que esses marcadores genômicos serão suficientemente informativos com relação a aplicações em medicina legal de identidade genética.
- 20 Essas mesmas suplicações segmentadas representam arquiteturas cromossômicas que predispõe alguns indivíduos a serem submetidos a rearranjo genético durante a meiose. Embora esses indivíduos não sejam eles próprios afetados, eles podem estar um risco elevado de descendência com aneuploidia segmentaria em regiões com configurações predispostas de
- 25 cromossomo. Outros rearranjos cromossômicos, tais como translocações recíprocas, Robertsonianas e de salto, inversões, isocromossomos e cromossomos de pequenos marcadores, podem ser suscetíveis de rearranjo relacionado a estrutura ou arquitetura genômica. Duplicações segmentarias, palíndromos ricos em AT (Gotter AL, Shaikh TH, Budarf ML, Rhodes CH,
- 30 Emanuel BS. *Hum Mol Genet.* 2004 Jan 1 ;13(1):103-15) e repetições pericentrométricas tem sido localizadas a esses pontos de rompimento do rearranjo. A análise de produtos da recombinação nas junções dos rearranjos tem re-

velado ambas a recombinação homóloga e a junção de finais não homólogos Shaw CJ and Lupski JR, Hum Mol Genet. 2004 Apr 1; 13 Spec No 1 :R57-64). Através da seleção apropriada de sondas no interior ou adjacente a regiões segmentais duplicadas do cromossomo, deve ser viável a determinação de quais indivíduos estão em um risco crescente com relação a rearranjos gaméticos do cromossomo que poderão concomitantemente aumentar o risco de prole anormal.

Também os rearranjos genômicos que não envolvem uma perda ou ganho no número de cópias, tais como as inversões ou as translocações, podem ser avaliadas com a utilização do método descrito. Uma sonda específica para os terminais 3' ou 5' da seqüência invertida ou translocada é conjugada a microesferas e hibridizada à DNA genômico marcado contendo a anormalidade cromossômica (como por exemplo, ABL no caso de uma translocação ABL/BCR ocasionando a leucemia mielogênica crônica). As microesferas hibridizadas são em seguida recuperadas, a seqüência derivada do paciente é removida por fusão a partir da seqüência conjugada, as contas são centrifugadas e o sobrenadante que contém o filamento fundido é em seguida usado na etapa que se segue. Os fragmentos recuperados são em seguida usados como alvos nos ensaios de hibridização de microesferas com a utilização de uma sonda de teste específica para a seqüência na vizinhança porém não implicada na inversão ou na translocação (por exemplo, BCR no cromossomo 22). A hibridização e a detecção pode ser executada como descrita anteriormente, exceto em que a reação de hibridização irá envolver a sonda de teste (BCR) bem como a sonda de teste da hibridização anterior (ABL). Se a proporção MFI das duas sondas de teste é aproximadamente igual a 1, isso irá indicar que a translocação ou a inversão foi identificada com sucesso. Se a segunda sonda de teste falhar em se hibridizar, então nenhuma anormalidade foi detectada. A proporção MFI da segunda sonda de teste comparada com a da primeira sonda de teste não deve ter uma proporção maior do que 1. Nenhum ensaio genômico na técnica anterior utilizando conjunto de suspensões pode detectar a presença de translocações ou inversões.

Desse modo, uma modalidade de preferência da presente invenção proporciona um método para a quantificação do número de cópias de uma seqüência de ácido nucléico -alvo em um genoma. O método em geral compreende as etapas de extração do ácido nucléico que contem a

5 referida seqüência de ácido nucléico a partir de um sujeito, fixando um marcador ao referido ácido nucléico, preparando uma sonda de ácido nucléico de baixa cópia conjugada com um particulado, para complementar a referida seqüência de ácido nucléico -alvo, hibridizando a referida sonda ao referido ácido nucléico para a formação de uma produto de reação de hibridização,

10 identificando o referido produto através da detecção do referido particulado, e quantificando o referido número de cópias da referida seqüência de ácido nucléico -alvo através da detecção do referido marcados no referido produto. De preferência o referido particulado compreende uma partícula nano cristalina, ainda de mais preferência, o referido particulado compreende uma na-

15 noesfera, mesmo de mais preferência, o referido particulado compreende uma microesfera, e de maior preferência, o referido particulado compreende uma microesfera de polímero espectralmente distinta. Em uma modalidade de preferência específica, a referida microesfera compreende poliestireno, e ainda mais especificamente, o referido particulado compreende uma conta

20 de poliestireno fluorescente, tingida internamente tendo um endereço espectral determinado. Em algumas aplicações, o método ainda compreende a etapa de ligar um fluorcromo a uma parte biológica na superfície da referida microesfera. Em outra aplicação de preferência, o método geral também inclui uma etapa selecionada a partir do grupo que consiste em conjugar as

25 referidas sondas as referidas microesferas através de reação modificada de carbodiimida, em que a referida microesfera tenha sido carboxilada e conjugando a referida microesfera à referida sonda com a utilização de uma ligação eletrófila, em que a referida ligação compreende a N-cloroacetamidohexil fosforamidita. O ácido nucléico-alvo extraído compreen-

30 de DNA selecionado a partir do grupo que consiste em DNA genômico e DNA complementar. A marcação pode ser feita através de qualquer método convencional, incluindo através de translação de entalhe com um marcador

de identificação, marcado diretamente durante uma reação de replicação de ácido nucléico in vitro, marcação final e iniciação aleatória. Os marcadores podem ser quaisquer marcadores convencionais, incluindo fluoróforos, conjugados enzimáticos, nucleotídeos marcados com fluoróforo, anticorpos marcados de forma fluorescente ligados a nucleotídeos contendo um antígeno, 5 biotina-dUTP, digoxigenina-sUTP e as combinações dos mesmos. De preferência, a seqüência de ácido nucléico da referida sonda é complementar a uma seqüência de baixa cópia ou de cópia única no genoma do referido sujeito. As proporções típicas de resposta de seqüências de ácido nucléico que 10 contêm o cancelamento de um ou mais pares de base é a partir de cerca de 0,1 até cerca de 0,75 em comparação a uma sonda de referência que tenha um complemento normal da referida seqüência de ácido nucléico. As proporções típicas de resposta das seqüências-alvo de ácido nucléico que contêm uma inserção ou uma duplicação de um ou mais pares de base é 15 de a partir de cerca de 1,25 até cerca de 1,65 em comparação a uma sonda de referência que tenha um complemento normal da referida seqüência de ácido nucléico -alvo. Vantajosamente, o método pode ser adaptado de tal forma que múltiplas sondas tendo seqüências-alvo de ácido nucléico separadas são conjugadas a particulados que tenham um ou mais endereços 20 espectrais separados e hibridizadas a ácidos nucléicos. Em modalidades de preferência, o referido particulado compreende uma conta revestida com estreptavidina ou carboxilada ligada a uma parte de biotina ou de amino nos terminais 3' ou 5' da referida sonda de ácido nucléico e que tenha um diâmetro entre 50 nm e 1 μ m. Além disso, a quantidade da seqüência -alvo detectada por 1 μ g de seqüência de ácido nucléico genômica heteróloga está dentro da faixa de 50 pg até 5 ng e as diferenças em número de cópias são detectadas com uma resolução genômica de tão pouco como 60 pb. De preferência, a referida etapa de quantificação inclui a etapa de detectar o endereço 25 espectral do referido produto com a utilização de citometria de fluxo. As sondas de preferência tem um comprimento de entre 50 e 2500 bases, de 30 mais preferência entre 70 e cerca de 2500 bases, ainda de mais preferência entre 60 e cerca de 1000 bases, mesmo de mais preferência entre 80 e cer-

ca de 800 bases, ainda de mais preferência entre 90 e cerca de 110 bases e de maior preferência de cerca de 100 bases.

Outra modalidade de preferência proporciona um método para a detecção de uma anormalidade cromossômica suspeita em um ácido nucléi-

5 co genômico ou complementar derivado de um sujeito. Em geral, o método compreende as etapas de preparar uma microesfera codificada espectralmente, fluorescente, que tenha um primeiro endereço espectral, identifican-

10 do uma seqüência -alvo de sonda de ácido nucléico genômico, por verificar a seqüência em nucleotídio por nucleotídio de uma seqüência-alvo de ácido nucléico na qual a anormalidade é suspeita de estar, sintetizando uma son-

da-alvo de baixa cópia de acordo com a seqüência da sonda de ácido nucléico genômico identificada, conjugando a sonda -alvo a uma microesfera que tenha um primeiro endereço espectral, sintetizando a sonda de referên-

15 cia selecionada para se hibridizar a uma seqüência de ácido nucléico de referência que tenha um número de cópias conhecido da referida seqüência de ácido nucléico -alvo, conjugando a sonda de referência a uma microesfe-

ra que tenha um segundo endereço espectral, reagindo a sonda -alvo com uma seqüência cromossômica -alvo quer contenha a anormalidade fazendo com que por meio disso que a sonda -alvo se hibridize a seqüência alvo,

20 reagindo a sonda de referência com uma seqüência cromossômica de referência que contenha a referida seqüência cromossômica -alvo e por meio disso fazendo com que a sonda de referência se hibridize a seqüência de referência, detectando a sonda hibridizada -alvo para verificar a existência da anormalidade no cromossomo, detectando a sonda de referência hibridi-

25 zada, e quantificando a sonda -alvo hibridizada através da comparação da resposta da sonda -alvo hibridizada detectada com a resposta da resposta da sonda de referência hibridizada detectada. De preferência a referida anormalidade é selecionada a partir do grupo que consiste em diferenças em número de cópias de seqüências no interior do referido ácido nucléico ge-

30 nômico ou complementar, duplicações, cancelamentos, inversões, transposições, translocações ou combinação das mesmas. Em forma de preferência, o referido método é eficaz na detecção das referidas anormalidades com

uma resolução genômica de tão pequena como 60 pb. O método de preferência usa citometria de fluxo. De preferência, a referida sonda de baixa cópia tem um número de cópia de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 ou 0, dependendo da aplicação ou da sequência-alvo de ácido nucléico.

- 5 Em outra modalidade de preferência, a presente invenção proporciona um método de quantificação genômica direta de anormalidades cromossômicas através da detecção por citometria de fluxo de seqüências de ácido nucléico marcadas hibridizada sondas de ácido nucléico complementares ou genômicos de baixa cópia conjugadas a microesferas. Em geral
- 10 o método compreende as etapas de preparar uma microesfera codificada de forma espectral, fluorescentes tendo um diâmetro de entre 50 nm e 5,8 µm, sintetizando uma sonda -alvo de baixa cópia selecionada para se hibridizar a uma seqüência de ácido nucléico específico no alvo na qual a anormalidade é suspeita de existir, conjugando a sonda -alvo à microesfera, hibridizando a
- 15 sonda -alvo a uma seqüência de ácido nucléico -alvo, detectando a sonda -alvo hibridizada através de citometria de fluxo, e quantificando a referida anormalidade com base nos resultados da referida citometria de fluxo. De preferência, a seqüência de ácido nucléico de uma sonda é como definida acima. Esse método é especificamente de preferência para a detecção e quantificação de uma anormalidade selecionada a partir do grupo que consiste
- 20 em diferenças em número de cópias de seqüências dentro do referido ácido nucléico genômico ou complementar, duplicações, cancelamentos, inversões, transposições, translocações e combinações das mesma. Da mesma forma como com os outros métodos de preferência, este método pode detectar anormalidades com uma resolução genômica tão pequena quanto 60 pb.
- 25

- Em outra modalidade de preferência, a presente invenção proporciona um método para detectar anormalidades cromossômicas. De um modo geral o método compreende as etapas de preparar uma sonda de hibridização através do acoplamento de uma microesfera de polietileno, espectralmente codificada a uma seqüência sintética de DNA, hibridizando a
- 30 referida sonda ao DNA genômico, e detectando o produto da referida hibridização através de citometria de fluxo. As anormalidades e as resoluções que

podem ser detectadas são como as descritas acima. Em formas preferidas desta modalidade, uma etapa adicional de comparação dos resultados a partir da referida citometria de fluxo, com os resultados da citometria de fluxo a partir de um produto da hibridização que tenha um número de cópias conhecido que corresponda a referida anormalidade. De preferência, a sonda é de baixa cópia ou de cópia única. Vantajosamente, o DNA para essa modalidade e para outras modalidades de preferência pode ser não amplificado.

Definições

A não ser que definidos de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados aqui, tem o mesmo significado como são comumente entendidos por um versado na técnica a qual a invenção pertencem. Todas as patentes, pedidos de patentes, pedidos de patente publicados e outras publicações e seqüências do GenBank e de outras bases de dados referidas aqui ficam incorporadas por referência em sua totalidade. Se uma definição mostrada nesta secção é contrária ou de outra forma inconsistente com uma definição mostrada em outros pedidos de patente, pedidos de patente publicados e outras publicações e seqüências do GenBank e de outras bases de dados que estão incorporadas aqui, neste pedido de patente por referência, a definição mostrada nesta seção prevalece sobre a definição que está incorporada aqui por referência.

Na forma usada aqui, "um", ou "uma" significa "pelo menos um" ou "um ou mais".

Na forma usada aqui, "ácido(s) nucléico(s)" se refere ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e/ou ácido ribonucleico (RNA) em qualquer forma, incluindo entre outras as formas de filamento unido, filamento duplo, filamento triplo, linear e circular.

Na forma usada aqui, a expressão "sonda de referência" significa uma sonda específica para um local no genoma, de preferência a partir de uma seqüência auto-somática, que é gravemente danificadora e de preferência letal em qualquer outro número de cópias que não 2. A sonda de referência pode ser derivada a partir de qualquer local cromossômico de baixa cópia ou de cópia única, contanto que ela tenha um complemento cromos-

sômico normal na amostra do paciente. Da determinação do número de cópias genômicas para o diagnóstico de doença constitucional, as sondas de referência irão ser tipicamente de origem autossômica a partir de um ou mais genes que sejam necessários para serem expressos a partir de dois

5 alelos durante o desenvolvimento normal. Para a determinação do número de cópias genômicas para diagnóstico de doença neoplásica, as sondas de referência são selecionadas a partir de domínios cromossômicos com uma escassez de oncogenes e que tenha um complemento cromossômico normal.

10 Na forma usada aqui, "marcador" se refere a qualquer grupo ou parte química que tenha uma propriedade física que pode ser detectada ou qualquer composto capaz de fazer com que um grupo ou uma parte química exiba uma propriedade física que possa ser detectada, tal como uma enzima que catalise a conversão de um substrato em um produto detectável. O termo "marcador" também engloba compostos que inibem a expressão de uma

15 propriedade física específica. O "marcador" também pode ser um composto que seja um membro de um par de ligação, o outro membro do qual contenha uma propriedade física detectável. Os marcadores de exemplo incluem grupos de massa, metais, grupos fluorescentes, grupos luminescentes,

20 grupos luminescentes químicos, grupos óticos, grupos de carga, grupos polares, cores, haptenos, ligantes de ligação com proteína, seqüências de nucleotídeos, grupos radioativos, enzimas, partículas particuladas e uma combinação dos mesmos.

Na forma usada aqui, "amostra" se refere a qualquer coisa que

25 possa conter um ácido nucléico -alvo a ser analisado. A amostra pode ser uma amostra biológica, tal como um fluido biológico ou um tecido biológico. Os exemplos de fluidos biológicos incluem urina, sangue, plasma, soro, saliva, sêmen, fezes, escarro, fluido cérebro espinhal, lágrimas, muco, fluido amniótico, ou similares. Os tecidos biológicos são agregados de células, usualmente de um tipo específico junto com as suas substâncias intercelulares

30 que formam um dos materiais estruturais de uma estrutura de um ser humano, animal, planta, bacteriana ou fúngica, incluindo os tecidos conecti-

vo, epitelial, da pele, muscular e de nervos. Os exemplos de tecidos biológicos também incluem órgãos, tumores, nodos linfáticos, artérias e coleções de célula ou de células individuais, por exemplo, isoladas a partir do plasma, sangue ou urina, ou através de tratamento de colagenase de tecidos sólidos.

5 Na forma usada aqui, "amplificação" se refere a um método para a duplicação exponencial de um analito de ácido nucléico -alvo em uma amostra para o aumento da sensibilidade da análise. Na forma descrita aqui, muitos métodos diferentes para a amplificação de ácidos nucléicos são conhecidos na técnica.

10 Na forma usada aqui, "conjunto" se refere a uma coleção de microesferas acolhendo um endereço espectral conjugado tanto com uma única sonda 1c ou uma coleção de sondas 1c.

Na forma usada aqui, "cópia baixa" ou "1c" se refere a uma sequência que irá se hibridizar a dez ou menos intervalos de sequência no ácido nucléico -alvo ou em localizações em um genoma. É de preferência que o número de cópias seja de 10 ou menos, de mais preferência de 7 ou menos, ainda de mais preferência de 5 ou menos, e de maior preferência de 3 ou menos.

20 Na forma usada aqui, "cópia única" ou "sc" se refere a uma sequência de ácido nucléico que irá se hibridizar a três ou menos intervalos de sequência na sequência de ácido nucléico -alvo ou em localizações em um genoma. Dessa forma, o termo irá englobar as sequências que são estritamente únicas (isto é, sequências complementares a uma e somente a uma sequência no genoma correspondente), bem como as duplicações, e triplicações.

25 Na forma usada aqui, "altamente reiteradas" significa presente em mais do que dez cópias.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DAS FIGURAS DOS DESENHOS

30 A Figura 1 é um esquema de um ensaio de hibridização de sonda de baixa cópia acoplada a microesfera;

A Figura 2 é uma comparação de proporções de medias geométricas (eixo x) com relação a pares de sondas de teste de baixa cópia (16-lb,

16-2b, PMP22, TEK3) com relação a sondas de referência (HOXB1c) compiladas a partir de 170 reações;

A Figura 3 contém histogramas da detecção de fluorescência de microesferas multiplexadas a sondas de baixa cópia hibridizadas a amostras (a) intactas para 16-2b (Amostra 47, proporção de 16-2b:HOXB1 = 0,86, Tabela 2), (b) duplicação para TEK3 (CMT1A, proporção de TEK3: HOXB1 = 1,40, Tabela 2) e (C) canceladas para 16-1b (amostra 33, proporção de 16-1b: HOXB1 = 0,49, e usando HOXB1 como a sonda de referência genômica interna para cada uma das amostras;

A Figura 4 é um mapa da região PWS/AS do Cromossomo 15q11-13; e

A Figura 5 é um resumo de todas as proporções QMH MFI obtidas no Exemplo 2.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS MODALIDADES DE PREFERÊNCIA

O exemplo que se segue demonstra as modalidades de preferência da presente invenção. Este exemplo demonstra a detecção de "heterozigosidade", "triploidia", duplicação, e inserção no genoma humano e a quantificação de ácidos nucleicos em uma solução. No entanto, este exemplo é somente para finalidades ilustrativas e a descrição aqui, não deve ser considerada como uma limitação quanto ao âmbito da presente invenção.

Exemplo 1

Materiais e Métodos

Seleção, acoplamento e hibridização de sondas conjugadas a microesferas.

Seleção da sonda. Cinco sondas 1c foram desenvolvidas (Rogan et al, 2001; Knoll e Rogan, 2004) e usadas neste estudo para distinguir as diferenças no número de cópias genômicas nas amostras do paciente. Elas incluíram: (i/ii) sondas do cromossomo 9q34 (16-1 e 16-2) a partir de dentro do íntron 1b do *ABL1* e canceladas em um subconjunto de pacientes de leucemia mielogênica crônica (CML) (iii/iv) sondas do cromossomo 17p12 reconhecendo *TEKT3* e *PMP22* que estão dentro da região duplicada do CMT1A (Inoue et al, 2001), e (v) uma sonda de referência do cromossomo 7p15 reconhecendo *HOXB1* (2 cópias de genoma diplóide). Os comprimen-

tos das sondas, as temperaturas de hibridização e as coordenadas do genoma estão relacionadas na Tabela 1. Cada sonda tinha um número de cópias de um como determinado com relação ao comprimento total da sonda encontrada no genoma; no entanto, algumas seqüências homólogas de baixa cópia foram encontradas dentro de pequenos segmentos (< 200 bases) das sondas.

Síntese de sonda de cópia baixa (1c). Um único iniciador para cada par específico para a sonda 1c (22 a 24 nucleotídios de comprimento) foi sintetizado com um modificador de 5' amino C-12 para o acoplamento as microesferas (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa). A reação em cadeia de polimerase (PVR) usando Pfx (Invitrogen, Carlsbad, California) foi executada com cada par de iniciador (modificado e não modificado) com a utilização de controle de DNA genômico humano (Promega, Madison, Wisconsin) como o gabarito para a síntese da sonda 1c. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em baixa agarose EEO (Seakera, FMC Bioproducts, Rockland, Maine) e extraído por centrifugação em coluna de micro rotação (Qiagen, Valência, California). Os produtos foram quantificados com a utilização de um espectrofotômetro e em seguida conjugados para as microesferas com uma média de 120,000 moléculas de DNA acopladas a cada microesfera.

Acoplamento das sondas às microesferas. Microesferas fluorescentes, cada uma com endereços espectrais separados (nomeadas como R1 a R9: Molecular Probes, Eugene, Oregon) e revestidas com aproximadamente 200.000 sítios carbóxi, foram conjugadas de forma individual a sondas 1c diferentes. As sondas 1c purificadas modificadas com amino foram acopladas as microesferas corboxiladas através de um procedimento de acoplamento de carbodiimida modificado (Dunbar et al, 2003; Fulton et al, 1997). Cada sonda foi inicialmente desnaturada com calor e em seguida resfriada de forma instantânea sobre gelo. Aproximadamente 3.125×10^5 microesferas com características espectrais idênticas foram pipetadas dentro de um tubo de micro centrifuga de 1,5 ml (USA Scientific, Ocala, Florida), centrifugadas durante 2 minutos a 10.000 g e drenadas do sobrenadante.

150 µl de 0,1 M de tampão MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico) pH 4,5 foram adicionados a cada tubo e as microesferas foram submetidas a vórtice seguido rapidamente por centrifugação durante 2 minutos a 10.000 g. O sobrenadante foi removido e as microesferas foram ressuspensas por vórtice em 80 µl de 0,1 M de tampão MES. Uma única sonda 1c (0,5 nmol) foi adicionada a cada tubo e misturada por vórtice. Um volume de 1,25 µl de uma solução fresca de 10 mg/ml de cloridrato de 1-etil-3,3-dimetilaminopropil carbodiimida (EDC) foram adicionados e a reação foi submetida ao vórtice rapidamente e incubada no escuro durante 30 minutos com misturação ocasional. A misturação e a incubação do EDC foi repetida duas vezes com a utilização de 1,25 µl de uma solução preparada de fresco de EDC cada vez. A reação foi parada com a adição de 500 µl de 0,02% de Tween 20 seguida por vórtice e centrifugação durante 2 minutos a 10.000 g. E, seguida a remoção do sobrenadante, 250 µl de SDS a 0,1% foram adicionados a cada tubo, passados pelo vórtice e em seguida centrifugados a 10.000 g durante 2 minutos. O sobrenadante foi removido de forma cuidadosa, 25 µl de 0,1M de MES pH 4,5 foram adicionados e o tubo foi passado pelo vórtice e armazenado no escuro a 4°C. As concentrações das microesferas acopladas foram quantificadas através da adição de 1 µl de cada microesfera à 100 µl de 1X PBS e analisando no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, California), com a utilização das condições dadas abaixo.

Preparação do Gabarito do DNA Genômico.

O gabarito do DNA genômico foi preparado a partir de péletes de células fixadas com metanol e ácido acético derivadas tanto de amostras do paciente que restaram depois da caracterização citogenética clínica ou a partir de linhas de células obtidas a partir da NIGMS-Coriell Cell Repository (Camden, New Jersey). As células fixadas foram lavadas duas vezes com 1X PBS e as concentrações das mesmas foram determinadas com um hemocitômetro. O gabarito do DNA genômico foi extraído a partir de ~600 células fixadas por amostra. Este DNA foi replicado in vitro com a utilização do kit GenomiPhi (Qiagen, Valencia, CA), e em seguida transladadas por entalhe (1 µg) com dUTP de biotina-16 durante 60 minutos à 15°C para ser obti-

do os produtos marcados de 300 pb a 1 kb de comprimento (Knoll and Lichter, 1994). 50 ng das amostras do paciente transladas por entalhe foram analisadas em cada ensaio de hibridização.

5 As amostras utilizadas para a validação do método foram conhecidas como exibindo diferenças no número de cópias com relação ao cromossomo 9q34 e cromossomo 17p12, com base em análise citogenética de rotina e/ou hibridização de fluorescência in situ (FISH). Os resultados citogenéticos com relação a essas amostras de teste estão relacionados na Tabela 12.

10 As amostras incluíram cinco de pacientes com CML, dos quais dois tinham um cancelamento do cromossomo combinado 9q34 ABL1 (encontrado em 10% dos pacientes; Sinclair et al, 2000) além da translocação característica do cromossomo 9;22 (designados como Amostras 33,81) e três tinham somente a translocação do cromossomo 9;22 sem o cancelamento (designados como amostras 38, 47 e 86); duas a partir de linhas de células com "risomia" 9 completa (GM09286 e GM1 0186); uma a partir de uma linha de células com uma duplicação do cromossomo 9q34 (GM06074); e 5 a partir de pacientes com a doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A e uma duplicação do cromossomo 17p12 (designada como CMTIA-I até 4, e 20 GM12214). Foi obtida a aprovação do Institutional Review Board para a utilização das células residuais fixadas.

Reações de hibridização. Para a hibridização, 50 ng de cada amostra foram diluídos em tampão (3 mols/l de cloreto de tetrametilamônio, 50 mmols/l Tris-HCl, pH 8,0, 1 g/l de Sarkosila) contendo 5.000 microesferas acopladas a sonda 1c. As reações de hibridização foram desnaturadas à 25 95°C durante 3 minutos e em seguida hibridizadas de um dia para o outro a 45°C até 51°C dependendo da composição do nucleotídio e do comprimento da sonda (Lewin, 1980) (Tabela 1).

Tabela 1: Características da sonda de hibridização

Gene	Sonda	Comprimento (pb)	Temperatura de hibridização	Cromossomo	Coordenadas (Hg 12)
<i>HOXB1</i>	<i>HoxB1a</i>	2286	51	17	43965662-43967948
	<i>HoxB1b</i>	1343	45	17	43962053-43963396
	<i>HoxB1c</i>	102	50	17	43964237-43964330
<i>ABL1</i>	16-1a	2304	45	9	130623551-130625854
	16-1b	100	50	9	130624671-130624771
	16-2a	1381	48	9	130627353-130628735
	16-2b	101	50	9	130627353-130627454
<i>TEKT3</i>	<i>TEKT3</i>	98	50	17	15149108-15149206
<i>PMP22</i>	<i>PMP22</i>	101	50	17	15073475-15073576

As microesferas hibridizadas foram em seguida lavadas com 200 μ l de 1,5 X TMAC (Dunbar et al, 2003) seguida por centrifugação a 10.000 g durante 2 minutos. O sobrenadante foi removido e 12 μ l de uma diluição de 1:50 de uma molécula de informação, estreptavidina-ficoetitrina (SPE; Molecular Probes), em 1,5 X TMAC foram adicionados para detectar os objetivos genômicos que continham biotina. As reações foram incubadas nas duas temperaturas de hibridização durante 12 minutos. Em seguida a marcação, 250 μ l de 1,5 X TMAC foram adicionados a cada reação, misturados, e centrifugados a 10.000 g durante 2 minutos. O sobrenadante foi removido e as microesferas hibridizadas foram ressuspensas em 70 μ l de 1,5 X TMAC.

Deteção por citometria de fluxo de sondas de cópia baixa acopladas a microesferas hibridizadas. As reações de hibridização foram diluídas em 300 μ l de 1X PBS antes da análise em um citômetro de fluxo FACS-Calibur. Aproximadamente 5.000 microesferas de cada conjunto foram analisadas por reação. O sinal de cada alvo, hibridizado a sua sonda complementar acoplada as microesferas, foi determinado a partir da intensidade da fluorescência do SPE. Os endereços espectrais da microesfera compatíveis selecionados para minimizar a superposição com a emissão de comprimentos de onda de fitoeritrina (PE) foram confirmados através da comparação dos resultados obtidos com outros conjugados idênticos e microesferas hibridizadas. Para cada reação, um tubo de reação com todos os componentes exceto o DNA -alvo foi usado como um controle negativo para a determinação da fluorescência de fundo no canal de detecção de FL2 (PE). Os padrões de contras fluorescentes (LinearFlow Flow Cytometry Intensity Calibra-

tion Kit; Molecular Probes) foram usados para a calibração da intensidade de canais de detecção de fluorocromo diferentes do citômetro de fluxo. O instrumento também foi calibrado com padrões de referência de fluorescência (Quantum R-PE MESF Medium Level Kit; Bangs Laboratories, Fishers, Indiana), com base nas contas com marcação na superfície calibrada em moléculas de unidades de fluorocromo solúvel (MESF) equivalentes.

As fixações das voltagens ótimas fotomultiplicadoras dos tubos foram determinadas através da seleção das voltagens fotomultiplicadoras dos tubos que minimizaram as diferenças entre as intensidades de fluorescência de duas sondas hibridizadas diferentes com relação a uma amostra de DNA de um único paciente com um genótipo normal. Essas fixações foram determinadas a partir de medições de fluorescência derivadas de instrumento (CellQuest; Becton Dickinson) de média aritmética, média geométrica, e média de canal do pico. As fixações típicas das voltagens fotomultiplicadoras dos tubos para o instrumento FACSCalibur foram FSC (difusão dianteira) = E00 (nenhuma amplificação do sinal), SSC (difusão lateral) = 344 v, FL1 = 727 V, FL2 = 640 V, FL3 = 300 V, e FL4 = 500 V. Os limites para FSC, FL 1, FL2, e FL3 foram ajustados no comum de 52 V. O limite FSC foi selecionado como o parâmetro primário e tinha um valor de 52 V e o parâmetro secundário foi ajustado a SSC com um valor de 125 V. A velocidade de fluxo foi ajustada em baixa e o fluido de bainha usado foi o FACsFlow (Becton Dickinson). O sistema foi descarregado entre as rodadas com 2,5 ml de água destilada para a remoção de quaisquer microesferas residuais. O CellQuest foi usado para o recolhimento e a análise de dados. A análise de dados também foi realizada com a utilização do pacote de citometria de fluxo WinMDI2.8 (WinMDI; J. Trotter, Salk Institute, La Jolla, California).

A maioria das sondas testadas não necessitou de otimização significativa com relação a composição devido a que a qualidade da sonda dependeu principalmente na natureza de cópia baixa da sequência usada para projetar a mesma. As proporções de intensidade da fluorescência caíram fora dos intervalos de confiança estabelecidos ou de genótipos conhecidos com relação a sequências que foram parálogas a outros locais genômi-

cos (dados não mostrados). Isso foi frustrado através da utilização das sondas que eram estritamente não homólogas a outros segmentos genômicos. Os ajustes ótimos de voltagem resultaram em microesferas aglomeradas intimamente com endereços espectrais diferentes, como visualizadas com o

5 CellQuest usando o mapa de difusão lateral (SSC). Os parâmetros de voltagem não ótimos resultaram em picos FL2 mais largos ou dados não lineares (Bagwell et al, 1989; Brown et al, 1994).

Primeiro mostrou-se que todas as sondas poderiam detectar o produto de PCR correspondente em uma reação de hibridização, estabelecendo por meio disso que a conjugação de sonda e a hibridização a microesferas foram eficazes. Os produtos purificados ABL1 (16-1, 16-2), TEKT3, PMP22, e HOXB1 foram amplificados a partir de DNA genômico normal (Promega) com a utilização de um único iniciador 5' biotinilado. Os Produtos de PCR biotinilados foram hibridizados à sondas complementares conjugadas a microesferas e detectados com SPE. A contagem de microesferas hibridizadas e as intensidades medias de fluorescência foram medidas com a

10 utilização do software CellQuest (Becton Dickinson). A densidade dos produtos de 1c hibridizados com relação a um conjunto de microesferas foi calculada através da comparação da quantidade de contas únicas (a partir da contagem de contas do lado varrido fechado) ao número de contas hibridizadas (contagem de contas de sinal fechadas e nível médio de intensidade de fluorescência), que determinou a eficácia da conjugação do procedimento de acoplamento por carbodiimida. A especificidade da sonda 1c conjugada as microesferas com relação a sua sequência -alvo foi determinada através

15 de comparação da intensidade média de fluorescência de rodadas de citometria de fluxo repetidas de análises de hibridização com sondas homólogas versus sondas heterólogas. A hibridização de cada sonda foi otimizada através de uma faixa de temperaturas de tempera (45°C até 60°C)

Verificação da especificidade e da sensibilidade da sonda

30 Experimentos de reconstrução genômica: Para testar a especificidade de sondas 1c em ambiente genômico complexo, microesferas acopladas a sondas 1c foram hibridizadas aos seus produtos de PCR purifica-

dos correspondentes na presença de excesso de DNA de timo de bezerro cisalhado (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey). Reações independentes de hibridização foram executadas com relação a 16-1a, 16-2a e HOXB1 e foram realizadas com 10.000 microesferas para cada sonda, 5 ng do produto de PCR correspondente e 50 ng de DNA genômico de timo de bezerro transladado por entalhe. Para o calculo da quantidade detectável mais baixa de produto hibridizado, uma série de diluições dos produtos de PVR (5 a 10 equivalentes genômicos por reação de hibridização) foram adicionados a 10 ng de DNA de timo de bezerro cisalhado com uma proporção molar de PCR para DNA de timo de bezerro cisalhados variando a partir de ~1:300 até 1:10.

Hibridizações multiplex com a sonda 1c conjugada com as microesferas com relação à 16-1a, 16-2a e HOXB1 e 5 ng de cada um dos seus produtos de PCR correspondentes também foram realizadas na presença ou na ausência de 10 ng de DNA de timo de bezerro cisalhado. Além disso, foram realizados experimentos de troca de microesferas, nos quais a sonda 1c 16-1a foi conjugada a dois conjuntos de microesferas com endereços espectrais diferentes (R2 e R9), hibridizadas aos produtos de PCR correspondentes em uma reação multiplex, e os níveis médios de intensidade de fluorescência foram comparados com relação a cada conjunto de microesferas.

A análise estatística foi realizada com a utilização de MATLAB (MATHEMATICS, Natick, Massachusetts). As proporções médias de fluorescência entre as sondas de teste e de referência foram registradas com a utilização das médias aritméticas no texto (Coder et al., 1994). Os residuais foram calculados através do ajuste das proporções de fluorescência média e valores de canal de pico com relação a valores previstos com base em genótipos conhecidos.

Resultados

30 Especificidade do ensaio de hibridização

Os produtos da PCR homólogos as sondas acopladas às microesferas foram usados como DNA -alvo em reações de hibridização para e-

5 xaminar a eficácia da marcação do procedimento de acoplamento por carbodiimida. Com base no sinal médio SPE (no canal PL2) acima a fluorescência de fundo ($> 10^1$) e o número de microesferas hibridizadas aos produtos da PCR presentes na reação, 98% ($\pm 4\%$) das microesferas tinham se hibridizado ao produto da PCR -alvo (dados não mostrados).

10 Os experimentos de reconstrução genômica confirmaram que as sondas 1c 16-1a, 16-2a e TEKT3 não são homólogas, ($> 75\%$) a qualquer sequência no genoma do bezerro (*Bos taurus*). Com base na análise de sequência, o genoma do *Bos taurus* não deveria conter sequências estreitamente relacionadas às sondas 16-1a, 16-2a, TEKT3 e PMP22. As intensidades medias de fluorescência abaixo dos níveis de fundo foram consistentemente observadas a partir desses sinais de SPE. Em contraste, a HOXB1 exibiu uma intensidade média de fluorescência de 12,81 em um ensaio de hibridização, que era prevista uma vez que essa sonda é 90% homóloga as

15 sequências de HOXB1 no genoma do *Bos taurus*.

As sondas 1c conjugadas 16-1a e 16-2a detectaram sequências homólogas semeadas dentro de um fundo genômico homólogo. A sensibilidade de detecção foi relacionada linearmente a quantidade da sonda presente, com base nos aumentos na intensidade média da fluorescência em

20 SPE com a concentração de produto (danos não mostrados). Os experimentos de troca de microesferas mostraram que esses resultados foram independentes do endereço espectral da microesfera. As intensidades médias do sinal de hibridização com relação a intensidades diferentes de microesferas conjugadas a mesma sonda deram valores muito similares em uma intensidade do sinal. Por exemplo, para a Amostra 47, a hibridização multiplex da sonda 16-1a conjugada à microesfera R2 produziu uma intensidade média de fluorescência de 32,8 e a microesfera R9 deu um sinal de fluorescência média de 32,02, uma diferença de $\sim 2\%$. Com a amostra 33, a fluorescência média dessa mesma sonda variou em $\sim 13\%$ (41,88 vs. 36,16) para microes-

25

30 feras com endereços espectrais diferentes.

Otimização do comprimento de sonda.

Sondas de comprimentos variáveis foram conjugadas a microes-

feras para o exame dos efeitos do comprimento da sonda sobre o sinal de hibridização. As sondas 1c 16-2a (1382 bases) e 16-2b (101 bases), que são sub conjuntos da sonda 16-2, foram acopladas a superfície de microesferas espectralmente distintas e multiplexadas em uma única reação de hibridização à Amostra 47 (que tem um genótipo normal no local 16-2). De forma surpreendente, a proporção do sinal médio de fluorescência para a sonda 16-2b mais curta com relação à HOXB1 foi de aproximadamente o dobro da proporção correspondente à 16-2a. Um experimento multiplex com DNA a partir do cancelamento do cromossomo 9 do paciente (Amostra 33) mostrou as sondas 16-2a e 16-2b como tendo sinais mais baixos ~ 52% e 66% respectivamente do que a HOXB1 de referência. Uma vez que o paciente do cancelamento tinha um número de cópias de 16-2 comparado a da 1c HOXB1, o sinal obtido com a 16-2b mais curta parece refletir de forma mais precisa o número real de cópias nesses indivíduos. Resultados similares foram obtidos com os sub conjuntos das sondas 16-1 (16-1a [2304 pb] e 16-1b [100 pb]) conjugados a microesferas quando hibridizadas independentemente ao produto de PCR correspondente e ao DNA genômico de controle. Ambas as sondas se hibridizaram com sucesso a ambos os produtos de PCR e ao DNA genômico de controle, no entanto as distribuições de fluorescência SPE com relação as reações da 16-1a foram muito mais amplas do que elas foram com relação a 16-1b. Descobriu-se que as microesferas conjugadas as sondas mais curtas (~ 100 bases) produziram distribuições de média de fluorescência bem-definidas e valores PE consistentemente mais altos. Esses conjugados também poderiam ser usados em reações de hibridização durante mais do que dois meses depois da conjugação quando armazenados à 4°C no escuro, ou contrário das sondas conjugadas mais longas que mostraram uma eficiência de hibridização degradada dentro de 2 semanas a partir da preparação.

As sondas de oligonucleotídeos mais curtas (HOXB1 e 16-1c) provaram ser mais adequadas para a caracterização de genótipos de amostras conhecidas. Essas sondas produziram testes com relação as proporções da sonda de referência MFI que poderiam distinguir o número de có-

pias. Por exemplo, o DNA a partir da "trissomia" da linha de células 9, GM09286, foi hibridizado com a sonda de teste 16-1c (62 bases) e a sonda de referência HOXB1 (62 bases), produzindo uma proporção de MF1 de 1,28. Essa proporção MF1 é consistente com a presença de 3 cópias da sequência 16-1c.

Deteccção de número de cópias genômicas reduzido em amostras com um cancelamento de 9q34.

Os genótipos do cancelamento do cromossomo 9q34 e as amostras normais de controle foram baseados de forma a serem distinguidos com base na comparação das intensidades de fluorescência. Em um estudo cego, microesferas conjugadas à 16-2b e à HOXB1 foram hibridizadas em reações separadas ao DNA genômico da amostra 33 e da amostra 47 (Figura 3). Nos histogramas da Figura 3, o sinal de intensidade de fluorescência (ficoeritrina FL2, eixo x) versus a contagem de microesferas (eixo y) é plotada com relação a sonda de teste e a sonda de referência com relação a cada uma das amostras. A proporção da fluorescência média da sonda 16-2b para a sonda de referência HOXB1 (Tabela 2) indicam um número de cópias mais baixo para a 16-2b na amostra 33 (proporção = 0,67), consistente com um cancelamento de uma cópia nesse local, a qual foi previamente demonstrado com a por scFISH com a sonda 16-2a. Intensidades de sinal similares foram encontradas para ambas as sondas na amostra 47 (proporção = 0,96), consistentes com um genótipo normal. As proporções de fluorescência média das sondas 16-1b para a HOXB1 nas amostras 33 e 81 também foram consistentes com os resultados da FISH, demonstrando um cancelamento de uma cópia da 16-1a em ambos os pacientes.

As amostras 33 e 38 foram em seguida hibridizadas com as sondas 16-1b, 16-2b e HOXB1c em reações multiplex separadas. Com relação a sonda HOXB1, a amostra 33 mostrou uma fluorescência média de 61% para a 16-1b e de 51% para a 16-2b. As hibridizações da amostra 38 mostraram níveis de fluorescência média similares para HOXB1 e 16-1b (87%) e 16-2b (89%). Esses resultados são consistentes com os dados da FISH que demonstram que a amostra 33 tem um cancelamento hemizigótico

com relação a ABL1 e que a amostra 38 não tem.

A proporção da intensidade de sinal das 16-1 para a HOXB1 e da 16-2 para a HOXB1 com relação as amostras com um cancelamento em 5'ABL1 e para aquelas em um cancelamento estão graficamente representadas na Figura 2. Na Figura 2, as amostras são agrupadas por sonda de teste (eixo y). Uma caixa (linhas interrompidas) está desenhada em torno de cada grupo de genótipo separado (esquerda = cancelamento de cromossomo. meio = normal, direita = duplicação de cromossomo). As linhas verticais indicam a proporção MF1 teórica para cada um dos genótipos (0,5, 1,0 e 1,5 para amostras canceladas, norma e duplicadas, respectivamente). Como indicado, as proporções MF1 para todas as amostras dentro de cada genótipo não se sobrepõem com outros genótipos. Em geral, todas as amostras testadas com um complemento dissômico tem proporções com relação as sondas derivadas de 16-1 ou 16-2 com relação as intensidades de fluorescência medias da HOXB1 próximas de 1, e aquelas amostras com o cancelamento 5'ABL1 têm proporções próximas a 0,5 (tabela 2).

Tabela 2: Proporções das medias de intensidades de fluorescência media com relação a diferentes Genótipos.

Genótipo	Anormalidade específica para o local	Sonda(s)*	MF1 ± S.E. (n)	95% C.I.
(A) Comparação das proporções de MF1 com as proporções previstas a partir de genótipos conhecidos				
Bialélico (não cancelamento)	Nenhuma	<u>16-1b or 16-2b</u> HOXB1	1.01 ± 0.01 (16)	1.00 – 1.03
	Nenhuma	<u>TEKT3 PMP22</u> HOXB1	1.01 ± 0.01 (4)	0.97 – 1.05
Cancelamento	del (5' ABL1)	<u>16-1b 16-2b</u> HOXB1	0.59 ± 0.02 (11)	0.54 – 0.64
Trialélico	+9 or int dup(9)	16-1b / HOXB1	1.37 ± 0.05 (7)	1.25 – 1.50
	int dup 17p12	<u>TEKT3 or PMP22</u> HOXB1	1.53 ± 0.04 (17)	1.46 – 1.61
	int dup 17p12	PMP22 / 16-1b	1.48 ± 0.06 (3)	1.21 – 1.75
(B) Identificação de genótipo em estudo cego de 20 amostras de controle e 2 de anormalidades				
Bialélico	Nenhuma	<u>TEKT3</u> HOXB1	1.00 ± 0.01 (60)	1.00 – 1.01
Trialélico	CMT1A	<u>TEKT3</u> HOXB1	1.51 ± 0.07 (6)	1.33 – 1.70

* Media de proporções de media geométrica de intensidades de fluorescência para sondas de teste e referência

*Variações em proporções de MF1 entre conjuntos em triplicata foi de $6,5 \times 10^{-6}$ até 1×10^{-3}

A média geométrica e a mediana proporcionam as medições mais precisas da intensidade de fluorescência para sinal no ensaio de hibridização, uma vez que essas medições têm a menor variação residual (0,10) em regressão contra as proporções previstas com relação a todos os genótipos estudados.

Detecção de número de cópias aumentado do cromossomo 9q34 em linhas de células "trissômicas" 9.

Para determinar se o número de cópias trissômicas pode ser distinguido a partir do número de cópias bialélicas, a sonda 16-1b foi hibridizada ao DNA da partir de linhas de células trissômicas para 9q34 e comparada com a Amostra 47, que é dissômica para essa região (Tabela 2). Ambas a HOXB1c e a 16-1b foram multiplexadas em uma única reação de hibridização. As linhas de células GM09286 (proporção = 1,34), GM10186 (proporção = 1,40) e GM06074 (proporção = 1,26) cada uma exibiu uma fluorescência média significativamente mais alta com relação a 16-1b quando comparada com a HOXB1c, enquanto que ambas as sondas exibiram sinais de fluorescência média similares com relação a amostra 47 (proporção = 0,96). Sugere-se que um desvio a partir da proporção prevista de 1,5 pode ser devido tanto a estabilidade, isto é baixo teor de guanina-citosina (GC), da sonda 1c 16-1b, ou com relação a estrutura secundária da região genômica testada, resultando em menos alvos ligados a microesferas. O ensaio confirma os resultados citogenéticos e de FISH anteriores mostrando que a cópia adicional da sequência do cromossomo 9q34 em todas as três linhas de células e o número de cópias normal da sequência do cromossomo 9q34 em na amostra 47 (Tabela 5)

Detecção do aumento do número de cópias da região do cromossomo 17p12 em pacientes CMT1A.

O DNA genômico de cinco pacientes de CMT1A com as duplicações do cromossomo 17p12 e a amostra 86 com um cariótipo normal nesta região do cromossomo foram hibridizados tanto com as sondas 1c TEKT3 ou PMP22 e HOXB1c conjugadas a microesferas. Todas as amostras dos pacientes CMT1A mostraram elevações similares nos sinais de intensidade de

fluorescência média (variando a partir de 28 a 40% maior do que da HOX-B1c) para a hibridização à TEKT3, refletindo a presença de três cópias deste locus (Figura 3). A mostra 86 exibiu somente uma diferença de 2% em intensidades de fluorescência média com relação as duas sondas (Tabela 3).

5 Tabela 3: Detecção por Citometria de Fluxo de Anormalidades do Cromossomo.

Amostra	Achados citogenéticos	Sonda de teste	Intensidade média			Genótipo
			Sonda de teste	Sonda de referência	Proporção *	
47 2	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL+)	16-1b	48.72	50.94	0.96	wt
38.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL+)	16-1b	39.22	40.22	0.98	wt
195.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL+)	16-1b	1240.47	1179.37	1.05	wt
195 3	ibid	16-1b	1121.98	1132.11	0.99	wt
CMT1A-1	nuc ish 17p12(PMP22x3)	16-1b	41.04	44.74	0.92	wt
177.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(ABL+)	16-1b	182.41	173.86	1.05	wt
177 3	ibid	16-1b	162.15	161.31	1.01	wt
86.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL+)	16-1b	107.40	104.20	1.03	wt
86 3	ibid	16-1b	124.63	114.80	1.09	wt
124.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL+)	16-1b	721.63	678.48	1.06	wt
77.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL+)	16-1b	122.30	119.63	1.02	wt
47.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL+)	16-2b	44.31	51.74	0.86	wt
38.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL+)	16-2b	40.22	44.99	0.89	wt
47.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL+)	16-2b	27.41	26.77	1.02	wt
86.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL+)	PMP22	84.99	82.70	1.03	wt
81***	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL-)	PMP22	203.47	202.15	1.01	wt
86***	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(ABL+)	PMP22	84.99	82.70	1.03	wt
86.00	ibid	PMP22	84.99	82.70	1.03	wt
81.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL-)	PMP22	203.47	202.15	1.01	wt
81 3	ibid	PMP22	190.66	194.03	0.98	wt
86.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(ABL+)	TEKT3	97.22	99.60	0.98	wt
33.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL-)	16-1b	12.87	26.35	0.49	del
33.00	ibid	16-1b	58.76	91.19	0.64	del
81.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL-)	16-1b	28.02	41.48	0.68	del
33.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL-)	16-1b	12.87	26.35	0.49	del
46.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL-)	16-1b	82.77	142.28	0.58	del
33 2	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL-)	16-2b	68.43	103.90	0.67	del
81.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL-)	16-2b	46.78	91.19	0.51	del
33.00	t(9;22)(q34;q11.2).ish der(9)(5ABL-)	16-2b	46.78	88.81	0.53	del

Tabela 3: Detecção por Citometria de Fluxo de Anormalidades do Cromossomo.

Amostra	Achados citogenéticos	Sonda de teste	Intensidade média			Genótipo
			Sonda de teste	Sonda de referência	Proporção *	
GM10168	47,XY,+9,ish 9p11q11(D9Z1x3)	16-1b	75.23	59.16	1.27	dup
GM08074	46,XX,rec(9)dup(9)inv ins(9)(q22.1;q34.3q34.1)	16-1b	97.95	77.63	1.28	dup
GM10166 ³	47,XY,+9,ish 9p11q11(D9Z1x3)	16-1b	104.00	74.37	1.40	dup
GM09268 ³	47,XY,+9,ish 9p11q11(D9Z1x3)	16-1b	65.10	48.72	1.34	dup
GM09288	47,XY,+9,ish 9p11q11(D9Z1x3)	16-1b	65.47	37.93	1.46	dup
GM10188	47,XY,+9,ish 9p11q11(D9Z1x3)	16-1b	57.94	35.81	1.63	dup
CMT1A-1	nuc ish 17p12(PMP22x3)	PMP22	965.98	684.61	1.71	dup
CMT1A-2	nuc ish 17p12(PMP22x3)	PMP22	556.73	342.57	1.63	dup
CMT1A-3	nuc ish 17p12(PMP22x3)	PMP22	984.76	521.22	1.85	dup
CMT1A-4	nuc ish 17p12(PMP22x3)	PMP22	628.91	358.77	1.76	dup
CMT1A-1 ^{***}	nuc ish 17p12(PMP22x3)	PMP22	198.31	121.58	1.61	dup
CMT1A-2 ^{***}	nuc ish 17p12(PMP22x3)	PMP22	159.39	110.60	1.44	dup
CMT1A-3 ^{***}	nuc ish 17p12(PMP22x3)	PMP22	90.11	64.04	1.41	dup
GM12214	D17S122x3 [†]	PMP22	869.93	530.49	1.64	dup
CMT1A-1	nuc ish 17p12(PMP22x3)	TEKT3	104.09	74.17	1.40	dup
CMT1A-1-1 ^{***}	nuc ish 17p12(PMP22x3)	TEKT3	3319.34	1880.66	1.66	dup
CMT1A-1 [†]	ibid	TEKT3	125.58	79.62	1.58	dup
CMT1A-1 [†]	ibid	TEKT3	70.65	48.21	1.47	dup
CMT1A-1 [†]	ibid	TEKT3	107.43	76.43	1.41	dup
CMT1A-2	nuc ish 17p12(PMP22x3)	TEKT3	70.65	48.21	1.47	dup
CMT1A-2 [†]	ibid	TEKT3	122.33	86.02	1.42	dup
CMT1A-2 [†]	ibid	TEKT3	104.09	74.17	1.40	dup
CMT1A-2 [†]	ibid	TEKT3	107.62	74.36	1.45	dup
CMT1A-3	nuc ish 17p12(PMP22x3)	TEKT3	122.33	86.02	1.42	dup
CMT1A-4	nuc ish 17p12(PMP22x3)	TEKT3	107.43	76.43	1.41	dup
GM12214	D17S122x3 [†]	TEKT3	181.33	131.19	1.38	dup

* Proporção da média geométrica de fluorescência

** HOXB1 usada como sonda de referência

*** 16-1b usada como sonda de referência

**** HOXB1 usada como sonda de referência

wt tipo natural; del: cancelamento; dupl: duplicação

[†] Sonda HOXB1 incluída em cada hibridização como referência para duas cópias a não ser que anotado de outra forma

² Rodada de amostras em estudo cego

³ Rodada de amostras em experimentos de reprodução com relação a hibridização executada em dias diferentes

⁴ Duplicações registradas no local por Iupski et al., 1991.

Resultados similares foram obtidos com relação a uma análise multiplex das mesmas amostras de CMT1A testadas com PMP22 e HOXB1 (variando a partir de 28,5 até 54 % acima de HOXB1c; Ver a Tabela 2). Hibridizações independentes com multi esferas com TEKT3 e HOXB1 acopladas a microesferas hibridizadas a CMT1-A e CMT1-A2 demonstraram que esses resultados foram reproduzíveis, produzindo proporções de intensidade média de fluorescência que variaram por menos do que 2% para CMT1A-2 e por 16% para CMT1-A (Tabela 2). Essas proporções indicam um agrupamento em torno do valor previsto de 1,5 (1,26 - 1,85) para as amostras contendo as duplicações de 17p12 (Figura 2) (Tabela 5).

A média geométrica da proporção mediana de fluorescência foi encontrada como sendo a melhor medida para o ensaio da hibridização devido a que ela proporciona os intervalos de confiança menores e residuais para todos os genótipos sem sobreposição entre os genótipos (Figura 2). A regressão linear múltipla dos dados para cada uma das categorias de pro-

porção contra as proporções previstas sobre todos os genótipos deu coeficientes de correlação de 0,86 para a média aritmética, 0,80 para a média geométrica, e 0,42 para a proporção do canal do pico. Os intervalos de confiança de 96% com relação a proporção da média geométrica de fluorescência do teste para as intensidades de amostra de referência para os espécimes com genótipos diplóides normais foi de 0,97 até 1,09, com relação aos cancelamentos hemizigóticos foi de 0,5 até 0,64, e para as duplicações foi a partir de 1,44 até 1,546. A média aritmética produziu intervalos de confiança ligeiramente maiores (variação residual = 0,13), e a fluorescência do canal do pico foi encontrada como sendo uma medição subótima do número cópias, devido a que varias reações de hibridização produziram residuais muito maiores com relação a esses genótipos.

Em um estudo cego, reações em, triplicata de 22 amostras genômicas codificadas (consistindo em 20 amostras de pacientes normais e 2 CMT1A com duplicações previamente confirmadas) foram hibridizadas à sondas TEKT3 e HOXB1. A capacidade de reprodução para rodadas em triplicata de cada uma dessas amostras foi excelente, com variações nas proporções de MF1 variando a partir de $6,5 \times 10^{-4}$, até 1×10^{-3} . As amostras dos pacientes com duplicações de CMT1 foram observadas de forma fácil a partir dos controles normais, com base nas proporções MF1 de hibridização de TEKT3 : HOXB1 com relação a esses grupos (resumidos na Tabela 5). Esses dados são consistentes com nossos resultados anteriores que não mostram nenhuma sobreposição entre os dois genótipos na análise não cega (Figura 2).

25 Distinguindo número de cópias do genótipo.

A proporção e MF1 é uma medição robusta para a determinação do número de cópias genômicas, sem que se leve em conta quais locais estejam sendo analisados. O teste médio para a proporção da sonda de referência MF1 foi de $1,0 \pm 0,06$ ($n = 21$) em indivíduos normais no presente estudo (Tabela 2). A proporção foi de $0,57 \pm 0,08$ ($N = 8$) com relação a todas as amostras com cancelamentos hemizigóticos, e foi de $1,50 \pm 0,15$ com relação as amostras trialélicas. Embora diversas sondas se mostrassem em

um grau modesto de desvio das proporções MT1, as anormalidades foram claramente observáveis a partir dos genótipos normais com relação a todas as sondas 1c em um nível de confiança de 95%, e com relação aos genótipos normais versus os genótipos cancelados, em um nível de confiança de 98%.

Discussão

Suspensões de microesferas codificadas de forma espectral, acopladas a seqüências de DNA sintéticas, podem ser hibridizadas ao DNA genômico e detectadas através de instrumentos citometria de fluxo convencionais. Esta abordagem facilitou a "genotipagem" de alto rendimento de polimorfismos de nucleotídio único (Vignali, 2000). No entanto, as metodologias da técnica anterior exigem que o DNA -alvo seja amplificado antes da hibridização do DNA -alvo para uma sonda de 1 a 50 nucleotídios acoplada a microesferas (Hadd et al, 2004; Rockenbauer et al, 2005). As sondas de oligonucleotídios não podem quantificar com precisão o número de cópias genômicas diretamente a partir das amostras de DNA do paciente (Earley et al, 2002; Sekar et al, 2005; Vignali, 2000), devido a sensibilidade e a especificidade não adequadas. O calculo do número de cópias de seqüências -alvo também é complicado pelo fato de que a etapa necessárias de amplificação pode ser difícil de ser controlada devido a que ela é inerentemente logarítmica. O número de cópias genômicas pode ser determinado de forma equivocada quando o DNA genômico marcado diretamente é hibridizado sem a amplificação precedente (Southern, 1975; White et al, 2004).

Examinou-se a possibilidade de que a hibridização direta de DNA derivado de paciente com relação a sondas mais longas acopladas a microesferas poderia medir de forma quantitativa o número de cópias (Figura 1) ou este número, cada sonda 1c é sintetizada através de PCR com a utilização de um iniciador avançado modificado com amino e conjugado a microesferas carboxiladas espectralmente distintas. Na etapa (2) o DNA da amostra é extraído a partir de péletes de células fitogenéticas fixadas, e transladadas por entalhe para a incorporação da dUPT biotina. A etapa 3 ilustra que as microesferas acopladas a sonda 1c são hibridizadas ao DNA

genômico preparado e manchadas com estreptavidina-ficoetitrina (SPE) e lavadas para a remoção do SPE residual. Na etapa 4 as amostras são passadas pelo citômetro de fluxo (detecções de laser duplo) para a detecção dos endereços espectrais separados e a quantificação do alvo ligado através de cada sonda de microesfera na etapa 5. Previamente, validou-se as sondas (1c) de cópia baixa derivadas através de computador para detectar uma ampla variedade de anormalidades cromossômicas através de fluorescência na hibridização in situ (FISH) com relação a muitas regiões cromossômicas diferentes (Knoll and Rogan, 2003; Rogan et al, 2001). Neste estudo, desenvolveu-se uma suspensão de microesferas com sondas 1c a partir de três regiões cromossômicas diferentes associadas com condições aneusômicas e demonstrou-se o uso deste método para a detecção dos ganhos ou perdas em número de cópias em espécimes de arquivo citogênético fixados em metanol-acido acético.

Com a presente invenção, foi desenvolvida um ensaio de hibridização de microesferas em suspensão para detectar as diferenças em números de cópias genômicas que utilizam sondas genômicas de cópia baixa (1c). A amplificação anterior de DNA -alvo ao local não foi necessária uma vez que as sondas 1c são projetadas para se hibridizar a um local único da sequência haplóide do genoma com uma alta especificidade. A perda ou ganho de seqüências de cópia baixa pode ser detectada diretamente no DNA genômico do paciente. Este ensaio pode seguir as análises citogênicas de rotina sem que sejam necessárias grandes quantidades de amostra do paciente, retiradas adicionais de sangue, amplificação genômica específico ao local ou métodos de purificação do DNA genômico que consomem tempo. Esses estudos foram realizados com a utilização de preparações de células fixadas que permanecem depois das análises citogênicas.

Os experimentos de hibridização demonstraram sensibilidade adequada para discernir a presença de uma versus duas cópias bem como de duas versus três cópias de uma seqüência genômica. O uso de sondas 1c múltiplas, independentes conjugadas a microesferas com assinaturas espectrais distintas pode medir independentemente as mudanças no número

de cópias no mesmo ensaio de hibridização. Os cancelamentos de cromossomos foram confirmados no gene ABL1 em dois pacientes de CML, "trisomia" do cromossomo 9q34 foi confirmada em três linhas de células cultivadas e duplicações do cromossomo 17p12 foram confirmadas em células de cinco pacientes de CMT1A, incluindo uma linha de células. A mesma sonda usada para a do cancelamento de um cromossomo hemizigótico 9q134 também detectou três alelos em linhas de células com trissomia nesse local. As proporções de média de sonda ou de intensidades medias de fluorescência foram consistentes com relação ao pacientes com o mesmo genótipo e foram agrupadas em torno dos valores previstos, sem levar em conta a origem do cromossomo da sonda de teste.

Muitos parâmetros foram otimizados durante o desenvolvimento do ensaio: (i) as sondas 1c conjugadas às microesferas mostraram especificidade com relação a seqüências homólogas quando examinadas em um ambiente genômico heterólogo complexo, isto é, tão pouco quanto 5 ng da seqüência -alvo presente em 1 µg de seqüência genômica heteróloga foram detectado com sucesso; (ii) as sondas 1c conjugadas aos conjuntos de microesferas com endereços espectrais diferentes mostraram diferenças não significativas nas intensidades medias de fluorescência, sem levar em conta de qual microesfera estava conjugada á sonda; (iii) o comprimento da sonda 1c fixada a superfície da microesfera afetou a eficácia da hibridização, com as sondas mais curtas (~100 pb) exibindo intensidades medias de fluorescência maiores quando comparadas as sondas mais longas (1 a 2 kb). As sondas mais curtas foram mais estáveis (duração em armazenamento mais longa) resultando também em menos variação de lote para lote no estoque de microesferas marcadas (iv) isso, por sua vez reduz o esforço necessário para conjugar, quantificar e qualificar as microesferas ligadas ao DNA.

Exemplo 2

Este exemplo descreve uma aplicação clínica da hibridização quantitativa de microesferas para o exame da região da síndrome de Prader-Willi (PWS) e Angelman (AS) no cromossomo 15q11-13. 17 sondas de teste de cópia única ou de cópia baixa (80 nucleotídios cada uma) cobrindo ~ 3,2

Mb da região PWS/AS e uma sonda de referência dissômica (HOXB1, cromossomo 17q21), foram cada uma conjugadas a uma de dez níveis de microesferas de poliestireno com endereços espectralmente separados. Todas as sondas foram hibridizadas à DNA genômico do paciente marcado com biotina em reações multiplex de QMH, e a hibridização foi detectada com a utilização de estreptavidina marcada com ficoeritrina e analisadas através de citometria de fluxo de laser duplo. As diferenças em número de cópias foram observadas através da comparação das intensidades medias de fluorescência (MFI) das sondas de teste com a sonda de referência. A proporção da MFI com relações a locais cancelados foi de $0,58 \pm 0,072$ ($n = 80$) quando comparadas com as proporções de MFI com relação a locais normais, $0,98 \pm 0,075$ ($n = 186$).

Os rearranjos genômicos do cromossomo 15q11-13 ocasionaram vários fenótipos, incluindo autismo, síndrome de Prader-Willi (PWS), e síndrome de Angelman (AS). Essa região cromossômica é submetida a uma fixação genômica e caracterizada por combinações complexas de elementos de repetição de cópia baixa (refs). As PWS e AS resultam tipicamente a partir de um cancelamento =4Mb na região do cromossomo 15q11-13 paterno ou materno (Nichols 1998), respectivamente, com pontos de rompimento agrupados (HP) tanto a dois sítios próximos (BP1 e BP2) como a um sítio distal (BP3) que permite a classificação dos pacientes do cancelamento (classes I e II) (Knoll et al. 1990). Os pacientes do cancelamento de classe I são cancelados com relação a região que se estende de PB1 até BP3 e os pacientes de cancelamento de classe II são cancelados com relação a região que se estende de BP2 e BP3 (Knoll et al. 1990). Além disso, as mutações no interior do dentro de fixação de parte dupla (1C) nesta região pode ocasionar qualquer um dos distúrbios. Uma região deste 1C é necessária para o estabelecimento e a manutenção da fixação paterna ou materna, e os estudos apuraram a região mais curta da sobreposição (SRO) é que define PWS-1C (PWS-SRO) e AS-1C (AS-SRO) (Mapendano et al. 2006). Além disso, ambas a PWS como a AS podem aparecer a partir da dissomia de um só progenitor (UPD) do cromossomo 15, que é de origem materna em paci-

entes de PWS (dissomia materna) ou de origem paterna em pacientes de AS (dissomia paterna).

Materiais e Métodos

Seleção de sonda, síntese e conjugação de microesferas.

- 5 Uma serie de 17 sondas de teste específicas para o cromossomo 15q11-13 foi projetada, bem como uma sonda de referência dissômica para HOXB1 no cromossomo 17q21. cada uma das sondas tinha 80 bases de comprimento como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Sondas QMH usadas neste estudo

Sonda	Localização cromossômica (maio de 2004)*	Número de cópias
Chr15Cen	chr15:19412079	sc
D15S541	chr15:20360015	sc
GCP5	chr15:20402365	sc
AC006596-94501	chr15:21418753	sc
AC006596-76610	chr15:21436280	sc
AC006596-75658	chr15:21437980	sc
D15S11	chr15:21625540	sc
4737-13740	chr15:22569559	sc
D15S63	chr15:22658040	lc
AS-SRO	chr15:22717169	sc
IC	chr15:22736450	lc
chr15:22736805	chr15:22736805	lc
PWS-SRO2	chr15:22751461	sc
PWS-SRO	chr15:22763150	sc
U41384	chr15:22751151	sc
SNRPN-5'	chr15:22736850	sc
AC004600	chr15:23123664	sc
OCA2	chr15:26017960	sc
HOXB1	chr17:43963520	lc

* A coordenada indica o final 5' da sonda QMH. O comprimento de cada sonda é de 80 nucleotídios.

- 10 Houve somente um igualdade genômica com relação ao total de 80 bases para cada sonda, no entanto, pequenos segmentos de sonda podem ser igualados em outras regiões do genoma.

- 15 As sondas foram selecionadas com base na composições de seqüência de cópia baixa das mesmas, conteúdo de GC (48 a 55%), a falta de conformações de seqüências secundárias potenciais estáveis como previsto pelo software MFold (disponível através de The Bioinformatics Center

at Rensselaer and Wadsworth, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY), e o comprimento das mesmas (80 nucleotídios). Cada sonda foi sintetizada com a utilização de um iniciador avançado marcado com 5'-C6-amino(Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) para o acoplamento as
5 microesferas carboxiladas, e um iniciador reverso não modificado por PCR (Promega RedTaq Ready Mix, Madison, WI) usando um DNA de controle genômico humano normal (Promega) como o gabarito. O produto da PCR foi separado por eletroforese sobre gel (Seakem; FMC Bioproducts, Rockland, ME) e extraído por centrifugação de coluna de microrrotação (QiaQuik; Qia-
10 gen, Valencia, CA), através de uma reação de acoplamento com carbodiimida (Dunbar et al. 2003; Fulton et al. 1997).

Cada sonda foi inicialmente desnaturada com calor e em seguida instantaneamente resfriada sobre gelo. Aproximadamente 3.125×10^5 microesferas com características espectrais idênticas foram pipetadas para
15 dentro de um tubo de 1,5 ml de micro centrifuga (USA Scientific, Ocala, Florida), centrifugadas durante 2 minutos a 10.000 g e drenadas do sobrenadante. 150 µl de tampão de 0,1 M MES(ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico) pH 4,5 foram adicionados a cada tubo e as microesferas foram submetidas a vórtice seguido rapidamente por centrifuga-
20 ção durante 2 minutos a 10,000 g. O sobrenadante foi removido e as microesferas foram ressuspensas por vórtice em 80 µl de 0,1 M de tampão MÊS. Uma única sonda 1c (0,5 nmol) foi adicionada a cada tubo e misturada por vórtice. Um volume de 1,25 µl de uma solução fresca de 10 mg/ml de cloridrato de 1-etil-3,3-dimetilaminopropil carbodiimida (EDC) foram adicionados
25 e a reação foi submetida ao vórtice rapidamente e incubada no escuro durante 30 minutos com misturação ocasional. A misturação e a incubação do EDC foi repetida duas vezes com a utilização de 1,25 µl de uma solução preparada de fresco de EDC cada vez. A reação foi parada com a adição de 500 µl de 0,02% de Tween 20 seguida por vórtice e centrifugação durante 2
30 minutos a 10.000 g. E, seguida a remoção do sobrenadante, 250 µl de SDS a 0,1% foram adicionados a cada tubo, passados pelo vórtice e em seguida centrifugados a 10.000 g durante 2 minutos. O sobrenadante foi removido de

forma cuidadosa, 25 µl de 0,1M de MES pH 4,5 foram adicionados e o tubo foi passado pelo vórtice e armazenado no escuro a 4°C. As concentrações das microesferas acopladas foram quantificadas através da adição de 1 µl de cada microesfera a 100 µl de 1X PBS e analisando no citômetro de fluxo

5 FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, California), com a utilização das condições dadas abaixo.

Os procedimentos de controle de qualidade para cada sonda conjugada com as microesferas foi executado para assegurar uma fixação apropriada das sondas às microesferas. Foi primeiro determinado que todas

10 as sondas poderiam detectar o produto de PCR correspondente em uma reação de hibridização, estabelecendo que a conjugação da sonda e a conjugação às microesferas foi eficiente. Os produtos de PCR purificados específicos para cada uma das sondas QMH utilizadas neste estudo (Tabela 3) foram amplificados a partir de DNA genômico normal (Promega) com a utilização de um único iniciador 5' biotilado. Os Produtos de PCR biotilados

15 foram hibridizados a sondas complementares conjugadas com as microesferas e detectados com SPE. A contagem das microesferas hibridizadas e as intensidades medias de fluorescência foram medidas com a utilização do software CellQuest (Becton Dickinson). A densidade dos produtos 1c hibridizados com relação a um conjunto de microesferas foi calculado através de

20 comparação da quantidade de contas únicas (a partir da contagem de contas do lado varrido fechado e nível médio de intensidade de fluorescência), que determinou a eficácia da conjugação do procedimento de acoplamento por carbodiimida. A especificidade da sonda 1c conjugada as microesferas com relação a sua sequência -alvo foi determinada através de comparação

25 da intensidade média de fluorescência de rodadas de citometria de fluxo repetidas de análises de hibridização com sondas homólogas versus sondas heterólogas. A hibridização de cada sonda foi otimizada através de uma faixa de temperaturas de tempera (45°C até 60°C).

30 Além disso, foram realizados experimentos de troca de microesferas, para verificar se o valor de MFI era independente do nível de microesferas usadas para a conjugação, os detalhes com relação aos quais foram

determinados previamente (Newkirk et al. 2006). Esses experimentos foram executados com a utilização da sonda 1c D15S63 conjugada a duas microesferas com endereços espectrais diferentes (L2 e L9). Ambos os conjuntos de microesferas foram hibridizados ao produto de PCR correspondente em uma reação multiplex, e aos níveis de intensidade média de fluorescência foram comparados para cada conjunto de microesferas. Ambas as reações mostraram valores de MF1 similares para a mesma sonda. Este experimento foi repetido para a sonda 1c (Tabela 2) com resultados similares.

Amostras de paciente e preparação de alvo genômico. O gabarito do DNA genômico foi preparado com a utilização de amostras do paciente arquivadas (n = 21) ou usando péletes de células fixadas com metanol e ácido acético derivadas a partir de preparações citogenéticas das amostras de medula óssea (n = 10). As péletes de células fixadas tinham sido armazenadas a partir de dois até oito anos em metanol e ácido acético. Os genótipos com relação a algumas amostras eram conhecidos antes dos estudos citogenéticos, e/ou de hibridização Southern, enquanto que algumas eram desconhecidas (Tabelas de 4 a 7). As células fixadas foram lavadas duas vezes com 1X de PBS e as concentrações das mesmas foram determinadas com um hemocítômetro. O gabarito do DNA genômico foi extraído a partir de ~600 células fixadas por amostra.

Para as amostras de DNA arquivadas não foi necessário nenhum tratamento antes da amplificação. O DNA genômico total foi replicado in vitro com a utilização de um protocolo modificado do kit GenomiPhi (GE Healthcare, Piscataway, NJ), para permitir a incorporação direta da biotina dentro do DNA do gabarito. Primeiro, 1 µl de cada amostra de DNA foi misturado com 9 µl de Tampão de Amostra (GE Healthcare, Piscataway, NJ), e desnaturado durante 3 minutos a 95°C. As amostras foram resfriadas instantaneamente sobre gelo durante 2 minutos seguido pela adição de 4 µl de 50 nmols de Biotina-16-dUTP (Roche, Indianapolis, IN), 9 µl de Tampão de Reação (GE Healthcare), e 1 µL de Enzyme Mix (GE Healthcare). As reações foram incubadas a 30°C durante 24 a 36 horas. A replicação com sucesso do DNA do paciente foi verificada através de amplificação por PCR das son-

das HOXB1 e PWS-SRO (tabela 3). Qualquer amostra que não produziu o produto da PCR nesta etapa de controle de qualidade inicial não foi usada para o QMH. Foi observado que as amostras que não amplificaram com sucesso o produto da PCR não produziram resultados de QHM precisos (dados não mostrados). A idade dos péletes de células fixadas é provavelmente um fator de contribuição para a falta de amplificação de PCR em seguida ao procedimento GenomiPhi modificado. A análise dessas amostras por PCR e eletroforese com gel indicou que o DNA extraído estava altamente degradado e cisalhado, o que poderia por sua vez fazer com que uma sonda intacta aparecesse cancelada no QMB. Foi observado que o DNA genômico que passou no controle de qualidade por PCR foi obtido a partir de péletes de células fixadas armazenadas mais recentemente (~ 2 a 5 anos) versus as péletes de células mais velhas (> 6 anos). As amostras de DNA que passaram no ensaio de PCR para controle de qualidade foram cisalhadas para ~300 a 800 pb por sonicação (B-300, Branson, Danbury, CT), que foi monitorada através de eletroforese sobre gel (Seakem). Vinte e cinco ng de cada uma das amostras de DNA genômico marcada e fragmentada foi usada por reação de QHM.

Reações de hibridização e citometria de fluxo. O DNA genômico preparado foi diluído em 40 µl de tampão de hibridização 1,5 XTMAC (3 mols/l de cloreto de tetrametilamônio, 50 mmmols/l Tris-HCl, pH 8,0, 1 g/l de Sarkosila) contendo ~ 7.500 de microesferas acopladas a cada sonda. A análise multiplex de dois a dez níveis diferentes de microesferas conjugadas as sondas com relação as QMH foi possível em uma única reação com a utilização de microesferas CytoPlex (Duke Scientific; Palo Alto, CA). As sondas incluídas nas reações de hibridização foram selecionadas com base em provas de genótipo disponíveis em cada paciente ou família previamente caracterizados, e as amostras desconhecidas foram hibridizadas com c-hr15Cen, GCP5, D15S11, D15S63, PWS-SRO, e OCA2 inicialmente em um esforço para delinear os cancelamentos de classe I, classe II e 1C (Tabela 3). As sondas QHM usadas nas reações de hibridização subseqüentes foram selecionadas adjacentes à ou no interior de quaisquer das regiões can-

celadas detectadas na primeira reação de QMH com a finalidade de caracterizar com precisão o intervalo de cancelamento (Figura 4). As reações foram desnaturadas com calor a 95°C durante 5 minutos e deixadas se hibridizar de um dia para o outro a 50°C. As reações foram centrifugadas durante 2 minutos a 10.000 g, o sobrenadante foi removido, e 12 µl de uma diluição a 1:50 de uma molécula de informação, estreptavidina-ficoeritrina SPE; Molecular Probes, Eugene, OR), em 1,5 X TMAC foram adicionados para a detecção dos alvos genômicos que continham a biotina. As reações foram incubadas em suas temperaturas de hibridização durante 12 minutos. Em seguida a marcação, 250 µl de 1,5 X TMAC foram adicionados a cada reação, misturados, e centrifugados à 10.000 g durante 2 minutos. O sobrenadante foi removido e as microesferas hibridizadas foram ressuspensas em 70 µl de 1,5 X TMAC

As amostras foram avaliadas através de análise por citometria de fluxo com a utilização de um FACSCalibur (Becton Dickenson, San Jose, CA) e aproximadamente 20.000 eventos foram analisados em cada reação. As fixações típicas de voltagem para o instrumento FACSCalibur foram FSC (varredura para frente) = E00 (nenhuma amplificação de sinal) em Modo Log, SSC (varredura lateral) = 344 V em Modo Linear, FL1 = 628 V em Modo Logarítmico, FL3 = 710V em Modo Logarítmico, e FL4 = 500 V em Modo Logarítmico foram fixados como o default para 52 V. O limite FSC foi o parâmetro primário com um valor de 50 V e o parâmetro secundário foi o SSC e ajustado a 130 V. A velocidade de fluxo foi fixada baixa. A compensação de cor como ajustada como se segue: FL1 = 1,9% FL2, FL2 = 21% FL1, FL2 = 0% FL3, FL3 = 10% FL2, FL3 = 4,7% FL4, e FL4 = 3,6% de FL3. Os valores de compensação de cor minimizam a sobreposição espectral dos valores MFI medidos nos canais diferentes do citômetro de fluxo. Esses ajustes foram determinados como ótimos com base em aglomerados distintos com relação a cada um dos níveis diferentes de microesferas não marcadas no gráfico de SSC vs. sinal de conta. Os padrões de contas fluorescentes (LinearFlow Flow Cytometry Intensity Calibration Kit; Molecular Probes) foram usados com relação à calibração da intensidade dos diferentes canais de

detecção do fluorcromo do citômetro de fluxo. O instrumento também foi calibrado com padrões de referência de fluorescência (Quantum R-PE MESF Medium Level Kit; Bangs Laboratories, Fishers, Indiana), com base nas contagens com a superfície marcada calibradas unidades de moléculas de fluorcromo solúvel equivalentes (MESF). Depois da análise de cada amostra através de citometria de fluxo, as proporções da média geométrica das intensidades de fluorescência (MFI) da sonda de teste com relação à sonda de referência foram calculadas e as estatísticas (por exemplo, média, 95% de intervalos de confiança, e desvio padrão) foram geradas com a utilização de MS Excel como mostrado na Tabela 5-1 até 5-9 (referida coletivamente como a Tabela 5).

Tabela 5-1. Cancelamento de PWS-IC

Sondas	R92-166-PWS		R92-167-PWS		R92-168-PWS	
	MFI	Proporção MFI	MFI	Proporção MFI	MFI	Proporção MFI
Chr15Cen						
D15S541						
GCP5						
AC006596-94501						
AC006596-76610						
AC006596-75658	877.68	0.92	775.26	0.88	447.16	1.03
D15S11						
4737-13740	867.25	0.9	752.88	0.91	442.1	1.02
D15S63	581.17	0.61	387.25	0.49	407.53	0.94
AS-SRO						
chr15:22736805	554.11	0.61	361.49	0.45		
IC						
PWS-SRO2	344.29	0.67	397.53	0.66		
PWS-SRO	554.11	0.61	400.98	0.51	436.9	1
U41384	862.51	0.95	540.17	0.99	446.47	1.03
AC004600	812.56	0.9	766.7	0.973	454.03	1.05
OCA2						
HOXB1	953.07	1	786.03	1	433.77	1
HoxB1	904.58	1	543.66			
HoxB1	953.07	1				
HOXB1	511.56					
HOXB1						

Tabela 5-2. Cancelamento de PWS-IC

Sondas	R93-001-MOD		R93-002-MOD		R93-013-MOD	
	MFI	Proporção MFI	MFI	Proporção MFI	MFI	Proporção MFI
Chr15Cen					608.86	1.04
D15S541						1
GCP5					591.17	1.07
AC006596-94501					623.74	
AC006596-76610					637.56	1
AC006596-75658					650.75	1.09
D15S11					550.78	
4737-13740					629.24	0.94
D15S63	349.83	0.93	218.07	0.89	685.65	1.1
AS-SRO	279.54	0.48	477.62	0.5	287.44	0.54
chr15:22736805	1177	0.52	558.24	0.6	576.46	0.62
IC			560.08	0.61	668.84	0.56
PWS-SRO2	168.4	0.51	140.18	0.58	474.64	0.67
PWS-SRO	611.92	0.62	560.08	0.81	576.46	0.62
U41384	353.57	0.99	628.65	1.01	656.62	1.03
AC004600					642.6	1.01
OCA2					583.66	1
HOXB1	355.59	1	925.21	1	708.99	1
HoxB1	611.92	1	617.84	1	919.25	1
HoxB1	1177	1	244.96	1	583.5	1
HOXB1	332.33	1	240.36		1171.82	1
HOXB1					623.05	1

Tabela 5-3. Cancelamento de PWS-IC

Sondas	R93-014-MOD		R90-035-PWS	
	MFI	Proporção MFI	MFI	Proporção MFI
Chr15Cen				
D15S541				
GCP5				
AC006596-94501	1040.10	1.04		
AC006596-76610	551.24	1		
AC006596-75658	589.73	1.07		
D15S11				
4737-13740	548.96	1		
D15S63	1099.32	1.09	2218.29	0.96
AS-SRO	550.84	0.94	1369.26	0.91
chr15:22736805	1002.80	1.01	539.61	0.94
IC			2282.87	0.98
PWS-SRO2			420.72	0.68
PWS-SRO	550.84	0.94	2282.87	0.98
U41384	601.70	1.09	2156.66	0.93
AC004600	1142.21	1.05		
OCA2				
HOXB1			571.37	1
HoxB1	585.35	1	2318.37	1
HoxB1	585.35	1	2318.67	1
HOXB1	971.38	1	617.43	1
HOXB1	1004.81	1		

Tabela 5.4

Sondas	C93-49-PWS		WJK-18		WJK-35	
	MFI	Proporção MFI	MFI	Proporção MFI	MFI	Proporção MFI
Chr15Cen	1393.07	0.98	2253	1.02	2132.08	0.93
D15S541			1410.88	0.85	403.88	0.95
GCP5	1341.11	0.94	4997.03	0.84	1614.86	0.89
AC006596-94501	1743.21	0.98	1923.16	0.47	2480.87	0.66
AC006596-76610						
AC006596-75658	7219.48	1				
D15S11	1432.32	1	2743.42	0.67	2436.3	0.65
4737-13740	1270.05	1.06				
D15S63	1226.86	0.68				
AS-SRO						
chr15:22736805						
IC	902	0.65				
PWS-SRO2						
PWS-SRO			1923.16	0.58	2022.45	0.53
U41384	782.40	0.84				
AC004600	1290.12	0.62				
OCA2	864.81	0.63	1798.12	0.44	2187.31	0.58
HOXB1	1299.39	1	2219.26	1	2301.9	1
HoxB1	1187.70	1	4095.52	1	3773.98	1
HoxB1	1418.39	1	5941.3	1	1808	1
HOXB1	1782.99	1			422.31	1
HOXB1						

Tabela 5.5

Sondas	WJK-29		WJK-36	
	MFI	Proporção MFI	MFI	Proporção MFI
Chr15Cen	1877.33	0.83	1956.96	0.85
D15S541	644.15	0.50	403.88	0.47
GCP5	1176.46	0.52	1164.56	0.50
AC006596-94501				
AC006596-76610				
AC006596-75658				
D15S11	1215.87	0.54	1429.98	0.62
4737-13740				
D15S63				
AS-SRO				
chr15:22736805				
IC				
PWS-SRO2				
PWS-SRO	1306.65	0.58	1394.38	0.60
U41384				
AC004600				
OCA2	1035.14	0.46	1335.82	0.58
HOXB1	2265.51	1	2308.24	1
HoxB1				
HoxB1				
HOXB1				
HOXB1				

Tabela 5.9

Sondas	R92-041-PWS*		R89-008-PWS*		R89-007-PWS*		R89-010-PWS		R89-009-PWS	
	MFI	Proporção MFI	MFI	Proporção MFI	MFI	Proporção MFI	MFI	Proporção MFI	MFI	Proporção MFI
Chr15Cen										
D15S41										
GCP5			585.89	0.84	440.17	0.86	533.35	0.82	388.31	0.86
AC006596-84501										
AC006596-76810										
AC006596-75658										
D15S11	457.83	0.95	478.84	0.95	351.34	0.92	314.43	0.99	534.92	0.97
4737-13740										
D15S63	484.20	1.01	476.12	0.95	348.58	0.91	305.53	0.96	522.52	0.95
AS-SRO										
chr15:22736805										
IC										
PWS-SRO2										
PWS-SRO										
U41384										
AC004600										
OCA2			671.45	0.97	498.49	0.98	660.90	1.01	459.97	0.99
HOXB1	479.32	1	501.16	1	379.95	1	317.69	1	551.04	1
HoxB1										
HoxB1										

As Tabelas de 4-1 até 4-9 incluem, cada uma indicadores de sonda na coluna mais a esquerda seguida pelo resultado das amostras em colunas pareadas incluindo as intensidades medias de fluorescência e as proporções das intensidades medias de fluorescência. Os dados que mostram os cancelamentos estão limitados por uma borda mais escura. Os valores geométricos de MFI foram mostrados anteriormente como sendo mais precisos para a avaliação dos dados a partir das análises QHM uma vez que os dados são coletados em modo logarítmico no citômetro de fluxo (Kirkwood 1979; Coder et al. 1994; Newkirk et al., 2006).

10 Resultados

Deteccões de grandes cancelamentos em pacientes de PWS/AS.

Uma série de sondas 1c conjugadas a microesferas cobrindo os cromossomos 15q11 a q13 foram hibridizadas a DNA genômico marcado a partir de pacientes na região PWS/AS. Em alguns casos os cancelamentos foram determinados por análise anterior (ver Métodos) (n = 8; WJKI 8, 35, 29, 36, 48, C93-49-PWS, R92-161-PWS, R92-144-PWS), e em outros pacientes, os genótipos não eram conhecidos, no entanto um diagnóstico clínico de PWS ou AS tinha sido feito (n = 3) (Não conhecidos 2, 2 e 3).

Um mapa da região PWS com as sondas está provido na Figura 4. Nesta figura, as coordenadas cromossômicas com relação às sondas 1C conjugadas a microesferas (destacadas) bem como outros microssatélites e genes são indicados. As AS-SRO e PWS-SRO estão identificadas com estrelas grandes. As sondas conjugadas as microesferas estão indicadas atra-

vés de uma linha pontilhada vertical ligada a um círculo que representa o nível de microesferas que foi usado para a conjugação (1 a 10). Os intervalos de cancelamento da classe I e da classe II, bem como os seus intervalos de pontos de rompimento (BP) estão representados. As estrelas pequenas indicam quais as microesferas conjugadas a sondas foram usadas em uma análise QMH inicial para distinguir os pacientes de cancelamento da classe I e da classe II., Os resultados QMH ilustram as regiões canceladas encontradas em pacientes examinados na presente análise. Os triângulos colocados nos intervalos de cancelamento marcam os marcadores de microssatélites tratados em cada grupo para definir os intervalos de cancelamento nos estudos anteriores (ref.) O número de pacientes encontrados com cada tipo de intervalo de cancelamento está indicado entre parênteses e um "*" preto indica se esses indivíduos são relacionados.

As reações multiplex iniciais de hibridização para delinear os cancelamentos da classe I dos da classe II em pacientes de grandes cancelamentos (n = 11) incluíram sondas de teste específicas para as sondas to Chr15Cen, GCP5, D15S11, PWS-SRO e OC A2, e para a sonda de referência HOXB1. O número de cópias para todas as sondas foi distinguível com facilidade com base nas proporções MFI em cada paciente (Tabelas 4-4, 4-5 e 4-6). A proporção de MFI com relação as regiões canceladas neste grupo de pacientes variaram a partir de 0,44 a 0,67 e para os segmentos genômicos intactos variaram a partir de 0,83 a 1,06 (Tabelas 4-4, 4-5 e 4-6). Usando os resultados a partir da reação inicial de QMH, as sondas subseqüentes foram escolhidas para ainda estreitar mais cada intervalo de cancelamento. Por exemplo nos pacientes WJK-29, WJK-36, e R92-144-PWS, Chr15Cen estava intacta porém, GCP5, D15S11, PWS-SRO e OCA2 foram encontrados como estando cancelados (Tabelas 4-5 e A- 6). Para delinear ainda mais esses intervalos de cancelamento, foi usada uma sonda QMH específico para D1S541 entre Chr1 5Cen e GCP5 em uma segunda reação. Os resultados a partir dessa reação de hibridização revelaram que WJK-29, WJK-36, e R92-144-PWS também são cancelados com relação à D15S541, que é responsável por um intervalo de cancelamento de ~ 5.66 Mb, e que classifica

esses dois pacientes como classe I (Amos- Landgraf et al. 1999). Nos pacientes WJK-18, 35, 48, e R92-161-PWS, os resultados iniciais de QMH indicaram que Chrl 5Cen e GCP5 estavam intactos, porém D15S11, PWS-SRO, e OCA2 foram cancelados (Tabelas 4-4 e 4-6). Depois de uma segunda reação de QMH, os resultados combinados mostraram um cancelamento a partir de AC006596-94501 até OCA2 (~4,6Mb), que é considerado um cancelamento de classe II (Knoll et al., 1990).

Os resultados de QMH para um paciente revelaram um cancelamento não clássico quando comparado ao segmento típico cancelado com relação aos pacientes de classe I e classe II (Tabela 4). No paciente C93-49-PWS, as sondas para D15S63, 1C, U41384, AC004600, e OCA2 estavam presentes em uma cópia cada uma, enquanto que Chr15Cen, GCP5, AC006596-94501, AC006596-76610, D15S11, e AC004737- 13740 estavam dissômicas (Tabela 4-4). O intervalo de cancelamento cobriu ~ 3,36 Mb e pode representar uma subclasse de cancelamentos II.

Deteccão de cancelamentos 1C em pacientes PWS.

Um total de seis pacientes PWS previamente encontrados como tendo cancelamentos 1C através de análise de microssatélite foram usados para QMH (R93-001-MOD, R93-002-MOD, R93-013-MOD, R90-035- PWS, R92-166-PWS, e R92-167-PWS) (Tabelas 4-1, 4-2 e 4-3). Para a primeira família as sondas de teste específicas para AC006596-75658, AC004737-13740, D15S63, chrl 5:22736805, PWS- SRO, U41384, e AC004600, bem como a sonda de referência HOXB1, foram hibridizadas a DNA genômico marcado, a partir de cada membro de cada família (Tabela 3). Nos R92-166-PWS e R92-167- PWS, um cancelamento a partir de D15S63 até PWS-SRO foi identificado (~ 93kb). Os resultados anteriores de microssatélite indicam um cancelamento em D15S63 e DI 5SI 28, de tal forma que os resultados de QMH prolongaram o cancelamento encontrado pela "genotipagem" de microssatélite em ~ 70 kb. O membro da família não afetado (R92- 168-PWS) foi encontrado como normal com relação a todos os locais testados (Tabela 4-1).

Outra família com uma mutação 1C PSW identificada anterior-

mente através de hibridização Southern e análise por microssatélite foi analisada por QMH (R93-001-MOD, R93-002-MOD, R93-013-MOD, e R93-014-MOD) (Tabelas 4-2 e 4-3) (Ohta et al., 1999; Rogan and Knoll, 2003). As reações iniciais de hibridização incluíram sondas de teste para AC006596-94501, 1C, PWS-SRO, e AC004600, além da sonda de referência HOXB1. Os resultados mostraram que todas as amostras analisadas estavam intactas com relação a AC006596-94501 e AC004600, porém a 1C e PWS-SRO foram canceladas em R93-001-MOD, R93-002-MOD, e R93-013-MOD. Reações QMH subsequentes com as sondas de teste circunscrevendo este intervalo de cancelamento refinaram o limite do cancelamento 1C a partir de AS-SRO até PWS-SRO (~50kb), que prolonga os resultados anteriores em ~45 kb (Buiting et al 1995; Ohta et al. 1999).

A QMH foi usada para a análise do menor intervalo de cancelamento PWS-SRO documentado até agora (~ 4,3 kb), R90-035-PWS (Tabela 4-3) (Ohta et al. 1999). Uma hibridização inicial incluiu sondas específicas para D15S63, AS-SRO, 1C, PWS-SRO, chr15:22736805, e U41384 além da sonda de referência HOXB1 e (Tabela 3). As proporções de MFI indicaram que todas as sondas de teste estavam intactas e desse modo outra sonda dentro da região que separa as AS-SRO e PWS-SRO, PWS-SRO2, foi projetada e hibridizada para esse paciente. A sonda PWS-SRO está localizada em 14,5 kb 3' ("telométrica") da sonda AS-SRO, e a 11,7 kb ("centométrica"), da sonda PWS-SRO QHM original. Uma proporção MFI de 0,68 revela que este locus está presente em uma cópia (Tabela 4-3). A sonda PWS-SRO2 também foi hibridizada a outros paciente de cancelamento 1C no corrente estudo (R92-166-PWS, R93-013-MOD, R93-002-MOD, e R93-001-MOD) e encontrou canceladas como previsto com proporções de MFI variando de 0.51 até 0,67 (Tabelas 4-1 e 4-2).

Um paciente AS clinicamente diagnosticado, Desconhecido 1, testado como normal por análise FISH e normal com relação a UPD, mas no entanto foi encontrado um teste SNRPN de metilação anormal (Tabela 4-7). As amostras da mãe e do pai do Desconhecido 1 foram identificados como Desconhecido 2 e desconhecido 3, respectivamente. (Tabela 4-7). Esta

combinação de resultados de testes tornou esse paciente um candidato ideal para a nova análise da presente invenção. Com a utilização de QMH, este paciente desconhecido (Desconhecido 1), e os progenitores do paciente (Desconhecido 2 e Desconhecido 3), foram inicialmente submetidos a triagem com Chr15Cen, GCP5, D1 5SIΔ1, PWS-SRO, e OC A2, e a sonda de referência HOXB1. Os resultados indicaram que todas as sondas estavam intactas, exceto com relação a PWS-SRO (Tabela 4). Foi feita uma segunda análise QMH focalizada na região 1C com as sondas AS-SRO e 1C. As proporções de MFI indicaram que essas sondas foram canceladas no paciente e na mãe, o que constitui um cancelamento de ~19 kb em torno da região AS-SRO (Tabela 4). Este resultado foi confirmado por uma terceira hibridização QHM com a sonda PWS-SRO2, circunscrita pela sonda 1C e PWS-SRO, e encontrada cancelada em ambos o paciente e a mãe (Tabela 4), bem como na análise scFISH com a sonda AS-SRO.

15 Detecção de cromossomos 15q proximais cancelados.

Um paciente, B2002-00905, com um cancelamento de um cromossomo proximal 15q, B2002- 00905 foi inicialmente caracterizado através de análise citogenética de rotina e em seguida analisado com a utilização de QMH. Uma análise QHM multiplex incluiu sondas de teste específicas para Chr15Cen, D15S541, GCP5, D15S11, D15S63, AC004600, e OCA2 além da sonda de referência. Os resultados indicaram que todas as sondas de testes canceladas, responsável por uma cobertura de cancelamento de > 6,6Mb, no entanto, não puderam ser identificadas seqüências de cópia baixa 5' (centométrica) da sonda Chr15Cen devido a seqüência heterocromática densa com repetições nessa região, e desse modo a quebra centométrica nesta inversão não pode ser refinada.

25 Avaliação da Temporização de Replicação Assíncrona em Dissomia Maternal em Famílias de Paciente PWS.

Estudos anteriores (Knoll et al., 1990) examinando a temporização da replicação específica (ASR) para alelo dentro do cromossomo 15q11-13 revelaram padrões de temporização de replicação paternal antecipada/maternal atrasada em D15S 11 e D15S63. Usando sondas QMH específicas

para esses dois locais, quatro pacientes PWS com dissomia maternal no cromossomo 15 (R89-007-PWS, R89-008-PWS, R90-019-PWS, R90-041-PWS) e os membros da sua família foram testados para ver se as proporções de QMH afetadas por ASR em indivíduos afetados ($n = 10$) (Tabelas 4-8 e 4-9) A sonda de referência HOXB1 foi usada em estudos de hibridização FISS para a verificação da aplicação síncrona da temporização. Os resultados de QMH com relação aos indivíduos com dissomia materna indicaram que não existe uma diferença discernível nas proporções de MFI quando comparados com os progenitores normais. Por exemplo, as proporções da MFI para D15S11 e D15S63 em R90-041-PWS foram de 0,95 e 1,01 (Tabela 4-9), respectivamente, o que é realmente mais elevada se comparada a do pai, R90-059-PWS, (0,93 e 0,94) porém ligeiramente menos do que da mãe, R90-060-PWS, (0,97 e 1,08) (Tabela 4-8). Os resultados QMH com relação as outras duas famílias estudadas (R90-059-PWS, R90-041-PWS, R89-008-PWS, R89-010-PWS, R89-009-PWS) foram sinônimos com os resultados para essa família.

Análise Estatística dos Resultados de QMH com Relação a Locais Normais e Cancelados.

Na Figura 5 as proporções de MFI estão plotadas no eixo y e o número de hibridizações QMH está plotado ao longo do eixo x. Não houve sobreposição nas proporções MFI com relação as sondas normais ou canceladas, por isso o número de cópias em cada local foi distinguível de com facilidade. O desvio padrão médio e os intervalos de confiança de 95% com relação aos locais normais e cancelados estão indicados na Figura 5.

A análise dos valores da MFI com relação a todos os locais normais testados por QMH ($n = 191$) mostraram uma média de $0,98 \pm 0,075$ com um nível de confiança de 95% de 0,011 (Figura 5) e os valores de MDI para todos os locais cancelados ($N = 80$) tiveram uma média de $0,58 \pm 0,072$ com um nível de confiança de 95% de 0,016 (Figura 5). Não foi observada nenhuma sobreposição entre os valores de MFI com relação aos locais normais e cancelados ($n = 27$) e os genótipos foram distinguíveis com facilidade com relação a todos os pacientes que passaram pela etapa inicial do contro-

le de qualidade PCR (Figura 5). Foi observado que as análises QMH com relação as amostras dos pacientes armazenadas em metanol/ ácido acético durante um período de tempo mais curto (~2 a 5 anos) antes da extração do DNA produziram proporções de MFI que estavam consistentemente mais próximos a 1,0 e 0,5 com relação aos locais normais e cancelados, respectivamente, quando comparados aqueles armazenados durante períodos de tempo mais longos (> 5 anos). Isso é provavelmente devido a qualidade comprometida (isto é, condição degradada e cisalhada) do DNA obtido a partir de péletes de células fixadas que tinham sido armazenadas durante períodos de tempo excessivos. Nenhuma amostra de paciente armazenada durante > 6 anos passou na etapa de controle de qualidade inicial por PCR e por esse motivo não puderam ser usadas para as análises QHM.

Discussão

Este estudo se aplica a análise quantitativa de hibridização de microesferas (QMH) desenvolvido anteriormente para a detecção de mudanças no número de cópias na região PWS/AS do cromossomo 15q11-13. Com a utilização da QMH, os cancelamentos de classe I e de classe II foram distinguíveis com facilidade em uma única análise e refinada de forma mais precisa em uma segunda análise QMH. Cancelamentos menores dentro do AS/SRO cobrindo ~ 19 kb foram definidos bem como cancelamentos tão pequenos quanto 4,3 kb no interior da região PWS-SRO. Um paciente exibiu um intervalo de cancelamento não usual a partir de D15S63 até OCA2 (~3,36 Mb), que poderia representar uma nova classe ou subclasse de cancelamentos. Os experimentos de hibridização ilustraram uma sensibilidade adequada para distinguir uma vs. duas cópias de uma sequência genômica com relação a regiões canceladas grandes e pequenas. A QMH, no entanto, não foi capaz de discernir padrões de temporização de replicações assíncronas (ASR) em pacientes PWS aparecendo a partir da dissomia materna. Estudos futuros irão incluir a sincronização de células antes da extração do DNA -alvo para examinar ainda mais essa aplicação potencial da QMH. O uso de microesferas separadas codificadas espectralmente permitiu uma análise precisa de até nove sondas de teste e uma sonda de referência em

um único tubo.

Este estudo da região PWS/AS é a primeira explicação clínica da análise QMH e verifica que ela é uma alternativa diagnóstica com relação a outros métodos de determinação do número de cópias que não necessitam da identificação de seqüências dependente do contexto. Outras técnicas para a avaliação do número de cópias na mesma região incluem FISH, hibridização Southern, microagrupamento, aCGH, MLPA, e MAPH. A QMH detectou de modo confiável as diferenças no número de cópias em uma resolução genômica de ≥ 80 pb, o que excede a resolução que pode ser alcançada através de FISH, hibridização Southern, e aCGH (que é limitada pelo tamanho e a densidade das sondas clonadas), e é similar a MAPH e MLPA em densidade de sonda. A QMH com a utilização de sondas 1c não necessita tanto da amplificação do DNA -alvo ou da adição de DNA competidor (isto é, Cot-1 DNA) para a supressão de seqüências repetitivas. A adição de DNA competidor tinha mostrado comprometer a precisão e a capacidade de reprodução das análises de hibridização genômica (Newkirk et al. 2005), o que não poderia ser ideal com relação a um teste para diagnóstico clínico.

A QMH não foi facilmente adaptável à região PWS/AS, a despeito da alta densidade das seqüências repetitivas circundantes e número limitado de regiões de cópia baixa disponíveis para o projeto da sonda. A otimização do ensaio foi mínima (Ver Métodos), e os resultados foram reproduzíveis de forma consistente entre as amostras com genótipos similares com diferenças desprezíveis entre as proporções da MFI (Figura 5; $0,98 \pm 0,075$ para locais intactos; $0,58 \pm 0,072$ para locais cancelados). Com a exceção de DNA genômico -alvo degradado, nenhum resultado positivo falso e nenhum resultado negativo falso foram obtidos com relação às amostras analisadas neste estudo. Isso ilustra a exigência com relação aos experimentos para o controle de qualidade antes da análise por QMH para serem assegurados resultados precisos. A análise QMH da presente invenção é um diagnóstico inicial ideal para a triagem de altos resultados de pacientes com PWS e AS. Este teste permite o refinamento dos intervalos de cancelamento de PWS/AS com a utilização de análises QMH subseqüentes, e a FISH pode

ser usada para a confirmação do contexto cromossômico dos cancelamentos detectados pela QMH.

A plataforma de hibridização de microesferas pode ser mais apropriada em algumas situações diagnosticas no lugar da FISH, hibridização genômica comparativa de conjunto (aCGH), análise Southern, hibridização multiplex de sondas amplificáveis (MAPH), hibridização multiplex de sonda de ligação (MLPA) e PCR quantitativa (qPCR). a análise com microesferas da presente invenção aumenta a resolução, aumenta a proporção de sinal para ruído, e é facilmente receptiva a multiplexação, tornando a mesma uma abordagem de alto rendimento. A capacidade de multiplexar as sondas conserva o material do paciente disponível e diminui o tempo necessário para fazer o diagnóstico. Além disso, a contaminação de seqüências genômicas heterólogas mostrou não impactar a eficiência da hibridização no ensaio.

No ensaio QMH, as diferenças em número de cópias são detectadas com uma resolução genômica tão pequena quanto 100 pb em um nível de menos do que 5 equivalentes genômicos por reação de hibridização. O nível de resolução alcançado com FISH e hibridização Southern é de ~20 kb até 650 kb. Com a aCGH, a resolução fica limitada ao tamanho e a densidade das sondas clonadas e a variabilidade em níveis de sinal de fluorescência pode afetar a precisão da interpretação. A MAPH tem uma resolução de aproximadamente 50 kb, e a MLPA, embora tenha uma resolução mais alta do que as outras técnicas, é sensível a polimorfismos de nucleotídeo único no ou próximo aos sítios de ligação o que pode levar a resultados negativos falsos. Da mesma forma, deve ser tomado cuidado com a qPCR para impedir a contaminação, e nenhuma das técnicas é multiplexada com facilidade.

Com arranjos genômicos de sondas 1c de sondas de hibridização conjugadas com suspensões de microesferas, deve ser viável delinear com rapidez a extensão das anormalidades cromossômicas que alteram o número normal de cópias. A hibridização de um conjunto denso de sondas 1c que cobrem uma região cromossômica pode ser usada para a triagem inicial com relação aos limites de um domínio aneussômico. Estudos FISH

- subseqüentes podem em seguida prover um contexto cromossômico com relação a essas alterações genéticas. Esta invenção proporciona a ela própria aplicações de alto rendimento uma vez que, em teoria, 3840 produtos diferentes podem ser analisados em uma única placa de micro titulação de
- 5 alta densidade com a utilização do nosso atual conjunto de 10 contas codificadas espectralmente distintas em cada cavidade. Com a instrumentação atual, presumindo um mínimo de resolução de sonda de 20 kb, uma única placa pode prover a determinação de número de cópias de alta resolução com relação a um domínio de 20 mb dentro de 90 minutos. Com base na
- 10 sensibilidade e a precisão demonstradas do método, a hibridização com suspensão de microesferas pode ser naturalmente extensível a outras aplicações, tais como a detecção e quantificação de seqüências de mRNA de cópia baixa ou rara (~ 5 equivalentes de genoma por reação de hibridização) em cDNA.

Referências para o Exemplo 1

Os materiais de referência que se seguem ficam incorporados aqui, por referência.

Armour JAL, Sismani C, Patsalis PC, Cross G. 2000. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res.* 28(2):605-609.

Bagwell CB, Baker D, Whetstone S, Munson M, Hitchcox S, Ault KA, Lovett EJ. 1989. A simple and rapid method for determining the linearity of a flow cytometer amplification system. *Cytometry* 10(6):689-94.

Brown RD, Zarbo RJ, Linden MD, Torres FX, Nakleh RE, Schultz D, Mackowiak PG. 1994. Two-color multiparametric method for flow cytometric DNA analysis. Standardization of spectral compensation. *American Journal of Clinical Pathology* 101(5):630-637.

Coder DM, Redelman D, Vogt RF. 1994. Computing the central location of immunofluorescence distributions: logarithmic data transformations are not always appropriate. *Cytometry* 18(2):75-8.

Dunbar S, Godbout R, Newkirk H, Hetzel J. 2003. Microsphere suspension array technology for SNP detection in cattle. *IEEE Eng Med Biol Mag* 22(4):158-62.

Earley M, Vogt RJ, Shapiro H, Mandy F, Kellar K, Bellisario R, Pass K, Marti G, Stewart C, Hannon W. 2002. Report from a workshop on multianalyte microsphere. *Cytometry* 50(5):239-42.

Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR, Jr. 1997. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem* 43(9):1749-56.

Hadd AG, Laosinchai-Wolf W, Novak CR, Badgett MR, Isgur LA, Goldrick M, Walkerpeach CR. 2004. Microsphere bead arrays and sequence validation of 5/7/9T genotypes for multiplex screening of cystic fibrosis polymorphisms. *J Mol Diagn* 6(4):348-55.

Inoue K, Dewar K, Katsanis N, Reiter LT, Lander ES, Devon KL, Wyman DW, Lupski JR, Birren B. 2001. The 1.4-Mb CMT1A Duplication/HNPP Deletion Genomic Region Reveals Unique Genome Architectural Features and Provides Insights into the Recent Evolution of New Genes. *Genome Research* 11(6):1018-1033.

Knoll JH, Lichter P. 1994. In situ hybridization to metaphase chromosomes and interphase nuclei. In Dracopoli NC, Haines JL, Korf BR, Moir DT, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR (eds): "Current protocols in Human Genetics Volume 1" Unit 4.3, Green-Wiley, New York. (Revised 2005, in press).

Knoll JH, Rogan PK. 2003. Sequence-based, in situ detection of chromosomal abnormalities at high resolution. *American Journal of Medical Genetics* 121(3):245-257.

Knoll JHM, Rogan PK. 2004. *Single Copy Genomic Hybridization Probes and Method of Generating Same*. US Patent No. 6,828,097.

Lewin B. 1980. DNA sequence organization: nonrepetitive and repetitive DNA. In "Gene Expression 2 – Eucaryotic Chromosomes", Chapter 18, pp 503-530, 2nd edition, Wiley-Interscience Publication.

Lupski JR, Oca-Luna RMd, Slaugenhaupt S, Pentao L, Guzzetta V, Trask BJ, Saucedo-Cardenas O, Barker DF, Killian JM, Garcia CA et al. 1991. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66(2):219-32.

Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. 2004. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* 66(6):488-95.

Rockenbauer E, Petersen K, Vogel U, Bolund L, Kolvraa S, Nielsen KV, Nexø BA. 2005. SNP genotyping using microsphere-linked PNA and flow cytometric detection. *Cytometry A* 64(2):80-6.

Rogan PK, Cazarro PM, Knoll JH. 2001. Sequence-based design of single-copy genomic DNA probes for fluorescence in situ hybridization. *Genome Res* 11(6):1086-94.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30(12):e57.

Sekar M, Bloch W, John PS. 2005. Comparative study of sequence-dependent hybridization kinetics in solution and on microspheres. *Nucleic Acids Res.* 33(1):366-75.

Shaffer, LG, Bejjani, BA. 2004. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update.* 10(3):221-26.

Sinclair P, Nacheva E, Leversha M, Telford N, Chang J, Reid A, Bench A, Champion K, Huntly B, Green A. 2000. Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 95(3):738-43.

Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-518.

Vignali D. 2000. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *J Immunol Methods.* 243(1-2):243-55.

White SJ, Breuning MH, den Dunnen JT. 2004. Detecting copy number changes in genomic DNA: MAPH and MLPA. *Methods Cell Biol.* 75:751-768.

Referências para o Exemplo 2

Os materiais de referência que se seguem ficam incorporados aqui por referência.

Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD (1999) Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* 65:370-386.

Bejjani BA, Shaffer LG (2004) A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update* 10:221-226

Bittel DC, Butler MG (2005) Prader-Willi syndrome: clinical genetics, cytogenetics and molecular biology. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 7:1-20.

Bittel DC, Kibiryeva N, Talebizadeh Z, Butler MG (2003) Microarray analysis of gene/transcript expression in Prader-Willi syndrome: deletion versus UPD. *J Med Genet* 40:568-574.

Bittel DC, Kibiryeva N, Talebizadeh Z, Driscoll DJ, Butler MG (2005) Microarray analysis of gene/transcript expression in Angelman syndrome: deletion versus UPD. *Genomics* 85:85-91.

Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B (1995) Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nature Genetics* 9:395-400

Knoll J, Rogan P (2004) Single Copy Genomic Hybridization Probes and Method of Generating Same. US 6,828,097

Knoll JH, Rogan PK (2003) Sequence-based, in situ detection of chromosomal abnormalities at high resolution. *American Journal of Medical Genetics* 121:245-257

Knoll JHM, Nicholls RD, Magenis RE, Glatt K, J.M. Graham J, Kaplan L, Lalande M (1990) Angelman syndrome: three molecular classes identified with chromosome 15q11q13-specific DNA markers. *Am J Hum Genet* 47:149-155

Mapendano CK, Kishino T, Miyazaki K, Kondo S, Yoshiura K-I, Hishikawa T, Koji T, Niikawa N, Ohta T (2006) Expression of the Snurf-Snrpn IC transcript in the oocyte and its putative role in the imprinting establishment of the mouse 7C imprinting domain. *J Hum Genet* 51:236-243

Newkirk H, Knoll JHM, Rogan P (2005) Distortion of quantitative genomic and expression hybridization by Cot-1 DNA: mitigation of this effect. *Nucleic Acids Research* 33:e191

Newkirk H, Miralles M, Rogan P, Knoll JHM (2006) Determination of genomic copy number with quantitative microsphere hybridization. *Human Mutation* 27:376-386

Nygren AOH, Ameziane N, Duarte HMB, Vijzelaar RNCP, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A (2005) Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Research* 33:e128

Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S, Muralidhar B, Bilienska B, Krajewska-Walasek M, Driscoll DJ, Horsthemke B, Butler MG, Nicholls RD (1999) Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet* 64:397-413

Sahoo T, Shaw CA, Young AS, Whitehouse NL, Schroer RJ, Stevenson RE, Beaudet AL (2005) Array-based comparative genomic hybridization analysis of recurrent chromosome 15q rearrangements. *Am J Med Genet* 139A:106-113

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Children's Mercy Hospital
Newkirk, Heather
Rogan, Peter
Knoll, Joan

<120> Quantificação da hibridização de suspensão de microesferas e usos das mesmas

<130> 36401-PCT

<150> 60/708,734

<151> 2005-08-16

<160> 28

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2287

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

aatagatgca atgggggtga gagagaatgt tcacttgcca agggaatgag ggcagacaag      60
agaaaggaaa attgagatgg gaggagggtga cctgcagagg aattgaagag aaagaaatta      120
ttgaggtaag agcaagctta tttctttcta ttttactttt tcggggagaa gatttgcaga      180
tgcttcatcc tttcatttta agatgtcttc cacagacgct aagaataact tgtctggagg      240
aatctagggc ttgtcttcta accccaaatt tgaacaaggc ctgtatctga tctggcagcc      300
ctgcttctga gagacttgag acttggtcac cttccacctt ttcctcatcc cggggagaat      360
cttctcacc ccatccttgc cttcataatt aagggaacaa ttgagggtct aaaggaagaa      420
gtgaatttca aatcagttta ataaaacagc acaaactctg gaattgagga atgcattccc      480
tttataacag ctgaagtcac caacaatcta ttattcatga cagcaagcaa agactgaggc      540
aaaagtgccc taagttggct ggggtgcagtc ccagcacttt ggaaggccaa ggcaagagga      600
tcacttgagc ccaggacttc gagaccagcc tgggcaagat ggtgagacca catctctaca      660
aaaataaata aatacaaaa ttagctgggt gtggtggtgc ctccctgaag tcccagctgc      720
tcagaaggga ggatggcttg agcccaggag ttcaaggctg caatgagcta tgaccacacc      780
actgcactct agcctgggtg acagagaacc tgtctctatt taaaaaaaaa aaaaaagtgc      840
ctcaagttat actgtcaatt gcagtgattg cctcagcttt ccaaattcac tatgtcctcc      900
aattcatccc tgagtcatgc caccttctct tgtgttagca gggacattaa aacttgccca      960
aattcctgct ggctctccca gccccagcag aaaagactgg gagaaccaag caactttgct     1020
ccctaggttc ccaatctcct cctcctccct aaaagaagct tcgctgactg gaataacctta     1080
tggcccatag gatttttggg ggaccaaatt aaactcacca gagagggtct ggggtggacc     1140
aacacaaaaa tgaaataaag ttgatgtcct agtttgtagt atctgcttgt acataaaaga     1200
gagcaaggag aacatagaca tgtttggaac tgaagttatc ttgacagtt ttcactcctt     1260
atcacactga gaatgcaggc aaggaaacta tctaaccaga atggggatat attagaagtt     1320

```

taacctcaga	ttctggtcct	ttctgtgaag	gaagctgctt	cagctggggg	cttggcagga	1380
gcaatctaaa	ttctctcatt	agaccttaaa	tgtctctatc	tgctctcccc	agcccaaadc	1440
tagggaggcc	aaacccaaga	tcaaagggtg	gggctaggcc	agtgagggtg	ctcatgcctg	1500
taatcccagc	actttgggag	gccaaggagg	gcagatcacc	tgaggtcggg	agttcaagac	1560
cagcctgacc	aacatggtga	aacccccatc	tctactaaaa	aatacaaaaa	ttagccgggt	1620
gtggtggcag	gcacctataa	tcccagctac	tcaagaggct	gaagcaggag	aatcgcttga	1680
acccgggagg	cggagggttg	agtgaagctg	gatcgaccca	ttgcactcca	gcctgggcga	1740
cagagcaaga	ctcaaaaaaa	aaaaaaaaaa	gttggggctt	aggaagtaaa	gaatattcat	1800
aattttttcc	ttctttcttt	cttttttttt	caggcagggt	ttcgctctgt	tgccccaggc	1860
tagagtgcaa	tgggtgaatc	acggctccct	acagctttga	cctcctgggc	tcaagcgatc	1920
ctcccacctc	agcctcctga	gtaggtagga	ctacaagcat	gcaccaccac	aagtttttca	1980
ctatgagatg	aattgttttt	gttgctgtta	gagaaaggat	atttctttta	atgcaagcta	2040
attaaactgt	cataaatctg	gttgagaacc	ttagactgta	tgtagtacat	attgtaatgg	2100
gattagtgtc	agctatgtgg	gccagaatag	ttgggttcaa	gcccttgctt	ggccattttt	2160
tttttttttt	tttaatacag	ggtctcactt	tgteaccacg	gctggagtgc	agtggcgcaa	2220
tctcggcccc	ctgcaacctc	tgctctccag	gccaagcaa	tcctcccacc	tcaacctccc	2280
aagtagc						2287

<210> 2
 <211> 1344
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2						
cggttctgga	accaaattctt	gacctgtggt	tcattgagct	ccagggtggc	ggcaatctcc	60
accctccggg	cccggctcag	gtacttggtg	aaatggaact	ccttttccag	ttctgtcagc	120
tgctttgtgg	tgaagttggt	gcggaggcca	ctgggcgagc	ccaggcctgg	ctctgacacc	180
ttcgctaggg	gcggggcagg	gagaaaggcc	aggtcaattc	tctcacctct	ttctccttcc	240
gcttccctcc	tcccggggct	ggctctggac	ctccatttgc	cattctgccc	aagtacagtt	300
gtcaaagttc	ccaggggacca	ccagggtaccc	ccatggtgat	caccaagtct	ggagcagcct	360
tccccatact	tccatccccc	atgcacacca	ggtcctgggt	ctgtgctggg	tgacacagatc	420
aggaagtggg	gtgtgtatgg	aaacttactc	ctggggtgac	cggttacata	ctgggtgggg	480
agacctcacc	tgacctgaga	cgtagggtgt	gctcttacct	gtgtctacca	gagccgctga	540
aagagaagaa	cccagcccag	accagggaca	tgctactgca	ggggaagcag	agatgctttg	600
ggccccggag	aagggggtgg	cacatctgag	ccctacctgt	cttgggtggg	tttctcttaa	660
ccttcatcca	gtcgaaggtc	cgggccgtgg	gggtgttagg	ttctgaaggg	cagggtgttt	720
ccttgtcctc	ggagaggaga	tcagcatagg	ccggtgcaaa	gctcgcggtc	tgctcgttcc	780

cataaggggg atgctgcgga ggatatggcc ccggaccggc tccacctgct ccgtagccat	840
cggacaagcc ccctagctgg gccccgtagc tcgagggatg aaaatagcct ccgtctcctt	900
ctgattgacc cagagggtag tactgagaag gcccgtagct ggggctgcag gcggcaggag	960
cataccccga gggcgcgag ctggggaagg gcacccccag ggtcgaaggc ggctgctggg	1020
cgggtagacc ggagttctgc tgaaacgcag ggctggacag cccccaccg tagcggccct	1080
cgcttgcata gctgtcaacc gcctgagccg agcttggggg aaaggagggt ggggcgctgt	1140
gggcgctgta ggcgctgggt ccccggttac agagtgggta ctctaagaag gaggttcatcc	1200
tattatagtc catgcgtcaa ggccgcagga gggtcggccc gtttggggga gacaccctct	1260
tgccctacaa ctttcggca gtatgtcaca gcgctggggc tcgaatccat ggctgaccc	1320
gctcgcttg gcaagcgctt ccct	1344

<210> 3
 <211> 94
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3	
ttatcctctc tctagccatc catagctgta gctggctcac tctcagac ttaaataact	60
ccctatatct ctctagagag ccacaatgag caca	94

<210> 4
 <211> 2304
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4	
gtggcttatg cctgtaattt cacactttgg gaggccaaag gcagggtgat tgcttgagcc	60
caggagttca agatcatcct gggcaacata agaagaccct gtctctacaa caagaacaaa	120
agaaattagc cagacgtgtt atcacacctg tgttcccagc tacttgagtg gctgagggtg	180
gagggtcact tgagctcggg aggccaatgc tgcagtgagc catgatcacg cactgcact	240
gcagcctggg taacagagca agaccccatc tcaaaacaaa gtttgagaac tggtgctatg	300
gaaagtctat caagaaggca catagggatg tttgttgctg aagtactaac actgaatgat	360
gtctgtgttg tggtagtag aaaaaagca atttgaaaat cattatttat ggtatggccc	420
catttttgta aaacaaaaat atctgtttat ttgtgtatgt ccaggaaaaa aaagtatgga	480
aggattttac accgaaattt ttatctctag ggacttgag ctttaggtg aatcggagaa	540
aactttctct ttttggttg tgtgatgtc caagtgtctt ttacaacaa acttgggtta	600
tcctataata cgaaaaattc gaagatttaa aaactgaggc caggcacggt ggctcatgcc	660
tataatccca gcactttggg aggttgacac atgtggatca cctgaggtca ggagtttgag	720
accagcttga ccaagaaggt aaaaccctgt ctctactaaa aatacaaaaa ttagctgggc	780
gtggttgag gtgcctgtag tcccagctac tcgggaggct gagacaggag agttgcttag	840
accagaggag tcgaggttg aacgagctga gattgcacgc cactgcactc ccagcctggg	900

tgaaaatgca aaattggagg tatgtacttt attttagaga cagggctctg ctttgtcacc	120
caggctggag tgtagtggca cagtcatagc tctactgcagc cttgaactcc tgggctccag	180
tgatcctctt gccttagcct cccaaagcaa tgggatcgta caggtgagcc attgcacctg	240
gccatgtatg tacatTTTTT ataagcattc agttgtttcc aatagtctaa tacatTTTTgt	300
atggccttct tatttttcat gaaaccttac taccattttt aagaaatttg taatatagaa	360
gaaaacagaa gtttcaattg tggggttaagt aaagaaagat gatcaaagat gatttgacca	420
aaagagtttt acttcattta aatgaagcat gttgtcaaag aaaatgaaag tgggaaaaaa	480
tgtgaaatca ttttgtatca gttcaggaca gaaccgtgct tgtgcttcag atctccaagt	540
gtgaacacac tgatgtgttg tgaagtgtgt tgcaaataga agcatttttt gaatgggagg	600
gagagggatg tgtaacatg atttagctgg gaattaaacc cataggaatg tgcgggcat	660
attttctgtg actaggggggt aaaaagatta aaatggctac tgaggatggg cttcagtaag	720
aggaggtctc ccgaaggcct tctctgccct gtgcctctgc agttccctga ctccttctg	780
tgttcgtccc tgcctttttg gtagttgtgc ccctgatgtc actcccctgt gtgttcagat	840
cctacctgct ggccagggtgc agtggtcac acctgtaatc ccagcacttt gggaacccaa	900
ggtgggacgg tcctctgaga ccaggagttt gagagagtgg cctggacaac atagcaacac	960
cctattagta ctaaaaataa aaaagttagc taggcataat aatgtcctgt gcttgtctag	1020
ctacttgga ggctgaggca gaaggattac ttgagtccag gagttcgagg ctgaagcaaa	1080
ctgtgatcat atcattgtac tccagcctgt gtgataaagc aagaccctat cttttaaaag	1140
taaaaaaca acaaacaaac aaaaaacaaa cctgcttaac ctttcaacac tctcttccag	1200
tccccctcc cttctgaaac catattttac atctctggtc ctcattaaat tttctgtaac	1260
ttctgccctt gtaactcttc tgcaacacaa atgaatacat aatcatatac ttcctagtag	1320
tatttcctaa tagttttatg tgagtttcat ggaagagagt gttgaaacgt aggtaggttt	1380
gtt	1383

<210> 7
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7	
atttggaag attatatcca tctacttaat gctagggatt ggattgtggc acgtggactg	60
tgaaaatgca aaattggagg tatgtacttt attttagaga ca	102

<210> 8
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8	
accaactttc atgccctagg tgaaacggag gacgtcttgg gaggtagaga gttgcccaag	60
gtctgaatcc atgggatcta ctaagaacaa gaccagac	99

<210> 9
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 agggcagctc atgacatgcc tccatgtttt ccatgtgggt catcaaaca cagagcacca 60
 gagaggggtg aactaaatga atactcaagt gccttccagt cc 102

<210> 10
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 aaaggcgatc tcctcctgct cctgctagag cgcagcgagc gcacggcggt tccgcagtaa 60
 tcctgagcac ggcaaggacc c 81

<210> 11
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 attcatacca gcaacagcag tggcatgatg cgggcaggat tgccagtgtc cgtgcatgcg 60
 tttgcactgg tgattgcagt g 81

<210> 12
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 gcaatagtgg tggacaagtt ggcacctcga ttgtctcagc tcaaggttct gcacaaagtg 60
 tttagtactg gagtagcaga a 81

<210> 13
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 taccaccac cctctaacca ccaaatggc taccctagat ggtgaagttg ggttaattgt 60
 tagacacggt ggaatcttta t 81

<210> 14
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 cggcagctag gggcaggagt gcaagaatga tgtatccttt caagtatcat gaccatcggg 60
 gtgaattgct gagttctggg g 81

<210> 15

<211> 81
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 taagtccttg gcattactta aagaaggcca ttagatatat gtcacgtgtg agagtgaggt 60
 ttgcagctgg gaagtaagcc t 81

<210> 16
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 gaaacagtca tcgagtggga tgacaacttg gaaaggcttt gtgggccttt gtgacctcat 60
 ggtatgcatc ccctcagggt g 81

<210> 17
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 tggcgtctgc taggagtctc ctatccggcg tttgtgccgc agaaaacctt taacctgcgt 60
 tttaccgta aacattttcc t 81

<210> 18
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 aaaagcataa gttttagtca catcaaaata taaacaatct tgaaattaat tcataagtaa 60
 atcaatagat atcttgaaat t 81

<210> 19
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 ttcggagagt tacccagggtg tagtaccctt ccaagtagat aatgattgaa agagtatgtg 60
 ctggagggtg atgatatttt c 81

<210> 20
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 ggttttgatt ttgatatact ccagtttatc tttttttgtg tttccttagc ttttggtgtt 60
 gtagtcaaga aatcattgcc a 81

<210> 21
 <211> 81
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

tgcattcttt ttaaaaaata tttttagtct ttacatttca gaatcagtat ttcaaagtg 60

acttgtagga ctacgtgcag t 81

<210> 22

<211> 81

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

cttgctgttg tgccgttctg ccccgatggt atcctgtccg ctgcattgg ggcgcgtccc 60

ccatccgccc ccaactgtgg t 81

<210> 23

<211> 81

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

ggttactgat tcataggggt atgtcgaggg cttttgtctg gaattccctg cttaccagta 60

gatgattggt ttacatattt t 81

<210> 24

<211> 81

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

ggccgcagag gcaggctggc gcgcagtctc aggcggggat gtgtgcgaag cctgccgctg 60

ctgcagcgag tctggcgag a 81

<210> 25

<211> 81

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

agtatttcaa atgtgacttg taggactacg tgcagtgagg aagattgtta atcatcctat 60

tctgaccagg agttctgaca a 81

<210> 26

<211> 81

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

caaacactgg gacccagaat agtaccctgt ggtcatagtg cccacagttc actaagcacc 60

ctcacaggtc ttgacagaa c 81

<210> 27

<211> 81

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27
tttacctgcg cacttgcaga tctttctcca ggagtgagtt taagggccgc acctccgctc 60
tggatggtga gcggagcaca g 81

<210> 28
<211> 81
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 28
aagacacttc aatcaccgc agcccatcca tctgagagcg acatggaagc gtcaaaaaca 60
tctttcttca aagacttttg g 81

REIVINDICAÇÕES

1. Método para quantificar o número de uma cópia de uma sequência-alvo de ácido nucléico em um genoma, o referido método compreendendo as etapas de:
 - 5 extrair o ácido nucléico que contém a referida sequência-alvo de ácido nucléico a partir de um sujeito,
fixar um marcador à referida sequência-alvo de ácido nucléico,
preparar um conjugado particulado, cópia baixa, sonda de ácido nucléico de sequência conhecida, selecionada para complementar a referida
 - 10 sequência-alvo de ácido nucléico,
hibridizar a referida sonda do referido ácido nucléico-alvo para formar um produto de uma reação de hibridização,
identificar o referido produto através da detecção do referido particulado, e
 - 15 quantificar o referido número da cópia da referida sequência-alvo de ácido nucléico através da detecção do referido marcador no referido produto.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido particulado compreende uma partícula nano cristalina.
- 20 3. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido particulado compreende uma nanoesfera.
4. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido particulado compreende uma microesfera.
5. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido
- 25 particulado compreende uma microesfera de polímero espectralmente distinta.
6. Método de acordo com a reivindicação 2, no qual a referida microesfera compreende um poliestireno.
7. Método de acordo com a reivindicação 2, que compreende
- 30 ainda a etapa de ligar um fluorocromo a uma parte biológica sobre a superfície da referida microesfera.
8. Método de acordo com a reivindicação 2, que compreende

ainda uma etapa selecionada a partir do grupo que consiste em conjugar as referidas sondas às referidas microesferas através de uma reação modificada de carbodiimida, na qual a referida microesfera tenha sido carboxilada e conjugar a referida microesfera à referida sonda utilizando uma corda eletrofilica, em que a referida corda compreende N-cloroacetamidohexil fosforamida.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido particulado compreende uma pérola de poliestireno, fluorescente, tingida internamente tendo um endereço espectral determinado.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido ácido nucléico-alvo extraído compreende um DNA selecionado a partir do grupo que consiste em DNA genômico e DNA complementar.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido ácido nucléico-alvo é marcado através de um processo selecionado a partir do grupo que consiste em marcação através de uma translação "nick" com um marcador de identificação, marcada diretamente durante uma reação de replicação de ácido nucléico *in vitro*, marcação final e marcação aleatória.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido marcador é selecionado a partir do grupo que consiste em fluoróforos, conjugados enzimáticos, nucleotídeos marcados com fluoróforo, anticorpos marcados de forma fluorescente ligados a nucleotídeos contendo um antígeno, biotina - dUTP, digoxigenina - dUTP, e as combinações dos mesmos.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual a referida sonda de cópia baixa tem um número de cópia de 10 ou menos.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual a sequência de ácido nucléico da referida sonda é complementar a uma sequência de cópia única no genoma do referido sujeito,

15. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual um ácido nucléico-alvo contendo o cancelamento de um ou mais pares de base exibe uma proporção de resposta de cerca de 0,2 até cerca de 0,75 em comparação a uma sonda de referência tendo um complemento normal da referida sequência-alvo de ácido nucléico.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual um ácido nucléico-alvo contendo uma inserção ou uma duplicação de um ou mais pares de base exibe uma resposta de cerca de 1,25 até cerca de 1,65 em comparação a uma sonda de referência tendo um complemento normal da referida seqüência-alvo de ácido nucléico.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual múltiplas sondas tendo seqüências de ácido nucléico separadas conjugadas a particulados que tenham um ou mais endereços espectrais separados são hibridizadas com relação a ácidos nucléicos-alvo.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido particulado compreende uma conta revestida com estreptavidina ou carboxilada ligada a uma parte de biotina no terminal 3' ou 5' da referida sonda de ácido nucléico.

19. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual a quantidade da seqüência-alvo detectada por 1 µg de uma seqüência de ácido nucléico genômico heterólogo está dentro da faixa de 50 pg até 50 ng.

20. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual as diferenças em número de cópia são detectadas com uma resolução genômica de tão pouco quanto 60 pb.

21. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual a referida etapa de quantificação incluindo a etapa de detectar o endereço espectral do referido produto com a utilização da citometria de fluxo.

22. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual a referida sonda tendo um comprimento entre 50 e 2500 bases.

23. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual o referido particulado tendo um diâmetro entre 50 nm e 1 µm.

24. Método para detectar uma anormalidade cromossômica suspeitada em um ácido nucléico derivado de um sujeito ou complementar, o referido método compreendendo as etapas de:

preparar uma microesfera fluorescente, codificada para espectro tendo um primeiro endereço espectral,

identificar uma seqüência de sonda-alvo de ácido nucléico ge-

nômico através da determinação da seqüência, nucleotídeo por nucleotídeo de uma seqüência-alvo de ácido nucléico na qual a anormalidade é suspeitada de permanecer,

5 sintetizar uma sonda-alvo de seqüência conhecida de baixa cópia de acordo com a seqüência de sonda-alvo de ácido nucléico genômico - alvo identificada,

 conjugar a sonda-alvo a uma microesfera que tenha um primeiro endereço de espectro,

10 sintetizar uma sonda de referência selecionada para se hibridizar a uma seqüência de ácido nucléico de referência tendo um número de cópia conhecido da referida seqüência-alvo de ácido nucléico,

 conjugar a sonda de referência a uma microesfera que tenha um segundo endereço de espectro,

15 reagir à sonda -alvo com uma seqüência cromossômica-alvo que contenha a anormalidade, fazendo com que, desse modo que a sonda-alvo se hibridize a seqüência-alvo,

 reagir à sonda de referência de seqüência conhecida com um seqüência de referência cromossômica que contenha a referida seqüência cromossômica-alvo e dessa forma fazendo com que a sonda de referência
20 se hibridize a seqüência de referência,

 detectar a sonda-alvo hibridizada para confirmar a existência da anormalidade no cromossomo,

 detectar a sonda de referência hibridizada, e

25 quantificar a sonda-alvo hibridizada através da comparação da resposta da sonda de referência hibridizada detectada com a resposta da sonda de referência hibridizada detectada.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, a referida anormalidade sendo selecionada a partir do grupo que consiste em diferenças nos números de cópia de seqüências no interior dos referidos ácidos nucléicos genômicos ou complementares, duplicações, cancelamentos, inversões,
30 transposições, translocações e as combinações das mesmas.

26. Método de acordo com a reivindicação 24, o referido método

detectando as referidas anormalidades com uma resolução genômica tão pequena quanto 60 pb.

27. Método de acordo com a reivindicação 24, no qual as referidas etapas de detecção utilizando a citometria de fluxo.

5 28. Método de acordo com a reivindicação 24, no qual a referida sonda tem um número de cópia de 10 ou menos.

29. Método de quantificação genômica direta de anormalidades cromossômicas através de detecção por citometria de fluxo de seqüências-alvo de ácido nucléico marcadas hibridizadas a sondas de ácido nucléico genômico ou complementar de baixa cópia de seqüência conhecida, conjugada a microesferas, o referido método compreendendo as etapas de:

preparar uma microesfera codificada de forma espectral, tendo um diâmetro entre 50 nm e 1 μ m,

15 sintetizar uma sonda-alvo de baixa cópia selecionada para se hibridizar a uma seqüência de ácido nucléico específico no objetivo no qual a anormalidade é suspeita de permanecer,

conjugar a sonda-alvo a microesfera,

hibridizar a sonda-alvo a uma seqüência-alvo de ácido nucléico,

detectar a sonda-alvo hibridizada através de citometria de fluxo,

20 e

quantificar a referida anormalidade com base nos resultados da referida citometria de fluxo.

30. Método de acordo com a reivindicação 29, no qual a seqüência de ácido nucléico de uma sonda é de um comprimento definido entre 50 e 2.500 bases.

31. Método de acordo com a reivindicação 29, a referida anormalidade sendo selecionada a partir do grupo que consiste em diferenças nos números de cópia de seqüências dentro do referido ácido nucléico genômico ou complementar, duplicações, cancelamentos, inversões, transposições, translocações, e as combinações das mesmas.

32. Método de acordo com a reivindicação 29, o referido método detectando as referidas anormalidades com uma resolução genômica tão

pequena quanto 60 pb.

33. Método para a detecção de anormalidades cromossômicas, o referido método compreendendo as etapas de:

5 preparação de uma sonda de hibridização pelo acoplamento de uma microesfera de poliestireno codificada e forma espectral a uma sequência de DNA sintética,

 hibridização a referida sonda ao DNA genômico,
detecção o produto da referida hibridização através de citometria de fluxo.

10 34. Método de acordo com a reivindicação 33, a referida anormalidade sendo selecionada a partir do grupo que consiste em diferenças nos números de cópia de seqüências dentro do referido ácido nucléico genômico ou complementar, duplicações, cancelamentos, inversões, transposições, translocações e as combinações dos mesmos.

15 35. Método de acordo com a reivindicação 33, o referido método detectando as referidas anormalidades com uma resolução genômica tão pequena quanto 60 pb.

 36. Método de acordo com a reivindicação 33, compreendendo ainda a etapa de comparar os resultados a partir da referida citometria de
20 fluxo com os resultados da citometria de fluxo, a partir de um produto de hibridização tendo um número de cópia conhecido que corresponda a referida anormalidade.

 37. Método de acordo com a reivindicação 33, no qual a referida sonda é complementar a 10 ou menos localizações no DNA genômico.

25 38. Método de acordo com a reivindicação 33, o referido DNA sendo não amplificado.

 39. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a referida sonda é de seqüência conhecida antes da hibridização.

30 40. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as condições sob as quais a hibridização acontece são direcionadas para a seqüência particular da sonda.

 41. Método de acordo com a reivindicação 40, em que o ponto

de fusão é conhecido antes da hibridização.

42. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o referido genoma é o genoma humano.

5 43. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o conteúdo de G-C da sonda é conhecido antes da hibridização.

44. Método de acordo com a reivindicação 1, em que há uma hibridização específica para a referida sequência-alvo de ácido nucléico.

45. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a sequência-alvo de ácido nucléico é conhecida antes da hibridização.

10 46. Método de acordo com a reivindicação 1, em que ainda compreende um arranjo de suspensão tri-dimensional.

47. Método de acordo com a reivindicação 1, em quem que a hibridização da referida sonda é o resultado de uma reação de hibridização.

Tabela 1: Características da sonda de hibridização

Gene	Sonda	Comprimento (pb)	Temperatura de hibridização	Cromossomo	Coordenadas (Hg 12)
HOXB1	HoxB1a	2286	51	17	43965662-43967948
	HoxB1b	1343	45	17	43962053-43963398
	HoxB1c	102	50	17	43964237-43964330
ABL1	16-1a	2304	45	9	130623551-130625854
	16-1b	100	50	9	130624671-130624771
	16-2a	1381	48	9	130627353-130628735
	16-2b	101	50	9	130627353-130627454
TEKT3	TEKT3	98	50	17	15149108-15149206
PMP22	PMP22	101	50	17	15073475-15073576

RESUMO

Patente de Invenção: "QUANTIFICAÇÃO DA HIBRIDIZAÇÃO DE SUSPENSÃO DE MICROESFERAS E USOS DA MESMA".

A presente invenção refere-se a novo ensaio de hibridização de
5 suspensão que foi usado para a determinação de número de cópia de ácido
nucléico através de citometria de fluxo. O ensaio foi validado com produtos
de baixa cópia (1c) variando em comprimento a partir de 100 até 2304 pares
de base conjugados a microesferas de polietileno espectralmente separadas.
No exemplo provido aqui, essas microesferas conjugadas foram usadas co-
10 mo sondas de hibridização multiplex para detectar seqüências homólogas
em DNA genômico extraído a partir de péletes de células citogênicas e mar-
cadas com biotina-dUTP. A hibridização foi detectada com estreptavidina
marcada com ficoeritrina e analisada através de citometria de fluxo. As dife-
renças em número de cópia puderam ser distinguidas através da compara-
15 ção das intensidades medias de fluorescência das sondas de teste com uma
sonda de referência diplóide em DNA genômico de amostras de pacientes e
linhas de células anormais. O ensaio é capaz de distinguir um único alelo e
três alelos no local do teste a partir de uma seqüência bialélica de referência,
sem levar em conta o contexto cromossômico. O ensaio é um aperfeiço-
20 mento de métodos precedentes que requerem a amplificação antecipada do
DNA-alvo específico para a localização, devido a que, as sondas 1c propor-
cionam uma especificidade e sensibilidade adequada para uma determina-
ção, precisa do número da cópia de homólogos-alvo. Devido a sua elevada
sensibilidade e precisão, o ensaio é útil para a determinação do número de
25 cópia de um ácido nucléico com relação a uma variedade de aplicações, in-
cluindo a determinação do número de cópia genômico em seres humanos,
modelos animais de doenças e na solução, medição de níveis de transcritos,
análise de DNA em medicina legal e análise de controle de qualidade na a-
gricultura.