(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 784 342**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2008.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2015 PCT/US2015/054759**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2016 WO16057832**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2015 E 15849301 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 3204520**

(54) Título: **Método para la identificación y la cuantificación de cambios en la expresión de ácidos nucleicos, variantes de corte y empalme, translocación, número de copias o metilación**

(30) Prioridad:

08.10.2014 US 201462061376 P
15.01.2015 US 201562103894 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.09.2020

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BARANY, FRANCIS;
EFCAVITCH, JOHN WILLIAM;
RUIZ RUEDA, CRISTIAN;
HUANG, JIANMIN y
FEINBERG, PHILIP B.

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la identificación y la cuantificación de cambios en la expresión de ácidos nucleicos, variantes de corte y empalme, translocación, número de copias o metilación

Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para identificar y cuantificar cambios en secuencias de ácidos nucleicos, en la expresión, en variantes de corte y empalme, en la translocación, en el número de copias, y/o en la metilación utilizando reacciones combinadas de nucleasa, de ligadura, y de la polimerasa con prevención de arrastres.

Antecedentes de la invención

La sangre transporta oxígeno, nutrientes, y señales fisiológicas a cada célula en el cuerpo, proporcionando a la vez simultáneamente inmunidad y protección contra patógenos externos. Sin embargo, la misma capacidad de la sangre para difundir sustento permite también la diseminación de enfermedades, ya se trate de células cancerosas se metastatizan hacia el hígado, el virus del Ébola que devasta los capilares, *Streptococcus pyogenes* que licua la carne, o el VIH que elude la detección dentro de las propias células CD4 que están destinadas a eliminar infecciones.

La propensión universal de los patógenos y los cánceres por igual a diseminarse a través de la sangre crea también una oportunidad para la identificación y la detección temprana -que permite a los médicos tratar y gestionar mejor los cuidados al paciente. La evolución de los tratamientos contra el SIDA fue paralela a mejoras en el diagnóstico de los ácidos nucleicos, a partir de los ensayos de la PCR de transcripción inversa iniciales para proteger el suministro de sangre de las naciones, para secuenciar variantes resistentes a fármacos, para la cuantificación mediante la RT-PCR de la carga vírica para determinar la eficacia del tratamiento en el tiempo. Hasta la fecha, estos infectados no se han curado, pero herramientas diagnósticas sofisticadas han guiado el tratamiento, las decisiones epidemiológicas y políticas para detener esta epidemia global.

El cáncer es la causa principal de muerte en países desarrollados y la segunda causa principal de muerte en países en desarrollo. El cáncer se ha convertido en la actualidad en la causa principal de mortalidad en todo el mundo, con una estimación de 8,2 millones de fallecimientos por cáncer en 2012. Se pronostica un aumento del 75 % de los casos de cáncer en todo el mundo y que lleguen a cerca de 25 millones en las dos próximas décadas. Un informe reciente de la organización mundial de la salud concluye: "(La) Batalla global contra el cáncer no se ganará con tratamiento solo". (Son) necesarias de forma urgente medidas de prevención eficaces para evitar (una) crisis de cáncer". La detección temprana del cáncer en la sangre es el mejor medio para una prevención eficaz. Salvará vidas al permitir un tratamiento temprano y mejor, así como para reducir el coste de los cuidados contra el cáncer.

El plasma o el suero de un paciente con cáncer contiene ácidos nucleicos liberados desde células cancerosas que experimentan procesos fisiológicos anómalos. Estos ácidos nucleicos ya han demostrado utilidad diagnóstica (Diaz y Bardelli, J Clin Oncol 32: 579-586 (2014); Bettegowda et al., Sci Transl Med 6: 224 (2014); Newman et al., Nat Med 20: 548-554 (2014); Thierry et al., Nat Med 20: 430-435 (2014)). Una fuente adicional de ácidos nucleicos está dentro de las células tumorales en circulación (CTC), aunque en la etapa inicial, y una fracción significativa de tumores localizados envían muy pocas CTC o ninguna por ml. El plasma o suero normales contienen ácidos nucleicos liberados a partir de células normales que experimentan procesos fisiológicos normales (es decir, secreción de exosomas, apoptosis). Puede producirse una liberación adicional de ácidos nucleicos en condiciones de estrés, inflamación, infección o lesión.

El desafío de desarrollar pruebas de diagnóstico y de cribado fiables es distinguir aquellos marcadores derivados del tumor que son indicadores de la enfermedad (por ejemplo, cáncer en estado inicial) frente a la presencia de los mismos marcadores que se derivan de tejido normal (que producirían señales falsas positivas). También hay una necesidad de equilibrar el número de marcadores examinados y el coste de la prueba, con la especificidad y la sensibilidad del ensayo. La técnica de elaboración de perfiles moleculares integrados (ARNm, metilación, número de copias, miARN, mutaciones) de miles de tumores por el Consorcio del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA), ha desvelado que los tumores colorrectales son tan diferentes entre sí como lo son los de mama, próstata, u otros cánceres epiteliales (TCGA "Comprehensive Molecular Characterization of Human Colon and Rectal Cancer Nature 487: 330-337 (2014)). Además, aquellos pocos marcadores que comparten en común (por ejemplo, las mutaciones KRAS), están también presentes en múltiples tipos de cánceres, lo que dificulta la capacidad de identificar el tejido de origen. Para la detección temprana del cáncer, el ensayo del ácido nucleico debe servir principalmente como herramienta de cribado, requiriendo la disponibilidad de seguimiento diagnóstico secundario (por ejemplo, colonoscopia para el cáncer colorrectal).

Un agravante del problema del problema biológico es la necesidad de cuantificar de forma fiable la mutación, la metilación del promotor, o el número de copias del ADN o el ARN a partir de bien un número muy pequeño de células iniciales (es decir, de CTC), o cuando la señal del cáncer procede de ADN exento de células (ADNlf) en la sangre y diluido en un exceso de ácido nucleico que procede de células normales, o liberadas inadvertidamente desde células sanguíneas normales durante el procesamiento de la muestra (Mateo et al., Genome Biol 15: 448 (2014)).

De forma análoga, un problema análogo de identificar dianas raras es el que surge cuando se usan técnicas basadas en ácidos nucleicos para detectar enfermedades infecciosas directamente en la sangre. En resumen, bien el patógeno puede estar presente en 1 o menos unidades formadoras de colonias (ufc)/ml, y/o hay muchos patógenos potenciales y variaciones de la secuencia responsables de la virulencia o la resistencia a los fármacos. Si bien estos problemas se ilustran para el cáncer, se reconoce que las soluciones son igualmente aplicables a enfermedades infecciosas.

Un continuum de necesidades diagnósticas requiere un continuum de pruebas diagnósticas.

La mayoría de esfuerzos diagnósticos moleculares actuales en el cáncer se han centrado en: (i) el pronóstico y la genómica predictiva, por ejemplo, identificar mutaciones heredadas en genes con predisposición al cáncer, tales como BrCA1, BrCA2, (Ford et al. Am J Hum Genet 62: 676-689 (1998)) (ii) tratamiento individualizado, por ejemplo, mutaciones en el gen de EGFR que guían una medicina personalizada (Sequist y Lynch, Ann Rev Med, 59: 429-442 (2008), y (iii) vigilancia de la reaparición, por ejemplo, detección de mutaciones KRAS emergentes en pacientes que desarrollan resistencia a los tratamientos farmacológicos (Hiley et al., Genome Biol 15: 453 (2014); Amado et al., J Clin Oncol 26: 1626-1634 (2008)). No obstante, esto pierde grandes oportunidades en el continuum del diagnóstico molecular del cáncer: (i) cribado más frecuente de aquellos con antecedentes familiares, (ii) cribado para la detección de la enfermedad inicial, y (iii) eficacia del tratamiento de vigilancia. Para abordar estas tres necesidades insatisfechas, se propone en el presente documento una nueva métrica para la detección basada en sangre denominada "carga de marcadores del cáncer", análoga a la carga vírica.

La secuenciación del ADN proporciona la capacidad en última instancia de distinguir todos los cambios del ácido nucleico asociados a la enfermedad. Sin embargo, el proceso sigue necesitando múltiples muestras iniciales y la preparación de moldes, y no es siempre económico. Las micromatrices de ADN pueden proporcionar información sustancial acerca de múltiples variantes de secuencias, tales como las SNP o diferentes niveles de expresión de ARN y son menos costosas que la secuenciación; sin embargo, son menos adecuadas para obtener resultados muy cuantitativos, ni para detectar mutaciones de baja abundancia. En otra parte del espectro se encuentra la reacción TaqMan™, que proporciona la cuantificación en tiempo real de un gen conocido, pero es menos adecuada para distinguir variantes de secuencia múltiples o mutaciones de abundancia baja.

Es fundamental hacer coincidir cada necesidad de diagnóstico no satisfecha con la prueba de diagnóstico adecuada -una que combine las metas divergentes de conseguir alta sensibilidad (es decir, pocos falsos negativos) y alta especificidad (es decir, pocos falsos positivos) a un coste bajo. Por ejemplo, la secuenciación directa de exones EGFR procedentes de una biopsia tumoral para determinar el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC) es significativamente más fiable y eficaz que el diseño de sondas TaqMan™ para las aproximadamente 180 mutaciones conocidas cuya respuesta a los fármacos está ya catalogada (Jia et al. Genome Res 23: 1434-1445 (2013)). La técnica más sensible para detectar mutaciones puntuales, BEAMing (Dressman et al., Proc Natl Acad Sci USA 100: 8817-8822 (2003)), se basa en el conocimiento previo de dichas mutaciones para buscarlas y, por tanto, es más adecuada para vigilar la reaparición de la enfermedad en lugar de para la detección temprana. Igualmente, para vigilar los niveles en sangre de translocaciones Bcr-Abl cuando se tratan pacientes de LMC con Gleevec (Jabbour et al., Cancer 112: 2112-2118 (2008)), un sencillo ensayo de la PCR cuantitativa con transcripción inversa PCR es mucho más preferible que secuenciar el ADN genómico completo en 1 ml de sangre (9 millones de células x 3 GB = 27 millones de Gb de datos en bruto).

La secuenciación de 2,1 Gb de todos y cada uno de los ADN exentos de células (ADNlc) aislados de pacientes de NSCLC se ha usado para proporcionar una cobertura de 10.000 veces en 125 kb de ADN dirigido (Kandoth et al. Nature 502: 333-339 (2013)). Esta estrategia identificó correctamente las mutaciones presentes en tumores emparejados, aunque solo se cubrieron un 50 % de tumores en estadio 1. Esta estrategia ha sido prometedora para el NSCLC, donde las muestras tienen en promedio de 5 a 20 mutaciones/Mb, sin embargo, no sería económica para otros cánceres tales como el cáncer de mama y ovario, que tienen en promedio menos de 1 a 2 mutaciones por Mb. Las actuales etapas de ligadura inicial, amplificación, y/o captura requeridas para una secuenciación profunda dirigida muy fiable son aún más complejas que los ensayos de PCR-TaqMan™ o PCR-LDR multiplexados.

Un análisis de datos integral de aproximadamente 600 muestras de cáncer colorrectal que tiene en cuenta la heterogeneidad del tumor, las agrupaciones de tumores y los falsos positivos biológicos/técnicos que varían de 3 % a 10 % por marcador individual mostró que el cribado de detección temprana óptima para el cáncer colorrectal requeriría al menos 5 a 6 marcadores positivos además de los 24 marcadores probados (Bacolod et al. Cancer Res 69:723-727 (2009); Tsafrir et al. Cancer Res 66: 2129-2137 (2006), Weinstein et al., Nat Genet 45: 1113-1120 (2013); Navin N.E. Genome Biol 15: 452 (2014); Hiley et al., Genome Biol 15: 453 (2014)); Esserman et al. Lancet Oncol 15: e234-242 (2014)). Además, la distribución de marcadores está sesgada en diferentes clados tumorales, por ejemplo, algunos tumores están fuertemente metilados, mientras que otros están apenas metilados, y son indistinguibles de la metilación relacionada con la edad del tejido adyacente. Por consiguiente, se necesita una estrategia multidimensional que utilice combinaciones de 3-5 conjuntos de marcadores de mutaciones, metilación, miARN, ARNm, variación de copias, corte y empalme alternativo o translocación para obtener suficiente cobertura de todos los diferentes clados tumorales. De forma análoga a un cribado prenatal no invasivo para la trisomía, basado en secuenciación o en realizar la detección de ligaduras en fragmentos aleatorios de ADNlc (Benn et al., Ultrasound Obstet Gynecol. 42(1):15-33 (2013); Chiu et

al., Proc Natl Acad Sci U S A 105: 20458 - 20463 (2008); Juneau et al., Fetal Diagn Ther. 36(4) (2014)), los marcadores reales puntuados en el cribado de un cáncer son secundarios para una cuantificación fiable de aquellos marcadores positivos en el plasma.

Desafíos técnicos del desarrollo de pruebas para el diagnóstico del cáncer.

Las pruebas diagnósticas destinadas a encontrar secuencias mutantes muy raras o de abundancia baja se enfrentan a potenciales señales de falsos positivos que surgen de: (i) un error de la polimerasa en la replicación de dianas naturales, (ii) un error en la secuenciación del ADN, (iii) una ligadura incorrecta de la diana natural, (iv) un producto de la PCR independiente de diana, y (iv) contaminación por arrastre de productos de la PCR que proceden de una muestra positiva previa. Las profundas implicaciones clínicas del resultado de una prueba positiva cuando se realiza un cribado del cáncer exigen que dicha prueba utilice todos los medios posibles para eliminar virtualmente los falsos positivos.

Fundamental para el concepto de detección de ácidos nucleicos es la amplificación o purificación selectiva de los marcadores específicos de cáncer deseados sin confundirlos con los mismos marcadores o marcadores muy similares procedentes de células normales. Estas estrategias incluyen: (i) múltiples regiones de unión a cebadores para la amplificación y detección ortogonal, (ii) selección por afinidad de las CTC o exosomas, y (iii) dilución espacial de la muestra.

Se ha demostrado anteriormente el éxito de la PCR-LDR, que utiliza 4 regiones de unión a cebadores para asegurar la sensibilidad y la especificidad. Las regiones deseadas se amplifican usando parejas o incluso parejas en tándem de cebadores de la PCR, seguido por parejas ortogonales de cebadores de la LDR anidados para la detección. Una ventaja de utilizar PCR-LDR es la capacidad de llevar a cabo una amplificación de la PCR proporcional de múltiples fragmentos para enriquecer dianas con bajo número de copias y, a continuación, usar la LDR cuantitativa para identificar directamente mutaciones específicas de cáncer. Biofire/bioMerieux ha desarrollado una tecnología similar denominada "matriz de película"; en la que los productos iniciales de reacción de la PCR multiplexada se redistribuyen en pocillos individuales y, a continuación, se realiza una PCR en tiempo real anidada con detección mediante el colorante SYBR Green.

Se ha demostrado la purificación por afinidad de las CTC mediante el uso de anticuerpos o aptámeros (Adams et al., J Am Chem Soc 130: 8633-8641 (2008); Dharmasiri et al., Electrophoresis 30: 3289-3300 (2009); Soper et al. Biosens Bioelectron 21: 1932-1942 (2006)). Se ha notificado en la bibliografía la captura por afinidad de péptidos de exosomas. El enriquecimiento de estas fracciones específicas de tumor procedentes de la sangre permite la cuantificación del número de copias, así como simplificar los ensayos de cribado y verificación.

La última estrategia, la dilución espacial de la muestra, se emplea en la PCR digital, así como su prima cercana conocida como BEAMing (Vogelstein y Kinzler, Proc Natl Acad Sci U S A. 96(16):9236-41 (1999); Dressman et al., Proc Natl Acad Sci USA 100: 8817-8822 (2003)). El fundamento de la PCR digital es superar el límite de discriminación enzimática cuando la muestra comprende muy pocas moléculas diana que contienen una mutación conocida en un exceso de 1.000 a 10.000 veces de ADN natural. Al diluir el ADN de entrada en 20.000 o más gotículas o perlas para distribuir menos de una molécula de diana por gotícula, el ADN puede amplificarse mediante la PCR, y a continuación detectarse mediante reacción de hibridación de sondas o TaqMan™, proporcionando en esencia una puntuación 0/1 digital. La estrategia es actualmente la más sensible para descubrir mutaciones puntuales en plasma, pero requiere un conocimiento previo de las mutaciones a puntuar, así como una dilución digital diferente para cada mutación, que agotaría la muestra completa para puntuar solamente unas pocas mutaciones.

PCR en tiempo real e instrumentación microfluídica

Se han diseñado numerosos ensayos/microdispositivos fabricados de la PCR para la detección rápida de patógenos y translocaciones y mutaciones asociadas a enfermedad. Cada combinación de ensayo/hardware tiene fortalezas concretas, pero cuando se combinan con el problema real de los marcadores multidimensionales y multiplexados requeridos para la detección del cáncer, la flexibilidad de la PCR-LDR con microfluidos proporciona determinadas ventajas.

La instrumentación, el diseño del ensayo y la arquitectura microfluídica deben integrarse perfectamente. Cierta instrumentación de la PCR utiliza fluorescencia en tiempo real o fluorescencia de punto final para cuantificar las moléculas iniciales de molde en cámaras de ciclación, pocillos o gotículas para diferentes temperaturas. Pero otro tipo de instrumentación comprende placas de microfluidos direccionables para la detección de la PCR en tiempo real. Sin embargo, el alto coste de los instrumentos y los consumibles ha limitado el uso generalizado de estas máquinas para aplicaciones clínicas.

En una arquitectura diferente, denominada PCR de flujo continuo, la mezcla de reacción se mueve a través de canales que están cuidadosamente dispuestos en un modelo de radiador, y fluye sobre elementos de calentamiento que están a temperaturas fijas. Esta arquitectura permite que la reacción de amplificación total se complete en unos pocos minutos, y es ideal para la separación y la lectura de capilares. Para las reacciones de detección de la ligasa, la lectura puede conseguirse aprovechando la LDR-FRET o la detección electrónica. En la LDR-FRET, un cebador tiene un

grupo donante, el otro tiene un grupo aceptor, y tras la ligadura forman una horquilla. Esto permite el recuento de los eventos de ligadura individuales para obtener lecturas muy cuantitativas del número de copias del ADN de entrada. Como alternativa, agregando nanopartículas de oro a cada cebador, el producto de ligadura contendrá dos nanopartículas, y estas pueden distinguirse usando la lectura electrónica.

Al tener en cuenta los diversos grados de automatización, la estrategia descrita en el presente documento se guía por los principios de "modularidad" y "escalabilidad". En primer lugar, el proceso debe separarse en etapas modulares que pueden optimizarse inicialmente en instrumentos diferentes. Por ejemplo, el dispositivo puede estar comprendido por un primer módulo para la purificación del ADN a partir de ADNlc plasmático, así como ARN procedente de exosomas, un segundo módulo para la transcripción inversa multiplexada y/o la amplificación limitada de diversas dianas, y un tercer módulo para generar y detectar productos de ligadura. Dicha arquitectura modular permite la distribución en módulos mejorados que se actualizan al ritmo de los desarrollos tecnológicos. Para que la estrategia de modularidad funcione, es fundamental que los productos de un módulo puedan moverse sin problemas hasta el siguiente módulo, sin fugas y sin preocuparse por la contaminación cruzada.

Segundo, el diseño modular debe ser adecuado para su fabricación escalable en altos volúmenes a costes bajos. Deben tenerse en consideración los costes de fabricación y cómo los cebadores/reactivos/muestras se depositan en el dispositivo.

La presente divulgación se dirige a superar estas y otras deficiencias de la técnica.

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones. La divulgación proporciona un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra, o de otras muestras, mediante uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen la secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados, y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la muestra. Se proporcionan uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios (a) un primer cebador de oligonuclótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia adyacente a la secuencia de nucleótidos diana, y (b) un segundo cebador de oligonuclótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una parte de un producto de extensión formado a partir del primer cebador de oligonuclótidos primario. La muestra puesta en contacto se combina con el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, y la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa se someta a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando así productos de extensión primarios que comprenden la secuencia de nucleótidos diana o un complemento de la misma. El método implica además combinar los productos de extensión primaria con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura. Cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótido que tiene un porción específica de la secuencia de nucleótidos diana, y (b) una segunda sonda de oligonucleótido que tiene un porción específica de la secuencia de nucleótidos diana, y en el que la primera y segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configura para hibridarse, de forma específica de la base, sobre una secuencia de nucleótidos diana complementaria de un producto de extensión primario. Las primera y segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de producto ligadas en la mezcla de la reacción de ligadura, y las secuencias de producto ligadas de las muestras se detectan y se distinguen para identificar la presencia de una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen secuencias de nucleótidos diana que difieren de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados.

Un primer aspecto de la presente invención se dirige a un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra, o de otras muestras, mediante uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen potencialmente la secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados. El método implica adicionalmente proporcionar una o más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la muestra, y proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de

oligonucleótidos primarios (a) un primer cebador de oligonuclótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia adyacente a la secuencia de nucleótidos diana y (b) un segundo cebador de oligonuclótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una parte de un producto de extensión formado a partir del primer cebador de oligonuclótidos primario. La muestra se combina con el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, la una o más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) en la muestra, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa se somete a condiciones adecuadas para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, y durante uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando así productos de extensión primarios que comprenden la secuencia de nucleótidos diana o un complemento de la misma. El método implica además combinar los productos de extensión primaria con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura, en el que cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene un porción específica del cebador en 5' y una porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 3', y (b) una segunda sonda d oligonucleótidos que tiene un porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 5' y una porción específica del cebador en 3'. La primera y segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configuran para hibridarse, de forma específica de la base, sobre una secuencia de nucleótidos diana complementaria de un producto de extensión primario. La mezcla de la reacción de ligadura se somete a uno o más ciclos de reacción de ligadura en los que la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de productos ligadas en la mezcla de la reacción de ligadura, donde cada secuencia de producto ligada comprende una porción específica del cebador en 5', las porciones específicas de la diana, y la porción específica del cebador en 3'. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos secundarios (a) un cebador de oligonucleótidos secundario que comprende la misma secuencia de nucleótidos que la porción específica del cebador en 5' de la secuencia del producto ligado y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos secundario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la porción específica del cebador en 3' de la secuencia del producto ligada, y combinar las secuencias del producto ligadas, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, la una o más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU), una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una segunda mezcla de reacción en cadena de la polimerasa. La segunda mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa se somete a condiciones adecuadas para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, y en uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera productos de extensión secundarios. Los productos de extensión secundarios se detectan y distinguen en la muestra para identificar la presencia de una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen secuencias de nucleótidos diana que difieren de las secuencias de nucleótidos en otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados.

Un segundo aspecto de la presente invención se dirige a un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra, o de otras muestras, mediante uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen potencialmente la secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados; proporcionando una o más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) en la muestra; y proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios (a) un primer cebador de oligonuclótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia adyacente a la secuencia de nucleótidos diana y (b) un segundo cebador de oligonuclótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una parte de un producto de extensión formado a partir del primer cebador de oligonuclótidos primario. El método implica además combinar la muestra, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, la una o más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) en la muestra, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa. La mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa se somete a condiciones adecuadas para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, y durante uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando así productos de extensión primarios que comprenden la secuencia de nucleótidos diana o un complemento de la misma. Los productos de extensión primarios se combinan con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura, en el que cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene un porción en 5' y una porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 3', y (b) una segunda sonda d

oligonucleótidos que tiene un porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 5' y una porción en 3', en la que la porción en 5' de la primera sonda de oligonucleótidos del conjunto de sondas es complementaria de una porción de la porción en 3' de la segunda sonda de oligonucleótidos, donde una sonda del conjunto de sondas comprende un resto generador de señal detectable, y donde la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas están configuradas para hibridarse, de forma específica de la base, sobre una secuencia de nucleótidos diana complementaria de un producto de extensión primario. El método implica además someter la mezcla de la reacción de ligadura a uno o más ciclos de reacción de ligadura, mediante el cual la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de producto ligadas en la mezcla de reacción de ligadura donde cada secuencia de producto ligada comprende la porción en 5', las porciones específicas diana, la porción en 3' y el resto generador de señal detectable. La porción en 5' de la secuencia del producto ligada se hibrida con su porción en 3' complementaria y se detecta la señal procedente del resto generador de señal detectable que se produce tras dicha hibridación. Las secuencias de producto ligadas se distinguen en la muestra basándose en dicha detección para identificar la presencia de una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen secuencias de nucleótidos diana que difieren de las secuencias de nucleótidos en otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados.

La divulgación también proporciona un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra, o de otras muestras, mediante uno o más restos metilados. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente una o más moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos en otras moléculas de ácidos nucleicos en uno o más restos metilados y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la muestra. El método implica además poner en contacto la muestra con una o más enzimas sensibles a la metilación para formar una mezcla de reacción con la enzima de restricción, en la que la una o más enzimas sensibles a la metilación escinden las moléculas de ácidos nucleicos de la muestra que contienen uno o más restos sin metilar en al menos una secuencia de reconocimiento de la enzima sensible a la metilación. Se proporcionan uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos primario (a) un primer cebador de oligonucleótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una región de la secuencia de nucleótidos diana que está en dirección 5' del uno o más restos metilados y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que una región de la secuencia de nucleótidos diana que está en dirección 3' del uno o más restos metilados. La mezcla de reacción con la enzima de restricción se combina con el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa primaria. El método implica además someter la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa primaria a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando así productos de extensión primarios que comprenden la secuencia de nucleótidos diana o un complemento de la misma. Se proporcionan uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos secundarios un primer y un segundo cebador de oligonucleótidos anidado que puede hibridarse con los productos de extensión primarios. Los productos de extensión primarios se combinan con el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa secundaria, y la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa secundaria se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera productos de extensión secundarios. Los productos de extensión secundarios de la muestra se detectan y distinguen para identificar la presencia de una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen secuencias de nucleótidos diana que difieren de las secuencias de nucleótidos en otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra en uno o más restos metilados.

La divulgación proporciona también un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos ribonucleicos diana que difieren en la secuencia de otras moléculas de ácidos ribonucleicos de la muestra debido a corte y empalme alternativo, un transcrito alternativo, un sitio de inicio alternativo, una secuencia de codificación alternativa, una secuencia no de codificación alternativa, una inserción de exón, una deleción de exón, una inserción de intrón, translocación, una mutación u otra redisposición genómica. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente una o más moléculas de ácidos ribonucleicos diana que contienen una secuencia que difiere de otras moléculas de ácidos ribonucleicos y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU presentes en la muestra. Se proporcionan uno o más cebadores de oligonucleótidos, siendo cada cebador complementario de la una o más moléculas de ácidos ribonucleicos diana. La muestra contactada se combina con el uno o más cebadores de oligonucleótidos y una transcriptasa inversa para formar una mezcla de transcripción inversa y se generan moléculas de ácidos desoxirribonucleicos complementarias (ADNc) en la mezcla de transcripción inversa. Cada molécula de ADNc comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de una molécula de ácido ribonucleico diana y contiene dU. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de cebador (a) un primer cebador de oligonucleótidos que comprende

una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una porción de una secuencia de nucleótidos de ADNc adyacente al complemento de la secuencia de la molécula de ácido ribonucleico diana del ADNc, y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una porción de un producto de extensión formado a partir del primer cebador de oligonucleótidos. La mezcla de transcripción inversa que contiene las moléculas de ADNc se combina con el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos y una polimerasa para formar una mezcla de reacción de la polimerasa, y la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera uno o más productos de extensión primarios diferentes. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene un porción específica de la secuencia diana, y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene un porción específica de la secuencia diana, en el que la primera y segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configura para hibridarse, de forma específica de la base, sobre una porción complementaria de un producto de extensión primario que corresponde a la secuencia de la molécula de ácido ribonucleico diana. Los productos de extensión primarios se ponen en contacto con una ligasa y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura y la primera y la segunda sondas del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias del producto ligadas en la mezcla de reacción de la ligasa. Las secuencias de producto ligadas de la muestra se detectan y distinguen identificando de esta forma la presencia de una o más moléculas de ácidos ribonucleicos diana que difieren en la secuencia de otras moléculas de ácidos ribonucleicos de la muestra debido a un corte y empalme alternativo, un transcrito alternativo, un sitio de inicio alternativo, una secuencia de codificación alternativa, una secuencia no de codificación alternativa, una inserción de exón, una deleción de exón, una inserción de intrón, translocación, mutaciones, u otra redisposición genómica.

La divulgación proporciona también un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos ribonucleicos diana que difieren en la secuencia de otras moléculas de ácidos ribonucleicos de la muestra debido a corte y empalme alternativo, un transcrito alternativo, un sitio de inicio alternativo, una secuencia de codificación alternativa, una secuencia no de codificación alternativa, una inserción de exón, una deleción de exón, una inserción de intrón, translocación, una mutación u otra redisposición genómica. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácidos ribonucleicos diana que potencialmente difieren en su secuencia de otras moléculas de ácidos ribonucleicos, y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU presentes en la muestra. Se proporcionan uno o más cebadores de oligonucleótidos, siendo cada cebador complementario de la una o más moléculas de ácidos ribonucleicos diana, y la muestra contactada se mezcla con el uno o más cebadores de oligonucleótidos, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una transcriptasa inversa para formar una mezcla de transcripción inversa. En la mezcla de transcripción inversa se generan moléculas de ácidos desoxirribonucleicos complementarias (ADNc), comprendiendo cada molécula de ADNc una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de la molécula de ácido ribonucleico diana y contiene dU. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de cebador (a) un primer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una porción de una secuencia de nucleótidos de ADNc adyacente al complemento de la secuencia de la molécula de ácido ribonucleico diana del ADNc, y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una porción de un producto de extensión formado a partir del primer cebador de oligonucleótidos. La mezcla de transcripción inversa que contiene las moléculas de ADNc se combina con el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una polimerasa para formar una mezcla de la reacción de la polimerasa, y la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa se someta a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera uno o más productos de extensión primarios diferentes. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de sondas (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica del cebador en 5' y una porción específica de la secuencia diana en 3', y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la secuencia diana en 5' y una porción específica del cebador en 3', donde la primera y segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configura para hibridarse, de forma específica de la base, sobre porciones complementarias de un producto de extensión primario que corresponde la secuencia de la molécula de ácido ribonucleico diana. Los productos de extensión primarios se ponen en contacto con una ligasa y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura, y la mezcla de la reacción de ligadura se somete a uno o más ciclos de reacción de ligadura mediante lo cual la primera y la segunda sondas del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias del producto ligadas en la mezcla de reacción de la ligasa, donde cada secuencia del producto ligada comprende la porción específica del cebador en 5', las porciones específicas de la diana, y la porción específica del cebador en 3'. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos secundarios (a) un cebador de oligonucleótidos secundario que comprende la misma secuencia de nucleótidos que la porción específica del cebador en 5' de la secuencia del producto ligado y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos secundario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la porción específica del cebador en 3' de la secuencia del producto ligada, y combinar las secuencias del producto ligadas, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios con una o

más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU), una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una segunda mezcla de reacción en cadena de la polimerasa. La segunda mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa se somete a condiciones adecuadas para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, y en uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera productos de extensión secundarios. Los productos de extensión secundarios se detectan y distinguen identificando de esta forma la presencia de una o más moléculas de ácidos ribonucleicos que difieren en la secuencia de otras moléculas de ácidos ribonucleicos de la muestra debido a un corte y empalme alternativo, un transcrito alternativo, un sitio de inicio alternativo, una secuencia de codificación alternativa, una secuencia no de codificación alternativa, una inserción de exón, una deleción de exón, una inserción de intrón, translocación, una mutación u otra redisposición genómica.

La divulgación proporciona también un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos ribonucleicos diana que difieren en la secuencia de otras moléculas de ácidos ribonucleicos de la muestra debido a corte y empalme alternativo, un transcrito alternativo, un sitio de inicio alternativo, una secuencia de codificación alternativa, una secuencia no de codificación alternativa, una inserción de exón, una deleción de exón, una inserción de intrón, translocación, una mutación u otra redisposición genómica. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácidos ribonucleicos diana que potencialmente difieren en su secuencia de otras moléculas de ácidos ribonucleicos, y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU presentes en la muestra. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, siendo cada cebador complementario de la una o más moléculas de ácidos ribonucleicos diana, y combinar la muestra contactada, el uno o más cebadores de oligonucleótidos, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una transcriptasa inversa para formar una mezcla de transcripción inversa. En la mezcla de transcripción inversa se generan moléculas de ácidos desoxirribonucleicos complementarias (ADNc), comprendiendo cada molécula de ADNc una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de la molécula de ácido ribonucleico diana y contiene dU. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de cebador (a) un primer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una porción de una secuencia de nucleótidos de ADNc adyacente al complemento de la secuencia de la molécula de ácido ribonucleico diana del ADNc, y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una porción de un producto de extensión formado a partir del primer cebador de oligonucleótidos. La mezcla de transcripción inversa que contiene las moléculas de ADNc se combina con el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una polimerasa para formar una mezcla de la reacción de la polimerasa, y la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa se someta a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera uno o más productos de extensión primarios diferentes. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de sondas (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene un porción en 5' y una porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 3', y (b) una segunda sonda d oligonucleótidos que tiene un porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 5' y una porción en 3', en la que la porción en 5' de la primera sonda de oligonucleótidos del conjunto de sondas es complementaria de una porción de la porción en 3' de la segunda sonda de oligonucleótidos, donde una sonda del conjunto de sondas comprende un resto generador de señal detectable, y donde la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas están configuradas para hibridarse, de forma específica de la base, sobre porciones complementarias de un producto de extensión primario que corresponde la secuencia de la molécula de ácido ribonucleico diana. Los productos de extensión primarios se ponen en contacto con una ligasa y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura, y la mezcla de la reacción de ligadura se somete a uno o más ciclos de reacción de ligadura mediante lo cual la primera y la segunda sondas del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias del producto ligadas en la mezcla de reacción de la ligasa, donde cada secuencia del producto ligada comprende la porción en 5', las porciones específicas diana, la porción en 3' y el resto generador de señal detectable. La porción en 5' de la secuencia del producto ligada se hibrida con su porción en 3' complementaria y se detecta la señal procedente del resto generador de señal detectable que se produce tras dicha hibridación. Las secuencias del producto ligadas de la muestra se detectan basándose en dicha detección para identificar la presencia de una o más moléculas de ácidos ribonucleicos que difieren en la secuencia de otras moléculas de ácidos ribonucleicos de la muestra debido a un corte y empalme alternativo, un transcrito alternativo, un sitio de inicio alternativo, una secuencia de codificación alternativa, una secuencia no de codificación alternativa, una inserción de exón, una deleción de exón, una inserción de intrón, translocación, una mutación u otra redisposición genómica.

La divulgación también proporciona un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos microrribonucleicos (miARN) diana que difieren en la secuencia de otras moléculas miARN de la muestra en una o más bases. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de miARN diana que difieren potencialmente en la secuencia de otras moléculas de miARN de la muestra en una o más bases, y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU potencialmente presentes en la muestra. Se proporcionan uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos,

comprendiendo cada conjunto de cebadores (a) un primer cebador de oligonucleótidos que tiene una porción en horquilla en 5', un grupo bloqueante, una porción interna específica del cebador en la región del bucle, y una porción de la secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de una porción en 3' de la secuencia de la molécula del miARN diana, (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que tiene una porción de la secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de un complemento del extremo 5' de la secuencia de la molécula del miARN diana, y una porción específica del cebador en 5', (c) un tercer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción interna específica del cebador del primer cebador de oligonucleótidos, y (d) un cuarto cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción del cebador en 5' del segundo cebador de oligonucleótidos. La muestra contactada se mezcla con el uno o más primeros cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una transcriptasa inversa para formar una mezcla de reacción de transcripción inversa. El primer cebador de oligonucleótidos se hibrida con la secuencia de la molécula de miARN diana, si está presente en la muestra, y la transcriptasa inversa extiende el extremo 3' del primer cebador de oligonucleótidos hibridado para generar un primer cebador de oligonucleótidos extendido que comprende el complemento de la secuencia de la molécula de miARN diana. El método implica además combinar la mezcla de reacción de la transcripción inversa con el segundo, el tercero, y el cuarto cebador de oligonucleótidos del conjunto de cebadores para formar una mezcla de reacción de la polimerasa en condiciones eficaces para que el uno o más segundos cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores se hibride con la región del primer cebador de oligonucleótidos extendido que comprende el complemento de la secuencia de la molécula de miARN diana y que se extienda para generar un producto de extensión primario que comprende la porción específica del cebador en 5', una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de la molécula de miARN diana, y el complemento de la porción interna específica del cebador. La mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación, y un tratamiento de extensión, formando de esta manera una pluralidad de productos de extensión primarios. El método implica además combinar la pluralidad de productos de extensión primarios con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura. Cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la secuencia diana y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene un porción específica de secuencia y una porción complementaria de un producto de extensión primario, en el que la primera y segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configura para hibridarse, de una forma específica de la base en porciones complementarias de un producto de extensión primario que corresponde a la secuencia de la molécula de miARN diana. Las primera y segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de producto ligadas en la mezcla de la reacción de ligadura, y las secuencias de producto ligadas de las muestras se detectan y se distinguen para identificar de esta forma una o más moléculas de miARN diana que difieren de las secuencias de otras moléculas de miARN de la muestra en una o más bases.

La divulgación también proporciona un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos microrribonucleicos (miARN) diana que difieren en la secuencia de otras moléculas miARN de la muestra en una o más bases. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de miARN diana que difieren potencialmente en la secuencia de otras moléculas de miARN de la muestra en una o más bases, y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU potencialmente presentes en la muestra. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de cebadores (a) un primer cebador de oligonucleótidos que tiene una porción en horquilla en 5', un grupo bloqueante, una porción interna específica del cebador en la región del bucle, y una porción de la secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de una porción en 3' de la secuencia de la molécula del miARN diana, (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que tiene una porción de la secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de un complemento del extremo 5' de la secuencia de la molécula del miARN diana, y una porción específica del cebador en 5', (c) un tercer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción interna específica del cebador del primer cebador de oligonucleótidos, y (d) un cuarto cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción del cebador en 5' del segundo cebador de oligonucleótidos. La muestra contactada se mezcla con el uno o más primeros cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una transcriptasa inversa para formar una mezcla de reacción de transcripción inversa donde el primer cebador de oligonucleótidos se hibrida con la secuencia de la molécula de miARN diana, si está presente en la muestra, y la transcriptasa inversa extiende el extremo 3' del primer cebador de oligonucleótidos hibridado para generar un primer cebador de oligonucleótidos extendido que comprende el complemento de la secuencia de la molécula de miARN diana. La mezcla de reacción de la transcripción inversa se mezcla con el segundo, el tercero, y el cuarto cebador de oligonucleótidos del conjunto de cebadores para formar una mezcla de reacción de la polimerasa en condiciones eficaces para que el uno o más segundos cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores se hibride con la región del primer cebador de oligonucleótidos extendido que comprende el complemento de la secuencia de la molécula de miARN diana y que se extienda para generar un producto de extensión primario que comprende la porción específica del cebador en 5', una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de la molécula de miARN diana, y el complemento de la porción interna específica del cebador. La mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación, y un tratamiento de extensión, formando de esta manera una pluralidad de productos de extensión primarios. La pluralidad de productos

de extensión primarios se combinan con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura, donde cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica del cebador en 5' y una porción específica de la secuencia diana en 3', y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la secuencia diana en 5', una porción complementaria de un producto de extensión primario y una porción específica del cebador en 3', y donde la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configuran para hibridarse, de forma específica de la base, sobre porciones complementarias de un producto de extensión primario que corresponde a la secuencia de la molécula de miARN diana. La mezcla de la reacción de ligadura se somete a uno o más ciclos de reacción de ligadura, por lo cual, la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de productos ligadas en la mezcla de reacción de ligadura en la que cada secuencia de producto ligada comprende la porción específica del cebador en 5', las porciones específicas de la diana, y la porción específica del cebador en 3'. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos secundarios (a) un cebador de oligonucleótidos secundario que comprende la misma secuencia de nucleótidos que la porción específica del cebador en 5' de la secuencia del producto ligado y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos secundario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la porción específica del cebador en 3' de la secuencia del producto ligada, y combinar las secuencias del producto ligadas, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, con una o más enzimas que pueden digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU), una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una segunda mezcla de reacción en cadena de la polimerasa. La segunda mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa se somete a condiciones adecuadas para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, y en uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera un producto de extensión secundario. Los productos de extensión secundarios de la muestra se detectan y distinguen identificando de esta forma la una o más moléculas de miARN diana que difieren en la secuencia de otras moléculas de miARN en la muestra en una o más bases.

La divulgación también proporciona un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos microrribonucleicos (miARN) diana que difieren en la secuencia de otras moléculas miARN de la muestra en una o más bases. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de miARN diana que difieren potencialmente en la secuencia de otras moléculas de miARN de la muestra en una o más bases, y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU potencialmente presentes en la muestra. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de cebadores (a) un primer cebador de oligonucleótidos que tiene una porción en horquilla en 5', un grupo bloqueante, una porción interna específica del cebador en la región del bucle, y una porción de la secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de una porción en 3' de la secuencia de la molécula del miARN diana, (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que tiene una porción de la secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de un complemento del extremo 5' de la secuencia de la molécula del miARN diana, y una porción específica del cebador en 5', (c) un tercer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción interna específica del cebador del primer cebador de oligonucleótidos, y (d) un cuarto cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción del cebador en 5' del segundo cebador de oligonucleótidos. La muestra contactada se mezcla con el uno o más primeros cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una transcriptasa inversa para formar una mezcla de reacción de transcripción inversa en la que el primer cebador de oligonucleótidos se hibrida con la secuencia de la molécula de miARN diana, si está presente en la muestra, y la transcriptasa inversa extiende el extremo 3' del primer cebador de oligonucleótidos hibridado para generar un primer cebador de oligonucleótidos extendido que comprende el complemento de la secuencia de la molécula de miARN diana. La mezcla de reacción de la transcripción inversa se mezcla con el segundo, el tercero, y el cuarto cebador de oligonucleótidos del conjunto de cebadores para formar una mezcla de reacción de la polimerasa en condiciones eficaces para que el uno o más segundos cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores se hibride con la región del primer cebador de oligonucleótidos extendido que comprende el complemento de la secuencia de la molécula de miARN diana y que se extienda para generar un producto de extensión primario que comprende la porción específica del cebador en 5', una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de la molécula de miARN diana, y el complemento de la porción interna específica del cebador. El método implica además someter la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación, y un tratamiento de extensión, formando de esta manera una pluralidad de productos de extensión primarios. La pluralidad de productos de extensión primarios se combinan con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura, en el que cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene un porción en 5' y una porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 3', y (b) una segunda sonda d oligonucleótidos que tiene un porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 5' y una porción en 3', en la que la porción en 5' de la primera sonda de oligonucleótidos del conjunto de sondas es complementaria de una porción de la porción en 3' de la segunda sonda de oligonucleótidos, donde una sonda del conjunto de sondas comprende un resto generador de señal detectable, y donde la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas están configuradas

para hibridarse, de forma específica de la base, sobre porciones complementarias de un producto de extensión primario que corresponde a la secuencia de la molécula de miARN diana. La mezcla de la reacción de ligadura se somete a uno o más ciclos de reacción de ligadura, por lo cual, la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de productos ligadas en la mezcla de reacción de ligadura en la que cada secuencia de producto ligada comprende la porción en 5', las porciones específicas diana, la porción en 3' y el resto generador de señal detectable. La porción en 5' de la secuencia del producto ligada se hibrida con su porción en 3' complementaria y se detecta la señal procedente del resto generador de señal detectable que se produce tras dicha hibridación. Las secuencias del producto ligadas de la muestra se distinguen basándose en dicha detección para identificar la presencia de una o más moléculas de miARN diana que difieren en la secuencia de otras moléculas de miARN de la muestra en una o más bases.

La divulgación también proporciona un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos microrribonucleicos (miARN) diana que difieren en la secuencia de otras moléculas miARN de la muestra en una o más bases. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de miARN diana que difieren potencialmente en la secuencia de otras moléculas de miARN por diferencias en una o más bases, y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU potencialmente presentes en la muestra. La muestra contactada se combina con una ligasa y una primera sonda de oligonucleótidos que comprende un fosfato en 5', una porción de horquilla en 5', una porción interna específica de cebador en la región del bucle, un grupo bloqueante y una secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de una porción en 3' de la secuencia de la molécula de miARN diana para formar una reacción de ligadura. El método implica además ligar la secuencia de la molécula de miARN diana por su extremo 3' al fosfato en 5' de la primera sonda de oligonucleótidos para generar una molécula de ácidos nucleicos quimérica que comprende la secuencia de la molécula de miARN diana, si está presente en la muestra, agregada a la primera sonda de oligonucleótidos. Se proporcionan uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de cebadores (a) un primer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de un complemento del extremo 5' de la secuencia de la molécula de miARN diana, y una porción específica del cebador en 5', (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la porción interna específica del cebador de la primera sonda de oligonucleótidos, y (c) un tercer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción específica del cebador en 5' del primer cebador de oligonucleótidos. La molécula de ácidos nucleicos quimérica se combina con el uno o más segundos cebadores de oligonucleótidos, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una transcriptasa inversa para formar una mezcla de reacción de transcripción inversa, en la que el uno o más segundos cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores se hibrida con la porción interna específica del cebador de la molécula de ácidos nucleicos quimérica, y se extiende por su extremo 3' para generar un complemento de la molécula de ácido nucleico quimérica, si está presente en la muestra. El método implica además combinar la mezcla de reacción de la transcripción inversa con el primer y el tercer cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores para formar una mezcla de reacción de la polimerasa, y someter la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera productos de extensión primarios. Los productos de extensión primarios comprenden la porción específica del cebador en 5', una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de la molécula de miARN diana, y el complemento de la porción interna específica del cebador. Los productos de extensión primarios se combinan con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura. Cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la secuencia diana y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene un porción específica de secuencia y una porción complementaria de un producto de extensión primario, en el que la primera y segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configura para hibridarse, de forma específica de la base, sobre porciones complementarias de un producto de extensión primario que corresponde a la secuencia de la molécula de miARN diana. Las primera y segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de producto ligadas en la mezcla de la reacción de ligadura, y las secuencias de producto ligadas de las muestras se detectan y se distinguen para identificar de esta forma una o más moléculas de miARN diana que difieren de las secuencias de otras moléculas de miARN de la muestra en una o más bases.

La divulgación también proporciona un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos microrribonucleicos (miARN) diana que difieren en la secuencia de otras moléculas miARN de la muestra en una o más bases. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de miARN que difieren potencialmente en la secuencia de otras moléculas de miARN por diferencias en una o más bases, y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU potencialmente presentes en la muestra. La muestra contactada se combina con una ligasa y una primera sonda de oligonucleótidos que comprende un fosfato en 5', una porción de horquilla en 5', una porción interna específica de cebador en la región del bucle, un grupo bloqueante, y una secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de una porción en 3' de la secuencia de la molécula de miARN diana para formar una reacción de ligadura, y la secuencia de la molécula de miARN diana está ligada por su extremo 3' al fosfato en 5' de la primera sonda de oligonucleótidos para generar una molécula de ácidos nucleicos quimérica que comprende la secuencia de la molécula de miARN diana, si está presente en la muestra, agregada a la primera sonda de oligonucleótidos. El método implica además proporcionar uno o más

conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de cebadores (a) un primer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de un complemento del extremo 5' de la secuencia de la molécula de miARN diana, y una porción específica del cebador en 5', (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la porción interna específica del cebador de la primera sonda de oligonucleótidos, y (c) un tercer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción específica del cebador en 5' del primer cebador de oligonucleótidos. La molécula de ácidos nucleicos quimérica se combina con el uno o más segundos cebadores de oligonucleótidos, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una transcriptasa inversa para formar una mezcla de reacción de transcripción inversa, donde el uno o más segundos cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores se hibrida con la porción interna específica del cebador de la molécula de ácidos nucleicos quimérica, y se extiende por su extremo 3' para generar un complemento de la molécula de ácido nucleico quimérica, si está presente en la muestra. La mezcla de reacción de la transcripción inversa se mezcla con el primer y el tercer cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores para formar una mezcla de reacción de la polimerasa, y la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera productos de extensión primarios que comprenden la porción específica del cebador en 5', una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de la molécula de miARN diana, y el complemento de la porción interna específica del cebador. Los productos de extensión primarios se combinan con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura, en el que cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica del cebador en 5' y una porción específica de la secuencia diana en 3', y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la secuencia diana en 5', una porción complementaria de un producto de extensión primario, y una porción específica del cebador en 3', en el que la primera y segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configura para hibridarse, de forma específica de la base, sobre porciones complementarias de un producto de extensión primario que corresponde a la secuencia de la molécula de miARN diana. La mezcla de la reacción de ligadura se somete a uno o más ciclos de reacción de ligadura, mediante el cual la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de productos ligadas en la mezcla de reacción de ligadura, en la que cada secuencia del producto ligada comprende una porción específica del cebador en 5', las porciones específicas de la diana, y la porción específica del cebador en 3'. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos secundarios (a) un primer cebador de oligonucleótidos secundarios que comprende la misma secuencia de nucleótidos que la porción específica del cebador en 5' de la secuencia del producto ligada y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos secundarios que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la porción específica del cebador en 3' de la secuencia del producto ligada. Las secuencias del producto ligadas se combinan con el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, una o más enzimas que pueden digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU), una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una segunda mezcla de reacción en cadena de la polimerasa. La segunda mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa se somete a condiciones adecuadas para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, y en uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera productos de extensión secundarios. Los productos de extensión secundarios de la muestra se detectan y distinguen identificando de esta forma la una o más moléculas de miARN diana que difieren en la secuencia de otras moléculas de miARN en la muestra en una o más bases.

La divulgación también proporciona un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos microrribonucleicos (miARN) diana que difieren en la secuencia de otras moléculas miARN de la muestra en una o más bases. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de miARN que difieren potencialmente en la secuencia de otras moléculas de miARN por diferencias en una o más bases, y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU potencialmente presentes en la muestra. La muestra contactada se combina con una ligasa y una primera sonda de oligonucleótidos que comprende un fosfato en 5', una porción de horquilla en 5', una porción interna específica de cebador en la región del bucle, un grupo bloqueante y una secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de una porción en 3' de la secuencia de la molécula de miARN diana para formar una reacción de ligadura. La molécula de miARN diana está ligada por su extremo 3' al fosfato en 5' de la primera sonda de oligonucleótidos para generar una molécula de ácidos nucleicos quimérica que comprende la secuencia de la molécula de miARN diana, si está presente en la muestra, agregada a la primera sonda de oligonucleótidos. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de cebadores (a) un primer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de un complemento del extremo 5' de la secuencia de la molécula de miARN diana, y una porción específica del cebador en 5', (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la porción interna específica del cebador de la primera sonda de oligonucleótidos, y (c) un tercer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción específica del cebador en 5' del primer cebador de oligonucleótidos. La molécula de ácidos nucleicos quimérica se combina con el uno o más segundos cebadores de oligonucleótidos, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una transcriptasa inversa para formar una

mezcla de reacción de transcripción inversa, en el que el uno o más segundos cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores se hibrida con la porción interna específica del cebador de la molécula de ácidos nucleicos quimérica, y se extiende por su extremo 3' para generar un complemento de la molécula de ácido nucleico quimérica, si está presente en la muestra. La mezcla de reacción de la transcripción inversa se mezcla con el primer y el tercer cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores para formar una mezcla de reacción de la polimerasa, y la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera productos de extensión primarios que comprenden la porción específica del cebador en 5', una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de la molécula de miARN diana, y el complemento de la porción interna específica del cebador. Los productos de extensión primarios se combinan con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura, en el que cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene un porción en 5' y una porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 3', y (b) una segunda sonda d oligonucleótidos que tiene un porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 5' y una porción en 3', en la que la porción en 5' de la primera sonda de oligonucleótidos del conjunto de sondas es complementaria de una porción de la porción en 3' de la segunda sonda de oligonucleótidos, donde una sonda del conjunto de sondas comprende un resto generador de señal detectable, y donde la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas están configuradas para hibridarse, de forma específica de la base, sobre porciones complementarias de un producto de extensión primario que corresponde a la secuencia de la molécula de miARN diana. La mezcla de la reacción de ligadura se somete a uno o más ciclos de reacción de ligadura, por lo cual, la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de productos ligadas en la mezcla de reacción de ligadura en la que cada secuencia de producto ligada comprende la porción en 5', las porciones específicas diana, la porción en 3' y el resto generador de señal detectable. La porción en 5' de la secuencia del producto ligada se hibrida con su porción en 3' complementaria, y se detecta la señal procedente del resto generador de señal detectable que se produce tras dicha hibridación. Las secuencias de producto ligadas se distinguen en la muestra basándose en dicha detección para identificar la presencia de una o más moléculas de miARN diana que difieren en la secuencia de otras moléculas de miARN de la muestra en una o más bases.

La divulgación proporciona también un dispositivo para añadir simultáneamente líquidos a dos o más pocillos de una fila y/o columna de una placa de microtitulación. El dispositivo tiene superficies superiores e inferiores opuestas teniendo la superficie superior aberturas que conducen a los pocillos y definiendo la superficie inferior los extremos cerrados de los pocillos. El dispositivo comprende una primera capa definida por un primer y un segundo límite con cámaras de medida que se extienden entre el primer y el segundo límite de dicha primera capa y en comunicación de fluidos entre sí. La primera capa se configura para situarse, en una posición operativa, cerca de la placa de microtitulación estando el primer límite de la primera capa más cerca de la superficie superior de la placa de microtitulación y estando cada una de las cámaras de medida en comunicación de fluidos con un pocillo individual de una fila y/o columna de la placa de microtitulación. La primera capa comprende además una cámara de llenado en comunicación de fluidos con una o más de las cámaras de medida. El dispositivo comprende una segunda capa definida por un primer y segundo límite con un puerto de llenado que se extiende entre el primer y el segundo límite de la segunda capa. La segunda capa se configura para situarse, en una posición operativa, sobre la primera capa con el primer límite de la segunda capa adyacente al segundo límite de la primera capa y estando alineado el puerto de llenado con la cámara de llenado. Cuando la primera capa, la segunda capa y la placa de microtitulación se sitúan unas con respecto a otras en sus posiciones operativas, el líquido que entra en el dispositivo a través del puerto de llenado pasará a través de la cámara de entrada, las cámaras de medida, y se dirigirá a dos o más pocillos de una fila y/o columna de la placa de microtitulación.

La divulgación proporciona también un método para añadir líquidos a dos o más pocillos de una fila y/o columna de una placa de microtitulación que tiene superficies superior e inferior opuestas, teniendo la superficie superior aberturas que conducen a los pocillos y definiendo la superficie inferior los extremos cerrados de los pocillos. Este método implica proporcionar un dispositivo que comprende una primera que tiene un primer y un segundo límite con cámaras de medida que se extienden entre el primer y el segundo límite de la primera capa y en comunicación de fluidos entre sí. La primera capa del dispositivo se configura para situarse, en una posición operativa, cerca de la placa de microtitulación estando los primeros límites de la primera capa más cerca de la superficie superior de la placa de microtitulación y estando una de las cámaras de medida en comunicación de fluidos con un pocillo individual de una fila y/o columna de la placa de microtitulación. La primera capa comprende además una cámara de llenado en comunicación de fluidos con una o más de las mencionadas cámaras de medida. El dispositivo comprende una segunda capa que tiene un primer y segundo límite con un puerto de llenado que se extiende entre el primer y el segundo límite de la segunda capa. La segunda capa se configura para situarse, en una posición operativa, sobre la primera capa con el primer límite de la segunda capa adyacente al segundo límite de la primera capa y estando alineado el puerto de llenado con la cámara de carga. Cuando la primera capa, la segunda capa y la placa de microtitulación se sitúan unas con respecto a otras en sus posiciones operativas, el líquido que entra en el dispositivo a través del puerto de llenado pasará a través de la cámara de llenado, las cámaras de medida, y se dirigirá a dos o más pocillos de una fila y/o columna de dicha placa de microtitulación. El método implica además llenar el dispositivo con líquido, y descargar el líquido del dispositivo dentro de dos o más pocillos de una fila y/o columna de dicha placa de microvaloración.

La presente divulgación describe numerosas estrategias para detectar mutaciones, cambios en la expresión, en variantes de corte y empalme, en la translocación, en el número de copias, y/o en la metilación de moléculas de ácidos nucleicos diana mediante el uso de reacciones de la nucleasa, ligasa y polimerasa. La presente invención resuelve los problemas de prevención de arrastres, y también permite el multiplexado espacial para proporcionar una cuantificación relativa, similar a la PCR digital. Dicha tecnología puede utilizarse para la detección temprana no invasiva del cáncer, el pronóstico no invasivo del cáncer, y la vigilancia de la reaparición del cáncer a partir de muestras de plasma o suero.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra un árbol lógico condicional para un pan-ensayo de detección temprana del cáncer basado en el análisis de una muestra de sangre de un paciente.

La Figura 2 ilustra un flujo de trabajo para el análisis de ADN, ARNm y miARN a partir de ADNlc, exosomas y CTC.

La Figura 3 ilustra el análisis genérico del ADN, ARNm y miARN mediante la distribución de una muestra, que inicialmente se ha diluido y distribuido entre 24 tubos para una PCR multiplexada o PCR con transcriptasa inversa seguida por LDR con sondas etiquetadas, en 24 x 16 filas de una placa de microtitulación.

La Figura 4 ilustra la adición de 16 conjuntos diferentes de cebadores marcadores en las 24 columnas de una placa de microtitulación de la Figura 3.

La Figura 5 ilustra un patrón de señal hipotético generado a partir de la detección de cada pocillo en tiempo real en la placa de microtitulación de la Figura 4.

La Figura 6 ilustra el flujo de trabajo para el análisis de ADN procedente de ADNlc o en plasma.

La Figura 7 ilustra el análisis del ADN, mediante la distribución de una muestra, que inicialmente se ha diluido y distribuido entre 24 tubos para una PCR multiplexada o PCR con transcriptasa inversa seguida por LDR con sondas etiquetadas, en 24 x 16 filas de una placa de microtitulación.

La Figura 8 ilustra la adición de 16 conjuntos diferentes de cebadores marcadores en las 24 columnas de una placa de microtitulación de la Figura 7.

La Figura 9 ilustra un patrón de señal hipotético generado a partir de la detección de cada pocillo en tiempo real en la placa de microtitulación de la Figura 8.

La Figura 10 ilustra un flujo de trabajo para el análisis de ARNm o miARN procedente de exosomas plasmáticos e ilustra un flujo de trabajo para el análisis de ADN, ARNm y miARN a partir de ADNlc, exosomas y CTC.

La Figura 11 ilustra el análisis de ARNm o miARN, mediante la distribución de una muestra, que inicialmente se ha diluido en serie entre 24 tubos para una PCR con transcriptasa inversa multiplexada seguido por LDR con sondas etiquetadas, en 24 x 16 filas de una placa de microtitulación.

La Figura 12 ilustra la adición de 16 conjuntos diferentes de cebadores marcadores en las 24 columnas de una placa de microtitulación de la Figura 11.

La Figura 13 ilustra un patrón de señal hipotético generado a partir de la detección de cada pocillo en tiempo real en la placa de microtitulación de la Figura 12.

La Figura 14 ilustra el flujo de trabajo para el análisis genérico del ADN, ARNm y miARN mediante la distribución de una muestra, que inicialmente se ha diluido entre 24 tubos para una PCR multiplexada o PCR con transcriptasa inversa mediante LDR con sondas etiquetadas, para captura mediada por estreptavidina en 24 x 16 filas de una placa de microtitulación.

La Figura 15 ilustra el análisis genérico del ADN, ARNm y miARN mediante la distribución de 24 muestras, que inicialmente se han diluido y distribuido entre 24 tubos para una PCR multiplexada o PCR con transcriptasa inversa mediante LDR con sondas etiquetadas, en 24 x 16 filas de una placa de microtitulación.

La Figura 16 ilustra la captura mediada por estreptavidina de los amplicones biotinilados de la PCR o RT-PCR en los pocillos de una placa de microtitulación de la Figura 15.

La Figura 17 ilustra la adición de 16 conjuntos diferentes de cebadores marcadores en las 24 columnas de una placa de microtitulación de la Figura 16.

La Figura 18 ilustra un patrón de señal hipotético generado a partir de la detección de LDR-FRET en cada pocillo en tiempo real en la placa de microtitulación de la Figura 17.

La Figura 19 ilustra el flujo de trabajo para el análisis de ADN mediante la distribución de una muestra, que inicialmente se ha diluido entre 24 tubos para una PCR multiplexada seguida por LDR con sondas etiquetadas, para captura mediada por estreptavidina en 24 x 16 filas de una placa de microtitulación.

La Figura 20 ilustra el análisis de ADN mediante la distribución de 24 muestras, que inicialmente se han diluido y distribuido entre 24 tubos para una PCR multiplexada seguida por LDR con sondas etiquetadas, en 24 x 16 filas de una placa de microtitulación.

La Figura 21 ilustra la captura mediada por estreptavidina de los amplicones biotinilados de la PCR o RT-PCR en los pocillos de una placa de microtitulación de la Figura 20.

La Figura 22 ilustra la adición de 16 conjuntos diferentes de cebadores marcadores en las 24 columnas de una placa de microtitulación de la Figura 21.

La Figura 23 ilustra un patrón de señal hipotético generado a partir de la detección de LDR-FRET en cada pocillo en tiempo real en la placa de microtitulación de la Figura 22.

La Figura 24 ilustra el flujo de trabajo para el análisis de miARN y miARN mediante la distribución de una muestra, que inicialmente se ha diluido entre 24 tubos para una PCR multiplexada seguida por LDR con sondas etiquetadas, para captura mediada por estreptavidina en 24 x 16 filas de una placa de microtitulación.

La Figura 25 ilustra el análisis de ARNm o miARN, mediante la distribución de una muestra, que inicialmente se

ha diluido en serie entre 24 tubos para una PCR con transcriptasa inversa multiplexada seguido por LDR con sondas etiquetadas, en 24 x 16 filas de una placa de microtitulación.

La Figura 26 ilustra la captura mediada por estreptavidina de los amplicones de la RT-PCR en los pocillos de una placa de microtitulación de la Figura 25.

La Figura 27 ilustra la adición de 16 conjuntos diferentes de cebadores marcadores en las 24 columnas de una placa de microtitulación de la Figura 26.

La Figura 28 ilustra un patrón de señal hipotético generado a partir de la detección de LDR-FRET en cada pocillo en tiempo real en la placa de microtitulación de la Figura 27.

La Figura 29 ilustra una simulación de una distribución de Poisson de 6 a 48 moléculas distribuidas entre 24 pocillos. En la parte superior se encuentra una forma tabular de las moléculas iniciales frente a las moléculas por pocillo. En la parte inferior hay un histograma del n.º de moléculas (x) frente al n.º de pocillos (y).

La Figura 30 ilustra una simulación de una distribución de Poisson de 12 a 96 moléculas distribuidas entre 24 pocillos. En la parte superior se encuentra una forma tabular de las moléculas iniciales frente a las moléculas por pocillo. En la parte inferior hay un histograma del n.º de moléculas (x) frente al n.º de pocillos (y).

La Figura 31 ilustra una simulación de una distribución de Poisson de 12 a 96 moléculas distribuidas entre 48 pocillos. En la parte superior se encuentra una forma tabular de las moléculas iniciales frente a las moléculas por pocillo. En la parte inferior hay un histograma del n.º de moléculas (x) frente al n.º de pocillos (y).

La Figura 32 ilustra una simulación de una distribución de Poisson de 24 a 192 moléculas distribuidas entre 48 pocillos. En la parte superior se encuentra una forma tabular de las moléculas iniciales frente a las moléculas por pocillo. En la parte inferior hay un histograma del n.º de moléculas (x) frente al n.º de pocillos (y).

La Figura 33 ilustra una simulación de una distribución de Poisson de 1 a 8 moléculas distribuidas entre 8 pocillos. En la parte superior se encuentra una forma tabular de las moléculas iniciales frente a las moléculas por pocillo. En la parte inferior hay un histograma del n.º de moléculas (x) frente al n.º de pocillos (y).

La Figura 34 ilustra una simulación de una distribución de Poisson de 2 a 16 moléculas distribuidas entre 8 pocillos. En la parte superior se encuentra una forma tabular de las moléculas iniciales frente a las moléculas por pocillo. En la parte inferior hay un histograma del n.º de moléculas (x) frente al n.º de pocillos (y).

La Figura 35 ilustra una simulación de una distribución de Poisson de 4 a 32 moléculas distribuidas entre 8 pocillos. En la parte superior se encuentra una forma tabular de las moléculas iniciales frente a las moléculas por pocillo. En la parte inferior hay un histograma del n.º de moléculas (x) frente al n.º de pocillos (y).

La Figura 36 ilustra una simulación de una distribución de Poisson de 8 a 64 moléculas distribuidas entre 8 pocillos. En la parte superior se encuentra una forma tabular de las moléculas iniciales frente a las moléculas por pocillo. En la parte inferior hay un histograma del n.º de moléculas (x) frente al n.º de pocillos (y).

La Figura 37 ilustra una simulación de una distribución de Poisson de 16 a 128 moléculas distribuidas entre 8 pocillos. En la parte superior se encuentra una forma tabular de las moléculas iniciales frente a las moléculas por pocillo. En la parte inferior hay un histograma del n.º de moléculas (x) frente al n.º de pocillos (y).

La Figura 38 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente diana(s) y/o mutaciones.

La Figura 39 ilustra la reacción PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente diana(s) y/o mutaciones.

La Figura 40 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente diana(s) y/o mutaciones.

La Figura 41 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente diana(s) y/o mutaciones.

La Figura 42 ilustra la reacción PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente diana(s) y/o mutaciones.

La Figura 43 ilustra la reacción PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente diana(s) y/o mutaciones.

La Figura 44 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente diana(s) y/o mutaciones.

La Figura 45 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente la metilación de la diana.

La Figura 46 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente la metilación de la diana.

La Figura 47 ilustra la reacción PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente la metilación de la diana.

La Figura 48 ilustra la reacción nucleasa-ligadura-PCR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente la metilación de la diana.

La Figura 49 ilustra la reacción nucleasa-ligadura-PCR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente la metilación de la diana.

La Figura 50 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente la metilación de la diana.

La Figura 51 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente la metilación de la diana.

La Figura 52 ilustra la reacción PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente la metilación de la diana.

La Figura 53 ilustra la reacción PCR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o

cuantificar relativamente la metilación de la diana.

La Figura 54 ilustra una visión general de la reacción LDR-qPCR con prevención de arrastre para identificar o cuantificar relativamente translocaciones en el ARNm.

La Figura 55 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente translocaciones en el ARNm.

La Figura 56 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente translocaciones en el ARNm.

La Figura 57 ilustra la reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente translocaciones en el ARNm.

La Figura 58 ilustra una visión general de la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para identificar o cuantificar relativamente el corte y empalme alternativo.

La Figura 59 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente transcritos de corte y empalme alternativo o de tipo natural.

La Figura 60 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente transcritos de corte y empalme alternativo o de tipo natural.

La Figura 61 ilustra la reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente transcritos de corte y empalme alternativo o de tipo natural.

La Figura 62 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente transcritos de corte y empalme alternativo de bajo nivel.

La Figura 63 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente transcritos de corte y empalme alternativo de bajo nivel.

La Figura 64 ilustra la reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente transcritos de corte y empalme alternativo de bajo nivel.

La Figura 65 ilustra una visión general de la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para identificar o cuantificar relativamente el corte y empalme alternativo.

La Figura 66 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente el sitio de inicio de la transcripción natural y alternativo.

La Figura 67 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente el sitio de inicio de la transcripción natural y alternativo.

La Figura 68 ilustra la reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente el sitio de inicio de la transcripción natural y alternativo.

La Figura 69 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente el sitio de inicio de la transcripción de bajo nivel o alternativo.

La Figura 70 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente el sitio de inicio de la transcripción de bajo nivel o alternativo.

La Figura 71 ilustra la reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente el sitio de inicio de la transcripción de bajo nivel o alternativo.

La Figura 72 ilustra una visión general de la reacción LDR-qPCR con prevención de arrastre para identificar o cuantificar relativamente la deleción de exones.

La Figura 73 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente el transcrito natural y con corte y empalme alternativo (deleción de exones).

La Figura 74 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente el transcrito natural y con corte y empalme alternativo (deleción de exones).

La Figura 75 ilustra la reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente el transcrito natural y con corte y empalme alternativo (deleción de exones).

La Figura 76 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente el transcrito natural con corte y empalme alternativo (deleción de exones) de bajo nivel.

La Figura 77 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente el transcrito natural con corte y empalme alternativo (deleción de exones) de bajo nivel.

La Figura 78 ilustra la reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente el transcrito natural con corte y empalme alternativo (deleción de exones) de bajo nivel.

La Figura 79 ilustra una visión general de la reacción LDR-qPCR con prevención de arrastre para identificar o cuantificar relativamente el corte y empalme alternativo con inserción de intrones.

La Figura 80 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente el transcrito natural y con corte y empalme alternativo (inserción de intrones).

La Figura 81 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente el transcrito natural y con corte y empalme alternativo (inserción de intrones).

La Figura 82 ilustra la reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente el transcrito natural y con corte y empalme alternativo (inserción de intrones).

La Figura 83 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente el transcrito natural con corte y empalme alternativo (inserción de intrones) de bajo nivel.

La Figura 84 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente el transcrito natural con corte y empalme alternativo (inserción de intrones)

de bajo nivel.
La Figura 85 ilustra la reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente el transcrito natural con corte y empalme alternativo (inserción de intrones) de bajo nivel.
La Figura 86 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para enumerar el número de copias de ADN.
La Figura 87 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para enumerar el número de copias de ADN.
La Figura 88 ilustra la reacción PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para enumerar el número de copias de ADN.
La Figura 89 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para enumerar el número de copias de ARN.
La Figura 90 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para enumerar el número de copias de ARN.
La Figura 91 ilustra la reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para enumerar el número de copias de ARN.
La Figura 92 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente el miARN.
La Figura 93 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente el miARN.
La Figura 94 ilustra la reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente el miARN.
La Figura 95 ilustra la reacción Ligadura-RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente el miARN.
La Figura 96 ilustra la reacción Ligadura-RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente el miARN.
La Figura 97 ilustra la reacción Ligadura-RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente el miARN.
La Figura 98 ilustra la reacción Ligadura-RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección Taqman para identificar o cuantificar relativamente el miARN.
La Figura 99 ilustra la reacción Ligadura-RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con detección UniTaq para identificar o cuantificar relativamente el miARN.
La Figura 100 ilustra la reacción Ligadura-RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre con detección FRET para identificar o cuantificar relativamente el miARN.
La Figura 101 ilustra las dimensiones de una versión de una placa de microtitulación de 384 pocillos comercialmente disponible.
La Figura 102 ilustra las dimensiones de otra versión de una placa de microtitulación de 384 pocillos comercialmente disponible.
La Figura 103 muestra una vista superior y lateral de la configuración de una placa de microtitulación de 384 pocillos típica.
La Figura 104 muestra una vista en perspectiva de la configuración de una placa de microtitulación de 384 pocillos típica.
La Figura 105 ilustra una vista superior y lateral de la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras situado encima de algunos pocillos de una placa de microtitulación.
La Figura 106 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras situado encima de algunos pocillos de una placa de microtitulación.
La Figura 107 ilustra una vista superior y lateral de las capas primera e intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras situado encima de algunos pocillos de una placa de microtitulación.
La Figura 108 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de las capas primera e intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras situado encima de algunos pocillos de una placa de microtitulación.
La Figura 109 ilustra una vista superior y lateral de la tercera, primera y capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras situado encima de algunos pocillos de una placa de microtitulación.
La Figura 110 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la tercera, primera y capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras situado encima de algunos pocillos de una placa de microtitulación.
La Figura 111 ilustra una vista superior y lateral de la segunda, tercera, primera y capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras situado encima de algunos pocillos de una placa de microtitulación.
La Figura 112 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la segunda, tercera, primera y capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras situado encima de algunos pocillos de una placa de microtitulación.
La Figura 113 ilustra una vista superior y lateral de las capas primera e intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que utiliza un puerto de llenado alternativo para llenar a presión los canales y las cámaras de medición de cada fila de una placa de microtitulación.
La Figura 114 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de las capas primera e intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que utiliza un puerto de llenado alternativo para llenar a presión los canales y las cámaras de medición de cada fila de una placa de microtitulación.
La Figura 115 ilustra una vista superior y lateral de la tercera, primera y capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que utiliza un puerto de llenado alternativo para llenar a presión los canales y las cámaras

de medición de cada fila de una placa de microtitulación.

La Figura 116 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la tercera, primera y capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que utiliza un puerto de llenado alternativo para llenar a presión los canales y las cámaras de medición de cada fila de una placa de microtitulación.

La Figura 117 ilustra una vista superior y lateral de la segunda, tercera, primera y capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que utiliza un puerto de llenado alternativo para llenar a presión los canales y las cámaras de medición de cada fila de una placa de microtitulación.

La Figura 118 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la segunda, tercera, primera y capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que utiliza un puerto de llenado alternativo para llenar a presión los canales y las cámaras de medición de cada fila de una placa de microtitulación.

La Figura 119 ilustra una vista superior y lateral de la capa intermedia en el lado de salida de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila de una placa de microtitulación.

La Figura 120 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la capa intermedia en el lado de salida de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila de una placa de microtitulación.

La Figura 121 ilustra una vista superior y lateral de las capas primera e intermedia en el lado de salida de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila de una placa de microtitulación.

La Figura 122 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de las capas primera e intermedia en el lado de salida de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila de una placa de microtitulación.

La Figura 123 ilustra una vista superior y lateral de la tercera, primera y capa intermedia en el lado de salida de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila de una placa de microtitulación.

La Figura 124 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la tercera, primera y capa intermedia en el lado de salida de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila de una placa de microtitulación.

La Figura 125 ilustra una vista superior y lateral de la segunda, tercera, primera y capa intermedia en el lado de salida de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila de una placa de microtitulación.

La Figura 126 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la segunda, tercera, primera y capa intermedia en el lado de salida de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila de una placa de microtitulación.

La Figura 127 ilustra una vista superior y lateral de la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila desde ambos lados de una placa de microtitulación.

La Figura 128 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila desde ambos lados de una placa de microtitulación.

La Figura 129 ilustra una vista superior y lateral de las capas primera e intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila desde ambos lados de una placa de microtitulación.

La Figura 130 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de las capas primera e intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila desde ambos lados de una placa de microtitulación.

La Figura 131 ilustra una vista superior y lateral de la tercera, primera y capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila desde ambos lados de una placa de microtitulación.

La Figura 132 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la tercera, primera y capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila desde ambos lados de una placa de microtitulación.

La Figura 133 ilustra una vista superior y lateral de la segunda, tercera, primera y capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila desde ambos lados de una placa de microtitulación.

La Figura 134 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la segunda, tercera, primera y capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila desde ambos lados de una placa de microtitulación.

La Figura 135 ilustra una vista superior y lateral de la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila y cada columna de una placa de microtitulación.

La Figura 136 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila y cada columna de una placa de microtitulación.

La Figura 137 ilustra una vista superior y lateral de una primera región de la primera capa y de la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila y cada columna de una placa de microtitulación.

La Figura 138 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la primera región de la primera capa y de la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila y cada columna de una placa de microtitulación.

La Figura 139 ilustra una vista superior y lateral de la primera y segunda regiones de la primera capa y de la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila y cada columna de una placa de microtitulación.

La Figura 140 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la primera y segunda regiones de la primera capa y de la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila y cada columna de una placa de microtitulación.

La Figura 141 ilustra una vista superior y lateral de la tercera capa, primera capa (con las regiones primera y segunda), y la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila y cada columna de una placa de microtitulación.

La Figura 142 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la tercera capa, primera capa (con las regiones primera y segunda), y la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila y cada columna de una placa de microtitulación.

La Figura 143 ilustra una vista superior y lateral de la segunda capa, tercera capa, primera capa (con las regiones primera y segunda), y la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila y cada columna de una placa de microtitulación.

La Figura 144 ilustra una vista en perspectiva con despiece ordenado de la segunda capa, tercera capa, primera capa (con las regiones primera y segunda), y la capa intermedia de un dispositivo de dispersión de muestras que aborda independientemente cada fila y cada columna de una placa de microtitulación.

La Figura 145 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con lectura Taqman para identificar o cuantificar relativamente mutaciones de bajo nivel.

La Figura 146 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con lectura UniTaq para identificar o cuantificar relativamente mutaciones de bajo nivel.

La Figura 147 ilustra la reacción PCR-qLDR con prevención de arrastre con lectura FRET para identificar o cuantificar relativamente mutaciones de bajo nivel.

La Figura 148 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con lectura Taqman para identificar o cuantificar relativamente mutaciones de bajo nivel.

La Figura 149 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con lectura UniTaq para identificar o cuantificar relativamente mutaciones de bajo nivel.

La Figura 150 ilustra la reacción PCR-qLDR con prevención de arrastre con lectura FRET para identificar o cuantificar relativamente mutaciones de bajo nivel.

La Figura 151 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con lectura Taqman para identificar o cuantificar relativamente la metilación de dianas de bajo nivel.

La Figura 152 ilustra la reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con lectura UniTaq para identificar o cuantificar relativamente la metilación de dianas de bajo nivel.

La Figura 153 ilustra la reacción PCR-qLDR con prevención de arrastre con lectura FRET para identificar o cuantificar relativamente la metilación de dianas de bajo nivel.

La Figura 154 ilustra la reacción mediante PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con lectura Taqman para identificar o cuantificar diana(s) y/o mutaciones de bajo nivel.

La Figura 155 ilustra la reacción Bucle-PCR-qLDR con prevención de arrastre con lectura FRET para identificar o cuantificar relativamente mutaciones de bajo nivel.

La Figura 156 ilustra la reacción Bucle-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre con lectura Taqman para identificar o cuantificar relativamente la metilación de dianas de bajo nivel.

La Figura 157 ilustra la reacción Bucle-PCR-qLDR con prevención de arrastre con lectura FRET para identificar o cuantificar relativamente la metilación de dianas de bajo nivel.

La Figura 158 ilustra la reacción PCR-qPCR con prevención de arrastre con lectura Taqman para identificar o cuantificar relativamente la metilación de dianas de bajo nivel.

La Figura 159 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los experimentos PCR-LDR-qPCR para detectar la mutación V600E de BRAF en un exceso de ADN natural.

La Figura 160 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los en los experimentos del píxel PCR-LDR-qPCR para enumerar moléculas individuales de la mutación V600E de BRAF.

La Figura 161 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los en los experimentos del píxel PCR-LDR-qPCR para enumerar moléculas individuales de la mutación V600E de BRAF en presencia de un exceso de ADN natural procedente de plasma.

La Figura 162 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los experimentos PCR-LDR-qPCR para detectar la mutación R248Q de TP53 en presencia de un exceso de ADN natural.

La Figura 163 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los experimentos PCR-LDR-qPCR para detectar la mutación R248Q de TP53 en presencia de un exceso de ADN natural.

La Figura 164 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los en los experimentos del píxel PCR-LDR-qPCR para enumerar moléculas individuales de la mutación R248Q de TP53 en presencia de un exceso de ADN natural.

La Figura 165 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los en los experimentos del píxel PCR-LDR-qPCR para enumerar moléculas individuales de la mutación R248Q de TP53 en presencia de un exceso de ADN natural procedente de plasma.

La Figura 166 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los experimentos PCR-LDR-qPCR para detectar la mutación G12C de KRAS en presencia de un exceso de ADN natural.

La Figura 167 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los experimentos PCR-LDR-qPCR para detectar la mutación G12S de KRAS en presencia de un exceso de ADN natural.

La Figura 168 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los en los experimentos del píxel PCR-LDR-qPCR para enumerar moléculas individuales de la mutación G12C de KRAS en

presencia de un exceso de ADN natural procedente de plasma.
La Figura 169 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los experimentos PCR-LDR-qPCR para detectar la mutación G12D de KRAS en presencia de un exceso de ADN natural.
La Figura 170 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los experimentos PCR-LDR-qPCR para detectar la mutación G12A de KRAS en presencia de un exceso de ADN natural.
La Figura 171 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los experimentos PCR-LDR-qPCR para detectar la mutación G12V de KRAS en presencia de un exceso de ADN natural.
La Figura 172 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los en los experimentos del píxel PCR-LDR-qPCR para enumerar moléculas individuales de la mutación G12V de KRAS en presencia de un exceso de ADN natural en plasma.
La Figura 173 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los experimentos PCR-LDR-qPCR para detectar la presencia o ausencia de metilación del gen de la vimentina.
La Figura 174 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en los en los experimentos del píxel PCR-LDR-qPCR para enumerar moléculas individuales de ADN metilado en presencia de un exceso de ADN no metilado ADNhg).
La Figura 175 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en el experimento para detectar metilación en la hebra superior de VIM_S3, usando la versión "A" de la sonda TaqMan.
La Figura 176 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en el experimento para detectar metilación en la hebra inferior de VIM S3, usando la versión "A" de la sonda TaqMan.
La Figura 177 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en el experimento para detectar metilación en la hebra superior de VIM S3, usando la versión "B" de la sonda TaqMan.
La Figura 178 ilustra los gráficos de amplificación mediante la PCR en tiempo real obtenidos en el experimento para detectar metilación en la hebra inferior de VIM S3, usando la versión "B" de la sonda TaqMan.

Descripción detallada de la invención

Diseño universal para la detección temprana de enfermedades usando la "Carga de marcador de enfermedad"

La prueba de detección temprana de enfermedades más económica puede combinar un ensayo inicial de amplificación y ligadura acoplados multiplexados para determinar la "carga de la enfermedad". Para la detección del cáncer, esto conseguiría una sensibilidad > 95 % para todos los tipos de cáncer (pan-oncología), para una especificidad > 97 %. Se ilustra en la Figura 1 un diagrama de flujo de un ensayo de carga de tumores cancerosos. Un ensayo de cribado inicial de PCR/LDR multiplexado que puntúa la mutación, metilación, miARN, ARNm, corte y empalme alternativo y translocaciones identifica aquellas muestras que tienen un resultado positivo para > 5 de 24-48 marcadores. A continuación, las presuntas muestras positivas se someten a ensayo usando PCR/LDR de 'píxel' con marcadores específicos de tejido adicionales para validar el resultado inicial e identificar el tejido de origen. Después, el médico puede solicitar la secuenciación dirigida para obtener una guía adicional sobre las decisiones de tratamiento del paciente.

La presente divulgación se dirige a un enfoque de diagnóstico universal que busca combinar las mejores características de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) digital, la reacción de detección de ligadura (LDR) y la detección cuantitativa de múltiples marcadores de enfermedades, por ejemplo, marcadores del cáncer. La familia de la arquitectura del ensayo y los dispositivos comprende tres módulos para cuantificación por PCR-LDR de marcadores de enfermedad de baja abundancia procedentes de la sangre. Cada módulo se puede optimizar independientemente y puede ser manual, semiautomático o totalmente automático. El diseño permite integrar los módulos entre sí, de forma que cada módulo se puede optimizar independientemente para conseguir un rendimiento mejorado de la totalidad del ensayo.

La primera familia de diseños de ensayo se basa en una amplificación inicial por PCR o RT-PCR multiplexada seguida por LDR multiplexada usando sondas LDR que tienen etiquetas únicas de secuencia que contienen partes específicas de cebadores. Los productos se distribuyen y se mezclan con conjuntos de cebadores marcadores con sondas TaqMan™ dirigidas a diana, o de forma alternativa, con sondas de cebadores UniTaq, y los ácidos nucleicos de entrada se cuantifican utilizando la PCR en tiempo real.

El primer módulo toma una muestra de entrada de sangre, y separa el plasma de los glóbulos rojos (RBC) y de los glóbulos blancos (WBC). Separa el plasma de nuevo para eliminar posibles células residuales. Adicionalmente, las fracciones de células que contienen todos los WBC y las células tumorales en circulación (CTC) y algunos RBC se separan. Los exosomas se separan o se capturan por afinidad a partir del plasma. El módulo purifica (i) el ARN a partir de la fracción de WBC y CTC, (ii) el miARN y el ARN a partir de los exosomas, y (iii) el ADN exento de células (ADNlc) del plasma.

El segundo módulo permite la distribución de los componentes anteriores en 24 o 48 cámaras o pocillos para multiplexado espacial con amplificación proporcional por PCR o RT-PCR multiplexada de la diana génica, promotor, regiones de miARN o ARNm. Estos incluyen: (i) ARNm específicos de variantes de corte y empalme o de fusión génica de la fracción de WBC que contiene CTC, (ii) miARN específicos procedentes de exosomas, (iii) ARNm específicos procedentes de exosomas, (iv) regiones de ADN específicas de genes cancerosos procedentes de ADNlc, y (v)

regiones promotoras específicas (metiladas) procedentes de ADNlc.

El tercer módulo permite la distribución espacial de los productos anteriores entre los pocillos de una placa de microtitulación, por ejemplo, en una configuración 24 x 16 o 48 x 32. Este módulo permite la detección y enumeración de los productos de la LDR usando la PCR en tiempo real para proporcionar resultados cuantitativos para cada marcador de enfermedad.

El primer y el segundo módulos se pueden configurar para procesar simultáneamente múltiples muestras en el modo de ensayo de cribado, donde los productos de la LDR que contienen etiquetas de secuencia proporcionan resultados cuantitativos relativos usando lecturas de PCR en tiempo real (véase la Figura 2). En esta configuración, el ADN y el ARN aislados de diversas fracciones sanguíneas procedentes de 24 muestras individuales se someten a PCR-LDR y RT-PCR-LDR multiplexada, después se distribuyen a lo largo de una columna, por ejemplo, 16 pocillos de la placa de microtitulación que se ilustra en la Figura 3. Los conjuntos de cebadores marcadores con sondas TaqMan™ dirigidas a diana, o de forma alternativa, con sondas de cebadores UniTaq, se añaden a través de las filas como se muestra en la Figura 4, lo que permite la PCR en tiempo real (Figura 5). En esta ilustración, las muestras n.º 2 y n.º 15 tienen una señal intensa en >5 posiciones, por lo tanto, se consideran potencialmente positivas (pendientes de verificación adicional tal como se describe adicionalmente más adelante), mientras que la muestra n.º 8 con 4 señales débiles también requerirán elaboración adicional.

Los dos módulos también se pueden configurar para procesar una sola muestra, donde la multiplexación espacial permite la PCR/LDR de "píxel", donde los productos de la LDR permiten la enumeración de las moléculas diana originales. Esto es análogo a la PCR digital, pero a un nivel de multiplexación más alto (véase la Figura 6). En esta configuración, el ADN y el ARN de una sola muestra se distribuye en 24 cámaras antes de la PCR-LDR multiplexada como se muestra en la Figura 7. En esta realización, algunas cámaras tienen una molécula diana o ninguna. Tras la multiplexación, los productos de la LDR se distribuyen a lo largo de una columna, por ejemplo, 16 pocillos de la placa de microtitulación (Figura 7). Los conjuntos de cebadores marcadores con sondas TaqMan™ dirigidas a diana, o de forma alternativa, conjuntos de cebadores UniTaq, se añaden a lo largo de las filas (véase la Figura 8), lo que permite la PCR en tiempo real (véase la Figura 9). Los resultados se interpretan basándose en una distribución de Poisson del valor Ct que representa una integral múltiple de una sola molécula de la mezcla original, *es decir,* 0, 1, 2 etc. Las Figuras 29 y 30 muestran una distribución de Poisson de 6 a 48 y de 12 a 96 moléculas en 24 pocillos, respectivamente, y las Figuras 31 y 32 muestran una distribución de Poisson de 12 a 96 y de 24 a 192 moléculas en 48 pocillos, respectivamente. La Figura 9, fila A muestra (n.º de direcciones: n,º de moléculas diana iniciales) de (17:0; 6:1; 1:2), lo que corresponde a 8 moléculas. La Figura 9, fila K muestra (7:0; 10:1; 5:2; 2:4), lo que corresponde a aproximadamente 30 moléculas.

Se puede utilizar una forma diferente de dilución y distribución para enumerar moléculas en un mayor intervalo, como se ilustra para la cuantificación de miARN o ARNm, en las Figuras 10-13. En este punto, la muestra inicial se distribuye entre 8 cámaras, se diluye 10 veces y se distribuye entre 8 cámaras más, etc. (véase la Figura 11). Las muestras se someten a RT-PCR y LDR multiplexada, y los productos de la LDR se distribuyen individualmente a lo largo de una columna (Figura 11). Los conjuntos de cebadores marcadores con sondas TaqMan™ dirigidas a diana, o de forma alternativa, conjuntos de cebadores UniTaq, se añaden a lo largo de las filas (véase la Figura 12), lo que permite la PCR y la detección en tiempo real (véase la Figura 13). Para el ejemplo de las 24 cámaras, esto se puede cuantificar en 3 órdenes de magnitud, pero para 48 cámaras puede cubrir 6 órdenes de magnitud para las diferencias. Las Figuras 33-37 muestran distribuciones de Poisson de 1 a 128 moléculas en 8 pocillos. En el ejemplo ilustrado en la Figura 13, fila G, las dos primeras diluciones proporcionan una señal más alta que los últimos 8 pocillos (1:0; 3:1; 3:2; 1:4), lo que corresponde a aproximadamente 14-16 x 100 x 1,25 = 1.750 a 2.000 moléculas. En contraste, la fila N de la Figura 13 proporciona señal solamente en los primeros 8 pocillos de la distribución (4:0; 3:1; 1:2), lo que corresponde a aproximadamente 5-6 x 1,25 = 6 a 8 moléculas.

La segunda familia de diseños de ensayo se basa en una amplificación inicial por PCR o RT-PCR multiplexada seguida por distribución y captura de las dianas amplificadas por la PCR en los pocillos de una placa de microtitulación. Un único ciclo de LDR permite capturar los productos de la LDR de las dianas correctas sobre el soporte sólido, mientras que las ligaduras incorrectas se eliminan por lavado. Los productos de la LDR se cuantifican, bien mediante LDR-FRET, PCR en tiempo real u otros sistemas indicadores.

El primer módulo toma una muestra de entrada de sangre, y separa las CTC si están presentes, separa el plasma de los glóbulos rojos, y los exosomas del plasma, y después purifica (i) ADN y ARN a partir de las CTC si están presentes, (ii) el miARN y el ARN a partir de los exosomas, y (iii) el ADNlc del plasma.

El segundo módulo permite la distribución de los componentes anteriores en 24 o 48 cámaras o pocillos para multiplexado espacial con amplificación proporcional por PCR o RT-PCR multiplexada de la diana génica, promotor, regiones de miARN o ARNm. Estos incluyen: (i) regiones cromosómicas específicas para la enumeración del número de copias a partir de las CTC, (ii) ARNm específicos de variantes de corte y empalme o de fusión génica procedente de las CTC, (iii) miARN específicos procedentes de exosomas, (iv) ARNm específicos procedentes de exosomas, (v) regiones de ADN específicas de genes cancerosos procedentes de ADNlc, y (vi) regiones promotoras específicas (metiladas) procedentes de ADNlc.

El tercer módulo permite la distribución espacial de los productos anteriores a lo largo de una columna, por ejemplo, 16 pocillos de la placa de microtitulación, seguido de la captura de la diana amplificada sobre el soporte sólido, por ejemplo, en una configuración 24 x 16 o 48 x 32. Este módulo permite capturar los productos de la LDR sobre el soporte sólido, seguido por la detección y enumeración de los productos de la LDR para proporcionar resultados cuantitativos para cada marcador.

El primer y el segundo módulos se pueden configurar para procesar simultáneamente múltiples muestras en el modo de ensayo de cribado, en los productos de la LDR proporcionan resultados cuantitativos relativos, análogos a la lectura de PCR en tiempo real (véase la introducción esquemática de Figura 14). En esta configuración, el ADN y el ARN aislados de diversas fracciones sanguíneas procedentes de 24 muestras individuales se someten a LDR y RT-PCR multiplexada, después se distribuyen a lo largo de una columna, por ejemplo, 16 pocillos de la placa de microtitulación, y se captura sobre el soporte sólido (véanse la Figuras 15 y 16). Las sondas LDR se añaden a lo largo de las filas, y la ligadura sobre la diana correcta captura el producto mientras el cebador que no ha reacción se elimina por lavado (Figura 17). Los resultados de la LDR-FRET ilustrados en la Figura 18 se muestran en sus respectivos pocillos, aunque en este módulo, los productos también se pueden desnaturalizar selectivamente y enumerarse usando electroforesis capilar para proporcionar resultados cuantitativos. En esta ilustración (Figura 18), las muestras n.º 2 y 15 tienen una señal intensa en >5 posiciones, por tanto son positivos provisionales, mientras la muestra 8 con 4 señales débiles también requerirá elaboración adicional.

Los dos módulos también se pueden configurar para procesar una sola muestra, donde la multiplexación espacial permite la PCR/LDR de "píxel", en el que los productos de la LDR permiten la enumeración de las moléculas diana originales, análogo a la PCR digital, pero a un nivel de multiplexación más alto (Figura 19). En esta configuración, el ADN y el ARN de una sola muestra se distribuye en 24 cámaras antes de la PCR multiplexada (Figura 20), de forma que algunas cámaras tienen una o ninguna molécula diana. Los amplicones se distribuyen a lo largo de una columna, por ejemplo, 16 pocillos de la placa de microtitulación, y se captura sobre el soporte sólido (Figuras 20 y 21). La adición de la sonda LDR y la detección del producto de la LDR es como anteriormente (Figuras 22 y 23). Los resultados se interpretan basándose en una distribución de Poisson del valor LDR que representa una integral múltiple de una sola molécula de la mezcla original, es decir, 0, 1, 2 etc. Las Figuras 29 y 30 muestran la distribución de Poisson de 6-48 y 12-96 moléculas en 24 pocillos, respectivamente, y las Figuras 31 y 32 muestran la distribución de Poisson de 12-96 y 24-192 moléculas en 48 pocillos, respectivamente. La Figura 23, fila A muestra (n.º de direcciones: n,º de moléculas diana iniciales) de (17:0; 6:1; 1:2), lo que corresponde a 8 moléculas. La Figura 23, fila K muestra (7:0; 10:1; 5:2; 2:4), lo que corresponde a aproximadamente 30 moléculas.

Se puede utilizar una forma diferente de dilución y distribución para enumerar moléculas en un mayor intervalo, como se ilustra para la cuantificación de miARN o ARNm, en las Figuras 24-28. En este punto, la muestra inicial se distribuye entre 8 cámaras, se diluye 10 veces y se distribuye entre 8 cámaras más, etc. (Figura 25). Las muestras se someten a RT-PCR y LDR multiplexada y se distribuyen a lo largo de una columna. Los productos de la RT-PCR se capturan sobre un soporte sólido (Figura 26) y el conjunto de cebadores LDR se añade a lo largo de las filas (véase la Figura 27). Para el ejemplo de las 24 cámaras, esto se puede cuantificar en 3 órdenes de magnitud, pero para 48 cámaras puede cubrir 6 órdenes de magnitud para las diferencias (véanse las distribuciones de Poisson de las Figuras 33-37). En el ejemplo ilustrado en la Figura 28, fila G, las dos primeras diluciones proporcionan una señal más alta que los últimos 8 pocillos (1:0; 3:1; 3:2; 1:4), lo que corresponde a aproximadamente 14-16 x 100 x 1,25 = 1.750 a 2.000 moléculas. En contraste, la Figura 28, fila N proporciona señal solamente en los primeros 8 pocillos de la distribución (4:0; 3:1; 1:2), lo que corresponde a aproximadamente 5-6 x 1,25 = 6 a 8 moléculas.

Falsos positivos y protección contra arrastres

Existe un desafío técnico para distinguir entre una señal verdadera generada a partir de las diferencias deseadas de los ácidos nucleicos específicos de enfermedad y una señal falsa generada a partir de los ácidos nucleicos normales presentes en la muestra y de la señal falsa generada en ausencia de diferencias de ácidos nucleicos específicos de enfermedad (es decir, mutaciones somáticas).

Se presentan a continuación numerosas soluciones a estos desafíos, pero comparten algunos temas comunes.

El primer tema es el multiplexado. La PCR funciona mejor cuando la concentración de cebadores es relativamente alta, de 50 nM a 500 nM, lo que limita el multiplexado. Además, cuántos más pares de cebadores PCR se añaden, las posibilidades de amplificar productos incorrectos o de crear dímeros de cebadores aumenta exponencialmente. En contraste, para las sondas de LDR, se utilizan concentraciones bajas de aproximadamente 4 nM a 20 nM y los dímeros de cebadores quedan limitados por el requisito de hibridación adyacente sobre la diana para permitir un evento de ligadura. El uso de bajas concentraciones de cebadores específicos de la PCR o sondas de LDR que contienen "colas" de secuencias de cebadores universales permite la adición posterior de concentraciones más elevadas de cebadores universales para conseguir la amplificación proporcionar de los productos de la PCR o LDR iniciales. Otra forma de evitar o minimizar falsos amplicones de la PCR o dímeros de cebadores es utilizar cebadores de PCR que contengan unas pocas bases adicionales y un grupo bloqueante, que se libera para formar un 3'OH libre por escisión con una nucleasa solamente cuando se hibridan con la diana, por ejemplo, una base de ribonucleótido como el grupo

bloqueante y la ARNasa H2 como la nucleasa de escisión.

El segundo tema es la fluctuación de la señal debido a la baja cantidad inicial de los ácidos nucleicos diana. A menudo, el ácido nucleico diana originado en unas pocas células, bien capturado como CTC o procedente de células tumorales que han experimentado apoptosis y han liberado su ADN en forma de fragmentos pequeños (140 - 160 pb) en el suero. En dichas condiciones, es preferible realizar cierto nivel de amplificación proporcional para evitar que se pierda la señal en su conjunto o notificar un número de copias inadecuado debido a fluctuaciones cuando se distribuyen pequeñas cantidades de moléculas de partida en pocillos individuales (para cuantificación de la PCR en tiempo real o en gotículas). Siempre que estas amplificaciones universales iniciales se mantengan a un nivel razonable (aproximadamente de 12 a 20 ciclos), se minimiza el riesgo de contaminación por arrastre durante la apertura del tubo y la distribución de los amplicones para la posterior detección/cuantificación (usando la PCR en tiempo real o en gotículas).

El tercer tema es la señal independiente de la diana, también conocido como "Sin control de molde" (NTC). Esto surge de las reacciones tanto de la polimerasa como de la ligasa que se producen en ausencia de la diana correcta. Parte de esta señal se puede minimizar mediante un diseño de cebadores razonable. Para las reacciones de ligadura, la actividad nucleasa 5'→ 3' de la polimerasa se puede utilizar para liberar el fosfato 5' del cebador de ligadura en dirección 3' (solamente cuando se hibrida con la diana), de forma que sea adecuado para la ligadura. Se puede conseguir una especificidad adicional para distinguir la presencia de una mutación de bajo nivel mediante: (i) uso de sondas LDR en dirección 5' que contienen un emparejamiento incorrecto en la 2ª o 3ª posición desde el 3'OH, (ii) uso de sondas LDR para la secuencia natural que (opcionalmente) se ligan pero no experimentan amplificación adicional, y (iii) uso de sondas LDR en dirección 5' que contienen unas pocas bases adicionales y un grupo bloqueante, que se libera para formar un 3'OH libre por escisión con una nucleasa solamente cuando se hibridan con la diana complementaria (por ejemplo, ARNasa H2 y una base de ribonucleótido).

El cuarto tema es bien suprimir (reducir) la amplificación o la amplificación incorrecta (falsa) debido a cebadores no utilizados en la reacción. Un enfoque para eliminar dichos cebadores no utilizados es capturar el ADN genómico o diana o diana amplificada en un soporte sólido, permite sondas de ligadura para hibridar y ligar, y después eliminar las sondas o los productos que no se hayan hibridado. Las soluciones alternativas incluyen la preamplificación, seguido por etapas posteriores de LDR y/o PCR anidada, de forma que haya un segundo nivel de selección en el proceso.

El quinto tema es la prevención del arrastre. La señal de arrastre se puede eliminar mediante incorporación de uracilo normal durante la etapa de amplificación universal, y el uso de UDG (y, opcionalmente, de la endonucleasa AP) en el procedimiento de elaboración durante la preamplificación. La incorporación de la prevención de arrastres es fundamental para los métodos de la presente invención, como se describe con mayor detalle a continuación. La amplificación por PCR inicial se realiza usando la incorporación de uracilo. La reacción de la LDR se realiza con sondas LDR que carecen de uracilo. Por lo tanto, cuando los productos de la LDR se someten a cuantificación mediante la PCR en tiempo real, la adición de UDG destruye los productos de la PCR iniciales, pero no los productos de la LDR. Además, puesto que la LDR es un proceso lineal, y que los cebadores marcadores utilizan secuencias ausentes del genoma humano, el arrastre accidental de los productos de la LDR de nuevo hacia la PCR original no producirá amplificación independiente del molde. Los esquemas adicionales para proporcionar prevención de arrastres con dianas metiladas incluyen el uso de endonucleasas de restricción antes de la amplificación, o después del tratamiento con bisulfito si se utiliza este último enfoque, como se describe más adelante.

Métodos para identificar marcadores de enfermedades

Un primer aspecto de la presente divulgación se dirige a un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra, o de otras muestras, mediante uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen la secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados, y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la muestra. Se proporcionan uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios (a) un primer cebador de oligonuclótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia adyacente a la secuencia de nucleótidos diana, y (b) un segundo cebador de oligonuclótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una parte de un producto de extensión formado a partir del primer cebador de oligonuclótidos primario. La muestra puesta en contacto se combina con el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, y la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa se someta a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando así productos de extensión primarios que comprenden la secuencia de nucleótidos diana o un complemento de la misma. El método implica además combinar los productos de extensión primaria con una ligasa y

uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura. Cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótido que tiene un porción específica de la secuencia de nucleótidos diana, y (b) una segunda sonda de oligonucleótido que tiene un porción específica de la secuencia de nucleótidos diana, en el que la primera y segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configura para hibridarse, de forma específica de la base, adyacente entre sí a una secuencia de nucleótidos diana complementaria de un producto de extensión primario con una unión entre las mismas. Las primera y segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de producto ligadas en la mezcla de la reacción de ligadura, y las secuencias de producto ligadas de las muestras se detectan y se distinguen para identificar la presencia de una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen secuencias de nucleótidos diana que difieren de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados.

Las Figuras 38-44 ilustran diversas realizaciones de este aspecto de la presente divulgación.

La Figura 38 (etapas A-F) ilustra una reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones en ADN genómico o ADNlc. Este método comienza aislando el ADN genómico o el ADN exento de células (ADNlc) como se muestra en la etapa A. Como se muestra en la Figura 38 (etapa B), la muestra de ADN se trata con una enzima que puede digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) que pueden estar presentes en la muestra. Las enzimas adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, uracilo ADN glicosilasa (UDG) de *E. coli*, UDG antártica termolábil, o uracilo ADN glicosilasa humana monofuncional selectiva para la versión monocatenaria (hSMUG1). A continuación, la muestra se somete a una reacción de amplificación, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las regiones de interés que contienen mutaciones. La reacción de amplificación se lleva acabo usando cebadores específicos de locus y una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. En una realización, se llevan a cabo ciclos de amplificación limitados (12-20 ciclos) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones que se producen. En otra realización, las regiones de interés se amplifican utilizan 20-40 ciclos. Los productos amplificados contienen dU como se muestra en la Figura 38, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre.

Como se muestra en la Figura 38 etapa D, sondas de oligonucleótidos específicas de diana se hibridan con los productos amplificados y la ligasa (círculo sólido) une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí cuando se hibridan con su secuencia complementaria. La sonda de oligonucleótidos en dirección 5' contiene una porción específica de cebador en 5' (Ai) y la sonda de oligonucleótidos en dirección 3' contiene una porción específica de cebador en 3' (Ci') que permite la posterior amplificación del producto de ligadura. Tras la ligadura, los productos de ligadura se distribuyen mediante alícuotas en pocillos separados que contienen uno o más pares de cebadores específicos de la marca, comprendiendo cada par los cebadores emparejados Ai y Ci, tratados con UDG o enzima similar para eliminar los productos de amplificación que contienen dU o contaminantes, se amplifican mediante la PCR, y se detectan. Como se muestra en las Figuras 38, etapas E & F, la detección del producto de ligadura se puede llevar a cabo usando tradicional ensayo de detección TaqMan™ *(*véase la patente de Estados Unidos n.º 6.270.967 de Whitcombe et al., y la patente de Estados Unidos n.º 7.601.821 de Anderson et al.). Para detección usando TaqMan™ se utiliza una sonda de oligonucleótidos que amplían la unión de ligadura junto con cebadores adecuados para hibridarse sobre las partes específicas de cebadores de los productos de ligadura para su amplificación y detección. La sonda TaqMan™ contiene un grupo indicador fluorescente en un extremo (F1) y una molécula inactivadora (Q) en el otro extremo, que están lo suficientemente cerca entre sí en la sonda intacta para que la molécula inactivadora inactive la fluorescencia del grupo indicador. Durante la amplificación, la sonda TaqMan™ y el cebador en dirección 5' se hibridan con sus regiones complementarias del producto de ligadura. La actividad nuclease 5'→ 3' de la polimerasa extiende el cebador hibridado y libera el grupo fluorescente de la sonda TaqMan™ para generar una señal detectable (Figura 38, etapa F). El uso de dUTP durante la reacción de amplificación genera productos que contienen dU, que posteriormente se pueden destruir usando UDG para prevención de arrastres.

La Figura 39 ilustra una reacción de PCR-qLDR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones en ADN genómico o ADNlc. Este método comienza aislando el ADN genómico o el ADN exento de células (ADNlc) como se muestra en la etapa A. Como se muestra en la Figura 39, etapa B, la muestra de ADN se trata con una enzima que digiere el desoxiuracilo (dU), tal como UDG, para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra, y después se somete a una reacción de amplificación, por ejemplo, una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las regiones de interés que contienen mutaciones. La reacción de amplificación se lleva acabo usando cebadores específicos de locus y una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. En una realización, se llevan a cabo ciclos de amplificación limitados (12-20 ciclos) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones que se producen. En otra realización, las regiones de interés se amplifican utilizan 20-40 ciclos. En esta realización, los cebadores específicos de locus también contienen regiones cebadoras en 5', por ejemplo, regiones cebadoras universales, que permiten una amplificación por PCR universal posterior utilizando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés (Figura 39, etapa B).

Como se muestra en la Figura 39, etapa C, los productos de amplificación incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres, y se capturan sobre un soporte sólido mediante el resto de biotina agregado en 5'. La mutación de interés

se detecta usando sondas de ligadura específicas de la mutación, como se ilustra en la Figura 39, etapa D. En esta realización, la primera sonda de ligadura contiene una región específica de la diana en 3' y una secuencia de cola en 5' con un resto donante o aceptor, y la segunda sonda de ligadura de un conjunto de cebadores contiene una región específica de la diana en 5' y una secuencia de cola en 3' con un resto donando o aceptor, respectivamente. Las secuencias de cola en 5' y 3' de las sondas de ligadura de un conjunto de sondas son complementarias entre sí, los grupos aceptor y donante pueden generar una señal detectable mediante transferencia de energía por resonancia de Forster (FRET) cuando quedan muy cerca uno de otro. Tras la ligadura, las sondas de oligonucleótidos no ligadas se eliminan por lavado, y el producto de ligadura se desnaturaliza a partir de los productos de amplificación inmovilizados. Tras la desnaturalización (Figura 39, etapa E), las secuencias de cola complementarias en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo los grupos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable.

Los productos de ligadura formados de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación se pueden distinguir usando una alternativa a la detección FRET. Por ejemplo, la sonda en dirección 5' puede contener un grupo indicador fluorescente en el extremo 5' seguido por la porción de secuencia de la cola, un grupo inactivador (por ejemplo, ZEN), y la porción específica de diana como se muestra en la Figura 39, etapa F. En la forma monocatenaria, el grupo fluorescente se inactiva mediante el grupo Zen. Después del ligamiento en dirección 5' y 3' de las sondas de ligamiento y de la desnaturalización del producto de ligamiento resultante, las porciones de cola en 5' y 3' complementarias del producto de ligadura se hibridan para formar una porción bicatenaria corta. En esta formación, el grupo indicador ya no queda inactivado por el grupo inactivador y se produce una señal detectable.

La Figura 39 ilustra un enfoque de superficie revestida con estreptavidina-cebador universal biotinilado para capturar productos de extensión sobre un soporte sólido. Dicha captura puede producirse antes o después de la etapa de ligadura. Otros enfoques para unir el producto al soporte sólido incluyen la unión covalente entre una parte o la mayoría del cebador universal y el soporte sólido antes de la amplificación mediante PCR.

Además de capturar los productos de extensión de la polimerasa usando biotina-estreptavidina, los cebadores se pueden diseñar para incluir una secuencia de captura en el extremo 5', un grupo bloqueante de la extensión mediante polimerasa, y una porción universal o específica de diana en el extremo 3'. Después de la amplificación, la porción de secuencia de captura en 5' de los productos será monocatenaria, y si se trata de una secuencia larga y/o rica en GC, se puede capturar sobre una secuencia complementaria en condiciones que permiten la desnaturalización de la hebra no capturada, o su eliminación por escisión, por ejemplo, escisión mediante la exonucleasa lambda. La etapa de captura se puede mejorar mediante el uso de PNA, LNA u otros análogos de nucleótidos dentro del cebador, secuencia de sonda de captura o ambos.

En otra realización, el cebador puede estar unido covalentemente a la superficie sólida usando dibenzociclooctilo (DBCO) para química de clic exenta de cobre (a una azida); 5-octadiinil dU para química de clic (a una azida); aminomodificador C6 dT (para unión peptídica); o azida, para química de clic a un alqueno o DBCO.

La Figura 40 (etapas A-F) ilustra otra reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 40, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra. En esta realización, la amplificación inicial se lleva a cabo usando cebadores PCR específicos de locus que contienen un grupo bloqueante escindible en sus extremos 3'. El grupo bloqueante evita la extensión de polimerasa no específica de la diana, y la amplificación. Como se muestra en la Figura 40, etapa B, un grupo bloqueante adecuado es una base de ARN (r) que se escinde mediante ARNasa-H (símbolo de estrella) solamente después de la hibridación del cebador con su secuencia de complementaria (véase, por ejemplo, Dobosy et. al. "RNase H-Dependent PCR (rhPCR): Improved Specificity and Single Nucleotide Polymorphism Detection Using Blocked Cleavable Primers", BMC Biotechnology 11(80): 1011 (2011)). La escisión de la base de ARN libera un 3'OH adecuado para su extensión mediante la polimerasa.

Tras la escisión de los grupos bloqueantes del cebador, la región de interés se amplifica, y el producto de la PCR que contiene dU permite la prevención de arrastre (Figura 40, etapa C). Las sondas de oligonucleótidos específicas de diana que contienen los cebadores marcados (Ai y Ci') se hibridan después con los productos amplificados de forma específica de la base, y la ligasa (círculo sólido) une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí cuando se hibridan con su secuencia complementaria (Figura 40, etapa D). Los productos de ligadura se detectan usando pares de cebadores emparejados Ai y Ci y sondas TaqMan™ que amplían la unión de ligadura como se describe en la Figura 38 (véase la Figura 40, etapas E-F).

La Figura 41 (etapas A-F) ilustra otra reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 41, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra (Figura 41, etapa B). La región de interés se amplifica usando cebadores específicos de locus y una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. En una realización, se llevan a cabo ciclos de amplificación limitados (12-20 ciclos) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones que se producen. En otra realización, las regiones de interés se amplifican utilizan 20-40 ciclos. Los productos amplificados contienen dU como se muestra

en la Figura 41, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre.

Como se muestra en la Figura 41 etapa D, sondas de oligonucleótidos específicas de diana se hibridan con los productos amplificados y la ligasa (círculo sólido) une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí cuando se hibridan con su secuencia complementaria. En esta realización, la sonda de oligonucleótidos en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la mutación de interés contiene ademas una porción específica de cebador en 5' (Ai) para facilitar la posterior detección del producto de ligadura, mientras que la sonda de oligonucleótidos en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la secuencia de ácidos nucleicos natural (no mutada) no contiene una porción específica de cebador en 5'. La sonda de oligonucleótidos en dirección 3', que tiene una secuencia común a las secuencias tanto natural como mutante contiene una porción específica de cebador en 3' (Ci') que, junto con la porción específica de cebador en 5' (Ai) de la sonda en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la mutación, permite la posterior amplificación y detección solamente de los productos mutantes ligados. Como se ilustra en la etapa D de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, -la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 41, etapa D). Tras la ligadura, los productos de ligadura se pueden detectar usando pares de cebadores emparejados Ai y Ci y sondas TaqMan™ que amplían la unión de ligadura como se describe en la Figura 38 (véase la Figura 41, etapas E-G), o mediante el uso de otros medios adecuados conocidos en la técnica.

La Figura 42 ilustra otra reacción de PCR-qLDR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 42, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra (Figura 42, etapa B). La región de interés se amplifica usando cebadores específicos de locus y una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. En esta realización, los cebadores específicos de locus también contienen regiones cebadoras en 5', por ejemplo, regiones cebadoras universales. Dichas secuencias permiten una amplificación por PCR universal posterior utilizando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés (Figura 42, etapa B). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la mutación de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la mutación, como se ilustra en la Figura 42, etapa D. En esta realización, las sondas de ligadura de un par de ligadura que puede detectar la secuenciación del ácido nucleico mutante (pero no la secuencia natural) contiene secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba para la Figura 39. Como se ilustra en la etapa D de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3', (por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, -la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 42, etapa D). Tras la ligadura (Figura 42, etapa E), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 42, etapa F).

La Figura 43 ilustra otra reacción de PCR-qLDR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 43, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra (Figura 43, etapa B). La región de interés se amplifica usando cebadores específicos de locus y una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. En esta realización, los cebadores específicos de locus también contienen regiones cebadoras en 5', por ejemplo, regiones cebadoras universales. Estas regiones permiten una amplificación por PCR universal posterior utilizando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés (Figura 43, etapa B). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la mutación de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la mutación, como se ilustra en la Figura 43, etapa D. En esta realización, las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se diseñan de forma que la base más en dirección 3' de la primera sonda de oligonucleótidos está solapada por la base más en dirección 5' inmediatamente flanqueante de la segunda sonda de oligonucleótidos que es complementaria de la molécula de ácidos nucleicos diana como se muestra en la Figura 43, etapa D. El oligonucleótido solapante se denomina como "aleta". Cuando el oligonucleótido solapante de aleta de la segunda sonda de oligonucleótidos es complementario de la secuencia de la molécula de ácidos nucleicos diana y la misma secuencia que el nucleótido final en 3' de la primera sonda de oligonucleótidos, el enlace fosfodiéster inmediatamente en dirección 5' respecto del nucleótido de solapa de la segunda sonda de oligonucleótidos se escinde de forma discriminante por una enzima que tiene una endonucleasa de aleta (FEN) o actividad nucleasa en 5' (por ejemplo la endonucleasa 5'-3' de la polimerasa Taq). Esta actividad específica de FEN produce un extremo 5' fosfato competente para la ligadura en la segunda sonda de oligonucleótidos que está precisamente colocado a lo largo del 3' OH adyacente de la primera sonda de oligonucleótidos. Como consecuencia de (a) hibridación específica de diana mediante sondas de oligonucleótidos adyacentes entre sí, (b) generación selectiva de 5' fosfatos solamente cuando el nucleótido de aleta escindido se corresponde con el molde, y (c) adición de una ligasa que discrimina contra el emparejamiento de no de Watson-Crick para la base en 3' de la primera sonda de oligonucleótidos, se consigue una especificidad y sensibilidad de detección de dianas muy elevada. De acuerdo con esta realización, las sondas de oligonucleótidos para ligadura también contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar

una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba para la Figura 39. Tras la ligadura (Figura 43, etapa E), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 43, etapa F).

La Figura 44 ilustra otra reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 44, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra (Figura 44, etapa B). La región de interés se amplifica usando cebadores específicos de locus y una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. En esta realización, las sondas de ligadura se diseñan para contener el cebador UniTaq y las secuencias marcadoras para facilitar las detecciones. El sistema UniTaq se describe completamente en la publicación de la solicitud estadounidense con número 2011/0212846 de Spier. El sistema UniTaq implica el uso de tres únicas secuencias "marcadoras", donde al menos una de las secuencias marcadoras únicas (Ai) está presente en la primera sonda de oligonucleótidos, y la segunda y tercera porciones marcadoras únicas (Bi' y Ci') están en la secuencia de la segunda sonda de oligonucleótidos como se muestra en la Figura 44, etapa D. Tras ligadura de las sondas de oligonucleótidos en un conjunto de sondas, el producto de ligadura resultante contendrá las secuencias específicas de diana de la secuencia Ai-secuencia Bi'-secuencia Ci'. La esencia del enfoque UniTaq es que ambas sondas de oligonucleótidos de una sonda de ligadura deben ser correctas para obtener una señal positiva, lo que permite una detección de ácidos nucleicos fuertemente multiplexada. Por ejemplo, y como se describe en el presente documento, esto se consigue exigiendo la hibridación de dos partes, es decir, dos de las marcas, entre sí.

Antes de detectar el producto de ligadura, la muestra se trata con UDG para destruir los amplicones diana originales, permitiendo solamente que se detecten los auténticos productos de ligadura. Para la detección, el producto de ligadura que contiene Ai (una primera porción específica de cebador), Bi' (una porción de detección UniTaq) y Ci' (una segunda porción específica de cebador) se ceba sobre ambas hebras usando un primer cebador de oligonucleótidos que tiene la misma secuencia de nucleótidos que Ai, y un segundo cebador de oligonucleótidos que es complementario de Ci' (es decir, Ci). El primer cebador de oligonucleótidos también incluye una sonda de detección UniTaq (Bi) que tiene una etiqueta F1 detectable en un extremo y una molécula inactivadora (Q) en el otro extremo (F1-Bi-Q-Ai). Opcionalmente situada cerca del inactivador hay una unidad de bloqueo de la polimerasa, por ejemplo, HEG, THF, Sp-18, ZEN o cualquier otro bloqueante conocido en la técnica que sea suficiente para detener la extensión de la polimerasa. La amplificación por PCR da como resultado la formación de productos bicatenarios, como se muestra en la Figura 44, etapa F). En este ejemplo, una unidad de bloqueo de la polimerasa evita que la polimerasa copie la parte 5' (Bi) del primer cebador universal, de forma que la hebra inferior del producto no puede formar una horquilla cuando se convierte en monocatenario. La formación de dicha horquilla daría como resultado la hibridación del extremo 3' del tallo con el amplicón, de forma que la extensión mediante polimerasa de este extremo 3' finalizaría la reacción de la PCR.

Los productos de la PCR bicatenarios se desnaturalizan, y cuando la temperatura se disminuye posteriormente, la hebra superior del producto forma una horquilla que tiene un tallo entre la porción 5' (Bi) del primer cebador de oligonucleótidos y la porción Bi' en el extremo opuesto de la hebra (Figura 44, etapa G). También durante esta etapa, el segundo cebador de oligonucleótidos se hibrida con la porción específica de cebador en 5' (Ci') del producto en horquilla. Tras la extensión del segundo cebador universal en la etapa G, la actividad nucleasa en 5' de la polimerasa escinde la etiqueta detectable D1 o la molécula inactivadora del extremo 5' del amplicón, aumentando de esta forma la distancia entre la etiqueta y el inactivador y permitiendo la detección de la etiqueta.

La Figura 145 (etapas A-F) ilustra otra reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones de bajo nivel. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 145, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra (Figura 145, etapa B). La región de interés se amplifica selectivamente usando cebadores selectivos de mutación en dirección 5', cebadores específicos de locus en dirección 3', y una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. Como se ilustra en la de esta Figura, se puede incorporar otra capa de selectividad al método al incluir un grupo bloqueante escindible 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN específica de mutación (mr), en el cebador específico de la mutación en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH adecuado para la extensión mediante polimerasa (Figura 145, etapa D). La ARNasa H escinde preferentemente la base de ARN cuando esta se corresponde perfectamente con el ADN mutante, pero será menos probable que escinda la base de ARN cuando se hibrida con el ADN natural. Una vez que se ha producido la reacción de escisión, la polimerasa extiende fielmente el 3'OH liberado y copia la base mutante o natural de la diana. Por lo tanto, a diferencia de la PCR específica de alelo, el cebador de la PCR no propaga una mutación derivada del cebador. En cambio, al copiar la base mediante ciclos repetidos de hibridación, escisión, elongación y desnaturalización, esta PCR amplifica selectivamente la diana mutante respecto de la diana natural en cada ciclo de amplificación. Los cebadores opcionales con la secuencia natural carecen de la base de ARN y quedan bloqueados, reduciendo adicionalmente la amplificación de la secuencia natural. Opcionalmente, se distribuye por alícuotas en los 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos amplificados contienen dU como se muestra en la Figura 145, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre.

Como se muestra en la Figura 145 etapa D, sondas de oligonucleótidos específicas de diana se hibridan con los productos amplificados y la ligasa (círculo sólido) une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí cuando se hibridan con su secuencia complementaria. En esta realización, la sonda de oligonucleótidos en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la mutación de interés contiene ademas una porción específica de cebador en 5' (Ai) para facilitar la posterior detección del producto de ligadura, mientras que la sonda de oligonucleótidos en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la secuencia de ácidos nucleicos natural (no mutada) no contiene una porción específica de cebador en 5'. La sonda de oligonucleótidos en dirección 3', que tiene una secuencia común a las secuencias tanto natural como mutante contiene una porción específica de cebador en 3' (Ci') que, junto con la porción específica de cebador en 5' (Ai) de la sonda en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la mutación, permite la posterior amplificación y detección solamente de los productos mutantes ligados. Como se ilustra en la etapa D de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, -la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 145, etapa D). Tras la ligadura, los productos de ligadura se pueden detectar usando pares de cebadores emparejados Ai y Ci y sondas TaqMan™ que amplían la unión de ligadura como se describe en la Figura 38 (véase la Figura 145, etapas E-G), o mediante el uso de otros medios adecuados conocidos en la técnica.

La Figura 146 (etapas A-F) ilustra otra reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones de bajo nivel. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 146, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra (Figura 146, etapa B). La región de interés se amplifica selectivamente usando cebadores selectivos de mutación en dirección 5', cebadores específicos de locus en dirección 3', y una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. Como se ilustra en la de esta Figura, se puede incorporar otra capa de selectividad al método al incluir un grupo bloqueante escindible 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN específica de mutación (mr), en el cebador específico de la mutación en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH adecuado para la extensión mediante polimerasa (Figura 146, etapa D). La ARNasa H escinde preferentemente la base de ARN cuando esta se corresponde perfectamente con el ADN mutante, pero será menos probable que escinda la base de ARN cuando se hibrida con el ADN natural. Una vez que se ha producido la reacción de escisión, la polimerasa extiende fielmente el 3'OH liberado y copia la base mutante o natural de la diana. Por lo tanto, a diferencia de la PCR específica de alelo, el cebador de la PCR no propaga una mutación derivada del cebador. En cambio, al copiar la base mediante ciclos repetidos de hibridación, escisión, elongación y desnaturalización, esta PCR amplifica selectivamente la diana mutante respecto de la diana natural en cada ciclo de amplificación. Los cebadores opcionales con la secuencia natural carecen de la base de ARN y quedan bloqueados, reduciendo adicionalmente la amplificación de la secuencia natural. Opcionalmente, se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos amplificados contienen dU como se muestra en la Figura 146, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre.

Como se muestra en la Figura 146 etapa D, sondas de oligonucleótidos específicas de diana se hibridan con los productos amplificados y la ligasa (círculo sólido) une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí cuando se hibridan con su secuencia complementaria. En esta realización, la sonda de oligonucleótidos en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la mutación de interés contiene ademas una porción específica de cebador en 5' (Ai) para facilitar la posterior detección del producto de ligadura, mientras que la sonda de oligonucleótidos en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la secuencia de ácidos nucleicos natural (no mutada) no contiene una porción específica de cebador en 5'. La sonda de oligonucleótidos en dirección 3', que tiene una secuencia común a las secuencias tanto natural como mutante contiene una porción específica de cebador en 3' (Bi'-Ci') que, junto con la porción específica de cebador en 5' (Ai) de la sonda en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la mutación, permite la posterior amplificación y detección solamente de los productos mutantes ligados. Como se ilustra en la etapa D de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, -la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 146, etapa D). Tras la ligadura, los productos de ligadura se amplifican usando cebadores específicos UniTaq (es decir, F1-Bi-Q-Ai, Ci) y se detectan como se ha descrito más arriba para la Figura 44 (véase la Figura 146, etapas E-H) o usando otros medios adecuados conocidos en la técnica.

La Figura 147 ilustra otra reacción de PCR-qLDR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones de bajo nivel. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 147, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra (Figura 147, etapa B). La región de interés se amplifica selectivamente usando cebadores selectivos de mutación en dirección 5', cebadores específicos de locus en dirección 3', y una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. Como se ilustra en la etapa B de esta Figura, se puede incorporar otra capa de selectividad al método al incluir un grupo bloqueante escindible 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN específica de mutación (mr), en el cebador específico de la mutación en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH adecuado para la extensión mediante

polimerasa (Figura 147, etapa D). La ARNasa H escinde preferentemente la base de ARN cuando esta se corresponde perfectamente con el ADN mutante, pero será menos probable que escinda la base de ARN cuando se hibrida con el ADN natural. Una vez que se ha producido la reacción de escisión, la polimerasa extiende fielmente el 3'OH liberado y copia la base mutante o natural de la diana. Por lo tanto, a diferencia de la PCR específica de alelo, el cebador de la PCR no propaga una mutación derivada del cebador. En cambio, al copiar la base mediante ciclos repetidos de hibridación, escisión, elongación y desnaturalización, esta PCR amplifica selectivamente la diana mutante respecto de la diana natural en cada ciclo de amplificación. Los cebadores opcionales con la secuencia natural carecen de la base de ARN y quedan bloqueados, reduciendo adicionalmente la amplificación de la secuencia natural. En esta realización, los cebadores específicos de locus en dirección 3' también contienen regiones cebadoras en 5', por ejemplo, regiones cebadoras universales, esto permite la amplificación por PCR universal utilizando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés (Figura 146, etapa B). Opcionalmente, se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la mutación de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la mutación, como se ilustra en la Figura 147, etapa D. En esta realización, las sondas de ligadura de un par de ligadura que puede detectar la secuenciación del ácido nucleico mutante (pero no la secuencia natural) contiene secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba para la Figura 39. Como se ilustra en la de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3', (por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, -la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 147, etapa D). Tras la ligadura (Figura 147, etapa E), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 147, etapa F).

La Figura 148 (etapas A-F) ilustra otra reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones de bajo nivel. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 148, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra (Figura 148, etapa B). La región de interés se amplifica selectivamente usando cebadores específicos de locus en dirección 5', cebadores específicos de locus en dirección 3', una sonda LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia natural, y una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. En esta realización, se puede incorporar otra capa de selectividad al método al incluir un grupo bloqueante escindible 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en el cebador en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH que está unas pocas bases en dirección 5' respecto de la mutación, y adecuado para la extensión mediante polimerasa (Figura 148, etapa D). Una sonda LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia natural que se solapa parcialmente con el cebador de la PCR en dirección 5' competirá preferentemente por la unión a la secuencia natural con el cebador en dirección 5', pero no tanto con el ADN mutante, y esto suprime la amplificación del ADN en cada ronda de la PCR. Opcionalmente, se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos amplificados contienen dU como se muestra en la Figura 148, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre.

Como se muestra en la Figura 148 etapa D, sondas de oligonucleótidos específicas de diana se hibridan con los productos amplificados y la ligasa (círculo sólido) une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí cuando se hibridan con su secuencia complementaria. En esta realización, la sonda de oligonucleótidos en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la mutación de interés contiene ademas una porción específica de cebador en 5' (Ai) para facilitar la posterior detección del producto de ligadura. Una vez más, la presencia de la sonda LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia natural suprime la ligadura a la secuencia natural diana si está presente después del enriquecimiento de la secuencia mutante durante la etapa de amplificación mediante PCR. La sonda de oligonucleótidos en dirección 3', que tiene una secuencia común a las secuencias tanto natural como mutante contiene una porción específica de cebador en 3' (Ci') que, junto con la porción específica de cebador en 5' (Ai) de la sonda en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la mutación, permite la posterior amplificación y detección solamente de los productos mutantes ligados. Como se ilustra en la etapa D de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, -la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 148, etapa D). Tras la ligadura, los productos de ligadura se pueden detectar usando pares de cebadores emparejados Ai y Ci y sondas TaqMan™ que amplían la unión de ligadura como se ha descrito más arriba para la Figura 38 (véase la Figura 148, etapas E-G), o mediante el uso de otros medios adecuados conocidos en la técnica.

La Figura 149 (etapas A-F) ilustra otra reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones de bajo nivel. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 149, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra (Figura 149, etapa B). Los cebadores específicos de locus en dirección 5' se diseñan unas pocas bases en dirección 5' respecto de la mutación e incluyen un grupo bloqueante escindible en 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r). Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella)

elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH que es adecuado para la extensión mediante polimerasa (Figura 149, etapa D). Una sonda LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia natural que se solapa parcialmente con el cebador de la PCR en dirección 5' competirá preferentemente por la unión a la secuencia natural con el cebador en dirección 5', pero no tanto con el ADN mutante, y esto suprime la amplificación del ADN en cada ronda de la PCR. Opcionalmente, se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos amplificados contienen dU como se muestra en la Figura 148, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre.

Como se muestra en la Figura 149 etapa D, sondas de oligonucleótidos específicas de diana se hibridan con los productos amplificados y la ligasa (círculo sólido) une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí cuando se hibridan con su secuencia complementaria. En esta realización, la sonda de oligonucleótidos en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la mutación de interés contiene ademas una porción específica de cebador en 5' (Ai) para facilitar la posterior detección del producto de ligadura. Una vez más, la presencia de la sonda LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia natural suprime la ligadura a la secuencia natural diana si está presente después del enriquecimiento de la secuencia mutante durante la etapa de amplificación mediante PCR. La sonda de oligonucleótidos en dirección 3', que tiene una secuencia común a las secuencias tanto natural como mutante contiene una porción específica de cebador en 3' (Bi-Ci') que, junto con la porción específica de cebador en 5' (Ai) de la sonda en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la mutación, permite la posterior amplificación y detección solamente de los productos mutantes ligados. Como se ilustra en la etapa D de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, -la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 149, etapa D). Tras la ligadura, los productos de ligadura se amplifican usando cebadores específicos UniTaq (es decir, F1-Bi-Q-Ai, Ci) y se detectan como se ha descrito más arriba para la Figura 44 (véase la Figura 149, etapas E-H) o usando otros medios adecuados conocidos en la técnica.

La Figura 150 ilustra otra reacción de PCR-qLDR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones de bajo nivel. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 150, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra (Figura 150, etapa B). Los cebadores específicos de locus en dirección 5' se diseñan unas pocas bases en dirección 5' respecto de la mutación e incluyen un grupo bloqueante escindible en 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r). Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH que es adecuado para la extensión mediante polimerasa (Figura 150, etapa D). Una sonda LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia natural que se solapa parcialmente con el cebador de la PCR en dirección 5' competirá preferentemente por la unión a la secuencia natural con el cebador en dirección 5', pero no tanto con el ADN mutante, y esto suprime la amplificación del ADN en cada ronda de la PCR. En esta realización, los cebadores específicos de locus en dirección 3' también contienen regiones cebadoras en 5', por ejemplo, regiones cebadoras universales, esto permite la amplificación por PCR universal utilizando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés (Figura 150, etapa B). Opcionalmente, se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la mutación de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la mutación, como se ilustra en la Figura 150, etapa D. De nuevo, la presencia de la sonda LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia natural suprime la ligadura a la secuencia natural diana si está presente después del enriquecimiento de la secuencia mutante durante la etapa de amplificación mediante PCR. En esta realización, las sondas de ligadura de un par de ligadura que puede detectar la secuenciación del ácido nucleico mutante (pero no la secuencia natural) contiene secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba para la Figura 39. Como se ilustra en la de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3', (por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, -la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 150, etapa D). Tras la ligadura (Figura 150, etapa E), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 150, etapa F).

En otra realización de este aspecto de la presente divulgación, el primer cebador de oligonuclótidos primario del conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios comprende una porción 5' que tiene una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácidos nucleicos natural con la que se hibrida el cebador de oligonuclótidos primario, pero tiene uno o más emparejamientos incorrectos en la secuencia de nucleótidos respecto a una porción correspondiente de la secuencia de nucleótidos de la moléculas de ácidos nucleicos diana.

De acuerdo con esta realización, se proporciona una polimerasa que carece de actividad 5' nucleasa, 3' nucleasa y de desplazamiento de hebra. Opcionalmente, el cebador de oligonuclótidos primario también puede contener un nucleótido o análogo de oligonucleótido escindible que se escinde durante la etapa de hibridación de la PCR para liberar un extremo 3'OH en el cebador de oligonucleótidos antes de dicho tratamiento de extensión. La mezcla de la

reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa que comprende un tratamiento de desnaturalización en el que los productos de extensión de la reacción se separan entre sí, un tratamiento de hibridación en el que el primer cebador de oligonuclótidos primario se hibrida con el producto de extensión que procede del segundo cebador de oligonuclótidos primario. Los productos de extensión que proceden del segundo oligonucleótido primario pueden formar una horquilla en bucle intramolecular entre el extremo 3' y la secuencia complementaria dentro del producto de extensión, que (i) comprende un emparejamiento incorrecto en o cerca del extremo 3' que inhibe la autoextensión si se hibrida con la secuencia diana mutante o (ii) comprende un emparejamiento en el extremo 3' que potencia la autoextensión si se autohibrida con la secuencia natural diana. El segundo cebador de oligonuclótidos primario se hibrida con el producto de extensión que procede del primer cebador de oligonuclótidos primario. El producto de extensión del primer cebador primario forma una horquilla en bucle intramolecular entre la parte 5' y la secuencia complementaria dentro del producto de extensión. Durante la etapa de extensión de la PCR, el primer cebador de oligonuclótidos primario (i) se extiende preferentemente sobre el producto de extensión que comprende la secuencia diana mutante formando así preferentemente productos de extensión primarios que comprenden la secuencia de nucleótidos diana mutante o un complemento de la misma, o (ii) se inhibe de formar productos de extensión primarios que comprenden la secuencia de nucleótidos diana natural o un complemento de la misma debido a la autohibridación y autoextensión anteriores de dicha diana. El segundo cebador de oligonuclótidos primario se extiende sobre el producto de extensión independientemente de la secuencia diana, en el que la secuencia mutante se amplifica preferentemente debido a los productos de extensión primarios diferentes que proceden de la hibridación de los primeros cebadores de nucleótidos primarios con la diana o copias de la misma, dando como resultado el enriquecimiento en el producto de extensión de la secuencia mutante y de los complementos de la misma durante la reacción en cadena de la polimerasa primaria.

Las Figuras 154 y 155 ilustran la realización anteriormente descrita de este aspecto de la presente invención. Como se muestra en la Figura 154, el ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 154, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra (Figura 154, etapa B). La región de interés se amplifica selectivamente usando cebadores específicos de locus en dirección 5' que comprenden una porción 5' que tiene una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción de la secuencia de nucleótidos de la molécula de ácidos nucleicos natural con la que se hibrida el cebador de forma que el producto de extensión puede formar un bucle en horquilla. En otras palabras, la porción 5' del cebador en dirección 5' contiene una secuencia de nucleótidos que es la misma que una porción de la secuencia dentro de la hebra de ADN natural de sentido contrario o es complementaria de una porción de secuencia dentro de la hebra de ADN natural de sentido directo. La reacción de amplificación también contiene cebadores específicos de locus en dirección 3', y una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. Como se ilustra en la etapa B de esta Figura, se puede incorporar otra capa de selectividad al método al incluir un grupo bloqueante escindible 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en el cebador específico de la mutación en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH adecuado para la extensión mediante polimerasa (Figura 154, etapa D). Opcionalmente, se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos amplificados contienen dU como se muestra en la Figura 154, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre. La PCR se lleva a cabo con una polimerasa que carece de actividad 5' nucleasa, 3' nucleasa y de desplazamiento de hebra. La Figura 154, etapa D ilustra adicionalmente que, en rondas posteriores de la PCR (i) la hebra inferior natural desnaturalizada forma un bucle en horquilla con correspondencia perfecta en el extremo 3', que se extiende mediante polimerasa, (ii) la hebra inferior mutante desnaturalizada forma un bucle en horquilla con al menos una base con emparejamiento incorrecto en el extremo 3', que generalmente no se extiende mediante polimerasa, (iii) la hebra superior desnaturalizada forma un bucle en horquilla en el lado 5', que se desnaturaliza durante la etapa de extensión de la PCR a 72 °C. La Figura 154, etapa E, ilustra adicionalmente que: (i) después de la extensión del bucle en horquilla del ADN natural, la secuencia en horquilla extendida no se desnaturaliza a 72 °C y evita que el cebador en dirección 5' genere una hebra superior de longitud completa. Sin embargo, la secuencia de bucle en horquilla del ADN mutante (ii) no se extiende teniendo en cuenta la base con emparejamiento incorrecto en 3', y por tanto se desnaturaliza a 72 °C, lo que permite que el cebador en dirección 5' genere la hebra superior de longitud completa. De forma análoga, el producto de la hebra superior (iii) se desnaturaliza a 72 °C, permitiendo que la polimerasa genere una hebra inferior de longitud completa. La diferencia de preferencia por extensión de bucle en horquilla de los cebadores en dirección 5' donde el molde natural (i) y mutante (ii) dan como resultado la eliminación preferente de los productos naturales en cada ciclo de amplificación, y por tanto da como resultado la amplificación preferente del ADN mutante. La eficacia de extensión diferencial del extremo 3' para extender el bucle en horquilla cuando se hibrida con el ADN mutante vs. el ADN natural se puede potenciar adicionalmente mediante el diseño de la porción 5' del cebador en dirección 5' para que contenga un emparejamiento incorrecto con el ADN natural en la 2ª o 3ª posición respecto del extremo. El producto de extensión procedente del cebador inferior generará solamente 1 emparejamiento incorrecto en la 2ª o 3ª posición respecto del extremo 3' cuando se autohibride con la secuencia natural, que se extenderá con facilidad con la polimerasa, pero que generará 2 emparejamientos incorrectos en el extremo 3' cuando se autohibride con la secuencia mutante, que no se extenderá con la polimerasa.

Como se muestra en la Figura 154 etapa G, sondas de oligonucleótidos específicas de diana se hibridan con los productos amplificados y la ligasa (círculo sólido) une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí cuando se hibridan con su secuencia complementaria. En esta realización, la sonda de oligonucleótidos en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la mutación de interés contiene ademas una porción específica de cebador en

5' (Ai) para facilitar la posterior detección del producto de ligadura, mientras que la sonda de oligonucleótidos en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la secuencia de ácidos nucleicos natural (no mutada) no contiene una porción específica de cebador en 5'. La sonda de oligonucleótidos en dirección 3', que tiene una secuencia común a las secuencias tanto natural como mutante contiene una porción específica de cebador en 3' (Ci') que, junto con la porción específica de cebador en 5' (Ai) de la sonda en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la mutación, permite la posterior amplificación y detección solamente de los productos mutantes ligados. Como se ilustra en la etapa F de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 154, etapa H). Tras la ligadura, los productos de ligadura se pueden detectar usando pares de cebadores emparejados Ai y Ci y sondas TaqMan™ que amplían la unión de ligadura como se describe en la Figura 38 (véase la Figura 154, etapas H-J), o mediante el uso de otros medios adecuados conocidos en la técnica.

La Figura 155 ilustra otra reacción de PCR-LDR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar mutaciones. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 155, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con UDG para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU que pueden estar presentes en la muestra (Figura 155, etapa B). La región de interés se amplifica selectivamente usando (i) cebadores específicos de locus en dirección 5' que también comprenden una porción de la secuencia 5' que es complementaria de la secuencia natural de la hebra superior, lo que permite la formación de bucles en horquilla después de la extensión, (ii) cebadores específicos de locus en dirección 3', y (iii) una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. Como se ilustra en la etapa B de esta Figura, se puede incorporar otra capa de selectividad al método al incluir un grupo bloqueante escindible 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en el cebador específico de la mutación en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH adecuado para la extensión mediante polimerasa (Figura 155, etapa D). Opcionalmente, se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos amplificados contienen dU como se muestra en la Figura 155, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre. La PCR se lleva a cabo con una polimerasa que carece de actividad 5' nucleasa, 3' nucleasa y de desplazamiento de hebra. La Figura 155, etapa D ilustra adicionalmente que, en rondas posteriores de la PCR: (i) la hebra inferior natural desnaturalizada forma un bucle en horquilla con correspondencia perfecta en el extremo 3', que se extiende mediante polimerasa, (ii) la hebra inferior mutante desnaturalizada forma un bucle en horquilla con al menos una base con emparejamiento incorrecto en el extremo 3', que generalmente no se extiende mediante polimerasa, (iii) la hebra superior desnaturalizada forma un bucle en horquilla en el lado 5', que se desnaturaliza durante la etapa de extensión de la PCR a 72 °C. La Figura 155, etapa E, ilustra adicionalmente que después de la extensión del bucle en horquilla del ADN natural (i), la secuencia en horquilla extendida no se desnaturaliza a 72 °C y evita que el cebador en dirección 5' genere una hebra superior de longitud completa. Sin embargo, la secuencia de bucle en horquilla del ADN mutante (ii) no se extiende teniendo en cuenta la base con emparejamiento incorrecto en 3', y por tanto se desnaturaliza a 72 °C, lo que permite que el cebador en dirección 5' genere la hebra superior de longitud completa. De forma análoga, el producto de la hebra superior (iii) se desnaturaliza a 72 °C, permitiendo que la polimerasa genere una hebra inferior de longitud completa. La diferencia de preferencia por extensión de bucle en horquilla de los cebadores en dirección 5' donde el molde natural (i) y mutante (ii) dan como resultado la eliminación preferente de los productos naturales en cada ciclo de amplificación, y por tanto da como resultado la amplificación preferente del ADN mutante.

En esta realización, los cebadores específicos de locus en dirección 3' también contienen regiones cebadoras en 5', por ejemplo, regiones cebadoras universales, esto permite la amplificación por PCR universal utilizando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés (Figura 155, etapa B). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la mutación de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la mutación, como se ilustra en la Figura 155, etapa G. En esta realización, las sondas de ligadura de un par de ligadura que puede detectar la secuenciación del ácido nucleico mutante (pero no la secuencia natural) contiene secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba para la Figura 39. Como se ilustra en la de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3', (por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 155, etapa G). Tras la ligadura (Figura 155, etapa H), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 155, etapa I).

La reacción de ligadura utilizada en los métodos de la presente invención es bien conocida en la materia. Las ligasas adecuadas para ligar sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas entre sí (opcionalmente después de la escisión de una ribosa en 3' y grupo bloqueante de la primera sonda de oligonucleótidos, o la aleta 5' de la segunda sonda de oligonucleótidos) incluyen, sin limitación, ligasa de *Thermus aquaticus*, ligasa de *E. coli*, ADN ligasa de T4, ARN ligasa de T4, ligasa *Taq*, ligasa 9 N° y ligasa de *Pyrococcus*, o cualquier otra ligasa termoestable conocida en la técnica. De acuerdo con la presente invención, el proceso de ligadura de nucleasa de la presente invención se puede llevar a cabo utilizando un ensayo con reacción de ligadura de oligonucleótidos (OLA) (véase Landegren, et al., "A

Ligase-Mediated Gene Detection Technique", Science 241:1077-80 (1988); Landegren, et al., "DNA DiagnosticsMolecular Techniques and Automation", Science 242:229-37 (1988); y en la patente de Estados Unidos n.º 4.988.617 de Landegren, et al.), una reacción de detección de ligadura (LDR) que utiliza un conjunto de sondas de oligonucleótidos complementarias (véase, por ejemplo, el documento WO 90/17239 de Barany et al), o una reacción en cadena de ligadura (LCR) que utiliza dos conjuntos de sondas de oligonucleótidos complementarias (véase, por ejemplo, el documento WO 90/17239).

Las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas de oligonucleótidos pueden estar en la forma de ribonucleótidos, desoxinucleótidos, ribonucleótidos modificados, desoxirribonucleótidos modificados, análogos de nucleótidos peptídicos, análogos de nucleótidos peptídicos modificados, oligonucleótidos con cadena principal de fosfato-azúcar modificados, análogos de nucleótidos y mezclas de los mismos.

La etapa de hibridación en la reacción de detección de ligasa, que es preferentemente un tratamiento de hibridación térmica, discrimina entre secuencia de nucleótidos basadas en un nucleótido distintivo en las uniones de ligadura. La diferencia entre la secuencia de nucleótidos diana puede ser, por ejemplo, una diferencia en una sola base de ácido nucleico, una deleción de ácido nucleico, una inserción de ácido nucleico, o una redisposición. Dichas diferencias de secuencia que implican más de una base también se pueden detectar. Preferentemente, el conjunto de sondas de oligonucleótidos tiene sustancialmente la misma longitud por lo que se hibridan con las secuencias de nucleótidos diana en condiciones de hibridación prácticamente similares.

La discriminación de la ligasa se puede potenciar adicionalmente utilizando varias características de diseño de sondas. Por ejemplo, un emparejamiento incorrecto intencionado o análogo de nucleótido (por ejemplo, inosina, nitroindol o nitropirrol) se puede incorporar a la primera sonda de oligonucleótidos en la 2ª o 3ª desde el extremo de unión en 3' para desestabilizar ligeramente la hibridación del extremo 3' si este tiene una correspondencia perfecta en el extremo 3', pero desestabiliza significativamente la hibridación del extremo 3' si hay un emparejamiento incorrecto en el extremo 3'. Este diseño reduce las ligaduras incorrectas no apropiadas cuando las sondas mutantes se hibridan con la diana natural. Como alternativa, las bases de ARN que se escinden mediante ARNasas se pueden incorporar a las sondas de oligonucleótidos para garantizar la formación del producto dependiente del molde. Por ejemplo, Dobosy et. al. "RNase H-Dependent PCR (rhPCR): Improved Specificity and Single Nucleotide Polymorphism Detection Using Blocked Cleavable Primers", BMC Biotechnology 11(80): 1011 (2011), describe el uso de una base de ARN cerca del extremo 3' de una sonda de oligonucleótidos con el extremo 3' bloqueado, y su corte con ARNasa H2 que genera un 3'-OH que se puede extender y ligar mediante PCR. Este enfoque se puede usar para generar un 3'OH o 5'-P competentes para ligadura, o ambos, siempre que se utiliza una ligasa que pueda unirse a una base 5'-ARN.

Otras modificaciones posibles incluyen sitios abásicos, por ejemplo, un furano interno abásico u oxo-G. Estas "bases" anómalas se eliminan mediante enzimas específicas para generar sitios 3'-OH o 5'P competentes para ligadura. La endonucleasa IV, Tth EndoIV (NEB) eliminará los restos abásicos después de que los oligonucleótidos ligados se hibriden con el ácido nucleico diana, pero no los procedentes de un ADN monocatenario. De forma similar, se puede usar oxo-G con Fpg o inosina/uracilo con EndoV o timina glicol con EndoVIII.

La discriminación por ligadura también se puede potenciar usando la reacción acoplada de nucleasa-ligasa que se describe en el documento WO2013/123220 de Barany et al. En esta realización, la primera sonda de oligonucleótidos contiene un grupo 3'OH competente para ligadura mientras que la segunda sonda de oligonucleótidos contiene un extremo 5' incompetente para ligadura (es decir, una sonda de oligonucleótidos sin un 5' fosfato). Las sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas están diseñadas de forma que la base más en dirección 3' de la primera sonda de oligonucleótidos quede solapada por la base más en dirección 5' inmediatamente flanqueante de la segunda sonda de oligonucleótidos que sea complementaria de la molécula de ácidos nucleicos diana. El oligonucleótido solapante se denomina como "aleta". Cuando el oligonucleótido solapante de aleta de la segunda sonda de oligonucleótidos es complementario de la secuencia de la molécula de ácidos nucleicos diana y la misma secuencia que el nucleótido final en 3' de la primera sonda de oligonucleótidos, el enlace fosfodiéster inmediatamente en dirección 5' respecto del nucleótido de solapa de la segunda sonda de oligonucleótidos se escinde de forma discriminante por una enzima que tiene una actividad endonucleasa de aleta (FEN) o actividad nucleasa en 5'. Esta actividad específica de FEN produce un nuevo extremo 5' fosfato competente para la ligadura en la segunda sonda de oligonucleótidos que está precisamente colocado a lo largo del 3' OH adyacente de la primera sonda de oligonucleótidos para permitir que se produzca la ligadura de las dos sondas. De acuerdo con esta realización, las endonucleasas de aleta o las 5' nucleasa que son adecuadas para escindir la aleta en 5' de la segunda sonda de oligonucleótidos antes de la ligadura incluyen, aunque no de forma limitativa, polimerasas que tienen actividad 5' nucleasa tales como la ADN polimerasa de *E.coli* y las polimerasas de *Taq* y *T. thermophilus,* así como la ARNasa T4 y *Taq*Exo.

Para inserciones o deleciones, la incorporación de una base emparejada o de análogos de nucleótidos (por ejemplo, -amino-dA o 5-propinil-dC) en la primera sonda de oligonucleótidos en la 2ª o 3ª posición desde la unión mejora la estabilidad y puede mejorar la discriminación de dichas mutaciones con desplazamiento de marco respecto de las secuencias naturales. Para las inserciones, el uso de uno o más nucleótidos modificados con tiofosfato en dirección 3' desde el enlace fosfato sésil deseado de la segunda sonda de oligonucleótidos evitará la escisión inadecuada mediante la enzima 5' nucleasa cuando las sondas se hibriden con el ADN natural, y reducir de esta forma la ligadura positiva falsa sobre la diana natural. De forma análoga, para las deleciones, el uso de uno o más nucleótidos

modificados con tiofosfato en dirección 5' desde el enlace fosfato sésil deseado de la segunda sonda de oligonucleótidos evitará la escisión inadecuada mediante la enzima 5' nucleasa cuando las sondas se hibriden con el ADN natural, y reducir de esta forma la ligadura positiva falsa sobre la diana natural.

El método de la presente invención también se puede utilizar para identificar una o más secuencias de ácidos nucleicos diana que difieren de otras secuencias de ácidos nucleicos de una muestra en uno o más restos metilados. De acuerdo con este aspecto de la presente invención, el método comprende además poner en contacto la muestra con al menos una primera enzima sensible a la metilación para formar una mezcla de reacción con la enzima de restricción antes de formar una mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa. De acuerdo con este aspecto de la presente invención, el primer cebador de oligonucleótidos primario comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una región de la secuencia de nucleótidos diana que está en dirección 5' del uno o más restos metilados y el segundo cebador de oligonucleótidos primario comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que una región de la secuencia de nucleótidos diana que está en dirección 3' del uno o más restos metilados.

La primera enzima sensible a la metilación escinde las moléculas de ácidos nucleicos de la muestra que contienen uno o más restos sin metilar en al menos una secuencia de reconocimiento de la enzima sensible a la metilación. De acuerdo con esta realización, la detección implica la detección de una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen la secuencia de nucleótidos diana, donde la molécula de ácidos nucleicos contenía inicialmente uno o más restos metilados.

De acuerdo con este y todos los aspectos de la presente invención, una "enzima sensible a la metilación" es una endonucleasa que no escindirá o tiene una eficacia de escisión reducida de su secuencia de reconocimiento análoga en una molécula de ácidos nucleicos cuando la secuencia de reconocimiento contiene un resto metilado (es decir, es sensible a la presencia de un resto metilado dentro de su secuencia de reconocimiento). Una "secuencia de reconocimiento de una enzima sensible a la metilación" es la secuencia de reconocimiento análoga de una enzima sensible a la metilación. En algunas realizaciones, el resto metilado es un 5-metil-C, dentro de la secuencia CpG (es decir, 5-metil-CpG). Una lista no limittiva de enzimas de endonucleasas de restricción sensibles a enzimas que son adecuadas para su uso en los métodos de la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, AciI, HinP1I, Hpy99I, HpyCH4IV, BstUI, HpaII, HhaI, o cualquier combinación de las mismas.

El método de la presente invención puede comprender además someter la mezcla de reacción con la enzima de restricción a tratamiento con bisulfito en condiciones adecuadas para convertir los restos de citosina no metilados en restos de uracilo antes de formar una mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa. En esta realización, el primer cebador de oligonuclótidos primario del conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de nucleótidos diana tratada con bisulfito que contiene uno o más sitios de restricción metilados no escindidos, y el segundo cebador de oligonuclótidos primario del conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios proporcionado comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una porción del producto de extensión formado a partir del primer cebador de oligonucleótidos.

El método de la presente invención puede implicar además proporcionar una o más segundas enzimas sensibles a la metilación que escinden moléculas de ácidos nucleicos que contienen restos no metilados dentro de una secuencia de reconocimiento de una enzima sensible a la metilación. La al menos una segunda enzima sensible a la metilación se combina con la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa que comprende la mezcla de reacción con enzima de restricción tratada con bisulfito para formar una segunda mezcla con enzima de restricción, donde la segunda enzima sensible a la metilación escinde las moléculas de ácidos nucleicos potencialmente presentes de la muestra que contienen uno o más restos sin metilar presente en al menos una secuencia de reconocimiento de la enzima sensible a la metilación durante dicho tratamiento de hibridación.

En una realización de este aspecto de la presente invención, uno o ambos cebadores de oligonucleótidos primarios del conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios tienen una porción 3' que tiene un nucleótido o análogo nucleotídico escindible y un grupo bloqueante, de forma que el extremo 3' de dicho cebador o cebadores no es adecuado para la extensión de la polimerasa. De acuerdo con esta realización, el método implica además escindir el nucleótido o análogo nucleotídico escindible de uno o ambos cebadores de oligonucleótidos durante el tratamiento de hibridación, liberando de esta forma extremos 3'OH libres en uno o ambos cebadores de oligonucleótidos antes de dicho tratamiento de extensión.

En una realización de este aspecto de la presente invención, el método implica además proporcionar uno o más oligonucleótidos bloqueantes que pueden hibridarse con una región de la secuencia de nucleótidos diana tratada con bisulfito que contiene restos no metilados. La mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa que comprende la mezcla de reacción con enzima de restricción tratada con bisulfito se pone en contacto con el uno o más oligonucleótidos bloqueantes antes de someter la mezcla a uno o más ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa. El uno o más oligonucleótidos bloqueantes se hibridan con las secuencias de ácido nucleico diana complementarias durante dicho tratamiento de hibridación y bloquean la extensión del cebador de oligonuclótidos primario durante dicho tratamiento de extensión.

Las Figuras 45-53 ilustran varias realizaciones del método de la presente invención para detectar moléculas de ácidos

nucleicos diana que contienen uno o más restos metilados.

La primera etapa de la reacción de la reacción PCR-LDR-qPCR representada gráficamente en la Figura 45 implica el aislamiento de ADN genómico o ADNlc. Opcionalmente, el ADN metilado se puede enriquecer usando anticuerpos específicos de la metilación. A continuación, la muestra se trata con endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y/o HinPII (G^CGC) y UNG (37 °C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 45, etapa A). Como se muestra en la Figura 45, etapa B, las regiones de interés metiladas se amplifican usando PCR en presencia de dUTP usando cebadores específicos de locus. En una realización, se llevan a cabo ciclos de amplificación limitados (12-20 ciclos) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones que se producen. En otra realización, las regiones de interés se amplifican utilizan 20-40 ciclos. Los productos de PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 45, etapa C), y los productos carecen de grupos metilo, lo que proporciona protección adicional. Como se muestra en la Figura 45, etapa D, las sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la región metilada contienen porciones específicas del cebador marcador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, usando pares de cebadores marcadores Ai y Ci' y sondas TaqMan™.

Después de la reacción de ligadura, la muestra que contiene el producto de ligadura se puede distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección. El tratamiento con UDG destruye los amplicones diana originales (Figura 45, etapa E), permitiendo que solamente los auténticos productos de LDR se amplifiquen y detecten. Los productos de ligadura se detectan en esta realización mediante un ensayo de detección tradicional TaqMan™ (Figura 45, etapas E-F) como se ha descrito anteriormente.

La Figura 46 (etapas A-F) ilustra otra reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar metilación. En esta realización, el ADN genómico o ADNlc se aísla y se trata con endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y/o HinPII (G^CGC) y UNG (37 °C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 46, etapa A). Como se muestra en la Figura 46, etapa B, las regiones de interés metiladas se amplifican usando PCR en presencia de dUTP usando cebadores específicos de locus. En una realización, se llevan a cabo ciclos de amplificación limitados (12-20 ciclos) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones que se producen. En otra realización, las regiones de interés se amplifican utilizan 20-40 ciclos. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos de la PCR contienen dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 46, etapa C).

Las sondas de oligonucleótidos utilizadas en esta realización están diseñadas para contener el cebador UniTaq y las secuencias de marcadores para facilitar la detección UniTaq como se ha descrito anteriormente. En consecuencia, después de la reacción de ligadura y el tratamiento con UDG para prevención de arrastres, los productos de ligadura se amplifican usando cebadores específicos de UniTaq (es decir, F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se muestra en la Figura 46, etapas E y F, y los productos amplificados se detectan como se muestra en la Figura 46, etapa G y se describe anteriormente.

La Figura 47 ilustra otra reacción de PCR-qLDR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar metilación. En esta realización, el ADN genómico o ADNlc se aísla y se trata con endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y/o HinPII (G^CGC) y UNG (37 °C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 47, etapa A). Como se muestra en la Figura 47, etapa B, las regiones de interés metiladas se amplifican usando PCR en presencia de dUTP usando cebadores específicos de locus. En esta realización, los cebadores específicos de locus también contienen regiones cebadoras en 5', por ejemplo, regiones cebadoras universales, que permiten una amplificación por PCR universal posterior utilizando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés (Figura 47, etapa B). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la mutación de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la mutación, como se ilustra en la Figura 47, etapa D. De acuerdo con esta realización, las sondas de oligonucleótidos para ligadura contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba para la Figura 39. Tras la ligadura (Figura 47, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 47, etapa E).

La Figura 48 ilustra una reacción nucleasa-ligadura-PCR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar metilación. En esta realización, el ADN genómico o ADNlc se aísla y se trata con HaeIII (GG^CC), endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y/o HinPII (G^CGC) y UNG (37 °C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 48, etapa A). Como se muestra en la Figura 48, etapa B, un oligonucleótido en forma de horquilla que contiene la secuencia marcadora (Ai') se liga al fosfato recientemente liberado del ADN diana digerido en la hebra molde de la muestra. Como se ilustra en la Figura 48, etapa C, la muestra se trata con HinP1I y Bsh1236I a 37 °C. Las enzimas de restricción sensibles a metilo se inactivan térmicamente después cuando se activa la polimerasa Taq para la posterior amplificación por PCR usando cebadores específicos de locus que contienen la secuencia marcadora Ci. Como se ha descrito antes, los cebadores pueden contener un grupo bloqueante escindible, (por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), que se elimina antes

de la amplificación mediante tratamiento con una ARNaseH2 (símbolo de la estrella) solamente cuando el cebador está unido a la secuencia diana complementaria. El cebador no bloqueado se extiende con la polimerasa, y la actividad 5' nucleasa de la polimerasa digiere la porción 5' de la horquilla ligada para generar un producto complementario de la diana que contiene la secuencia Ci y Ai'. Los oligonucleótidos en horquilla no ligados se extienden sobre ellos mismos.

Como se muestra en la Figura 48, etapa D, las regiones de interés que contienen metilo se amplifican usando la PCR incluyendo dUTP con los cebadores marcadores Ai y Ci. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los productos de PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 48, etapa E), y los productos carecen de grupos metilo, lo que proporciona protección adicional. Los productos amplificados se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para detección TaqMan™ usando cebadores específicos de locus y una sonda TaqMan™ como se ha descrito anteriormente.

La Figura 49 ilustra una reacción nucleasa-ligadura-PCR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar metilación. Los productos de la PCR que contienen los restos de interés originalmente metilados y el dU se generaron según las etapas A-D que se han ilustrado y descrito anteriormente con respecto a Figura 48. En esta realización, se usa la posterior amplificación utilizando cebadores UniTaq y secuencias marcadoras para detectar los restos metilados de interés. Como se muestra en la etapa E de la Figura 49, los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres, se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes y se amplifican usando cebadores específicos de locus con colas Aj y Bj-Cj, así como cebadores específicos UniTaq (F1-Bj-Q-Aj y Cj). Los productos de ADN bicatenarios resultantes se muestran en la Figura 49, etapa F. Como se muestra en la Figura 49, etapa G, tras la etapa de desnaturalización, la temperatura se enfría para permitir la formación de horquillas entre Bj y Bj'. La actividad 5'→3' nucleasa de la polimerasa Taq (rombos rellenos) extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal.

La Figura 50 ilustra una reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar metilación. En esta realización, el ADN genómico o ADNlc se aísla y se trata con endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y UNG (37 °C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 50, etapa A). El ADN digerido se trata con bisulfito para convertir los restos dC no metilados en uracilo (dU) consiguiendo así el ADN bicatenario no complementario. Como se muestra en la Figura 50B, los cebadores específicos de locus se hibridan en presencia de BstU1 (CG^CG) (triángulos rellenos), que pueden escindir el ADN arrastrado que contiene restos no metilados. Los cebadores específicos de locus contienen un bloqueante escindible en su extremo 3' para prevenir la extensión no específica de diana. Una vez hibridado con su secuencia diana complementaria, el grupo bloqueante (separador C3) y una base de ARN se eliminan con ARNasaH2 (símbolo de estrella). La región de interés que contiene metilo se amplifica utilizando la PCR en presencia de dUTP. Se realizar una amplificación de ciclos limitada (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones, y opcionalmente la muestra digerida se distribuye en alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR. Como se muestra en esta realización, se puede usar un oligonucleótido bloqueante (barra negra gruesa) para limitar la amplificación del ADN natural.

Los productos amplificados contienen dU y carecen de grupos metilo, lo que permite la prevención de arrastres como se muestra en la Figura 50, etapa C. Como se muestra en la Figura 50, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la región metilada que contienen secuencias específicas del cebador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con la región diana de interés. La ligasa (círculos rellenos) sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí para formar productos de ligadura que contienen partes específicas de cebador en dirección 3' y 5' y una porción correspondiente a la región de interés metilada. Los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando pares de cebadores emparejados Ai y Ci, y sondas TaqMan™ a través de la unión de la ligadura como se muestra en la Figura 50 etapas E-F. La mezcla de muestra se trata con UDG para prevención de arrastres y eliminación de los amplicones diana originales (Figura 50, etapa E) de forma que solo los productos de LDR auténticos se amplifican y se detectan.

La Figura 51 ilustra otra reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar metilación. Los productos de la PCR que contienen los restos de interés originalmente metilados y el dU se generaron según las etapas A-C que se han ilustrado y descrito anteriormente con respecto a Figura 50. En esta realización, los oligonucleótidos de ligadura específicos de la región metilada contienen secuencias específicas de cebador para detección UniTaq (Ai y Ci') y una secuencia marcadora (Bi') para la posterior amplificación por PCR y detección. Los productos de ligadura se amplifican y detectan usando cebadores específicos de UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente (Figura 51, etapas E-G).

La Figura 52 otra reacción de PCR-qLDR con prevención de arrastre para detectar metilación. Análogamente a las realizaciones mostradas en las Figuras 50 y 51, el ADN genómico o ADNlc se aísla y se trata con endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y UNG (37 °C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 52, etapa A). El ADN digerido se trata con bisulfito para convertir los restos no metilados en uracilo consiguiendo así el ADN bicatenario no complementario. Como se muestra en la Figura 52B, los cebadores específicos de locus que contienen un grupo bloqueante escindible en 3' se

hibridan en presencia de BstU1 (CG^CG) (triángulos llenos), que pueden escindir el ADN arrastrado que contiene restos no metilados. Una vez que los cebadores se han hibridado con su secuencia diana complementaria, el grupo bloqueante se retira y la región de interés que contiene metilo se amplifica utilizando la PCR en presencia de dUTP. En esta realización, los cebadores específicos de locus contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que permite una posterior amplificación universal del cebador para agregar un grupo biotina en 5'. Se puede usar un cebador de oligonucleótidos bloqueante durante la amplificación para limitar la formación de amplicones naturales.

Los productos de amplificación se capturan sobre un soporte sólido mediante el grupo biotina en 5' (Figura 52, etapa C). Como se muestra en la Figura 52D, se forman productos de ligadura usando sondas de oligonucleótidos de ligadura específicos de la región metilada, donde la sonda en dirección 3' contiene un grupo aceptor en 5' y una cola de secuencia que es complementaria de la cola de secuencia en 3' de la sonda de ligadura en dirección 5'. La sonda de ligadura en dirección 5' también contiene un grupo donante en 3' de manera que, tras la formación de un producto de ligadura, las regiones complementarias en 3' y 5' del producto se hibridan poniendo los grupos aceptor y donante en estrecha proximidad entre sí para generar una señal FRET para detectar los restos metilados de interés (Figura 52, etapa E).

La Figura 151 (etapas A-F) ilustra otra reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar la metilación de dianas de bajo nivel. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 151, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y UNG para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 151, etapa A). El ADN digerido se trata con bisulfito para convertir los restos no metilados en uracilo consiguiendo así el ADN bicatenario no complementario. La región de interés se amplifica selectivamente usando cebadores específicos de locus en dirección 5', cebadores específicos de locus en dirección 3', una sonda LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia no metilada tratada con bisulfito o su complemento y una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. En esta realización, se puede incorporar otra capa de selectividad al método al incluir un grupo bloqueante escindible 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en el cebador en dirección 5', así como en el cebador en dirección 3'. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para liberar un grupo 3'OH del cebador en dirección 5', que está unas pocas bases en dirección 5' del sitio de metilación, y adecuado para su extensión mediante polimerasa (Figura 151, etapa B). Una sonda de LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia no metilada tratada con bisulfito (o su complemento) que se solapa parcialmente con el cebador de la PCR en dirección 5' preferentemente competirá por la unión a la secuencia no metilada tratada con bisulfito con el cebador en dirección 5' y con el ADN de la secuencia metilada tratada con bisulfito, suprimiendo de esta forma la amplificación del ADN de la secuencia no metilada tratada con bisulfito en cada ciclo de la PCR. Opcionalmente, se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos amplificados contienen dU como se muestra en la Figura 151, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre.

Como se muestra en la Figura 151 etapa D, sondas de oligonucleótidos específicas de diana se hibridan con los productos amplificados y la ligasa (círculo sólido) une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí cuando se hibridan con su secuencia complementaria. En esta realización, la sonda de oligonucleótidos en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la secuencia no metilada tratada con bisulfito de interés contiene además una porción específica de cebador en 5' (Ai) para facilitar la posterior detección del producto de ligadura. Una vez más, la presencia de una sonda de LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia no metilada tratada con bisulfito (o su complemento) suprime la hibridación de la sonda de ligadura en dirección 5' en la secuencia diana no metilada tratada con bisulfito si está presente después del enriquecimiento de la secuencia diana metilada tratada con bisulfito durante la etapa de amplificación de la PCR. La sonda de oligonucleótidos en dirección 3', que tiene una secuencia común a ambas secuencias diana tanto no metilada como metilada tratada con bisulfito contienen una porción específica de cebador en 3' (Ci') que, junto con la porción específica de cebador en 5' (Ai) de la sonda en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la secuencia diana metilada tratada con bisulfito. La ligadura de las sondas de oligonucleótidos en dirección 3' y 5' permite la posterior amplificación y detección solamente de los productos de ligadura de la secuencia diana metilada tratada con bisulfito. Como se ilustra en la etapa D de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, -la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 151, etapa D). Tras la ligadura, los productos de ligadura se pueden detectar usando pares de cebadores emparejados Ai y Ci y sondas TaqMan™ que amplían la unión de ligadura como se ha descrito más arriba para la Figura 38 (véase la Figura 151, etapas E-G), o mediante el uso de otros medios adecuados conocidos en la técnica.

La Figura 152 (etapas A-F) ilustra otra reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar la metilación de dianas de bajo nivel. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 152, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y UNG para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 152, etapa A). El ADN digerido se trata con bisulfito para convertir los restos no metilados en uracilo consiguiendo así el ADN bicatenario no complementario. Se diseñan cebadores específicos de locus en dirección 3' y 5' para incluir un grupo bloqueantes escindible en 3' (Blk

3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r). Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH y es adecuado para la extensión mediante polimerasa (Figura 152, etapa D). Una sonda de LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia no metilada tratada con bisulfito (o su complemento) que se solapa parcialmente con el cebador de la PCR en dirección 5' preferentemente competirá por la unión con la secuencias diana no metilada tratada con bisulfito respecto del cebador en dirección 5' y respecto la secuencia diana metilada tratada con bisulfito, suprimiendo de esta forma la amplificación de la secuencia diana no metilada tratada con bisulfito en cada ciclo de la PCR. Opcionalmente, se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos amplificados contienen dU como se muestra en la Figura 152, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre.

Como se muestra en la Figura 152 etapa D, sondas de oligonucleótidos específicas de diana se hibridan con los productos amplificados y la ligasa (círculo sólido) une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí cuando se hibridan con su secuencia complementaria. Una vez más, la presencia de una sonda de LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia no metilada tratada con bisulfito (o su complemento) suprime la ligadura a la secuencia diana no metilada tratada con bisulfito si está presente después del enriquecimiento de la secuencia diana metilada tratada con bisulfito durante la etapa de amplificación de la PCR. En esta realización, la sonda de oligonucleótidos en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la secuencia no metilada tratada con bisulfito de interés contiene además una porción específica de cebador en 5' (Ai) para facilitar la posterior detección del producto de ligadura. La sonda de oligonucleótidos en dirección 3', que tiene una secuencia común a ambas secuencias diana tanto no metilada como metilada tratada con bisulfito contienen una porción específica de cebador en 3' (Bi'-Ci') que, junto con la porción específica de cebador en 5' (Ai) de la sonda en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la secuencia diana metilada tratada con bisulfito, permite la posterior amplificación y detección solamente de los productos de ligadura de la secuencia diana metilada tratada con bisulfito. Como se ilustra en la etapa D de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, -la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 152, etapa D). Tras la ligadura, los productos de ligadura se amplifican usando cebadores específicos UniTaq (es decir, F1-Bi-Q-Ai, Ci) y se detectan como se ha descrito más arriba para la Figura 44 (véase la Figura 152, etapas E-H) o usando otros medios adecuados conocidos en la técnica.

La Figura 153 ilustra otra reacción de PCR-qPCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar la metilación de dianas de bajo nivel. El ADN genómico o el ADNlc se aíslan (Figura 153, etapa A), y la muestra de ADN aislado se trata con endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y UNG para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 153, etapa A). El ADN digerido se trata con bisulfito para convertir los restos no metilados en uracilo consiguiendo así el ADN bicatenario no complementario. Se diseñan cebadores específicos de locus en dirección 3' y 5' para incluir un grupo bloqueantes escindible en 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r). Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH y es adecuado para la extensión mediante polimerasa (Figura 153, etapa D). Una sonda de LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia no metilada tratada con bisulfito (o su complemento) que se solapa parcialmente con el cebador de la PCR en dirección 5' preferentemente competirá por la unión con la secuencias diana no metilada tratada con bisulfito respecto del cebador en dirección 5' y respecto de la secuencia diana metilada tratada con bisulfito, suprimiendo de esta forma la amplificación de la secuencia diana no metilada tratada con bisulfito en cada ciclo de la PCR. En esta realización, los cebadores específicos de locus en dirección 3' también contienen regiones cebadoras en 5', por ejemplo, regiones cebadoras universales, esto permite la amplificación por PCR universal utilizando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés (Figura 153, etapa B). Opcionalmente, se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos amplificados contienen dU como se muestra en la Figura 153, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre. Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la secuencia diana metilada tratada con bisulfito de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la secuencia diana metilada tratada con bisulfito, como se ilustra en la Figura 153, etapa D. De nuevo, la presencia de una sonda de LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia no metilada tratada con bisulfito (o su complemento) suprime la ligadura a la secuencia diana no metilada tratada con bisulfito si está presente después del enriquecimiento de la secuencia diana metilada tratada con bisulfito durante la etapa de amplificación de la PCR. En esta realización, las sondas de ligadura de un par de ligadura que puede detectar la secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia diana metilada tratada con bisulfito (pero no la secuencia diana no metilada tratada con bisulfito) contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba para la Figura 39. Como se ilustra en la de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3', (por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, -la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 153, etapa D). Tras la ligadura (Figura 153, etapa E), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 153, etapa F).

En otra realización de este aspecto de la presente invención es el primer cebador de oligonuclótidos primario del conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios comprende una porción 5' que tiene una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción de la secuencia de nucleótidos de una secuencia diana no metilada tratada con bisulfito con la que se hibrida el cebador de oligonuclótidos primario, pero tiene uno o más emparejamientos incorrectos en la secuencia de nucleótidos respecto a una porción correspondiente de la secuencia de nucleótidos de la secuencia diana metilada tratada con bisulfito.

De acuerdo con esta realización, la ADN polimerasa es una que carece de 5' nucleasa, 3' nucleasa, y actividad de desplazamiento de cadena. Opcionalmente, el cebador de oligonuclótidos primario también contiene un nucleótido o análogo nucleotídico escindible que se escinde durante la etapa de hibridación de la reacción en cadena de la polimerasa para liberar los extremos 3'OH libres sobre el cebador de oligonucleótidos adecuado para la extensión. La mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa que comprende un tratamiento de desnaturalización en el que los productos de extensión de la reacción se separan entre sí, y un tratamiento de hibridación en el que el primer cebador de oligonuclótidos primario se hibrida con el producto de extensión que procede del segundo cebador de oligonuclótidos primario. El producto de extensión que procede del segundo cebador primario forma una horquilla en bucle intramolecular entre el extremo 3' y la secuencia complementaria dentro del producto de extensión, que (i) comprende uno o más emparejamientos incorrectos en o cerca del extremo 3' que inhibe la autoextensión si se hibrida con la secuencia diana tratada con bisulfito o (ii) comprende un emparejamiento en el extremo 3' que potencia la autoextensión si se autohibrida con la secuencia diana no metilada tratada con bisulfito. El segundo cebador de oligonuclótidos primario se hibrida con el producto de extensión que procede del primer cebador de oligonuclótidos primario. El producto de extensión que procede del primer cebador de oligonucleótidos primario forma una horquilla en bucle intramolecular entre la parte 5' y la secuencia complementaria dentro del producto de extensión. Durante la etapa de extensión de la PCR, el primer cebador de oligonuclótidos primario (i) preferentemente se extiende sobre el producto de extensión que comprende la secuencia diana metilada tratada con bisulfito, formando preferentemente de esta manera productos de extensión primarios que comprenden la secuencia de nucleótidos de la diana metilada tratada con bisulfito o un complemento de la misma, o (ii) se inhibe de formar productos de extensión primarios que comprenden la secuencia de nucleótidos de la diana no metilada tratada con bisulfito o un complemento de la misma debido a la autohibridación y autoextensión anterior de dicha diana. El segundo cebador de oligonuclótidos primario (iii) se extiende sobre el producto de extensión independientemente de la secuencia diana, en el que la secuencia metilada tratada con bisulfito se amplifica preferentemente debido a los productos de extensión primarios diferentes que proceden de la hibridación de los primeros cebadores de nucleótidos primarios con la diana o copias de la misma, dando como resultado el enriquecimiento en el producto de extensión de la secuencia metilada tratada con bisulfito y de los complementos de la misma durante dicha reacción en cadena de la polimerasa primaria.

Las Figuras 156 y 157 ilustran esta realización de la presente invención. Como se muestra en la Figura 156, el ADN genómico o ADNlc se aísla y se trata con endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y UNG (37 °C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 156, etapa A). El ADN digerido se trata con bisulfito para convertir los restos dC no metilados en uracilo (dU) consiguiendo así el ADN bicatenario no complementario. La región de interés se amplifica selectivamente usando (i) cebadores específicos de locus en dirección 5' que también comprenden una porción de la secuencia 5' complementaria de la secuencia no metilada tratada con bisulfito de la hebra superior, lo que permite la formación de bucles en horquilla después de la extensión, (ii) cebadores específicos de locus en dirección 3', y (iii) una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. Como se ilustra en la etapa B de esta Figura, se puede incorporar otra capa de selectividad al método al incluir un grupo bloqueante escindible 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en el cebador específico de la mutación en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH adecuado para la extensión mediante polimerasa (Figura 156, etapa D). Opcionalmente, la muestra digerida se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos amplificados contienen dU como se muestra en la Figura 156, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre. La PCR se lleva a cabo con una polimerasa que carece de actividad 5' nucleasa, 3' nucleasa y de desplazamiento de hebra. La Figura 156, etapa D ilustra adicionalmente que, en rondas posteriores de amplificación: (i) la hebra inferior no metilada tratada con bisulfito desnaturalizada forma un bucle en horquilla con correspondencia perfecta en el extremo 3', que se extiende mediante polimerasa, (i) la hebra inferior metilación tratada con bisulfito desnaturalizada forma un bucle en horquilla con dos o más emparejamientos incorrectos, que generalmente no se extiende mediante polimerasa,w y (iii) la hebra superior desnaturalizada forma un bucle en horquilla en su lado 5', que se desnaturaliza durante la etapa de extensión de la PCR a 72 °C. La Figura 156, etapa E ilustra adicionalmente que: después de la extensión del bucle en horquilla del ADN no metilado tratado con bisulfito (i), la secuencia en horquilla extendida no se desnaturaliza a 72 °C y evita que el cebador en dirección 5' genere una hebra superior de longitud completa. Sin embargo, la secuencia de bucle en horquilla del ADN metilado tratado con bisulfito (ii) no se extiende teniendo en cuenta las dos o más bases con emparejamiento incorrecto y por tanto se desnaturaliza a 72 °C, lo que permite que el cebador en dirección 5' genere la hebra superior de longitud completa. De forma análoga, el producto de la hebra superior (iii) se desnaturaliza a 72 °C, permitiendo que la polimerasa genere una hebra inferior de longitud completa. La diferencia de preferencia por extensión de bucle en horquilla de los cebadores en dirección 5' con el molde (i) no metilado tratado con bisulfito y (ii) metilado tratado con bisulfito da como resultado la eliminación preferente de los productos de amplificación no metilados tratados con bisulfito en cada ciclo de amplificación, y por tanto da como resultado la amplificación preferente

del ADN metilado tratado con bisulfito.

Como se muestra en la Figura 156, etapa G, sondas de oligonucleótidos específicas de la secuencia diana metilada tratada con bisulfito se hibridan con los productos amplificados, y la ligasa (círculo sólido) une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí cuando se hibridan con su secuencia complementaria. En esta realización, la sonda de oligonucleótidos en 5' que tiene una secuencia específica para detectar la secuencia metilada tratada con bisulfito de interés contiene además una porción específica de cebador en 5' (Ai) para facilitar la posterior detección del producto de ligadura, mientras que la sonda de oligonucleótidos opcional en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la secuencia de ácidos nucleicos no metilada tratada con bisulfito no contiene una porción específica de cebador en 5'. La sonda de oligonucleótidos en dirección 3', que tiene una secuencia específica para tratar las secuencias metiladas tratadas con bisulfito contiene una porción específica del cebador en 3' (Ci') que, junto con la porción específica del cebador en 5' (Ai) de la sonda en dirección 5' que tiene una secuencia específica para detectar la secuencia metilada tratada con bisulfito de interés, permite la posterior amplificación y detección solamente de los productos mutantes ligados. Como se ilustra en la de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 156, etapa H). Tras la ligadura, los productos de ligadura se pueden detectar usando pares de cebadores emparejados Ai y Ci y sondas TaqMan™ que amplían la unión de ligadura como se describe en la Figura 38 (véase la Figura 156, etapas H-J), o mediante el uso de otros medios adecuados conocidos en la técnica.

La Figura 157 otra reacción de PCR-qLDR con prevención de arrastre para detectar metilación. En esta realización, el ADN genómico o ADNlc se aísla y se trata con endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y UNG (37 °C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 157, etapa A). El ADN digerido se trata con bisulfito para convertir los restos dC no metilados en uracilo (dU) consiguiendo así el ADN bicatenario no complementario. La región de interés se amplifica selectivamente usando (i) cebadores específicos de locus en dirección 5' que también comprenden una porción en 5' que tienen una secuencia complementaria de la secuencia no metilada tratada con bisulfito de la hebra superior, lo que permite la formación de bucles en horquilla después de la extensión, (ii) cebadores específicos de locus en dirección 3', y (iii) una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP. Como se ilustra en la de esta Figura, se puede incorporar otra capa de selectividad al método al incluir un grupo bloqueante escindible 3' (Blk 3', por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en el cebador en dirección 5'. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH adecuado para la extensión mediante polimerasa (Figura 157, etapa D). Opcionalmente, la muestra digerida se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos amplificados contienen dU como se muestra en la Figura 157, etapa C, lo que permite el tratamiento posterior con UDG o una enzima similar para evitar el arrastre. La PCR se lleva a cabo con una polimerasa que carece de actividad 5' nucleasa, 3' nucleasa y de desplazamiento de hebra. La Figura 157, etapa D ilustra adicionalmente que, en rondas posteriores de la PCR (i) la hebra inferior no metilada tratada con bisulfito desnaturalizada forma un bucle en horquilla con correspondencia perfecta en el extremo 3', que se extiende mediante polimerasa, (i) la hebra inferior metilación tratada con bisulfito desnaturalizada forma un bucle en horquilla con dos o más emparejamientos incorrectos, que generalmente no se extiende mediante polimerasa,w y (iii) la hebra superior desnaturalizada forma un bucle en horquilla en el lado 5', que se desnaturaliza durante la etapa de extensión de la PCR a 72 °C. La Figura 157, etapa E, ilustra adicionalmente que después de la extensión del bucle en horquilla del ADN no metilado tratado con bisulfito (i), la secuencia en horquilla extendida no se desnaturaliza a 72 °C y evita que el cebador en dirección 5' genere una hebra superior de longitud completa. Sin embargo, la secuencia de bucle en horquilla del ADN metilado tratado con bisulfito (ii) no se extiende teniendo en cuenta las dos o más bases con emparejamiento incorrecto y por tanto se desnaturaliza a 72 °C, lo que permite que el cebador en dirección 5' genere la hebra superior de longitud completa. De forma análoga, el producto de la hebra superior se desnaturaliza a 72 °C, permitiendo que la polimerasa genere una hebra inferior de longitud completa (iii). La diferencia de preferencia por extensión de bucle en horquilla de los cebadores en dirección 5' con el molde (i) no metilado tratado con bisulfito y (ii) metilado tratado con bisulfito da como resultado la eliminación preferente de los productos de amplificación no metilados tratados con bisulfito en cada ciclo de amplificación, y por tanto da como resultado la amplificación preferente del ADN metilado tratado con bisulfito.

En esta realización, los cebadores específicos de locus en dirección 3' también contienen una región cebadora en 5', por ejemplo, una región cebadora universal, esto permite la amplificación por PCR universal utilizando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés (Figura 157, etapa B). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la secuencia metilada tratada con bisulfito de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la secuencia diana metilada tratada con bisulfito como se ilustra en la Figura 150, etapa G. En esta realización, las sondas de ligadura de un par de ligadura que puede detectar la secuencia de ácidos nucleicos metilada tratada con bisulfito (pero no la secuencia no metilada tratada con bisulfito) contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba para la Figura 39. Como se ilustra en la etapa G de esta Figura, se puede incorporar otra capa de especificidad al método al incluir un grupo bloqueante escindible en 3', (por ejemplo, el separador C3), y una base de ARN (r), en la sonda de ligadura en dirección 5'. Después de la hibridación específica

de la diana, la ARNasa H (símbolo de estrella) elimina la base de ARN para generar un grupo 3'OH competente para ligadura (Figura 150, etapa G). Tras la ligadura (Figura 157, etapa H), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 157, etapa I).

Otro aspecto de la presente divulgación se dirige a un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra, o de otras muestras, mediante uno o más restos metilados. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácidos nucleicos que potencialmente comprenden la secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos en otras moléculas de ácidos nucleicos en uno o más restos metilados y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la muestra. El método implica además poner en contacto la muestra con una o más enzimas sensibles a la metilación para formar una mezcla de reacción con la enzima de restricción, en la que la una o más de dichas enzimas sensibles a la metilación escinden las moléculas de ácidos nucleicos de la muestra que contienen uno o más restos sin metilar en al menos una secuencia de reconocimiento de la enzima sensible a la metilación. Se proporcionan uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos primario (a) un primer cebador de oligonucleótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una región de la secuencia de nucleótidos diana que está en dirección 5' del uno o más restos metilados y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que una región de la secuencia de nucleótidos diana que está en dirección 3' del uno o más restos metilados. La mezcla de reacción con la enzima de restricción se combina con el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una mezcla de reacción en cadena de la polimerasa primaria. El método implica además someter la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa primaria a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando así productos de extensión primarios que comprenden la secuencia de nucleótidos diana o un complemento de la misma. Se proporcionan uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos secundarios un primer y un segundo cebador de oligonucleótidos anidado que puede hibridarse con los productos de extensión primarios. Los productos de extensión primarios se combinan con el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa secundaria, y la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa secundaria se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera productos de extensión secundarios. Los productos de extensión secundarios de la muestra se detectan y distinguen para identificar la presencia de una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen secuencias de nucleótidos diana que difieren de las secuencias de nucleótidos en otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra en uno o más restos metilados.

De acuerdo con este aspecto de la presente divulgación, la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa secundaria puede comprender además una o más sondas de detección de oligonucleótidos, por ejemplo, una sonda de detección de oligonucleótidos TaqMan™. La sonda de detección se hibrida con una secuencia de nucleótidos diana dentro del producto de extensión primario o su complemento, y tiene una molécula inactivadora y una etiqueta detectable que están separadas entre sí, pero se encuentran lo suficientemente cerca entre sí para que la molécula inactivadora inactive la etiqueta detectable. Durante la etapa de reacción del proceso de la reacción en cadena de la polimerasa secundaria, la una o más sondas de detección de oligonucleótidos se hibridan con porciones complementarias de los productos de extensión primarios y la molécula inactivadora y la etiqueta detectable posteriormente se escinden de la una o más sondas de detección de oligonucleótidos durante la etapa de extensión. Tras la escisión, la etiqueta detectable se separa del inactivador de forma que la etiqueta detectable se detecta.

En una realización, uno o ambos cebadores de oligonucleótidos primarios del conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios pueden tener opcionalmente una porción 3' que comprende un nucleótido o análogo nucleotídico escindible y un grupo bloqueante, de forma que el extremo 3' de dicho cebador o cebadores no es adecuado para la extensión de la polimerasa hasta que el nucleótido o análogo nucleotídico escindible se escinden. Tras la escisión, se libera un extremo 3'OH en uno o ambos cebadores de oligonucleótidos primarios antes de permitir la extensión del cebador.

En otra realización, los cebadores de oligonucleótidos primarios del conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios comprenden una porción de secuencia de nucleótidos idéntica o sustancialmente idéntica en 5' que tiene una longitud comprendida entre aproximadamente 6 y 20 bases. De acuerdo con esta realización, los productos de extensión deseados que se generan tienen la longitud suficiente para que los cebadores primarios se hibriden preferentemente con ellos. Sin embargo, cuando se forma un producto de cebador dimérico no deseable, producirá una horquilla consigo mismo mediante sus extremos 5' complementarios y quedará inutilizado para continuar con la amplificación.

La Figura 158 ilustra una reacción PCR-PCR con prevención de arrastre ilustrativa para detectar la metilación de

acuerdo con este aspecto de la presente invención. En esta realización, el ADN genómico o ADNlc se aísla y se trata con endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y/o HinPII (G^CGC) y UNG para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 158, etapa A). Como se muestra en la Figura 158, etapa B, las regiones de interés metiladas se amplifican usando PCR en presencia de dUTP usando cebadores específicos de locus. En una realización, se llevan a cabo ciclos de amplificación limitados (12-20 ciclos) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones que se producen. En otra realización, las regiones de interés se amplifican utilizan 20-40 ciclos. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos de la PCR contienen dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 158, etapa C). Opcionalmente, la muestra se distribuye por alícuotas en los 12, 24, 48, o 96 pocillos antes de la PCR. Las regiones que contienen metilo se amplifican usando cebadores específicos de locus anidados o semianidados y un ensayo interno tradicional de detección TaqMan™. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres.

La Figura 53 otra reacción de PCR-qPCR con prevención de arrastre para detectar metilación. Análogamente al resto de realizaciones de la presente invención, el ADN genómico o ADNlc se aísla y se trata con endonucleasas de restricción sensibles a metilo, por ejemplo, Bsh1236I (CG^CG) y UNG (37 °C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres (Figura 53, etapa A). El ADN digerido se trata con bisulfito para convertir los restos no metilados en uracilo consiguiendo así el ADN bicatenario no complementario. Como se muestra en la Figura 53, etapa B, los cebadores específicos de locus que contienen un grupo bloqueante escindible en 3' se hibridan en presencia de BstU1 (CG^CG) (triángulos llenos), que pueden escindir el ADN arrastrado que contiene restos no metilados. Una vez que los cebadores se han hibridado con su secuencia diana complementaria, el grupo bloqueante se retira. En esta realización, la región de interés que contiene metilo se amplifica utilizando la PCR en presencia de dNTP. En esta realización, se utiliza un cebador de oligonucleótidos bloqueante durante la amplificación para limitar la formación de amplicones naturales. Como se muestra en la Figura 53, etapa C, los productos de la PCR están no metilados, lo que proporciona protección frente a arrastres.

Como se muestra en la Figura 53, etapas D y E, los productos de la PCR se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para detección TaqMan™ usando cebadores específicos de locus que opcionalmente están anidados o semianidados al conjunto primario de cebadores específicos de locus y sonda TaqMan™ (barra negra). Opcionalmente, se puede incorporar un oligonucleótido bloqueante (barra negra gruesa) en esta reacción para limitar la formación de amplicones naturales. En esta realización, la reacción TaqMan™ se lleva a cabo en presencia de los dUTP, lo que permite la prevención de arrastres.

Otro aspecto de la presente divulgación se dirige a un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos ribonucleicos que contienen una secuencia de ribonucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos ribonucleicos de la muestra, o de otras muestras, un transcrito alternativo, un sitio de inicio alternativo, una secuencia de codificación alternativa, una secuencia no de codificación alternativa, una inserción de exón, una deleción de exón, una inserción de intrón, translocación, una mutación u otra redisposición genómica. Este método implica proporcionar una muestra que contiene potencialmente una o más moléculas de ácidos ribonucleicos que contienen una secuencia de ribonucleótidos diana que difiere de la secuencia de ribonucleótidos de otras moléculas de ácidos ribonucleicos y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU presentes en la muestra. Se proporcionan uno o más cebadores de oligonucleótidos, siendo cada cebador complementario de la una o más moléculas de ácidos ribonucleicos que contienen una secuencia de ribonucleótidos diana. La muestra contactada se combina con el uno o más cebadores de oligonucleótidos y una transcriptasa inversa para formar una mezcla de transcripción inversa y se generan moléculas de ácidos desoxirribonucleicos complementarias (ADNc) en la mezcla de transcripción inversa. Cada molécula de ADNc comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de ribonucleótidos diana y contiene dU. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de cebador (a) un primer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una porción de una secuencia de nucleótidos de ADNc adyacente al complemento de la secuencia de ribonucleótidos diana del ADNc, y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una porción de un producto de extensión formado a partir del primer cebador de oligonucleótidos. La mezcla de transcripción inversa que contiene las moléculas de ADNc se combina con el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos y una polimerasa para formar una mezcla de reacción de la polimerasa, y la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera uno o más productos de extensión primarios diferentes. El método implica además proporcionar uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos. Cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la secuencia diana, y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la secuencia diana, en el que la primera y segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configura para hibridarse, de forma específica de la base, adyacente entre sí a un producto de extensión primario complementario con una unión entre las mismas. Los productos de extensión primarios se ponen en contacto con una ligasa y el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura y la primera y la segunda sondas del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias del producto ligadas en la mezcla de reacción de la ligasa. Las secuencias de producto ligadas de la

muestra se detectan y distinguen identificando de esta forma la presencia de una o más moléculas de ácidos ribonucleicos que contienen la secuencia de ribonucleótidos diana que difieren de las secuencias de ribonucleótidos de otras moléculas de ácidos ribonucleicos de la muestra debido a un corte y empalme alternativo, un transcrito alternativo, un sitio de inicio alternativo, una secuencia de codificación alternativa, una secuencia no de codificación alternativa, una inserción de exón, una deleción de exón, una inserción de intrón, translocación, una mutación u otra redisposición genómica.

Las Figuras 54-85 ilustran diversas realizaciones de este aspecto de la presente invención.

La Figura 54 ilustra una visión general de la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar translocaciones en el ARNm. Se muestra una ilustración de las translocaciones entre dos genes del ADN en la Figura 54, etapa A. Se ilustran ejemplos de las diferentes uniones de fusión entre los exones 1-b (fusión de ARNm 1), 2-b (fusión de ARNm 2), y 3-b (fusión de ARNm 3) en los ARNm (Figura 54, etapa B). Este método implica aislar el ARNm a partir de eritrocitos completos, exosomas, o células tumorales circulantes (CTC) y generar ADNc usando transcriptasa inversa y un cebador complementario del exón b. El ADNc generado se amplifica mediante PCR usando cebadores directos con los exones 1, 2 y 3 y el cebador del exón b (Figura 54, etapa B). Independientemente del punto de rotura de la translocación, los cebadores amplificarán el fragmento más pequeño que contenga la región de unión del exón. Los diversos productos formados durante la amplificación por PCR se muestran en la Figura 54, etapa C.

Se realiza la LDR usando sondas de oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón. Las sondas de ligadura se pueden diseñar para contener porciones específicas del cebador marcador (por ejemplo, Ai, Ci') adecuadas para la posterior detección usando cebadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (Figura 54, etapas C-D, panel izquierdo). Como alternativa, las sondas de ligadura se pueden diseñar para contener porciones específicas del cebador UniTaq (Ai, Ci') y específicas del marcador (Bi') (Figura 54, etapas C-D, panel derecho). Tras la formación del producto de ligadura específicos de la unión del exón, los productos de ligadura se amplifican mediante la PCR, y se detectan (Figura 54, etapa D). Cuando se utilizan cebadores específicos de la marca (Ai, Ci) para amplificar los productos de la LDR, cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura, y se puede puntuar individualmente. Cuando se usan cebadores específicos de UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci), para amplificar los productos de la LDR, el mismo conjunto de cebadores puntúa la translocación dada, independientemente de la unión al exón específica.

La Figura 55 ilustra una reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar translocaciones en el ARNm. En esta realización, el ARNm se aísla (Figura 55, etapa A) y se trata con UDG para prevención de arrastres (Figura 55, etapa B). El ADNc se genera usando cebadores específicos de transcrito en 3' y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. La polimerasa Taq se activa para realizar ciclos limitados de amplificación por PCR (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 55, etapa B). Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos de la PCR incorporan dUTP, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 55, etapa C).

Como se muestra en la Figura 55, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen partes específicas del cebador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de la base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 55, etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para la detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 55, etapa E). Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, que también destruye los amplicones diana originales (Figura 55, etapa E). Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de la LDR, lo que proporciona protección adicional contra arrastres.

La Figura 56 ilustra otra reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar translocaciones en el ARNm. En esta realización, el ARNm se aísla (Figura 56, etapa A) y se trata con UDG para prevención de arrastres (Figura 56, etapa B). El ADNc se genera usando cebadores específicos de transcrito en 3' y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. La polimerasa Taq se activa para realizar ciclos limitados de amplificación por PCR (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 56, etapa B). Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 56, etapa C).

Como se muestra en la Figura 56, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen partes específicas del cebador UniTaq (Ai, Ci') y la parte marcadora (Bi') adecuadas para la posterior amplificación por PCR y detección, se hibridan con secuencias de ácidos nucleicos correspondientes a la molécula de ARNm diana a detectar (Figuras 56, etapa D). Tras la ligadura de las sondas de oligonucleótidos, la muestra se trata con UDG para eliminar los amplicones diana originales, lo que permite la amplificación y detección selectiva de los productos de ligadura usando cebadores específicos UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito más arriba (Figuras 56, etapas E-F), facilitando de esta manera la detección de la fusión de ARNm con translocación de ARNm. Como se muestra en la Figura 56, etapas E y F, los productos de ligadura amplificados incorporan dUTP para permitir una futura prevención de arrastres.

La Figura 57 ilustra un ejemplo de una reacción RT-PCR-qPCR con prevención de arrastre para detectar translocaciones en el ARNm. En esta realización, el ARNm se aísla (Figura 57, etapa A) y se trata con UDG para prevención de arrastres (Figura 57, etapa B). El ADNc se genera usando cebadores específicos de transcrito en 3' y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. La polimerasa Taq se activa para realizar ciclos limitados de amplificación por PCR (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 57, etapa B). Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores y porciones específicas de cebadores universales para permitir una posterior amplificación universal por PCR usando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 57, etapa C). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la región de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la unión al exón, como se ilustra en la Figura 57, etapa D. En esta realización, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón de un par de ligadura contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 57, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 57, etapa E).

La Figura 58 ilustra una visión general de la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar el corte y empalme alternativo. La Figura 58, etapa A, es una ilustración de un gen con 5 exones mostrados según el ADN. y la Figura 58, etapa B, muestra ejemplos de variantes de ARNm normales (1-2-3a-4) y de corte y empalme alternativo (1-2-3b-4). Este método implica aislar el ARNm a partir de eritrocitos completos, exosomas o CTC, y generar ADNc usando transcriptasa inversa con un cebador complementario del exón 4 como se muestra en la Figura 58, etapa B. El ADNc se amplifica por PCR usando el cebador del exón 4 y un cebador directo del exón 2, para generar amplicones de las variantes tanto normal como de corte y empalme, en el caso de estar presente. Como se muestra en la Figura 58, etapa C, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen secuencias del cebador marcador (Ai, Ci'; panel izquierdo) o cebador UniTaq y secuencias marcadoras (Ai, Bi'-Ci'; panel derecho) se hibridan con su correspondiente secuencia diana en los productos de la PCR, y la ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí si son perfectamente complementarios en la unión. Los productos de ligadura se amplifican y detectan usando cebadores específicos de la marca (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q o F2-Q, Figura 58, etapa D, panel izquierdo) o cebadores UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, F2-Bi-Q-Ai, Ci, Figura 58, etapa D, panel derecho), como se ha descrito anteriormente.

La Figura 59 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar relativamente transcritos de ARNm de corte y empalme alternativo o de tipo natural. La Figura 59, etapa A ilustra el transcrito natural que contiene el exón 3a (parte superior) y un transcrito de corte y empalme alternativo que contiene el exón 3b (parte inferior) a detectar. Este método implica aislar el ARNm y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 59, etapa B). El ADNc se genera usando cebadores específicos de transcrito en 3' y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. La polimerasa Taq se activa para realizar ciclos limitados de amplificación por PCR (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 59, etapa B). Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 59, etapa C). Como se muestra en la Figura 59, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen partes específicas del cebador marcador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de la base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 59, etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para la detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q y F2-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 59, etapa E-F). La variante natural y la de corte y empalme alternativo se cuantifican y distinguen usando PCR en tiempo real y detectando las sondas TaqMan™ marcadas diferencialmente. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, que también destruye los amplicones diana originales (Figura 59, etapa E). Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de la LDR, lo que proporciona protección adicional contra arrastres.

La Figura 60 ilustra otra reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar relativamente transcritos de ARNm de corte y empalme alternativo o de tipo natural. La Figura 60, etapa A ilustra el transcrito natural que contiene el exón 3a (parte superior) y un transcrito de corte y empalme alternativo que contiene el exón 3b (parte inferior) a detectar. Las etapas A-D de este método son esencialmente las mismas que se han descrito para la Figura 59, salvo que las sondas de ligadura específicas de la unión del exón se han diseñado para contener secuencias de cebadores UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura correspondientes a la variante natural y a la variante de corte y empalme alternativo posteriormente se amplifican, se detectan y se cuantifican utilizando la PCR en tiempo real con cebadores específicos UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y se ha ilustrado en la Figura 60, etapas E-G.

La Figura 61 ilustra una reacción RT-PCR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar relativamente transcritos de ARNm de corte y empalme alternativo o de tipo natural. La Figura 61, etapa A ilustra el transcrito natural que contiene el exón 3a (parte superior) y un transcrito de corte y empalme alternativo que contiene el exón 3b (parte inferior) a detectar. Este método implica aislar el ARNm y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 61,

etapa B). El ADNc se genera usando cebadores específicos de transcrito en 3' y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores y porciones específicas de cebadores universales para permitir una posterior amplificación universal por PCR usando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 61, etapa C). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la región de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la unión al exón, como se ilustra en la Figura 61, etapa D. En esta realización, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón de un par de ligadura contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 61, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 61, etapa E).

La Figura 62 ilustra una reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar transcritos de corte y empalme alternativo de bajo nivel. La Figura 62, etapa A ilustra el transcrito natural que contiene el exón 3a (parte superior) y un transcrito de corte y empalme nivel alternativo de bajo nivel que contiene el exón 3b (parte inferior) a detectar. Este método implica aislar el ARNm y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 62, etapa B). El ADNc se genera usando cebadores específicos de transcrito en 3' (es decir, con el exón 4) y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. La polimerasa Taq se activa para realizar ciclos limitados de amplificación por PCR (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 62, etapa B). En esta realización, un cebador específico de la variante de corte y empalme alternativo (es decir, el exón 3b), y que no se hibrida con la variante natural (es decir, el exón 3a), se utiliza para generar solamente productos de amplificación correspondientes a la variante de corte y empalme alternativo. Los productos de la PCR incorporan dUTP, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 62, etapa C). Como se muestra en la Figura 62, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen partes específicas del cebador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 62, etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 62, etapa E-F). La variante de corte y empalme alternativo se detecta durante la PCR en tiempo real por la liberación del grupo fluorescente de la sonda TaqMan™. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales (Figura 62, etapa E). Solamente se amplifican los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de LDR, proporcionando una protección adicional contra los arrastres.

Las Figuras 63 y 64 ilustran reacciones RT-PCR-LDR-qPCR y RT-PCR-qLDR con prevención de arrastres similares para detectar transcritos de corte y empalme alternativo de bajo nivel como se ha descrito y se muestra con respecto a la Figura 62. En la realización de la Figura 63, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón se han diseñado para contener secuencias de cebadores UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura correspondientes a la variante de corte y empalme alternativo posteriormente se amplifican, se detectan y se cuantifican utilizando la PCR en tiempo real con cebadores específicos UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y como se ilustra en la Figura 63, etapas E-G. En la realización de la Figura 64, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón de un par de ligadura contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 64, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos (D, F2) donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 64, etapa E).

La Figura 65 ilustra una visión general de la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar el corte y empalme alternativo. La Figura 65, etapa A, muestra una ilustración de un gen con 3 exones, y un sitio de inicio alternativo y un primer exón en el ADN. La Figura 65, etapa B muestra ejemplos de la variante normal (1-2-3) y la variante de corte y empalme alternativo (1a-2-3) de los ARNm. Este método implica aislar el ARNm a partir de eritrocitos completos, exosomas o CTC, y generar ADNc usando transcriptasa inversa con un cebador complementario del exón 2 como se muestra en la Figura 65, etapa B. El ADNc se amplifica por PCR usando el cebador del exón 2 y un cebador directo que es complementario de cualquier del exón 1 o el exón 1a para generar amplicones de ambas variantes de corte y empalme. Como se muestra en la Figura 65, etapa C, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen secuencias del cebador marcador (Ai, Ci'; panel izquierdo) o cebador UniTaq y secuencias marcadoras (Ai, Bi'-Ci'; panel derecho) se hibridan con su correspondiente secuencia diana en los productos de la PCR, y la ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí si son perfectamente complementarios en la unión. Los productos de ligadura se amplifican y detectan usando cebadores específicos de la marca (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q o F2-Q; Figura 58, etapa D, panel izquierdo) o cebadores UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, F2-Bi-Q-Ai y Ci, Figura 58, etapa D, panel derecho), como se ha descrito anteriormente.

La Figura 66 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar transcritos que

contienen un sitio de inicio de la transcripción natural y alternativo. La Figura 66, etapa A, ilustra el transcrito natural que contiene el exón 1 (parte superior) y el transcrito alternativo que tiene el exón 1a como el sitio de inicio (parte inferior). Este método implica aislar el ARNm y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 66, etapa B). El ADNc se genera usando cebadores específicos de transcrito en 3' y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. El ADNc se amplifica por PCR usando el cebador específico del exón 2 y un cebador directo que es complementario de cualquier del exón 1 o el exón 1a para generar amplicones de ambas variantes de corte y empalme. Se lleva a cabo una amplificación por PCR limitada (12-20 ciclos) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 66, etapa B). En otra realización, las regiones de interés se amplifican usando 20-40 ciclos de la PCR. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 66, etapa C). Como se muestra en la Figura 66, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen partes específicas del cebador marcador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR con TaqMan™, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de la base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 66, etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para la detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q y F2-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 66, etapa E-F). La variante natural y la de sitio de inicio alternativo se cuantifican y distinguen usando PCR en tiempo real y detectando las sondas TaqMan™ marcadas diferencialmente. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, que también destruye los amplicones diana originales (Figura 66, etapa E). Solamente se amplifican los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de la LDR, lo que proporciona protección adicional contra arrastres.

La Figura 67 ilustra otra reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar relativamente transcritos de ARNm de corte y empalme alternativo o de tipo natural. La Figura 67, etapa A, ilustra el transcrito natural que contiene el exón 1 (parte superior) y el transcrito alternativo que tiene el exón 1a como el sitio de inicio (parte inferior). Las etapas A-D de este método son esencialmente las mismas que se han descrito para la Figura 66, salvo que las sondas de ligadura específicas de la unión del exón se han diseñado para contener secuencias de cebadores UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura correspondientes a los transcritos natural y variante posteriormente se amplifican, se detectan y se cuantifican utilizando la PCR en tiempo real con cebadores específicos UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y se ha ilustrado en la Figura 67, etapas E-F.

La Figura 68 ilustra una reacción RT-PCR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar relativamente transcritos de ARNm de corte y empalme alternativo o de tipo natural. La Figura 68, etapa A, ilustra el transcrito natural que contiene el exón 1 (parte superior) y el transcrito alternativo que tiene el exón 1a como el sitio de inicio (parte inferior). Este método implica aislar el ARNm y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 68, etapa B). El ADNc se genera usando cebadores específicos de transcrito en 3' y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. El ADNc se amplifica por PCR usando el cebador del exón 2 y un cebador directo que es complementario de cualquier del exón 1 o el exón 1a para generar amplicones de ambas variantes de corte y empalme. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores y porciones específicas de cebadores universales para permitir una posterior amplificación universal por PCR usando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 68, etapa C). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la región de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la unión al exón, como se ilustra en la Figura 68, etapa D. En esta realización, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón de un par de ligadura contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 68, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 68, etapa E).

La Figura 69 ilustra una reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar un bajo nivel del transcrito de sitio de inicio alternativo. La Figura 69, etapa A, ilustra el transcrito natural que contiene el exón 1 (parte superior) y el transcrito alternativo que tiene el exón 1a como el sitio de inicio (parte inferior). Este método implica aislar el ARNm y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 69, etapa B). El ADNc se genera usando cebadores específicos de transcrito en 3' y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. La polimerasa Taq se activa para realizar ciclos limitados de amplificación por PCR (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 69, etapa B). En esta realización, un cebador específico del transcrito alternativo (es decir,exón 1a) que no se hibrida con la variante natural (es decir, exón 1) se utiliza para generar solamente productos de amplificación correspondientes al transcrito alternativo. Los productos de la PCR incorporan dUTP, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 69, etapa C). Como se muestra en la Figura 69, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen partes específicas del cebador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 69, etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 69, etapa E-F). La variante de corte y empalme

alternativo se detecta durante la PCR en tiempo real por la liberación del grupo fluorescente de la sonda TaqMan™. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales (Figura 69, etapa E). Solamente se amplifican los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de LDR, proporcionando una protección adicional contra los arrastres.

Las Figuras 70 y 71 ilustran reacciones RT-PCR-LDR-qPCR y RT-PCR-qLDR con prevención de arrastres similares para detectar transcritos de sitio de inicio alternativo de bajo nivel como se ha descrito y se muestra con respecto a la Figura 69 (etapas A-C), donde solamente se utilizan los cebadores específicos de la amplificación del transcrito alternativo. En la realización de la Figura 70, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón se han diseñado para contener secuencias de cebadores UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura correspondientes a los transcritos de sitio de inicio alternativo posteriormente se amplifican, se detectan y se cuantifican utilizando la PCR en tiempo real con cebadores específicos UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y como se ilustra en la Figura 70, etapas E-G. En la realización de la Figura 71, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón de un par de ligadura contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 71, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos (D, F2) donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 71, etapa E).

La Figura 72 ilustra una visión general de la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar deleción la deleción de exones. La Figura 72, etapa A, muestra una ilustración de un gen con 5 exones y 4 intrones en el ADN. La Figura 72, etapa B, muestra ejemplos del transcrito natural que contiene los exones 1-5 (parte superior) y el transcrito alternativo donde el exón 4 está eliminado (parte inferior, es decir, los exones 1-3 y 5). Este método implica aislar el ARNm a partir de eritrocitos completos, exosomas o CTC, y generar ADNc usando transcriptasa inversa con un cebador complementario del exón 5 como se muestra en la Figura 72, etapa B. El ADNc se amplifica por PCR usando el cebador del 5 junto con cebadores directos complementarios del exón 3 y del exón 4 para generar amplicones de variantes tanto naturales como de deleción. Como se muestra en la Figura 72, etapa C, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen secuencias del cebador marcador (Ai, Ci'; panel izquierdo) o cebador UniTaq y secuencias marcadoras (Ai, Bi'-Ci'; panel derecho), se hibridan con su correspondiente secuencia diana en los productos de la PCR, y la ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí si son perfectamente complementarios en la unión. Los productos de ligadura se amplifican y detectan usando cebadores específicos de la marca (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q o F2-Q; Figura 72, etapa D, panel izquierdo) o cebadores UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, F2-Bi-Q-Ai y Ci, Figura 72, etapa D, panel derecho), como se ha descrito anteriormente.

La Figura 73 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar transcritos naturales y transcritos que tienen una deleción de exones. La Figura 73, etapa A, ilustra el transcrito natural que contiene los exones 1-5 (parte superior) y el transcrito alternativo que tiene solamente los exones 1-3 y 5, donde el exón 4 falta (parte inferior). Este método implica aislar el ARNm y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 73, etapa B). El ADNc se genera usando un cebador específico de transcrito en 3' (por ejemplo, un cebador específico del exón 5) y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. El ADNc se amplifica por PCR usando el cebador del 5 junto con cebadores directos complementarios del exón 3 y del exón 4 para generar amplicones de variantes tanto naturales como de deleción. Se lleva a cabo una amplificación por PCR limitada (12-20 ciclos) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 73, etapa B). En otra realización, las regiones de interés se amplifican usando 20-40 ciclos de la PCR. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 73, etapa C). Como se muestra en la Figura 73, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen partes específicas del cebador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de la base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 73, etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para la detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q y F2-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 73, etapa E-F). La variante natural y la de deleción se cuantifican y distinguen usando PCR en tiempo real y detectando las sondas TaqMan™ marcadas diferencialmente. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, que también destruye los amplicones diana originales (Figura 73, etapa E). Solamente se amplifican los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de la LDR, lo que proporciona protección adicional contra arrastres.

La Figura 74 ilustra otra reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar transcritos naturales y transcritos que tienen una deleción de exones. La Figura 74, etapa A, ilustra el transcrito natural que contiene los exones 1-5 (parte superior) y el transcrito alternativo que tiene solamente los exones 1-3 y 5, donde el exón 4 falta (parte inferior). Las etapas A-D de este método son esencialmente las mismas que se han descrito para la Figura 73, salvo que las sondas de ligadura específicas de la unión del exón se han diseñado para contener secuencias de cebadores UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura correspondientes a los transcritos natural y variante posteriormente se amplifican, se detectan

y se cuantifican utilizando la PCR en tiempo real con cebadores específicos UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y se ha ilustrado en la Figura 74, etapas E-G.

La Figura 75 ilustra una reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre para cuantificar transcritos naturales y transcritos que tienen una deleción de exones. La Figura 75, etapa A, ilustra el transcrito natural que contiene los exones 1-5 (parte superior) y el transcrito alternativo que tiene solamente los exones 1-3 y 5, donde el exón 4 falta (parte inferior). Este método implica aislar el ARNm y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 75, etapa B). El ADNc se genera usando un cebador específico de transcrito en 3' (por ejemplo, un cebador específico del exón 5) y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. El ADNc se amplifica por PCR usando el cebador del 5 junto con cebadores directos complementarios del exón 3 y del exón 4 para generar amplicones de variantes tanto naturales como de deleción. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores y porciones específicas de cebadores universales para permitir una posterior amplificación universal por PCR usando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 75, etapa C). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la región de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la unión al exón, como se ilustra en la Figura 75, etapa D. En esta realización, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón de un par de ligadura contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 75, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 75, etapa E).

La Figura 76 ilustra una reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar transcritos de bajo nivel que tienen una deleción de exones. La Figura 76, etapa A, ilustra el transcrito natural que contiene los exones 1-5 (parte superior) y el transcrito alternativo que tiene solamente los exones 1-3 y 5, donde el exón 4 falta (parte inferior). Este método implica aislar el ARNm y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 76, etapa B). El ADNc se genera usando un cebador específico de transcrito en 3' (por ejemplo, un cebador específico del exón 5) y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. El ADNc se amplifica por PCR usando el cebador del exón 5 junto con un cebador directo complementario del exón 3 y del oligonucleótido bloqueantes. El oligonucleótido bloqueante se hibrida con el exón 4 en el transcrito natural, evitando de esta manera la amplificación de los transcritos naturales. En consecuencia, solamente se generan productos de amplificación correspondientes al transcrito de deleción. Los productos de la PCR incorporan dUTP, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 76, etapa C). Como se muestra en la Figura 76, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen partes específicas del cebador marcador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de la base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 76 etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 76, etapa E-F). El transcrito de deleción se detecta durante la PCR en tiempo real mediante la liberación del grupo fluorescente de la sonda TaqMan™. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, que también destruye los amplicones diana originales (Figura 76, etapa E). Solamente se amplifican los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de la LDR, lo que proporciona protección adicional contra arrastres.

Las Figuras 77 y 78 ilustran reacciones RT-PCR-LDR-qPCR y RT-PCR-qLDR con prevención de arrastres similares para detectar transcritos de deleción de bajo nivel como se ha descrito y se muestra con respecto a la Figura 76. En la realización de la Figura 77, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón se han diseñado para contener secuencias de cebadores UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura correspondientes a los transcritos deleción posteriormente se amplifican, se detectan y se cuantifican utilizando la PCR en tiempo real con cebadores específicos UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y como se ilustra en la Figura 77, etapas E-G. En la realización de la Figura 78, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón de un par de ligadura contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 78, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos (D, F2) donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 78, etapa E).

La Figura 79 ilustra una visión general de la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar el corte y empalme alternativo con inserción de intrones. La Figura 79, etapa A, muestra una ilustración de un gen con 5 exones y 4 intrones en el ADN. La Figura 79, etapa B, muestra ejemplos del transcrito natural que contiene los exones 1-5 (parte superior) y el transcrito de corte y empalme alternativo que contiene los exones 1-5 con inserción de un intrón i1 (parte inferior). Este método implica aislar el ARNm a partir de eritrocitos completos, exosomas o CTC, y generar ADNc usando transcriptasa inversa con un cebador complementario del exón 2 como se muestra en la Figura 79, etapa B. El ADNc se amplifica por PCR usando el cebador específico del exón 2 junto con un cebador directo del exón 1, para generar amplicones tanto de la variante natural como de la inserción del intrón. Como se muestra en la Figura 79, etapa C, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen secuencias

del cebador marcador (Ai, Ci'; panel izquierdo) o cebador UniTaq y secuencias marcadoras (Ai, Bi'-Ci'; panel derecho) se hibridan con su correspondiente secuencia diana en los productos de la PCR, y la ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí si son perfectamente complementarios en la unión. Los productos de ligadura se amplifican y detectan usando cebadores específicos de la marca (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q o F2-Q; Figura 79, etapa D, panel izquierdo) o cebadores UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, F2-Bi-Q-Ai y Ci, Figura 79, etapa D, panel derecho), como se ha descrito anteriormente.

La Figura 80 ilustra una reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar transcritos naturales y transcritos de corte y empalme alternativo que contienen una inserción de intrón. La Figura 80, etapa B, muestra ejemplos del transcrito natural que contiene los exones 1-5 (parte superior) y el transcrito de corte y empalme alternativo que contiene los exones 1-5 con inserción de un intrón i1 (parte inferior). Este método implica aislar el ARNm y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 80, etapa B). El ADNc se genera usando un cebador específico de transcrito en 3' (por ejemplo, un cebador específico del exón 2) y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. El ADNc se amplifica por PCR usando el cebador específico del exón 2 junto con un cebador directo del exón 1 para generar amplicones de variantes tanto naturales como la variante de inserción de intrón. Se lleva a cabo una amplificación por PCR limitada (12-20 ciclos) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 80, etapa B). En otra realización, las regiones de interés se amplifican utilizan 20-40 ciclos. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 80, etapa C). Como se muestra en la Figura 80, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen partes específicas del cebador marcador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de la base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 80, etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para la detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q y F2-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 80, etapa E-F). La variante natural y la de inserción se cuantifican y distinguen usando PCR en tiempo real y detectando las sondas TaqMan™ marcadas diferencialmente. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, que también destruye los amplicones diana originales (Figura 80, etapa E). Solamente se amplifican los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de la LDR, lo que proporciona protección adicional contra arrastres.

La Figura 81 ilustra otra reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar transcritos naturales y transcritos de corte y empalme alternativo que contienen una inserción de intrón. La Figura 81, etapa B, muestra ejemplos del transcrito natural que contiene los exones 1-5 (parte superior) y el transcrito de corte y empalme alternativo que contiene los exones 1-5 con inserción de un intrón i1 (parte inferior). Las etapas A-D de este método son esencialmente las mismas que se han descrito para la Figura 80, salvo que las sondas de ligadura específicas de la unión del exón se han diseñado para contener secuencias de cebadores UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura correspondientes a los transcritos natural y variante posteriormente se amplifican, se detectan y se cuantifican utilizando la PCR en tiempo real con cebadores específicos UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y se ha ilustrado en la Figura 81, etapas E-G.

La Figura 82 ilustra una reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre para cuantificar transcritos naturales y transcritos de corte y empalme alternativo que contienen una inserción de intrón. La Figura 82, etapa B, muestra ejemplos del transcrito natural que contiene los exones 1-5 (parte superior) y el transcrito de corte y empalme alternativo que contiene los exones 1-5 con inserción de un intrón i1 (parte inferior). Este método implica aislar el ARNm y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 82, etapa B). El ADNc se genera usando un cebador específico de transcrito en 3' (por ejemplo, un cebador específico del exón 2) y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. El ADNc se amplifica por PCR usando el cebador específico del exón 2 junto con un cebador directo del exón 1 para generar amplicones de variantes tanto naturales como la variante de inserción de intrón. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores y porciones específicas de cebadores universales para permitir una posterior amplificación universal por PCR usando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 82, etapa C). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la región de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la unión al exón, como se ilustra en la Figura 82, etapa D. En esta realización, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón de un par de ligadura contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 82, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 82, etapa E).

La Figura 83 ilustra una reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar transcritos de bajo nivel que contienen una inserción de intrones. La Figura 83, etapa B, muestra ejemplos del transcrito natural que contiene los exones 1-5 (parte superior) y el transcrito de corte y empalme alternativo que contiene los exones 1-5 con inserción de un intrón i1 (parte inferior). Este método implica aislar el ARNm y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 83, etapa B). El ADNc se genera usando un cebador específico de transcrito en 3' (por ejemplo, un cebador específico del exón 2) y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. El ADNc se amplifica por PCR usando

el cebador del exón 2 junto con un cebador directo específico del intrón. El cebador específico de intrón no amplifica el transcrito natural, sino solamente se amplifica el transcrito que contiene la inserción del intrón i1. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 83, etapa C). Como se muestra en la Figura 83, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de la unión del exón que contienen partes específicas del cebador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de la base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 83, etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 83, etapa E-F). El transcrito que contiene la inserción de intrón se detecta durante la PCR en tiempo real mediante la liberación del grupo fluorescente de la sonda TaqMan™. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, que también destruye los amplicones diana originales (Figura 83, etapa E). Solamente se amplifican los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de la LDR, lo que proporciona protección adicional contra arrastres.

Las Figuras 84 y 85 ilustran reacciones RT-PCR-LDR-qPCR y RT-PCR-qLDR con prevención de arrastres similares para detectar transcritos de una inserción de intrón de bajo nivel como se ha descrito y se muestra con respecto a la Figura 83. En la realización de la Figura 84, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón se han diseñado para contener secuencias de cebadores UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura correspondientes al transcrito de inserción de intrón posteriormente se amplifican, se detectan y se cuantifican utilizando la PCR en tiempo real con cebadores específicos UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y como se ilustra en la Figura 84, etapas E-G. En la realización de la Figura 85, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón de un par de ligadura contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 85, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos (D, F1) donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 85, etapa E).

Los métodos de la presente invención son adecuados para cuantificar o enumerar la cantidad de la una o más secuencias de nucleótidos diana en una muestra. Por ejemplo, los métodos de la presente invención se pueden utilizar para enumerar el número de copias relativo de una o más moléculas de ácidos nucleicos diana en una muestra como se ilustra en las Figuras 86-91.

La Figura 86 ilustra la reacción PCR-LDR con prevención de arrastre para enumerar el número de copias de ADN. Este método implica aislar el ADN a partir de las CTC, exosomas específicos de tumor u otras muestras biológicas, y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 86, etapa B). Las regiones cromosómicas de interés se amplifican usando ciclos de la PCR limitados (12-20 ciclos) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 86, etapa B). En otra realización, las regiones cromosómicas de interés se amplifican utilizan 20-40 ciclos. Para una enumeración precisa, la muestra se dispersa entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la amplificación por PCR. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 86, etapa C). Como se muestra en la Figura 86, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de locus que contienen partes específicas del cebador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de la base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 86, etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 86, etapa E-F). El número de copias de ADN se determina basándose en la distribución de Poisson de la señal entre los diferentes pocillos o cámaras. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, que también destruye los amplicones diana originales (Figura 86, etapa E). Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de la LDR, lo que proporciona protección adicional contra arrastres.

La Figura 87 ilustra otra reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para enumerar el número de copias de ADN. Este método implica esencialmente las mismas etapas (es decir, las etapas A-D) que el método ilustrado en la Figura 86; sin embargo, en esta realización, las sondas de ligadura específicas de locus se han diseñado para contener secuencias de cebadores UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura posteriormente se amplifican, se detectan y se cuantifican utilizando la PCR en tiempo real con cebadores específicos UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y se ha ilustrado en la Figura 87, etapas E-G. El número de copias se determina basándose en la distribución de Poisson de la señal entre los diferentes pocillos o cámaras.

La Figura 88 también ilustra la reacción PCR-qPCR con prevención de arrastre para enumerar el número de copias de ADN. Este método implica aislar el ADN a partir de las CTC, exosomas específicos de tumor u otras muestras biológicas, y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 88, etapa B). Las regiones cromosómicas de interés se amplifican usando ciclos de la PCR limitados (12-20 ciclos) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 88, etapa B). En otra realización, las regiones cromosómicas de interés se amplifican

utilizan 20-40 ciclos. Para una enumeración precisa, la muestra se dispersa entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la amplificación por PCR. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores y porciones específicas de cebadores universales para permitir una posterior amplificación universal por PCR usando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 88, etapa C). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la región de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de locus, como se ilustra en la Figura 88, etapa D. En esta realización, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón de un par de ligadura contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 88, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 88, etapa E). El número de copias se determina basándose en la distribución de Poisson de la señal entre los diferentes pocillos o cámaras.

La Figura 89 ilustra la reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para enumerar el número de copias de ARN. Este método implica aislar el ARN a partir de eritrocitos completos, exosomas, CTS u otra muestra biológica, y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 89, etapa B). El ADNc se genera usando cebadores específicos de transcrito en 3' y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. La polimerasa Taq se activa para realizar ciclos limitados de amplificación por PCR (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 89, etapa B). Para una enumeración precisa, la muestra se dispersa entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la amplificación por PCR. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 89, etapa C). Como se muestra en la Figura 89, etapa D, sondas de oligonucleótidos de ligadura específicas de locus que contienen partes específicas del cebador marcador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de la base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 89, etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 89, etapa E-F). El número de copias de ARN se cuantifica por PCR en tiempo real basándose en la distribución de Poisson de la señal entre los diferentes pocillos o cámaras. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, que también destruye los amplicones diana originales (Figura 89, etapa E). Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR cuando se utilice la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de la LDR, lo que proporciona protección adicional contra arrastres.

La Figura 90 ilustra otra reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para enumerar el número de copias de ARN. Para una enumeración precisa, la muestra se dispersa entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la amplificación por PCR. Este método implica esencialmente las mismas etapas (es decir, las etapas A-D) que el método ilustrado en la Figura 89; sin embargo, en esta realización, las sondas de ligadura específicas de locus se han diseñado para contener secuencias de cebadores UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura posteriormente se amplifican, se detectan y se cuantifican utilizando la PCR en tiempo real con cebadores específicos UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y se ha ilustrado en la Figura 90, etapas E-G. El número de copias se determina basándose en la distribución de Poisson de la señal entre los diferentes pocillos o cámaras.

La Figura 91 ilustra la reacción RT-PCR-qPCR con prevención de arrastre para enumerar el número de copias de ARN. Este método implica aislar el ARN a partir de eritrocitos completos, exosomas, CTC u otras muestras biológicas, y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 91, etapa B). Para una enumeración precisa, la muestra se dispersa entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la amplificación por PCR. El ADNc se genera usando cebadores específicos del transcrito en 3' y transcriptasa inversa en presencia de dUTP. La polimerasa Taq se activa para realizar ciclos limitados de amplificación por PCR (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones (Figura 91, etapa B). Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores y porciones específicas de cebadores universales para permitir una posterior amplificación universal por PCR usando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 91, etapa C). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la región de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de locus, como se ilustra en la Figura 91, etapa D. En esta realización, las sondas de ligadura específicas de la unión del exón de un par de ligadura contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 91, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 91, etapa E). El número de copias se determina basándose en la distribución de Poisson de la señal entre los diferentes pocillos o cámaras. Otro aspecto de la presente divulgación se dirige a un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos microrribonucleicos (miARN) que contienen una secuencia de microrribonucleótidos diana que se diferencia de las secuencias de microrribonucleótidos en otras moléculas de

miARN de la muestra en una o más bases. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de miARN que contienen potencialmente la secuencia de microrribonucleótidos diana que se diferencia de las secuencias de microrribonucleótidos en otras moléculas de miARN de la muestra en una o más bases, y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU potencialmente presentes en la muestra. Se proporcionan uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de cebadores (a) un primer cebador de oligonucleótidos que tiene una porción en horquilla en 5', un grupo bloqueante, una porción interna específica del cebador en la región del bucle, y una porción de la secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de una porción en 3' de la molécula de miARN que contiene la secuencia de microrribonucleótidos diana, (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que tiene una porción de la secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de un complemento del extremo 5' de la molécula de miARN que contiene la secuencia de microrribonucleótidos diana, y una porción específica del cebador en 5', (c) un tercer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción interna específica del cebador del primer cebador de oligonucleótidos, y (d) un cuarto cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción del cebador en 5' del segundo cebador de oligonucleótidos. La muestra contactada se mezcla con el uno o más primeros cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una transcriptasa inversa para formar una mezcla de reacción de transcripción inversa. El primer cebador de oligonucleótidos se hibrida con la molécula de miARN que contiene la secuencia de microrribonucleótidos diana, si está presente en la muestra, y la transcriptasa inversa extiende el extremo 3' del primer cebador de oligonucleótidos hibridado para generar un primer cebador de oligonucleótidos extendido que comprende el complemento de la de la molécula de miARN que contiene la secuencia de microrribonucleótidos diana. El método implica además combinar la mezcla de reacción de la transcripción inversa con el segundo, el tercero, y el cuarto cebador de oligonucleótidos del conjunto de cebadores para formar una mezcla de reacción de la polimerasa en condiciones eficaces para que el uno o más segundos cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores se hibride con la región del primer cebador de oligonucleótidos extendido que comprende el complemento de la de la molécula de miARN que contiene la secuencia de microrribonucleótidos diana y que se extienda para generar un producto de extensión primario que comprende la porción específica del cebador en 5', una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de microrribonucleótidos diana de la molécula de miARN, y el complemento de la porción interna específica del cebador. La mezcla de reacción en cadena de la polimerasa se somete a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación, y un tratamiento de extensión, formando de esta manera una pluralidad de productos de extensión primarios. El método implica además combinar la pluralidad de productos de extensión primarios con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura. Cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana y (b) una segunda sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana y una porción complementaria de un producto de extensión primario, en el que la primera y segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configura para hibridarse, de forma específica de la base, adyacentes entre sí sobre porciones complementarias específicas de diana de un producto de extensión primario con una unión entre las mismas. Las primera y segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de producto ligadas en la mezcla de la reacción de ligadura, y las secuencias de producto ligadas de las muestras se detectan y se distinguen para identificar de esta forma una o más moléculas de miARN que contienen una secuencia de microrribonucleótidos diana que difieren de las secuencias de microrribonucleótidos de otras moléculas de miARN de la muestra en una o más bases.

La Figura 92 ilustra una reacción de PCR-LDR con prevención de arrastre para cuantificar el miARN. Este método implica aislar el ARN de exosomas específicos de tumor u otras muestras biológicas, y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 92, etapa B). Un cebador de oligonucleótidos que tiene una porción que es complementaria del extremo 3' del miARN diana, y que contiene una horquilla, una marca (Tj), y un grupo bloqueante (círculo relleno) se hibrida con el extremo 3' del miARN diana. El extremo 3' del cebador de oligonucleótidos se extiende usando transcriptasa inversa (rombos rellenos) en presencia de dUTP (Figura 92, etapa B). La polimerasa Taq se activa para realizar ciclos limitados de amplificación por PCR (12-20) usando un cebador puente que comprende una secuencia que es complementaria de una parte del miARN transcrito de forma inversa y una porción de secuencia específica del cebador en dirección 5' (Ti), y cebadores marcadores (Ti, Tj) como se muestra en la Figura 92, etapa B. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Opcionalmente, la muestra se puede distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos de la PCR incorporan dUTP, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 92, etapa C). Como se muestra en la Figura 92, etapa D, sondas de ligadura específicas de la secuencia de miARN que contienen partes específicas del cebador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana en los productos de la PCR de forma específica de la base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 92, etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 92, etapa E-F). La presencia de miARN en la muestra se cuantifica usando la PCR en tiempo real basándose en la detección de la etiqueta liberada de la sonda TaqMan™. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, que también destruye los amplicones diana originales (Figura 92, etapa E). Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de la LDR, lo que proporciona protección adicional contra arrastres.

La Figura 93 ilustra otra reacción de RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar el miARN. Este método implica esencialmente las mismas etapas (es decir, las etapas A-D) que el método ilustrado en la Figura 92; sin embargo, en esta realización, las sondas de ligadura específicas de miARN se han diseñado para contener secuencias del cebador UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura posteriormente se amplifican, se detectan y se cuantifican usando PCR en tiempo real con cebadores específicos de UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y se ha ilustrado en la Figura 93, etapas E-G.

La Figura 94 también ilustra una reacción de RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre para cuantificar el miARN. Este método implica aislar el ARN de exosomas específicos de tumor u otras muestras biológicas, y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 94, etapa B). Un cebador de oligonucleótidos que tiene una porción que es complementaria del extremo 3' del miARN diana, y que contiene una horquilla, una marca (Tj), y un grupo bloqueante (círculo relleno) se hibrida con el extremo 3' del miARN diana. El extremo 3' del cebador de oligonucleótidos se extiende usando transcriptasa inversa (rombos rellenos) en presencia de dUTP (Figura 94, etapa B). La polimerasa Taq se activa para realizar ciclos limitados de amplificación por PCR (12-20) usando un cebador puente que comprende una secuencia que es complementaria de una parte del miARN transcrito de forma inversa y una porción de secuencia específica del cebador en dirección 5' (Ti), y cebadores marcadores (Ti, Tj) como se muestra en la Figura 94, etapa B. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores y porciones específicas de cebadores universales para permitir una posterior amplificación universal por PCR usando cebadores marcados con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 94, etapa C). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la región de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la secuencia de miARN, como se ilustra en la Figura 94, etapa D. En esta realización, las sondas de ligadura específicas de la secuencia de miARN contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 94, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 94, etapa E).

Otro aspecto de la presente divulgación se dirige a un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos microrribonucleicos (miARN) que contienen una secuencia de microrribonucleótidos diana que se diferencian en su secuencia de otras moléculas de miARN de la muestra en una o más bases. Este método implica proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de miARN que contienen potencialmente una secuencia de microrribonucleótidos diana que se diferencian en su secuencia de otras moléculas de miARN por diferencias en una o más bases, y poner en contacto la muestra con una o más enzimas capaces de digerir moléculas de ácidos nucleicos que contienen dU potencialmente presentes en la muestra. La muestra contactada se combina con una ligasa y una primera sonda de oligonucleótidos que comprende un fosfato en 5', una porción de horquilla en 5', una porción interna específica de cebador en la región del bucle, un grupo bloqueante y una secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de una porción en 3' de la molécula de miARN que contiene una secuencia de microrribonucleótidos diana para formar una reacción de ligadura. El método implica además ligar la molécula de miARN que contiene una secuencia de microrribonucleótidos diana por su extremo 3' al fosfato en 5' de la primera sonda de oligonucleótidos para generar una molécula de ácidos nucleicos quimérica que comprende la molécula de miARN que contiene una secuencia de microrribonucleótidos diana, si está presente en la muestra, agregada a la primera sonda de oligonucleótidos. Se proporcionan uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos, comprendiendo cada conjunto de cebadores (a) un primer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos en 3' que es complementaria de un complemento del extremo 5' de la molécula de miARN que contiene una secuencia de microrribonucleótidos diana, y una porción específica del cebador en 5', (b) un segundo cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la porción interna específica del cebador de la primera sonda de oligonucleótidos, y (c) un tercer cebador de oligonucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción específica del cebador en 5' del primer cebador de oligonucleótidos. La molécula de ácidos nucleicos quimérica se combina con el uno o más segundos cebadores de oligonucleótidos, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una transcriptasa inversa para formar una mezcla de reacción de transcripción inversa, en la que el uno o más segundos cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores se hibrida con la porción interna específica del cebador de la molécula de ácidos nucleicos quimérica, y se extiende por su extremo 3' para generar un complemento de la molécula de ácido nucleico quimérica, si está presente en la muestra. El método implica además combinar la mezcla de reacción de la transcripción inversa con el primer y el tercer cebadores de oligonucleótidos de un conjunto de cebadores para formar una mezcla de reacción de la polimerasa, y someter la mezcla de reacción en cadena de la polimerasa a uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera productos de extensión primarios. Los productos de extensión primarios comprenden la porción específica del cebador en 5', una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de microrribonucleótidos diana de la molécula de miARN, y la porción interna específica del cebador o sus complementos. Los productos de extensión primarios se combinan con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de la reacción de ligadura. Cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana y (b) una segunda

sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de la diana y una porción complementaria de un producto de extensión primario, en el que la primera y segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configura para hibridarse, de forma específica de la base, adyacentes entre sí sobre porciones complementarias específicas de diana de un producto de extensión primario con una unión entre las mismas. Las primera y segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de producto ligadas en la mezcla de la reacción de ligadura, y las secuencias de producto ligadas de las muestras se detectan y se distinguen para identificar de esta forma una o más moléculas de miARN que contienen una secuencia de microrribonucleótidos diana que difieren en su secuencia de otras moléculas de miARN de la muestra en una o más bases.

La Figura 95 ilustra otra reacción de Ligadura-RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar el miARN. Este método implica aislar el ARN de exosomas y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 95, etapa B). Una sonda de oligonucleótidos que tiene una porción que es complementaria del extremo 3' del miARN diana, y que contiene una horquilla, una marca (Tj'), y un grupo bloqueante (círculo relleno) se liga por su extremo 5' con el extremo 3' del miARN diana. El producto de ligadura comprende el miARN, la marca Tj', el grupo bloqueante, y una secuencia complementaria de la parte en 3' del miARN (Figura 95, etapa B). El ADNc se genera usando un cebador de Tj' y transcriptasa inversa. El ADNc se amplifica con la polimerasa Taq en una amplificación por PCR con ciclos limitados (12-20 ciclos) usando un cebador puente que comprende una secuencia que es complementaria de una parte del miARN transcrito de forma inversa y una porción de secuencia específica del cebador en dirección 5' (Ti) y cebadores marcadores (Ti, Tj) como se muestra en la Figura 95, etapa B. Como alternativa, el ADNc se amplifica usando 20-40 ciclos de la PCR. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Opcionalmente, la muestra se puede distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 95, etapa C).

Como se muestra en la Figura 95, etapa D, sondas de ligadura específicas de la secuencia de miARN que contienen partes específicas del cebador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de la base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 95, etapa D), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 95, etapa E-F). La presencia de miARN en la muestra se cuantifica usando la PCR en tiempo real basándose en la detección de la etiqueta liberada de la sonda TaqMan™. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, que también destruye los amplicones diana originales (Figura 95, etapa E). Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de la LDR, lo que proporciona protección adicional contra arrastres.

La Figura 96 ilustra otra reacción de Ligadura-RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar el miARN. Este método implica esencialmente las mismas etapas (es decir, las etapas A-D) que el método ilustrado en la Figura 95; sin embargo, en esta realización, las sondas de ligadura específicas de miARN se han diseñado para contener secuencias del cebador UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura posteriormente se amplifican, se detectan y se cuantifican usando PCR en tiempo real con cebadores específicos de UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y se ha ilustrado en la Figura 96, etapas E-G.

La Figura 97 ilustra una reacción de Ligadura-RT-PCR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar el miARN. Este método implica esencialmente las mismas etapas, es decir, las etapas A y B, que se han descrito e ilustrado en la Figura 95. Sin embargo, en esta realización, el ADNc que se ha producido en la etapa B se amplifica usando al menos un cebador etiquetado con biotina para agregar una biotina en 5' a los productos de amplificación que contienen la región de interés. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 97, etapa C). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la región de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la secuencia de miARN, como se ilustra en la Figura 97, etapa D. En esta realización, las sondas de ligadura específicas de la secuencia de miARN contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 97, etapa D), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 97, etapa E).

La Figura 98 ilustra otra reacción de Ligadura-RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar el miARN. Este método implica aislar el ARN de exosomas específicos de tumor u otras muestras biológicas, y tratarlo con UDG para prevención de arrastres (Figura 98, etapa B). Una sonda de oligonucleótidos que tiene una porción que es complementaria del extremo 3' del miARN diana, y que contiene una horquilla, una marca (Tj'), y un grupo bloqueante (círculo relleno) se liga por su extremo 5' con el extremo 3' del miARN diana. El producto de ligadura comprende el miARN, la marca Tj', el grupo bloqueante, y una secuencia complementaria de la parte en 3' del miARN (Figura 98, etapa B). El ADNc se genera usando cebador Tj y transcriptasa inversa. El ADNc se amplifica con la polimerasa Taq en una amplificación por PCR con ciclos limitados (12-20 ciclos) usando un cebador puente que

comprende una secuencia que es complementaria de una parte del miARN transcrito de forma inversa y una porción de secuencia específica del cebador en dirección 5' (Ti) y cebadores marcadores (Ti, Tj), donde el cebador puede contiene un grupo bloqueante escindible en su extremo 3' como se muestra en la Figura 98, etapa C. Como alternativa, el ADNc se amplifica usando 20-40 ciclos de la PCR. Como se ha descrito anteriormente, el separador C3 es un grupo bloqueante adecuado, y una base de ARN (r) se escinde usando ARNasaH (símbolo de estrella) solamente cuando el cebador se hibrida con su diana complementaria. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Opcionalmente, la muestra se puede distribuir por alícuotas entre 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 98, etapa D).

Como se muestra en la Figura 98, etapa E, sondas de ligadura específicas de la secuencia de miARN que contienen partes específicas del cebador (Ai, Ci') adecuadas para la posterior amplificación por PCR, se hibridan con su correspondiente secuencia diana de forma específica de la base. La ligasa sella covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí (Figura 98, etapa E), y los productos de ligadura se distribuyen en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando cebadores marcadores (Ai, Ci) y sondas TaqMan™ (F1-Q) que expanden la unión de ligadura (Figura 98, etapa F-G). La presencia de miARN en la muestra se cuantifica usando la PCR en tiempo real basándose en la detección de la etiqueta liberada de la sonda TaqMan™. Las muestras se tratan con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales (Figura 98, etapa F). Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se utiliza la PCR en presencia de dUTP. Ni los cebadores de PCR originales ni las sondas de LDR amplifican los productos de la LDR, lo que proporciona protección adicional contra arrastres.

La Figura 99 ilustra otra reacción de Ligadura-RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar el miARN. Este método implica esencialmente las mismas etapas (es decir, las etapas A-E) que el método ilustrado en la Figura 98; sin embargo, en esta realización, las sondas de ligadura específicas de miARN se han diseñado para contener secuencias del cebador UniTaq (Ai, Ci') y una secuencia marcadora UniTaq (Bi'). En consecuencia, en esta realización, los productos de ligadura posteriormente se amplifican, se detectan y se cuantifican usando PCR en tiempo real con cebadores específicos de UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci) como se ha descrito anteriormente y se ha ilustrado en la Figura 99, etapas F-H.

La Figura 100 ilustra otra reacción de Ligadura-RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para cuantificar el miARN. Este método implica esencialmente las mismas etapas, es decir, las etapas A y B, que se han descrito e ilustrado en la Figura 98. Sin embargo, en esta realización, el ADNc que se ha producido en la etapa B se amplifica usando al menos un cebador etiquetado con biotina para formar productos biotinilados que contienen la región de interés. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres (Figura 100, etapa D). Los productos de la PCR biotinilados se inmovilizan sobre un soporte sólido y la región de interés se detecta usando sondas de ligadura específicas de la secuencia de miARN, como se ilustra en la Figura 100, etapa E. En esta realización, las sondas de ligadura específicas de la secuencia de miARN contienen secuencias de cola complementarias y un grupo aceptor o donante, respectivamente, que pueden generar una señal detectable mediante FRET cuando se ponen muy cerca entre sí como se ha descrito más arriba. En consecuencia, tras la ligadura (Figura 100, etapa E), los extremos de cola complementarios en 5' y 3' de los productos de ligadura se hibridan entre sí poniendo sus respectivos restos donante y aceptor muy cerca uno de otro para generar una señal FRET detectable (Figura 100, etapa F).

Como se describe con más detalle en el presente documento, el método de la presente invención puede detectar moléculas de ácidos nucleicos con baja abundancia que comprenden, en una o más base nucleotídicas, mutaciones, inserciones, deleciones, translocaciones, variantes de corte y empalme, variantes de miARN, transcritos alternativos, sitios de inicio alternativos, secuencias codificantes alternativas, secuencias no codificantes alternativas, cortes y empalmes alternativos, inserciones de exones, deleciones de exones, inserciones de intrones, otras redisposiciones en el genoma, y/o bases nucleotídicas metiladas.

Tal como se usa en el presente documento "molécula de ácidos nucleicos con baja abundancia" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos diana que está presente en niveles tan bajos como del 1 % al 0,01 % de la muestra. En otras palabras, una molécula de ácidos nucleicos con baja abundancia que tiene, en una o más bases nucleotídicas, mutaciones, inserciones, deleciones, translocaciones, variantes de corte y empalme, variantes de miARN, transcritos alternativos, sitios de inicio alternativos, secuencias codificantes alternativas, secuencias no codificantes alternativas, cortes y empalmes alternativos, inserciones de exones, deleciones de exones, inserciones de intrones, otras redisposiciones en el genoma, y/o bases nucleotídicas metiladas, se pueden distinguir entre un exceso de 100 a 10.000 veces de moléculas de ácidos nucleicos en la muestra (es decir, molécula de ácidos nucleicos con alta abundancia) que tienen una secuencia de nucleótidos similar a la de las moléculas de ácidos nucleicos con baja abundancia pero que no tienen, en una o más bases nucleotídicas, mutaciones, inserciones, deleciones, translocaciones, variantes de corte y empalme, variantes de miARN, transcritos alternativos, sitios de inicio alternativos, secuencias codificantes alternativas, secuencias no codificantes alternativas, cortes y empalmes alternativos, inserciones de exones, deleciones de exones, inserciones de intrones, otras redisposiciones en el genoma, y/o bases nucleotídicas metiladas.

En algunas realizaciones de la presente invención, el número de copias de una o más secuencias de nucleótidos diana

con baja abundancia se cuantifican con respecto al número de copias de moléculas de ácidos nucleicos con alta abundancia en la muestra que tengan una secuencia de nucleótidos similar a la de las moléculas de ácidos nucleicos con baja abundancia. En otras realizaciones de la presente invención, la una o más secuencias de nucleótidos diana se cuantifican con respecto a otras secuencias de nucleótidos de la muestra. En otras realizaciones de la presente invención, se cuantifica el número de copias relativo de una o más secuencias de nucleótidos diana. Los métodos de cuantificación relativa y absoluta (es decir, número de copias) son bien conocidos en la técnica.

Las moléculas de ácidos nucleicos con baja abundancia a detectar pueden estar presentes en cualquier muestra biológica, incluyendo, aunque no de forma limitativa, tejido, células, suero, sangre, plasma, fluido amniótico, esputo, orina, fluidos corporales, secreciones corporales, excreciones corporales, ácidos nucleicos en circulación exentos de células, ácidos nucleicos tumorales en circulación exentos de células, ácidos nucleicos fetales en circulación exentos de células en mujeres embarazadas, células tumorales en circulación, tumor, biopsia tumoral y exosomas.

Los métodos de la presente invención son adecuados para diagnosticar o pronosticar una patología y/o para distinguir un genotipo o predisposición a una enfermedad.

Con respecto a la detección temprana del cáncer, los métodos de la presente invención son adecuados para detectar tanto mutaciones repetidas en genes conocidos (por ejemplo, CRAF, KRAS), como mutaciones poco frecuentes en genes desconocidos (por ejemplo, p53) cuanto están presentes en del 1 % al 0,01 % de la muestra. Los métodos de la presente invención también pueden conseguir una cuantificación precisa del ARNm específico de tumor aislado de exosomas (por ejemplo, una docena de marcadores de expresión que diferencian el tejido tumoral de colon de la correspondiente mucosa normal), y ARNm específico de tumor aislado de exosomas o proteínas Argonauta (por ejemplo, una docena de marcadores de microARN que diferencian el tejido tumoral de colon de la correspondiente mucosa normal). Los métodos de la presente invención también abordan la cuantificación precisa de los cambios en el número de copias específico de tumor en el ADN aislado de células tumorales en circulación (por ejemplo, una docena de marcadores de expresión que diferencian el tejido tumoral de colon de la correspondiente mucosa normal), y la detección de mutaciones en el ADN aislado de células tumorales en circulación (por ejemplo, genes KRAS, BRAF, AKT, p53, BRCA1).

La presente invención también puede cuantificar con precisión (i) ARNm específico de tumor aislado de exosomas o células tumorales en circulación, (ii) miARN específico de tumor aislado de exosomas o proteínas Argonauta, y (iii) cambios en el número de copias específico de tumor en el ADN aislado de células tumorales en circulación que pueden predecir el resultado o guiar el tratamiento. La presente invención también puede detectar mutaciones en el ADN aislado de células tumorales en circulación, por ejemplo, genes KRAS, BRAF, AKT, p53, BRCA1 u otros genes que pueden predecir el resultado o guiar el tratamiento.

Con respecto al diagnóstico prenatal, los métodos de la presente invención pueden detectar la aneuploidía mediante el recuento del número de copias (por ejemplo, Trisomía 21), enfermedades hereditarias que contienen mutaciones frecuentes en genes conocidos (por ejemplo, anemia de células falciformes, fibrosis quística), enfermedades hereditarias que contienen mutaciones poco frecuentes en genes conocidos (por ejemplo, poliposis adenomatosa familiar), enfermedades heredadas que proceden de un aumento o pérdida en el número de copias conocido o esporádico en genes conocidos (por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne), y pruebas de paternidad.

Un aspecto importante de implementar los ensayos anteriormente descritos en un escenario clínico es la reducción en la cantidad de mano de obra necesaria para rellenar filas y columnas con muestras, reactivos, y sondas/cebadores específicos del ensayo. Las placas de noventa y seis pocillos son las habituales en la mayoría de laboratorios, pero las placas de 384 pocillos proporcionan un rendimiento más elevado y una reducción en el coste por cada pocillo de ensayo. Parte de los impedimentos de su adopción ha sido el aumento de mano de obra asociado a estas placas, que se puede resolver mediante robots de pipeteo pero con una considerable inversión de capital. Dependiendo de la configuración específica de los ensayos en la placa, también se incurren en gastos notables debido al aumento en el uso de puntas de pipeta. Una realización de los ensayos descritos anteriormente requiere la dispersión de 24 reacciones de la PCR-LDR multiplexada entre las 24 columnas de una placa de microtitulación, seguido por la dispersión de 16 conjuntos diferentes de sondas marcadoras LDR a través de las filas de la placa. Esta configuración del ensayo exigiría 48 administraciones mediante un pipeteador de 8 puntas para llenar las columnas y después 48 administraciones mediante un pipeteador de 8 puntas para llenar todas las filas. Las placas de 1536 pocillos tienen la ventaja de reducir el coste de un ensayo aún más, pero exigen el llenado automatizado ya que esto está más allá de las capacidades mecánicas de un operador humano. Se han comercializado dispositivos que permiten el llenado simultáneo de muchas filas y columnas con un número reducido de etapas de pipeteo mediante el uso de dispositivos de microfluidos que utilizan canales de volumen muerto bajo que introducen líquidos en cada "pocillo", pero requieren la complicación adicional de válvulas y motores de válvulas externos. Evidentemente, se precisa un enfoque diferente.

Otro aspecto más de la presente divulgación es un dispositivo para su uso junto con una placa de microtitulación para añadir líquidos simultáneamente a dos o más pocillos de una fila y/o columna de una placa de microtitulación que tiene superficies superior e inferior opuestas, teniendo la superficie superior aberturas que conducen a los pocillos y definiendo la superficie inferior los extremos cerrados de los pocillos. El dispositivo comprende una primera capa definida por un primer y un segundo límite con cámaras de medida que se extienden entre el primer y el segundo límite

de dicha primera capa y en comunicación de fluidos entre sí. La primera capa se configura para situarse, en una posición operativa, cerca de la placa de microtitulación estando el primer límite de la primera capa más cerca de la superficie superior de la placa de microtitulación y estando cada una de las cámaras de medida en comunicación de fluidos con un pocillo individual de una fila y/o columna de la placa de microtitulación. La primera capa comprende además una cámara de llenado en comunicación de fluidos con una o más de las cámaras de medida. El dispositivo comprende una segunda capa definida por un primer y segundo límite con un puerto de llenado que se extiende entre el primer y el segundo límite de la segunda capa. La segunda capa se configura para situarse, en una posición operativa, cerca de la primera capa estando el primer límite de la segunda capa más cerca del segundo límite de la primera capa y estando alineado el puerto de llenado con la cámara de llenado. Cuando la primera capa, la segunda capa y la placa de microtitulación se sitúan unas con respecto a otras en sus posiciones operativas, el líquido que entra en el dispositivo a través del puerto de llenado pasará a través de la cámara de llenado, las cámaras de medida, y se dirigirá a dos o más pocillos de una fila y/o columna de la placa de microtitulación.

En algunas realizaciones, el dispositivo de la presente divulgación comprende una capa intermedia que tiene un primer y segundo límite con pasos de la capa intermedia que se extienden entre el primer y el segundo límite de dicha capa. La capa intermedia se configura para situarse, en una posición operativa, entre la placa de microtitulación y la primera capa, con el primer límite de la capa intermedia adyacente a la superficie superior de la placa de microtitulación y el segundo límite de la capa intermedia adyacente al primer límite de la primera capa. Uno de los pasos de la capa intermedia está alineado con un pocillo individual de una fila y/o columna de la placa de microtitulación, donde, cuando la primera capa, la segunda capa, la capa intermedia y la placa de microtitulación están situadas unas con respecto a otras en sus posiciones operativas, el líquido que entra en el dispositivo a través del puerto de llenado pasará a través de la cámara de llenado, las cámaras de medida, los pasos de la capa intermedia y hacia el interior de los pocillos de la placa de microtitulación.

El dispositivo de la presente divulgación puede comprender además una tercera capa que tiene un primer y segundo límite con un conector del puerto de llenado que se extiende entre el primer y el segundo límite de la tercera capa. La tercera capa se configura para situarse, en una posición operativa, entre la primera capa y la segunda capa con el primer límite de la tercera capa adyacente al segundo límite de la primera capa y estando alineado el conector del puerto de llenado con el puerto de llenado. Cuando la primera capa, la segunda capa, la tercera capa, la capa intermedia y la placa de microtitulación están situadas unas con respecto a otras en sus posiciones operativas, el líquido que entra en el dispositivo a través del puerto de llenado pasará a través del conector del puerto de llenado, la cámara de llenado, las cámaras de medida, los pasos de la capa intermedia y hacia el interior de los pocillos de la placa de microtitulación.

Las Figuras 103-112 representan gráficamente una realización ilustrativa de la divulgación. La Figura 103 muestra una vista superior y lateral de una parte de una placa de microtitulación 100 de 384 pocillos típica que se ha utilizado junto con el dispositivo de la presente divulgación. La placa de microtitulación está definida por varios pocillos 103, teniendo cada pocillo un extremo superior abierto 104 que es adecuado para recibir muestra y/o reactivos de reacción, y un extremo inferior cerrado 102. La Figura 104 muestra una vista en perspectiva de la placa de microtitulación de la Figura 103.

Las Figuras 105 y 106 representan gráficamente vistas laterales superior e inferior y una vista en perspectiva con despiece ordenado, respectivamente, de la capa intermedia 106 del dispositivo situada adyacente a la superficie superior de la placa de microtitulación 100. La capa intermedia 106 del dispositivo contiene pasos intermedios 108 que se extienden a través de la capa intermedia. Cada paso intermedio 108 de la capa intermedia 106 está alineado con un pocillo 103 individual de una fila o columna de la placa de microtitulación 100. En una realización, los pasos de la capa intermedia funcionan como válvulas de control para controlar o evitar el flujo de líquido desde la cámara de medida a los pocillos de la placa de microtitulación. El diámetro del canal vertical de los pasos 108 de la capa intermedia producen una tensión superficial que evita que el líquido fluya al exterior de la cámara de medida 120 (véase la Figura 107) hasta que se aplica fuerza centrífuga. En algunas realizaciones, las paredes verticales de los pasos 108 de la capa intermedia están compuestos o están revestidos de material hidrófobo que aumenta la resistencia del fluido a fluir hacia afuera de la cámara de medida 120 hasta que se aplica fuerza centrífuga. Los materiales hidrófobos adecuados incluyen cualquier material con un ángulo de contacto con el agua ≥9 0°, tales como, por ejemplo, copolímero de olefina cíclica, polietileno, polipropileno, polidimetilsiloxano, etileno propileno fluorado, politetrafluoroetileno. Como alternativa, la pared de los pasos de la capa intermedia puede estar compuesta de un material hidrófilo que tiene un ángulo de contacto con el agua < 90°, pero tratado con un revestimiento hidrófobo, por ejemplo, Teflón-negro de carbono, para crear una superficie superhidrófoba que tienen ángulos de contacto con el agua > 150°.

El experto en la materia puede calcular fácilmente el cociente entre la resistencia de los pasos 108 de la capa intermedia y el volumen de la cámara de medida 120 (véase la Figura 107). De forma alternativa, se pueden emplear otras realizaciones de válvulas pasivas que liberal el líquido bajo la influencia de una fuerza aplicada externamente.

Como se representa gráficamente en las Figuras 105 y 106, la capa intermedia 106 también contiene un paso de desbordamiento 110 que conecta la cámara de desbordamiento 116 de la primera capa con la cámara de llenado 118 de la primera capa (véase la Figura 107).

La colocación y orientación adecuada del dispositivo sobre la superficie superior de una placa de microtitulación se consigue enclavando el dispositivo al perímetro de la parte superior de las placas de microtitulación como se muestra en la Figuras 101 y 102. El alineamiento adicional de cada una de las cámaras de medida se puede conseguir mediante el uso de bordes o rebordes 112 en la capa intermedia 106 que interactúan con el extremo abierto 104 de cada pocillo 103 de la placa de microtitulación 100 como se muestra en la vista lateral de la Figura 105. El experto en la técnica puede pensar en otras realizaciones de colocación, basándose por ejemplo en bordes pequeños situados en la parte superior de los pocillos de la placa de microtitulación. Aunque no se entiende que proporcionen un sellado hermético, los bordes o rebordes 112 de la capa intermedia 106 que se representan en la Figura 105 proporcionan cierta medida del control de la contaminación cruzada entre pocillos adyacentes de la placa de microtitulación 100.

Las Figuras 107 y 108 representan gráficamente vistas laterales superior e inferior y una vista en perspectiva con despiece ordenado, respectivamente, de la primera capa 114 del dispositivo, colocado operativamente adyacente al segundo límite de la capa intermedia 106 del dispositivo. La primera capa 114 del dispositivo contiene cámaras de medida 120 que están en comunicación de fluidos entre sí mediante los canales 122 de las cámaras de medida, y con los pocillos 103 individuales de la placa de microtitulación. Las cámaras de medida 120 tienen un volumen fijo para controlar el volumen de líquido suministrado a cada pocillo 103 de la placa de microtitulación 100. Las cámaras de medida 120 reciben líquido desde la cámara de llenado 118 por acción capilar del líquido o con fuerza mecánica, por ejemplo, la fuerza de un pipeteador que empuja el líquido al interior de la cámara de llenado 118. En una realización, todas las cámaras de medida 120 del dispositivo tienen el mismo volumen de medida. En otra realización, las cámaras de medida 120 tienen diferentes volúmenes de medida por fila y/o columna. Las paredes de la cámara de llenado, cámaras de medida, y los canales de las cámaras de medida pueden estar compuestos o revestidos de un material hidrófilo.

Como se ilustra en las Figuras 107 y 108, cada cámara de medida 120 está en comunicación de fluidos con los pocillos 103 de la placa de microtitulación mediante los pasos 108 de la capa intermedia. Como se ha descrito anteriormente, los pasos de la capa intermedia pueden funcionar como una válvula de control para evitar que el líquido de la cámara de medida 120 fluya al interior de los pocillos 103 de la placa de microtitulación 100 hasta que se aplique una fuerza adecuada, por ejemplo, fuerza centrífuga.

La primera capa 114 del dispositivo también contiene una cámara de desbordamiento 116 como se representa gráficamente en las Figuras 107 y 108. Como se ha mencionado anteriormente, la cámara de desbordamiento 116 está en comunicación de fluidos con la cámara de llenado 118 mediante el paso de desbordamiento 110 de la capa intermedia 106.

Las Figuras 109 y 110 representan gráficamente vistas laterales superior e inferior y una vista en perspectiva con despiece ordenado, respectivamente, de la tercera capa 124 del dispositivo colocado operativamente adyacente al segundo límite de la primera capa 114 del dispositivo. La tercera capa 124 del dispositivo contiene un conector 128 del puerto de llenado que se extiende a través de la tercera capa 124, alineando y conectando el puerto de llenado 132 de la segunda capa 130 (mostrado en la Figura 111) con la cámara de llenado 118 de la primera capa 114. La tercera capa 124 también contiene conectores 126 de paso de aire que se extienden a través de la tercera capa 124, alineándose y conectando las cámaras de medida 120 de la primera capa 114 con los pasos de aire 136 de la segunda capa 130 (también mostrados en la Figura 111). Las paredes de los conectores 126 de paso de aire de la tercera capa están compuestos o revestidos de material hidrófobo. La tercera capa 124 del dispositivo también contiene conectores 125 de desbordamiento que se extienden a través de la tercera capa, alineándose y conectando la cámara de desbordamiento 116 de la primera capa 114 con los pasos de aire 134 de desbordamiento de la segunda capa 130 (mostrados en la Figura 111).

Las Figuras 111 y 112 representan gráficamente vistas laterales superior e inferior y una vista en perspectiva con despiece ordenado, respectivamente, de la segunda capa 130 del dispositivo colocado operativamente adyacente al segundo límite de la tercera capa 124 del dispositivo. La segunda capa 130 del dispositivo contiene un puerto de llenado 132 que se extiende a través de la segunda capa 130, y está alineado con el conector 128 del puerto de llenado de la tercera capa 124, o en algunas realizaciones, directamente con la cámara de llenado 118 de la primera capa 114. La segunda capa 130 del dispositivo también contiene pasos de aire 136 que se extienden a través de la segunda capa 130 y están alineados con las cámaras de medida 120 de la primera capa 114. Los pasos de aire 136 de la segunda capa están conectados a las cámaras de medida 120 de la primera capa 114 mediante los conectores 126 de paso de aire de la tercera capa 124. Como se ilustra además en las Figuras 111 y 112, la segunda capa 130 del dispositivo también contiene un paso de aire 134 de desbordamiento que se extiende a través de la segunda capa 130 y está alineado con la cámara de desbordamiento 116 de la primera capa 114. El paso de aire 134 de desbordamiento conecta con la cámara de desbordamiento 116 mediante los conectores 125 del paso de aire de desbordamiento de la tercera capa 124.

Aunque el dispositivo se ha descrito en términos de capas individuales, las capas del dispositivo están integradas, proporcionando al dispositivo una estructura monolítica.

En una realización de la presente divulgación, la primera capa del dispositivo está provista de un par de cámaras de

llenado separadas en extremos opuestos de las cámaras de medida y la segunda capa está prevista de un par de puertos de llenado separados, cada una en comunicación de fluidos entre sí con uno de los pares de las cámaras de llenado separadas. Un del par de los puertos de llenado separados proporciona líquido a uno del par de las cámaras de llenado separadas y a la mitad de las cámaras de medida, mientras que la otra del par de puertos de llenado separados proporciona líquido a la otra del par de las cámaras de llenado separadas y a la otra mitad de las cámaras de medida.

En otra realización de la presente divulgación, la primera capa del dispositivo está provista de un par de cámaras de llenado separadas en extremos opuestos de las cámaras de medida y la segunda capa está prevista de un par de puertos de llenado separados, cada una en comunicación de fluidos entre sí con uno de los pares de las cámaras de llenado separadas. Un del par de los puertos de llenado separados proporciona líquido a uno del par de las cámaras de llenado y a todas las cámaras de medida, mientras que la otra del par de puertos de llenado separados proporciona líquido a la otra del par de las cámaras de llenado separadas y a todas las cámaras de medida.

El dispositivo de la presente divulgación se puede configurar para llenar dos o más filas y columnas de dicha placa de microtitulación con líquido.

Las Figuras del presente documento ilustran diferentes diseños compatibles con una placa de microtitulación de 384 pocillos; sin embargo, los conceptos descritos son análogamente aplicables a placas de 1536 pocillos por un experto en la materia. Las Figuras 105 a 112 descritas detalladamente en lo anterior ilustran un dispositivo para el llenado simultáneo de todos los pocillos de todas las filas distribuidas en 24 columnas mediante el uso de puertos de llenado 132 situados en el lado derecho del apilado dispositivo-placa de microtitulación. La configuración se basa en la acción capilar para llenar cada una de las cámaras de medida 120 individuales conectadas mediante canales 122 como se muestra en la Figura 111.

Las Figuras 113 a 118 son una serie de vistas superiores, laterales y en perspectiva con despiece ordenado que ilustran una segunda configuración del dispositivo. Esta segunda configuración del dispositivo se basa en la fuerza mecánica del pipeteador para impulsar el líquido al interior de los canales y cámaras de medida. Todas las Figuras 113-118 representan los mismos rasgos del dispositivo que se muestran en las Figuras 107-112 (numerados en correspondencia como 200-236), salvo que el puerto de llenado 232 de la segunda capa 230 se ha modificado para facilitar el llenado mecánico de los pocillos con líquido, como se muestra en la Figura 117. Las dimensiones del puerto de llenado 232 son cónicas, de forma que una punta desechable convencional se ajuste correctamente al puerto, lo que permite usar presión positiva para llenar las cámaras de medida. Las dimensiones y la separación de los puertos de llenado son compatibles con el uso de pipetas multicanal manuales o estaciones de trabajo robóticas multicanal.

Las Figuras 119 a 126 son una serie de vistas superiores, laterales y en perspectiva que muestran una porción del dispositivo que se ha representado gráficamente en las Figuras 105 a 118. La porción del dispositivo representada gráficamente en las Figuras 119-126 representa los extremos de salida de la fila y/o columnas mostradas en las Figuras 105-118, es decir, la porción del dispositivo opuesta a los puertos de llenado. Los rasgos del dispositivo representados gráficamente en las Figuras 119-126, marcadas como 300-336, corresponden a los rasgos descritos y marcados en referencia a las Figuras 105-112 (es decir, los rasgos 100-136 del dispositivo).

Las Figuras 127 a 134 son una serie de vistas superiores, laterales y en perspectiva con despiece ordenado que ilustran una configuración alternativa del dispositivo de la presente divulgación. En esta configuración del dispositivo, los puertos de llenado 432 (véase la Figura 133) para cargar reactivos en los pocillos de la placa de microtitulación están situados a ambos lados del apilado dispositivo-placa de microtitulación. Esta configuración se puede utilizar para añadir dos conjuntos de reactivos diferentes a todos los pocillos de cada fila. Como alternativa, cada lado de los canales fluidos puede abordar 12 de las 24 columnas de cada lado del dispositivo, dividiendo de esta forma la placa en dos regiones paralelas de 192 pocillos. Esta configuración mantiene la capacidad de abordar independientemente cada fila y cada columna de ambas regiones. Los rasgos del dispositivo representados gráficamente en las Figuras 127-134, marcadas como 400-436, corresponden a los rasgos descritos y marcados en referencia a las Figuras 105-112 (es decir, los rasgos 100-136 del dispositivo).

Las Figuras 135 a 144 son una serie de vistas superiores, laterales y en perspectiva con despiece ordenado que ilustran una configuración alternativa del dispositivo de la presente divulgación. Esta configuración del dispositivo es adecuada para el llenado simultáneo de todos los pocillos por filas y todos los pocillos por columnas. Como alternativa, cada lado de los canales fluidos puede abordar 12 de las 24 columnas de cada lado del dispositivo y 8 de las 16 filas de cada lado del dispositivo dividiendo de esta forma la placa en cuatro regiones diferentes de 96 pocillos. Esta configuración mantiene la capacidad de abordar independientemente cada fila y cada columna de las cuatro regiones. Los rasgos del dispositivo representados gráficamente en las Figuras 135-144, marcadas como 500-536, corresponden a los rasgos descritos y marcados en referencia a las Figuras 105-112 (es decir, los rasgos 100-136 del dispositivo).

De acuerdo con esta configuración, Las Figuras 135 y 136 representan gráficamente vistas laterales superior e inferior y una vista en perspectiva con despiece ordenado, respectivamente, de la capa intermedia 506 del dispositivo situada adyacente a la superficie superior de la placa de microtitulación 500. La capa intermedia 506 del dispositivo contiene

pasos intermedios 508 que se extienden a través de la capa intermedia. En esta realización, cada pocillo de la placa de microtitulación está alineado con al menos dos pasos intermedios 508 como se muestra en la vista superior, lateral y con despiece ordenado de las Figuras 135 y 136, respectivamente. la capa intermedia 506 también contiene el paso de desbordamiento 510.

Las Figuras 137 a 140 representan gráficamente vistas superior, lateral y en despiece ordenado, de la primera capa 514 del dispositivo (véase la Figura 139), colocado operativamente adyacente al segundo límite de la capa intermedia 506 del dispositivo. De acuerdo con esta realización, la primera capa 514 del dispositivo de la presente divulgación tiene una primera región 513 que tiene las cámaras de medida 520 en dos o más filas (véanse las Figuras 137 y 138), y una segunda región 515 que tiene las cámaras de medida 520 en dos o más columnas (véanse las Figuras 139 y 140) estando la primera y segunda regiones desplazadas entre sí. Las cámaras de medida 520 de la primera 513 y segunda 515 regiones de la primera capa 514 están en comunicación de fluidos entre sí mediante los canales 522 de las cámaras de medida, y con los pocillos 503 individuales de la placa de microtitulación. Como se ha descrito anteriormente, las cámaras de medida 520 tienen un volumen fijo para controlar el volumen de líquido suministrado a cada pocillo 503 de la placa de microtitulación 500. Las cámaras de medida 520 reciben líquido desde la cámara de llenado 518 por acción capilar del líquido o con fuerza mecánica que empuja el líquido al interior de la cámara de llenado 518. La salida de líquido desde las cámaras de medida 520 al interior de los pocillos de la placa de microtitulación se controla mediante, por ejemplo, las fuerzas hidrófobas de los pasos 508 de la capa intermedia. En una realización, todas las cámaras de medida 520 del dispositivo tienen el mismo volumen de medida. En otra realización, las cámaras de medida 520 tienen diferentes volúmenes de medida por fila y/o columna.

Cada una de la primera 513 y segunda 515 regiones de la primera capa 514 del dispositivo contiene una cámara de desbordamiento 516 como se representa gráficamente en las Figuras 137-138 y en las Figuras 139-140, respectivamente. Como se ha mencionado anteriormente, la cámara de desbordamiento 516 está en comunicación de fluidos con la cámara de llenado 518 mediante el paso de desbordamiento 510 de la capa intermedia 506.

Las Figuras 141 y 142 representan gráficamente vistas laterales superior e inferior y una vista en perspectiva con despiece ordenado, respectivamente, de la tercera capa 524 del dispositivo colocado operativamente adyacente al segundo límite de la segunda región 515 de la primera capa 514 del dispositivo. La tercera capa 524 del dispositivo contiene un conector 528 del puerto de llenado que se extiende a través de la tercera capa 524, alineando y conectando el puerto de llenado 532 de la segunda capa 530 (mostrado en la Figura 143) con la cámara de llenado 518 de la primera capa 514. La tercera capa 524 también contiene conectores 526 de paso de aire que se extienden a través de la tercera capa 524, alineándose y conectando las cámaras de medida 520 de la primera capa 514 con los pasos de aire 536 de la segunda capa 530 (también mostrados en la Figura 143). La tercera capa 524 del dispositivo también contiene conectores 525 de desbordamiento que se extienden a través de la tercera capa, alineándose y conectando la cámara de desbordamiento 516 de la primera capa 514 con los pasos de aire 534 de desbordamiento de la segunda capa 530 (mostrados en la Figura 143).

Las Figuras 143 y 144 representan gráficamente vistas laterales superior e inferior y una vista en perspectiva con despiece ordenado, respectivamente, de la segunda capa 530 del dispositivo colocado operativamente adyacente al segundo límite de la tercera capa 524 del dispositivo. En esta realización, la segunda capa 530 del dispositivo contiene puertos de llenado 532, uno para cada fila y cada columna, que se extienden a través de la segunda capa 530, y está alineada con los conectores 528 del puerto de llenado de la tercera capa 524, o en algunas realizaciones, directamente con las cámaras de llenado 518 de la primera capa 514. La segunda capa 530 del dispositivo además contiene pasos de aire 536 que se extienden a través de la segunda capa 530 y están alineados con las cámaras de medida 520 de la primera capa 514. Los pasos de aire 536 de la segunda capa están conectados a las cámaras de medida 520 de la primera capa 514 mediante los conectores 526 de paso de aire de la tercera capa 524. Como se ilustra además en las Figuras 143 y 144, la segunda capa 530 del dispositivo también contiene un paso de aire 534 de desbordamiento en cada fila y columna que se extiende a través de la segunda capa 530 y está alineado con la cámara de desbordamiento 516 de la primera capa 514. El paso de aire 534 de desbordamiento conecta con la cámara de desbordamiento 516 mediante los conectores 525 del paso de aire de desbordamiento de la tercera capa 524.

Aunque cada una de las diferentes configuraciones anteriormente descrita se ha ilustrado por una serie de dibujos que muestran vistas superior, lateral y en despiece ordenado para cada capa del dispositivo, con fines de fabricación, el dispositivo se puede moldear monolíticamente o ensamblarse a partir de capas individuales según determine un experto en la técnica.

Otro aspecto de la presente divulgación se dirige a un método para añadir líquidos a dos o más pocillos de una fila y/o columna de una placa de microtitulación que tiene superficies superior e inferior opuestas, teniendo la superficie superior aberturas que conducen a los pocillos y definiendo la superficie inferior los extremos cerrados de los pocillos. Este método implica proporcionar el dispositivo de la presente divulgación que se ha descrito anteriormente y llenar el dispositivo con líquido. El líquido se descarga en uno o más pocillos de una fila y/o columna de dicha placa de microtitulación del dispositivo.

Como se ha mencionado anteriormente, el dispositivo de la presente divulgación se puede configurados para dejar que los pozos se llenen por acción capilar o por fuerza mecánica.

El dispositivo de la presente divulgación, que permite el llenado simultáneo de todas las columnas y filas de una placa de microtitulación tanto secuencialmente como al mismo tiempo, se fabrica de un material adecuado (por ejemplo, poliestireno, policarbonato, etc.) que sea compatible con reactivos biológicos y se coloca sobre los pocillos de la placa de microtitulación. A continuación, los reactivos se introducen en los puertos de llenado (por ejemplo, 24 y/o 16 puertos de llenado) y los reactivos se dispersan automáticamente en cada una de las cámaras de medida colocadas encima de cada uno de los pocillos de la placa de microtitulación (por ejemplo, 384 cámaras de medida para los 384 pocillos de una placa). El apilado dispositivo-placa de microtitulación se coloca en un rotor de canjilón oscilante de una centrífuga de baja velocidad convencional y se somete a una corta centrifugación suficiente para impulsar el líquido desde las cámaras de medida individuales al interior de cada uno de los pocillos. Tras detener la centrífuga, el apilado dispositivo-placa de microtitulación se retira de la centrífuga, el apilado se separa, y el dispositivo se desecha mientras que la placa se vuelve a usar en la siguiente etapa del proceso de análisis. De esta forma la mano de obra necesaria en la configuración anteriormente descrita para una placa de 384 pocillos se reduciría a 3 administraciones de un pipeteador de 8 puntas para cargar los puertos de llenado de las columnas y a 2 administraciones de un pipeteador de 8 puntas para cargar los puertos de llenado de las columnas en comparación de un total de 96 administraciones de un pipeteador de 8 puntas que requiere un enfoque manual. Adicionalmente, el uso del dispositivo solamente consume 24 puntas de pipeta, mientras que un enfoque manual consumiría 384 puntas de pipeta, lo que supone un notable ahorro de costes, lo que es importante en un laboratorio clínico de alto rendimiento. El experto en la técnica podría aplicar el dispositivo y el proceso anteriormente descrito fácilmente a una placa de microtitulación de 1536 pocillos y esto daría como resultado beneficios similares a los descritos para la placa de 384 pocillos. Un beneficio añadido del dispositivo descrito en el presente documento, que reduce de manera importante el número de etapas de pipeteado, es el control de la contaminación cruzada por aerosoles que contienen los amplicones de la PCR. Esto es especialmente importante en la detección de una representación de alelos mutantes con bajo número de copias. Durante la introducción de líquidos en los puertos de carga del dispositivo, cada uno de los 384 o 1536 pocillos queda cubierto por el dispositivo y la combinación de los pocillos cubiertos y la reducción en el número de etapas de transferencia de líquido proporciona cierta reducción en la probabilidad de una contaminación cruzada entre amplicones de la PCR entre pocillos.

Puesto que cada fila y columna es obligatorio se puede abordar por separado, se pueden diseñar muchas configuraciones experimentales que se pueden satisfacer con el mismo dispositivo mediante una selección racional de cómo se llenan los puertos de carga. De esta forma, se puede aplicar el mismo líquido a las 24 columnas mediante 3 etapas de pipeteador de 8 puntas (sin cambios de puntas) y el mismo líquido se puede aplicar a las 16 filas mediante 2 etapas de un pipeteador de 8 puntas (sin cambios de puntas); se pueden aplicar 24 componentes diferentes a cada una de las 24 filas mediante 3 etapas de pipeteador de 8 puntas (3 cambios de puntas) y se pueden aplicar 16 componentes diferentes a cada una de las 16 filas mediante 2 etapas de un pipeteador de 8 puntas (2 cambios de punta). El experto en la técnica tiene a su disposición otras muchas configuraciones de llenado. El líquido dispersado puede ser cualquier líquido biológico, por ejemplo, una muestra biológica, reactivos de reacción tales como, por ejemplo, cebadores, sondas, enzimas, productos de reacción, etc.

En una realización, están disponibles una serie de dispositivos de dispersión con una selección de volúmenes de medida fijos, lo que anticipa en particular un elevado volumen de aplicaciones de biología molecular tales como las que se pueden encontrar en un laboratorio de diagnóstico clínico o un laboratorio de desarrollo de productos farmacéuticos. En otra realización, se fabrican dispositivos de dispersión personalizados con volúmenes de medición especificados por el usuario para sus aplicaciones en particular.

Ejemplos

Ejemplo teórico 1-Marcador de mutaciones de alta sensibilidad (cuando está presente en de 1 % al 0,01 %), Mutación en una única base, inserción pequeña, y mutaciones de deleción pequeñas en genes conocidos en ADNlc plasmático total.

Revisión de la estrategia: Esta estrategia depende de la fidelidad de tres enzimas: (i) La polimerasa Taq copia fielmente un bajo nivel de copias de ADN en la muestra inicial, (ii) La enzima ARNasa H2 elimina un grupo bloqueante del cebador de la LDR en dirección 5', y (iii) Ligasa para discriminar entre un emparejamiento correcto y un emparejamiento incorrecto en el lado 3' del cebador en dirección 5'. Esto último se ve adicionalmente potenciado mediante el uso de un emparejamiento incorrecto intencionado o análogo nucleotídico en la 2ª o 3ª base desde el extremo 3' que desestabiliza ligeramente la hibridación del extremo 3' si esté está correctamente emparejado en el extremo 3', pero desestabiliza significativamente la hibridación del extremo 3' si hay un emparejamiento incorrecto en el extremo 3'. Por último, las estrategias cinéticas, tales como la alteración de los tiempos y condiciones de ciclación puede potenciar la discriminación entre el molde natural y el mutante. Una vez que se ha producido el evento de ligadura, dichos productos se amplificarán en una etapa posterior de amplificación por PCR en tiempo real y, por tanto, esta es la etapa discriminatoria clave.

Para la etapa de la PCR inicial, los cebadores de la PCR contienen colas universales que son parcialmente idénticas a las usadas a concentraciones más bajas (10 - 50 nM). La región idéntica puede tener de 8 a 11 bases o más. Por lo tanto, si se forma cualquier cebador dimérico independiente de diana, el producto incorrecto formará una horquilla que

inhibirá la amplificación adicional. Además, las colas potencian una unión posterior del cebador de la PCR a los amplicones correctos.

Como alternativa, la fidelidad de la amplificación y la reducción de falsos amplicones y cebadores diméricos se consigue usando cebadores de la PCR a concentraciones más bajas, pero que contienen una base de ARN, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante en el extremo 3'. Solo cuando el cebador se hibrida correctamente a su diana prevista, la ARNasaH2 escindirá la base de ARN, liberando un 3'OH libre en el cebador de ADN. Incluso aunque un cebador se activara accidentalmente en una diana incorrecta, en el siguiente ciclo, las bases en dirección 3' de cebador en 3' no formarán un emparejamiento perfecto con las bases a eliminar. Esto disminuye significativamente la posibilidad de una segunda escisión y extensión. En resumen, la eficacia de la amplificación de las dianas incorrectas no producirá un fondo significativo. Además, la amplificación por PCR inicial va seguida de una etapa de LDR, anidada esencialmente con el producto inicial de la PCR.

Cuando se empieza con ADNlc, la longitud promedio es de 160 bases, por tanto, los cebadores de la PCR deben combinarse en dos grupos cuando se distribuyen en forma de mosaico a través de una región génica (por ejemplo, p53) de forma que cada grupo amplifica fragmentos de aproximadamente 100 pb, que están desplazados entre sí en aproximadamente 50 bases, de tal manera que se obtiene un "mosaico" en una región determinada.

Para proteger contra la contaminación por arrastre, se añadió UNG a la reacción antes de la activación de la polimerasa, y se llevó a cabo la amplificación inicial de la PCR con dUTP. Las sondas de la LDR comprenden las bases naturales, por tanto, el producto de la LDR es ahora resistente a la digestión con UNG en la segunda etapa de la PCR en tiempo real. Señalar que los productos de la LDR contienen secuencias marcadoras o secuencias UniTaq en sus extremos sin ligadura, que están ausentes en el ADN diana, por tanto, el arrastre accidental de productos de la LDR no da como resultado una amplificación a gran escala. A diferencia de la PCR, un producto de LDR inicial no es sustrato de una segunda reacción de la LDR.

El caso más difícil es el de las mutaciones KRAS, donde 6 cambios en el codón 12 y 1 cambio en el codón 13 están separados entre sí conjuntamente. En general, para una mayor fidelidad, el emparejamiento incorrecto entre la sonda mutante y la secuencia natural debe ser al menos C:A para la última base, no G:T. Por lo tanto, se necesita aplicar ambas sondas de la hebra superior y de la hebra inferior, o 2 conjuntos de ligadura para la reacción de la PCR. Sin embargo, puede administrarse más de una mutación a la misma secuencia UniTaq, o etiqueta de fluorescencia con una sonda TaqMan™, ya que el objetivo es encontrar una mutación y no distinguir necesariamente diferentes mutaciones entre sí.

Como las diferentes sondas competirán entre sí por la unión a la secuencia mutante (rara), es importante dejar que todas las sondas se hibriden con la secuencia correcta. Habrá 3 cebadores en dirección 5' y 1 cebador en dirección 3' para las mutaciones en la 1ª posición del codón 12 de KRAS. La falsa ligadura de las sondas LDR mutantes a la secuencia diana natural pueden suprimirse adicionalmente usando una sonda de LDR bloqueada en dirección 5' con la secuencia natural en la base discriminante, pero que carece de la secuencia marcadora adecuada. Se diseñan las sondas para evitar las falsas ligaduras/falsas señales de las sondas mutantes con la secuencia normal, pero también para que se produzcan ligaduras correctas en presencia de la secuencia mutante.

Para resumir los niveles de discriminación de la anterior estrategia utilizando tanto cebadores de la PCR como sondas de la LDR para detectar cada mutación:

1. Uso de cebadores de la PCR con colas universales, de tal manera que si se forma cualquier cebador dimérico independiente de diana, el producto incorrecto formara una horquilla que inhibirá la amplificación adicional.
2. Uso de UNG para evitar la contaminación por arrastre de la reacción inicial de la PCR.
3. Uso de la actividad nucleasa de la ARNasaH2 para liberar un 3'OH sin bloquear en la sonda LDR en dirección 5', solamente cuando se hibrida con la diana.
4. Uso de la fidelidad de la ligadura en 3' de la ligasa termoestable en la sonda LDR en dirección 5'.
5. Uso de emparejamiento incorrecto o de análogos nucleotídicos en la 2ª o 3ª base desde el extremo 3' de la sonda en dirección 5'.
6. Uso de cebadores UniTaq o cebadores marcadores para amplificar los productos de la LDR para una lectura de la PCR en tiempo real.
7. Uso de UNG para evitar la contaminación por arrastre de la reacción de la PCR en tiempo real.

Protocolo detallado para la detección de alta sensibilidad de mutaciones en el marcador (cuando está presente en de 1 % al 0,01 %), mutaciones repetidas en genes conocidos:

1.1.a. Incubar el ADN genómico en presencia de UNG (37 °C, 15-30 minutos, para evitar el arrastre), dUTP y otros dNTP, AmpliTaq Gold, y cebadores específicos de genes que contienen colas universales, de tal manera que si se forma cualquier cebador dimérico independiente de diana, el producto incorrecto formara una horquilla que inhibirá la amplificación adicional. Esta mezcla de reacción de la PCR del ADN genómico inicial es adecuada para una amplificación de la PCR multiplexada en 12, 24, 48, o 96 pocillos individuales (multiplexado espacial), o en un único pocillo. Desnaturalizar el ADN genómico procedente del plasma, inactivar UNG, y activar AmpliTaq Gold (94 °C, 5-10

minutos) y amplificar mediante PCR multiplexada los fragmentos que contienen mutaciones para un número limitado de ciclos (94 °C, 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s durante 12-20 ciclos). Los cebadores de la PCR se han diseñado para tener valores de la Tm alrededor de 64-66 °C, y que se hibriden sólidamente, incluso cuando se usan a concentraciones 10 a 50 veces por debajo de la norma para la PCR uniplexada (10 nM a 50 nM cada cebador). Los ciclos se limitan a retener el equilibrio proporcional de los productos de la PCR unos con respecto a otros, mientras se siguen amplificando secuencias con baja abundancia de aproximadamente 100.000 a 1.000.000 de veces. Tras la amplificación por la PCR, se inactiva la polimerasa Taq (incubando a 99 °C durante 30 minutos.)

1.1.b. Añadir la ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D), RNaseH2, suplementada con tampón para condiciones de ligadura optimizadas, y sondas de LDR en dirección 5' y en dirección 3' adecuadas (10 nM a 20 nM de cada, las sondas en dirección 3' se pueden sintetizar con 5' fosfato, o tratamiento con quinasa en todo el volumen antes de las reacciones; las sondas en dirección 5' comprenden una base de ARN después del extremo 3' deseado, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante para evitar la ligadura independiente de diana). Las sondas en dirección 5' comprenden una etiqueta en 5', tal como UniAi seguido por una secuencia específica de diana con un emparejamiento incorrecto C:A o G:T en la 3ª o penúltima base, la mutación base en el extremo 3', seguido por una base de ARN y 4 bases de ADN más que se emparejan con la diana, y un separador C3 para bloquear la ligadura (o posterior extensión mediante la polimerasa). Las sondas en dirección 3' comprenden un extremo fosforilado en 5', seguido por una secuencia específica de diana, y una etiqueta en 3', tal como UniCi'. Realizar 20 ciclos de la LDR, (94 °C, 10 s, 60 °C 4-5 minutos). Esto permitirá que se produzcan eventos de ligadura en los productos de la PCR si está presente el ADN mutante.

1.1.c. Abrir los tubos/pocillos, diluir (10 a 100 veces) y distribuir en alícuotas a los pocillos para las reacciones de la PCR en tiempo real, conteniendo cada pocillo la mezcla maestra TaqMan™ adecuada con UNG para la prevención de arrastres y los siguientes cebadores: UniCi y UniAi, y una sonda TaqMan™ que cubre la secuencia a través de la unión de la ligadura. En dichas condiciones, las secuencias marcadoras de las sondas de LDR serían UniAi y UniCi respectivamente, y los productos tendrían la forma: UniAi - Diana en dirección 5'-Mutación-Diana en dirección 3' - UniCi'

Esta estrategia evita generar señales de fondo que no procedan del ADN natural en la segunda reacción de la PCR en tiempo real. Primero, UNG destruirá la hebra inferior del producto inicial de la PCR, de tal manera que la sonda de LDR en dirección 5' restante no tenga diana con la que hibridarse y, por tanto, el extremo 3' queda bloqueado y no se extenderá. En segundo lugar, cualquier cebador de la PCR residual de la reacción inicial de la PCR no podrá unirse a ninguno de los productos iniciales de la PCR (destruidos por UNG) o a los productos de la LDR (sin sitios de unión) y, por tanto, el extremo 3' permanece bloqueado y no se extenderá. Por último, la sonda TaqMan™ ahora tiene 2 bases que difieren de la secuencia natural (la mutación base, y la base en la 3ª posición desde el extremo 3' de la unión de la ligadura) y, por tanto, se hibridará solo a una temperatura por debajo de 60 °C, pero ahora, el cebador de la PCR en dirección 5' tendrá que hibridarse en primer lugar y, por consiguiente extenderse, evitando de esta manera que la sonda TaqMan™ se hibride y genere señales de la actividad 5'-3' de la polimerasa Taq.

Un segundo diseño del ensayo se basa en una amplificación inicial de la PCR multiplexada seguida por la distribución y captura de las dianas amplificadas mediante la PCR sobre los pocillos de una placa de microtitulación. Un único ciclo de LDR permite capturar los productos de la LDR de las dianas correctas sobre el soporte sólido, mientras que las ligaduras incorrectas se eliminan por lavado. Los productos de la LDR se cuantifican, bien mediante LDR-FRET, PCR en tiempo real u otros sistemas indicadores.

Para amplificar el ADNIc para detectar la mutación, se utilizan cebadores de la PCR que contienen colas universales. Los cebadores específicos de gen se usan a concentraciones bajas (10 a 50 nM) y contienen colas universales que son parcialmente idénticas. Por lo tanto, si se forma cualquier cebador dimérico independiente de diana, el producto formará una horquilla que inhibirá la amplificación adicional. Para maximizar la capacidad de detectar mutaciones con una abundancia muy baja, tras preparar una mezcla maestra que contiene todos los componentes, la mezcla de reacción se distribuye en 12, 24, 48, o 96 pocillos independientes. Puesto que una única molécula (con una mutación) solo puede distribuirse a un pocillo dado, el proceso enriquecerá eficazmente la molécula que contiene la mutación en comparación con el ADN natural normal, y por tanto, mejora significativamente la relación señal a ruido. Una estrategia es usar una amplificación en dos etapas, en la que la amplificación inicial utiliza cebadores específicos de gen con colas universales, y la segunda amplificación utiliza cebadores universales para agregar un grupo biotina a una hebra de producto específica. La amplificación inicial (con una concentración baja de cebadores de la PCR) seguirá siendo cuantitativa, con la condición de que esté limitada a aproximadamente 8-20 ciclos. Los productos de la amplificación se diluyen a continuación en dos nuevos pocillos por cada uno de los pocillos originales, conteniendo cada uno los dos cebadores universales (a concentraciones mayores de 0,5 - 1 pmoles), con uno o el otro biotinilados en el pocillo respectivo. La amplificación continúa ahora durante 8-29 ciclos más, durante un total de aproximadamente 15-40 ciclos. Como etapa opcional, los productos pueden separarse (mediante electroforesis o tamaño) de los cebadores no usados.

Como alternativa, los productos pueden amplificarse en una única reacción de amplificación añadiendo los cebadores universales al pocillo de amplificación inicial, donde solo un cebador universal está biotinilado. Como alternativa, los cebadores específicos de gen biotinilados se pueden usar directamente en una única etapa de amplificación. Solo

cuando es prudente diseñar sondas LDR contra la hebra superior y la hebra inferior (es decir, maximizar la discriminación por LDR de la mutación) será necesario capturar la hebra directa y la hebra inversa de un amplicón dado. Esto se puede conseguir utilizando mezclas de cada cebador a un 50 % de biotinilación en la misma reacción, o un 100 % de biotinilación en reacciones independientes. Siempre que los productos biotinilados permanezcan separados durante la captura sobre el soporte sólido, pueden estar en la misma reacción de amplificación. Sin embargo, si las hebras del producto de la PCR se vuelven a hibridar tras la captura, puede ser necesario capturarlas en localizaciones separadas sobre el soporte sólido. Esta separación espacial puede ser necesaria para asegurar que existe suficiente producto de la PCR monocatenario disponible para identificar mutaciones mediante una posterior detección por LDR.

Con ADNlc, la longitud del fragmento está biológicamente limitada a aproximadamente 160 pb. Por lo tanto, para cubrir las mutaciones de punto caliente comunes a través de una región más grande, se diseñarán conjuntos de cebadores para generar fragmentos solapantes. Por tanto, los cebadores se distribuirían entre un combinado "A" y "B", duplicando el número de pocillos mencionados. Se puede usar frecuentemente el ADN aislado de fragmentos tamaño exón de las CTC, mitigando así la necesidad de combinaciones de dos amplicones. Algunos fragmentos se amplifican más lentamente que los otros. Este problema puede superarse incluyendo una reacción multiplexada adicional con unos pocos más ciclos de amplificación.

La Figura 38 ilustra la detección de la mutación en ADN genómico o ADNlc usando el protocolo de detección de la PCR-LDR-q PCR con prevención de arrastres. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura.

La Figura 39 ilustra una variación de la Figura 38, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Los cebadores de la PCR contienen colas universales para eliminar la formación de cebadores diméricos, y para permitir la amplificación con cebadores universales, uno de los cuales contiene una biotina, lo que permite capturar los productos en pocillos revestidos con estreptavidina. Las sondas de ligadura se hibridan a la diana y solamente forman producto cuando existe una complementariedad perfecta en la unión de la ligadura. Las sondas de ligadura sin reaccionar, o los productos de ligadura independientes de diana se eliminan a continuación por lavado. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detección.

La Figura 40 ilustra una variación de la Figura 38, donde los cebadores de la PCR iniciales específicos de gen contienen una base de ARN, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante en el extremo 3'. Estos cebadores específicos de gen están sin bloquear desde el extremo por la ARNasaH2 solo cuando se hibridan con la diana, liberando un extremo 3'OH adecuado para la extensión de la polimerasa.

La Figura 41 ilustra una variación de la Figura 38, donde los cebadores de la PCR iniciales específicos de gen contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Las sondas LDR en dirección 5' y en dirección 3' contienen las porciones específicas de cebador UniAi y UniCi' respectivamente. Además, las sondas LDR específicas de mutación en dirección 5' contienen la mutación base en el extremo 3', seguido por una base de ARN y 4 bases de ADN más que se emparejan con la diana, y un separador C3 para bloquear la ligadura (o posterior extensión mediante la polimerasa). Solo se eliminará el grupo bloqueante en dirección 5' en presencia de ARNasaH2 y cuando se hibride con la diana correcta, liberando un extremo 3'OH adecuado para ligadura. En esta ilustración, la sonda LDR en dirección 5' complementaria del ADN natural contiene también un grupo bloqueante, pero no la base de ARN o la etiqueta en 5'. Esta sonda potencia además la especificidad de ligadura para discriminar el mutante de la diana natural.

La Figura 42 ilustra una variación de la Figura 41, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Los cebadores de la PCR contienen colas universales para eliminar la formación de cebadores diméricos, y las sondas LDR se diseñan para contener secuencias complementarias cortas que solo se hibridan entre sí cuando se ligan juntas, generando una señal FRET adecuada para detección.

La Figura 43 ilustra una variación de la Figura 42, donde el lado 5' de la sonda LDR en dirección 3' contiene una base, la misma que la base en 3' discriminante de la sonda en dirección 5', dicha base se elimina mediante la actividad nucleasa 5' a 3' de la nucleasa Fen o la polimerasa Taq para liberar un fosfato en 5' adecuado para una ligadura posterior. La nucleasa solo debe escindirse cuando la sonda en dirección 3' se hibrida a una diana mutante. Ambas sondas de LDR específicas de mutación en la dirección 5' y en la dirección 3' contienen secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detección. En esta ilustración, la sonda LDR en dirección 5' complementaria del ADN natural no contiene una secuencia complementaria y no generaría una señal FRET aunque estuviera ligada a una sonda escindida en dirección 3'.

La Figura 44 ilustra una variación de la Figura 43, donde los cebadores de la PCR iniciales específicos de gen contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Las sondas LDR en dirección 5' y en la dirección 3' contienen porciones específicas de los cebadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'- UniTaq Ci' y porciones

específicas de las secuencias marcadoras. Después de la ligadura, los productos se diluyen y distribuyen en pocillos que contienen cebadores específicos de UniTaq del formato UniTaq Ci y F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). La hebra de producto formada por el cebador marcado fluorescentemente formará una horquilla, de tal forma que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el cebador UniTaq Ci se une a la secuencia UniTaq Ci', la actividad exonucleasa 5'→3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente F1 y generando la señal detectada por el instrumento de la PCR en tiempo real.

La Figura 145 ilustra una variación de la Figura 41, donde los productos de la PCR se amplifican selectivamente usando cebadores en dirección 5' selectivos para la mutación y cebadores en dirección 3' específicos de locus. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasaH elimina la base de ARN específica de mutante para liberar un grupo 3'OH adecuado para la extensión de la polimerasa. La ARNasa H escinde preferentemente la base de ARN cuando esta se corresponde perfectamente con el ADN mutante, pero será menos probable que escinda la base de ARN cuando se hibrida con el ADN natural. Esto se produce durante cada ciclo de la amplificación por PCR, enriqueciendo así la amplificación de las dianas mutantes específicas. Los cebadores opcionales con la secuencia natural carecen de la base de ARN y quedan bloqueados, reduciendo adicionalmente la amplificación de la secuencia natural. Tras la etapa inicial de enriquecimiento de la PCR, este procedimiento continúa con el protocolo de detección de LDR-q PCR con prevención de arrastres. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura.

La Figura 146 ilustra una variación de la Figura 145, donde las sondas LDR en dirección 5' y en la dirección 3' contienen porciones específicas de los cebadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'- UniTaq Ci' y porciones específicas de las secuencias marcadoras. Después de la ligadura, los productos se diluyen y distribuyen entre pocillos que contienen cebadores específicos de UniTaq del formato UniTaq Ci y F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai, y la señal generada en la PCR se detecta mediante un instrumento de PCR en tiempo real.

La Figura 147 ilustra una variación de la Figura 145, donde los productos de la PCR se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detección.

La Figura 148 ilustra una variación de la Figura 41, donde los productos de la PCR se amplifican selectivamente usando cebadores en dirección 5' y en dirección 3' específicos de locus. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasaH elimina la base de ARN para liberar un grupo 3 OH adecuado para la extensión de la polimerasa. Una sonda LNA o PNA bloqueante que comprende la secuencia natural que se solapa parcialmente con el cebador de la PCR en dirección 5' competirá preferentemente por la unión a la secuencia natural con el cebador en dirección 5', pero no tanto con el ADN mutante, y esto suprime la amplificación del ADN en cada ronda de la PCR. Tras la etapa inicial de enriquecimiento de la PCR, este procedimiento continúa con el protocolo de detección de LDR-qPCR con prevención de arrastres. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura.

La Figura 149 ilustra una variación de la Figura 148, donde las sondas LDR en dirección 5' y en la dirección 3' contienen porciones específicas de los cebadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'- UniTaq Ci' y porciones específicas de las secuencias marcadoras. Después de la ligadura, los productos se diluyen y distribuyen entre pocillos que contienen cebadores específicos de UniTaq del formato UniTaq Ci y F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai, y la señal generada en la PCR se detecta mediante un instrumento de PCR en tiempo real.

La Figura 150 ilustra una variación de la Figura 148, donde los productos de la PCR se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detección.

La Figura 154 ilustra otra variación donde los productos de la PCR se amplificaron selectivamente usando cebadores en dirección 5' específicos de locus que comprenden también porciones de secuencias en 5' complementarias de la secuencia natural de la hebra superior permitiendo la formación de bucles en horquillas tras la extensión, y cebadores en dirección 3' específicos de locus. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasaH elimina la base de ARN para liberar un grupo 3 OH adecuado para la extensión de la polimerasa. La PCR se lleva a cabo con una polimerasa que carece de actividad 5' nucleasa, 3' nucleasa y de desplazamiento de hebra. (i) La desnaturalización de la hebra inferior natural da como resultado la formación de un bucle en horquilla con un emparejamiento perfecto en el extremo 3', que se extiende mediante la polimerasa para formar una región en horquilla más larga. Esta no se desnaturaliza a 72 °C y evita que el cebador en dirección 5' genere una hebra superior de longitud completa. (ii) La desnaturalización de la hebra inferior mutante da como resultado la formación de un bucle en horquilla con un emparejamiento incorrecto en el extremo 3'. Este no se extiende mediante la polimerasa y, por tanto, se desnaturaliza a 72 °C, lo que permite que el cebador en dirección 5' genere la hebra superior de longitud completa. (iii) La desnaturalización de la hebra superior da como resultado una horquilla en el lado 5', que se desnaturaliza durante la etapa de extensión de la PCR (72 °C), permitiendo que la polimerasa genere una hebra inferior de longitud completa. La diferencia en la preferencia de extensión de la horquilla de los cebadores en dirección 5' con (i) moldes naturales y (ii) moldes mutantes da como resultado la amplificación preferente del ADN mutante. Esta selección contra la

amplificación del ADN natural se produce para cada ciclo de la PCR, enriqueciendo así las dianas mutantes. Tras la etapa inicial de enriquecimiento de la PCR, este procedimiento continúa con el protocolo de detección de LDR-q PCR con prevención de arrastres. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura.

La Figura 155 ilustra una variación de la Figura 154, donde los productos de la PCR se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detección.

Como ejemplo de enumeración cuantitativa de mutaciones usando el multiplexado espacial en 48 pocillos, considerar que el ADNlc total en la muestra diana que se somete a amplificación inicial de la PCR tiene aproximadamente 10.000 equivalentes genómicos, conteniendo 12 de los mismos una mutación en el codón 12 de KRAS. La distribución inicial en 48 pocillos da como resultado aproximadamente 200 equivalentes genómicos por pocillo, conteniendo 1 pocillo 2 copias mutantes, conteniendo 10 pocillos 1 copia mutante, y no conteniendo los restantes 37 pocillos copias mutantes. Después de aproximadamente 20 ciclos de amplificación de la PCR, (para simplificar el cálculo, considere un 99 % de eficacia de la amplificación, o aproximadamente 960.000 veces de eficacia completa darían como resultado una amplificación de 1.046.576 veces), entonces, el número total de copias de la mutación será de 960.000 y para el tipo natural será de 192 millones. Suponiendo una eficacia de ligadura del 50 % en un ADN mutante por ciclo, multiplicado por 20 veces, y para la ligadura en un ADN natural, una fidelidad de ligadura de 1.000 veces, entonces, el ADN mutante daría como resultado 9,6 millones de moléculas, aunque el ADN natural diera como resultado 1,9 millones de moléculas. La distribución espacial en 48 pocillos daría como resultado 200.000 y 40.000 moléculas de producto de la LDR para el mutante y el tipo natural respectivamente. Tras la adición de los cebadores marcadores y sonda TaqMan™ con PCR en tiempo real, para simplificar el cálculo, los productos de la LDR anteriores se convierten en valores de Ct de 10 y 12,5 respectivamente. Para que cualquier señal derivada se puntúe como positiva, sería necesario que apareciera en al menos 2 o 3 pocillos, y también que se distinguiera fácilmente de la señal (nivel bajo) que surge de la ligadura incorrecta de las sondas en el ADN natural. Dicha ligadura incorrecta en el ADN natural puede incluso suprimirse adicionalmente añadiendo una sonda LDR en la dirección 5', que carecería del indicador fluorescente, de tal manera que los productos de la ligadura serían silenciosos sin producir señal. La probable distribución de Poisson (véase, por ejemplo, la Figura 31) muestra, que la muestra negativa tendrá un intervalo de distribución de (pocillos: moléculas) (38:0; 10:1; 1:2) para 12 moléculas. Estas cifras son suficientemente diferentes, por tanto, la lectura de TaqMan™ proporcionará una enumeración cuantitativa de la señal, lo que permite asignar una puntuación de 0, 1 o 2 moléculas originales por pocillo (representada por los valores de Ct de 12,5, 10, y 9 respectivamente), para un total de 12 moléculas KRAS mutantes en la muestra. Cuando la señal solamente pueda distinguir entre 0 y 1 moléculas mutantes, dado un número inicial de 12 o menos moléculas iniciales enumeradas en un mínimo de 24 pocillos, se puede enumerar el número inicial de copias mutantes.

Cuando se usa la detección LDR-FRET, tras la distribución en los 48 pocillos individuales para la captura en fase sólida, suponiendo solo un 50 % de eficacia de captura para productos biotinilados, cada pocillo habrá capturado 10.000 mutantes y 2 millones de amplicones KRAS naturales respectivamente. Suponiendo una eficacia de ligadura de solamente el 50 % en un ADN mutante por ciclo, deberían capturarse al menos 5.000 productos de la LDR sobre el soporte sólido si estuviera originalmente presente una única molécula mutante. Si hubiera dos moléculas mutantes en el pocillo original, entonces deberían capturarse aproximadamente 10.000 productos de la LDR. Para los pocillos con solo el producto natural, suponiendo una fidelidad de ligadura de 1:1000 (sonda LDR mutante en dirección 5' ligada incorrectamente en el ADN natural), solo se capturarían 1.000 productos de la LDR. Para que cualquier señal derivada se puntúe como positiva, sería necesario que apareciera en al menos 2 o 3 pocillos, y también que se distinguiera fácilmente de la señal (nivel bajo) que surge de la ligadura incorrecta de las sondas en el ADN natural. Dicha ligadura incorrecta en el ADN natural puede incluso suprimirse adicionalmente añadiendo una sonda LDR en la dirección 5', que carecería del indicador fluorescente, de tal manera que los productos de la ligadura serían silenciosos sin producir señal. Estas cifras son suficientemente diferentes, por tanto, la lectura LDR-FRET proporcionará una enumeración cuantitativa de la señal, permitiendo la asignación de una puntuación de 0, 1, o 2 moléculas originales por pocillo (representada como señales LDR-FRET de aproximadamente 1000, 5000, y 10.000, respectivamente), para un total de 12 moléculas KRAS en la muestra. Cuando la señal solamente pueda distinguir entre 0 y 1 moléculas mutantes, dado un número inicial de 12 o menos moléculas iniciales enumeradas en un mínimo de 24 pocillos, se puede enumerar el número inicial de copias mutantes.

Cuando se utilizan sondas de la LDR que contienen UniTaq, tienen el siguiente formato: las sondas en dirección 5' comprenden una secuencia marcadora en 5', tal como UniTaqAi, que contiene una porción específica de cebador, seguido por una secuencia específica de diana con un emparejamiento incorrecto C:A o G:T en la 3ª o penúltima base, la mutación base en el extremo 3', seguido por una base de ARN y 4 bases de ADN más que se emparejan con la diana, y un grupo separador-bloqueante C3. Los cebadores en dirección 3' comprenden un extremo fosforilado en 5', seguido por una secuencia específica de diana, y una secuencia marcadora en 3', tal como UniTaq Bi' - UniCi', que contiene también una porción específica de cebador.

Los productos de la LDR se pueden detectar usando cebadores específicos de UniTaq que tienen el formato UniTaq Ci y F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:

F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana en la dirección 5'-Mutación-Diana en la dirección 3' - UniTaq Bi'- UniTaq Ci'

Esta construcción formará una horquilla, de tal forma que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el cebador UniTaq Ci se une a la secuencia UniTaq Ci', la actividad exonucleasa 5'→3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente F1.

Los cebadores de la PCR iniciales o de las sondas de la LDR en dirección 5' también puede contener una base de ARN, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante (por ejemplo el separador C3) en el extremo 3'. A continuación, se añade ARNasaH2 a la reacción. Esto garantiza que no se forman productos independientes del molde.

Las sondas LDR en dirección 3' también se pueden fosforilar durante la reacción de ligadura usando quinasa termófila de fago (derivada del bacteriófago RM378 que infecta *Rhodothermus marinus).* En estas condiciones, la etapa de desnaturalización en la LDR debería ser tan corta como fuera posible (es decir, 94 °C o incluso menor durante 1 segundo), ya que la quinasa termófila no es completamente termoestable -o preincubar simplemente a 65 °C durante 15 minutos para conseguir la fosforilación completa del cebador. Alternativamente, el lado 5' de la sonda LDR en dirección 3' contiene la misma base que la base discriminante en 3' de la sonda en dirección 5', dicha base se eliminada por la actividad 5' a 3' nucleasa de la nucleasa Fen o la polimerasa Taq para liberar un fosfato en 5' adecuado para una ligadura posterior.

Ejemplo teórico 2 - Marcador de metilación de alta sensibilidad para la hipermetilación del promotor (cuando está presente de 1 % al 0,01 %) en ADN plasmático total. (por ejemplo, p16 y otros genes supresores tumorales, "islas" de CpG también, Sept9, vimentina, etc.)

Revisión de la estrategia v1: Se trató ADN genómico aislado o ADN enriquecido con metilo con un cóctel de enzimas sensibles a metilo cuyos elementos de reconocimiento comprenden solo o principalmente bases C y G (por ejemplo, Bsh1236I = CG^CG; HinPII = G^CGC; AciI = C^CGC o G^CGG; y Hpy99I = CGWCG^). Cebadores de la PCR escogidos con criterio amplifican fragmentos de ADN sin cortar de aproximadamente 100 - 130 pb. El fragmento debería tener al menos 2-3 sitios de enzimas sensibles a metilo, de tal manera que la escisión podría hacer que estos fragmentos desaparecieran. Estos sitios se seleccionan para que la prevención de arrastres pueda trabajar a dos niveles: (i) los sitios siguen siendo escindibles en ADN que contiene dUTP incorporado, lo que permite el uso de UNG para la prevención de arrastres y (ii) tras la amplificación, los sitios están sin metilar, de tal manera que los productos se volverían a escindir fácilmente por lo que se arrastrarían a otra reacción. Con posterioridad a la amplificación inicial mediante la PCR, las reacciones LDR y UniTaq con protección de arrastres se realizaron como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, se pueden realizar reacciones LDR y TaqMan™, o TaqMan™ directa para identificar y cuantificar cantidades relativas de ADN metilado en la muestra inicial.

Para resumir los niveles de discriminación de la anterior estrategia utilizando tanto cebadores de la PCR como sondas de la LDR para detectar la metilación de baja abundancia:

1. Uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana cuando no está metilada.
2. Uso de cebadores de la PCR con colas universales, de tal manera que si se forma cualquier cebador dimérico independiente de diana, el producto incorrecto formara una horquilla que inhibirá la amplificación adicional.
3. Uso de UNG y enzimas de restricción sensibles a la metilación para evitar la contaminación por arrastres de la reacción de la PCR inicial.
4. Uso de la fidelidad de la ligadura en 3' de la ligasa termoestable en la sonda LDR en dirección 5'.
5. Uso de cebadores UniTaq o cebadores marcadores para amplificar los productos de la LDR para una lectura de la PCR en tiempo real.
6. Uso de UNG para evitar la contaminación por arrastre de la reacción de la PCR en tiempo real.

Protocolo detallado para la detección de alta sensibilidad de la metilación del promotor v1:

2.1. a. Incubar ADN genómico, ADNlc, o ADN enriquecido con metilo en presencia de Bsh1236I (CG^CG) y HinPII (G^CGC), y UNG (37 °C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres. Añadir suplemento de tampón para optimizar la amplificación de la PCR multiplexada, dUTP y otros dNTP, AmpliTaq Gold, y cebadores específicos de genes que contienen colas universales, de tal manera que si se forma cualquier cebador dimérico independiente de diana, el producto incorrecto formara una horquilla que inhibirá la amplificación adicional. Esta mezcla de reacción de la PCR del ADN genómico inicial es adecuada para una amplificación de la PCR multiplexada en 12, 24, 48, o 96 pocillos individuales (multiplexado espacial), o en un único pocillo. Desnaturalizar el ADN genómico digerido, inactivar UNG y las endonucleasas de restricción, y activar AmpliTaq Gold (94 °C, 5-10 minutos) y amplificar mediante PCR multiplexada los fragmentos que contienen mutaciones para un número limitado de ciclos (94 °C, 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s durante 16-20 ciclos). Los cebadores de la PCR se han diseñado para tener valores de la Tm alrededor de 64-66 °C, y que se hibriden sólidamente, incluso cuando se usan a concentraciones 10 a 50 veces por debajo de la norma para la PCR uniplexada (10 nM a 50 nM cada cebador). Los ciclos se limitan a retener el equilibrio relativo de los productos de la PCR unos con respecto a otros, mientras se siguen amplificando secuencias con baja abundancia de aproximadamente 100.000 a 1.000.000 de veces. Tras la amplificación por la PCR, se inactiva la polimerasa Taq

(incubando a 99 °C durante 30 minutos.)

2.1.b. Añadir ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D) suplementada con tampón para condiciones de ligadura optimizadas, y sondas de LDR en dirección 5' y en dirección 3' adecuadas (10 nM a 20 nM de cada, los cebadores en dirección 3' se pueden sintetizar con 5' fosfato, o tratamiento con quinasa en todo el volumen antes de las reacciones. Las sondas en dirección 5' comprenden una etiqueta en 5', tal como UniAi seguido por la secuencia específica de diana. Las sondas en dirección 3' comprenden un extremo fosforilado en 5', seguido por una secuencia específica de diana, y una etiqueta en 3', tal como UniCi'. Realizar 20 ciclos de la LDR, (94 °C, 10 s, 60 °C 4-5 minutos). Esto permitirá que se produzcan eventos de ligadura en los productos de la PCR si está presente el ADN metilado en la muestra original.

2.1,c. Abrir los tubos/pocillos, diluir (10 a 100 veces) y distribuir en alícuotas a los pocillos para las reacciones de la PCR en tiempo real, conteniendo cada pocillo la mezcla maestra TaqMan™ adecuada con UNG para la prevención de arrastres y los siguientes cebadores: UniCi y UniAi, y una sonda TaqMan™ que cubre la secuencia a través de la unión de la ligadura. En dichas condiciones, las secuencias marcadoras de los cebadores de LDR serían UniAi y UniCi respectivamente, y los productos tendrían la forma: UniAi - Diana en dirección 5'-Región de metilación-Diana en dirección 3' - UniCi'

Se pueden interrogar dos o tres fragmentos en una única región promotora al mismo tiempo usando el mismo colorante fluorescente. Se puede determinar el número de fragmentos metilados por promotor mediante una señal total para este colorante. Cuando se usa el multiplexado espacial, la muestra se distribuye entre 12, 24, 48 o 96 pocillos individuales antes de la etapa de incubación a 37 °C (pero después de la adición de enzimas). De esta manera, la metilación a lo largo de una región promotora de una molécula de ADN dada puede distinguirse de la metilación de tres regiones diferentes en tres moléculas diferentes.

Puesto que no hay necesidad de distinguir entre una señal natural y una señal mutante, se puede eliminar la etapa de la LDR, con la reacción inicial de la PCR seguida directamente por una reacción de la PCR secundaria en tiempo real (por ejemplo, TaqMan™). La desventaja de ir directamente a una PCR secundaria es que no se utilizaría una protección de arrastres mediante UNG ya que los productos de la reacción inicial de la PCR han incorporado dUTP, y por tanto quedarían destruidos por el UNG. Una estrategia para abordar este problema sería utilizar dNTP convencionales en la PCR inicial, y se basa únicamente en las endonucleasas de restricción para destruir cualquier arrastre potencial a partir de las reacciones de la PCR iniciales o posteriores, ya que estos productos están ahora sin metilar.

Un segundo diseño del ensayo se basa en una digestión inicial con restricción, seguida por la distribución y captura de las dianas amplificadas mediante la PCR sobre los pocillos de una placa de microtitulación. Un único ciclo de LDR permite capturar los productos de la LDR de las dianas correctas sobre el soporte sólido, mientras que las ligaduras incorrectas se eliminan por lavado. Los productos de la LDR se cuantifican, bien mediante LDR-FRET(qLDR), PCR en tiempo real (qPCR) u otros sistemas indicadores.

La Figura 45 ilustra la detección de metilación en el ADN genómico o el ADNlc usando la digestión con restricción básica, con protocolo de detección PCR-LDR-q PCR con prevención de arrastres. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura.

La Figura 46 ilustra una variación de la Figura 45, donde los cebadores de la PCR iniciales específicos de gen contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Las sondas LDR en dirección 5' y 3' contienen etiquetas UniTaq Ai y UniTaq Bi'- UniTaq Ci' respectivamente. Después de la ligadura, los productos se diluyen y distribuyen en pocillos que contienen cebadores específicos de UniTaq del formato UniTaq Ci y F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). La hebra de producto formada por el cebador marcado fluorescentemente formará una horquilla, de tal forma que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el cebador UniTaq Ci se une a la secuencia UniTaq Ci', la actividad exonucleasa 5'->3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente F1 y generando la señal detectada por el instrumento de la PCR en tiempo real.

La Figura 47 ilustra una variación de la Figura 45, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Los cebadores de la PCR contienen colas universales para eliminar la formación de cebadores diméricos, y para permitir la amplificación con cebadores universales, uno de los cuales contiene una biotina, lo que permite capturar los productos en pocillos revestidos con estreptavidina. Las sondas de ligadura se hibridan a la diana y solamente forman producto cuando existe una complementariedad perfecta en la unión de la ligadura. Las sondas de ligadura sin reaccionar, o los productos de ligadura independientes de diana se eliminan a continuación por lavado. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detección.

Como ejemplo de enumeración cuantitativa de metilación usando el multiplexado espacial en 48 pocillos, considerar una muestra de ADNlc con 12 equivalentes genómicos de ADN tumoral, utilizada para puntuar la metilación sobre un marcador en el cromosoma 20, que se amplifica hasta aproximadamente 4 copias por célula cancerosa. Esto proporcionaría 48 copias de ADN metilado que es resistente a la digestión. El ADN sin metilar se fragmenta con la

enzima de restricción, pero sobrevive una minoría de ADN sin metilar, ~ 12 copias, para un total de 60 copias. También, se puede producir algo de metilación relacionada con la edad, que permite alcanzar hasta 12 copias. En consecuencia, las muestras sin metilación específica de tumor pueden tener una señal en el intervalo de 12-24 copias, mientras que las que tienen el marcador del cromosoma 20 metilado en los 4 cromosomas pueden tener un total en el intervalo de 60-72 copias. Si se observa la distribución de Poisson probable (véanse las Figuras 31 y 32, la muestra negativa tendrá un intervalo de distribución de (pocillos: moléculas) (38:0; 10:1; 1:2) para 12 moléculas hasta (29:0; 15:1; 4:2; 1:3) para 24 moléculas, mientras que las muestras positivas tendrán un intervalo de distribución de (14:0; 17:1; 11:2; 4:3; 1:4) para 60 moléculas hasta (11:0; 16:1; 12:2; 6:3; 2:4; 1:5) para 72 moléculas. La precisión para distinguir una señal LDR que procede de 2 moléculas (por ejemplo, para LDR-TaqMan™, un valor Ct de 9, o para la detección LDR-FRET de 10.000 productos de la LDR) de 3 moléculas (por ejemplo, para la LDR-TaqMan™, un valor de Ct de 8,5 o para una LDR-FRET de 15.000 moléculas) dependerá de la desviación estándar de la señal de la LDR de pocillo a pocillo. No obstante, incluso aunque la señal LDR sea tan variable como para dificultar la distinción entre las señales de alto nivel, siempre que la señal esté lo suficientemente limpias como para distinguir 0, 1 y 2 moléculas iniciales (representada cono valores de Ct de LDR-TaqMan™ de 12,5, 10 y 9, o señales de la LDR-FRET de aproximadamente 1.000, 5.000, y 10.000, respectivamente), Esta estrategia no tendrá dificultad para distinguir y enumerar la señal metilada que surge de aquellos individuos con ADN tumoral auténtico en circulación, de los que tienen una señal metilada relacionada con la edad (pero no cancerosa) en sangre normal. En el caso de que las Ct o la señal fluorescente solamente puede distinguir 0 de 1 o más moléculas metiladas iniciales, dado un número inicial de 12 equivalentes genómicos o menos de ADN tumoral, y 60 o más equivalentes genómicos de ADN metilado para la región concreta (por ejemplo, el cromosoma 20) enumerados en un mínimo de 48 pocillos, la estrategia debería distinguir y enumerar las señales metiladas que proceden de individuos con ADN tumoral auténtico en circulación de aquellos con señales metiladas relacionadas con la edad (pero no cancerosas) en sangre normal.

Cuando se utilizan sondas de la LDR que contienen UniTaq, tienen el siguiente formato: Las sondas en dirección 5' comprenden una etiqueta en 5', tal como UniTaqAi seguido por la secuencia específica de diana. Las sondas en dirección 3' comprenden un extremo fosforilado en 5', seguido por una secuencia específica de diana, y una etiqueta en 3', tal como UniTaq Bi' - UniTaq Ci'.

Los productos de la LDR se pueden detectar usando cebadores específicos de UniTaq que tienen el formato UniTaq Ci y F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:
F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Diana en dirección 5'- Región de metilación - Diana en dirección 3' - UniTaq Bi'- UniTaq Ci'

Esta construcción formará una horquilla, de tal forma que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el cebador UniTaq Ci se une a la secuencia UniTaq Ci', la actividad exonucleasa 5'->3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente F1.

Las sondas LDR en dirección 5' y los cebadores de la PCR pueden contener también una base de ARN, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante en el extremo 3'. A continuación, se añade ARNasaH2 a la reacción. Esto garantiza que no se forman productos independientes del molde. n algunos diseños, un sitio de restricción sensible a metilación está en dirección 3' desde el extremo 3' del cebador de la PCR, de manera que la escisión con la enzima elimina la secuencia de unión de las 4 bases adicionales, y la escisión de la base de ARN por la ARNasaH2 se reduce significativamente.

Las sondas LDR en dirección 3' también se pueden fosforilar durante la reacción de ligadura usando quinasa termófila de fago (derivada del bacteriófago RM378 que infecta *Rhodothermus marinus).* En estas condiciones, la etapa de desnaturalización de la LDR deberá ser tan corta cono sea posible (por ejemplo, 94 °C o incluso menor durante 1 segundo), ya que la quinasa termófila no es totalmente termoestable -o solo se preincuba a 65 °C durante 15 minutos para conseguir la fosforilación completa del cebador. Como alternativa, el lado 5' de la sonda en 3' puede contener una base, la misma que la base en 3' discriminante de la sonda en dirección 5', dicha base se elimina mediante la actividad nucleasa 5' a 3' de la nucleasa Fen o la polimerasa Taq para liberar un fosfato en 5' adecuado para una ligadura posterior.

Revisión de la estrategia v2: Como en el caso anterior, el ADN genómico aislado, o el ADN enriquecido con metilo, se trata con un cóctel de enzimas sensibles a metilo (HinP1I, Bsh1236I, AciI, Hpy99I y HpyCH4IV), así como por enzimas insensibles a metilo (HaeIII y MspI). La idea es generar un fragmento de ADN de aproximadamente 40 bases o más, en el que el fosfato en 5' del fragmento se origina a partir de una enzima insensible a metilo. El fragmento debería tener al menos 2-3 sitios de enzimas sensibles a metilo, de tal manera que la escisión podría hacer que estos fragmentos desaparecieran. A continuación, se hibridó una hebra del fragmento genómico sobre un molde artificial que contiene una horquilla, con una región en dirección 5', que no está relacionada con el ADN genómico, y se puede ligar al fragmento genómico en el 5' fosfato. La porción monocatenaria de la horquilla contiene también una región complementaria de la diana que contiene uno o más sitios de enzimas de restricción sensibles a metilo. Las mismas enzimas sensibles a metilo se añaden posteriormente de nuevo, y si se escapa accidentalmente una hebra diana sin metilar de la etapa inicial de digestión con restricción, se escindirá en esta segunda etapa. Se añadió un oligonucleótido en dirección 3' que se hibrida al fragmento genómico, en dirección 3' de dónde se hibrida con la hebra del molde.

Cuando se extiende el cebador específico de locus, la actividad exonucleasa 5→3' de la polimerasa destruye la porción del molde del oligonucleótido ligado, creando un producto que contiene los marcadores en dirección 5' y 3' y adecuado para su amplificación. El oligonucleótido de la horquilla sin ligar se extenderá sobre sí mismo y no se amplificará adicionalmente. Los oligonucleótidos en la dirección 5' y 3' tienen secuencias universales opcionales, así como secuencias específicas de UniTaq, lo que permite una "preamplificación" simultánea durante 12-20 ciclos, antes de la apertura del tubo, y su división entre los ensayos UniTaq o TaqMan™ adecuados. Para cada región promotora, existirán tres posiciones de interrogación, de forma que aparecerá la señal (indicando el valor Ct la cantidad relativa de secuencia metilada) así como la intensidad total de la señal (es decir = 1, 2, o 3 sitios metilados para este promotor). Esta estrategia es también compatible con el uso de UNG para proporcionar una protección contra arrastres, y la AENasaH2 para proporcionar una fidelidad extra durante las etapas de amplificación de la PCR.

Para resumir los niveles de discriminación de la anterior estrategia para la detección de la metilación de abundancia baja:

1. Uso de enzimas de restricción insensibles a la metilación para generar un 5' fosfato único en un ADN diana bicatenario.
2. Uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana bicatenaria cuando no está metilada.
3. Uso de UNG y enzimas de restricción sensibles a la metilación para evitar la contaminación por arrastres de la reacción de la PCR inicial.
4. Uso de la fidelidad de la ligadura de la ligasa termoestable para ligar la etiqueta correcta a la hebra diana.
5. Uso de un cebador específico de locus y de polimerasa para amplificar las hebras diana ligadas.
6. Uso de la actividad nucleasa de la ARNasaH2 para liberar un 3'OH sin bloquear en los cebadores de la PCR, solamente cuando se hibrida con la diana.
7. Uso de secuencias en el extremo 3' de oligonucleótidos marcadores, de manera que, cuando no están ligadas, forman horquillas y se extienden sobre sí mismas para formar productos que no se amplifican.
8. Uso de cebadores UniTaq o cebadores marcadores para amplificar los productos de la PCR o LDR para una lectura de la PCR en tiempo real.

Protocolo detallado para la detección de alta sensibilidad de la metilación del promotor v2:

2.2a. Preparar la mezcla que contiene las enzimas de restricción, moldes de horquillas artificiales (véase más adelanten) y ligasa termoestable. Escindir el ADN genómico aislado, o el ADN enriquecido con metilo, con un cóctel de enzimas sensibles a metilo (por ejemplo, HinP1I, Bsh1236I, AciI, Hpy99I y HpyCH4IV), así como por enzimas insensibles a metilo (HaeIII y MspI). Generar fragmentos de aproximadamente 40 bases o más que tienen un 5' fosfato procedente de un sitio HaeIII o MspI, y al menos 3 sitios sensibles a metilo (que no se escindieron porque estaban metilados). Preferentemente, generar tres de dichos fragmentos por promotor. Destruir las endonucleasas térmicamente (65 °C durante 15 minutos) y desnaturalizar el ADN (94 °C 1 minuto). Los moldes artificiales contienen la región del cebador en dirección 5' (U1PM del Cebador Universal 5' opcional, seguido por UniTaq Ai) así como una región complementaria de UniTaq Ai, y una región complementaria del ADN diana con una Tm de aproximadamente 72 °C, y un solapamiento con al menos un sitio de restricción sensible a metilo). Incubar a 60 °C para permitir la hibridación y la ligadura de los oligonucleótidos de la horquilla al 5' fosfato del ADN diana si, y solo si este se había metilado e hibridado al molde correcto. Esta mezcla de producto de ligadura - ADN genómico inicial es adecuada para la amplificación por PCR multiplexada en 12, 24, 48 o 96 pocillos individuales (multiplexado opcional), o en un único pocillo.
2.2b. Añadir: Las enzimas de restricción sensibles a metilo (incubar a 37 °C durante 30 minutos), así como la polimerasa Taq de inicio caliente, dNTP, UniTaqAi, y los cebadores en dirección 3' (que contienen el Cebador U2 Universal en 5', seguido por UniTaq Bi, seguido por una secuencia diana específica de locus complementaria del fragmento diana con la secuencia que está exactamente en la dirección 3' de la secuencia artificial de la hebra del molde). Cuando se extiende el cebador específico de locus, la actividad exonucleasa 5'→3' de la polimerasa destruye la porción del molde del oligonucleótido ligado, creando un producto que contiene los marcadores en dirección 5' y 3' y adecuado para su amplificación. El oligonucleótido de la horquilla sin ligar se extenderá sobre sí mismo y no se amplificará adicionalmente. En el mejor de los casos, las colas de cebadores universales UlPm y U2 de los cebadores compuestos de la LDR y PCR son algo más cortas que los Cebadores universales U1 y U2. Esto permite la amplificación universal inicial a una temperatura de ciclación menor (por ejemplo, hibridación a 55 °C) seguido por una temperatura de ciclación mayor (por ejemplo, hibridación a 65 °C) de forma que los cebadores universales UlPm y U2 se unen preferentemente al producto deseado (en comparación con los cebadores compuestos que se unen a productos incorrectos). En la variación preferida para minimizar las amplificaciones independientes de diana, los cebadores de la PCR en dirección 3' contienen una base de ARN y un extremo 3' bloqueado, que se liberan con una ARNasa-H que escinde la base de ARN cuando el cebador se hibrida con su diana. Estas condiciones amplifican los productos de la secuencia:
Cebador Univ.U1Pm-UniTaq Ai - Región de metilación - UniTaq Bi' - Cebador Univ. U2'
O simplemente de la secuencia:
UniTaq Ai - Región de metilación - UniTaq Ci'
2.2c. Abrir tubos, diluir de 10 a 100 veces y distribuir por alícuotas entre pocillos TaqMan™, conteniendo cada pocillo los siguientes cebadores: Cebador universal U2 y cebadores específicos UniTaq del formato F1-UniTaq Bi

- Q - UniTaq Ai. (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:
F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Región de metilación - UniTaq Bi' - UniTaq Ci' - Cebador Univ U2'

Esta construcción formará una horquilla, de tal forma que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el Cebador universal U2 se une a la secuencia del Cebador universal U2', la actividad exonucleasa 5'→3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente F1.

Para productos con secuencia UniTaq Ai - ADN diana - UniTaq Ci', estos se pueden detectar usando cebadores de la PCR anidados, con escisión opcional con ARNasaH2 para eliminar grupos bloqueantes y una sonda TaqMan™ interna.

Como control de la cantidad total de ADN presente, se puede elegir un fragmento diana próximo donde se genera el 5' fosfato con una enzima insensible a metilo (*HaeIII* o *MspI*), y el resto del fragmento carece de sitios de enzimas sensibles a metilo. El oligonucleótido en dirección 5' que está ligado al fragmento diana es una mezcla de dos oligonucleótidos: (i) Un oligonucleótido presente en 1 de 100 con la secuencia UniTaq específica correcta, y (ii) un oligonucleótido presente en 99 de 100 con una secuencia que tiene aproximadamente 8-10 bases complementarias de su extremo 3'. Tras el evento de ligadura y la destrucción del molde con la endonucleasa UNG y AP, se añadieron los cebadores universales para su amplificación por PCR. El producto de ligadura que contiene las secuencias UniTaq se amplifica y proporcionará una señal equivalente a 1 de 100 del molde original. La mayoría del producto de ligadura carece de secuencia universal en el extremo 5', y no se amplifica exponencialmente. La sonda en la dirección 5' no ligada formará posteriormente una horquilla sobre sí misma, y extiende su propia secuencia 3' sobre sí misma, sacándola de la contención para convertirse en parte de otro amplicón de la PCR. De forma adicional o alternativa, el control puede utilizar una relación diferente de los dos oligonucleótidos, por ejemplo 1:10 o 1:1000 para permitir comparaciones fiables a niveles bajos del ADN metilado presente en el sitio del promotor de interés.

Un control alternativo utiliza una mezcla de dos oligonucleótidos: (i) Un oligonucleótido de la horquilla presente en 1 de 100 con la secuencia UniTaq específica correcta, y (ii) un oligonucleótido de la horquilla presente en 99 de 100 sin la secuencia UniTaq. Tras el evento de ligadura, se añadieron los cebadores universales para su amplificación por PCR. Cuando se extiende el cebador específico de locus, la actividad exonucleasa 5'-> 3' de la polimerasa destruye la porción del molde del oligonucleótido ligado, creando un producto que contiene los marcadores en dirección 5' y 3' y adecuado para su amplificación. El oligonucleótido de la horquilla sin ligar se extenderá sobre sí mismo y no se amplificará adicionalmente. El producto de ligadura que contiene las secuencias UniTaq se amplifica y proporcionará una señal equivalente a 1 de 100 del molde original. La mayoría del producto de ligadura carece de secuencia universal en el extremo 5', y no se amplifica exponencialmente.

La Figura 48 ilustra la detección de metilación en el ADN genómico o el ADNlc usando la digestión con restricción, ligadura en horquilla, extensión específica de locus, con protocolo de amplificación por PCR con prevención de arrastres. Se detectaron los productos usando cebadores de la PCR anidados con sondas TaqMan™ diseñadas a lo largo de la secuencia metilada.

La Figura 49 ilustra una variación de la Figura 48, donde los cebadores de la PCR iniciales específicos de gen contienen etiquetas UniAi y UniCi. Los productos se diluyeron y se distribuyeron en pocillos para una amplificación anidada. Los cebadores de la PCR anidados en dirección 5' y 3' contienen etiquetas UniTaq Aj y UniTaq Bj-UniTaq Cj en sus extremos 5', respectivamente. Adicionalmente, los cebadores específicos de UniTaq del formato UniTaq Cj y F1-UniTaq Bj - Q - UniTaq Aj están presentes en la mezcla de amplificación a una concentración mayor, y por tanto se convierten en los cebadores dominantes que se incorporan a los productos de la amplificación. La hebra de producto formada por el cebador marcado fluorescentemente formará una horquilla, de tal forma que la secuencia UniTaq Bj se empareja con la secuencia UniTaq Bj'. Cuando el cebador UniTaq Cj se une a la secuencia UniTaq Cj', la actividad exonucleasa 5'->3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bj, liberando el colorante fluorescente F1 y generando la señal detectada por el instrumento de la PCR en tiempo real.

Los productos de la secuencia UniTaq Ai - ADN diana - UniTaq Ci' se pueden detectar también utilizando cebadores anidados dentro de la secuencia UniTaq Ci y UniTaq Ai, y una sonda TaqMan™ convencional.

Se pueden interrogar dos o tres fragmentos en una única región promotora al mismo tiempo usando el mismo colorante fluorescente. Se puede determinar el número de fragmentos metilados por promotor mediante una señal total para este colorante. Cuando se usa el multiplexado espacial, la muestra se distribuye entre 12, 24, 48 o 96 pocillos individuales antes de la etapa de incubación a 37 °C (pero después de la adición de enzimas). De esta manera, la metilación a lo largo de una región promotora de una molécula de ADN dada puede distinguirse de la metilación de tres regiones diferentes en tres moléculas diferentes.

Como hay una etapa de ligadura inicial, no es necesaria una etapa de LDR posterior, con la reacción inicial de la PCR seguida directamente por una reacción de la PCR secundaria en tiempo real (por ejemplo, TaqMan™). La desventaja de ir directamente a una PCR secundaria es que no se utilizaría una protección de arrastres mediante UNG ya que los productos de la reacción inicial de la PCR han incorporado dUTP, y por tanto quedarían destruidos por el UNG.

Una estrategia para abordar este problema sería utilizar dNTP convencionales en la PCR inicial, y se basa únicamente en las endonucleasas de restricción para destruir cualquier arrastre potencial a partir de las reacciones de la PCR iniciales o posteriores, ya que estos productos están ahora sin metilar.

Los cebadores de la PCR pueden contener también una base de ARN, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante en el extremo 3'. A continuación, se añade ARNasaH2 a la reacción. Esto garantiza que no se forman productos independientes del molde con los conjuntos de cebadores UniTaq. n algunos diseños, un sitio de restricción sensible a metilación está en dirección 3' desde el extremo 3' del cebador de la PCR, de manera que la escisión con la enzima elimina la secuencia de unión de las 4 bases adicionales, y la escisión de la base de ARN por la ARNasaH2 se reduce significativamente.

Revisión de la estrategia v3: Se trató ADN genómico aislado o ADN enriquecido con metilo con enzimas sensibles a metilo cuyos elementos de reconocimiento comprenden solo o principalmente parejas de dinucleótidos CpG (por ejemplo, Bsh1236I = CG^CG; y Hpy99I = CGWCG^). Tratar con bisulfito, que convierte el "dC" en "dU", y convierte las hebras en no complementarias. Hibridar los cebadores específicos de locus en presencia de BstU1 (CG^CG), que escindirán el ADN arrastrado. Los cebadores y la diana que no se escindieron se desbloquean con la ARNasaH2 solo cuando se unen a la diana. Los cebadores de la PCR sin bloquear amplifican a continuación los fragmentos de ADN convertidos con bisulfito sin cortar de aproximadamente 100 - 130 pb. El fragmento debería tener al menos 2 sitios de enzimas sensibles a metilo, de tal manera que la escisión podría hacer que estos fragmentos desaparecieran. Estos sitios se seleccionan para que la prevención de arrastres pueda trabajar a dos niveles: (i) los sitios siguen siendo escindibles en ADN que contiene dUTP incorporado, lo que permite el uso de UNG para la prevención de arrastres y (ii) tras la amplificación, los sitios están sin metilar, de tal manera que los productos se volverían a escindir fácilmente por lo que se arrastrarían a otra reacción. Además, el fragmento debería tener parejas de CpG metiladas internas adicionales, de manera que un cebador bloqueante se enriquecería para la amplificación de la diana metilada inicialmente, y, además, las sondas LDR se seleccionarían también para la detección de la diana metilada inicialmente. Con posterioridad a la amplificación inicial mediante la PCR, las reacciones LDR y UniTaq con protección de arrastres se realizaron como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, se pueden realizar reacciones LDR y TaqMan™, o TaqMan™ directa para identificar y cuantificar cantidades relativas de ADN metilado en la muestra inicial.

Para resumir los niveles de discriminación de la anterior estrategia utilizando ambos cebadores de la PCR y la LDR para detectar la metilación de baja abundancia:

1. Uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación para escindir la diana cuando no está metilada.
2. Uso de la actividad nucleasa de la ARNasaH2 para liberar un 3'OH sin bloquear en los cebadores de la PCR, solamente cuando se hibrida con la diana.
3. Uso de UNG y enzimas de restricción sensibles a la metilación para evitar la contaminación por arrastres de la reacción de la PCR inicial.
4. Uso de la fidelidad de la ligadura en 3' de la ligasa termoestable en la sonda LDR en dirección 5'.
5. Uso de cebadores UniTaq o cebadores marcadores para amplificar los productos de la LDR para una lectura de la PCR en tiempo real.
6. Uso de UNG para evitar la contaminación por arrastre de la reacción de la PCR en tiempo real.

Protocolo detallado para la detección de alta sensibilidad de la metilación del promotor v3

2.3.a. Incubar ADN genómico o ADN enriquecido con metilo en presencia de *Bsh*1236I (CG^CG) y UNG (37 °C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres. Tratar con bisulfito, que convierte las hebras en no complementarias, y purificar las hebras de ADN usando un kit comercialmente disponible (es decir, de Zymo Research o Qiagen). Añadir suplemento de tampón para optimizar la amplificación de la PCR multiplexada, dUTP y otros dNTP, AmpliTaq Gold, RNaseH2, *Bst*U1(CG^CG), y cebadores específicos de gen contienen una base de ARN después del extremo 3' deseado, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante para evitar la extensión sobre dianas incorrectas. Esta mezcla de reacción de la PCR del ADN genómico inicial es adecuada para una amplificación de la PCR multiplexada en 12, 24, 48, o 96 pocillos individuales (multiplexado espacial), o en un único pocillo. BstU1 escindirá cualquier ADN arrastrado procedente de una amplificación inicial. Desnaturalizar el ADN genómico digerido y las endonucleasas de restricción, y activar AmpliTaq Gold (94 °C, 5-10 minutos) y amplificar mediante PCR multiplexada los fragmentos que contienen mutaciones para un número limitado de ciclos (94 °C, 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s durante 16-20 ciclos). Los cebadores de la PCR se han diseñado para tener valores de la Tm alrededor de 60 °C, pero con las 5 bases extra está más cerca de 65-68 °C, y se hibridarán sólidamente, incluso cuando se usan a concentraciones 10 a 50 veces por debajo de la norma para la PCR uniplexada (10 nM a 50 nM cada cebador). Adicionalmente, se usa un oligonucleótido bloqueante para limitar la amplificación del ADN sin metilar. Los ciclos se limitan a retener el equilibrio relativo de los productos de la PCR unos con respecto a otros, mientras se siguen amplificando secuencias con baja abundancia de aproximadamente 100.000 a 1.000.000 de veces. Tras la amplificación por la PCR, se inactiva la polimerasa Taq (incubando a 99 °C durante 30 minutos.)

2.3.b. Añadir ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D) suplementada con tampón para condiciones de ligadura optimizadas, y sondas de LDR en dirección 5' y en dirección 3' adecuadas (10 nM a 20 nM de cada, las sondas en dirección 3' se pueden sintetizar con 5' fosfato, o fosforilarse con quinasa en todo el volumen antes

de las reacciones. Las sondas en dirección 5' comprenden una etiqueta en 5', tal como UniAi seguido por la secuencia específica de diana. Las sondas en dirección 3' comprenden un extremo fosforilado en 5', seguido por una secuencia específica de diana, y una etiqueta en 3', tal como UniCi'. Realizar 20 ciclos de la LDR, (94 °C, 10 s, 60 °C 4-5 minutos). Esto permitirá que se produzcan eventos de ligadura en los productos de la PCR si está presente el ADN metilado en la muestra original.

2.3.c. Abrir los tubos/pocillos, diluir (10 a 100 veces) y distribuir en alícuotas a los pocillos para las reacciones de la PCR en tiempo real, conteniendo cada pocillo la mezcla maestra TaqMan™ adecuada con UNG para la prevención de arrastres y los siguientes cebadores: UniCi y UniAi, y una sonda TaqMan™ que cubre la secuencia a través de la unión de la ligadura. En dichas condiciones, las secuencias marcadoras de las sondas de LDR serían UniAi y UniCi respectivamente, y los productos tendrían la forma: UniAi- Diana en dirección 5'-Región de metilación tratada con bisulfito-Diana en dirección 3' - UniCi'

Se pueden interrogar dos o tres fragmentos en una única región promotora al mismo tiempo usando el mismo colorante fluorescente. Se puede determinar el número de fragmentos metilados por promotor mediante una señal total para este colorante. Cuando se usa el multiplexado espacial, la muestra se distribuye entre 12, 24, 48 o 96 pocillos individuales antes de la etapa de incubación a 37 °C (pero después de la adición de enzimas). De esta manera, la metilación a lo largo de una región promotora de una molécula de ADN dada puede distinguirse de la metilación de tres regiones diferentes en tres moléculas diferentes.

La Figura 50 ilustra la detección de la metilación en el ADN genómico o el ADNIc usando digestión con restricción y tratamiento con bisulfito. Los cebadores de la PCR inicial de la región metilada tratada con bisulfito contienen una base de ARN, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante en el extremo 3'. La hibridación de estos cebadores en presencia de BstU1 escindirá el ADN arrastrado. Estos cebadores específicos de gen están sin bloquear desde el extremo por la ARNasaH2 solo cuando se hibridan con la diana, liberando un extremo 3'OH adecuado para la extensión de la polimerasa. Se usa un oligonucleótido de bloqueo para limitar la amplificación del ADN sin metilar convertido con bisulfito. Las sondas LDR para el ADN diana metilado convertido con bisulfito proporcionan especificidad adicional. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura.

La Figura 51 ilustra una variación de la Figura 50. Las sondas LDR en dirección 5' y 3' contienen etiquetas UniTaq Ai y UniTaq Bi'- UniTaq Ci' respectivamente. Después de la ligadura, los productos se diluyeron y distribuyeron en pocillos que contenían cebadores específicos de UniTaq que tienen el formato UniTaq Ci y F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). La hebra de producto formada por el cebador marcado fluorescentemente formará una horquilla, de tal forma que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el cebador UniTaq Ci se une a la secuencia UniTaq Ci', la actividad exonucleasa 5'→3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente F1 y generando la señal detectada por el instrumento de la PCR en tiempo real.

La Figura 52 ilustra una variación de la Figura 50, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Los cebadores de la PCR contienen colas universales para eliminar la formación de cebadores diméricos, y para permitir la amplificación con cebadores universales, uno de los cuales contiene una biotina, lo que permite capturar los productos en pocillos revestidos con estreptavidina. Las sondas de ligadura se hibridan a la diana y solamente forman producto cuando existe una complementariedad perfecta en la unión de la ligadura. Las sondas de ligadura sin reaccionar, o los productos de ligadura independientes de diana se eliminan a continuación por lavado. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detección.

La Figura 151 ilustra una variación de la Figura 50, donde después de la digestión inicial con la endonucleasa de restricción y la conversión con bisulfito, los productos de la PCR se amplifican selectivamente usando cebadores en dirección 5' y en dirección 3' específicos de locus. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasaH elimina la base de ARN para liberar un grupo 3 OH adecuado para la extensión de la polimerasa. Una sonda de LNA o PNA bloqueante que comprende una secuencia no metilada tratada con bisulfito (o su complemento) que se solapa parcialmente con el cebador de la PCR en dirección 5' preferentemente competirá por la unión con la secuencias diana no metilada tratada con bisulfito respecto del cebador en dirección 5', pero no tanto como la secuencia diana metilada tratada con bisulfito, y por tanto suprime la amplificación de la secuencia diana sin metilar tratada con bisulfito en cada ciclo de la PCR. Tras la etapa inicial de enriquecimiento de la PCR, este procedimiento continúa con el protocolo de detección de LDR-qPCR con prevención de arrastres. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura.

La Figura 152 ilustra una variación de la Figura 151, donde las sondas LDR en dirección 5' y en la dirección 3' contienen porciones específicas de los cebadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'- UniTaq Ci' y porciones específicas de las secuencias marcadoras. Después de la ligadura, los productos se diluyen y distribuyen entre pocillos que contienen cebadores específicos de UniTaq del formato UniTaq Ci y F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai, y la señal generada en la PCR se detecta mediante un instrumento de PCR en tiempo real.

La Figura 153 ilustra una variación de la Figura 151, donde los productos de la PCR se han capturado sobre un soporte

sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detección.

La Figura 156 ilustra una variación de la Figura 50, donde los productos de la PCR se amplificaron selectivamente usando cebadores en dirección 5' específicos de locus que comprenden también porciones de secuencias en 5' complementarias de la secuencia sin metilar tratada con bisulfito de la hebra superior que permite la formación de bucles en horquilla tras su extensión, y cebadores en dirección 3' específicos de locus. Después de la hibridación específica de la diana, la ARNasaH elimina la base de ARN para liberar un grupo 3 OH adecuado para la extensión de la polimerasa. Se llevó a cabo la PCR con una polimerasa que carecía de nucleasa en 5', 3' nucleasa, y actividad de desplazamiento de cadena. (i) La desnaturalización de la hebra inferior no metilada tratada con bisulfito da como resultado un bucle en horquilla con correspondencia perfecta en el extremo 3', que se extiende mediante la polimerasa para formar una región en horquilla más larga. Esta no se desnaturaliza 72 °C y evita que el cebador en dirección 5' genere una hebra superior de longitud completa. (i) La desnaturalización de la hebra inferior metilada tratada con bisulfito da como resultado un bucle en horquilla con dos o más emparejamientos incorrectos. Este no se extiende mediante la polimerasa y, por tanto, se desnaturaliza a 72 °C, lo que permite que el cebador en dirección 5' genere la hebra superior de longitud completa. (iii) La desnaturalización de la hebra superior da como resultado una horquilla en el lado 5', que se desnaturaliza durante la etapa de extensión de la PCR (72 °C), permitiendo que la polimerasa genere una hebra inferior de longitud completa. La diferencia en la preferencia de extensión de la horquilla de los cebadores en dirección 5' con (i) molde no metilado tratado con bisulfito y (ii) molde metilado tratado con bisulfito da como resultado la amplificación preferente del ADN mutante. Esta selección contra la amplificación de la diana no metilada tratada con bisulfito se produce para cada ciclo de la PCR, enriqueciendo por tanto las dianas metiladas tratadas con bisulfito. Tras la etapa inicial de enriquecimiento de la PCR, este procedimiento continúa con el protocolo de detección de LDR-q PCR con prevención de arrastres. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura.

La Figura ilustra una variación de la Figura 148, donde los productos de la PCR se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detección.

Las sondas LDR en dirección 5' y los cebadores de la PCR pueden contener también una base de ARN, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante en el extremo 3'. A continuación, se añade ARNasaH2 a la reacción. Esto garantiza que no se forman productos independientes del molde. n algunos diseños, un sitio de restricción sensible a metilación está en dirección 3' desde el extremo 3' del cebador de la PCR, de manera que la escisión con la enzima elimina el grupo bloqueante.

Las sondas LDR en dirección 3' también se pueden fosforilar durante la reacción de ligadura usando quinasa termófila de fago (derivada del bacteriófago RM378 que infecta *Rhodothermus marinus).* En estas condiciones, la etapa de desnaturalización de la LDR deberá ser tan corta cono sea posible (por ejemplo, 94 °C o incluso menor durante 1 segundo), ya que la quinasa termófila no es totalmente termoestable -o solo se preincuba a 65 °C durante 15 minutos para conseguir la fosforilación completa del cebador. Como alternativa, el lado 5' del cebador en 3' puede contener una base, la misma que la base en 3' discriminante del cebador en dirección 5', dicha base se elimina mediante la actividad nucleasa 5' a 3' de la nucleasa Fen o la polimerasa Taq para liberar un fosfato en 5' adecuado para una ligadura posterior.

La Figura 53 ilustra una variación de la Figura 50, donde los productos de la PCR se distribuyen (multiplexado espacial), y a continuación se someten a una segunda PCR anidada usando una sonda TaqMan™ así como un oligonucleótido bloqueante para limitar la amplificación del ADN no metilado convertido con bisulfito.

La Figura 151 158 ilustra una variación de la Figura 45, donde los productos de la PCR primarios se detectan directamente usando cebadores anidados específicos de locus y sondas TaqMan™ internas. Los productos de la PCR incorporan dU y están sin metilar, lo que permite la prevención de arrastres.

Ejemplo teórico 3- Detección de alta sensibilidad de la translocación génica o variación en el sitio de corte y empalme del ARNm aislado del ARNm plasmático total, exosomas, células tumorales en circulación (CTC) o células sanguíneas totales que contienen CTC.

Revisión de la estrategia: Esta estrategia depende de la fidelidad de tres enzimas: (i) La transcriptasa inversa y una copia fiel de un número de copias bajo de transcritos de ARN anómalos en la muestra inicial, (ii) La polimerasa Taq para amplificar proporcionalmente el ADNc, y (iii) la ligasa termoestable que discrimina los cebadores que se hibridan adyacentes entre sí. Una vez que se ha producido el evento de ligadura, dichos productos se amplificarán en una etapa posterior de amplificación por PCR en tiempo real y, por tanto, esta es la etapa discriminatoria clave.

Una ventaja de utilizar la LDR es que puede discriminar un evento de translocación independientemente de los puntos de rotura precisos. Además, cuando una translocación o un corte y empalme alternativo crean nuevas uniones exón-exón, la LDR es muy idónea para distinguir con precisión estas uniones, con precisión de las bases exactas en las uniones.

Existen al menos dos fuentes de transcritos que tienen un corte y empalme anómalo en los tumores. Los tumores pueden experimentar una desregulación global de la expresión génica mediante una hipometilación global. Una consecuencia de la hipometilación es la degradación del control de los sitios de inicio de la transcripción en las regiones promotoras, lo que permite secuencias alternativas en el extremo 5' de los transcritos. Dichas secuencias líder con un corte y empalme alternativo se pueden identificar y cuantificar posteriormente usando ensayos con LDR. Una segunda fuente de transcritos que tienen corte y empalme alternativo surge de una desregulación de la maquinaria de corte y empalme. Algunos de estos transcritos se traducen a proteínas que facilitan o incluso impulsan el crecimiento tumoral. De nuevo, estos transcritos que tienen un corte y empalme alternativo se pueden identificar y cuantificar posteriormente usando ensayos con LDR, incluido proporcionar niveles relativos tanto del transcrito anómalo como del natural en la misma reacción de LDR.

Para proteger contra la contaminación por arrastre, se añadió UNG a la reacción antes de la activación de la polimerasa, y se llevó a cabo la amplificación inicial de la PCR con dUTP. Las sondas de la LDR comprenden las bases naturales, por tanto, el producto de la LDR es ahora resistente a la digestión con UNG en la segunda etapa de la PCR en tiempo real. Señalar que los productos de la LDR contienen marcadores o secuencias UniTaq en sus extremos sin ligadura, que están ausentes en el ADN diana, por tanto, el arrastre accidental de productos de la LDR no da como resultado una amplificación a gran escala. A diferencia de la PCR, un producto de LDR inicial no es sustrato de una segunda reacción de la LDR.

Para resumir los niveles de discriminación de la anterior estrategia para la detección de alta sensibilidad de la variación por translocación o corte y empalme alternativo del ARNm:

1. Uso de cebadores de la PCR con colas universales, de tal manera que, si se forma cualquier cebador dimérico independiente de diana, el producto incorrecto formará una horquilla que inhibirá la amplificación adicional.
2. Uso de UNG para evitar la contaminación por arrastre de la reacción inicial de la PCR.
3. Uso de la fidelidad de la ligadura en 3' de la ligasa termoestable en la sonda LDR en dirección 5'.
4. Uso de cebadores UniTaq o cebadores marcadores para amplificar los productos de la LDR para una lectura de la PCR en tiempo real.
5. Uso de UNG para evitar la contaminación por arrastre de la reacción de la PCR en tiempo real.

Protocolo detallado para la detección de alta sensibilidad de translocación génica o variación de corte y empalme en el ARNm

3.1. a. Incubar ARNm aislado (u once ácidos nucleicos aislados toales) en presencia de UNG (37 °C, 15-30 minutos, para evitar el arrastre), dUTP y otros dNTP, transcriptasa inversa MMLV, AmpliTaq Gold, y cebadores específicos del transcrito. (la transcriptasa inversa MMLV se puede diseñar mediante ingeniería genética para sintetizar ADNc a 50-60 °C, a partir del ARN de entrada total (Invitrogen Superscript III). Como alternativa, se han diseñado mediante ingeniería genética polimerasas ADN polimerasas Tth o Tma para mejorar su actividad de transcriptasa inversa (puede necesitar la adición del cofactor Mn). Por último, la ADN polimerasa PyroPhage 3173 termofílica tiene actividad tanto de desplazamiento de cadena como de transcripción inversa, y también puede ser de utilidad). Esta mezcla de reacción de la PCR del ADN genómico inicial es adecuada para una amplificación por PCR con transcripción inversa multiplexada en 12, 24, 48, o 96 pocillos individuales (multiplexado espacial), o en un único pocillo. Tras la extensión de los cebadores inversos sobre sus transcritos de ARN análogos para generar ADNc, inactivar las transcriptasas inversas UNG y MMLV, y activar AmpliTaq Gold (94 °C, 5-10 minutos) y amplificar mediante PCR multiplexada los fragmentos que contienen transcritos para un número limitado de ciclos (94 °C, 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s durante 16-20 ciclos). Los cebadores de la PCR se han diseñado para tener valores de la Tm alrededor de 64-66 °C, y que se hibriden sólidamente, incluso cuando se usan a concentraciones 10 a 50 veces por debajo de la norma para la PCR uniplexada (10 nM a 50 nM cada cebador). Los ciclos se limitan a retener el equilibrio relativo de los productos de la PCR unos con respecto a otros, mientras se siguen amplificando secuencias con baja abundancia de aproximadamente 100.000 a 1.000.000 de veces. Tras la amplificación por la PCR, se inactiva la polimerasa Taq (incubando a 99 °C durante 30 minutos.)

3.1.b. Añadir ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D) suplementada con tampón para condiciones de ligadura optimizadas, y sondas de LDR en dirección 5' y en dirección 3' adecuadas (10 nM a 20 nM de cada, las sondas en dirección 3' se pueden sintetizar con 5' fosfato, o fosforilarse con quinasa en todo el volumen antes de las reacciones; las sondas en dirección 5' comprenden una etiqueta en 5', tal como UniAi seguido por la secuencia específica del transcrito. Las sondas en dirección 3' comprenden un extremo fosforilado en 5', seguido por una secuencia específica de diana, y una etiqueta en 3', tal como UniCi'. Realizar 20 ciclos de la LDR, (94 °C, 10 s, 60 °C 4-5 minutos). Esto permitirá que se produzcan eventos de ligadura sobre los productos de la PCR del ADNc si está presente la unión exón-exón deseada. Para la detección de translocaciones donde la unión precisa es desconocida, se utilizan tres sondas de la LDR. La una o varias sondas intermedias contienen secuencias complementarias de las regiones conocidas en dirección 5' y 3' de los (diversos) transcritos de corte y empalme. Las sondas en dirección 5' y 3' contienen marcadores como se ha descrito anteriormente para permitir la posterior amplificación mediante UniTaq o TaqMan™ y la detección de los productos de ligadura deseados.

3.1,c. Abrir los tubos/pocillos, diluir (10 a 100 veces) y distribuir en alícuotas a los pocillos para las reacciones de la PCR en tiempo real, conteniendo cada pocillo la mezcla maestra TaqMan™ adecuada con UNG para la

prevención de arrastres y los siguientes cebadores: UniCi y UniAi, y una sonda TaqMan™ que cubre la secuencia a través de la unión de la ligadura. En dichas condiciones, las secuencias marcadoras de las sondas de LDR serían UniAi y UniCi respectivamente, y los productos tendrían la forma: UniTaq Ai - Exón en dirección 5' - Unión del exón en dirección 3' - UniTaq Ci'

Para que los productos que utilizan tres sondas de la LDR detecten transcritos con uniones desconocidas, se formará el siguiente producto: UniTaq Ai - Exón en dirección 5' - Secuencia puente - Exón en dirección 3' - UniTaq Ci'

La Figura 54 ilustra una visión general del enfoque para usar la reacción PCR-LDR con prevención de arrastres para detectar translocaciones al nivel de ARNm. Se muestra una ilustración de la translocación entre dos genes, con el entrecruzamiento que permite a los exones 1, 2 o 3 del gen en dirección 5' fusionarse con el exón b del gen en dirección 3'. Se diseñan sondas de la LDR para detectar todas las posibles uniones entre exones (1-b, 2-b y 3-b).

La Figura 55 ilustra una ampliación de la detección de la translocación (visión general en la Figura 54) en un gen de fusión que utiliza el protocolo detección básico RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres. Los cebadores de la transcripción inversa iniciales específicos de gen y de la PCR contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura.

La Figura 56 ilustra una variación de la Figura 55, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando cebadores UniTaq marcados de forma fluorescente.

La Figura 57 ilustra una variación de la Figura 55, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detección.

La Figura 58 ilustra una visión general del enfoque para usar la reacción PCR-LDR con prevención de arrastres para detectar corte y empalme alternativo. Se ilustran un ejemplo de ARNm normal (1-2-3a-4) y una variante de corte y empalme alternativo (1-2-3b-4). Se diseñan sondas de la LDR para detectar tanto la variante normal como la variante de corte y empalme alternativo (3a-4 y 3b-4).

La Figura 59 ilustra una ampliación de la detección de la variante de corte y empalme alternativo (visión general en la Figura 58) que utiliza el protocolo detección básico RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres. Los cebadores de la transcripción inversa iniciales específicos de gen y de la PCR contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ marcadas de forma distinta diseñadas a través de las secuencias de la unión de la ligadura, para los transcritos normales 3a-4 (F1), y para la variante de corte y empalme alternativo 3b-4 (F2).

La Figura 60 ilustra una variación de la Figura 59, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai o UniTaq Aj y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando los cebadores UniTaq marcados de forma fluorescente F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai y F2-UniTaq Bi - Q - UniTaq Aj para detectar las señales F1 y F2, que representan el transcrito normal 3a-4, y la variante de corte y empalme alternativo 3b-4, respectivamente.

La Figura 61 ilustra una variación de la Figura 59, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET F1 y F2 adecuada para detección, que representan el transcrito normal 3a-4, y la variante de corte y empalme alternativo 3b-4, respectivamente.

La Figura 62 ilustra una ampliación de la detección de la variante de corte y empalme alternativo de bajo nivel (visión general en la Figura 58) que utiliza el protocolo detección básico RT-PCR-LDR-q PCR con prevención de arrastres. Los cebadores de la transcripción inversa iniciales específicos de gen y de la PCR contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores, y están diseñados para amplificar solamente el transcrito minoritario que contiene la unión 3b-4. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura para la variante de corte y empalme alternativo minoritaria 3b-4.

La Figura 63 ilustra una variación de la Figura 62, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando el cebador UniTaq marcado con fluorescencia F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai para detectar la señal de F1, que representa la variante de corte y empalme alternativo 3b-4 de baja abundancia.

La Figura 64 ilustra una variación de la Figura 62, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias

complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET F1 adecuada para detección, que representa la variante de corte y empalme alternativo 3b-4 de baja abundancia.

La Figura 65 ilustra una visión general del enfoque para usar la reacción PCR-LDR con prevención de arrastres para detectar corte y empalme alternativo, con un sitio de inicio alternativo para el primer exón. Se muestra una ilustración de los ARNm normal (1-2-3) y variante de corte y empalme alternativo (1a-2-3). Se diseñan sondas de la LDR para detectar tanto la variante normal como la variante de corte y empalme alternativo (1-2 y 1a-2).

La Figura 66 ilustra una ampliación de la detección de la variante de corte y empalme alternativo (visión general en la Figura 65) que utiliza el protocolo detección básico RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres. Los cebadores de la transcripción inversa iniciales específicos de gen y de la PCR contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ marcadas de forma distinta diseñadas a través de las secuencias de la unión de la ligadura, para el transcrito normal 1-2 (F1), y para la variante con el sitio de inicio alternativo 1a-2 (F2).

La Figura 67 ilustra una variación de la Figura 66, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai o UniTaq Aj y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando los cebadores UniTaq marcados de forma fluorescente F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai y F2-UniTaq Bi - Q - UniTaq Aj para detectar las señales F1 y F2, que representan el transcrito normal 1-2, y la variante con sitio de inicio alternativo 1a-2, respectivamente.

La Figura 68 ilustra una variación de la Figura 66, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET F1 y F2 adecuada para detección, que representan el transcrito normal 1-2, y la variante con sitio de inicio alternativo 1a-2, respectivamente.

La Figura 69 ilustra una ampliación de la detección de la variante de corte y empalme alternativo de bajo nivel (visión general en la Figura 58) que utiliza el protocolo detección básico RT-PCR-LDR-q PCR con prevención de arrastres. Los cebadores de la transcripción inversa iniciales específicos de gen y de la PCR contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores, y están diseñados para amplificar solamente el transcrito minoritario que contiene la unión 1a-2. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura para la variante de sitio de inicio alternativo 1a-2.

La Figura 70 ilustra una variación de la Figura 69, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando el cebador UniTaq marcado con fluorescencia F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai para detectar la señal de F1, que representa la variante de sitio de inicio alternativo 1a-2 de baja abundancia.

La Figura 71 ilustra una variación de la Figura 69, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET F1 adecuada para detección, que representa la variante de sitio de inicio alternativo 1a-2 de baja abundancia.

La Figura 72 ilustra una visión general del enfoque para usar la reacción PCR-LDR con prevención de arrastres para detectar corte y empalme alternativo con deleción de exones. Se ilustran un ejemplo de ARNm normal (e1-e2-e3-e4-e5) y una variante de corte y empalme alternativo (e1-e2-e3-e5). Se diseñan sondas de la LDR para detectar tanto la variante normal como la variante de corte y empalme alternativo (e4-e5 y e3-e5) con deleción de exones.

La Figura 73 ilustra una ampliación de la detección de la variante de corte y empalme alternativo (con deleción de exones) (visión general en la Figura 58) que utiliza el protocolo detección básico RT-PCR-LDR-q PCR con prevención de arrastres. Los cebadores de la transcripción inversa iniciales específicos de gen y de la PCR contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ marcadas de forma distinta diseñadas a través de las secuencias de la unión de la ligadura, para el transcrito normal e4-e5 (F1), y para la variante de corte y empalme alternativo con deleción de exones e3-e5 (F2).

La Figura 74 ilustra una variación de la Figura 73, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai o UniTaq Aj y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando los cebadores UniTaq marcados de forma fluorescente F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai y F2-UniTaq Bi - Q - UniTaq Aj para detectar las señales F1 y F2, que representan el transcrito normal e4-e5, y para la variante de corte y empalme alternativo con deleción de exones e3-e5, respectivamente.

La Figura 75 ilustra una variación de la Figura 73, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET F1 y F2 adecuada para detección, que representan el transcrito normal e4-e5, y para la variante de corte y empalme

alternativo con deleción de exones e3-e5, respectivamente.

La Figura 76 ilustra una ampliación de la detección de la variante de corte y empalme alternativo (con deleción de exones) de bajo nivel (visión general en la Figura 58) que utiliza el protocolo detección básico RT-PCR-LDR-q PCR con prevención de arrastres. Los cebadores de la transcripción inversa iniciales específicos de gen y de la PCR contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores, y están diseñados para amplificar solamente el transcrito minoritario que contiene la unión e3-e4 mediante el uso de un oligonucleótido bloqueante con la secuencia e4 para suprimir la amplificación del transcrito natural. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura para la variante de corte y empalme alternativo con deleción de exones poco abundante e3-e5.

La Figura 77 ilustra una variación de la Figura 76, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando el cebador UniTaq marcado con fluorescencia F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai para detectar la señal de F1, que representa la variante de corte y empalme alternativo con deleción de exones de baja abundancia e3-e5.

La Figura 78 ilustra una variación de la Figura 76, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET F1 adecuada para detección, que representa la variante de corte y empalme alternativo con deleción de exones de baja abundancia e3-e5.

La Figura 79 ilustra una visión general del enfoque para usar la reacción PCR-LDR con prevención de arrastres para detectar corte y empalme alternativo con inserción de intrones. Se muestra un ejemplo de ARNm normal (e1-e2-e3-e4-e5) y una variante de corte y empalme alternativo (el documento e1, i1-e2-e3-e4-e5). Se diseñan sondas de la LDR para detectar tanto la variante normal como la variante de corte y empalme alternativo con inserción de intrones(e1-e2 e i1-e2).

La Figura 80 ilustra una ampliación de la detección de la variante de corte y empalme alternativo (visión general en la Figura 79) que utiliza el protocolo detección básico RT-PCR-LDR-PCR en tiempo real con prevención de arrastres. Los cebadores de la transcripción inversa iniciales específicos de gen y de la PCR contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ marcadas de forma distinta diseñadas a través de las secuencias de la unión de la ligadura, para el transcrito normal e1-e2 (F1), y para la variante de corte y empalme alternativo con inserción de intrones i1-e2 (F2).

La Figura 81 ilustra una variación de la Figura 80, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai o UniTaq Aj y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando los cebadores UniTaq marcados de forma fluorescente F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai y F2-UniTaq Bi - Q - UniTaq Aj para detectar las señales F1 y F2, que representa el transcrito normal e1-e2, y para la variante de corte y empalme alternativo con inserción de intrones i1-e2, respectivamente.

La Figura 82 ilustra una variación de la Figura 80, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET F1 y F2 adecuada para detección, que representa el transcrito normal e1-e2, y para la variante de corte y empalme alternativo con inserción de intrones i1-e2, respectivamente.

La Figura 83 ilustra una ampliación de la detección de la variante de corte y empalme alternativo (con inserción de intrones) de bajo nivel (visión general en la Figura 79) que utiliza el protocolo detección básico RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres. Los cebadores de la transcripción inversa iniciales específicos de gen y de la PCR contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores, y están diseñados para amplificar solamente el transcrito minoritario que contiene la unión i1-e2. Esto se puede conseguir (i) digiriendo los ácidos nucleicos con ADNasa1 pancreática, para digerir todo el ADN genómico mientras se deja el ARNm intacto, o (ii) usando conjuntos de cebadores que también amplían el intrón i2, por ejemplo, por transcripción inversa desde e3, en presencia del cebador bloqueante a i2. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura para la variante de corte y empalme alternativo minoritaria con inserción de intrones i1-e2.

La Figura 84 ilustra una variación de la Figura 83, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando el cebador UniTaq marcado con fluorescencia F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai para detectar la señal de F1, que representa la variante de corte y empalme alternativo con inserción de intrones de baja abundancia i1-e2.

La Figura 85 ilustra una variación de la Figura 83, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET F1 adecuada para detección, que representa la variante de corte y empalme alternativo con inserción de intrones de

baja abundancia i1-e2.

Cuando se utilizan sondas de la LDR que contienen UniTaq, tienen el siguiente formato: las sondas en dirección 5' comprenden una etiqueta en 5', tal como UniTaqAi seguido por la secuencia específica de diana. Las sondas en dirección 3' comprenden un extremo fosforilado en 5', seguido por una secuencia específica de diana, y una etiqueta en 3', tal como UniTaq Bi' - UniTaq Ci'.

Los productos de la LDR se pueden detectar usando cebadores específicos de UniTaq que tienen el formato UniTaq Ci y F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:
F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Exón en dirección 5' - Unión del exón en dirección 3' - UniTaq Bi' - UniTaq Ci'

Esta construcción formará una horquilla, de tal forma que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el cebador UniTaq Ci se une a la secuencia UniTaq Ci', la actividad exonucleasa 5'->3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente F1.

Para que los productos que utilizan tres sondas de la LDR detecten transcritos con uniones desconocidas, se formará el siguiente producto: F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Exón en dirección 5' - Secuencia de puente - Exón en dirección 3' -UniTaq Bi' - UniTaq Ci'

Uno de los cebadores de la PCR iniciales o de las sondas de la LDR en dirección 5' también puede contener una base de ARN, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante en el extremo 3'. se añade ARNasaH2 a la reacción después de la etapa de transcripción inversa para la PCR, y/o durante la reacción de la LDR. Esto garantiza que no se forman productos independientes del molde.

Las sondas LDR en dirección 3' también se pueden fosforilar durante la reacción de ligadura usando quinasa termófila de fago (derivada del bacteriófago RM378 que infecta *Rhodothermus marinus).* En estas condiciones, la etapa de desnaturalización de la LDR deberá ser tan corta cono sea posible (por ejemplo, 94 °C o incluso menor durante 1 segundo), ya que la quinasa termófila no es totalmente termoestable -o solo se preincuba a 65 °C durante 15 minutos para conseguir la fosforilación completa del cebador. Como alternativa, el lado 5' de la sonda en 3' puede contener una base, la misma que la base en 3' discriminante del cebador en dirección 5', dicha base se elimina mediante la actividad nucleasa 5' a 3' de la nucleasa Fen o la polimerasa Taq para liberar un fosfato en 5' adecuado para una ligadura posterior.

Ejemplo teórico 4 - Cuantificación precisa de los cambios en el número de copias específico de tumor en el ADN aislado de células tumorales en circulación

Revisión de la estrategia: Puesto que puede haber solamente unas pocas CTC presentes en la muestra purificada, es importante utilizar la multiplexación espacial para contar con precisión cada copia cromosómica de la muestra. Esta estrategia depende de la fidelidad de dos enzimas: (i) La polimerasa Taq copia fielmente un bajo nivel de copias de regiones de ADN en la muestra inicial, y (ii) la ligasa que discrimina los cebadores que se hibridan adyacentes entre sí. Una vez que se ha producido el evento de ligadura, dichos productos se amplificarán en una etapa posterior de amplificación por PCR en tiempo real y, por tanto, esta es la etapa discriminatoria clave.

Para proteger contra la contaminación por arrastre, se añadió UNG a la reacción antes de la activación de la polimerasa, y se llevó a cabo la amplificación inicial de la PCR con dUTP. Las sondas de la LDR comprenden las bases naturales, por tanto, el producto de la LDR es ahora resistente a la digestión con UNG en la segunda etapa de la PCR en tiempo real. Señalar que los productos de la LDR contienen marcadores o secuencias UniTaq en sus extremos sin ligadura, que están ausentes en el ADN diana, por tanto, el arrastre accidental de productos de la LDR no da como resultado una amplificación a gran escala. A diferencia de la PCR, un producto de LDR inicial no es sustrato de una segunda reacción de la LDR.

Para resumir los niveles de discriminación de la anterior estrategia utilizando tanto cebadores de la PCR como cebadores de la LDR para la determinación de la detección del número de copias en regiones específicas:

1. Uso de cebadores de la PCR con colas universales, de tal manera que si se forma cualquier cebador dimérico independiente de diana, el producto incorrecto formara una horquilla que inhibirá la amplificación adicional.
2. Uso de UNG para evitar la contaminación por arrastre de la reacción inicial de la PCR.
3. Uso de la fidelidad de la ligadura en 3' de la ligasa termoestable en la sonda LDR en dirección 5'.
4. Uso de cebadores UniTaq o cebadores marcadores para amplificar los productos de la LDR para una lectura de la PCR en tiempo real.
5. Uso de UNG para evitar la contaminación por arrastre de la reacción de la PCR en tiempo real.

Protocolo detallado para una cuantificación precisa de los cambios en el número de copias específico de tumor en el ADN o ARN aislado de células tumorales en circulación.

4.1.a. Incubar el ADN genómico en presencia de UNG (37 °C, 15-30 minutos, para evitar el arrastre), dUTP y otros dNTP, AmpliTaq Gold, y cebadores específicos de genes que contienen colas universales, de tal manera que si se forma cualquier cebador dimérico independiente de diana, el producto incorrecto formara una horquilla que inhibirá la amplificación adicional. Esta mezcla de reacción de la PCR del ADN genómico inicial se distribuye entre 12, 24, 48 o 96 pocillos individuales (multiplexado espacial) para multiplexar la amplificación por la PCR. Desnaturalizar el ADN genómico procedente del plasma, inactivar UNG, y activar AmpliTaq Gold (94 °C, 5-10 minutos) y amplificar mediante PCR multiplexada las regiones cromosómicas para un número limitado de ciclos (94 °C, 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s durante 12-20 ciclos). Los cebadores de la PCR se han diseñado para tener valores de la Tm alrededor de 64-66 °C, y que se hibriden sólidamente, incluso cuando se usan a concentraciones 10 a 50 veces por debajo de la norma para la PCR uniplexada (10 nM a 50 nM cada cebador). Los ciclos se limitan a retener el equilibrio proporcional de los productos de la PCR unos con respecto a otros, mientras se siguen amplificando secuencias con baja abundancia de aproximadamente 100.000 a 1.000.000 de veces. Tras la amplificación por la PCR, se inactiva la polimerasa Taq (incubando a 99 °C durante 30 minutos.)

4.1.b. Añadir ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D) suplementada con tampón para condiciones de ligadura optimizadas, y sondas de LDR en dirección 5' y en dirección 3' adecuadas (10 nM a 20 nM de cada, las sondas en dirección 3' se pueden sintetizar con 5' fosfato, o tratamiento con quinasa en todo el volumen antes de las reacciones; Las sondas en dirección 5' comprenden una etiqueta en 5', tal como UniAi seguido por la secuencia específica de diana. Las sondas en dirección 3' comprenden un extremo fosforilado en 5', seguido por una secuencia específica de diana, y una etiqueta en 3', tal como UniCi'. Realizar 20 ciclos de la LDR, (94 °C, 10 s, 60 °C 4-5 minutos). Esto permitirá que se produzcan eventos de ligadura en los productos de la PCR si está presente el ADN cromosómico.

4.1.c. Abrir los tubos/pocillos, diluir (10 a 100 veces) y distribuir en alícuotas a los pocillos para las reacciones de la PCR en tiempo real, conteniendo cada pocillo la mezcla maestra TaqMan™ adecuada con UNG para la prevención de arrastres y los siguientes cebadores: UniCi y UniAi, y una sonda TaqMan™ que cubre la secuencia a través de la unión de la ligadura. En dichas condiciones, las secuencias marcadoras de los cebadores de LDR serían UniAi y UniCi respectivamente, y los productos tendrían la forma: UniAi - Región cromosómica diana - UniCi'

La Figura 86 ilustra la enumeración del número de copias de ADN con multiplexación espacial (véanse la Figuras 6-9), usando el protocolo de detección PCR-LDR-q PCR básico con prevención de arrastres. Los cebadores de la PCR iniciales específicos de gen contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura para cada región cromosómica, y se enumera el número de copias totales.

La Figura 87 ilustra una variación de la Figura 86, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando el cebador UniTaq marcado con fluorescencia F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai para detectar la señal de cada región cromosómica, y se enumera el número de copias totales.

La Figura 88 ilustra una variación de la Figura 86, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido (véanse las Figuras 19-23). Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detectar cada región cromosómica, y enumerar el número de copias totales.

La Figura 89 ilustra la enumeración del número de transcritos de ARNm con multiplexación espacial (véanse la Figuras 10-13), usando el protocolo de detección PCR-LDR-qPCR con transcripción inversa con prevención de arrastres. Los cebadores de la transcripción inversa iniciales específicos de gen y de la PCR contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura para cada transcrito de ARNm, para permitir una enumeración precisa.

La Figura 90 ilustra una variación de la Figura 89, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando el cebador UniTaq marcado con fluorescencia F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai para detectar la señal de cada transcrito de ARNm, para permitir una enumeración precisa.

La Figura 91 ilustra una variación de la Figura 89, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido (véanse las Figuras 24-28). Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detectar cada transcrito de ARNm, para permitir una enumeración precisa.

Como ejemplo de multiplexación espacial entre 48 pocillos, considérese ADN aislado de 12 CTC, con sondas preparadas para varias regiones de copia de valor pronóstico o terapéutico, tales como la pérdida de heterocigosidad del brazo cromosómico 8p (LOH en 8p; predice el peor resultado), o la amplificación del gen de Her2 en 17q12 (predice la sensibilidad a la terapia con herceptina). Se pueden utilizar múltiples sondas de la PCR para determinar el número

de copias a través del genoma, con pares adicionales en puntos focales conocidos por experimentar una amplificación significativa. Para este ejemplo, las regiones diploides del genoma producirían señal a partir de las 24 copias (es decir, 2 x 12 células), un evento LOH en 8p produciría 12 copias y, por ejemplo, si el gen de Her2 se amplificara 8 veces, esto produciría señal de las 96 copias (es decir 8 x 12). La distribución de Poisson probable (Figuras 31 & 32) muestra que la región LOH tendrá una distribución de aproximadamente (pocillos: moléculas) (38:0; 10:1; 1:2) para 12 moléculas, las regiones diploides tendrán una distribución de aproximadamente (29:0; 15:1; 4:2; 1:3) para 24 moléculas, mientras que la región amplificada tendrá una distribución de aproximadamente (6:0; 13:1; 13:2; 9:3; 4:4; 2:5; 1:6) para 96 moléculas. Se observa que si una región ha experimentado solamente una amplificación leve, por ejemplo, de 2 copias por célula a 3 copias, las regiones trisómicas tendrán una distribución de aproximadamente (23:0; 17:1; 6:2; 2:3) para 36 moléculas y, por tanto, se podrán distinguir de las regiones diploides. Como antes, incluso aunque la señal LDR de TaqMan™ sea tan variable como para dificultar la distinción entre las señales de alto nivel, siempre que la señal esté lo suficientemente limpias como para distinguir 0, 1 y 2 moléculas iniciales (representada cono valores de Ct de LDR-TaqMan™ de 12,5, 10 y 9, o señales de la LDR de aproximadamente 1.000, 5.000, y 10.000, respectivamente), esta estrategia no tendrá problemas para distinguir y enumerar regiones que han experimentado LOH, regiones que sean diploides, y regiones que hayan experimentado amplificación. La CT o la señal fluorescente es lo suficientemente variable como para distinguir solamente entre 0 y 1 o más moléculas cromosómicas iniciales, dadas 24 copias de cromosomas diploides en un mínimo de 48 pocillos, esta estrategia debería distinguir y enumerar regiones que han experimentado LOH, regiones que sean diploides, y regiones que hayan experimentado amplificación.

Para muestras de ADNlc con mayor carga de ADN tumoral o con ARNm o miARN, donde la diana inicial está presente en cantidades mayores, la señal de LDR será proporcionalmente más intensa. También se puede conseguir un intervalo dinámico grande de moléculas iniciales mediante el uso de una estrategia diferente para diluir la señal inicial. Por ejemplo, después de una etapa de transcripción inversa para el ARNm aislado de los exosomas, en lugar de dividir la muestra equitativamente entre 48 pocillos, la muestra se distribuye entre 10 alícuotas, las 8 primeras se distribuyen entre pocillos, y una de las alícuotas remanentes se diluye entre 10 alícuotas, donde 8 se distribuyen entre pocillos, etc. Esto permite 6 órdenes de magnitud de dilución: (es decir 8 x 6 = 48). El estudio de las distribuciones de Poisson muestra que siempre que 1 pocillo de la última dilución represente 0 moléculas, un conjunto dado de 8 pocillos puede proporcionar una estimación semicuantitativa de las moléculas iniciales para un intervalo dinámico de 2 órdenes de magnitud, de 1 a 128 moléculas, incluso aunque la lectura de la LDR solamente necesite proporcionar un intervalo dinámico de 20 veces, o un intervalo Ct de 4-5 (véanse las Figuras 33-37 que muestran la distribución de Poisson de 1 a 128 moléculas en 8 pocillos). Puesto que las diluciones son solo de 10 veces, se pueden usar al menos 2 conjuntos de 8 pocillos para determinar el número de moléculas originales de múltiples transcritos diferentes de la muestra, incluso aunque algunas moléculas de ARNm estuvieran en aproximadamente 10 moléculas, mientras que otras estuvieran en aproximadamente 1 x 10^6 moléculas.

Se puede usar la misma estrategia para cuantificar las copias de ARN, pero se añade la transcriptasa inversa en la primera etapa, y la distribución espacial de la mezcla de reacción inicial puede ser por dilución y distribución, como se ha detallado anteriormente.

Cuando se utilizan sondas de la LDR que contienen UniTaq, tienen el siguiente formato: las sondas en dirección 5' comprenden una etiqueta en 5', tal como UniTaqAi seguido por una secuencia específica de diana con un emparejamiento incorrecto C:A o G:T en la 3ª o penúltima base, la mutación base en el extremo 3', seguido por una base de ARN y 4 bases de ADN más que se emparejan con la diana, y un grupo separador-bloqueante C3. Las sondas en dirección 3' comprenden un extremo fosforilado en 5', seguido por una secuencia específica de diana, y una etiqueta en 3', tal como UniTaq Bi' - UniCi'.

Los productos de la LDR se pueden detectar usando cebadores específicos de UniTaq que tienen el formato UniTaq Ci y F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q). En estas condiciones, se formará el siguiente producto:
F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Región cromosómica diana - UniTaq Bi' - UniTaq Ci'

Esta construcción formará una horquilla, de tal forma que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el cebador UniTaq Ci se une a la secuencia UniTaq Ci', la actividad exonucleasa 5'->3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente F1.

Uno de los cebadores de la PCR iniciales (con ARN) o ambos cebadores de la PCR iniciales (con ADN) o las sondas LDR en dirección 5' también pueden contener una base de ARN, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante en el extremo 3'. Cuando se cuantifican las copias de ADN, se añade ARNasaH2 a la reacción de la PCR, y/o a la reacción de la LDR. Cuando se cuantifica el ARN, se añade ARNasaH2 a la reacción después de la etapa de transcripción inversa de la PCR, y/o a la reacción de la LDR. Esto garantiza que no se forman productos independientes del molde.

Las sondas LDR en dirección 3' también se pueden fosforilar durante la reacción de ligadura usando quinasa termófila de fago (derivada del bacteriófago RM378 que infecta *Rhodothermus marinus).* En estas condiciones, la etapa de desnaturalización de la LDR deberá ser tan corta cono sea posible (por ejemplo 94 °C o incluso menor durante 1 segundo), ya que la quinasa termófila no es totalmente termoestable -o solo se preincuba a 65 °C durante 15 minutos

para conseguir la fosforilación completa del cebador. Como alternativa, el lado 5' del cebador en 3' puede contener una base, la misma que la base en 3' discriminante del cebador en dirección 5', dicha base se elimina mediante la actividad nucleasa 5' a 3' de la nucleasa Fen o la polimerasa Taq para liberar un fosfato en 5' adecuado para una ligadura posterior.

Ejemplo teórico 5 - Cuantificación precisa de cambios en el miARN, ARNlnc o ARNm a partir de exosomas aislados o a partir de células tumorales en circulación

Revisión de la estrategia: Esta estrategia depende de la fidelidad de dos enzimas: (i) La transcriptasa inversa y la polimerasa Taq copian fielmente un bajo nivel de copias de miARN en la muestra inicial, y (ii) la ligasa que discrimina las sondas que se hibridan adyacentes entre sí. Una vez que se ha producido el evento de ligadura, dichos productos se amplificarán en una etapa posterior de amplificación por PCR en tiempo real y, por tanto, esta es la etapa discriminatoria clave.

El microARN(miARN) se ha identificado como un marcador específico de tejido de la presencia de tumores, su clasificación y su pronóstico. El miARN se encuentra en el suero y el plasma bien en forma de complejos con proteínas Ago2 o bien mediante encapsulación como exosomas.

Para proteger contra la contaminación por arrastre, se añadió UNG a la reacción antes de la transcripción inversa con MMLV, y se llevó a cabo la amplificación inicial de la PCR con dUTP. Las sondas de la LDR comprenden las bases naturales, por tanto, el producto de la LDR es ahora resistente a la digestión con UNG en la segunda etapa de la PCR en tiempo real. Señalar que los productos de la LDR contienen marcadores o secuencias UniTaq en sus extremos sin ligadura, que están ausentes en el miARN diana, por tanto, el arrastre accidental de productos de la LDR no da como resultado una amplificación a gran escala. A diferencia de la PCR, un producto de LDR inicial no es sustrato de una segunda reacción de la LDR.

Un bucle en horquilla específico del miARN que contiene una región cebadora universal inversa y una región específica de miARN de 6-8 bases se hibrida con el extremo 3' del miARN y se extiende con MMLV en presencia de dUTP. En las condiciones correctas, MMLV añadirá 2-3 nucleótidos C después del extremo 5' del molde de miARN en una reacción de extensión independiente del molde.

Tras la generación del ADNc inicial, añadir un cebador inverso universal y un cebador directo con cola universal que se hibridan con los 2-3 nucleótidos C adicionales y de 12 a 14 bases específicas del miARN. Se utiliza la polimerasa Taq para realizar 16-20 ciclos de amplificación universal; el cebador inverso universal se sitúa para eliminar la mayor parte de la región de la horquilla durante la generación del ADNc.

Para resumir los niveles de discriminación de la anterior estrategia para la detección de alta sensibilidad del miARN:

1. Uso de UNG para evitar la contaminación por arrastre de las reacciones de transcripción inversa y de la PCR iniciales.
2. Uso de la fidelidad de la ligadura en 3' de la ligasa termoestable en la sonda LDR en dirección 5'.
3. Uso de cebadores UniTaq o cebadores marcadores para amplificar los productos de la LDR para una lectura de la PCR en tiempo real.
4. Uso de UNG para evitar la contaminación por arrastre de la reacción de la PCR en tiempo real.

Protocolo detallado para la detección de alta sensibilidad de miARN:

5.1.a. Incubar el miARN aislado (u once ácidos nucleicos aislados toales) en presencia de UNG (37 °C, 15-30 minutos, para evitar el arrastre), dUTP y otros dNTP, transcriptasa inversa MMLV, AmpliTaq Gold, y cebadores específicos del transcrito. Esta mezcla de reacción de la PCR del ADN genómico inicial es adecuada para una amplificación por PCR con transcripción inversa multiplexada en 12, 24, 48, o 96 pocillos individuales (multiplexado espacial), o en un único pocillo. Tras la extensión de los cebadores inversos en horquilla sobre su miARN análogo para generar ADNc, inactivar las transcriptasas inversas UNG y MMLV, y activar AmpliTaq Gold (94 °C, 5-10 minutos) y amplificar mediante PCR multiplexada los fragmentos que contienen el transcrito usando cebadores puente y cebadores marcadores Ti y Tj para un número limitado de ciclos (94 °C, 10 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s durante 16-20 ciclos). Tras la amplificación por la PCR, se inactiva la polimerasa Taq (incubando a 99 °C durante 30 minutos.)

5.1.b. Añadir ligasa termoestable (preferentemente de la cepa AK16D) suplementada con tampón para condiciones de ligadura optimizadas, y sondas de LDR en dirección 5' y en dirección 3' adecuadas (10 nM a 20 nM de cada, las sondas en dirección 3' se pueden sintetizar con 5' fosfato, o tratamiento con quinasa en todo el volumen antes de las reacciones; Las sondas en dirección 5' comprenden una etiqueta en 5', tal como UniAi seguido por la secuencia específica de diana. Las sondas en dirección 3' comprenden un extremo fosforilado en 5', seguido por una secuencia específica de diana, y una etiqueta en 3', tal como UniCi'. Realizar 20 ciclos de la LDR, (94 °C, 10 s, 60 °C 4-5 minutos). Esto permitirá que se produzcan eventos de ligadura en los productos de la PCR si está presente el ADN cromosómico.

5.1.c. Abrir los tubos/pocillos, diluir (10 a 100 veces) y distribuir en alícuotas a los pocillos para las reacciones de

la PCR en tiempo real, conteniendo cada pocillo la mezcla maestra TaqMan™ adecuada con UNG para la prevención de arrastres y los siguientes cebadores: UniCi y UniAi, y una sonda TaqMan™ que cubre la secuencia a través de la unión de la ligadura. En dichas condiciones, las secuencias marcadoras de las sondas de LDR serían UniAi y UniCi respectivamente, y los productos tendrían la forma: UniAi - miARN en dirección 5' - Unión con el miARN en dirección 3' - UniCi'

En una variación del tema anterior, el oligonucleótido en horquilla se liga al extremo 3' del miARN de una forma específica de base, agregando una secuencia bucle artificial, que contiene un sitio de unión al cebador marcador (Tj). Esto permite la extensión para copiar toda la secuencia del miARN, así como iniciar una reacción de la PCR utilizando cebadores puente específicos de miARN (que comprenden (Ti) y secuencia específica de miARN), y los dos cebadores marcadores (Ti, Tj). El producto de la PCR es ahora adecuado para la posterior etapa de la LDR como se ha descrito anteriormente.

La Figura 92 ilustra la detección del miARN, usando transcripción inversa de un cebador en bucle, seguido por un protocolo de la PCR con marcador cebador y puente con prevención de arrastres. El posterior protocolo de detección LDR-q PCR se utiliza con prevención de arrastres. Los cebadores de la PCR específicos de miARN contienen colas de 8-11 bases idénticas como parte de los cebadores marcadores para evitar los cebadores diméricos. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura para cada miARN detectado.

La Figura 93 ilustra una variación de la Figura 92, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando el cebador UniTaq marcado con fluorescencia F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai para detectar la señal de cada miARN.

La Figura 94 ilustra una variación de la Figura 92, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detectar cada miARN.

La Figura 95 ilustra la detección del miARN, usando la ligadura de un cebador en bucle directamente al miARN, seguido por transcripción inversa usando un cebador marcador complementario del bucle con prevención de arrastres. El procedimiento utiliza un cebador marcador y puente para detección por PCR-LDR-q PCR, con prevención de arrastres. Los cebadores de la PCR específicos de miARN contienen colas de 8-11 bases idénticas como parte de los cebadores marcadores para evitar los cebadores diméricos. Los productos se detectan usando sondas TaqMan™ diseñadas a través de la secuencia de la unión de la ligadura para cada miARN detectado.

La Figura 96 ilustra una variación de la Figura 95, donde los cebadores de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando el cebador UniTaq marcado con fluorescencia F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai para detectar la señal de cada miARN.

La Figura 97 ilustra una variación de la Figura 95, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detectar cada miARN.

La Figura 98 ilustra una variación de la Figura 95, donde el cebador de la PCR en puente contiene una base de ARN, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante en el extremo 3'. se añade ARNasaH2 a la reacción después de la etapa de transcripción inversa para desbloquear el cebador de la PCR. Esto garantiza que no se forman productos independientes del molde.

La Figura 99 ilustra una variación de la Figura 98, donde las sondas de la LDR en dirección 5' y 3' contienen marcadores UniTaq Ai y UniTaq Bi'-UniTaq Ci' respectivamente, y los productos se detectan usando el cebador UniTaq marcado con fluorescencia F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai para detectar la señal de cada miARN.

La Figura 100 ilustra una variación de la Figura 98, donde los productos de la PCR están distribuidos (multiplexación espacial) y se han capturado sobre un soporte sólido. Las sondas de la LDR se han diseñado para contener secuencias complementarias cortas que solamente se hibridan entre sí cuando están unidas entre sí, generando una señal FRET adecuada para detectar cada miARN.

Cuando se utilizan sondas de la LDR que contienen UniTaq, tienen el siguiente formato: las sondas en dirección 5' comprenden una etiqueta en 5', tal como UniTaqAi seguido por la secuencia específica de diana. Las sondas en dirección 3' comprenden un extremo fosforilado en 5', seguido por una secuencia específica de diana, y una etiqueta en 3', tal como UniTaq Bi' - UniTaq Ci'.

Los productos de la LDR se pueden detectar usando cebadores específicos de UniTaq que tienen el formato UniTaq Ci y F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai. (donde F1 es un colorante fluorescente que se inactiva mediante el Inactivador Q).

En estas condiciones, se formará el siguiente producto:
F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai -miARN en dirección 5' - Unión de miARN en dirección 3' - UniTaq Bi' - UniTaq Ci'

Esta construcción formará una horquilla, de tal forma que la secuencia UniTaq Bi se empareja con la secuencia UniTaq Bi'. Cuando el cebador UniTaq Ci se une a la secuencia UniTaq Ci', la actividad exonucleasa 5'->3' de la polimerasa digiere la secuencia UniTaq Bi, liberando el colorante fluorescente F1.

Para que los productos que utilizan tres sondas de la LDR detecten transcritos con uniones desconocidas, se formará el siguiente producto: F1-UniTaq Bi - Q - UniTaq Ai - Exón en dirección 5' - Secuencia de puente - Exón en dirección 3' -UniTaq Bi' - UniTaq Ci'

Uno de los cebadores de la PCR iniciales o de las sondas de la LDR en dirección 5' también puede contener una base de ARN, 4 bases adicionales y un grupo bloqueante en el extremo 3'. se añade ARNasaH2 a la reacción después de la etapa de transcripción inversa para la PCR, y/o durante la reacción de la LDR. Esto garantiza que no se forman productos independientes del molde.

Las sondas LDR en dirección 3' también se pueden fosforilar durante la reacción de ligadura usando quinasa termófila de fago (derivada del bacteriófago RM378 que infecta *Rhodothermus marinus).* En estas condiciones, la etapa de desnaturalización de la LDR deberá ser tan corta cono sea posible (por ejemplo, 94 °C o incluso menor durante 1 segundo), ya que la quinasa termófila no es totalmente termoestable -o solo se preincuba a 65 °C durante 15 minutos para conseguir la fosforilación completa del cebador. Como alternativa, el lado 5' de la sonda en 3' puede contener una base, la misma que la base en 3' discriminante de la sonda en dirección 5', dicha base se elimina mediante la actividad nucleasa 5' a 3' de la nucleasa Fen o la polimerasa Taq para liberar un fosfato en 5' adecuado para una ligadura posterior.

Ejemplos empíricos - Detección de mutaciones relacionadas con el cáncer y metilación mediante PCR-LDR-qPCR

Métodos generales para los ejemplos empíricos 1-4.

Las líneas de células usadas fueron: la línea de células HT-29 de adenocarcinoma de colon, que hospeda la mutación heterocigótica V600E (1799T>A) BRAF; la línea de células HEC-1 (A) de adenocarcinoma de endometrio, que hospeda la mutación heterocigótica R248Q (743G>A) TP53 y la mutación heterocigótica G12D (35G>A) KRAS; la línea de células LS123 de adenocarcinoma de colon, que hospeda la mutación heterocigótica G12S (34G>A) KRAS; la línea de células SW1463 de adenocarcinoma de colon, que hospeda la mutación homocigótica G12C (34G>T) KRAS; la línea de células SW480 de adenocarcinoma de colon, que hospeda la mutación homocigótica G12V (35G>T) KRAS; y la línea de células SW1116 de adenocarcinoma de colon, que hospeda la mutación heterocigótica G12A (35G>C) KRAS. Todas las líneas de células se sembraron en placas de cultivo de 60 cm^2 de medio 5a de McCoy que contenían 4,5 g/l de glucosa, suplementado con suero de feto de ternera al 10 % y se mantuvieron en una atmósfera humidificada que contenía CO_2 al 5 %. Una vez que las células alcanzaron un 80-90 % de confluencia se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (x 3) y se recogieron mediante centrifugación (500 x g). El ADN se aisló usando el Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen; Valencia, CA). La concentración del ADN se determinó con Quant-iT Picogreen Assay Life Technologies/ThermoFisher; Waltham, Ma). Se adquirió ADN genómico humano (0,2 mg/ml) que contenía ADN genómico de alto peso molecular (>50 kb) aislado de sangre humana (capa leucocitaria) (ADNhg de Roche) de Roche (Indianápolis, IN). Se determino que su concentración precisa era de 39 ng/µl mediante el kit de ensayo Quant-iT PicoGreen dsDNA.

Se adquirió plasma humano (con K2 EDTA como anticoagulante) de donantes exentos de cáncer, de 21-61 años de edad, de BioreclamationIVT (Nassau, NY). El ADN se aisló de muestras de plasma individuales (5 ml) usando el Kit de ácidos nucleicos en circulación QIAamp de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se cuantificó con Quant-iT Picogreen Assay Life Technologies/ThermoFisher; Waltham, Ma).

Ejemplo empírico 1-Detección de la mutación V600E (1799T>A) BRAF

En la Tabla 1 se relacionan todos los cebadores utilizados. Todos los cebadores se adquirieron de Integrated DNA Technologies Inc. (IDT, Coralville, IA), salvo por el cebador iCDx-315-BRA_FFLW, que se adquirió de Exiqon Inc. (Woburn, MA).

Tabla 1. Cebadores para detección mediante PCR-LDR-qPCR de la mutación BRAF V600E

Nombre del cebador	Etapa	Secuencia de Cebador
iCDx-328-Braf_PF_WT_blk2	PCR	CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAr GCTAT/3SpC3/ (SEQ ID NO: 1)
iCDx-284-Br600-PR	PCR	GGTGTCGTGGTCAAAATGGATCCAGACAACT GTTCAAAC (SEQ ID NO: 2)
iCDx-315-BRAF_FLW	PCR	/5Phos/GCTA+C+AG+T+G+AAAT+CTCG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 3)
iCDx-308-Br600_(3)-L_Up_Rm	LDR	TAGCGATAGTACCGACAGTCACGTCCTAAAT AGGTGATTTTGGTCTAGCTACGGArGAAAC/3 SPC3/ (SEQ ID NO: 4)
iCDx-276-Br600-L_Dn_P	LDR	/5Phos/GAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATTT GGTGTGCGGAAACCTATCGTCGA (SEQ ID NO: 5)
iCDx-277_A4	qPCR	TAGCGATAGTACCGACAGTCAC (SEQ ID NO: 6)
iCDx-279_C4	qPCR	TCGACGATAGGTTTCCGCAC (SEQ ID NO: 7)
iCDx-281-Br600_(3)_Sonda	qPCR	5'- /56-TAMN/TA CGG AGA AAT CTC GAT GGA GTG GGT /3IAbRQSp/ -3' (SEQ ID NO: 8)
/5SpC3/ - Separador C3 en 5', /3SpC3/ - Separador C3 en 3', /5Phos/ - 5' Fosfato, /56-FAM/ - Colorante Fluorescente Fam en 5', /5HEX/ - Colorante Fluorescente HEX™, /ZEN/ - ZEN™ Flourescent Quencher™, /3IABkFQ/ - Inactivador Fluorescente Iowa Black ® en 3', gama espectral verde a rosa, "+" - Base de ácido nucleico bloqueada, "rA" - base de ribonucleótido riboadenosina; "rT" - base de ribonucleótido ribotimidina; "rG" - base de ribonucleótido riboguanosina; "rC" - base de ribonucleótido ribocitosina		

Experimentos de dilución. Se llevó a cabo la etapa de la PCR en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 1,58 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 2 µl de tampón Gotaq Flexi 5X sin magnesio (Promega, Madison, WI), 0,8 µl de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega, Madison, WI), 0,2 µl de dNTP (con dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 10 mM cada uno) (Promega, Madison, WI), 0,25 µl de cebador directo iCDx-328-Braf_PF_WT_blk2 en 2 µM, 0,25 µl de cebador inverso iCDx-284-Br600-PR en 2 µM, 1,25 µl de cebador de bloqueo iCDx-284-Br600-PR LNA en 2 µM, 0,25 µl de ARNAsaH2 (IDT) a 20 mU/µl (diluido en tampón de dilución ARNAsaH2 a partir de IDT), 0,2 µl de Antarctic thermolabile UDG (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) en 1 U/µl, y 0,22 µl de polimerasa Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) mezclado con Platinum Taq Antibody (Invitrogen/ThermoFisher Waltham, Ma) (la mezcla se preparó añadiendo 0,02 µl de polimerasa Klentaq1 a 50 U/µl para 0,2 µl de Platinum Taq Antibody a 5 U/µl), y 3 µl del molde correspondiente. Los moldes fueron: agua exenta de nucleasa para el NTC - Control sin molde -, ADNhg de Roche a 11,7 ng/µl (por tanto, 35 ng o 10000 equivalentes genómicos (GE) en 3 µl) - natural -, y se mezcló ADNwc HT-29 con ADNhg de Roche del siguiente modo: 1) 0,047 ng/µl de ADNwc HT-29 en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,14 ng de ADNwc HT-29 y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 40 GE HT-29 (solo 20 GE están mutados) y 10000 GE de ADN genómico humano de Roche DNA (es decir, 1 mutante (mt) en 500 naturales (wt)); 2) 0,023 ng/µl de ADNwc HT-29 en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,07 ng de ADNwc HT-29 y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 20 GE HT-29 (solo 10 GE están mutados) y 10000 GE de ADNhg de Roche; (es decir, 1 mt en 1000 wt) 3) 0,0117 ng/µl de ADNDNA HT-29 en 11.7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,0035 ng de ADNwc HT-29 y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 10 GE HT-29 (solo 5 GE están mutados) y 10000 GE de ADNhg de Roche (es decir, 1 mt en 2000 wt); 4) 0,006 ng/µl de ADNwc HT-29 en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,00175 ng de ADNwc HT-29 y 35 ng de ADNhd de Roche en 3 µl, que corresponden a 5 GE HT-29 (solo 2 o 3 GE están mutados) y 10000 GE de ADNhg de Roche (es decir, 1 mt en 5000 wt). Nota: tras preparar 0,047 ng/µl de wcADN HT-29 en 11,7 ng/µl de mezcla de hgADN de Roche (40 GE de mutantes en 10000 GE de hgADN de Roche), el resto de mutantes más el hgADN de Roche se prepararon mediante diluciones en serie que mezclaban 0,5 volúmenes de la mezcla de hgADN de roche mutante anterior más 0,5 volúmenes de hgADN de Roche a 11,7 ng/µl, de tal manera que los mutantes GE se diluyeron ½ mientras que hgADN GE de Roche permanece sin diluir (10000 GE). Se ejecutaron las reacciones de la PCR en placas de la PCR BioExcell de 96 pocillos transparentes de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma) y el siguiente programa: 30 min a 37 °C, 2 min a 95 °C, 40 ciclos de (10 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C), 10 min a 99,5 °C, y un mantenimiento final a 4 °C.

Se llevó a cabo la etapa de la LDR en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 5,82 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 1 µl de tampón de reacción de ligasa 10X AK16D [1X tampón contiene Tris-HCl 20 mM pH 8,5 (Bio-Rad, Hercules, CA), $MgCl_2$ 5 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), KCl 50 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo), DTT 10 mM

(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) y 20 ug/ml de BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo)], 0,25 µl de DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) a 40 mM, 0,25 µl de NAD^+ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) a 40 mM, 0,25 µl de ARNsaH2 (IDT) a 20 mU/µl, 0,2 µl de iCDx-308-Br600_(3)-L_Up_Rm Up cebador a 500 nM, 0,2 µl de iCDx-276-Br600-L_Dn_P Down cebador a 500 nM, 0,028 µl de ligasa AK16D purificada a 8,8 µM, y 2 µl de reacción de la PCR. Las reacciones de la PCR se realizaron en placas de 96 pocillos transparentes BioExcell de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma) y el siguiente programa: 20 ciclos de (10 s a 94 °C, y 4 min a 60 °C) seguido por un mantenimiento final 4 °C.

La etapa de la qPCR se llevó a cabo en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 1,5 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 5 µl de mezcla maestra de la PCR 2X TaqMan® Fast Universal (amplitaq rápida, UDG y dUTP) de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), 1 µl de iCDx-277_A4 cebador directo a 2,5 µM, 1 µl de iCDx-279_C4 cebador inversa a 2,5 µM, 0,5 µl de iCDx-281-Br600_(3)_Probe sonda Taqman a 5 µM, y 1 µl de reacción de la LDR. Se ejecutaron las reacciones de la qPCR en el termociclador ViiA7 en tiempo real de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando placas de reacción de 96 pocillos MicroAmp® Fast de 0,1 ml con película adhesiva óptica MicroAmp™ de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma, y la siguiente configuración: bloqueo rápido, Curva patrón según tipo de experimento, ROX como referencia pasiva, Ct como método de cuantificación (umbral automático, pero ajustado a 0,04 cuando sea necesario), TAMRA como indicador y NFQ-MGB como inactivador; y usando el siguiente programa: 2 min a 50 °C, y 40 ciclos de (1 s a 95 °C, y 20 s a 60 °C). Los resultados se muestran en la Figura 159 y la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de los experimentos de dilución para detectar BRAF V600E.

Moldes	Equivalentes de genoma iniciales (por 10 µl de PCR)	Ct	Diferencia de Ct frente a 10000 GE de hgADN de Roche
HT-29_1 (BRAF V600E, het) + hgDNA de Roche (WT)	40 (20 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 500 wt)	**16,1**	16,7
HT-29_1 (BRAF V600E, het) + hgDNA de Roche (WT)	20 (10 mt) + 10.000 wt (es decir, 1 mt/1.000 wt)	**22,4**	10,4
HT-29_1 (BRAF V600E, het) + hgDNA de Roche (WT)	10 (5 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt/2.000 wt)	**22,7**	10,2
HT-29_1 (BRAF V600E, het) + hgDNA de Roche (WT)	5 (2 o 3 mt) + 10.000 wt (es decir, 1 mt/5.000 wt)	**22,0**	10,9
ADNhg de Roche (WT)	10.000 wt	**32,8**	
NTC	N/A	Indeterminado	
Mt = mutante BRAF V600E. WT = BRAF natural. Het = heterocigoto. UD = Indeterminado. Los valores de Ct en negrita corresponden a las Ct obtenidas de "curvas verdaderas", y los valores en tipo fuente normal corresponden a los valores obtenidos de "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).			

Experimentos de tipo píxel que utilizan ADNhg de Roche. La etapa de la PCR se llevó a cabo en una mezcla de 130 µl preparada añadiendo: 56,54 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 26 µl de tampón Gotaq Flexi 5X sin magnesio (Promega, Madison, WI), 10,4 µl de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega, Madison, WI), 2,6 µl de dNTP (con dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 10 mM cada uno) (Promega, Madison, WI), 3,25 µl de cebador directo iCDx-328-Braf_PF_WT_blk2 en 2 µM, 3,25 µl de cebador inverso iCDx-284-Br600-PR en 2 µM, 16,25 µl de cebador de bloqueo iCDx-284-Br600-PR LNA en 2 µM, 3,25 µl de ARNAsaH2 (IDT) a 20 mU/µl (diluido en tampón de dilución ARNAsaH2 a partir de IDT), 2,6 µl de Antarctic thermolabile UDG (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) en 1 U/µl, y 2,86 µl de polimerasa Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) mezclada con Platinum Taq Antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) (la mezcla se preparó añadiendo 0,3 µl de polimerasa Klentaq1 de 50 U/µl a 3 µl de Platinum Taq Antibody a 5 U/µl), y 3 µl del molde correspondiente. Los moldes fueron: agua exenta de nucleasa para el NTC - Control sin molde -, ADNhg de Roche a 2,925 ng/µl (por tanto, 8,75 ng o 2500 equivalentes genómicos (GE) en 3 µl) - natural -, y se mezcló ADNwc HT-29 con ADNhg de Roche del siguiente modo: 1) 0,023 ng/µl de ADNwc HT-29 en 2,925 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,07 ng de ADNwc HT-29 y 8,75 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 20 GE HT-29 (solo 10 GE están mutados) y 2500 GE de ADNhg de Roche; 2) 0,0117 ng/µl de ADNwc HT-29 en 2,925 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,0035 ng de ADNwc HT-29 y 8,75 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 10 GE HT-29 (solo 5 GE están mutados) y 2500 GE de ADNhg de Roche. Nota: los 0,0117 ng/µl de ADNwc HT-29 en 2,925 ng/µl de mezcla de ADNhg de Roche se prepararon mediante mezcla con dilución en serie de 0,5 volúmenes de los 0,023 ng/µl de ADNwc HT-29 en 2,925 ng/µl de mezcla de ADNhg de Roche (20 GE de mutante, 10 GE mutados, en 2500 GE de ADNhg de Roche) más 0,5 volúmenes de ADNhg de Roche a 2,925 ng/µl, de tal manera que el mutante se diluyó hasta 10 GE (5 GE mutados) mientras que el GE del ADNhg de Roche permanece sin diluir (2500 GE).

Cada 130 µl de mezcla de la PCR se dividieron en 12 tubos, 10 µl de cada uno, y a continuación se llevaron a cabo las reacciones de la PCR en placas de la PCR de 96 pocillos transparentes BioExcell de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied

Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma y el siguiente programa: 30 min a 37 °C, 2 min a 95 °C, 40 ciclos de (10 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C), 10 min a 99,5 °C, y un mantenimiento final a 4 °C. Las etapas de la LDR y la qPCR posteriores se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente, en la sección de experimentos de dilución. Los resultados se muestran en la Figura 160 y la Tabla 3.

Tabla 3. Resultado de los experimentos de pixel para detectar BRAF V600E diluido en ADNhg de Roche.

Moldes	GE por 130 µl de	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Amplificaciones totales
HT-29_1 (BRAF V600E, het) + hgDNA de Roche (WT)	20 GE (10 mt) + 2500 GE (wt)	**27,7**	**23,0**	**25,2**	**27,5**	**27,4**	**26,0**	35,7	**22,6**	**24,9**	**27,1**	**25,8**	**26,4**	**11**
HT-29_1 (BRAF V600E, het) + hgDNA de Roche (WT)	10 GE (5 mt) 2500 GE (wt)	35,8	**31,8**	**27,5**	36,0	**26,5**	**31,1**	**31,3**	**23,1**	35,9	**23,7**	36,3	35,7	7
ADNhg de Roche (wt)	2500 GE (wt)	36,5	37,5	36,3	36,4	35,8	37,2	36,0	36,9	37,0	36,8	36,8	36,0	**0**
NTC	N/A	UD	39,8	39,1	38,1	UD	UD	39,5	UD	39,1	35,5	UD	38,8	**0**

Mt = mutante BRAF V600E. wt = BRAF natural. Het = heterocigoto. UD = Indeterminado. Las columnas 1-12 corresponden a las Ct obtenidas de los tubos 1-12, respectivamente, correspondiendo los valores en negrita a las Ct obtenidas de las "curvas verdaderas", y los valores en tipo de fuente normal que corresponden a los valores obtenidos de las "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).

Experimentos de píxel que utilizan ADN plasmático humano (plasma n.º 8). La etapa de la PCR se llevó a cabo en una mezcla de 130 µl preparada añadiendo: 46,54 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 26 µl de tampón Gotaq Flexi 5X sin magnesio (Promega, Madison, WI), 10,4 µl de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega, Madison, WI), 2,6 µl de dNTP (con dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 10 mM cada uno) (Promega, Madison, WI), 3,25 µl de cebador directo iCDx-328-Braf_PF_WT_blk2 en 2 µM, 3,25 µl de cebador inverso iCDx-284-Br600-PR en 2 µM, 16,25 µl de cebador de bloqueo iCDx-284-Br600-PR LNA en 2 µM, 3,25 µl de ARNAsaH2 (IDT) a 20 mU/µl (diluido en tampón de dilución ARNAsaH2 a partir de IDT), 2,6 µl de Antarctic thermolabile UDG (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) en 1 U/µl, y 2,86 µl de polimerasa Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) mezclada con Platinum Taq Antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) (la mezcla se preparó añadiendo 0,3 µl de polimerasa Klentaq1 de 50 U/µl a 3 µl de Platinum Taq Antibody a 5 U/µl), y 13 µl del molde correspondiente. Los moldes fueron: agua exenta de nucleasa para el NTC - Control sin molde -, ADN plasmático (preparado por tanto como 6,9 µl de H2O exenta de nucleasa más 6,1 µl de ADN plasmático a 0,714 ng/µl, 4,375 ng de ADN plasmático o 1250 Equivalentes genómicos (GE) en la reacción de la PCR) -natural-, y ADNwc HT-29 mezclado con ADN plasmático del siguiente modo: 1) 4,9 µl de H2O exenta de nucleasa, más 6,1 µl de ADN plasmático a 0,714 ng/µl, más 2 µl de 0,035 ng/µl de ADNwc HT-29, por lo tanto, 4,375 ng de ADN plasmático o 1250 Equivalentes genómicos (GE) más 0,07 ng de ADNwc HT-29 que corresponden a 20 GE HT-29 (solo 10 GE están mutados) en la reacción de la PCR; 2) 5,9 µl de H2O exenta de nucleasa, más 6,1 µl de ADN plasmático a 0,714 ng/µl, más 1 µl de 0,035 ng/µl de ADNwc HT-29, por lo tanto, 4,375 ng de ADN plasmático o 1250 Equivalentes genómicos (GE) más 0,035 ng de ADNwc HT-29 que corresponden a 10 GE HT-29 (solo 5 GE están mutados) en la reacción de la PCR. Nota: La mezcla con 4,375 ng de ADN plasmático o 1250 Equivalentes genómicos (GE) más 0,035 ng de ADNwc (10 GE de mutantes, 5 mutados) se preparó mediante dilución en serie mezclando 0,5 volúmenes de la mezcla previa con 4,375 ng ADN plasmático o 1250 Equivalentes genómicos (GE) y 0,07 ng de ADNwc (20 GE de mutantes, 10 mutados) con 0,5 volúmenes de los 4,375 ng de la mezcla ADN plasmático.

Cada 130 µl de mezcla de la PCR se dividieron en 12 tubos, 10 µl de cada uno, y a continuación se llevaron a cabo las reacciones de la PCR en placas de la PCR de 96 pocillos transparentes BioExcell de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma y el siguiente programa: 30 min a 37 °C, 2 min a 95 °C, 45 ciclos de (10 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C), 10 min a 99,5 °C, y un mantenimiento final a 4 °C. Las etapas de la LDR y la qPCR posteriores se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente, en la sección de experimentos de dilución. Los resultados se muestran en la Figura 161 y la Tabla 4.

Tabla 4. Resultado de los experimentos de píxel para detectar BRAF V600E diluido en ADN plasmático humano.

Moldes	GE por 130 µl de PCR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Amplificaciones totales
HT-29_1 (BRAF V600E, het) + ADN plasmático humano (wt)	20GE(10mt) + 1250 GE (wt)	35,7	**22,4**	**19,4**	34,3	**21,1**	**19,1**	**28,2**	**16,4**	34,4	**29,1**	34,7	**18,0**	**8**
HT-29_1 (BRAF V600E, het) + ADN plasmático humano (wt)	10 GE (5 mt) + 1250 GE (wt)	**20,3**	35,5	**16,6**	35,0	34,8	**19,3**	34,3	34,2	35,3	34,3	36,0	34,9	**3**
ADN plasmático humano (wt)	1250 GE (wt)	36,4	UD	**25,6**	36,0	35,1	35,7	34,7	35,3	35,8	36,2	36,2	33,0	**1**
NTC	N/A	UD	39,9	UD	UD	38,2	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	**0**

Mt = mutante BRAF V600E. wt = BRAF natural. Het = heterocigoto. UD = Indeterminado. Las columnas 1-12 corresponden a las Ct obtenidas de los tubos 1-12, respectivamente, correspondiendo los valores en negrita a las Ct obtenidas de las "curvas verdaderas", y los valores en tipo de fuente normal que corresponden a los valores obtenidos de las "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).

ES 2 784 342 T3

Ejemplo empírico 2-Detección de la mutación R248Q (743G>A) TP53

En la Tabla 5 se relacionan todos los cebadores utilizados. Todos los cebadores se adquirieron de Integrated DNA Technologies Inc. ((IDT), Coralville, IA), salvo los cebadores PNA, que se adquirieron de PNABio Inc. (Thousand Oaks, CA).

Tabla 5. Cebadores para la detección mediante PCR-LDR-qPCR de la mutación TP53 R248Q

Nombre del cebador	Etapa	Secuencia de Cebador
iCDx-326-p53-248_PF_WT_blk2	PCR	CCTGCATGGGCGGCATGrAACCG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 9)
iCDx-248-p53-248_PR	PCR	GGTGTCGTGGAAGTGGCAAGTGGCTCC TGAC (SEQ ID NO: 10)
PNA-p53-248-10	PCR	GAACCGGAGG (SEQ ID NO: 1 1)
PNA-p53-248-11L	PCR	TGAACCGGAGG (SEQ ID NO: 12)
iCDx-305-P53-248(3)-L_Up_Rm	LDR	TCACTATCGGCGTAGTCACCACAGACG CATGGGCGGCATGAATCArGAGGT/3SPC 3/ (SEQ ID NO: 13)
iCDx-202-P53-248-L_Dn_P	LDR	/5Phos/GAGGCCCATCCTCACCATCATCA CGTTGTTGGTGACTTTACCCGGAGGA (SEQ ID NO: 14)
iCDx-82_GTT-GCGC_A2	qPCR	TCACTATCGGCGTAGTCACCA (SEQ ID NO: 15)
iCDx-244-C2	qPCR	TCCTCCGGGTAAAGTCACCA (SEQ ID NO: 16)
iCDx-228-p53-248_Probe_s	qPCR	5'- /56-FAM/CG GCA TGA A/ZEN/T CAG AGG CCC ATC C/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 17)
PNA = Ácido nucleico peptídico, /5SpC3/ - Separador C3 en 5', /3SpC3/ - Separador C3 en 3', /5Phos/ - 5' Fosfato, /56-FAM/ - Colorante Fluorescente Fam en 5', /5HEX/ - Colorante Fluorescente HEX™, /ZEN/ - ZEN™ Flourescent Quencher™, /3IABkFQ/ - Inactivador fluorescente Iowa Black® en 3', gama espectral verde a rosa, "+" - Base de ácido nucleico bloqueada, "rA" - base de ribonucleótido riboadenosina; "rT" - base de ribonucleótido ribotimidina; "rG" - base de ribonucleótido riboguanosina; "rC" - base de ribonucleótido ribocitosina		

Experimentos de dilución. Se llevó a cabo la etapa de la PCR en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 1,58 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 2 µl de tampón Gotaq Flexi 5X sin magnesio (Promega, Madison, WI), 0,8 µl de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega, Madison, WI), 0,2 µl de dNTP (con dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 10 mM cada uno) (Promega, Madison, WI), 0,25 µl de cebador directo iCDx-326-p53-248_PF_WT_blk2 a 2 µM, 0,25 µl de cebador inverso iCDx-248-p53-248_PR a 2 µM, 1,25 µl de cebador de bloqueo de PNA, PNA-p53-248-10 (o PNA-p53-248-11L en los últimos experimentos) a 2 µM, 0,25 µl de ARNAsaH2 (IDT) a 20 mU/µl (diluido en tampón de dilución ARNAsaH2 a partir de IDT), 0,2 µl de Antarctic thermolabile UDG (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) en 1 U/µl, y 0,22 µl de polimerasa Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) mezclada con Platinum Taq Antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) (la mezcla se preparó añadiendo 0,02 µl de polimerasa Klentaq1 (de 50 U/µl) a 0,2 µl de Platinum Taq Antibody (solución madre a 5 U/µl), y 3 µl del molde correspondiente. Los moldes fueron: agua exenta de nucleasa para el NTC - Control sin molde -, ADNhg de Roche a 11,7 ng/µl (por tanto, 35 ng o 10000 Equivalentes genómicos (GE) en 3 µl) - natural -, y HEC-1(A) ADNwc mezclado con ADNhg de Roche del siguiente modo: 1) 0,047 ng/µl de ADNwc HEC-1(A) en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,14 ng de ADNwc HEC-1 (A) y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 40 GE de HEC-1 (A) (solo 20 GE están mutados) y 10000 GE de ADNhg de Roche (es decir, 1 mt en 500 wt); 2) 0,023 ng/µl de ADNwc HEC-1(A) en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,07 ng de ADNwc HEC-1 (A) y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 20 GE de HEC-1 (A) (solo 10 GE están mutados) y 10000 GE de ADNhg de Roche (es decir, 1 mt en 1000 wt); 3) 0,0117 ng/µl de ADNwc HEC-1(A) en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,0035 ng de ADNwc HEC-1 (A) y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 10 GE de HEC-1 (A) (solo 5 GE están mutados) y 10000 GE de ADNhg de Roche (es decir, 1 mt en 2000 wt); 4) 0,006 ng/µl de ADNwc HEC-1(A) en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto, 0,00175 ng de ADNwc HEC-1 (A) y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 5 GE de HEC-1 (A) (solo 2 o 3 GE están mutados) y 10000 GE de ADNhg de Roche (es decir, 1 mt en 5000 wt). Nota: tras preparar 0,047 ng/µl de ADNwc HEC-1 (A) en 11,7 ng/µl de mezcla de ADNhg de Roche (40 GE de mutantes en 10000 GE de ADNhg de Roche), el resto de mutantes más el hgADN de Roche se prepararon mediante diluciones en serie que mezclaban 0,5 volúmenes de la mezcla de hgADN de roche mutante anterior más 0,5 volúmenes de hgADN de Roche a 11,7 ng/µl, de tal manera que los mutantes GE se diluyeron ½ mientras que hgADN GE de Roche permanece sin diluir (10000 GE). Se ejecutaron las reacciones de la PCR en placas de la PCR BioExcell de 96 pocillos transparentes de 0,2 ml (Worldwide Medical

Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma y el siguiente programa: 30 min a 37 °C, 2 min a 95 °C, 35 ciclos de (10 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C), 10 min a 99,5 °C, y un mantenimiento final a 4 °C.

Se llevó a cabo la etapa de la LDR en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 5,82 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 1 µl de tampón de reacción de ligasa 10X AK16D [1X tampón contiene Tris-HCl 20 mM pH 8,5 (Bio-Rad, Hercules, CA), $MgCl_2$ 5 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), KCl 50 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo), DTT 10 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) y 20 ug/ml de BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo)], 0,25 µl de DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) a 40 mM, 0,25 µl de NAD^+ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) a 40 mM, 0,25 µl de ARNsaH2 (IDT) a 20 mU/µl, 0,2 µl de cebador iCDx-305-P53-248(3)-L_Up_Rm Up a 500 nM, 0,2 µl de cebador iCDx-202-P53-248-L_Dn_P Dn a 500 nM, 0,028 µl de ligasa AK16D purificada a 8,8 µM, y 2 µl de reacción de la PCR. Las reacciones de la PCR se realizaron en placas de 96 pocillos transparentes BioExcell de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma y el siguiente programa: 20 ciclos de (10 s a 94 °C, y 4 min a 60 °C) seguido por un mantenimiento final 4 °C.

La etapa de la qPCR se llevó a cabo en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 1,5 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 5 µl de mezcla maestra de la PCR 2X TaqMan® Fast Universal (amplitaq rápida, UDG y dUTP) de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), 1 µl de cebador directo iCDx-82_GTT-GCGC_A2 a 2,5 µM, 1 µl de cebador inverso iCDx-244-C2 a 2,5 µM, 0,5 µl de sonda iCDx-228-p53-248_Probe_s Taqman a 5 µM, y 1 µl de reacción de la LDR. Se ejecutaron reacciones de la qPCR en un termociclador ViiA7 en tiempo real de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando placas de reacción de 96 pocillos MicroAmp® Fast de 0,1 ml con película adhesiva óptica MicroAmp™ de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma, y la siguiente configuración: bloqueo rápido, Curva patrón según tipo de experimento, ROX como referencia pasiva, Ct como método de cuantificación (umbral automático, pero ajustado a 0,04 cuando sea necesario), FAM como indicador y NFQ-MGB como inactivador; y usando el siguiente programa: 2 min a 50 ºC, y 40 ciclos de (1 s a 95 °C, y 20 s a 60 °C). Los resultados del experimento utilizando el cebador de bloqueo PNA-p53-248-10 en la etapa de la PCR se muestran en la Figura 162 y la Tabla 6, y los resultados del experimento utilizando el cebador de bloqueo PNA-p53-248-11L en la etapa de la PCR se muestran en la Figura 163 y la Tabla 7.

Tabla 6. Resultados de los experimentos de dilución para detectar TP53 R248Q utilizando PNA-p53-248-10 como cebador de bloqueo en la etapa de la PCR.

Moldes	Equivalentes de genoma iniciales (por 10 µl de PCR)	Ct	Diferencia de Ct frente a 10000 GE de hgADN de Roche
HEC-1(A)_1 (TP53 R248Q, het) + ADNhg de Roche (WT)	40 (20 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 500 wt)	**6,4**	7,3
HEC-1(A)_1 (TP53 R248Q, het) + ADNhg de Roche (WT)	20 (10 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 1.000 wt)	**7,6**	6,0
HEC-1(A)_1 (TP53 R248Q, het) + ADNhg de Roche (WT)	10 (5 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 2.000 wt)	**10,6**	3,0
HEC-1(A)_1 (TP53 R248Q, het) + ADNhg de Roche (WT)	5 (2 o 3 mt) + 10.000 wt (es decir, 1 mt/5.000 wt)	**11,2**	2,5
ADNhg de Roche (WT)	10.000 wt	**13,7**	
NTC	N/A	UD	
Mt = mutante TP53 R248Q. WT = TP53 natural. Het = heterocigoto. UD = Indeterminado. Los valores de Ct en negrita corresponden a las Ct obtenidas de "curvas verdaderas", y los valores en tipo fuente normal corresponden a los valores obtenidos de "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).			

Tabla 7. Resultados de los experimentos de dilución para detectar TP53 R248Q utilizando PNA-p53-248-11L como agente de bloqueo en la etapa de la PCR.

Moldes	Equivalentes de genoma iniciales (por 10 µl de PCR)	Ct	Diferencia de Ct frente a 10000 GE de hgADN de Roche
HEC-1(A)_1 (TP53 R248Q, het) + ADNhg de Roche (WT)	40 (20 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 500 wt)	**6,2**	14,5
HEC-1(A)_1 (TP53 R248Q, het) + ADNhg de Roche (WT)	20 (10 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 1.000 wt)	**15,7**	5,0
HEC-1(A)_1 (TP53 R248Q, het) + ADNhg de Roche (WT)	10 (5 mt) + 10000 wt (es decir, 1 mt/ 2.000 wt)	**14,5**	6,3
HEC-1(A)_1 (TP53 R248Q, het) + ADNhg de Roche (WT)	5 (2 o 3 mt) + 10.000 wt (es decir, 1 mt/5.000 wt)	**16,6**	4,1
ADNhg de Roche (WT)	10.000 wt	**20,7**	

(continuación)

Moldes	Equivalentes de genoma iniciales (por 10 µl de PCR)	Ct	Diferencia de Ct frente a 10000 GE de hgADN de Roche
NTC	N/A	UD	
Mt = mutante TP53 R248Q. WT = TP53 natural. Het = heterocigoto. UD = Indeterminado. Los valores de Ct en negrita corresponden a las Ct obtenidas de "curvas verdaderas", y los valores en tipo fuente normal corresponden a los valores obtenidos de "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).			

Experimentos de tipo píxel que utilizan ADNhg de Roche. La etapa de la PCR se llevó a cabo en una mezcla de 130 µl preparada añadiendo: 56,54 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 26 µl de tampón Gotaq Flexi 5X sin magnesio (Promega, Madison, WI), 10,4 µl de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega, Madison, WI), 2,6 µl de dNTP (con dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 10 mM cada uno) (Promega, Madison, WI), 3,25 µl de cebador directo iCDx-326-p53-248_PF_WT_blk2 a 2 µM, 3,25 µl de cebador inverso iCDx-248-p53-248_PR a 2 µM, 16,25 µl de agente de bloqueo de PNA, PNA-p53-248-10 a 2 µM, 3,25 µl de ARNAsaH2 (IDT) a 20 mU/µl (diluido en tampón de dilución ARNAsaH2 a partir de IDT), 2,6 µl de Antarctic thermolabile UDG (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) en 1 U/µl, y 2,86 µl de polimerasa Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) mezclada con Platinum Taq Antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) (la mezcla se preparó añadiendo 0,3 µl de polimerasa Klentaq1 de 50 U/µl a 3 µl de Platinum Taq Antibody a 5 U/µl), y 3 µl del molde correspondiente. Los moldes fueron: agua exenta de nucleasa para el NTC - Control sin molde -, ADNhg de Roche a 2,925 ng/µl (por tanto, 8,75 ng de ADNhg de Roche o 2500 equivalentes genómicos (GE) en 3 µl) - natural -, y se mezcló ADNwc HEC-1(A) con ADNhg de Roche del siguiente modo: 1) 0,023 ng/µl de ADNwc HEC-1(A) en 2,925 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,07 ng de wcDNA HEC-1(A) y 8,75 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 20 GE de HEC-1(A) (solo 10 GE están mutados) y 2500 GE de ADNhg de Roche; 2) 0,0117 ng/µl de ADNwc HEC-1(A) en 2,925 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,0035 ng de ADNwc HEC-1(A) y 8,75 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 10 GE de HEC-1(A) (solo 5 GE están mutados) y 2500 GE de ADNhg de Roche. Nota: los 0,0117 ng/µl de ADNwc HEC-1 (A) en 2,925 ng/µl de mezcla de ADNhg de Roche se prepararon mediante mezcla con dilución en serie de 0,5 volúmenes de los 0,023 ng/µl de ADNwc HEC-1 (A) en 2,925 ng/µl de mezcla de ADNhg de Roche (20 GE de mutante, 10 GE mutados, en 2500 GE de ADNhg de Roche) más 0,5 volúmenes de ADNhg de Roche a 2,925 ng/µl, de tal manera que el mutante se diluyó hasta 10 GE (5 GE mutados) mientras que el GE del ADNhg de Roche permanece sin diluir (2500 GE).

Cada 130 µl de mezcla de la PCR se dividieron en 12 tubos, 10 µl de cada uno, y a continuación se llevaron a cabo las reacciones de la PCR en placas de la PCR de 96 pocillos transparentes BioExcell de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma y el siguiente programa: 30 min a 37 °C, 2 min a 95 °C, 35 ciclos de (10 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C), 10 min a 99,5 °C, y un mantenimiento final a 4 °C. Las etapas de la LDR y la qPCR posteriores se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente, en la sección de experimentos de dilución. Los resultados se muestran en la Figura 164 y la Tabla 8.

Tabla 8. Resultado de los experimentos de pixel para detectar TP53 R248Q diluido en ADNhg de Roche.

Moldes	GE por 130 µl de PCR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Amplificaciones totales
HEC-1(A)_1 (TP53R248Q, het) + ADNhg de Roche (wt)	20 GE (10 mt) + 2500 GE (wt)	34,8	**18,6**	30,0	27,5	**20,3**	**18,3**	**18,7**	**17,4**	**21,8**	**17,0**	**19,5**	**19,0**	**9**
HEC-1(A)_1 (TP53R248Q, het) + ADNhg de Roche (wt)	10 GE (5 mt) + 2500 GE (wt)	**19,9**	**20,2**	**22,2**	UD	**19,2**	UD	**18,0**	34,7	34,4	**19,7**	31,3	**18,8**	**7**
ADNhg de Roche (wt)	2500 GE (wt)	37,0	28,8	33,4	28,8	33,2	UD	32,4	34,8	UD	34,2	**20,5**	34,1	**1**
NTC	N/A	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	**0**

Mt = mutante TP53 R248Q. WT = TP53 natural. Het = heterocigoto. UD = Indeterminado. Las columnas 1-12 corresponden a las Ct obtenidas de los tubos 1-12, respectivamente, correspondiendo los valores en negrita a las Ct obtenidas de las "curvas verdaderas", y los valores en tipo de fuente normal que corresponden a los valores obtenidos de las "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).

Experimentos de píxel que utilizan ADN plasmático humano (plasma n.º 10). La etapa de la PCR se llevó a cabo en una mezcla de 130 µl preparada añadiendo: 46,54 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 26 µl de tampón Gotaq Flexi 5X sin magnesio (Promega, Madison, WI), 10,4 µl de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega, Madison, WI), 2,6 µl de dNTP (con dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 10 mM cada uno) (Promega, Madison, WI), 3,25 µl de cebador directo iCDx-326-p53-248_PF_WT_blk2 a 2 µM, 3,25 µl de cebador inverso iCDx-248-p53-248_PR a 2 µM, 16,25 µl de agente de bloqueo de PNA, PNA-p53-248-11L a 2 µM, 3,25 µl de ARNAsaH2 (IDT) a 20 mU/µl (diluido en tampón de dilución ARNAsaH2 a partir de IDT), 2,6 µl de Antarctic thermolabile UDG (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) en 1 U/µl, y 2,86 µl de polimerasa Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) mezclada con Platinum Taq Antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) (la mezcla se preparó añadiendo 0,3 µl de polimerasa Klentaq1 de 50 U/µl a 3 µl de Platinum Taq Antibody a 5 U/µl), y 13 µl del molde correspondiente. Los moldes fueron: agua exenta de nucleasa para el NTC -Control sin molde-; ADN plasmático (preparado por tanto como 7,6 µl de H2O exenta de nucleasa más 5,4 µl de ADN plasmático a 0,811 ng/µl, 4,375 ng de ADN plasmático o 1250 de Equivalentes genómicos (GE) en la reacción de la PCR) - natural -; y HEC-1(A) wcDNA mezclado con ADN plasmático del siguiente modo: 1) 5,6 µl de H2O exenta de nucleasa, más 5,4 µl de ADN plasmático a 0,811 ng/µl, más 2 µl de 0,035 ng/µl de ADNwc HEC-1(A), por lo tanto, 4,375 ng de ADN plasmático o 1250 Equivalentes genómicos (GE) más 0,07 ng de ADNwc HEC-1 (A) que corresponden a 20 GE de HEC-1 (A) (solo 10 GE están mutados) en la reacción de la PCR; 2) 6,6 µl de H2O exenta de nucleasa, más 5,4 µl de ADN plasmático a 0,811 ng/µl, más 1 µl de 0,035 ng/µl de ADNwc HEC-1(A), por lo tanto, 4,375 ng de ADN plasmático o 1250 Equivalentes genómicos (GE) más 0,035 ng de ADNwc HEC-1 (A) que corresponden a 10 GE de HEC-1 (A) (solo 5 GE están mutados) en la reacción de la PCR. Nota: La mezcla con 4,375 ng de ADN plasmático o 1250 Equivalentes genómicos (GE) más 0,035 ng de ADNwc (10 GE de mutantes, 5 mutados) se preparó mediante dilución en serie mezclando 0,5 volúmenes de la mezcla previa con 4,375 ng ADN plasmático o 1250 Equivalentes genómicos (GE) y 0,07 ng de ADNwc (20 GE de mutantes, 10 mutados) con 0,5 volúmenes de los 4,375 ng de la mezcla ADN plasmático.

Cada 130 µl de mezcla de la PCR se dividieron en 12 tubos, 10 µl de cada uno, y a continuación se llevaron a cabo las reacciones de la PCR en placas de la PCR de 96 pocillos transparentes BioExcell de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma) y el siguiente programa: 30 min a 37 °C, 2 min a 95 °C, 35 ciclos de (10 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C), 10 min a 99,5 °C, y un mantenimiento final a 4 °C. Las etapas de la LDR y la qPCR posteriores se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente, en la sección de experimentos de dilución. Los resultados se muestran en la Figura 165 y la Tabla 9.

Tabla 9. Resultado de los experimentos de píxel para detectar TP53 R248Q diluido en ADN plasmático humano.

Moldes	GE por 130 µl de PCR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Amplificaciones totales
HEC-1 (A)_1 (TP53 R248Q, het) + ADN plasmático humano (WT)	20 GE (10 mt) + 1250 GE (wt)	**19,7**	**19,5**	**22,9**	**24,0**	**20,4**	**18,7**	**22,7**	**23,0**	**19,3**	**19,7**	**20,8**	UD	**11**
HEC-1 (A)_1 (TP53 R248Q, het) + ADN plasmático humano (WT)	10 GE (5 mt) + 1250 GE (wt)	UD	UD	**19,9**	UD	37,1	UD	**19,7**	**25,9**	**22,9**	UD	37,4	UD	**4**
ADN plasmático humano (WT)	1250 GE (wt)	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	**0**
NTC	N/A	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD	**0**

Mt = mutante TP53 R248Q. WT = TP53 natural. Het = heterocigoto. UD = Indeterminado. Las columnas 1-12 corresponden a las Ct obtenidas de los tubos 1-12, respectivamente, correspondiendo los valores en negrita a las Ct obtenidas de las "curvas verdaderas", y los valores en tipo de fuente normal que corresponden a los valores obtenidos de las "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).

Ejemplo empírico 3 - Detección de mutaciones en las 12 primeras posiciones del codón KRAS: G12C (34G>T) y G12S (34G>A)

En la Tabla 10 se relacionan todos los cebadores utilizados. Todos los cebadores se adquirieron de Integrated DNA Technologies Inc. ((IDT), Coralville, IA), salvo para el cebador PNA, que se adquirió de PNABio Inc. (Thousand Oaks, CA).

Tabla 10. Cebadores para la detección mediante la PCR-LDR-qPCR de las mutaciones KRAS G12C G12S

Nombre del cebador	Etapa	Secuencia de Cebador
iCDx-327-Kr_12_2_PF_WT_blk2	PCR	TGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGG ArGCTGG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 18)
iCDx-303-Kr-12_1&2_PR	PCR	GGTGTCGTGGCGTCCACAAAATGATTCT GAATTAGCTGTA (SEQ ID NO: 19)
PNA-Kras 12_2-11L	PCR	GAGCTGGTGGC (SEQ ID NO: 20)
PNA-Kras 12_2-11R	PCR	AGCTGGTGGCG (SEQ ID NO: 21)
iCDx-393-Kr-12_1(3)-L_Up_Rm	LDR	TTCGTACCTCGGCACACCAACATAACTG AATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGTTHr GTGAT/3SpC3/ (SEQ ID NO: 22)
iCDx-222-Kr-12_ 1--L_Dn_P	LDR	/5Phos/GTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGGCGTGTGGCTCCGTT ACTCTGTCGA (SEQ ID NO: 23)
iCDx-245_A3	qPCR	TTCGTACCTCGGCACACCA (SEQ ID NO: 24)
iCDx-246-C3	qPCR	TCGACAGAGTAACGGAGCCA (SEQ ID NO: 25)
iCDx-259-T-Kr-12_1_Probe	qPCR	5'- /5HEX/TT GGA GTT H/ZEN/GT GGC GTA GGC AAG A/3IABkFQ/ -3' (SEQ ID NO: 26)
PNA = Ácido nucleico peptídico, /5SpC3/ - Separador C3 en 5', /3SpC3/ - Separador C3 en 3', /5Phos/ - 5' Fosfato, /56-FAM/ - Colorante Fluorescente Fam en 5', /5HEX/ - Colorante Fluorescente HEX™, /ZEN/ - ZEN™ Flourescent Quencher™, /3IABkFQ/ - Inactivador fluorescente Iowa Black® en 3', gama espectral verde a rosa, "+" - Base de ácido nucleico bloqueada, "rA" - base de ribonucleótido riboadenosina; "rT" - base de ribonucleótido ribotimidina; "rG" - base de ribonucleótido riboguanosina; "rC" - base de ribonucleótido ribocitosina		

Experimentos de dilución. Se llevó a cabo la etapa de la PCR en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 1,58 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 2 µl de tampón Gotaq Flexi 5X sin magnesio (Promega, Madison, WI), 0,8 µl de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega, Madison, WI), 0,2 µl de dNTP (con dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 10 mM cada uno) (Promega, Madison, WI), 0,25 µl de cebador directo iCDx-327-Kr_12_2_PF_WT_blk2 en 2 µM, 0,25 µl de cebador inverso iCDx-303-Kr-12_1&2_PR a 2 µM, 1,25 µl de PNA-Kras 12_2-11L (o PNA-Kras 12_2-11R) PNA cebador de bloqueo a 2 µM, 0,25 µl de ARNAsaH2 (IDT) a 20 mU/µl (diluido en tampón de dilución ARNAsaH2 a partir de IDT), 0,2 µl de Antarctic thermolabile UDG (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) en 1 U/µl, y 0,22 µl de polimerasa Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) mezclada con Platinum Taq Antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) (la mezcla se preparó añadiendo 0,02 µl de polimerasa Klentaq1 de 50 U/µl a 0,2 µl de Platinum Taq Antibody a 5 U/µl), y 3 µl del molde correspondiente. Los moldes fueron: agua exenta de nucleasa para el NTC - Control sin molde -, ADNhg de Roche a 11,7 ng/µl (por tanto, 35 ng o 10000 Equivalentes genómicos (GE) en 3 µl) - natural -, y SW1463 (G12C, 34G>T, homocigótico) o LS123 (G12S, 34G>A, heterocigótico) wcDNA mezclado con ADNhg de Roche del siguiente modo: 1) 0,047 ng/µl de ADNwc SW1463 o LS123 en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,14 ng de ADNwc SW1463 o LS123 y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 40 GE de ADNwc SW1463 o LS123 (40 GE están mutados para SW1463, y 20 GE están mutados para LS123) y 10000 GE de ADN genómico humano de Roche (es decir, 1 mt en 250 wt para SW1463 y 1 mt en 500 wt para LS123); 2) 0,023 ng/µl de ADNwc SW1463 o LS123 en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,07 ng de wcDNA SW1463 o LS123 y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 20 GE de ADNwc SW1463 o LS123 (20 GE están mutados para SW1463, y 10 GE están mutados para LS123) y 10000 GE de ADNhg de Roche (es decir. 1 mt en 500 wt para SW1463 y 1 mt en 1000 para LS123); 3) 0,0117 ng/µl de ADNwc SW1463 o LS123 en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,0035 ng de ADNwc de SW1463 o LS123 y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 10 GE de ADNwc SW1463 o LS123 (10 GE están mutados para SW1463, y 5 GE están mutados para LS123) y 10000 GE de ADNhg de Roche (es decir 1 mt en 1000 wt para SW1463 y 1 mt en 2000 wt para LS123); 4) 0,006 de ADNwc SW1463 o LS123 ng/µl en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto 0,00175 ng de ADNwc SW1463 o LS123 y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 5 GE de ADNwc SW1463 o LS123 (5 GE están mutados para SW1463, y 2 o 3 GE están mutados para LS123) y 10000 GE de ADNhg de Roche (es decir 1 mt en 2000 wt para SW1463 y 1 mt en 5000 wt para LS123). Nota: tras preparar los 0,047 ng/µl de ADNwc SW1463 o LS123 (A) en 11,7 ng/µl de mezcla de ADNhg de Roche (40 GE de mutantes en 10000 GE de ADNhg de Roche), el resto de mutantes más el hgADN de

Roche se prepararon mediante diluciones en serie que mezclaban 0,5 volúmenes de la mezcla de hgADN de roche mutante anterior más 0,5 volúmenes de hgADN de Roche a 11,7 ng/µl, de tal manera que los mutantes GE se diluyeron ½ mientras que hgADN GE de Roche permanece sin diluir (10000 GE). Se ejecutaron las reacciones de la PCR en placas de la PCR BioExcell de 96 pocillos transparentes de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma y el siguiente programa: 30 min a 37 °C, 2 min a 95 °C, 50 ciclos de (10 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C), 10 min a 99,5 °C, y un mantenimiento final a 4 °C.

Se llevó a cabo la etapa de la LDR en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 5,82 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 1 µl de tampón de reacción de ligasa 10X AK16D [1X tampón contiene Tris-HCl 20 mM pH 8,5 (Bio-Rad, Hercules, CA), $MgCl_2$ 5 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), KCl 50 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo), DTT 10 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) y 20 ug/ml de BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo)], 0,25 µl de DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) a 40 mM, 0,25 µl de NAD^+ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) a 40 mM, 0,25 µl de ARNsaH2 (IDT) a 20 mU/µl, 0,2 µl de cebador iCDx-393-Kr-12_1(3)-L_Up_Rm Up a 500 nM, 0,2 µl de cebador iCDx-222-Kr-12_1-L_Dn_P Dn a 500 nM, 0,028 µl de ligasa AK16D purificada a 8,8 µM, y 2 µl de reacción de la PCR. Las reacciones de la PCR se realizaron en placas de 96 pocillos transparentes BioExcell de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma y el siguiente programa: 20 ciclos de (10 s a 94 °C, y 4 min a 60 °C) seguido por un mantenimiento final 4 °C.

La etapa de la qPCR se llevó a cabo en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 1,5 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 5 µl de mezcla maestra de la PCR 2X TaqMan® Fast Universal (amplitaq rápida, UDG y dUTP) de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), 1 µl de iCDx-245_A3 cebador directo a 2,5 µM, 1 µl de cebador inverso iCDx-246-C3 a 2,5 µM, 0,5 µl de iCDx-259-T-Kr-12_1_Probe sonda Taqman a 5 µM, y 1 µl de reacción de la LDR. Se ejecutaron las reacciones de la qPCR en un termociclador ViiA7 en tiempo real de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando placas de reacción de 96 pocillos MicroAmp® Fast de 0,1 ml con película adhesiva óptica MicroAmp™ de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma, y la siguiente configuración: bloqueo rápido, Curva patrón según tipo de experimento, ROX como referencia pasiva, Ct como método de cuantificación (umbral automático, pero ajustado a 0,04 cuando sea necesario), HEX como indicador y NFQ-MGB como inactivador; y usando el siguiente programa: 2 min a 50 ºC, y 40 ciclos de (1 s a 95 °C, y 20 s a 60 °C). Los resultados del experimento utilizando el cebador de bloqueo de PNA, PNA-Kras 12_2-11L en la etapa de la PCR se muestran en la Figura 166 y la Tabla 11. Los resultados del experimento utilizando el cebador de bloqueo de PNA, PNA-Kras 12_2-11R en la etapa de la PCR se muestran en la Figura 167 y la Tabla 12.

Tabla 11. Resultados de los experimentos de dilución para detectar la mutación KRAS G12C (34G >) utilizando el cebador de bloqueo de PNA, PNA-Kras 12_2-11L en la etapa de la PCR.

Moldes	Equivalentes de genoma iniciales (por 10 µl de PCR)	Ct	Diferencia de Ct frente a 10000 GE de hgADN de Roche
SW1463_1 (KRAS G12C, hom) + ADNhg de Roche (WT)	40 (40 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 250 wt)	**26,0**	4,9
SW1463_1 (KRAS G12C, hom) + ADNhg de Roche (WT)	20 (20 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 500 wt)	**22,1**	8,8
SW1463_1 (KRAS G12C, hom) + ADNhg de Roche (WT)	10 (10 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 1.000 wt)	**24,2**	6,7
SW1463_1 (KRAS G12C, hom) + ADNhg de Roche (WT)	5 (5 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 2.000 wt)	**26,3**	4,6
ADNhg de Roche (WT)	10.000 wt	**30,9**	
NTC	N/A	Indeterminado	
Mt = mutante KRAS G12C. WT = KRAS natural. Hom = homocigoto. UD = Indeterminado. Los valores de Ct en negrita corresponden a las Ct obtenidas de "curvas verdaderas", y los valores en tipo fuente normal corresponden a los valores obtenidos de "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).			

Tabla 12. Resultados de los experimentos de dilución para detectar la mutación KRAS G12S (34G >) utilizando el cebador de bloqueo de PNA, PNA-Kras 12_2-11R en la etapa de la PCR.

Moldes	Equivalentes de genoma iniciales (por 10 µl de PCR)	Ct	Diferencia de Ct frente a 10000 GE de hgADN de Roche
LS123_1 (KRAS G12S, het) + ADNhg de Roche (WT)	40 (20 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 500 wt)	**30,5**	1,6
LS123_1 (KRAS G12S, het) + ADNhg de Roche (WT)	20 (10 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 1.000 wt)	**31,2**	0,9

(continuación)

Moldes	Equivalentes de genoma iniciales (por 10 µl de PCR)	Ct	Diferencia de Ct frente a 10000 GE de hgADN de Roche
LS123_1 (KRAS G12S, het) + ADNhg de Roche (WT)	10 (5 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 2.000 wt)	**31,4**	0,7
LS123_1 (KRAS G12S, het) + ADNhg de Roche (WT)	5 (2 o 3 mt) + 10.000 wt (es decir, 1 mt/5.000 wt)	**30,5**	1,6
ADNhg de Roche (WT)	10.000 wt	**32,1**	
NTC	N/A	38,4	
Mt = mutante KRAS G12S. WT = KRAS natural. Het = heterocigoto. UD = Indeterminado. Los valores de Ct en negrita corresponden a las Ct obtenidas de "curvas verdaderas", y los valores en tipo fuente normal corresponden a los valores obtenidos de "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).			

Experimentos de píxel que utilizan ADN plasmático humano (plasma n.º 9). La etapa de la PCR se llevó a cabo en una mezcla de 130 µl preparada añadiendo: 46,54 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 26 µl de tampón Gotaq Flexi 5X sin magnesio (Promega, Madison, WI), 10,4 µl de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega, Madison, WI), 2,6 µl de dNTP (con dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 10 mM cada uno) (Promega, Madison, WI), 3,25 µl de cebador directo iCDx-327-Kr_12_2_PF_WT_blk2 en 2 µM, 3,25 µl de cebador inverso iCDx-303-Kr-12_1&2_PR a 2 µM, 16,25 µl de agente de bloqueo de PNA, PNA-Kras 12_2-11L PNA a 2 µM, 3,25 µl de ARNAsaH2 (IDT) a 20 mU/µl (diluido en tampón de dilución ARNAsaH2 a partir de IDT), 2,6 µl de Antarctic thermolabile UDG (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) en 1 U/µl, y 2,86 µl de polimerasa Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) mezclada con Platinum Taq Antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) (la mezcla se preparó añadiendo 0,3 µl de polimerasa Klentaq1 de 50 U/µl a 3 µl de Platinum Taq Antibody a 5 U/µl), y 13 µl del molde correspondiente. Los moldes fueron: agua exenta de nucleasa para el NTC -Control sin molde-; ADN plasmático (preparado por tanto como 8,3 µl de H2O exenta de nucleasa más 4,7 µl de ADN plasmático a 0,743 ng/µl, 3,5 ng de ADN plasmático o 1000 de Equivalentes genómicos (GE) en la reacción de la PCR) - natural -; y ADNwc SW1463 mezclado con ADN plasmático del siguiente modo: 1) 6,3 µl de H2O exenta de nucleasa, más 4,7 µl de ADN plasmático a 0,743 ng/µl, más 2 µl de 0,0175 ng/µl de ADNwc SW1463, por lo tanto, 3,5 ng de ADN plasmático o 1000 Equivalentes genómicos (GE) más 0,035 ng de ADNwc SW1463 que corresponden a 10 GE de SW1463 (los 10 GE están mutados) en la reacción de la PCR; 2) 7,3 µl de H2O exenta de nucleasa, más 4,7 µl de ADN plasmático a 0,743 ng/µl, más 1 µl de 0,0175 ng/µl de ADNwc SW1463, por lo tanto, 3,5 ng de ADN plasmático o 1000 Equivalentes genómicos (GE) más 0,0175 ng de ADNwc SW1463 que corresponden a 5 GE de SW1463 (solo 5 GE están mutados) en la reacción de la PCR. Nota: La mezcla con 3,5 ng de ADN plasmático o 1000 Equivalentes genómicos (GE) más 0,0175 ng de ADNwc (5 GE de mutantes, 5 mutados) se preparó mediante dilución en serie mezclando 0,5 volúmenes de la mezcla previa con 3,5 ng de ADN plasmático o 1000 Equivalentes genómicos (GE) y 0,035 ng de ADNwc (10 GE de mutantes, 10 mutados) con 0,5 volúmenes de los 3,5 ng de la mezcla de ADN plasmático.

Cada 130 µl de mezcla de la PCR se dividieron en 12 tubos, 10 µl de cada uno, y a continuación se llevaron a cabo las reacciones de la PCR en placas de la PCR de 96 pocillos transparentes BioExcell de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma y el siguiente programa: 30 min a 37 °C, 2 min a 95 °C, 50 ciclos de (10 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C), 10 min a 99,5 °C, y un mantenimiento final a 4 °C. Las etapas de la LDR y la qPCR posteriores se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente, en la sección de experimentos de dilución. Los resultados se muestran en la Figura 168 y la Tabla 13.

Tabla 13. Resultado de los experimentos de píxel para detectar KRAS G12C diluido en ADN plasmático humano.

Moldes	GE por 130 µl de PCR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Amplificaciones totales
SW1463_1 (KRAS G12C, hom) + ADN plasmático humano (WT)	10 GE (10 mt) + 1000 GE (wt)	UD	**22,4**	UD	UD	**18,9**	UD	38,1	38,8	**19,6**	37,8	39,6	37,6	**3**
SW1463_1 (KRAS G12C, hom) + ADN plasmático humano (WT)	5 GE (5 mt) + 1000 GE (wt)	38,8	39,7	**19,3**	**25,9**	37,2	39,0	**17,9**	UD	UD	39,6	UD	UD	**3**
ADN plasmático humano (WT)	1000 GE	39,1	38,4	UD	38,4	39,4	UD	38,3	38,0	UD	39,4	UD	UD	**0**
NTC	N/A	UD	39,4	UD	UD	UD	37,8	UD	UD	UD	UD	38,7	UD	**0**

Mt = mutante KRAS G12C. WT = KRAS natural. Hom = homocigoto. UD = Indeterminado. Las columnas 1-12 corresponden a las Ct obtenidas de los tubos 1-12, respectivamente, correspondiendo los valores en negrita a las Ct obtenidas de las "curvas verdaderas", y los valores en tipo de fuente normal que corresponden a los valores obtenidos de las "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).

Ejemplo empírico 4 - Detección de mutaciones en las 12 segundas posiciones del codón KRAS: G12D (35G>A), G12A (35G>C) y G12V (35G>T)

En la Tabla 14 se relacionan todos los cebadores utilizados. Todos los cebadores se adquirieron de Integrated DNA Technologies Inc. ((IDT), Coralville, IA), salvo para el cebador PNA, que se adquirió de PNABio Inc. (Thousand Oaks, CA).

Tabla 14. Cebadores para la detección mediante la PCR-LDR-qPCR de las mutaciones KRAS, G12D, G12A y G12V

Nombre del cebador	Etapa	Secuencia de Cebador
iCDx-327-Kr_12_2_PF_WT_blk2	PCR	TGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTT GGArGCTGG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 18)
iCDx-303-Kr-12_1&2_PR	PCR	GGTGTCGTGGCGTCCACAAAATGATT CTGAATTAGCTGTA (SEQ ID NO: 19)
PNA-Kras 12_2-11L	PCR	GAGCTGGTGGC (SEQ ID NO: 20)
iCDx-307-Kr-12_2(3)-L_Up_Rm	LDR	TTCGTACCTCGGCACACCAACATATG AATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCC GHrUGGCA/3SpC3/ (SEQ ID NO: 27)
iCDx-394-Kr-12_2(3)-L_Up_Rm	LDR	TTCGTACCTCGGCACACCAACATATG AATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCC GHrUGGTA/3SpC3/ (SEQ ID NO: 28)
iCDx-269-Kr-12_2-L_Dn_P	LDR	/5Phos/TGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGGCGTGTGG CTCCGTTACTCTGTCG A (SEQ ID NO: 29)
iCDx-245_A3	qPCR	TTCGTACCTCGGCACACCA (SEQ ID NO: 24)
iCDx-246-C3	qPCR	TCGACAGAGTAACGGAGCCA (SEQ ID NO: 25)
iCDx-270-Kr-12_2(3)_Probe	qPCR	5'- /5HEX/TAG TTG GAG/ZEN/ CCG HTG GCG TAG G /3IABkFQ/ -3' (SEQ ID NO: 30)
PNA = Ácido nucleico peptídico, /5SpC3/ - Separador C3 en 5', /3SpC3/ - Separador C3 en 3', /5Phos/ - 5' Fosfato, /56-FAM/ - Colorante Fluorescente Fam en 5', /5HEX/ - Colorante Fluorescente HEX™, /ZEN/ - ZEN™ Flourescent Quencher™, /3IABkFQ/ - Inactivador Fluorescente Iowa Black ® en 3', gama espectral verde a rosa, "+" - Base de ácido nucleico bloqueada, "rA" - base de ribonucleótido riboadenosina; "rT" - base de ribonucleótido ribotimidina; "rG" - base de ribonucleótido riboguanosina; "rC" - base de ribonucleótido ribocitosina		

Experimentos de dilución. Se llevó a cabo la etapa de la PCR en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 1,58 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 2 µl de tampón Gotaq Flexi 5X sin magnesio (Promega, Madison, WI), 0,8 µl de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega, Madison, WI), 0,2 µl de dNTP (con dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 10 mM cada uno) (Promega, Madison, WI), 0,25 µl de cebador directo iCDx-327-Kr_12_2_PF_WT_blk2 en 2 µM, 0,25 µl de cebador inverso iCDx-303-Kr-12_1&2_PR a 2 µM, 1,25 µl de agente de bloqueo de PNA, PNA-Kras 12_2-11L PNA a 2 µM, 0,25 µl de ARNAsaH2 (IDT) a 20 mU/µl (diluido en tampón de dilución ARNAsaH2 a partir de IDT), 0,2 µl de Antarctic thermolabile UDG (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) en 1 U/µl, y 0,22 µl de polimerasa Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) mezclada con Platinum Taq Antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) (la mezcla se preparó añadiendo 0,02 µl de polimerasa Klentaq1 de 50 U/µl a 0,2 µl de Platinum Taq Antibody a 5 U/µl), y 3 µl del molde correspondiente. Los moldes fueron: agua exenta de nucleasa para el NTC - Control sin molde -, ADNhg de Roche a 11,7 ng/µl (por tanto, 35 ng o 10000 equivalentes genómicos (GE) en 3 µl) - natural -, ADNwc HEC-1(A) (G12D, 35G>A, heterocigótico) o SW1116 (G12A, 35G>C, heterocigótico) o SW480 (G12V, 35G>T, homocigótico) se mezclaron con ADNhg de Roche del siguiente modo: 1) 0,047 ng/µl de ADNwc de HEC-1(A), SW1116 o SW480 en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto, 0,14 ng de HEC-1(A), SW1116 o SW480 y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 40 GE de HEC-1(A), SW1116 o SW480 (20 GE están mutados para HEC-1(A) o SW1116, y 40 GE están mutados para SW480) y 10000 GE de ADN genómico humano de Roche (es decir, 1 mt in 500 wt para HEC-1(A) o SW1116 y 1 mt en 250 para SW480; 2) 0,023 ng/µl de ADNwc de HEC-1(A), SW1116 o SW480 en 11.7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto, 0,07 ng de HEC-1(A), ADNwc de SW1116 o SW480 y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 20 GE de HEC-1(A), SW1116 o SW480 (10 GE están mutados para HEC-1(A) o SW1116, y 20 GE está mutados para SW480) y 10000 GE de ADNhg de Roche (es decir, 1 mt en 1000 wt para HEC-1(A) o SW1116 y 1 mt en 500 wt para SW480); 3) 0,0117 ng/µl de ADNwc de HEC-1(A), SW1116 o SW480 en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto, 0,0035 ng de HEC-1(A), ADNwc de SW1116 o SW480 y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 10 GE de HEC-1(A), SW1116 o SW480 (5 GE están mutados para HEC-1(A) o SW1116, y 10 GE están mutados para SW480) y 10000 GE de ADNhg de Roche (es decir 1 mt in 2000 para HEC-1(A) o SW1116

y 1 mt en 1000 para SW480); 4) 0,006 ng/µl de ADNwc de HEC-1(A), SW1116 o SW480 en 11,7 ng/µl de ADNhg de Roche, por tanto, 0,00175 ng de HEC-1(A), ADNwc de SW1116 o SW480 y 35 ng de ADNhg de Roche en 3 µl, que corresponden a 5 GE de HEC-1(A), SW1116 o SW480 (2 o 3 GE están mutados para HEC-1(A) o SW1116, y 5 GE están mutados para SW480) y 10000 GE de ADNhg de Roche (es decir, 1 mt en 5000 wt para HEC-1(A) o SW1116 y 1 mt en 2000 wt para SW480). Nota: después de preparar los 0,047 ng/µl de ADNwc de HEC-1(A), ADNwc SW1116 o SW480 (A) en 11,7 ng/µl de mezcla de ADNhg de Roche (40 GE de mutantes en 10000 GE de ADNhg de Roche), el resto de mutantes más el hgADN de Roche se prepararon mediante diluciones en serie que mezclaban 0,5 volúmenes de la mezcla de hgADN de roche mutante anterior más 0,5 volúmenes de hgADN de Roche a 11,7 ng/µl, de tal manera que los mutantes GE se diluyeron ½ mientras que hgADN GE de Roche permanece sin diluir (10000 GE). Se ejecutaron las reacciones de la PCR en placas de la PCR BioExcell de 96 pocillos transparentes de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma) y el siguiente programa: 30 min a 37 °C, 2 min a 95 °C, 50 ciclos de (10 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C), 10 min a 99,5 °C, y un mantenimiento final a 4 °C.

Se llevó a cabo la etapa de la LDR en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 5,82 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 1 µl de tampón de reacción de ligasa 10X AK16D [1X tampón contiene Tris-HCl 20 mM pH 8,5 (Bio-Rad, Hercules, CA), $MgCl_2$ 5 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), KCl 50 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo), DTT 10 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) y 20 ug/ml de BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo)], 0,25 µl de DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) a 40 mM, 0,25 µl de NAD^+ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) a 40 mM, 0,25 µl de ARNsaH2 (IDT) a 20 mU/µl, 0,2 µl de cebador iCDx-307-Kr-12_2(3)-L_Up_Rm o iCDx-394-Kr-12_2(3)-L_Up_Rm Up a 500 nM, 0,2 µl de cebador iCDx-269-Kr-12_2-L_Dn_P Dn a 500 nM, 0,028 µl de ligasa AK16D purificada a 8,8 µM, y 2 µl de reacción de la PCR. Las reacciones de la PCR se realizaron en placas de 96 pocillos transparentes BioExcell de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma y el siguiente programa: 20 ciclos de (10 s a 94 °C, y 4 min a 60 °C) seguido por un mantenimiento final 4 °C.

La etapa de la qPCR se llevó a cabo en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 1,5 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 5 µl de mezcla maestra de la PCR 2X TaqMan® Fast Universal (amplitaq rápida, UDG y dUTP) de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), 1 µl de iCDx-245_A3 cebador directo a 2,5 µM, 1 µl de cebador inverso iCDx-246-C3 a 2,5 µM, 0,5 µl de sonda Taqman iCDx-270-Kr-12_2(3)_Probe a 5 µM, y 1 µl de reacción de la LDR. Se ejecutaron las reacciones de la qPCR en el termociclador ViiA7 en tiempo real de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando placas de reacción de 96 pocillos MicroAmp® Fast de 0,1 ml con película adhesiva óptica MicroAmp™ de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma, y la siguiente configuración: bloqueo rápido, Curva patrón según tipo de experimento, ROX como referencia pasiva, Ct como método de cuantificación (umbral automático, pero ajustado a 0,04 cuando sea necesario), HEX como indicador y NFQ-MGB como inactivador; y usando el siguiente programa: 2 min a 50 ºC, y 40 ciclos de (1 s a 95 °C, y 20 s a 60 °C). Se muestran los resultados del experimento para detectar la mutación KRAS G12D (35G>A) usando el cebador de la LDR iCDx-307-Kr-12_2(3)-L up Rm UP en la Figura 169 y la Tabla 15. Se muestran los resultados del experimento para detectar la mutación KRAS G12A (G>C) usando el cebador de la LDR iCDx-307-Kr-12_2(3)-L up Rm UP LDR en la Figura 170 y la Tabla 16. Se muestran los resultados del experimento para detectar la mutación KRAS G12V (35G>T) usando el cebador de la LDR iCDx-307-Kr-12_2(3)-L up Rm UP en la Figura 171 y la Tabla 17.

Tabla 15. Resultados de los experimentos de dilución para detectar la mutación KRAS G12D (35G>A) usando el cebador de la LDR iCDx-307-Kr-12_2 (3)-L_Up_Rm UP.

Moldes	Equivalentes de genoma iniciales (por 10 µl de PCR)	Ct	Diferencia de Ct frente a 10000 GE de hgADN de Roche
HEC-1(A)_1 (KRAS G12D, het) + ADNhg de Roche (WT)	40 (20 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 500 wt)	**28,4**	6,0
HEC-1(A)_1 (KRAS G12D, het) + ADNhg de Roche (WT)	20 (10 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 1.000 wt)	**31,0**	3,5
HEC-1(A)_1 (KRAS G12D, het) + ADNhg de Roche (WT)	10 (5 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 2.000 wt)	**32,2**	2,2
HEC-1(A)_1 (KRAS G12D, het) + ADNhg de Roche (WT)	5 (2 o 3 mt) + 10.000 wt (es decir, 1 mt/5.000 wt)	**29,8**	4,6
ADNhg de Roche (WT)	10.000 wt	**34,4**	
NTC	N/A	35,1	
Mt = mutante KRAS G12D. WT = KRAS natural. Het = heterocigoto. UD = Indeterminado. Los valores de Ct en negrita corresponden a las Ct obtenidas de "curvas verdaderas", y los valores en tipo fuente normal corresponden a los valores obtenidos de "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).			

Tabla 16. Resultados de los experimentos de dilución para detectar la mutación KRAS G12A (35G>C) usando el cebador de la LDR iCDx-307-Kr-12_2 (3)-L_Up_Rm UP.

Moldes	Equivalentes de genoma iniciales (por 10 µl de PCR)	Ct	Diferencia de Ct frente a 10000 GE de hgADN de Roche
SW1116 (KRAS G12A, het) + ADNhg de Roche (WT)	40 (20 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 500 wt)	**24,8**	9,6
SW1116 (KRAS G12A, het) + ADNhg de Roche (WT)	20 (10 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 1.000 wt)	**23,6**	10,8
SW1116 (KRAS G12A, het) + ADNhg de Roche (WT)	10 (5 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 2.000 wt)	**25,2**	9,2
SW1116 (KRAS G12A, het) + ADNhg de Roche (WT)	5 (2 o 3 mt) + 10.000 wt (es decir, 1 mt/5.000 wt)	**28,9**	5,6
ADNhg de Roche (WT)	10.000 wt	**34,4**	
NTC	N/A	36,0	
Mt = mutante KRAS G12A. WT = KRAS natural. Het = heterocigoto. UD = Indeterminado. Los valores de Ct en negrita corresponden a las Ct obtenidas de "curvas verdaderas", y los valores en tipo fuente normal corresponden a los valores obtenidos de "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).			

Tabla 17. Resultados de los experimentos de dilución para detectar la mutación KRAS G12V (35G>T) usando el cebador de la LDR iCDx-307-Kr-12_2 (3)-L_Up_Rm UP.

Moldes	Equivalentes de genoma iniciales (por 10 µl de PCR)	Ct	Diferencia de Ct frente a 10000 GE de hgADN de Roche
SW480 (KRAS G12V, hom) + ADNhg de Roche (WT)	40 (40 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 250 wt)	**21,9**	12,6
SW480 (KRAS G12V, hom) + ADNhg de Roche (WT)	20 (20 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 500 wt)	**22,8**	11,6
SW480 (KRAS G12V, hom) + ADNhg de Roche (WT)	10 (10 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 1.000 wt)	**24,0**	10,5
SW480 (KRAS G12V, hom) + ADNhg de Roche (WT)	5 (5 mt) + 10.000 wt (es decir 1 mt / 2.000 wt)	**27,9**	6,5
ADNhg de Roche (WT)	10.000 wt	**34,4**	
NTC	N/A	34,8	
Mt = mutante KRAS G12V. WT = KRAS natural. Hom = homocigoto. UD = Indeterminado. Los valores de Ct en negrita corresponden a las Ct obtenidas de "curvas verdaderas", y los valores en tipo fuente normal corresponden a los valores obtenidos de "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).			

Experimentos de píxel que utilizan ADN plasmático humano (plasma n.º 9). La etapa de la PCR se llevó a cabo en una mezcla de 130 µl preparada añadiendo: 46,54 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 26 µl de tampón Gotaq Flexi 5X sin magnesio (Promega, Madison, WI), 10,4 µl de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega, Madison, WI), 2,6 µl de dNTP (con dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 10 mM cada uno) (Promega, Madison, WI), 3,25 µl de cebador directo iCDx-327-Kr_12_2_PF_WT_blk2 en 2 µM, 3,25 µl de cebador inverso iCDx-303-Kr-12_1&2_PR a 2 µM, 16,25 µl de agente de bloqueo de PNA, PNA-Kras 12_2-11L PNA a 2 µM, 3,25 µl de ARNAsaH2 (IDT) a 20 mU/µl (diluido en tampón de dilución ARNAsaH2 a partir de IDT), 2,6 µl de Antarctic thermolabile UDG (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) en 1 U/µl, y 2,86 µl de polimerasa Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) mezclada con Platinum Taq Antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) (la mezcla se preparó añadiendo 0,3 µl de polimerasa Klentaq1 de 50 U/µl a 3 µl de Platinum Taq Antibody a 5 U/µl), y 13 µl del molde correspondiente. Los moldes fueron: agua exenta de nucleasa para el NTC -Control sin molde-; ADN plasmático (preparado por tanto como 8,3 µl de H2O exenta de nucleasa más 4,7 µl de ADN plasmático a 0,743 ng/µl, 3,5 ng de ADN plasmático o 1000 de Equivalentes genómicos (GE) en la reacción de la PCR) - natural -; y ADNwc SW480 mezclado con ADN plasmático del siguiente modo: 1) 6,3 µl de H2O exenta de nucleasa, más 4,7 µl de ADN plasmático a 0,743 ng/µl, más 2 µl de 0,0175 ng/µl de SW480, por lo tanto, 3,5 ng de ADN plasmático o 1000 Equivalentes genómicos (GE) más 0,035 ng de ADNwc de SW480 que corresponden a 10 GE de SW480 (los 10 GE están mutados) en la reacción de la PCR; 2) 7,3 µl de H2O exenta de nucleasa, más 4,7 µl de ADN plasmático a 0,743 ng/µl, más 1 µl de 0,0175 ng/µl de SW480, por lo tanto, 3,5 ng de ADN plasmático o 1000 Equivalentes genómicos (GE) más 0,0175 ng de SW480 que corresponden a 5 GE de SW480 (solo 5 GE están mutados) en la reacción de la PCR. Nota: La mezcla con 3,5 ng de ADN plasmático o 1000 Equivalentes genómicos (GE) más 0,0175 ng de ADNwc de SW480 (5 GE de mutantes, 5 mutados) se preparó mediante dilución en serie mezclando 0,5 volúmenes de la mezcla previa con 3,5 ng ADN plasmático o 1000 Equivalentes genómicos (GE) y 0,035 ng de ADNwc de SW480 (10 GE de mutantes, 10 mutados) con 0,5 volúmenes de los 3,5 ng de la mezcla ADN plasmático.

Cada 130 µl de mezcla de la PCR se dividieron en 12 tubos, 10 µl de cada uno, y a continuación se llevaron a cabo las reacciones de la PCR en placas de la PCR de 96 pocillos transparentes BioExcell de 0,2 ml (Worldwide Medical Products, Inc., Bristol, PA) precintadas con película adhesiva transparente MicroAmp® de Applied Biosystems (Applied

Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando un sistema termociclador de la PCR Proflex de Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma y el siguiente programa: 30 min a 37 °C, 2 min a 95 °C, 50 ciclos de (10 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C), 10 min a 99,5 °C, y un mantenimiento final a 4 °C. Las etapas de la LDR y la qPCR posteriores se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente, en la sección de Experimentos de dilución, usando como cebador en dirección 5' iCDx-394-Kr-12_2(3)-L_Up_Rm para la etapa de la LDR. Los resultados se muestran en la Figura 172 y la Tabla 18.

Tabla 18. Resultado de los experimentos de píxel para detectar KRAS G12V diluido en ADN plasmático humano.

Moldes	GE por 130 µl de PCR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Amplificaciones totales
SW480_1 (KRAS G12V, hom) + ADN plasmático humano (WT)	10 GE (10 mt) + 1000 GE (wt)	35,5	**19,4**	**21,5**	35,6	**18,8**	**19,3**	**19,4**	34,9	**22,6**	**22,0**	**20,0**	**20,5**	**9**
SW480_1 (KRAS G12V, hom) + ADN plasmático humano (WT)	5 GE (5 mt) + 1000 GE (wt)	**22,4**	**21,0**	**20,3**	**22,3**	**20,2**	35,3	35,0	**19,6**	**19,8**	**26,5**	35,7	**20,4**	**9**
ADN plasmático humano (WT)	1000 GE (wt)	37,9	36,1	36,3	36,2	35,7	36,2	36,4	35,5	36,0	37,1	36,3	35,9	**0**
NTC	N/A	36,0	36,6	35,9	36,9	36,2	36,2	36,7	36,5	37,2	36,5	36,8	35,9	**0**

Mt = mutante KRAS G12V. WT **=** KRAS natural. Hom **=** homocigoto. UD **=** Indeterminado. Las columnas 1-12 corresponden a las Ct obtenidas de los tubos 1-12, respectivamente, correspondiendo los valores en negrita a las Ct obtenidas de las "curvas verdaderas", y los valores en tipo de fuente normal que corresponden a los valores obtenidos de las "curvas planas", es decir, las curvas no iniciales que aparecen en ciclos de amplificación posteriores (generalmente tras un valor de Ct de 36).

Ejemplo empírico 5 - Detección de metilación en el ADN genómico de la línea de células

Métodos generales. Las líneas de células usadas fueron: LS-174T, HCT-15, HT-29, WiDi, SW1116, línea de células de adenocarcinoma de colon. Todas las líneas de células se sembraron en placas de cultivo de 60 cm^2 de medio 5a de McCoy que contenían 4,5 g/l de glucosa, suplementado con suero de feto de ternera al 10 % y se mantuvieron en una atmósfera humidificada que contenía CO_2 al 5 %. Una vez que las células alcanzaron un 80-90 % de confluencia se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (x 3) y se recogieron mediante centrifugación (500 x g). El ADN se aisló usando el Kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen; Valencia, CA). Se determinó la concentración del ADN con el ensayo Quant-iT Picogreen (Life Technologies/ThermoFisher; Waltham, Ma).

ADN genómico humano (0,2 mg/ml) que contiene ADN genómico; de alto peso molecular (>50 kb) aislado de sangre humana (capa leucocitaria) (ADN genómico humano de Roche) se adquirió de Roche (Indianápolis, IN). Se determinó que su concentración era de 39 ng/µl según el Kit de ensayo de ADNbc Quant-iT PicoGreen.

Digestión con restricción de ADN genómico con enzima Bsh1236I. Se digirieron los ADN genómicos (500 ng) de las líneas celulares relacionadas anteriormente con 10 unidades de la enzima de restricción Bsh1236I en 20 µl de mezcla de reacción que contenía tampón 1xCutSmart (Acetato de potasio 50 mM, Tris-Acetato 20 mM, Acetato de magnesio 10 mM, 100 µg/ml de BSA, pH 7,9 a 25 °C). Se llevaron a cabo las reacciones de digestión a 37 °C durante 1 hora y posterior inactivación enzimática calentando a 80 °C durante 20 min.

Conversión del bisulfito del ADN genómico digerido. Se llevó a cabo la conversión del bisulfito usando el kit de Metilación-Iluminación del ADN EZ de Zymo Research Corporation (Irvine, CA). Se añadieron 130 µl de Reactivo de conversión de la iluminación a 20 µl del ADN Bsh1236I genómico digerido. La reacción de conversión se incubó a 98 °C durante 8 minutos, seguido por 54 °C durante una hora y a continuación se enfrió a 4 °C. 600 µl de tampón e unión M se añadió a una Columna Zymo-Spin ™ seguido por la colocación de la columna en un tubo de recogida. La mezcla de reacción de 150 µl contenía ADN digerido y el reactivo de conversión de luz se cargó en la columna Zymo-Spin IC que contenía los 600 µl del tampón de unión-M. Se precintó la tapa de la columna, y se mezcló la solución invirtiendo la columna varias veces. Se centrifugó la columna a velocidad completa (≥ 10.000 x g) durante 30 s descartándose el flujo pistón. Se añadieron 100 µl de tampón de lavado M a la columna y se centrifugó la columna a toda velocidad durante 30 s y se descartó el flujo pistón. Se añadieron 200 µl de tampón de desulfonación L a la columna, y se dejó que la columna reposara a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. Después de la incubación, se centrifugó la columna a toda velocidad durante 30 segundos. Se añadieron 200 µl de tampón de lavado M a la columna y se centrifugó la columna a toda velocidad durante 30 segundos descartándose el flujo pistón. Esta etapa de lavado se repitió una vez más. Por último, la columna se introdujo en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, y se añadieron 10 µl de tampón de elución M a la matriz de la columna y se centrifugó a toda velocidad durante 30 segundos para eluir el ADN convertido con bisulfito.

Cebadores de la PCR y la LDR. En la Tabla 19 se relacionan todos los cebadores utilizados. Todos los cebadores se adquirieron de Integrated DNA Technologies Inc. ((IDT), Coralville, IA), salvo para LNA1 y LNA2, que se adquirió de Exiqon Inc. (Woburn, MA), y PNA, que se adquirió de PNA Bio (Thousand Oaks, CA).

Tabla 19. Cebadores para la metilación por PCR-LDR-qPCR.

Nombre del cebador	Etapa	Secuencia de Cebador
iCDx-2031-Vim-S3-FP	PCR	GAACTCCAACCGAAACTACGTAArCTACA/3SpC 3/ (SEQ ID NO: 31)
iCDx-2032A-Vim-S3-RP	PCR	GGTGTCGTGGACGAGGCGTAGAGGTTGCrGGT TA/3SpC/ (SEQ ID NO: 32)
VIM-S3-LNA1	PCR	CA+TAA+CT+AC+AT+CC+AC+CCA (SEQ ID NO: 33)
VIM-S3-LNA2	PCR	CA+TAA+CT+AC+AT+C+C+AC+CCA (SEQ ID NO: 34)
VIM-S3-PNA2	PCR	ACATAACTACATCCACCCA (SEQ ID NO: 35)
iCDx-2033A-Vim-S3-Up	LDR	TAGACACGAGCGAGGTCACAACTCCAACCGAA ACTACGTAACTGCGrUCCGT/3SpC3/ (SEQ ID NO: 36)
iCDx-2034A-Vim-S3-Dn	LDR	/5Phos/TCCACCCGCACCTACAACCTAAACAACG CGTGCAAAATTCAGGCTGTGCA (SEQ ID NO: 37)
iCDx-2035A-Vim-S3-RT-Pb	qPCR	TAACTGCGTCCACCCGCACCTAC (SEQ ID NO: 38)
iCDx-2036-Vim-S3-RT-FP	qPCR	TAGACACGAGCGAGGTCAC (SEQ ID NO: 39)
iCDx-2037-Vim-S3-RT-RP	qPCR	TGCACAGCCTGAATTTTGCAC (SEQ ID NO: 40)
/5SpC3/ - Separador C3 en 5', /3SpC3/ - Separador C3 en 3', /5Phos/ - 5' Fosfato, /56-FAM/ - Colorante Fluorescente Fam en 5', /5HEX/ - Colorante Fluorescente HEX™, /ZEN/ - ZEN™ Flourescent Quencher™, /3IABkFQ/ - Inactivador Fluorescente Iowa Black ® en 3', gama espectral verde a rosa, "+" - Base de ácido nucleico bloqueada, "rA" - base de ribonucleótido riboadenosina; "rT" - base de ribonucleótido ribotimidina; "rG" - base de ribonucleótido riboguanosina; "rC" - base de ribonucleótido ribocitosina		

Experimentos PCR-LDR-qPCR. Se llevó a cabo la etapa de la PCR en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 2 µl de tampón Gotaq Flexi 5X sin magnesio (Promega, Madison, WI), 0,8 µl de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega, Madison, WI), 0,2 µl de dNTP (con dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 10 mM cada uno) (Promega, Madison, WI), 0,25 µl del cebador directo iCDx-2031-Vim-S3-FP a 2 µM, 0,25 µl del cebador inverso iCDx-2032A-Vim-S3-RP a 2 µM, 1,25 µl del cebador de bloqueo VIM-S3-LNA o VIM-S3-PNA2 a 2 µM, 0,25 µl de ARNasaH2 (IDT) a 20 mU/µl (diluido en tampón de dilución ARNseH2 de IDT), y 0,22 µl de polimerasa Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) mezclado con Platinum Taq Antibody (Invitrogen/Thermo Fisher, Carlsbad, CA) (la mezcla se preparó añadiendo 0,02 µl de polimerasa Klentaq1 de 50 U/µl a 0,2 µl de Platinum Taq Antibody a 5 U/µl), y 4,78 µl del molde correspondiente que contenía 35 ng de ADN genómico. Los moldes fueron: LS-174T, HCT-15, HT-29, WiDr, SW1116, y ADN genómico humano de Roche. Las reacciones de la PCR se realizaron en un sistema termociclador PCR ProFlex (Applied Biosystems/ThermoFisher, Waltham, Ma) y se ejecutaron con el siguiente programa: 2 min a 95 °C, 40 ciclos de (10 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C), 10 min a 99,5 °C, y un mantenimiento final a 4 °C.

Se llevó a cabo la etapa de la LDR en una reacción de 10 µl preparada añadiendo: 5,82 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 1 µl de tampón de reacción de ligasa 10X AK16D [1X tampón contiene Tris-HCl 20 mM pH 8,5 (Bio-Rad, Hercules, CA), $MgCl_2$ 5 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), KCl 50 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo), DTT 10 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) y 20 ug/ml de BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo)], 0,25 µl de DTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) a 40 mM, 0,25 µl de NAD^+ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) a 40 mM, 0,25 µl de ARNsaH2 (IDT) a 20 mU/µl, 0,2 µl de cebador iCDx-2033A-Vim-S3-Up a 500 nM, 0,2 µl de cebador iCDx-2034A-Vim-S3-Dn a 500 nM, 0,028 µl de ligasa AK16D purificada a 8,8 µM, y 2 µl de reacción de la PCR. Las reacciones de la LDR se realizaron en un sistema termociclador PCR ProFlex (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma) y el siguiente programa: 20 ciclos de (10 s a 94 °C, y 4 min a 60 °C) seguido por un mantenimiento final 4 °C.

La etapa de la qPCR se llevó a cabo en una mezcla de reacción de 10 µl preparada añadiendo: 1,5 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 5 µl de mezcla maestra de la PCR 2X TaqMan® Fast Universal (amplitaq rápida, UDG y dUTP) de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), 1 µl del cebador directo iCDx-2036-Vim-S3-RT-FP a 2,5 µM, 1 µl del cebador inverso iCDx-2037-Vim-S3-RT-RP a 2,5 µM, 0,5 µl de sonda iCDx-2035A-Vim-S3-RT-Pb Taqman a 5 µM, y 1 µl de productos de reacción de la LDR. Las reacciones qPCR en un termociclador ViiA7 en tiempo real de Applied Biosystems (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), utilizando placas de reacción de 96 pocillos MicroAmp® Fast de 0,1 ml con película adhesiva óptica MicroAmp™ (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma), y la siguiente configuración: bloqueo rápido, Curva patrón según tipo de experimento, ROX como referencia pasiva, Ct como método de cuantificación (umbral automático, pero ajustado a 0,05 cuando sea necesario), TAMRA como indicador y NFQ-MGB como inactivador; y usando el siguiente programa: 2 min a 50 °C, y 40 ciclos de (1 s a 95 °C, y 20 s a 60 °C). Los resultados se muestran en la Figura 173 y la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados de los experimentos para detectar la metilación en ADN genómico de una línea de células.

Moldes	Equivalentes de genoma iniciales (por 10 µl de PCR)	Ct	Diferencia de Ct frente a 10000 GE de hgADN de Roche
LS-174T	10.000	28,5	10,1
HCT-15	10.000	20,2	18,6
HT-29	10.000	20,4	18,2
WiDr	10.000	20,3	18,3
SW1116	10.000	UD	0
ADN de Roche	10.000	38,6	0

Experimentos de píxel. Se llevó a cabo la etapa de la PCR en una mezcla de 130 µl preparada añadiendo: 59,14 µl de agua exenta de nucleasa (IDT), 26 µl de tampón Gotaq Flexi 5X sin magnesio (Promega, Madison, WI), 10,4 µl de $MgCl_2$ a 25 mM (Promega, Madison, WI), 2,6 µl de dNTP (con dATP, dCTP, dGTP y dUTP, 10 mM cada uno) (Promega, Madison, WI), 3,25 µl de cebador directo iCDx-2031-VIM-S3-FP en 2 µM, 3,25 µl de cebador inverso iCDx-2032-VIM-S3-PR a 2 µM, 16,25 µl de cebador de bloqueo iCDx-VIM-S3-LNA2 a 2 µM, 3,25 µl de ARNAsaH2 (IDT) a 20 mU/µl (diluido en tampón de dilución ARNAsaH2 a partir de IDT), 2,6 µl de Antarctic thermolabile UDG (New England Biolabs (NEB), Ipswich, MA) en 1 U/µl, y 2,86 µl de polimerasa Klentaq1 (DNA Polymerase Technology, St. Louis, MO) mezclada con Platinum Taq Antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA) (la mezcla se preparó añadiendo 0,3 µl de polimerasa Klentaq1 de 50 U/µl a 3 µl de Platinum Taq Antibody a 5 U/µl), y 3 µl del molde correspondiente. 3 µl de moldes contienen: (1) 0,070 ng (20 GE) de ADN de HT-29 mezclados con 9 ng (2500 GE) de ADNhg de Roche. (2) 0,035 ng (10 GE) de ADN de la línea de células HT-29 mezclados con 9 ng (2500 GE) de ADNhg de Roche. (3) 9 ng (2500 GE) de ADN de Roche, (4) agua exenta de nucleasa para el control sin molde (NTC).

Cada 130 µl de mezcla de la PCR se dividieron en 12 tubos, 10 µl cada uno, y a continuación las reacciones de la PCR se realizaron en un sistema termociclador PCR ProFlex (Applied Biosystems/ThermoFisher; Waltham, Ma) y el siguiente programa: 2 min a 95 °C, 40 ciclos de (10 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 30 s a 72 °C), 10 min a 99,5 °C, y un mantenimiento final a 4 °C. Las etapas de la LDR y la qPCR posteriores se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 174 y la Tabla 25.

Se repitió el procedimiento de la PCR-LDR-qPCR para la detección de la metilación en las hebras superior e inferior de VIM-S3 como se ha descrito anteriormente usando una versión modificada de las sondas de LDR y las sondas Taqman (es decir, la versión B). Se muestra una comparación de los resultados para la detección de la metilación en los gráficos de amplificación de las Figuras 175-178. La Figura 175 proporciona los gráficos de la PCR en tiempo real para el Aden de la línea de células y el ADN natural (Roche) usando el diseño del cebador de la hebra superior de VIM-S3 y la versión "A" de Taqman (Tabla 21). Los resultados muestran un valor de Ct de aproximadamente 10 y 11,5 para el ADN de las líneas de células WiDr y HT-29 respectivamente, indicando la metilación en el sitio S3 en la región del promotor VIM. Las líneas de células SW1116, el ADN de Roche, el control sin molde (NTC) para la etapa inicial de la PCR, la etapa siguiente de la LDR, y la etapa final de Taqman están todas en una línea de bases (es decir, uniforme). Se repitió el mismo experimento usando sondas de la versión "A" diseñadas para la hebra inferior (Figura 176 y Tabla 22). Como se esperaba, los resultados muestran un valor de Ct de aproximadamente 11 y 9 para el ADN de las líneas de células WiDr y HT-29 respectivamente, indicando la metilación en el sitio S3 en la región del promotor VIM. Sin embargo, los resultados con SW1116, ADN de Roche, el control sin molde (NTC) para la etapa inicial de la PCR, y NTC para la etapa siguiente de la LDR al proporcionar valores de Ct de alrededor de 28,5 a 31, incluso aunque los inventores saben del experimento anterior que no existe metilación en el sitio S3 en la región del promotor VIM. Esta discrepancia se resolvió diseñando las sondas Taqman para solapar la porción de la sonda anterior del producto de la LDR en aproximadamente 9 bases, y la porción de la sonda posterior de la LDR del producto de la LDR mediante las bases restantes en la sonda. Además, se añadieron dos bases no complementarias en el lado 5' a la sonda Taqman para asegurar que cualquier extensión accidental de la polimerasa cruzada no sería capaz de extenderse sobre la sonda LDR anterior en un ciclo posterior. La Figura 177 proporciona gráficos de la PCR en tiempo real para el ADN de la línea de células y el ADN natural (Roche) usando el diseño del cebador de la hebra superior de WIM-S3 y la versión "B" de la sonda Taqman (Tabla 23). Los resultados muestran un valor de Ct de aproximadamente 12 y 13,5 para el ADN de las líneas de células WiDr y HT-29, respectivamente, indicando la metilación en el sitio S3 en la región del promotor VIM. Las líneas de células SW1116, el ADN de Roche, el control sin molde (NTC) para la etapa inicial de la PCR, la etapa siguiente de la LDR, y la etapa final de Taqman están en línea de bases (es decir, uniforme). Se repitió el mismo experimento usando las sondas de la versión "B" diseñadas para la hebra inferior (Figura 178 y Tabla 24). Como se esperaba, los resultados muestran un valor de Ct de aproximadamente 11,5 y 9,5 para el ADN de las líneas de células WiDr y HT-29, respectivamente, indicando la metilación en el sitio S3, en la región del promotor VIM. Ahora, los resultados con las líneas de células, SW1116, el ADN de Roche, el control sin el molde (NTC) para la etapa inicial de la PCR, la etapa siguiente de la LDR, y la etapa final de Taqman están en una línea de bases (es decir, uniforme), indicando que la versión "B" del nuevo diseño de la sonda resolvió el problema de las señales falsa de NTC o las muestras sin metilación en la región del sitio 3 de VIM.

Tabla 21 Cebadores de metilación para la hebra superior de VIM S3 utilizando la versión "A" de la sonda Taqman

Tipo de cebador	Nombre del cebador	Secuencias
PCR	iCDx_2031	GAACTCCAACCGAAACTACGTAArCTACA/3SpC3/ (SEQ ID NO: 31)
PCR	iCDx_2032	GGTGTCGTGGACGAGGCGTAGAGGTTGCrGGTTA/3SpC3/ (SEQ ID NO: 32)
LDR	iCDx_2033A	TAGACACGAGCGAGGTCACAACTCCAACCGAAACTACGTA ACTGCGrUCCGT/3SpC3/ (SEQ ID NO: 36)
LDR	iCDx_2034	/5Phos/TCCACCCGCACCTACAACCTAAACAACGCGTGCAA A ATTCAGGCTGTGCA (SEQ ID NO: 37)
Sonda Taqman	iCDx_2035	/5HEX/TAACTGCGT/ZEN/CCACCCGCACCTAC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 38)
Cebador Taqman	iCDx_2036	TAGACACGAGCGAGGTCAC (SEQ ID NO: 39)
Cebador Taqman	iCDx_2037	TGCACAGCCTGAATTTTGCAC (SEQ ID NO: 40)
Bloqueante de la PCR	VIM-S3-LNA2	CA+TAA+CT+AC+AT+C+C+AC+CCA (SEQ ID NO: 34)
/5SpC3/ - Separador C3 en 5', /3SpC3/ - Separador C3 en 3', /5Phos/ - 5' Fosfato, /56-FAM/ - Colorante Fluorescente Fam en 5', /5HEX/ - Colorante Fluorescente HEX™, /ZEN/ - ZEN™ Flourescent Quencher™, /3IABkFQ/ - Inactivador Fluorescente Iowa Black ® en 3', gama espectral verde a rosa, "+" - Base de ácido nucleico bloqueada, "rA" - base de ribonucleótido riboadenosina; "rT" - base de ribonucleótido ribotimidina; "rG" - base de ribonucleótido riboguanosina; "rC" - base de ribonucleótido ribocitosina		

Tabla 22 Cebadores de metilación para la hebra inferior de VIM S3 utilizando la versión "A" de la sonda Taqman

Tipo de cebador	Nombre del cebador	Secuencias
PCR	iCDx_2081	GTCGAGTTTTAGTCGGAGTTACGTGrATTAA/3SpC3/ (SEQ ID NO: 92)
PCR	iCDx_2082	GGTGTCGTGGGAAAACGAAACGTAAAAACTACGACTAArUA CTG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 93)
LDR	iCDx_2083	TGGATCGAGACGGAATGCAACCGAGTTTTAGTCGGAGTTAC GTGATCACrGTTCG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 94)
LDR	iCDx_2084	/5Phos/GTTTATTCGTATTTATAGTTTGGGTAGCGCGTTGCGGTTTCCCTGATTGAT ACCCGCA (SEQ ID NO: 98)
Sonda Taqman	iCLx_2083	/5HEX/AGTCGGAGT/ZEN/TACGTGATCACGTTTATTCGTATT TATAG/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 101)
Cebador Taqman	iCDx_2086	TGGATCGAGACGGAATGCAAC (SEQ ID NO: 102)
Cebador Taqman	iCDx_2087	TGCGGGTATCAATCAGGGAAAC (SEQ ID NO: 103)
Bloqueante de la PCR	iCDx_2088	GTT+A+T+GT+G+ATT+A+T+GT+TT+AT+T+T+GT+ATTT (SEQ ID NO: 104)
/5SpC3/ - Separador C3 en 5', /3SpC3/ - Separador C3 en 3', /5Phos/ - 5' Fosfato, /56-FAM/ - Colorante Fluorescente Fam en 5', /5HEX/ - Colorante Fluorescente HEX™, /ZEN/ - ZEN™ Flourescent Quencher™, /3IABkFQ/ - Inactivador fluorescente Iowa Black® en 3', gama espectral verde a rosa, "+" - Base de ácido nucleico bloqueada, "rA" - base de ribonucleótido riboadenosina; "rT" - base de ribonucleótido ribotimidina; "rG" - base de ribonucleótido riboguanosina; "rC" - base de ribonucleótido ribocitosina		

Tabla 23 Cebadores de metilación para la hebra superior de VIM S3 utilizando la versión "B" de la sonda Taqman

Tipo de cebador	Nombre del cebador	
PCR	iCDx_2031	GAACTCCAACCGAAACTACGTAArCTACA/3SpC3/ (SEQ ID NO: 31)
PCR	iCDx_2032	GGTGTCGTGGACGAGGCGTAGAGGTTGCrGGTTA/3S pC3/(SEQ ID NO: 32)
LDR	iCDx_2033A	TAGACACGAGCGAGGTCACAACTCCAACCGAAACTAC GTAACTGCGrUCCGT/3SpC3/ (SEQ ID NO: 36)
LDR	iCDx_2034	/5Phos/TCCACCCGCACCTACAACCTAAACAACGCGTGCAAAATTCAGGCTGTGC A (SEQ ID NO: 37)
Sonda Taqman	iCDx_2035B	/5HEX/TTTAACTGC/ZEN/GTCCACCCGCACCTAC/31ABkFQ/ (SEQ ID NO: 44)
Cebador Taqman	iCDx_2036	TAGACACGAGCGAGGTCAC (SEQ ID NO: 39)
Cebador Taqman	iCDx_2037	TGCACAGCCTGAATTTTGCAC (SEQ ID NO: 40)
Bloqueante de la PCR	VIM-S3-LNA2	CA+TAA+CT+AC+AT+C+C+AC+CCA (SEQ ID NO:34)
/5SpC3/ - Separador C3 en 5', /3SpC3/ - Separador C3 en 3', /5Phos/ - 5' Fosfato, /56-FAM/ - Colorante Fluorescente Fam en 5', /5HEX/ - Colorante Fluorescente HEX™, /ZEN/ - ZEN™ Flourescent Quencher™, /3IABkFQ/ - Inactivador Fluorescente Iowa Black ® en 3', gama espectral verde a rosa, "+" - Base de ácido nucleico bloqueada, "rA" - base de ribonucleótido riboadenosina; "rT" - base de ribonucleótido ribotimidina; "rG" - base de ribonucleótido riboguanosina; "rC" - base de ribonucleótido ribocitosina		

Tabla 24 Cebadores de metilación para la hebra inferior de VIM S3 utilizando la versión "B" de la sonda Taqman

Tipo de cebador	Nombre del cebador	Secuencias
PCR	iCDx_2081	GTCGAGTTTTAGTCGGAGTTACGTGrATTAA/3SpC3 / (SEQ ID NO: 92)
PCR	iCDx_2082	GGTGTCGTGGGAAAACGAAACGTAAAAACTACGAC TAArUACTG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 93)
LDR	iCDx_2083	TGGATCGAGACGGAATGCAACCGAGTTTTAGTCGG AGTTACGTGATCACrGTTCG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 94)
LDR	iCDx_2084	/5Phos/GTTTATTCGTATTTATAGTTTGGGTAGCGCGTTGCGGTTTCCCTGATTGAT ACCCGCA (SEQ ID NO: 98)
Sonda Taqman	iCDx_2085 B	/5HEX/TTTGATCAC/ZEN/GTTTATTCGTATTTATAGTTTGGGTAGCGC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 99)
Cebador Taqman	iCDx_2086	TGGATCGAGACGGAATGCAAC (SEQ ID NO: 102)
Cebador Taqman	iCDx_2087	TGCGGGTATCAATCAGGGAAAC (SEQ ID NO: 103)
Bloqueante de la PCR	iCDx_2088	GTT+A+T+GT+G+ATT+A+T+GT+TT+AT+T+T+GT+AT TT (SEQ ID NO: 104)
/5SpC3/ - Separador C3 en 5', /3SpC3/ - Separador C3 en 3', /5Phos/ - 5' Fosfato, /56-FAM/ - Colorante Fluorescente Fam en 5', /5HEX/ - Colorante Fluorescente HEX™, /ZEN/ - ZEN™ Flourescent Quencher™, /3IABkFQ/ - Inactivador fluorescente Iowa Black® en 3', gama espectral verde a rosa, "+" - Base de ácido nucleico bloqueada, "rA" - base de ribonucleótido riboadenosina; "rT" - base de ribonucleótido ribotimidina; "rG" - base de ribonucleótido riboguanosina; "rC" - base de ribonucleótido ribocitosina		

Tabla 25. Resultado de los experimentos de píxel para detectar metilación del ADN de HT-29 en ADNhg de Roche.

Moldes	GE por 130 µl de PCR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Amplificaciones totales
HT-29+ ADNhg de Roche	20 GE (Met) + 2500 GE (wt)	21,5	17,5	14,5	16,0	15,9	14,4	15,0	14,5	14,3	14,2	16,1	13,5	12
HT-29+ ADNhg de Roche	10 GE (Met) + 2500 GE (wt)	UD	15,2	UD	16,2	UD	15,8	16,3	UD	20,3	16,1	UD	UD	6
ADNhg de Roche	2500 GE (wt)	UD	UD	UD	UD	UD	38,5	UD	36,8	UD	UD	37,6	36,6	0
NTC	0	UD	37,6	UD	37,9	38,3	UD	UD	UD	36,8	38,0	39,5	UD	0

Ejemplo empírico 6 - Diseño de cebador para detección de la metilación y mutaciones

Se llevó a cabo el diseño del ensayo de metilación llevando a cabo en primer lugar el análisis informático de la secuencia del ADN genómico de la Vimentina (VIM) y de los genes TMEM90B para identificar posibles sitios de CG altamente metilados. Tras el análisis informático y la identificación de múltiples sitios de metilación, se seleccionaron tres a cuatro sitios en cada gen para el desarrollo de la prueba. Para ayudar en el desarrollo de la prueba, se llevó a cabo una conversión informatizada con bisulfito del ADN genómico convertido con bisulfito de los respectivos genes. Esto se lleva a cabo tanto para la hebra superior como para la inferior para diseñar oligonucleótidos que no están incluidos en las secuencias convertidas con bisulfito esperadas. Se llevó a cabo la conversión informatizada de la hebra superior convirtiendo las bases G que no siguen una base 5'C inmediata en bases A (Conversión de G-A para todas las G que no son CG) y para la hebra inferior que se convierte en una base C próxima a una base 3'G inmediata en bases T (conversión de C-T para todas las bases C que no son CG). Los criterios de diseño para el ensayo de ligadura comienzan identificando la base discriminante que es tanto la C metilada como la G adyacente (en la que la C de la hebra complementaria está metilada), como la identificación de numerosos rasgos adicionales de la secuencia que ayudarían a los criterios de diseño de los inventores, incluyendo evitar secuencias con muy poco contenido de GC tras la conversión con el bisulfito. Una vez que se han seleccionado los sitios metilados para el desarrollo del ensayo, se evalúa el mismo sitio en las hebras superior e inferior. Se utilizó una estrategia en cuatro etapas para diseñar oligonucleótidos para este ensayo. La primera etapa es diseñar los oligonucleótidos en dirección 5' y 3' para la reacción de detección de la ligasa (LDR). En segundo lugar, diseñar un oligonucleótido directo e inverso específicos de gen para cubrir el sitio de la LDR y los oligonucleótidos de la LDR con un amplicón específico de gen con de 100 a 140 bases de longitud total. Tercera, diseñar las sondas marcadas con colorante fluorescente (FAM y HEX™) que cubren el sitio de ligadura y se unen específicamente al producto de la LDR ligado. Y la etapa final es diseñar una sonda de un ácido nucleico boqueado WT (LNA™) correspondiente para bloquear la amplificación de la región del promotor sin metilar tratada con bisulfito.

…AGCCGGCCGAGCTCCAGCCGGAGCTACGTGACTACGTCCACCCGCACCTACAG

CCTGGGCAGCGCGCTGCGCCCCAGCACCAGCCGCAGCCTCTACGCCTCGTCCCCG

GGCGGCGTGTATGCCACGCGCTCCTCTGC... (SEQ ID NO: 137)

…AACCGACCGAACTCCAACCGAAACTACGTAACTA**CG**TCCACCCGCACCTACAACC

TAAACAACGCGCTACGCCCCAACACCAACCGCAACCTCTACGCCTCGTCCCCGAAC

GACGTATATACCACGCGCTCCTCTAC...(SEQ ID NO: 131)

La secuencia genómica del sitio 3 (S3) de VIM superior antes de la conversión con bisulfito y después de la conversión con bisulfito. (Los nucleótidos en negrita de color rojo) representan el sitio S3 de la metilación)

Las sondas de oligonucleótidos de la LDR en dirección 5' (Up) se diseñan con una T_m de 64-66 °C, siendo el extremo 3' en la base discriminante de interés tanto C como G en la CG metilada. Una vez que se selecciona la secuencia del cebador y en el intervalo de T_m requerido, se utiliza una técnica de extensión no específica del bloqueo, basada en el método de escisión con RNaseH2™de IDT (Coralville, la) para añadir una base de ARN complementaria inmediata al lado 3' de la base discriminante seguido por dos bases de ADN emparejadas en la segunda y tercera posición y las dos bases de ADN emparejadas incorrectamente (preferentemente, cualquiera de los emparejamientos incorrectos G-T o A-C) en la cuarta y quinta (o la tercera y quinta) posiciones, seguido por la adición de un separador C3 en 3'. La cola de cinco bases general y el separador se usan para bloquear la extensión no específica desactivada de la sonda LDR anterior. Para la sonda de oligonucleótidos de LDR en dirección 5', se utiliza también un emparejamiento incorrecto adicional (preferentemente cualquier emparejamiento incorrecto de G-T o A-C) en la posición adyacente, segunda, o tercera del lado 5' de la base discriminante. Las modificaciones adicionales incluyen un separador C3 en 5' para bloquear la digestión de la exonucleasa lambda de los productos de los productos de ligadura. Tras la selección y la modificación del oligonucleótido en dirección 5', se añadió una secuencia marcadora correspondiente a un oligonucleótido directo para un experimente posterior de PCR en tiempo real al lado 5' de la secuencia. Las secuencias marcadoras se seleccionan de una lista de parejas de cebadores directos e inversos de oligonucleótidos de la qPCR que se diseñaron anteriormente.

Secuencia de la sonda LDR en dirección 5':
AACTCCAACCGAAACTACGTAACT**G**CGrUCC**gt**/3SpC3/ (SEQ ID NO: 132)

Secuencia marcadora en 5' + Secuencia de la sonda LDR en dirección 5':
TAGACACGAGCGAGGTCACAACTCCAACCGAAACTACGTAACT**G**CGrUCC**gt**/3SpC3 / (SEQ ID NO: 133)

Secuencia marcadora en 5' + Secuencia de la sonda LDR en dirección 5' con el Separador en 5' y un emparejamiento incorrecto en la cuarta y quinta posiciones de escisión:

/5SpC3/TAGACACGAGCGAGGTCACAACTCCAACCGAAACTACGTAACT**G**CGrUCCgt/

3SpC3/ (SEQ ID NO: 36)

Secuencia marcadora en 5' + Secuencia de la sonda LDR en dirección 5' con el Separador en 5' y un emparejamiento incorrecto en la tercera y quinta posiciones de escisión:

/5SpC3/TAGACACGAGCGAGGTCACAACTCCAACCGAAACTACGTAACT**G**CGrUC**t**A**t**/

3SpC3/ (SEQ ID NO: 42)

Cebador directo de la qPCR: 5'- TAGACACGAGCGAGGTCAC 3' (SEQ ID NO: 39)

…AACCGACCG**AACTCCAACCGAAACTACGTAACTaCG**TCCACCCGCACCTACAAC

CTAAACAACGCGCTACGCCCCAACACCAACCGCAACCTCTACGCCTCGTCCCCGAAC

GACGTATATACCACGCGCTCCTCTAC... (SEQ ID NO: 131)

ADN genómico convertido con bisulfito en VIM S3-localización de la LDR en dirección 5' en negrita, emparejamiento incorrecto en la tercera posición de un sitio "a" minúscula, y el sitio de escisión del ARN subrayado.

Se diseñó la sonda de oligonucleótidos LDR en dirección 3' (Dn) en la base inmediatamente siguiente del lado 3' de la base discriminante. Las sondas de oligonucleótidos se diseñaron con una T_m de 70-72 °C grados. Al igual que la sonda en dirección 5', se añadió una secuencia marcadora seleccionada al extremo 3' de la secuencia. Las modificaciones adicionales realizadas para el diseño implican la adición de un emparejamiento incorrecto en la cuarta posición más cercana al lado 5' y la inclusión de bases emparejadas incorrectamente adicionales en el extremo 3' en el oligonucleótido correcto antes de la secuencia marcadora en tiempo real.

Secuencia de la sonda LDR en dirección 3': /5Phos/TCCACCCGCACCTACAACCTAAACAACGC (SEQ ID NO: 134)

Sonda de la LDR en dirección 3' + Secuencia del cebador marcador complementario en 3':
/5Phos/TCCACCCGCACCTACAACCTAAACAACGC**GTGCAAAATTCAGGCTGTGCA** (SEQ ID NO: 37)

Oligonucleótidos en dirección 3' con emparejamiento incorrecto en la cuarta posición y bases adicionales que separan la secuencia genómica tratada con bisulfito de la secuencia de la qPCR:

/5Phos/TCC**a**CCCGCACCTACAACCTAAACAACGC**GCT**GTGCAAAATTCAGGCTGTGCA (SEQ ID NO: 135)

Cebador inverso de la qPCR: 5'-TGCACAGCCTGAATTTTGCAC -3' (SEQ ID NO: 40)

…AACCGACCGAACTCCAACCGAAACTACGTAACTACG**TCCACCCGCACCTACAAC**

CTAAACAACGCGCTACGCCCCAACACCAACCGCAACCTCTACGCCTCGTCCCCGAA

CGACGTATATACCACGCGCTCCTCTAC... (SEQ ID NO: 131)

ADN genómico convertido con bisulfito en 55 VIM S3-Localización de la LDR en dirección 3' (Dn) en negrita, el sitio CG de metilación está subrayado

Se diseñaron cebadores de oligonucleótidos directos (FP) e inversos (RP) específicos de gen inmediatamente en

dirección 5' de las sondas de oligonucleótidos LDR con un solapamiento significativo de la sonda de oligonucleótidos LDR en dirección 5' con una longitud de amplicón total de aproximadamente 100-140 bases. Los cebadores de oligonucleótidos directo e inverso específicos de gen se diseñaron con una T_m de 62-64 °C. El cebador inverso se diseñó adicionalmente en dirección 3' y sin solapamiento de la sonda de oligonucleótidos LDR Dn, para incorporar sitios de restricción CGCG adicionales cuando estén presentes para discriminación adicional de sitios metilados. Preferentemente, uno o más sitios de restricción Bsh1236I (CGCG) están presentes en el ADN diana para permitir una escisión opcional de un ADN sin metilar antes de la conversión con bisulfito. Opcionalmente, el cebador inverso tiene una cola no específica de 10 bases añadida al extremo 5' para evitar la formación del cebador-dímero con los otros cebadores inversos. Los cebadores tanto directo como inverso utilizan también el artificio de escisión del ARN en el extremo 3' del cebador, pero, a diferencia de las sondas de oligonucleótidos de la LDR, los cebadores solo tienen un emparejamiento incorrecto en el extremo 3' adyacente al grupo bloqueante.

Cebador directo: 5'-GAACTCCAACCGAAACTACGTAArCTACa/3SpC3/ (SEQ ID NO: 31)

Cebador inverso: 5'-ACGAGGCGTAGAGGTTGCrGGTTa/3SpC3/ (SEQ ID NO: 136)

Cebador inverso + Cola de 10 bases
5' **GGTGTCGTGG**ACGAGGCGTAGAGGTTGCrGGTT**A**/3SpC3/ (SEQ ID NO: 32)

Cebador directo e inverso que contiene una base con emparejamiento incorrecto (minúscula y negrita) en la porción de escisión del ARN del cebador

…AACCGACC**GAACTCCAACCGAAACTACGTAA**CTACGTCCACCCGCACCTACAAC

CTAAACAACGCGCTACGCCCCAACACCAACC**GCAACCTCTACGCCTCGT**CCCCGA

ACGACGTATATACCACGCGCTCCTCTAC...(SEQ ID NO: 131)

ADN genómico convertido con bisulfito en VIMS3-Cebadores directo (FP) es inverso (RP) específicos de gen en negrita, se alargó el sitio CG de metilación, las regiones del sitio de escisión del ARN están subrayadas

De los tres a cuatro sitios identificados en el anterior análisis, se seleccionaron dos sitios para el desarrollo del ensayo tanto en la hebra superior como en la hebra inferior. Para diferenciar entre los dos sitios, se diseñaron sondas en tiempo real específicas de hebra para cubrir el producto de ligadura con sondas FAM o 5' HEX™ marcadas en 5' específicas de sitio. Se diseñaron sondas en tiempo real diseñadas para incorporar el emparejamiento incorrecto en la tercera posición que se incorporó en la sonda LDR en dirección 5' en el lado 5' de la base discriminante, y se diseñó una sonda adicional para cubrir el emparejamiento incorrecto en 5' y el emparejamiento incorrecto opcional en la cuarta posición en el lado 3' de la base discriminante en la sonda en dirección 3'. Se diseñaron las T_m de las sondas para 68-70 °C. Inicialmente, se diseñaron las sondas para tener una cobertura igual de los lados 5' y 3' del sitio de ligadura, pero se diseñaron sondas adicionales con un sesgo de cobertura de 1/3 en el lado (5') seguido por 2/3 en el lado en dirección 3' (3') del sitio de ligadura, que tenía en la mayoría de casos 7 bases en dirección 5' y 15 bases en dirección 3' del sitio de ligadura para la mayoría de las sondas. Para evitar problemas con una fluorescencia baja del colorante FAM cuando se acopla a una base G, se diseñaron todas las sondas evitando una base G en su primera base en su primera base en 5' de tal manera que los colorantes se pueden intercambiar según sea necesario sin necesidad de modificación de la secuencia. Las modificaciones adicionales implican la adición de emparejamientos incorrectos inmediatamente después del colorante fluorescente. Se sintetizaron las sondas a partir de IDT y utilizan un inactivador de nueve bases ZEN™ (IDT) desde el lado 5', y un inactivador fluorescente Iowa Black® FQ (IDT) en el extremo 3'.

Sonda en tiempo real con emparejamiento incorrecto en la tercera posición del emparejamiento (negrita):
/5HEX/TAACTGCGT/ZEN/CCACCCGCACCTAC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 38)

Sonda en tiempo real con emparejamiento incorrecto en la tercera posición del emparejamiento (negrita) y dos bases adicionales:

/5HEX/ttTAACT**G**C/ZEN/GTCCACCCGCACCTAC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 44)

/5HEX/ttTAACT**G**C/ZEN/GTCC**G**CCCGCACCTAC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 45)

…AACCGACCGAACTCCAACCGAAACTACG**TAACTaCGTCCACCCGCACCTAC**AAC

CTAAACAACGCGCTACGCCCCAACACCAACCGCAACCTCTACGCCTCGTCCCCGAAC

GACGTATATACCACGCGCTCCTCTAC...(SEQ ID NO: 131)

ADN genómico convertido con bisulfito en VIM S3-Sitio de la sonda en tiempo real, sitio "a" minúscula con emparejamiento incorrecto en la tercera posición en dirección 5' y sitio A subrayado del emparejamiento incorrecto en la cuarta posición en dirección 3'

Se diseñaron cebadores bloqueantes para el ácido nucleico bloqueado (LNA™) para reducir la amplificación de la diana sin metilar tratada con bisulfito, teniendo una sonda de LNA perfectamente emparejada que se une a la diana sin metilar tratada con bisulfito y utilizando 5-10 bases bloqueadas (LNA) para evitar la amplificación. Las sondas de bloqueo de LNA, se sintetizaron por Exiqon (Woburn, Ma) con una T_m de 72-75 °C.

Tabla 26. Lista de oligonucleótidos de detección de la metilación

iCDx-2031-VIM-S3-FP,G AACTCCAACCGAAACTACGTAArCTACA/3SpC3/ (SEQ ID NO. 31)	Oligonucleótido directo de amplificación por PCR
iCDx-2032A-VIM-S3-RP,GGTGTCGTGGACGAGGCGTAGAGGTTGCrGGTTA/3 SpC3/ (SEQ ID NO. 32)	Oligonucleótido inverso de la amplificación por PCR
iCDx-2033A-VIM-S3-Up,**TAGACACGAGCGAGGTCAC**AACTCCAACCGAAACTACGTAACT**G**CGrUCC**GT**/3SpC3/ (SEQ ID NO. 36)	Oligonucleótido de LDR en dirección 5' con emparejamiento incorrecto en la tercera posición y emparejamientos incorrectos en los sitios de escisión 4º y 5º (negrita)
iCDx-2033B-VIM-S3-Up,/5SpC3/**TAGACACGAGCGAGGTC**ACAACTCCAACC GAAACTACGTAACT**G**CGrUCC**GT**/3SpC3/ (SEQ ID NO. 41)	Oligonucleótido de LDR en dirección 5' con emparejamientos incorrectos en la tercera posición y en el sitio de escisión en la posición 4ª y 5ª (negrita) y el Separador C3 en 5'
iCDx-2033D-VIM-S3-Up,/5SpC3/**TAGACACGAGCGAGGTC**ACAACTCCAACC GAAACTACGTAACT**G**CGrUC**T**A**T**/3SpC3/ (SEQ ID NO. 42)	Oligonucleótido de LDR en dirección 5' con emparejamientos incorrectos en la tercera posición y en el sitio de escisión en la tercera y la quinta (negrita) y el Separador C3 en 5'
iCDx-2034A-VIM-S3-Dn,/5Phos/TCCACCCGCACCTACAACCTAAACAACGCG TGCAAAATTCAGGCTGTGCA (SEQ ID NO. 37)	Oligonucleótido de LDR en dirección 3'
iCDx-2034D-VIM-S3-Dn,/5Phos/TCCGCCCGCACCTACAACCTAAACAACGCGCTGTGCAAAATT CAGG CTGTG C A (SEQ ID NO. 43)	Oligonucleótido de LDR en dirección 3' con emparejamiento incorrecto en la cuarta posición (negrita)
iCDx-2035A-VIM-S3-RT-Pb, /5HEX/TAACT**G**CGT/ZEN/CCACCCGCACCTAC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 38)	Sonda en tiempo real con emparejamiento incorrecto en la tercera posición del emparejamiento (negrita)
iCDx-2035B-VIM-S3-RT-Pb, /5HEX/ttTAACTGC/ZEN/GTCCACCCGCACCTAC/3IABk FQ/ (SEQ ID NO. 44)	Sonda en tiempo real con emparejamiento incorrecto en la tercera posición del emparejamiento (negrita) y emparejamientos incorrectos presecuencia (minúscula)
iCDx-2035D-VIM-S3-RT-Pb, 5HEX/ttTAACT**G**C/ZEN/GTCCGCCC**G**CACCTAC/3IABkF Q/ (SEQ ID NO. 45)	Sonda en tiempo real con emparejamiento incorrecto en la tercera posición del emparejamiento (negrita en dirección 5') y emparejamientos incorrectos en la cuarta posición (negrita en dirección 3') y emparejamientos incorrectos presecuencia (minúscula)
iCDx-2036-VI M-S3-RT -FP, T AGACACGAGCGAGGTCAC (SEQ ID NO. 39)	Cebador directo en tiempo real
iCDx-2037-VIM-S3-RT-RP,TGCACAGCCTGAATTTTGCAC (SEQ ID NO. 40)	Cebador inverso en tiempo real
VIM-S3-LNA1,CA+TAA+CT+AC+AT+CC+AC+CCA (SEQ ID NO. 33)	Sonda de LNA ("+" = base nucleica bloqueada)

(continuación)

VIM-S3-LNA2,CA+TAA+CT+AC+AT+C+C+AC+CCA (SEQ ID NO. 34)	Sonda de LNA ("+" = base nucleica bloqueada)
/5SpC3/ - Separador C3 en 5', /3SpC3/ - Separador C3 en 3', /5Phos/ - 5' Fosfato, /56-FAM/ - Colorante Fluorescente Fam en 5', /5HEX/ - Colorante Fluorescente HEX™, /ZEN/-ZEN™ Flourescent Quencher™, /3IABkFQ/ - Inactivador fluorescente Iowa Black® en 3', gama espectral verde a rosa, "+" - Base de ácido nucleico bloqueada, "rA" - base de ribonucleótido riboadenosina; "rT" - base de ribonucleótido ribotimidina; "rG" - base de ribonucleótido riboguanosina; "rC" - base de ribonucleótido ribocitosina	

Se llevó a cabo la detección de la mutación en un número de oncogenes de cáncer diferentes y supresores tumorales que hospedad mutaciones de punto caliente conocidas incluyendo KRAS (G12A, G12D, G12S, G12C y G12V), BRAF (V600E, 1799T>A), y Tp53 (R248Q, 743G>A). El ensayo se llevó a cabo de forma similar al ensayo de metilación usando una estrategia de Reacciones de Detección de la Ligasa cuantitativas (LDR) excepto que la base discriminante está localizada en la mutación de interés.

Las sondas de oligonucleótidos en dirección 5' de LDR (Up) se diseñan con una T_m de 64-66 °C en dirección 5' de un extremo en la mutación (base discriminante de interés). Una vez que se selecciona el cebador fuera de esta base y en el intervalo de T_m requerido, la técnica de extensión no específica del bloqueo basada en el método de escisión de la RNaseH2™ de IDT (Coralville, I a) se utiliza para añadir una base de ARN complementaria inmediata al lado 3' de la base discriminante seguido por dos bases de ADN emparejadas en la segunda y tercera posición y dos bases de ADN emparejadas incorrectamente (G-A, C-T) en la cuarta y la quinta posición seguido por la adición de un Separador C3 en 3'. La cola de cinco bases general y el separador se usan para bloquear la extensión no específica desactivada de la sonda LDR anterior. Para la sonda de oligonucleótidos de LDR en dirección 5' se utiliza también un emparejamiento incorrecto adicional (preferentemente, cualquiera de un emparejamiento incorrecto G-T o A-C) en la posición adyacente, segunda o preferentemente tercera en el lado 5' de la base discriminante. Tras la selección y la modificación del oligonucleótido en dirección 5', se añadió una secuencia marcadora correspondiente a un cebador directo para un experimente posterior de PCR en tiempo real en el lado 5' de la secuencia LDR en dirección 5'. Las secuencias marcadoras se seleccionan de una lista de parejas de cebadores directos e inversos de oligonucleótidos de la qPCR que se diseñaron anteriormente.
iCDx-308-Br600_(3)-L_Up_Rm:

5'**TAGCGATAGTACCGACAGTCACG***tcct*AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTAC**G**GAr

GAAA**c**/3SpC3/ (SEQ ID NO: 4)

Ejemplo del oligonucleótido de LDR en dirección 5' (de 5': etiqueta en mayúscula y negrita, secuencia enlazadora corta en minúscula y cursiva, secuencia de la sonda LDR en dirección 5' en mayúscula con emparejamiento incorrecto en la posición 3 antes de la mutación en negrita, y emparejamiento incorrecto en la última posición de una cola de cinco bases en negrita y minúscula)

Se diseñaron sondas LDR en dirección 5' adicionales como se ha descrito anteriormente, con las siguientes modificaciones: para las sondas LDR de la versión "A", la base de ARN inmediata al lado 3' de la base discriminante seguida de tres bases de ADN emparejadas en la segunda, tercera, y cuarta posición y una base de ADN emparejada incorrectamente (G-A, C-T) en la quinta posición seguido por la adición de un Separador C3 en 3'; para las sondas LDR de la versión "B", la base de ARN inmediata al lado 3' de la base discriminante seguida por dos bases de ADN emparejadas en la segunda y tercera posición y dos bases de ADN emparejadas incorrectamente (G-A, CT) en la cuarta y la quinta posición seguido por la adición de un Separador C3 en 3'; para las versiones "D" de las sondas LDR, la base de ARN inmediata al lado 3' de la base discriminante seguida por dos bases de ADN emparejadas en la segunda y la cuarta posición y dos bases de ADN emparejadas incorrectamente (G-A, C-T) en la tercera y la quinta posición seguido por la adición de un Separador C3 en 3'. Adicionalmente, la versión "A", "B" y "D" de las sondas LDR en la posición 5' tenía una base de ADN emparejada incorrectamente (G-A, C-T) en la tercera posición de la unión por ligadura (es decir, el extremo 3' tras la escisión con ARNasaH) y la versión "D" de las sondas LDR en dirección 3' tenían una base de ADN emparejada incorrectamente (G-A, C-T) en la cuarta posición de la unión por ligadura (es decir, el extremo 5').

Se diseñó la sonda de oligonucleótidos LDR en dirección 3' (Dn) en la base inmediatamente siguiente del lado 3' de la base discriminante. Los oligonucleótidos se diseñaron con una T_m de 68 °C grados. Se añadió una secuencia marcadora correspondiente al complemento inverso del cebador inverso para un experimento posterior de PCR en tiempo real en el lado 3' de la secuencia específica de LDR. Al igual que la sonda de oligonucleótidos de LDR en dirección 5', estas secuencias se seleccionaron también a partir de una lista predeterminada de parejas óptimas de cebadores de la qPCR.
iCDx-276-Br600-L_Dn_ P:
/5Phos/GAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCAT*ttggt***GTGCGGAAACCTATCGTCGA** (SEQ ID NO: 5)

Ejemplo de un oligonucleótido de LDR en dirección 3' (desde 5': secuencia de la sonda LDR en dirección 5' en

mayúsculas, secuencia enlazadora corta en minúsculas y cursiva, y seguido por una etiqueta la PCR en tiempo real en mayúsculas y negrita)

Los cebadores directo (FP) e inverso (RP) específicos de gen para la etapa de la PCR se diseñaron inmediatamente en la dirección 5' o en dirección 3', respectivamente, de las sondas de oligonucleótidos de LDR. Existe un solapamiento significativo entre el FP y la sonda de oligonucleótidos de LDR, y no existe solapamiento entre el RP y la sonda de LDR en dirección 3'. Se diseñaron cebadores de oligonucleótidos directos e inversos específicos de gen con una T_m de 64-66 °C, y con una longitud total del amplicón de 74-94 bases. De manera adicional, el cebador inverso tiene una cola de 10 bases no específicas añadida al extremo 5' para evitar la formación del cebador-dímero de los cebadores en dirección 3'. Opcionalmente, los cebadores directo e inverso utilizan también el método de escisión RNaseH2™ de 5 bases en el extremo 3' del cebador, pero a diferencia de las sondas de oligonucleótidos de LDR, tenían cero o un emparejamiento incorrecto en el extremo 3' (cuando este extremo 3' está en la base mutada que se va a discriminar, esta se emparejó con la secuencia natural y se emparejó de manera incorrecta con la secuencia mutante).

iCDx-328-Braf_PF_WT_blk2 (método de escisión RNaseH2™ de 5 bases con FP y emparejamiento incorrecto en el extremo 3'): CCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTArGCTAt/3SpC3/ (SEQ ID NO: 1)

iCDx-284-Br600-PR (RP específico de gen con una cola de 10 bases en negrita, una base enlazadora extra en cursiva, y una secuencia específica de gen en mayúsculas):
ggtgtcgtggTCAAAATGGATCCAGACAACTGTTCAAAC (SEQ ID NO: 2)

Ejemplo de cebadores de la PCR directo e inverso específicos de gen

para la etapa de la PCR en tiempo real, se diseñaron sondas específicas de hebra en tiempo real marcadas con FAM, HEX™ o TAMRA en el extremo 5' para cubrir el producto de ligadura a través de la unión entre los cebadores de LDR en dirección 5' y en dirección 3'. Se diseñaron diferentes sondas para incorporar el emparejamiento incorrecto adyacente, en la segunda posición o en la tercera posición situado en el lado 5' de la base discriminante que se incorporó en los oligonucleótidos en dirección 5' correspondientes. Se diseñaron las sondas con una T_m de 68 °C. Para evitar problemas con la fluorescencia baja del colorante FAM cuando se acopla a una base G, se diseñaron todas las sondas sin utilizar una base G en su primera base inicial en 5' de tal manera que los colorantes se pueden intercambiar según sea necesario sin necesidad de modificación de la secuencia. Las modificaciones adicionales implican la adición de emparejamientos incorrectos inmediatamente después de la sonda fluorescente. Se sintetizaron las sondas a partir de IDT y la mayoría utilizan un inactivador de nueve bases ZEN™ a partir del lado 5', y un inactivador fluorescente Iowa Black® FQ o Iowa Black® RQ (IDT) en el extremo 3'.iCDx-277_A4: TAGCGATAG-TACCGACAGTCAC (SEQ ID NO: 6) iCDx-279_C4: TCGACGATAGGTTTCCGCAC (SEQ ID NO: 7) iCDx-281-Br600_(3)_Sonda: 5'- /56-TAMN/TA CGG AGA AAT CTC GAT GGA GTG GGT /3IAbRQSp/ -3' (SEQ ID NO: 8)

Ejemplo de los oligonucleótidos utilizados en el experimento de la PCR en tiempo real

Se diseñaron cebadores de bloqueo para el ácido nucleico bloqueado (LNA™) para reducir la amplificación de la diana natural, así como la ligadura de las sondas de LDR en dirección 5' y en dirección 3' en la diana natural amplificada. Para llevar a cabo esto se sintetizó una sonda LNA natural perfectamente emparejada utilizando entre 3-6 bases bloqueadas por Exiqon (Woburn, Ma) con una T_m de 71-76 °C. Las LNA contienen también un grupo fosfato en 5' y un separador C3 con tres cebadores para evitar resultados falsos positivos que surgen de la extensión de la sonda en el ADN natural.
iCDx-315-BRAF_FLW: /5Phos/GCTA+C+AG+T+G+AAAT+CTCG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 3)

Ejemplo de los oligonucleótidos LNA utilizados para bloquear la señal natural (las bases de LNA se aquellas precedidas por un signo +)

Como alternativa, Se diseñaron cebadores de bloqueo de ácidos nucleicos peptídicos (PNA™) para reducir la amplificación de la diana natural, así como la ligadura de las sondas de LDR en dirección 5' y en dirección 3' en la diana natural amplificada. Para hacer esto, se diseñó un oligonucleótido PNA natural perfectamente emparejado para incluir 4-8 bases en cada lado de la base discriminante, y para tener una Tm de 70-76 °C. Se sintetizaron oligonucleótidos de PNA por PNA Bio (Thousand Oaks, CA).
PNA-p53-248-11L: TGAACC**G**GAGG (SEQ ID NO: 12)

Ejemplo de un oligonucleótido de PNA utilizado para bloquear la señal natural (la base discriminante está en negrita, y esta se empareja con la diana natural)

Tabla 27. Lista de cebadores de detección de la mutación

Etapa	Nombre del cebador	Secuencia de Cebador
BRAF		
Cebador directo PCR	iCDx-328-Braf_PF_WT_blk2	
Cebador inverso PCR	iCDx-284-Br600-PR	CCTC ACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTArG CTAT/3SpC3/ (SEQ ID NO: 1) GGTGTCGTGGTCAAAATGGATCCAGACAACT GTTCAAAC (SEQ ID NO: 2)
Sonda bloqueante 1 de LNA	iCDx-315-BRAF_FLW	/5Phos/GCTA+C+AG+T+G+AAAT+CTCG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 3)
LDR en dirección 5'	iCDx-308-Br600_(3)-L_Up_Rm	
LDR en dirección 3'	iCDx-276-Br600-L_Dn_P	TAGCGATAGTACCGACAGTCACGTCCT AAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACGGArGAAAC/3SP C3/ (SEQ ID NO: 4)/5Phos/GAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATTTGGTGTGCGGAAACCTA TCGTCGA (SEQ ID NO: 5)
Cebador marcador directo	iCDx-277_A4	TAGCGATAGTACCGACAGTCAC (SEQ ID NO: 6)
Cebador marcador inverso	iCDx-279_C4	TCGACGATAGGTTTCCGCAC (SEQ ID NO: 7)
Sonda en tiempo real	iCDx-281-Br600_(3)_Sonda	5'- /56-TAMN/TACGGAGAAATCTCGATGGAGTGGGT/3IAbRQSp/ -3' (SEQ ID NO: 8)
p53		
Cebador directo PCR	iCDx-326-p53-248_PF_WT_blk2	CCTGCATGGGCGGCATGrAACCG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 9)
Cebador inverso PCR	iCDx-248-p53-248_PR	GGTGTCGTGGAAGTGGCAAGTGGCTCCTGAC (SEQ ID NO: 10)
Sonda bloqueante 1 de PNA	PNA-p53-248-10	GAACCGGAGG (SEQ ID NO: 11)
Sonda bloqueante 2 de PNA	PNA-p53-248-11L	TGAACCGGAGG (SEQ ID NO: 12)
LDR en dirección 5'	iCDx-305-P53-248(3)-L_Up_Rm	TCACTATCGGCGTAGTCACCACAGACGCATGGGCGGCATGAATCArGAG GT (SEQ ID NO: 13) /3SPC3/
LDR en dirección 3'	iCDx-202-P53-248-L_Dn_P	/5Phos/GAGGCCCATCCTCACCATCATCACGTTGTTGGTGACTTTACCCGG AGGA (SEQ ID NO: 14)
Cebador marcador directo	iCDx-82_GTT-GCGC_A2	TCACTATCGGCGTAGTCACCA (SEQ ID NO:15)
Cebador marcador inverso	iCDx-244-C2	TCCTCCGGGTAAAGTCACCA (SEQ ID NO: 16)
Sonda en tiempo real	iCDx-228-p53-248_Probe_s	5'- /56-FAM/CG GCA TGA A/ZEN/T CAG AGG CCC ATC C/3IABkFQ/ (SEQ ID NO: 17)

(continuación)

Etapa	Nombre del cebador	Secuencia de Cebador
KRAS		
Cebador directo PCR	iCDx-327-Kr_12_2_PF_WT_blk2	TGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGArGCTGG/3SpC3/ (SEQ ID NO: 18)
Cebador inverso PCR	iCDx-303-Kr-12_1&2_PR	GGTGTCGTGGCGTCCACAAAATGATTCTGAATTAGCTGTA (SEQ ID NO: 19)
Sonda bloqueante 1 de PNA	PNA-Kras 12_2-11L	GAGCTGGTGGC (SEQ ID NO: 20)
Sonda bloqueante 2 de PNA	PNA-Kras 12_2-11R	AGCTGGTGGCG (SEQ ID NO: 21)
LDR en dirección 5'	iCDx-393-Kr-12_1(3)-L_Up_Rm	TTCGTACCTCGGCACACCAACATAACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGTTHrGTGAT/3Sp C3/ (SEQ ID NO: 22)
LDR en dirección 3'	iCDx-222-Kr-12_1-L_Dn_P	/5Phos/GTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGGCGTGTGGCTCCGTTACTCTGTCGA (SEQ ID NO: 23)
LDR en dirección 5' ver-B	iCDx-307-Kr-12_2(3)-L_Up_Rm	TTCGTACCTCGGCACACCAACATATGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCCGHrUGGCA/3Sp C3/ (SEQ ID NO: 27)
LDR en dirección 5' ver-C	iCDx-394-Kr-12_2(3)-L_Up_Rm	TTCGTACCTCGGCACCCAACATATGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCCGHrUGGTA/3Sp C3/ (SEQ ID NO: 28)
LDR en dirección 3' ver-B	iCDx-269-Kr-12_2-L_Dn_P	/5Phos/TGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGGCGTGTGGCTCCGTTACTCTGTCGA (SEQ ID NO: 29)
Cebador marcador directo	iCDx-245_A3	TTCGTACCTCGGCACACCA (SEQ ID NO: 24)
Cebador marcador inverso	iCDx-246-C3	TCGACAGAGTAACGGAGCCA (SEQ ID NO: 25)
Sonda 1 en tiempo real	iCDx-259-T-Kr-12_1_Probe	5'- /5HEX/TT GGA GTT H/ZEN/GT GGC GTA GGC AAG A/3IABkFQ/ -3' (SEQ ID NO: 26)
Sonda 2 en tiempo real	iCDx-270-Kr-12_2(3)_Probe	5'- /5HEX/TAG TTG GAG/ZEN/ CCG HTG GCG TAG G /3IABkFQ/ -3' (SEQ ID NO: 30)
/5SpC3/ - Separador C3 en 5', /3SpC3/ - Separador C3 en 3', /5Phos/ - 5' Fosfato, /56-FAM/ - Colorante Fluorescente Fam en 5', /5HEX/ - Colorante Fluorescente HEX™, /ZEN/ - ZEN™ Flourescent Quencher™, /3IABkFQ/ - Inactivador fluorescente Iowa Black® en 3', gama espectral verde a rosa, "+" - Base de ácido nucleico bloqueada, "rA" - base de ribonucleótido riboadenosina; "rT" - base de ribonucleótido ribotimidina; "rG" - base de ribonucleótido riboguanosina; "rC" - base de ribonucleótido ribocitosina		

Tabla 28. Oligonucleótidos de detección de la metilación		
Etapa	**Nombre**	**Secuencia**
Hebra superior de VIM-S2		
Cebador directo PCR	iCDx-2021-Vim-S2-FP	ACCACTCTCGCTCCGAAATrCCCCA/3SpC3/ (SEQ ID NO. 46)
Cebador inverso PCR	iCDx-2022A-Vim-S2-RP	GGTGTCGTGGCGGATTGGTTTTCGGAGAAGAGGrCGAAT/3SpC3/ (SEQ ID NO. 47)
LDR en dirección 5' ver-A	iCDx-2023A-Vim-S2-Up	TACCCTCCTAGCTCCGTACATCTCGCTCCGAAATCCTCGrCGCTG/3SpC3/

(continuación)

Etapa	**Nombre**	**Secuencia**
Hebra superior de VIM-S2		
LDR en dirección 5' ver-B	iCDx-2023B-Vim-S2-Up	/5SpC3/TACCCTCCTAGCTCCGTACATCTCGCTCCGAAATCCTCGrCGCTG/3SpC3/ (SEQ ID NO. 48)
LDR en dirección 3' ver-A	iCDx-2024A-Vim-S2-Dn	/5Phos/CGCCAAAAACGCAACCGCGCTGTGTTGTCTGGTGGTGCA (SEQ ID NO. 49)
Sonda en tiempo real ver-B	iCDx-2025B-Vim-S2-RT-Pb	/56-FAM/AT CCT CGC G/ZEN/C CAA AAA CGC /3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 50)
Sonda en tiempo real ver-A	iCDx-2025A-Vim-S2-RT-Pb	/56-FAM/CCGAAATCC/ZEN/TCGCGCCAAAAACG/3IABkF Q/ (SEQ ID NO. 51)
Cebador marcador directo	iCDx-2026-Vim-S2-RT-FP	TACCCTCCTAGCTCCGTACA (SEQ ID NO. 52)
Cebador marcador inverso	iCDx-2027-Vim-S2-RT-RP	TGCACCACCAGACAACACA (SEQ ID NO. 53)
Sonda bloqueante 1 de LNA	VIM-S2-LNA1	A+AT+CC+CC+AC+AC+CA+A (SEQ ID NO. 54)
Sonda bloqueante 2 de LNA	VIM-S2-LNA2	A+AT+CC+CC+A+C+AC+CA+A (SEQ ID NO. 55)
Sonda bloqueante 2 de PNA	VIM-S2-PNA2	AATCCCCACACCAAA (SEQ ID NO. 56)
Hebra superior de VIM-S3		
Cebador directo PCR	iCDx-2031-VIM-S3-FP	GAACTCCAACCGAAACTACGTAArCTACA/3SpC3/ (SEQ ID NO. 31)
Cebador inverso PCR	iCDx-2032A-VIM-S3-RP	GGTGTCGTGGACGAGGCGTAGAGGTTGCrGGTTA/3SpC3/ (SEQ ID NO. 32)
LDR en dirección 5' ver-A	iCDx-2033A-VI M-S3-Up	TAGACACGAGCGAGGTCACAACTCCAACCGAAACTACGTAACTGCGrUCCGT/3SpC3/ (SEQ ID NO. 36)
LDR en dirección 5' ver-B	iCDx-2033B-VIM-S3-Up	/5SpC3/TAGACACGAGCGAGGTCACAACTCCAACCGAAACTACGTAACTGCGrUCCGT/3SpC3/ (SEQ ID NO. 41)
LDR en dirección 5' ver-D	iCDx-2033D-VIM-S3-Up	/5SpC3/TAGACACGAGCGAGGTCACAACTCCAACCGAAACTACGTAACTGCGrUCTAT/3SpC3/ (SEQ ID NO. 42)
LDR en dirección 3' ver-D	iCDx-2034D-VIM-S3-Dn	/5Phos/TCCGCCCGCACCTACAACCTAAACAACGCGCTGTGCAAA ATT C AG G CTGTG C A (SEQ ID NO. 43)
Sonda en tiempo real ver-B	iCDx-2035B-VIM-S3-RT-Pb	/5HEX/TTTAACTGC/ZEN/GTCCACCCGCACCTAC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 44)

(continuación)

Etapa	**Nombre**	**Secuencia**
Hebra superior de VIM-S3		
Sonda en tiempo real ver-D	iCDx-2035D-VIM-S3-RT-Pb	/5HEX/TTTAACTGC/ZEN/GTCCGCCCGCACCTAC/3IABkFQ/(SEQ ID NO. 45)
Sonda en tiempo real ver-A	iCDx-2035A-VIM-S3-RT-Pb	/5HEX/TAACTGCGT/ZEN/CCACCCGCACCTAC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 38)
Cebador marcador directo	iCDx-2036-VIM-S3-RT-FP	TAGACACGAGCGAGGTCAC (SEQ ID NO. 39)
Cebador marcador inverso	iCDx-2037-VIM-S3-RT-RP	TGCACAGCCTGAATTTTGCAC (SEQ ID NO. 40)
Sonda bloqueante 1 de LNA	VIM-S3-LNA1	CA+TAA+CT+AC+AT+CC+AC+CCA (SEQ ID NO. 33)
Sonda bloqueante 2 de LNA	VIM-S3-LNA2	CA+TAA+CT+AC+AT+C+C+AC+CCA (SEQ ID NO. 34)
Sonda bloqueante 2 de PNA	VIM-S3-PNA2	ACATAACTACATCCACCCA (SEQ ID NO. 35)
Hebra inferior de TMEM-S1		
Cebador directo PCR	iCDx-2051-TMEM90B-REV-S1-FP	GTTAGATATTGGTCGCGGGTTATTATTTGrGACGA/3S pC3/ (SEQ ID NO. 57)
Cebador inverso PCR	iCDx-2052-TMEM90B-REV-S1-RP	GGTGTCGTGGGCAACCCGCGCGAAAArTAACT/3SpC3/ (SEQ ID NO. 58)
LDR en dirección 5' ver-B	iCDx-2053B-TMEM90B-REV-S1-Up	/5SpC3/TGCTTACCCACGATGCACCCGCGGGTTATTATTTGGAAGCrGATCC/3SpC3/ (SEQ ID NO. 59)
LDR en dirección 5' ver-D	iCDx-2053D-TMEM90B-REVS1-Up	/5SpC3/TGCTTACCCACGATGCACCCGCGGGTTATTATTTGGAAGCrGACTC/3SpC3/ (SEQ ID NO. 60)
LDR en dirección 5' ver-A	iCDx-2053A-TMEM90B-REV-S1-Up	TGCTTACCCACGATGCACCCGCGGGTTATTATTTGGAAGCrGATCC/3SpC3/ (SEQ ID NO. 61)
LDR en dirección 3' ver-D	iCDx-2054D-TMEM90B-REV-S1-Dn	/5Phos/GATCTTTCGTTAGGGTTTTTTTGGTTTGGGTTAAAGTTGGTGGGTCGTATGACTTGCTCGCA (SEQ ID NO. 62)
LDR en dirección 3' ver-A	iCDx-2054A-TMEM90B-REV-S1-Dn	/5Phos/GATTTTTCGTTAGGG 1 1 1 1 1 1 1GGTTTGGGTTAAAGTT GGTCGTATGACTTGCTCGCA (SEQ ID NO. 63)
Sonda en tiempo real ver-B	iCDx-2055B-TMEM90B-REV-S1-RT-Pb	/56-FAM/AATGGAAGC/ZEN/GATTTTTCGTTAGGGTTTTTTTG/3IABkFQ/
Sonda en tiempo real ver-D	iCDx-2055D-TMEM90B-REV-S1-RT-Pb	/56-FAM/AATGGAAGC/ZEN/GATCTTTCGTTAGGGTTTTTTTG/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 64)
Sonda en tiempo real ver-A	iCDx-2055A-TMEM90B-REV-S1-RT-Pb	/56-FAM/ATTTGGAAG/ZEN/CGATTTTTCGTTAGGGTTTT/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 65)

(continuación)

Etapa	**Nombre**	**Secuencia**
Hebra inferior de TMEM-S1		
Cebador marcador directo	iCDx-2056-TMEM90B-REV-S1-RT-FP	TGCTTACCCACGATGCACC (SEQ ID NO. 66)
Cebador marcador inverso	iCDx-2057-TMEM90B-REV-S1-RT-RP	TGCGAGCAAGTCATACGACC (SEQ ID NO. 67)
Sonda bloqueante 1 de LNA	iCDx-2058-TMEM90B-REV-S1-LNA	AT+TT+GG+A+T+G+T+GA+TTTTT+T+GTT+AG (SEQ ID NO. 68)
Hebra inferior de TMEM-S3		
Cebador directo PCR	iCDx-2061-TMEM90B-REV-S3-FP	TTTGGGTTGTATTTTGGTGTTTTGTTrATTTA/3SpC3/ (SEQ ID NO. 69)
Cebador inverso PCR	iCDx-2062-TMEM90B-REV-S3-RP	GGTGTCGTGGCTAACTCCGCTACGCTCTCAArUTCTA/3SpC3/(SEQ ID NO. 70)
LDR en dirección 5' ver-B	iCDx-2063B-TMEM90B-REV-S3-Up	/5SpC3/TTCGCCTACCGCAGTGAACTGGGTTGTATTTTGGTGT TTTGTTATCTCrGGGGA/3SpC3/ (SEQ ID NO. 71)
LDR en dirección 5' ver-D	iCDx-2063D-TMEM90B-REV-S3-Up	/5SpC3/TTCGCCTACCGCAGTGAACTGGGTTGTATTTTGGTGT TTTGTTATCTCrGGAAA/3SpC3/ (SEQ ID NO. 72)
LDR en dirección 5' ver-A	iCDx-2063A-TMEM90B-REV-S3-Up	TTCGCCTACCGCAGTGAACTGGGTTGTATTTTGGTGTTTTGTT ATCTCrGGGGA/3SpC3/ (SEQ ID NO. 73)
LDR en dirección 3' ver-D	iCDx-2064D-TMEM90B-REV-S3-Dn	/5Phos/GGGTGACGCGAAGGGGTTGTTGTGCGAAGTTGAGAC ATGGGCTCGCA (SEQ ID NO. 74)
LDR en dirección 3' ver-A	iCDx-2064A-TMEM90B-REV-S3-Dn	/5Phos/GGGAGACGCGAAGGGGTTGTTGTGGTTGAG AC AT GGGCTCGCA (SEQ ID NO. 75)
Sonda en tiempo real ver-B	iCDx-2065B-TMEM90B-REV-S3-RT-Pb	/5HEX/AATTATCTC/ZEN/GGGAGACGCGAAGGG/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 76)
Sonda en tiempo real ver-D	iCDx-2065D-TMEM90B-REV-S3-RT-Pb	/5HEX/AATTATCTC/ZEN/GGGTGACGCGAAGGG/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 77)
Sonda en tiempo real ver-A	iCDx-2065A-TMEM90B-REV-S3-RT-Pb	/5HEX/TTTTGTTAT/ZEN/CTCGGGAGACGCGAAGGG/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 78)
Cebador marcador directo	iCDx-2066-TMEM90B-REV-S3-RT-FP	TTCGCCTACCGCAGTGAAC (SEQ ID NO. 79)
Cebador marcador inverso	iCDx-2067-TMEM90B-REV-S3-RT-RP	TGCGAGCCCATGTCTCAAC (SEQ ID NO. 80)
Sonda bloqueante 1 de LNA	iCDx-2068-TMEM90B-REV-S3-LNA	TTGTTATT+T+T+GGGAGA+T+G+T+GAAG (SEQ ID NO. 81)

(continuación)

Etapa	**Nombre**	**Secuencia**
Hebra inferior de VIM-S2		
Cebador directo PCR	iCDx-2071-VI M-REV-S2-FP	GGTTTAGTTTTTTGTTATTTTCGTTTCGAGGrUTTTA/3SpC3/ (SEQ ID NO. 82)
Cebador inverso PCR	iCDx-2072-VI M-REV-S2-RP	GGTGTCGTGG GACGATAACGCGAACTAACTCrCCGAG/3SpC3/ (SEQ ID NO. 83)
LDR en dirección 5' ver-B	iCDx-2073B-VIM-REV-S2-Up	/5SpC3/TTGCAACAGGCTACCGACCGTTTTTTGTTATTTTCGTT TCGAGGTTCTCrGCGCC/3SpC3/ (SEQ ID NO. 84)
LDR en dirección 5' ver-A	iCDx-2073A-VIM-REV-S2-Up	TTGCAACAGGCTACCGACCGTTTTTTGTTATTTTCGTTTCGAG GTTCTCrGCGCC/3SpC3/ (SEQ ID NO. 85)
LDR en dirección 3'	iCDx-2074-VI M-REV-S2-Dn	/5Phos/GCGTTAGAGACGTAGTCGCGTTTTTATTATTTATATTT ATCGCGGGTAGGTAAGGAAGTCACGCA (SEQID NO. 86)
Sonda en tiempo real ver-B	iCDx-2075B-VIM-REV-S2-RT-Pb	/56-FAM/AG GTT CTC G/ZEN/C GTT AGA GAC GTA GTC G/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 87)
Sonda en tiempo real ver-A	iCDx-2075A-VIM-REV-S2-RT-Pb	/56-FAM/ATTTTCGTT/ZEN/TCGAGGTTCTCGCGTTAGAGA/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 88)
Cebador marcador directo	iCDx-2076-VIM-REV-S2-RT-FP	TTGCAACAGGCTACCGACC (SEQ ID NO. 89)
Cebador marcador inverso	iCDx-2077-VIM-REV-S2-RT-RP	TGCGTGACTTCCTTACCTACC (SEQ ID NO. 90)
Sonda bloqueante 1 de LNA	iCDx-2078-VIM-REV-S2-LNA	TTT + T +GAG+GTTTT + T +G+ T +GTT AGAGA+ T +GT A (SEQ ID NO. 91_
Hebra inferior de VIM-S3		
Cebador directo PCR	iCDx-2081-VIM-REV-S3-FP	GTCGAGTTTTAGTCGGAGTTACGTGrATTAA/3SpC3/ (SEQ ID NO. 92)
Cebador inverso PCR	iCDx-2082-VI M-REV-S3-RP	GGTGTCGTGGGAAAACGAAACGTAAAAACTACGACTAArUACTG/3SpC3/ (SEQ ID NO. 93)
LDR en dirección 5' ver-B	iCDx-2083B-VIM-REV-S3-Up	/5SpC3/TGGATCGAGACGGAATGCAACCGAGTTTTAGTCGGA GTTACGTGATCACrGTTCG/3SpC3/ (SEQ ID NO. 94)
LDR en dirección 5' ver-D	iCDx-2083D-VIM-REV-S3-Up	/5SpC3/TGGATCGAGACGGAATGCAACCGAGTTTTA GTCGGAGTTACGTGATCACrGTCTG/3SpC3/ (SEQ ID NO. 95)
LDR en dirección 5' ver-A	iCDx-2083A-VIM-REV-S3-Up	TGGATCGAGACGGAATGCAACCGAGTTTTAGTCGGA GTT ACGT GAT CACrGTT CG/3SpC3/ (SEQ ID NO. 96)
LDR en dirección 3' ver-D	iCDx-2084D-VIM-REV-S3-Dn	/5Phos/GTTCATTCGTATTTATAGTTTGGGTAGCGCGTTGCGTT TTGTTTCCCTGATTGATACCCGCA (SEQ ID NO. 97)
LDR en dirección 3' ver-A	iCDx-2084A-VIM-REV-S3-Dn	/5Phos/GTTTATTCGTATTTATAGTTTGGGTAGCGCGTTGCGGT TTCCCTGATTGATACCCGCA (SEQ ID NO. 98)
Sonda en tiempo real ver-B	iCDx-2085B-VIM-REV-S3-RT-Pb	/5HEX/TTTGATCAC/ZEN/GTTTATTCGTATTTATAGTTTGGGTA GCGC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 99)

(continuación)

Etapa	**Nombre**	**Secuencia**
Hebra inferior de VIM-S3		
Sonda en tiempo real ver-D	iCDx-2085D-VIM-REV-S3-RT-Pb	/5HEX/TTTGATCAC/ZEN/GTTCATTCGTATTTATAGTTTGGGTAGCGC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 100)
Sonda en tiempo real ver-A	iCDx-2085A-VIM-REV-S3-RT-Pb	/5HEX/AGTCGGAGT/ZEN/TACGTGATCACGTTTATTCGTATTTATAG/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 101)
Cebador marcador directo	iCDx-2086-VIM-REV-S3-RT-FP	TGGATCGAGACGGAATGCAAC (SEQ ID NO. 102)
Cebador marcador inverso	iCDx-2087-VIM-REV-S3-RT-RP	TGCGGGTATCAATCAGGGAAAC (SEQ ID NO. 103)
Sonda bloqueante 1 de LNA	iCDx-2088-VIM-REV-S3-LNA	GTT+A+T+GT+G+ATT+A+T+GT+TT+AT+T+T+GT+AT TT (SEQ ID NO. 104)
Hebra superior de TMEM90B-S1		
Cebador directo PCR	iCDx-2101-TMEM90B-F-S1-FP	CTAACCGCGAACCACCATCTAArACGCT/3SpC3/(SEQ ID NO. 105)
Cebador inverso PCR	iCDx-2102-TMEM90B-F-S1-RP	GGTGTCGTGGTTCGCGCGAAGGTGGTTArUTAAC/3SpC3/ (SEQ ID NO. 106)
LDR en dirección 5' ver-B	iCDx-2103B-TMEM90B-F-S1-Up	/5SpC3/TTGCATTTCGTTAGCGACACAGCGAACCACCATCTAAACACGrATCTT/3SpC3/ (SEQ ID NO. 107)
LDR en dirección 5' ver-D	iCDx-2103D-TMEM90B-F-S1-Up	/5SpC3/TTGCATTTCGTTAGCGACACAGCGAACCACCATCTAAACACGrATTCT/3SpC3/ (SEQ ID NO. 108)
LDR en dirección 5' ver-A	iCDx-2103A-TMEM90B-F-S1-Up	TTGCATTTCGTTAGCGACACAGCGAACCACCATCTAAACACGrATCTT/3SpC3/ (SEQ ID NO. 109)
LDR en dirección 3' ver-D	iCDx-2104D-TMEM90B-F-S1-Dn	/5Phos/ATCTCCCGCTAAAACCTCCCTAATCTAAACCAAAATTAATGTGAGTCGATCTACCCGCA (SEQ ID NO. 110)
LDR en dirección 3' ver-A	iCDx-2104A-TMEM90B-F-S1-Dn	/5Phos/ATCCCCCGCTAAAACCTCCCTAATCTAAACCTGTGAGTCGATCTACCCGCA (SEQ ID NO. 111)
Sonda en tiempo real ver-B	iCDx-2105B-TMEM90B-F-S1-RT-Pb	/56-FAM/AAAAACACG/ZEN/ATCCCCCGCTAAAACCT/31ABkFQ/ (SEQ ID NO. 112)
Sonda en tiempo real ver-D	iCDx-2105D-TMEM90B-F-S1-RT-Pb	/56-FAM/AAAAACACG/ZEN/ATCTCCCGCTAAAACCTCC/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 113)
Sonda en tiempo real ver-A	iCDx-2105A-TMEM90B-F-S1-RT-Pb	/56-FAM/CATCTAAAC/ZEN/ACGATCCCCCGCTAA/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 114)
Cebador marcador directo	iCDx-2106-TMEM90B-F-S1-RT-FP	TTGCATTTCGTTAGCGACACA (SEQ ID NO. 115)
Cebador marcador inverso	iCDx-2107-TMEM90B-F-S1-RT-RP	TGCGGGTAGATCGACTCACA (SEQ ID NO. 116)
Sonda bloqueante 1 de LNA	iCDx-2108-TMEM90B-F-S1-LNA	CTAAA+C+A+C+A+ATCCCC+C+A+CT (SEQ ID NO. 117)

(continuación)

Etapa	**Nombre**	**Secuencia**
Hebra superior de TMEM90B-S3		
Cebador directo PCR	iCDx-2111-TMEM90B-F-S3-FP	CTAACCTAAACTACACCTTAATACCTTACCArCCCCT/3SpC3/ (SED ID NO. 118)
Cebador inverso PCR	iCDx-2112-TMEM90B-F-S3-RP	GGTGTCGTGGTTTTGTTGGGTAGTTTGGTTTCGTTArCGTTC/3SpC3/ (SEQ ID NO. 119)
LDR en dirección 5' ver-B	iCDx-2113B-TMEM90B-F-S3-Up	/5SpC3/TGGATCGAGACGGAATGCAACCTACACCTTAATACCTTACCACCTCGrAAAGG/3SpC3/ (SEQ ID NO. 120)
LDR en dirección 5' ver-D	iCDx-2113D-TMEM90B-F-S3-Up	/5SpC3/TGGATCGAGACGGAATGCAACCTACACCTTAATACCTTACCACCTCGrAAGAG/3SpC3/ (SEQ ID NO. 121)
LDR en dirección 5' ver-A	iCDx-2113A-TMEM90B-F-S3-Up	TGGATCGAGACGGAATGCAACCTACACCTTAATACCTTACCACCTCGrAAAGG/3SpC3/ (SEQ ID NO. 122)
LDR en dirección 3' ver-D	iCDx-2114D-TMEM90B-F-S3-Dn	/5Phos/AAAGACGCGAAAAAACTACTATACGAATTCGATAAAAACTAATAAAACCGAAAACTGTTTCCCTGATTGATACCCGCA (SEQ ID NO. 123)
LDR en dirección 3' ver-A	iCDx-2114A-TMEM90B-F-S3-Dn	/5Phos/AAAAACGCGAAAAAACTACTATACGAATTCG ATAAAAACTAATAAAACCGTTTCCCTGATTGATACCCGCA (SEQ ID NO. 124)
Sonda en tiempo real ver-B	iCDx-2115B-TMEM90B-F-S3-RT-Pb	/5HEX/TTCACCTCG/ZEN/AAAAACGCGAAAAAACTACT/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 125)
Sonda en tiempo real ver-D	iCDx-2115D-TMEM90B-F-S3-RT-Pb	/5HEX/TTCACCTCG/ZEN/AAAGACGCGAAAAAACTACTATACG/3IABkFQ/ (SEQ ID NO. 126)
Sonda en tiempo real ver-A	iCDx-2115A-TMEM90B-F-S3-RT-Pb	/5H EX/CCTTACCAC/ZEN/CTCGAAAAACGCGAA/31ABkFQ/ (SEQ ID NO. 127)
Cebador marcador directo	iCDx-2116-TMEM90B-F-S3-RT-FP	TGGATCGAGACGGAATGCAAC (SEQ ID NO. 128)
Cebador marcador inverso	iCDx-2117-TMEM90B-F-S3-RT-RP	TGCGGGTATCAATCAGGGAAAC (SEQ ID NO. 129)
Hebra superior de TMEM90B-S1		
Sonda bloqueante 1 de LNA	iCDx-2118-TMEM90B-F-S3-LNA	ACCACCC+C+A+AAAAA+C+A+C+AA (SEQ ID NO. 130)
/5SpC3/ - Separador C3 en 5', /3SpC3/ - Separador C3 en 3', /5Phos/ - 5' Fosfato, /56-FAM/ - Colorante Fluorescente Fam en 5', /5HEX/ - Colorante Fluorescente HEX™, /ZEN/ - ZEN™ Flourescent Quencher™, /3IABkFQ/ - Inactivador fluorescente Iowa Black® en 3', gama espectral verde a rosa, "+" - Base de ácido nucleico bloqueada, "rA" - base de ribonucleótido riboadenosina; "rT" - base de ribonucleótido ribotimidina; "rG" - base de ribonucleótido riboguanosina; "rC" - base de ribonucleótido ribocitosina		

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra, o de otras muestras, en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados, comprendiendo dicho método:

proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen potencialmente la secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos y/o uno o más restos metilados;
proporcionar una o más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) en la muestra;
proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios (a) un primer cebador de oligonuclótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia adyacente a la secuencia de nucleótidos diana y (b) un segundo cebador de oligonuclótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una parte de un producto de extensión formado a partir del primer cebador de oligonuclótidos primario;
combinar la muestra, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, la una o más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) en la muestra, una mezcla de desoxinucleótidos, que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa;
someter la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa a condiciones adecuadas para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, y uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando así productos de extensión primarios que comprenden la secuencia de nucleótidos diana o un complemento de la misma;
combinar los productos de extensión primarios con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla de reacción de ligadura, en donde cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene un porción específica del cebador en 5' y una porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 3', y (b) una segunda sonda d oligonucleótidos que tiene un porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 5' y una porción específica del cebador en 3' y en donde la primera y la segunda sondas de nucleótidos de un conjunto de sondas están configuradas para hibridarse, de forma específica de la base, sobre una secuencia de nucleótidos diana complementaria de un producto de extensión primario;
someter la mezcla de la reacción de ligadura a uno o más ciclos de reacción de ligadura, por lo cual, la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de productos ligadas en la mezcla de reacción de ligadura en donde cada secuencia de producto ligada comprende la porción específica del cebador en 5', las porciones específicas de la diana y la porción específica del cebador en 3';
proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos secundarios (a) un primer cebador de oligonucleótidos secundarios que comprende la misma secuencia de nucleótidos que la porción específica del cebador en 5' de la secuencia del producto ligada y (b) un segundo cebador de oligonucleótidos secundarios que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la porción específica del cebador en 3' de la secuencia del producto ligada;
combinar las secuencias de productos ligadas, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos secundarios, la una o más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU), una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP y una ADN polimerasa para formar una segunda mezcla de reacción en cadena de la polimerasa;
someter la segunda mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa a condiciones adecuadas para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, y en uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando de esta manera productos de extensión secundarios; y
detectar y distinguir los productos de extensión secundarios en la muestra para identificar la presencia de una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen secuencias de nucleótidos diana que difieren de las secuencias de nucleótidos en otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados.

2. Un método para identificar, en una muestra, una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen una secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra, o de otras muestras, mediante uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos y/o uno o más restos metilados, comprendiendo dicho método:

proporcionar una muestra que contiene una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen potencialmente

la secuencia de nucleótidos diana que difiere de las secuencias de nucleótidos de otras moléculas de ácidos nucleicos en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos y/o uno o más restos metilados;
proporcionar una o más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) en la muestra;
proporcionar uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, comprendiendo cada conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios (a) un primer cebador de oligonuclótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia adyacente a la secuencia de nucleótidos diana y (b) un segundo cebador de oligonuclótidos primario que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una parte de un producto de extensión formado a partir del primer cebador de oligonuclótidos primario;
combinar la muestra, el uno o más conjuntos de cebadores de oligonucleótidos primarios, la una o más enzimas capaces de digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) en la muestra, una mezcla de desoxinucleótidos que incluye dUTP, y una ADN polimerasa para formar una mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa;
someter la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa a condiciones adecuadas para digerir las moléculas de ácidos nucleicos que contienen desoxiuracilo (dU) presentes en la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, y uno o más ciclos de reacción en cadena de la polimerasa que comprenden un tratamiento de desnaturalización, un tratamiento de hibridación y un tratamiento de extensión, formando así productos de extensión primarios que comprenden la secuencia de nucleótidos diana o un complemento de la misma;
combinar los productos de extensión primarios con una ligasa y uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos para formar una mezcla la reacción de ligadura, en donde cada conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende (a) una primera sonda de oligonucleótidos que tiene un porción en 5' y una porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 3', y (b) una segunda sonda d oligonucleótidos que tiene un porción específica de la secuencia de nucleótidos diana en 5' y una porción en 3', en donde la porción en 5' de la primera sonda de oligonucleótidos del conjunto de sondas es complementaria de una porción de la porción en 3' de la segunda sonda de oligonucleótidos, en donde una sonda del conjunto de sondas comprende un resto generador de señal detectable, y en donde la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas están configuradas para hibridarse, de forma específica de la base, sobre una secuencia de nucleótidos diana complementaria de un producto de extensión primario;
someter la mezcla de la reacción de ligadura a uno o más ciclos de reacción de ligadura, por lo cual, la primera y la segunda sondas de oligonucleótidos del uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos se ligan entre sí para formar secuencias de productos ligadas en la mezcla de reacción de ligadura en donde cada secuencia de producto ligada comprende la porción en 5', las porciones específicas diana, la porción en 3' y el resto generador de señal detectable;
hibridar la porción en 5' de la secuencia del producto ligada a su porción complementaria en 3';
detectar la señal procedente del resto generador de señal detectable que se produce tras dicha hibridación; y
distinguir las secuencias de producto ligadas en la muestra basándose en dicha detección para identificar la presencia de una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen secuencias de nucleótidos diana que difieren de las secuencias de nucleótidos en otras moléculas de ácidos nucleicos de la muestra en uno o más nucleótidos, uno o más números de copias, una o más secuencias de transcritos, y/o uno o más restos metilados.

3. El método de las reivindicaciones 1 o 2 que comprende además:
poner en contacto la muestra con al menos una primera enzima sensible a la metilación para formar una mezcla de reacción con la enzima de restricción antes de, o al mismo tiempo que, dicha mezcla para formar una mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, en donde dicha primera enzima sensible a la metilación escinde las moléculas de ácidos nucleicos de la muestra que contienen uno o más restos sin metilar en al menos una secuencia de reconocimiento de la enzima sensible a la metilación y en donde dicha detección implica la detección de una o más moléculas de ácidos nucleicos que contienen la secuencia de nucleótidos diana, en donde dichas moléculas de ácidos nucleicos contenía inicialmente uno o más restos metilados.

4. El método de la reivindicación 3, en el que el primer cebador de oligonucleótidos primario comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una región de la secuencia de nucleótidos diana que está en dirección 5' del uno o más restos metilados y el segundo cebador de oligonucleótidos primario comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que una región de la secuencia de nucleótidos diana que está en dirección 3' del uno o más restos metilados.

5. El método de la reivindicación 3 que comprende además:
someter la mezcla de reacción con la enzima de restricción a tratamiento con bisulfito en condiciones adecuadas para convertir los restos de citosina no metilados en restos de uracilo antes de dicha combinación para formar una mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, en donde el primer cebador de oligonuclótidos primario del conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios proporcionado comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de la secuencia de nucleótidos diana tratada con bisulfito que contiene uno o más sitios de restricción metilados no escindidos, y el segundo cebador de oligonuclótidos primario del conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios proporcionado comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una porción del producto de extensión formado a partir del primer cebador de oligonucleótidos.

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

proporcionar una o más segundas enzimas sensibles a la metilación que escinden moléculas de ácidos nucleicos que contienen restos no metilados dentro de una secuencia de reconocimiento de una enzima sensible a la metilación; y
combinar la al menos una segunda enzima sensible a la metilación con la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa que comprende la mezcla de reacción con enzima de restricción tratada con bisulfito para formar una segunda mezcla con enzima de restricción, en donde dicha segunda enzima sensible a la metilación escinde las moléculas de ácidos nucleicos potencialmente presentes de la muestra que contienen uno o más restos sin metilar dentro de al menos una secuencia de reconocimiento de la enzima sensible a la metilación durante dicho tratamiento de hibridación.

7. El método de la reivindicación 5, en el que uno o ambos cebadores de oligonucleótidos primarios del conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios tienen una porción 3' que comprende un nucleótido o un análogo nucleotídico escindible y un grupo bloqueante, de forma que el extremo 3' de dicho cebador o cebadores no es adecuado para la extensión de la polimerasa, comprendiendo dicho método además:

escindir el nucleótido o el análogo nucleotídico escindible de uno o ambos cebadores de oligonucleótidos durante dicho tratamiento de hibridación, liberando de esta manera los extremos 3'OH libres en uno o ambos cebadores de oligonucleótidos antes de dicho tratamiento de extensión;
opcionalmente
en donde el primer cebador de oligonuclótidos primario del conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios comprende una porción en 5' que tiene una secuencia de nucleótidos que es la misma que la porción de la secuencia de nucleótidos de una secuencia diana no metilada tratada con bisulfito con la que se hibrida el cebador de oligonuclótidos primario, pero tiene uno o más emparejamientos incorrectos en la secuencia de nucleótidos respecto a una porción correspondiente de la secuencia de nucleótidos de la secuencia diana metilada tratada con bisulfito.

8. El método de la reivindicación 4 que comprende además;
proporcionar uno o más oligonucleótidos bloqueantes que pueden hibridarse con una región de la secuencia de nucleótidos diana tratada con bisulfito que contiene restos no metilados; y
poner en contacto la mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa, que comprende la mezcla de reacción con enzima de restricción tratada con bisulfito, con dichos uno o más oligonucleótidos bloqueantes antes de dicha etapa, en donde dichos uno o más oligonucleótidos bloqueantes se hibridan con las secuencias de ácido nucleico diana complementarias tratadas con bisulfito durante dicho tratamiento de hibridación e impiden dicha extensión del cebador de oligonuclótidos primario durante dicho tratamiento de extensión.

9. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que uno o ambos cebadores de oligonucleótidos primarios del conjunto de cebadores de oligonucleótidos primarios tienen una porción 3' que comprende un nucleótido o un análogo nucleotídico escindible y un grupo bloqueante, de forma que el extremo 3' de dichos cebador o cebadores no es adecuado para la extensión de la polimerasa, comprendiendo dicho método además:
escindir el nucleótido o el análogo nucleotídico escindible de uno o ambos cebadores de oligonucleótidos durante dicho tratamiento de hibridación, liberando de esta manera los extremos 3'OH libres en uno o ambos cebadores de oligonucleótidos antes de dicho tratamiento de extensión.

10. El método de la reivindicación 1, en el que la segunda sonda de oligonucleótidos del conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende además una porción de detección unitaq, formando de esta manera secuencias de productos ligadas que comprenden la porción específica del cebador en 5', las porciones específicas diana, la porción de detección unitaq, y la porción específica de cebador en 3', comprendiendo dicho método además:

proporcionar una o más sondas de detección unitaq, en donde cada sonda de detección unitaq se hibrida con una porción de detección unitaq complementaria y dicha sonda de detección comprende una molécula inactivadora y una etiqueta detectable que están separadas entre sí;
añadir la una o más sondas de detección unitaq a la segunda mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa; e
hibridar la una o más sondas de detección unitaq a porciones de detección unitaq complementarias de la secuencia de producto ligada o un complemento de la misma durante dicho sometimiento de la segunda mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa a condiciones adecuadas para uno o más ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa, mediante lo cual, la molécula inactivadora y la etiqueta detectable se escinden de la una o más sondas de detección unitaq durante el tratamiento de extensión, por lo cual dicha detección implica la detección de la etiqueta detectable escindida.

11. El método de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método además:

proporcionar una o más sondas de detección de oligonucleótidos, en donde cada sonda de detección de

oligonucleótidos se hibrida con una porción de unión del producto de ligadura o su complemento, y dicha sonda de detección comprende una molécula inactivadora y una etiqueta detectable que están separadas entre sí;
añadir las una o más sondas de detección de oligonucleótidos a la segunda mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa; e
hibridar la una o más sondas de detección de oligonucleótidos a porciones de detección complementarias de la secuencia de producto ligada o un complemento de la misma durante dicho sometimiento de la segunda mezcla de la reacción en cadena de la polimerasa a condiciones adecuadas para uno o más ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa, mediante lo cual, la molécula inactivadora y la etiqueta detectable se escinden de las una o más sondas de detección de oligonucleótidos durante dicho tratamiento de extensión, por lo cual dicha detección implica la detección de la etiqueta detectable escindida.

12. El método de la reivindicación 2, comprendiendo dicho método además:

inmovilizar al menos una hebra de cada producto de extensión primario sobre un soporte sólido antes o después de dicha ligadura, en donde dicha secuencia de producto ligada se hibrida con el producto de extensión primario inmovilizado; y
eliminar las sondas de oligonucleótidos no ligadas y los productos de ligadura no específicos de diana de la muestra después de dicha ligadura; y
desnaturalizar la secuencia del producto de ligadura del producto de extensión primario inmovilizado antes de dicha hibridación.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la porción en 3' de la primera sonda de oligonucleótidos del conjunto de sondas de oligonucleótidos comprende un nucleótido o un análogo nucleotídico escindible y un grupo bloqueante, de forma que el extremo 3' no es adecuado para la extensión de la polimerasa o la ligadura, comprendiendo dicho método además;
escindir el nucleótido o el análogo nucleotídico escindibles de la primera sonda de oligonucleótidos cuando dicha sonda se hibrida a una secuencia de nucleótidos diana complementaria del producto de extensión primario, liberando de esta manera un 3'OH de la primera sonda de oligonucleótidos antes de dicha ligadura.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que la segunda sonda de oligonucleótidos tiene, en su extremo 5', un oligonucleótido idéntico solapante con el extremo 3' de la primera sonda de oligonucleótidos, y, tras la hibridación de la primera y segunda sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas en posiciones adyacentes de una secuencia de nucleótidos diana complementaria de un producto de extensión primario para formar una unión, el nucleótido solapante idéntico de la segunda sonda de oligonucleótidos forma una solapa en la unión con la primera sonda de oligonucleótidos, comprendiendo dicho método además:
escindir el nucleótido solapante idéntico de la segunda sonda de oligonucleótidos con una enzima que tiene actividad 5' nucleasa liberando de esta forma un fosfato en el extremo 5' de la segunda sonda de oligonucleótidos antes de dicha ligadura.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que el uno o más conjuntos de sondas de oligonucleótidos comprenden además una tercera sonda de oligonucleótidos que tiene una porción específica de diana, en donde la segunda y tercera sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas se configura para hibridarse adyacentes entre sí sobre la secuencia de nucleótidos diana con una unión entre las mismas para permitir la ligadura entre la segunda y la tercera sondas de oligonucleótidos para formar una secuencia de producto ligada que comprende la primera, segunda y tercera sondas de oligonucleótidos de un conjunto de sondas.

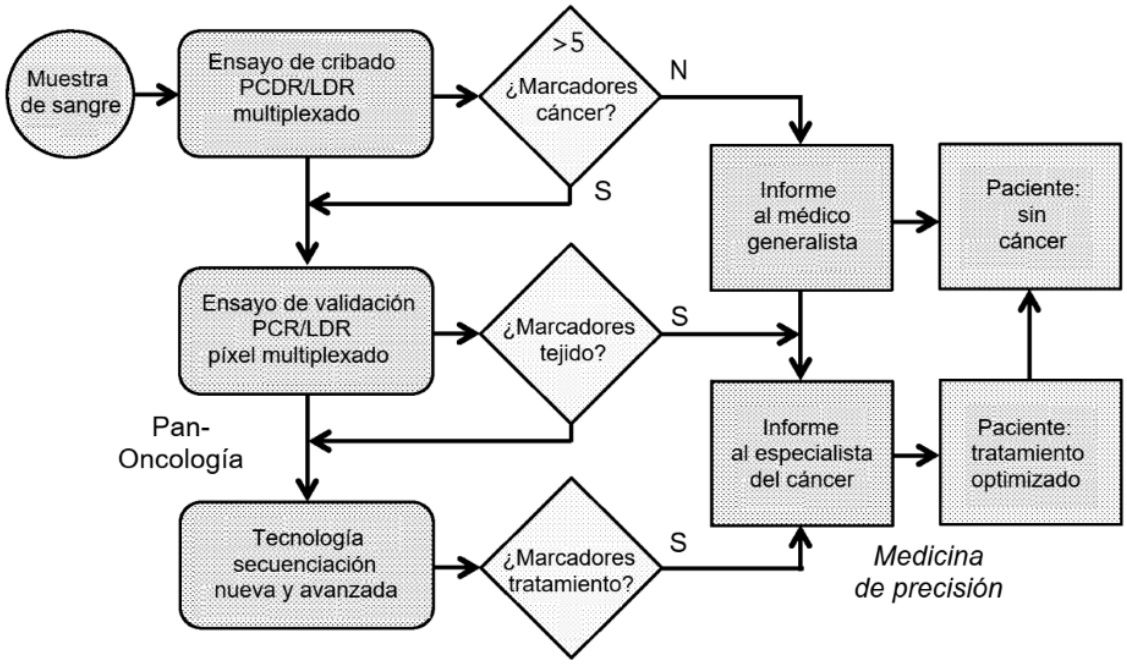

Muestra de sangre
Ensayo de cribado PCDR/LDR multiplexado
>5 ¿Marcadores cáncer?
N
S
Informe al médico generalista
Paciente: sin cáncer
Ensayo de validación PCR/LDR píxel multiplexado
¿Marcadores tejido?
S
Pan-Oncología
Informe al especialista del cáncer
Paciente: tratamiento optimizado
Tecnología secuenciación nueva y avanzada
¿Marcadores tratamiento?
S
Medicina de precisión

Figura 1

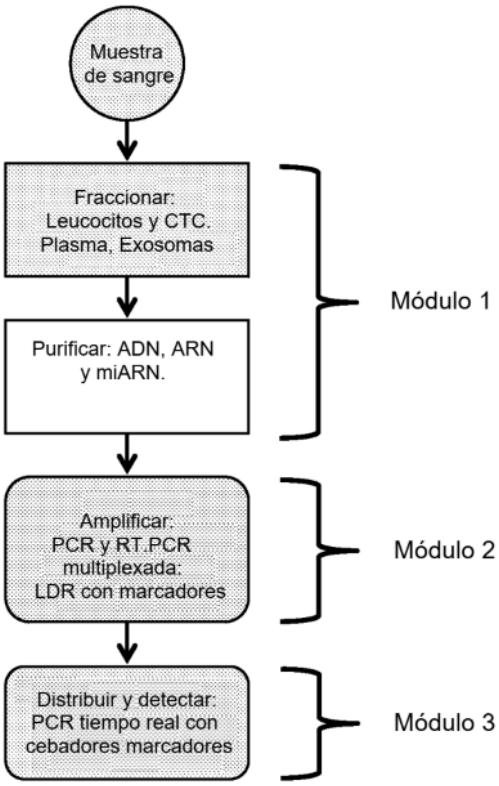

Muestra de sangre
Fraccionar: Leucocitos y CTC. Plasma, Exosomas
Purificar: ADN, ARN y miARN.
Módulo 1
Amplificar: PCR y RT.PCR multiplexada: LDR con marcadores
Módulo 2
Distribuir y detectar: PCR tiempo real con cebadores marcadores
Módulo 3

Figura 2

PCR y RT-PCR multiplexada; LDR con marcadores, 24 muestras.
Distribuir los productos de la LDR de cada muestra en 16 pocillos

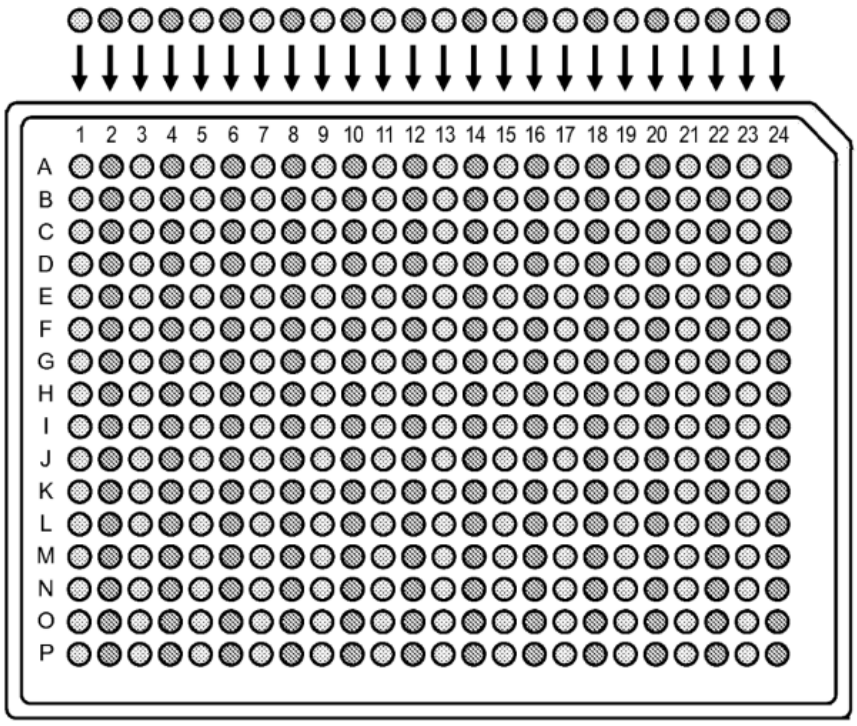


Figura 3

PCR y RT-PCR multiplexada; LDR con marcadores, 24 muestras.

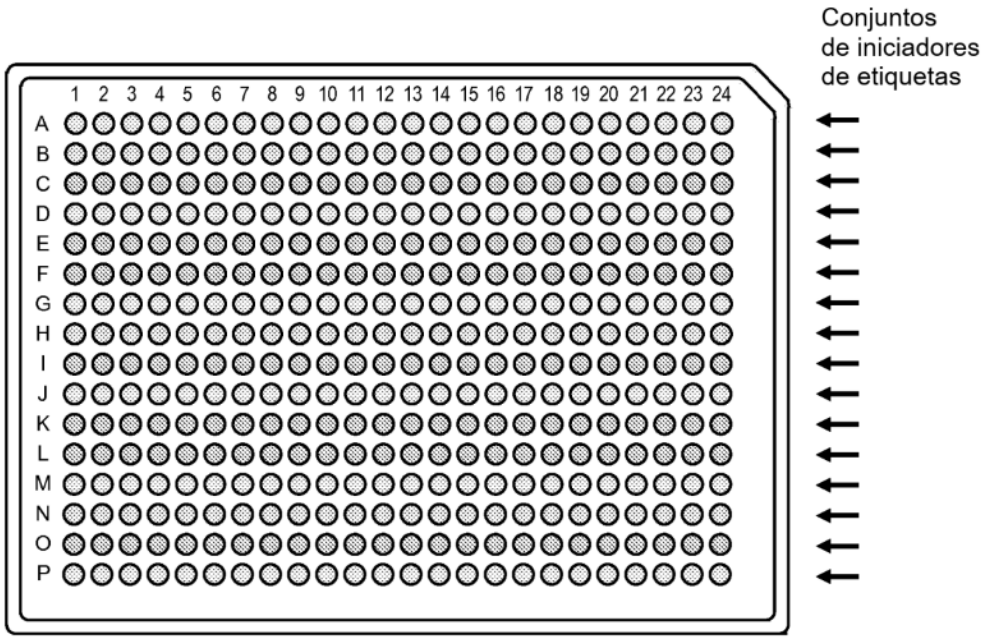
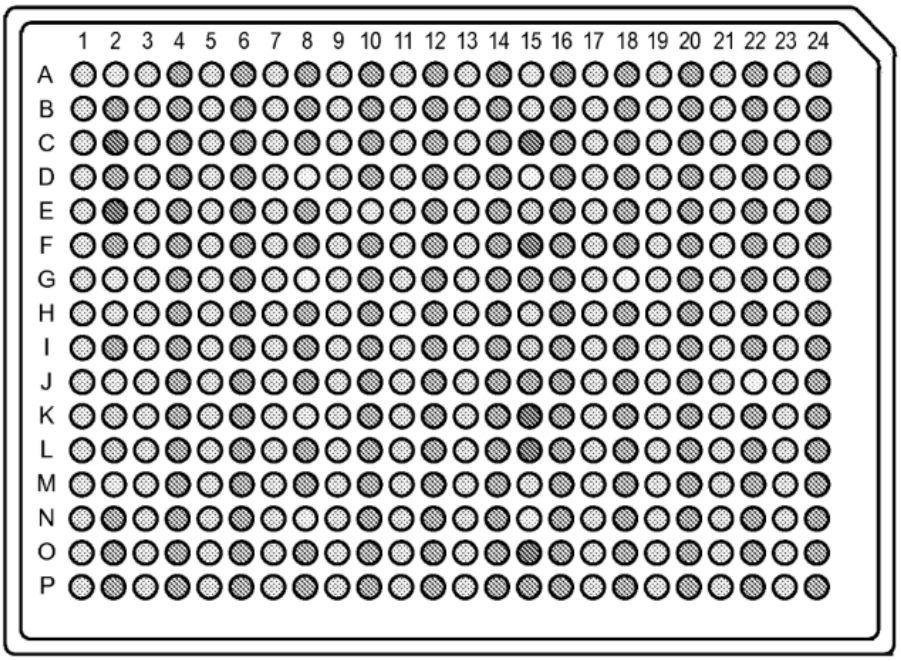


Figura 4

(PCR y RT-PCR multiplexada; LDR con marcadores, 24 muestras)



Resultados de la PCR en tiempo real, 24 muestras

Figura 5

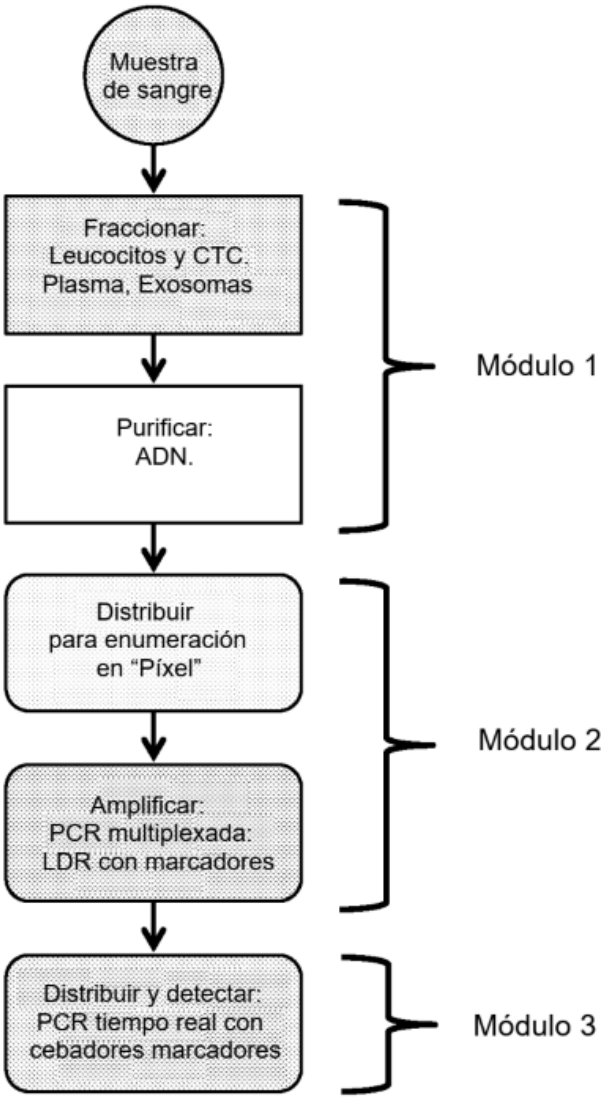

Muestra de sangre
Fraccionar: Leucocitos y CTC. Plasma, Exosomas
Purificar: ADN.
Módulo 1
Distribuir para enumeración en "Píxel"
Amplificar: PCR multiplexada: LDR con marcadores
Módulo 2
Distribuir y detectar: PCR tiempo real con cebadores marcadores
Módulo 3

Figura 6

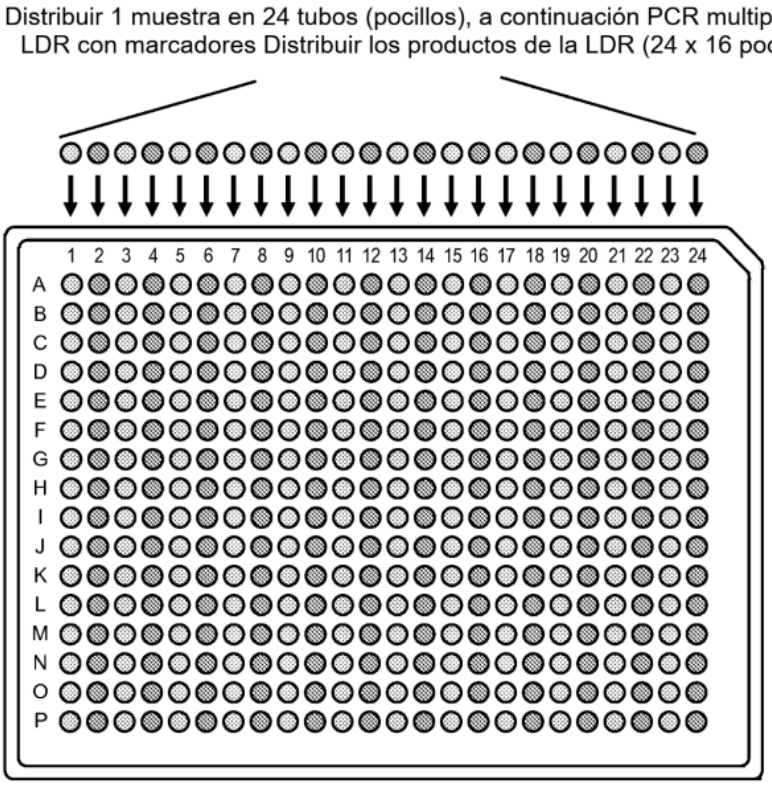

Distribuir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), a continuación PCR multiplexada;
LDR con marcadores Distribuir los productos de la LDR (24 x 16 pocillos).
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P

Figura 7

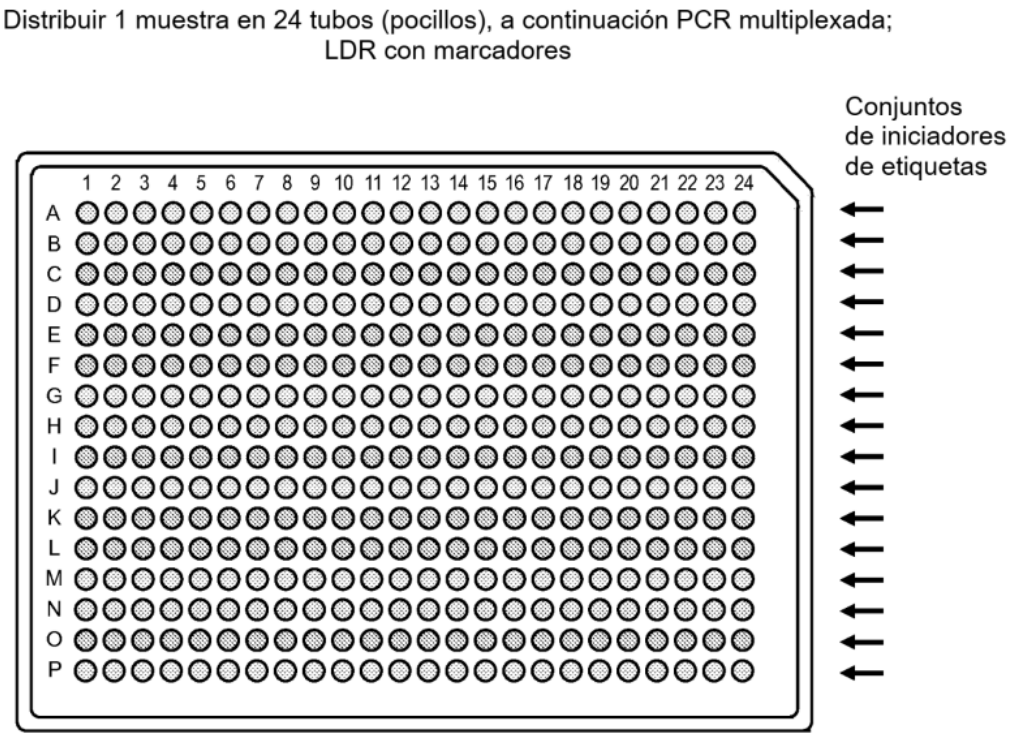
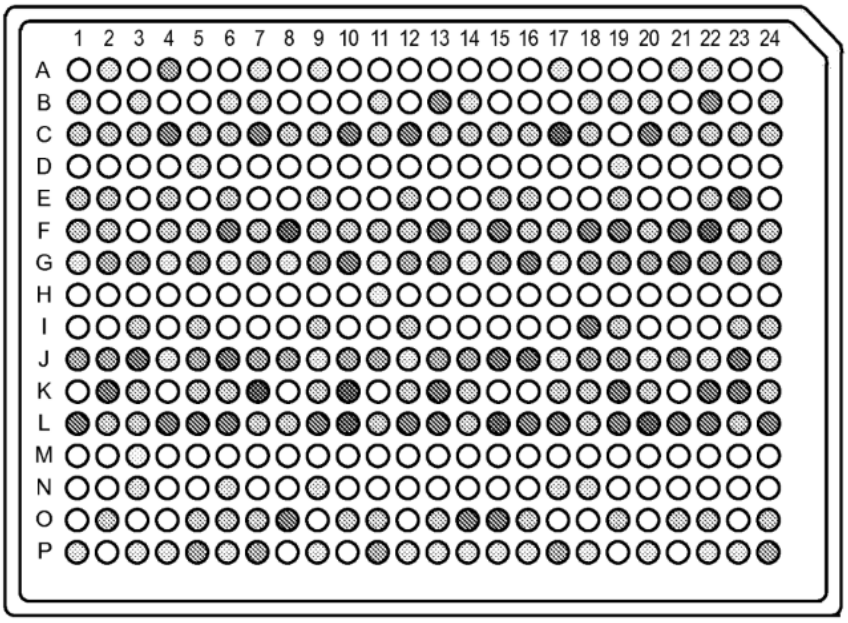

Distribuir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), a continuación PCR multiplexada;
LDR con marcadores
Conjuntos
de iniciadores
de etiquetas
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P

Figura 8

(Distribuir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), a continuación PCR multiplexada;
LDR con marcadores)



Resultados de la PCR en tiempo real, 1 muestra
con enumeración 'Píxel'

Figura 9

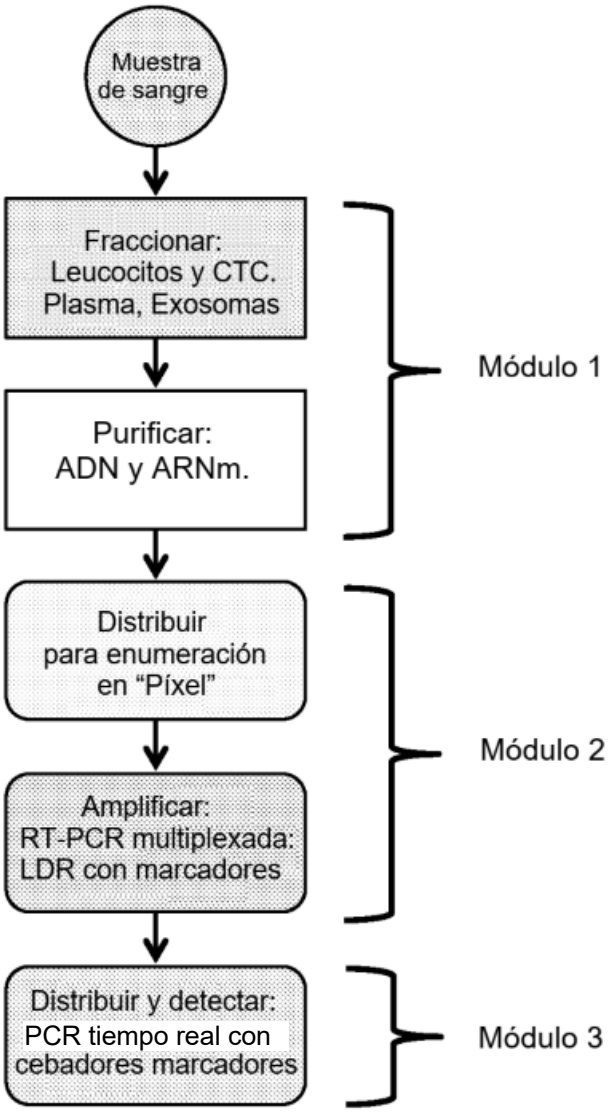

Muestra de sangre
Fraccionar: Leucocitos y CTC. Plasma, Exosomas
Purificar: ADN y ARNm.
Módulo 1
Distribuir para enumeración en "Píxel"
Amplificar: RT-PCR multiplexada: LDR con marcadores
Módulo 2
Distribuir y detectar: PCR tiempo real con cebadores marcadores
Módulo 3

Figura 10

Distribuir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), después RT-PCR multiplexada; LDR con marcadores
Distribuir los productos de la LDR (24 x 16 pocillos).

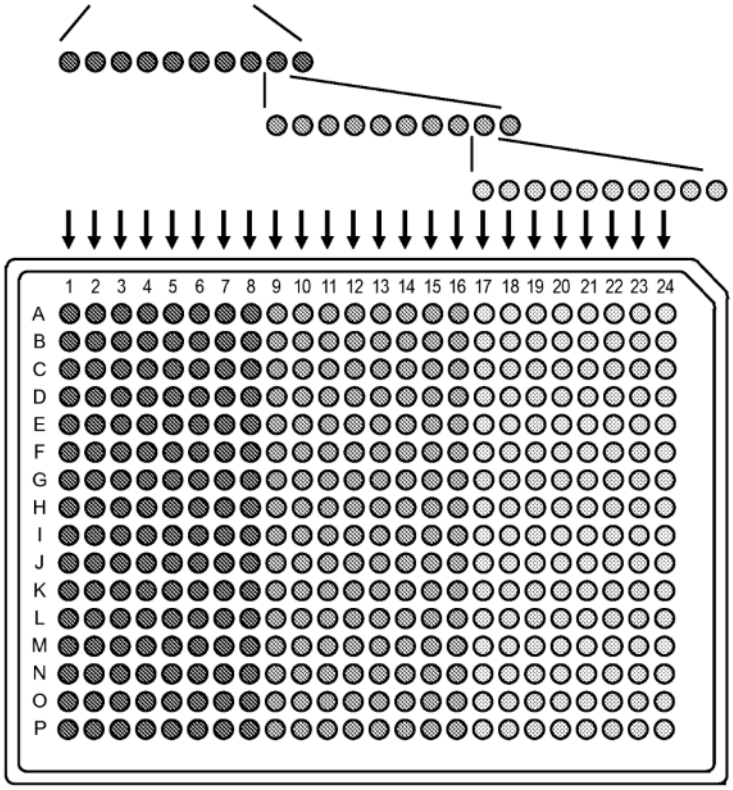


Figura 11

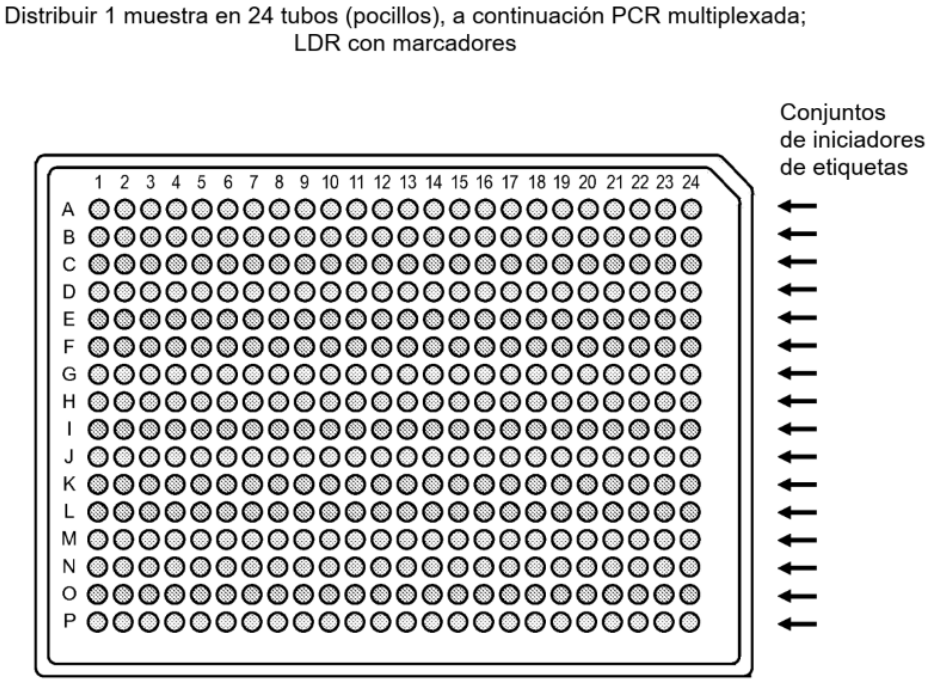
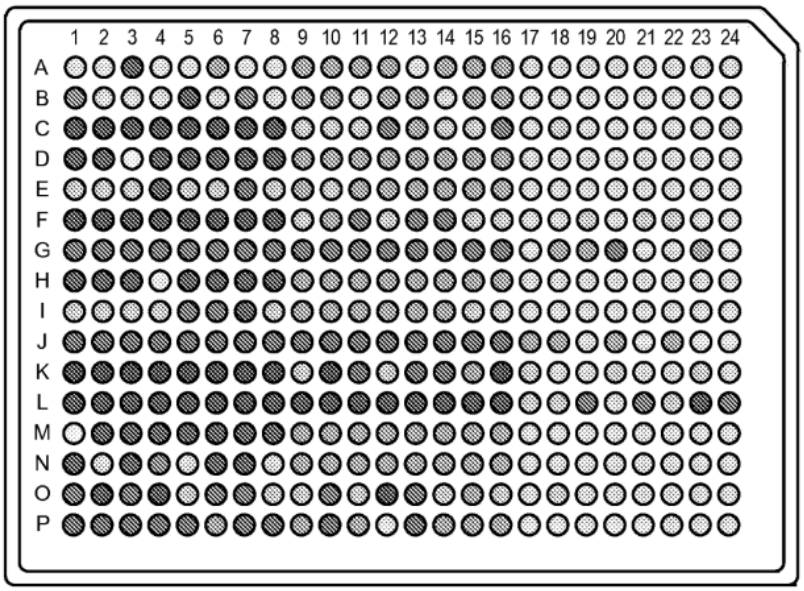

Distribuir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), a continuación PCR multiplexada;
LDR con marcadores
Conjuntos
de iniciadores
de etiquetas
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P

Figura 12

(Diluir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), a continuación RT-PCR multiplexada;
LDR con marcadores)



Resultados de PCR en tiempo real, 1 muestra
con enumeración "Píxel"

Figura 13

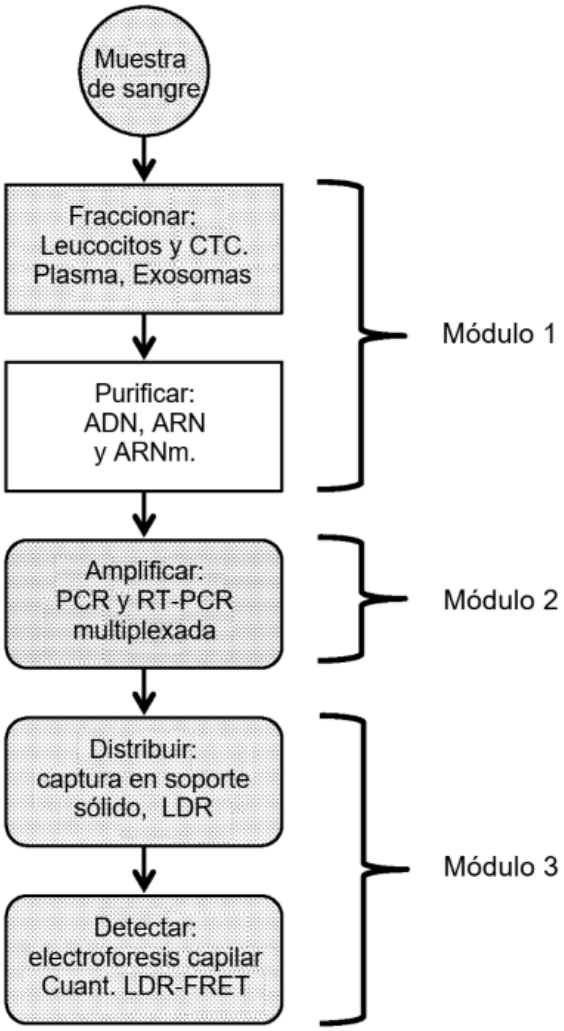

Muestra de sangre
Fraccionar: Leucocitos y CTC. Plasma, Exosomas
Purificar: ADN, ARN y ARNm.
Módulo 1
Amplificar: PCR y RT-PCR multiplexada
Módulo 2
Distribuir: captura en soporte sólido, LDR
Detectar: electroforesis capilar Cuant. LDR-FRET
Módulo 3

Figura 14

PCR y RT-PCR multiplexada; 24 muestras.
Distribuir los productos de la PCR de cada muestra entre 16 pocillos

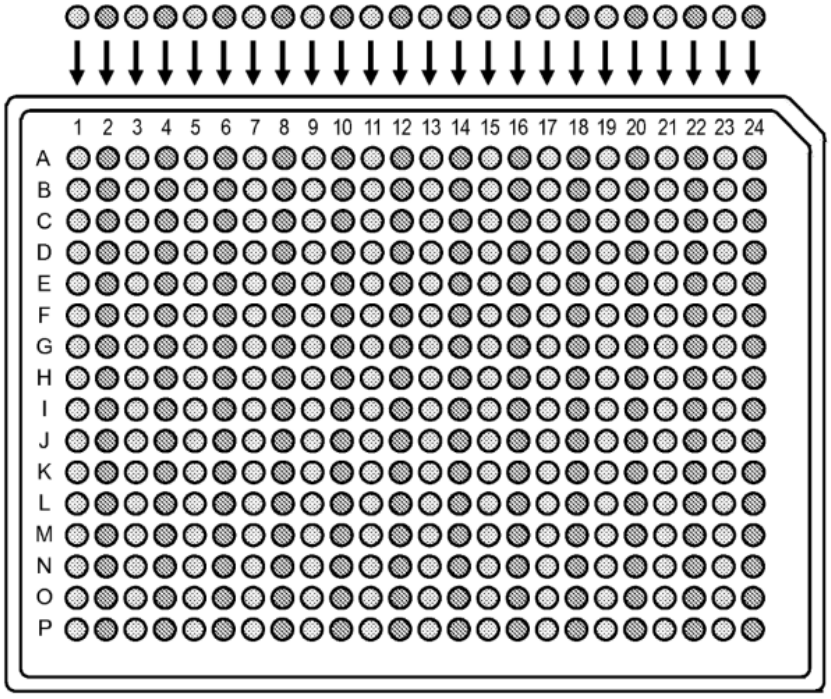
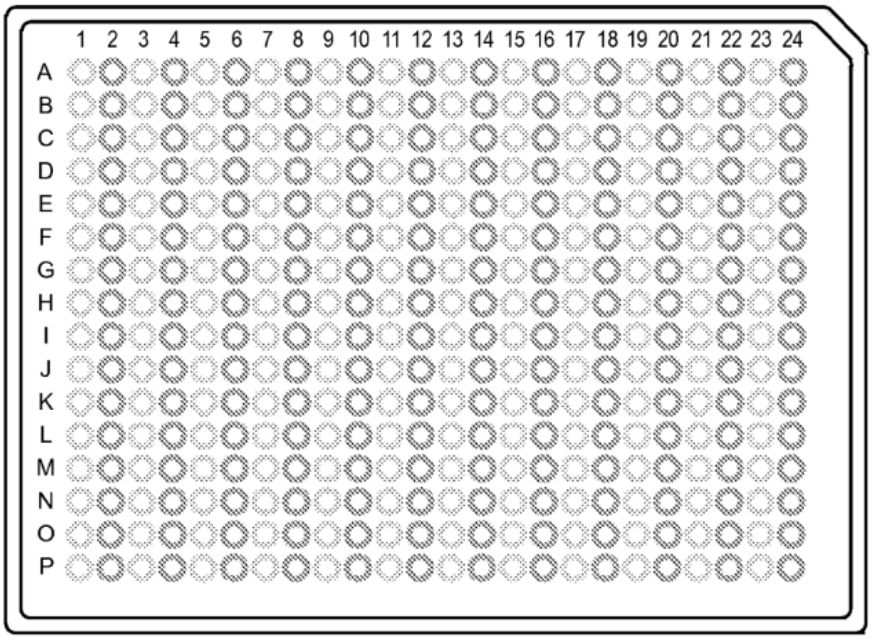


Figura 15

PCR y RT-PCR multiplexada; 24 muestras



Productos de la PCR y RT-PCR capturados sobre un soporte sólido

Figura 16

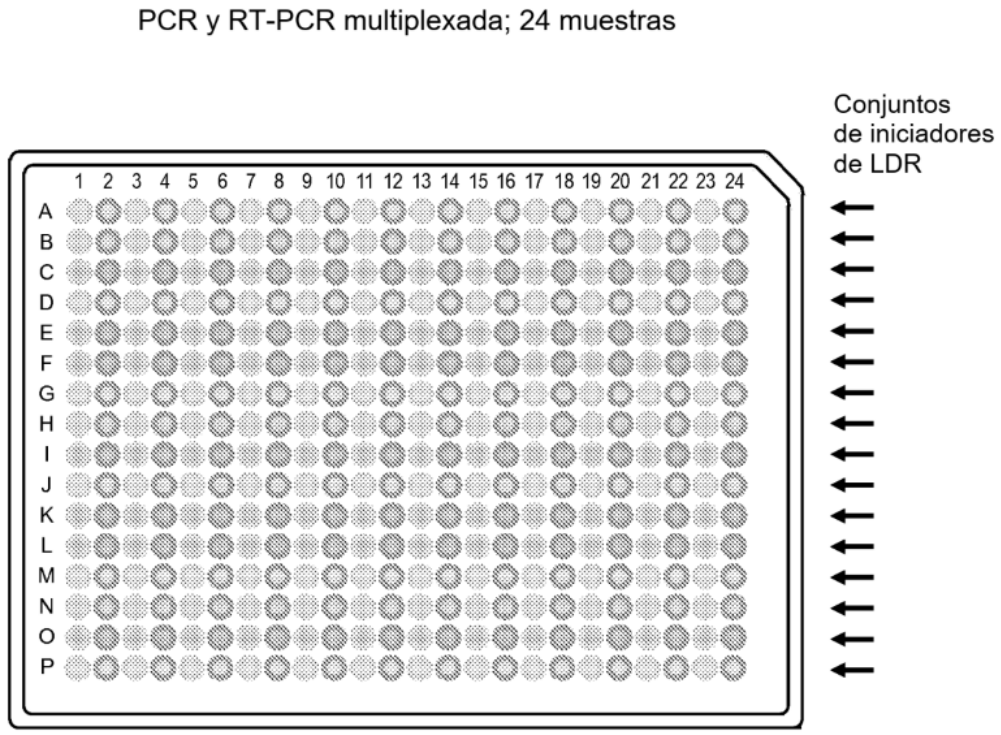
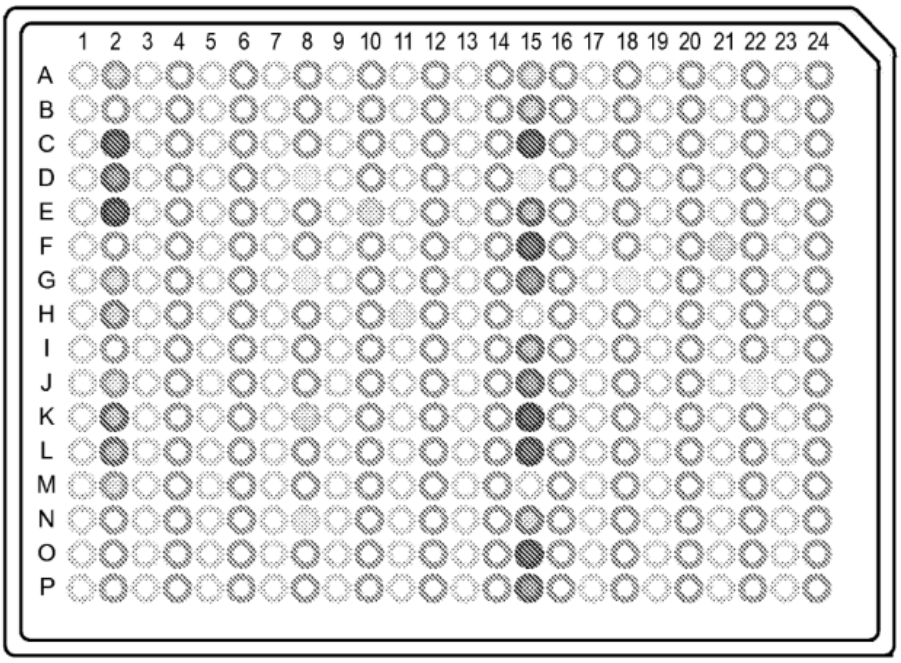

PCR y RT-PCR multiplexada; 24 muestras
Conjuntos de iniciadores de LDR
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P

Figura 17

(PCR y RT-PCR multiplexada; 24 muestras)



Resultados de LDR-FRET, 24 muestras

Figura 18

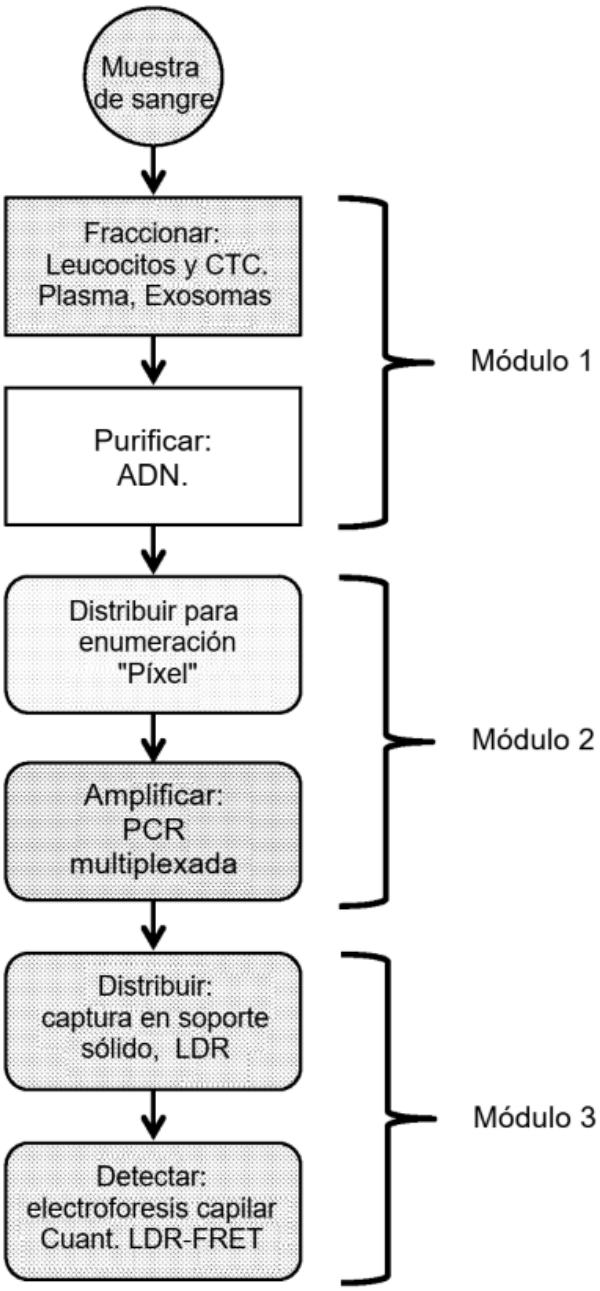

Muestra de sangre
Fraccionar: Leucocitos y CTC. Plasma, Exosomas
Purificar: ADN.
Módulo 1
Distribuir para enumeración "Píxel"
Amplificar: PCR multiplexada
Módulo 2
Distribuir: captura en soporte sólido, LDR
Detectar: electroforesis capilar Cuant. LDR-FRET
Módulo 3

Figura 19

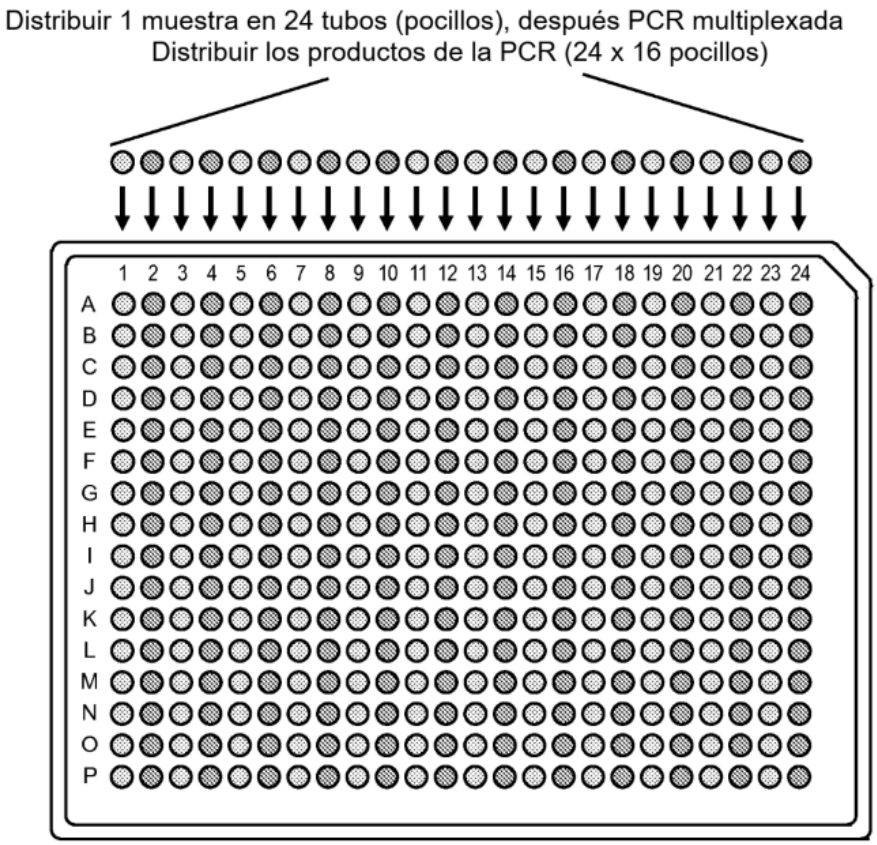
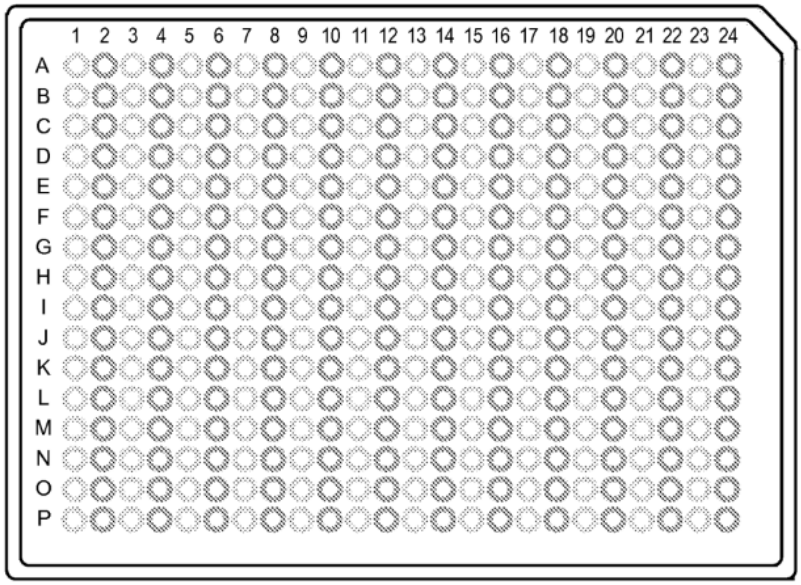

Distribuir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), después PCR multiplexada
Distribuir los productos de la PCR (24 x 16 pocillos)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P

Figura 20

Distribuir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), a continuación PCR multiplexada;



Productos de la PCR capturados sobre un soporte sólido

Figura 21

Distribuir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), a continuación PCR multiplexada

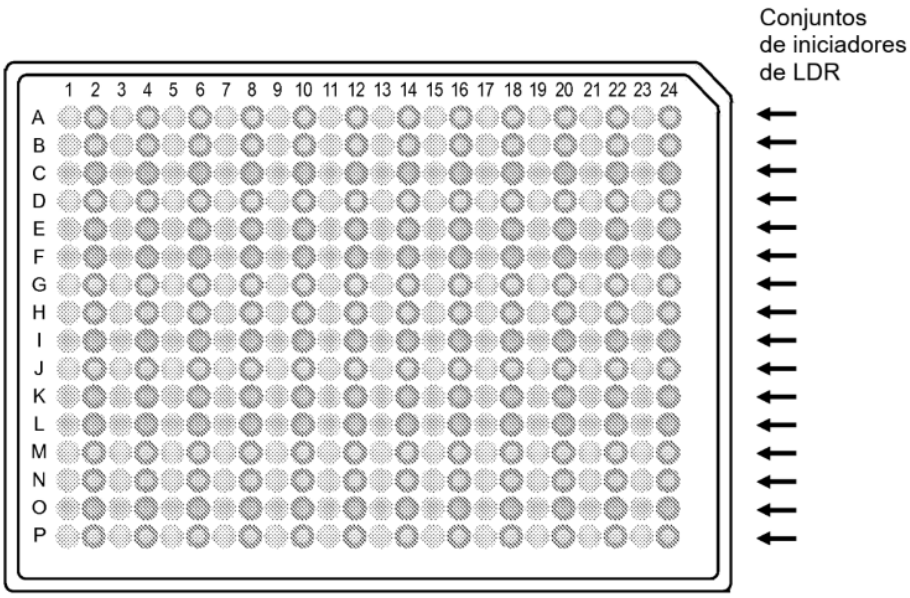
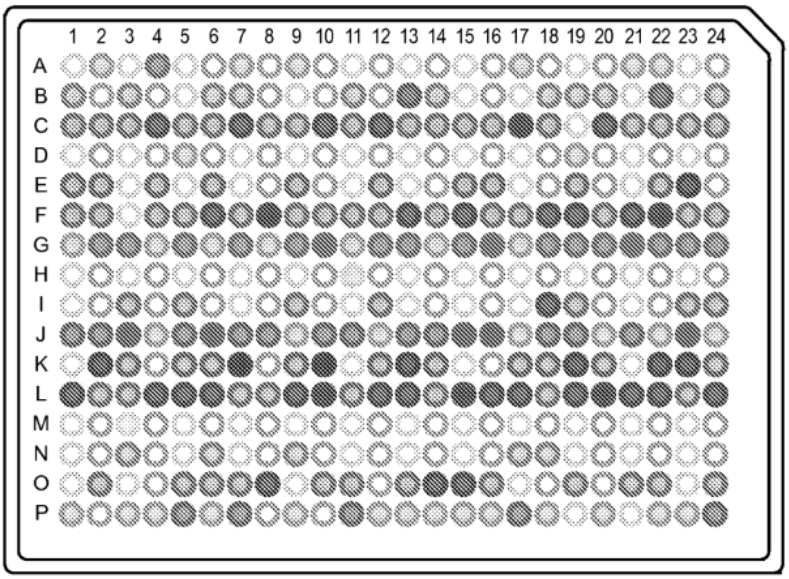


Figura 22

(Distribuir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), a continuación PCR multiplexada)



Resultados de LDR-FRET, 1 muestra
com enumeración "Píxel"

Figura 23

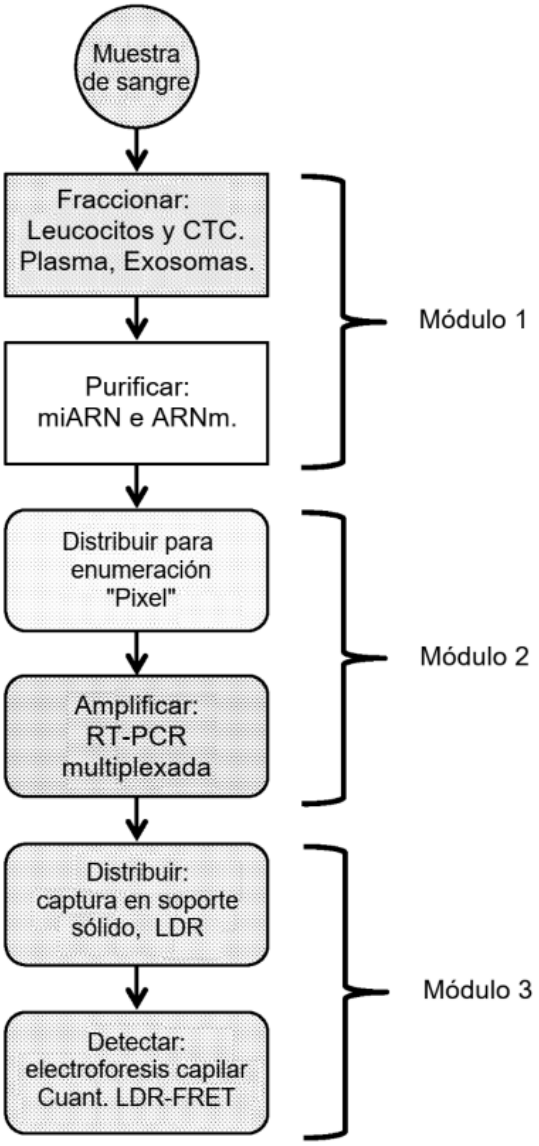

Muestra de sangre
Fraccionar: Leucocitos y CTC. Plasma, Exosomas.
Purificar: miARN e ARNm.
Módulo 1
Distribuir para enumeración "Pixel"
Amplificar: RT-PCR multiplexada
Módulo 2
Distribuir: captura en soporte sólido, LDR
Detectar: electroforesis capilar Cuant. LDR-FRET
Módulo 3

Figura 24

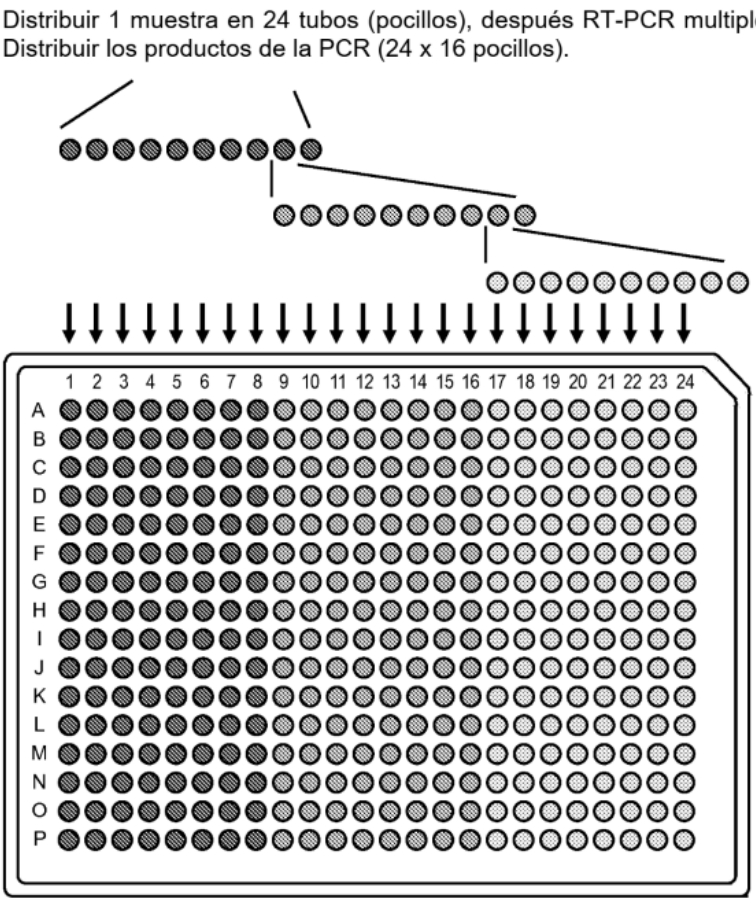
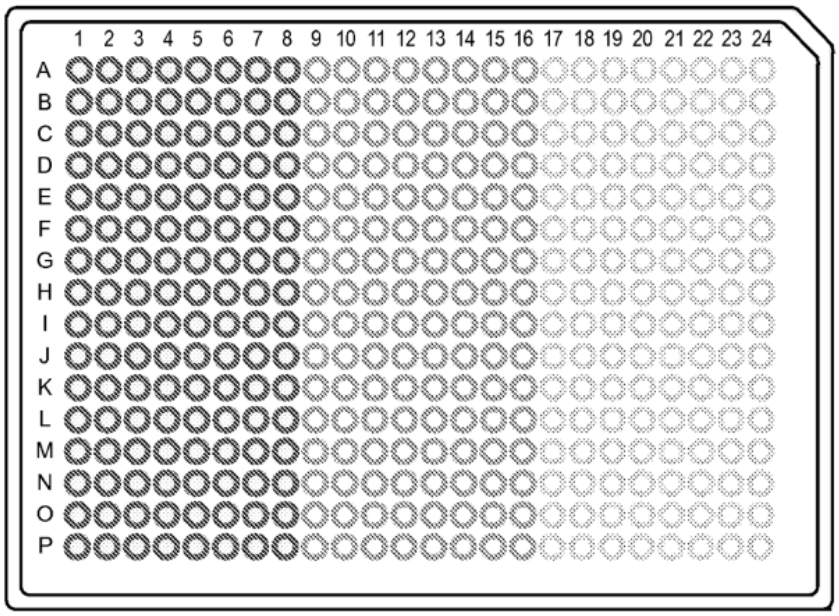

Distribuir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), después RT-PCR multiplexada
Distribuir los productos de la PCR (24 x 16 pocillos).
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P

Figura 25

Diluir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), a continuación RT-PCR multiplexada;



Productos de la RT-PCR capturados sobre un soporte sólido

Figura 26

Diluir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), a continuación RT-PCR multiplexada;

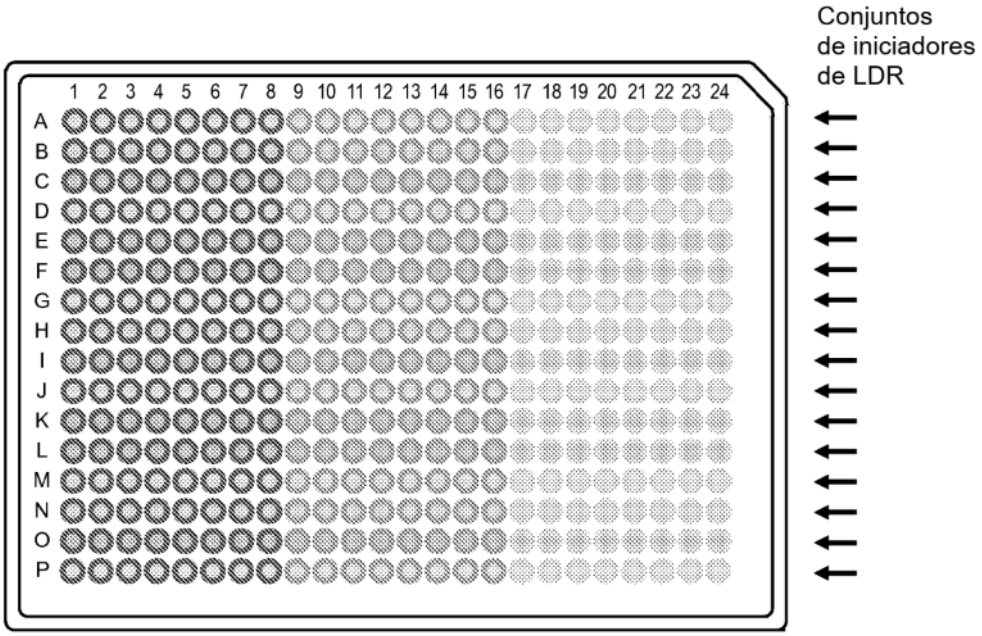
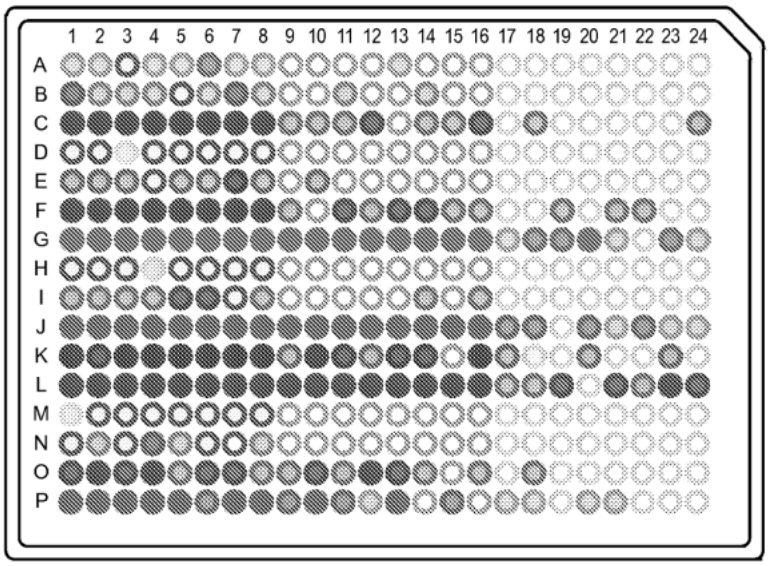


Figura 27

(Diluir 1 muestra en 24 tubos (pocillos), a continuación RT-PCR multiplexada)



Resultados LDR-FRET, 1 muestra
con enumeración 'Píxel'

Figura 28

Distribución de Poisson de 6 a 48 moléculas en 24 pocillos

Pocillos con	6	12	18	24	30	36	42	48
0	19	15	11	9	7	5	4	3
1	5	7	9	9	9	8	7	6
2	1	2	3	4	5	6	6	6
3	0	0	1	1	2	3	4	4
4	0	0	0	0	1	1	2	2
5	0	0	0	0	0	0	1	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0

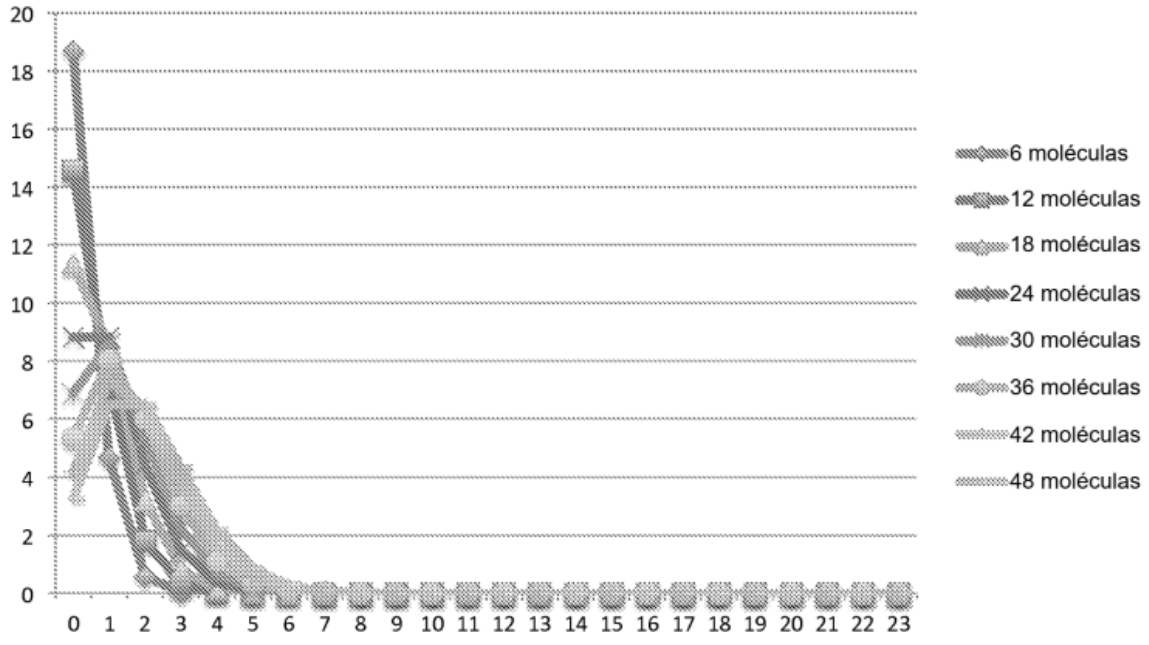


Figura 29

Distribución de Poisson de 12 a 96 moléculas en 24 pocillos

Pocillos con	12	24	36	48	60	72	84	96
0	15	9	5	3	2	1	1	0
1	7	9	8	6	5	4	3	2
2	2	4	6	6	6	5	4	4
3	0	1	3	4	5	5	5	5
4	0	0	1	2	3	4	5	5
5	0	0	0	1	2	2	3	4
6	0	0	0	0	1	1	2	3
7	0	0	0	0	0	1	1	1
8	0	0	0	0	0	0	0	1
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0

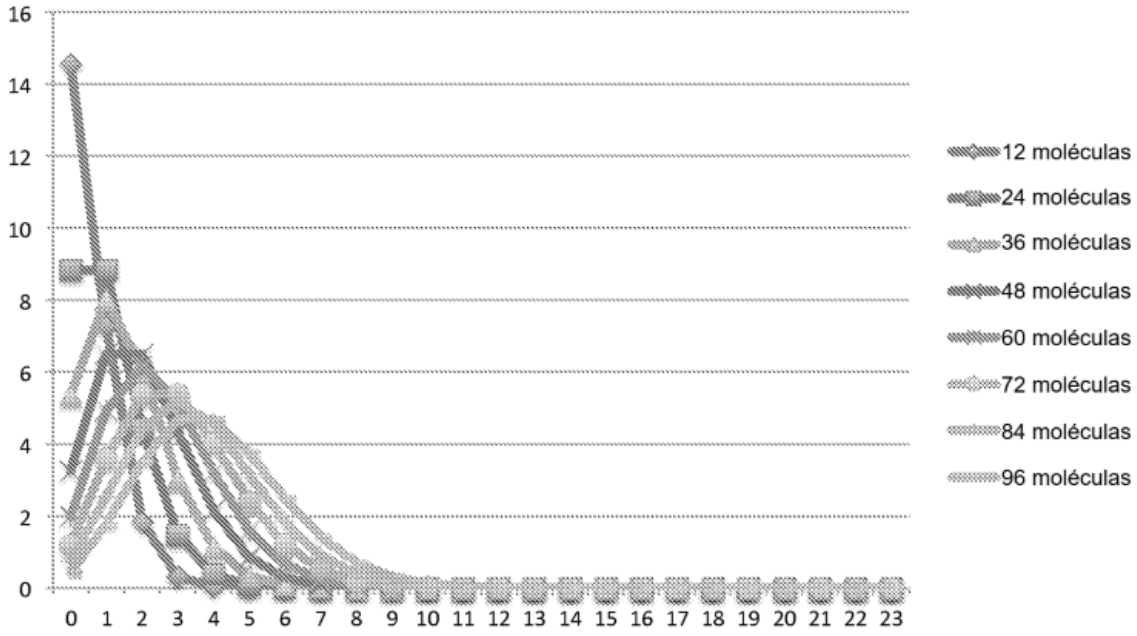


Figura 30

Distribución de Poisson de 12 a 48 moléculas en 48 pocillos

Pocillos con	12	24	36	48	60	72	84	96
0	37	29	23	18	14	11	8	6
1	9	15	17	18	17	16	15	13
2	1	4	6	9	11	12	13	13
3	0	1	2	3	4	6	7	9
4	0	0	0	1	1	2	3	4
5	0	0	0	0	0	1	1	2
6	0	0	0	0	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0
...	...	...	...	...	...	...	...	...
47	0	0	0	0	0	0	0	0

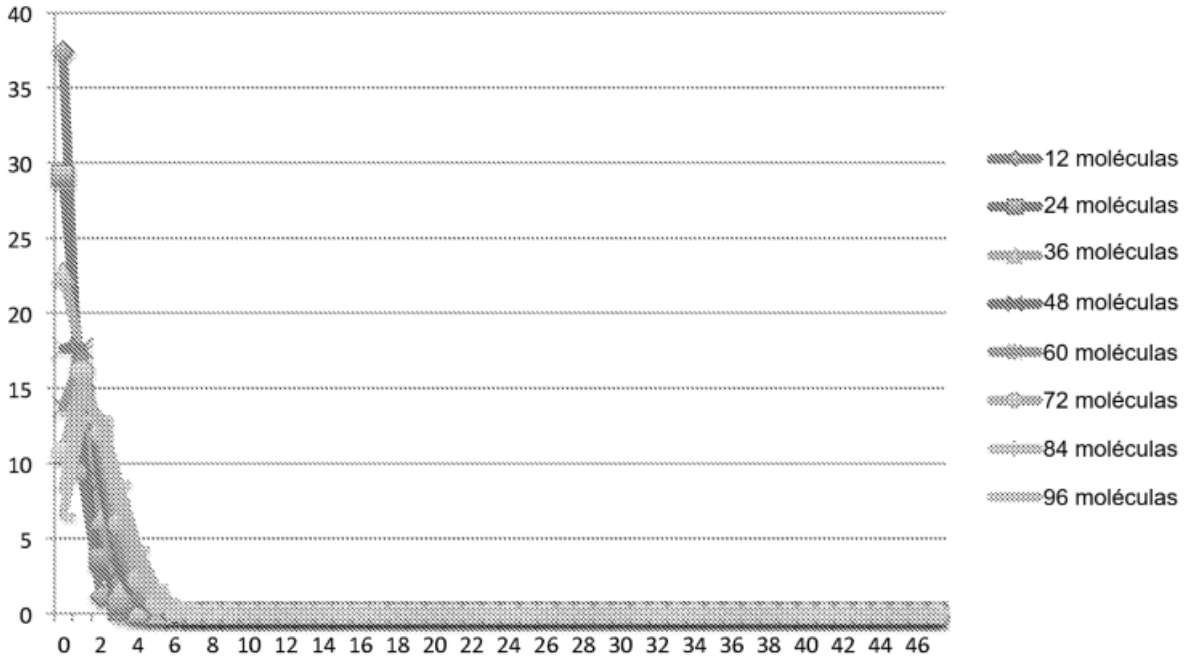


Figura 31

Distribución de Poisson de 24 a 192 moléculas en 48 pocillos

Pocillos con	24	48	72	96	120	144	168	192
0	29	18	11	6	4	2	1	1
1	15	18	16	13	10	7	5	4
2	4	9	12	13	12	11	9	7
3	1	3	6	9	10	11	10	9
4	0	1	2	4	6	8	9	9
5	0	0	1	2	3	5	6	8
6	0	0	0	1	1	2	4	5
7	0	0	0	0	0	1	2	3
8	0	0	0	0	0	0	1	1
9	0	0	0	0	0	0	0	1
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0
...	...	...	...	...	...	...	...	...
47	0	0	0	0	0	0	0	0

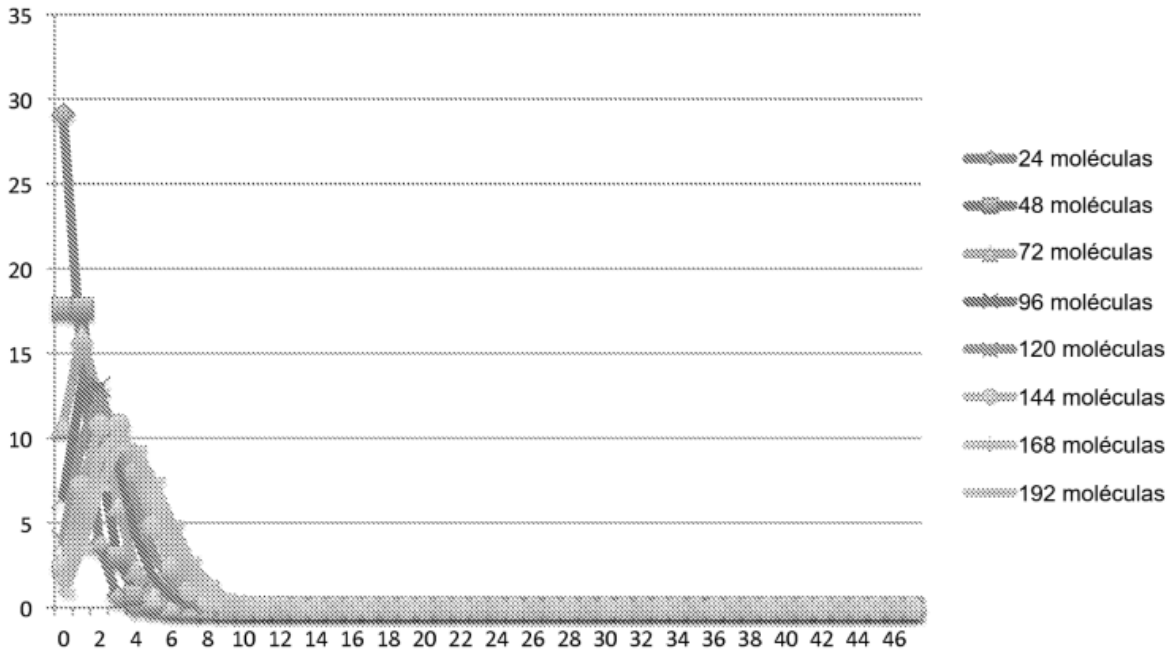


Figura 32

Distribución de Poisson de 1 a 8 moléculas en 8 pocillos

Pocillos con	1	2	3	4	5	6	7	8
0	7	6	5	5	4	4	3	3
1	1	2	2	2	3	3	3	3
2	0	0	0	1	1	1	1	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0

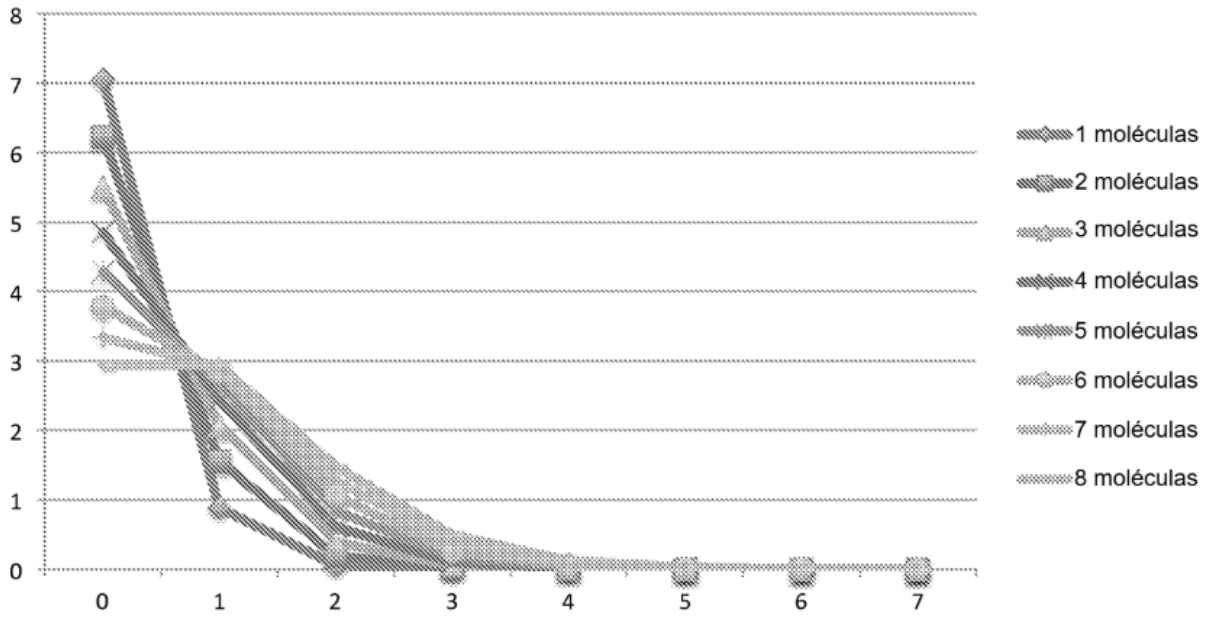


Figura 33

Distribución de Poisson de 2 a 16 moléculas en 8 pocillos

Pocillos con	2	4	6	8	10	12	14	16
0	6	5	4	3	2	2	1	1
1	2	2	3	3	3	3	2	2
2	0	1	1	1	2	2	2	2
3	0	0	0	0	1	1	1	1
4	0	0	0	0	0	0	1	1
5	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0

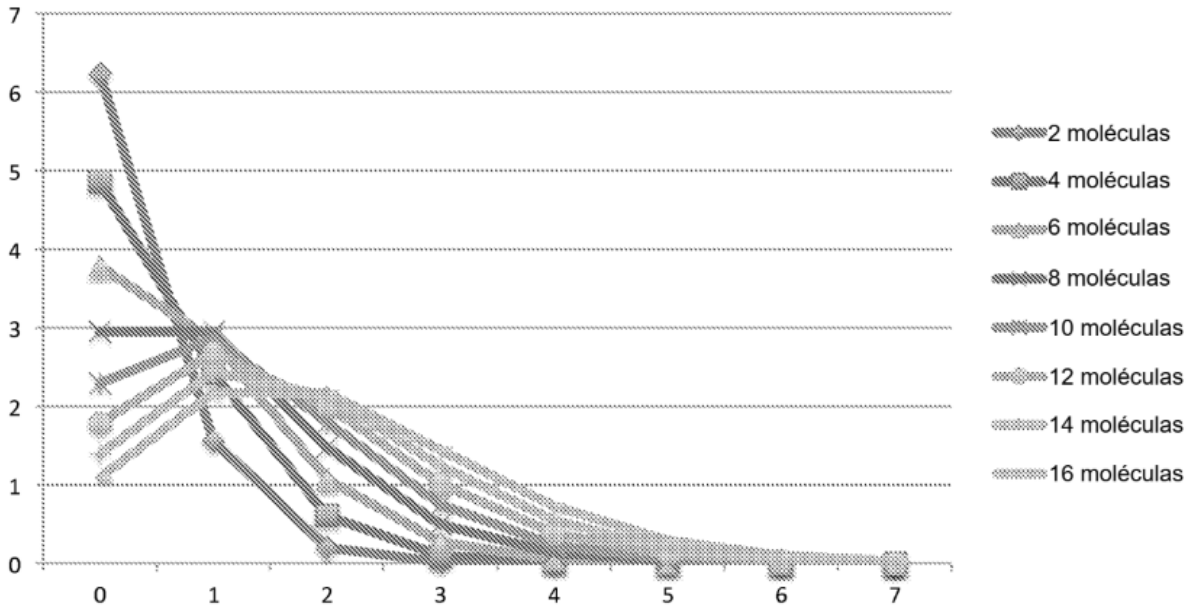


Figura 34

Distribución de Poisson de 4 a 32 moléculas en 8 pocillos

Pocillos con	4	8	12	16	20	24	28	32
0	5	3	2	1	1	0	0	0
1	2	3	3	2	2	1	1	1
2	1	1	2	2	2	2	1	1
3	0	0	1	1	2	2	2	2
4	0	0	0	1	1	1	2	2
5	0	0	0	0	1	1	1	1
6	0	0	0	0	0	0	1	1
7	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0

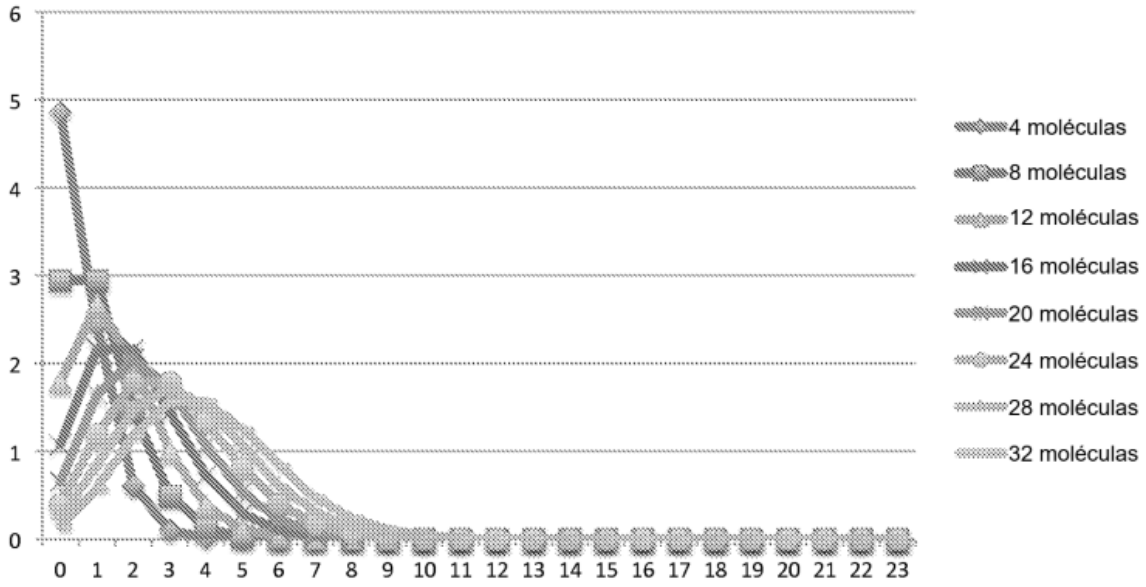


Figura 35

Distribución de Poisson de 8 a 64 moléculas en 8 pocillos

Pocillos con	8	16	24	32	40	48	56	64
0	3	1	0	0	0	0	0	0
1	3	2	1	1	0	0	0	0
2	1	2	2	1	1	0	0	0
3	0	1	2	2	1	1	0	0
4	0	1	1	2	1	1	1	0
5	0	0	1	1	1	1	1	1
6	0	0	0	1	1	1	1	1
7	0	0	0	0	1	1	1	1
8	0	0	0	0	1	1	1	1
9	0	0	0	0	0	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	1	1
11	0	0	0	0	0	0	0	1
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0

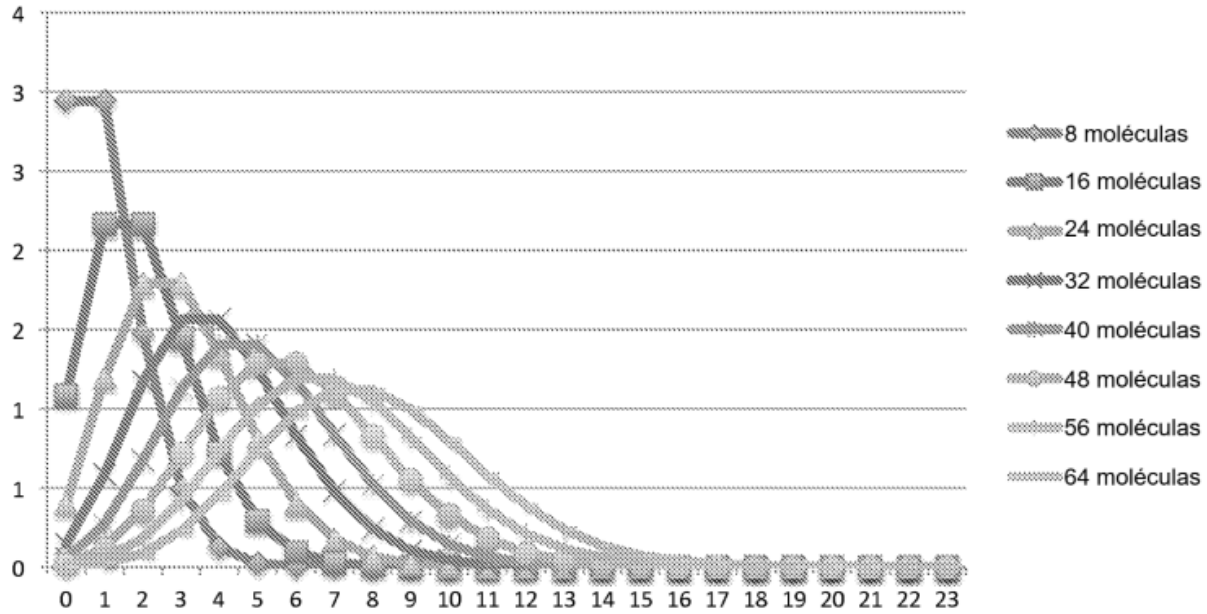


Figura 36

Distribución de Poisson de 16 a 128 moléculas en 8 pocillos

Pocillos con	16	32	48	64	80	96	112	128
0	1	0	0	0	0	0	0	0
1	2	1	0	0	0	0	0	0
2	2	1	0	0	0	0	0	0
3	1	2	1	0	0	0	0	0
4	1	2	1	0	0	0	0	0
5	0	1	1	1	0	0	0	0
6	0	1	1	1	1	0	0	0
7	0	0	1	1	1	0	0	0
8	0	0	1	1	1	1	0	0
9	0	0	1	1	1	1	0	0
10	0	0	0	1	1	1	1	0
11	0	0	0	1	1	1	1	0
12	0	0	0	0	1	1	1	1
13	0	0	0	0	1	1	1	1
14	0	0	0	0	0	1	1	1
15	0	0	0	0	0	1	1	1
16	0	0	0	0	0	0	1	1
17	0	0	0	0	0	0	1	1
18	0	0	0	0	0	0	0	1
19	0	0	0	0	0	0	0	1
20	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0	0	0

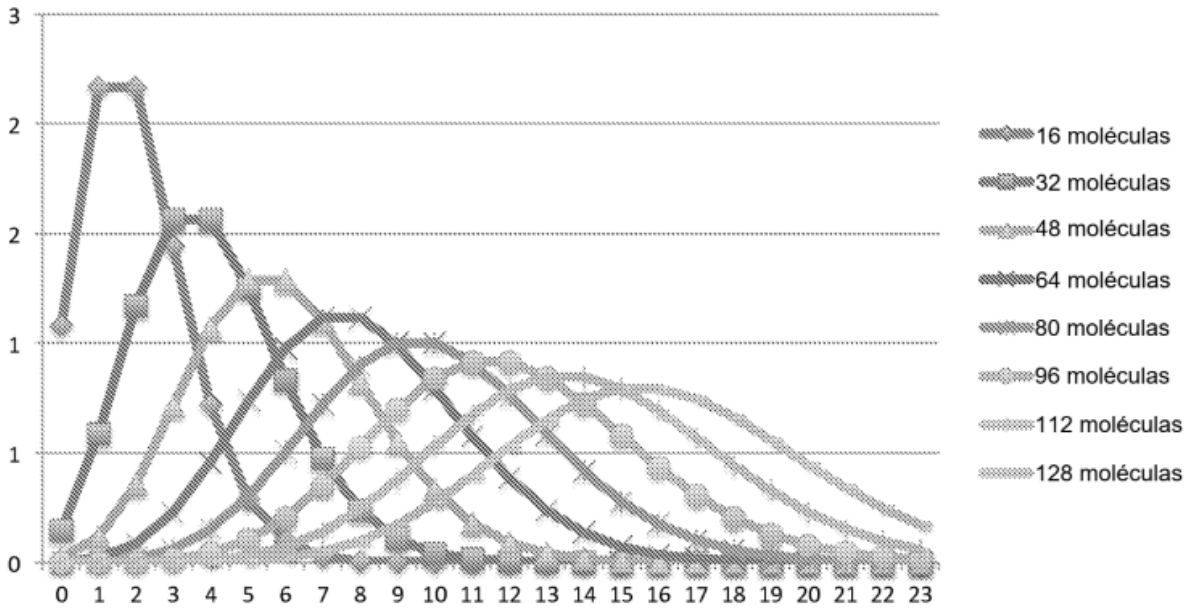


Figura 37

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNlc.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, y amplificar las regiones que contienen mutaciones usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la etapa de amplificación por PCR.) C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Oligonucleótidos de ligadura específicos de la mutación que contienen marcadores (Ai, Ci') para para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura,

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

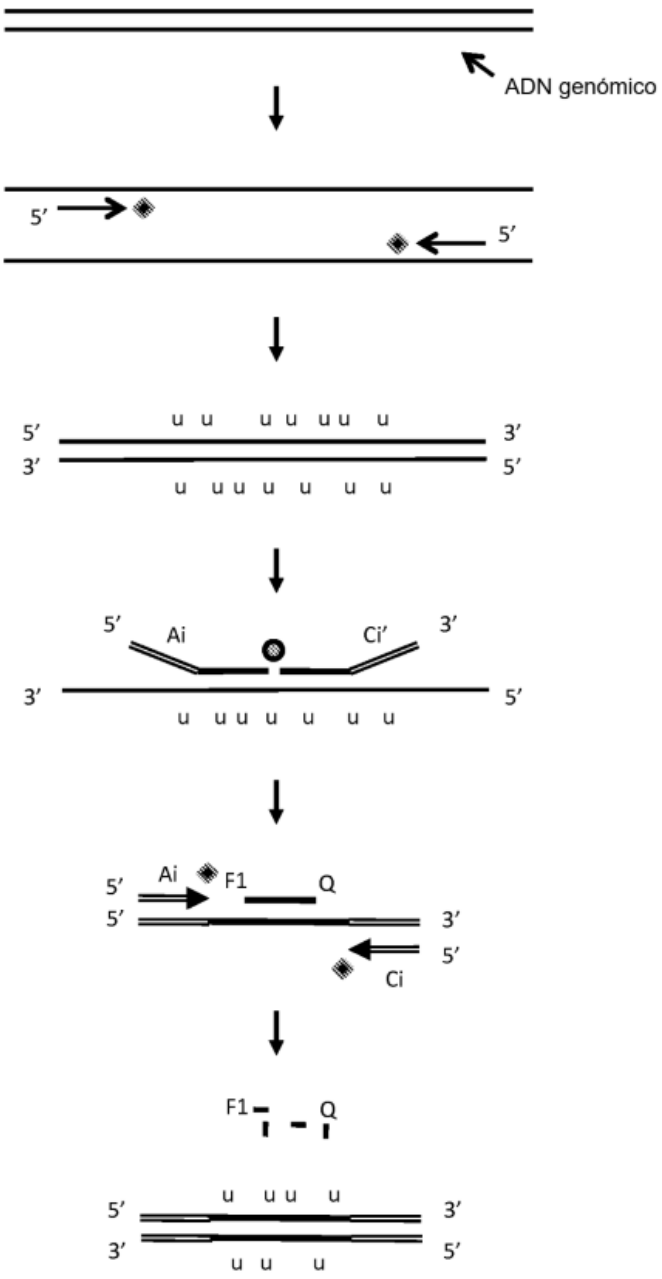


Figura 38

A. Reacción de PCR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNlc.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa), distribuir en alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos, y amplificar amplificar las regiones que contienen mutaciones usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación del cebador universal para agregar una biotina en 5')

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Oligonucleótidos de ligadura específicos de la mutación contienen colas complementarias para la posterior detección por FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no unidos. Desnaturalizar el producto de la diana, dejando que las colas se hibriden y poniendo el donando (D) y el grupo fluorescente (F1) muy cerca, después detectar y enumerar la señal FRET.

O

F. Oligonucleótidos de ligadura específicos de mutación contienen colas complementarias para la posterior detección fluorescente. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí.

G. Desnaturalizar el producto de la diana, dejar que las colas se hibriden y separar el inactivador (Q) del indicador fluorescente (F1). Después detectar y enumerar la señal fluorescente desactivada.

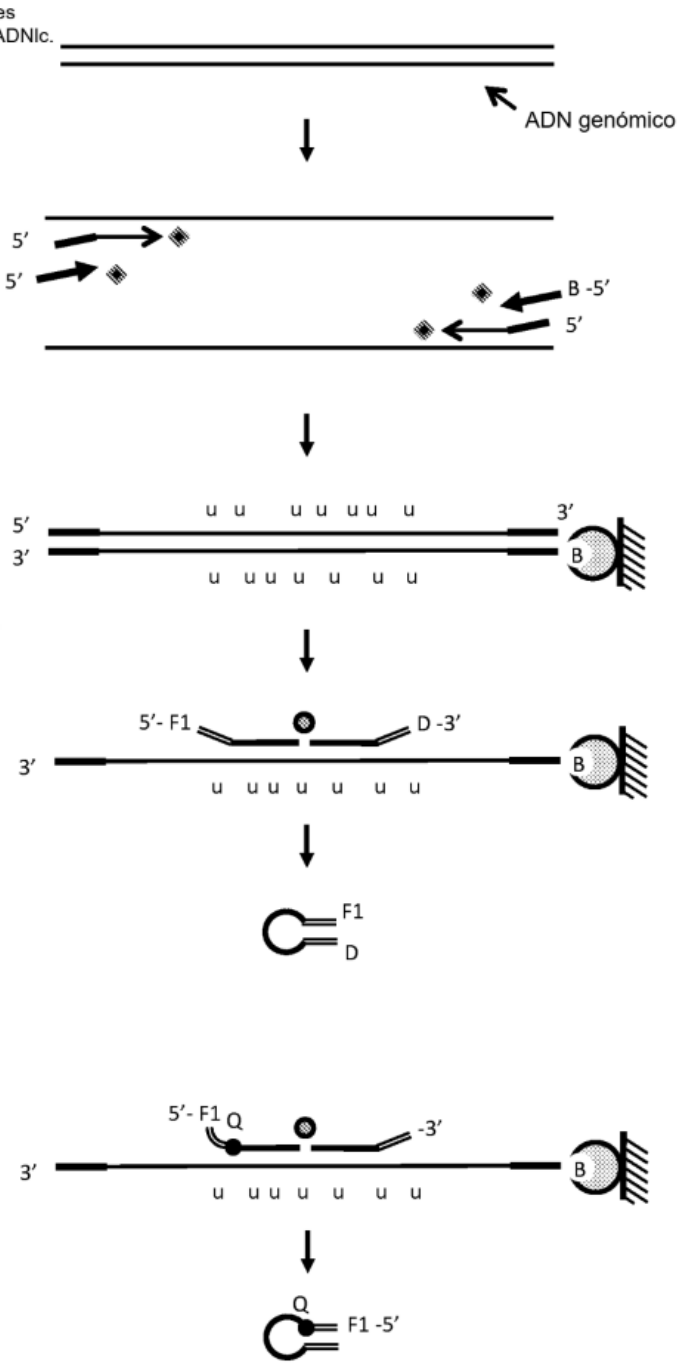


Figura 39

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNlc

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres. Los cebadores específicos de locus se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana. Amplificar las regiones que contienen mutaciones usando PCR (y dUTP). Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la mutación contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura,

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

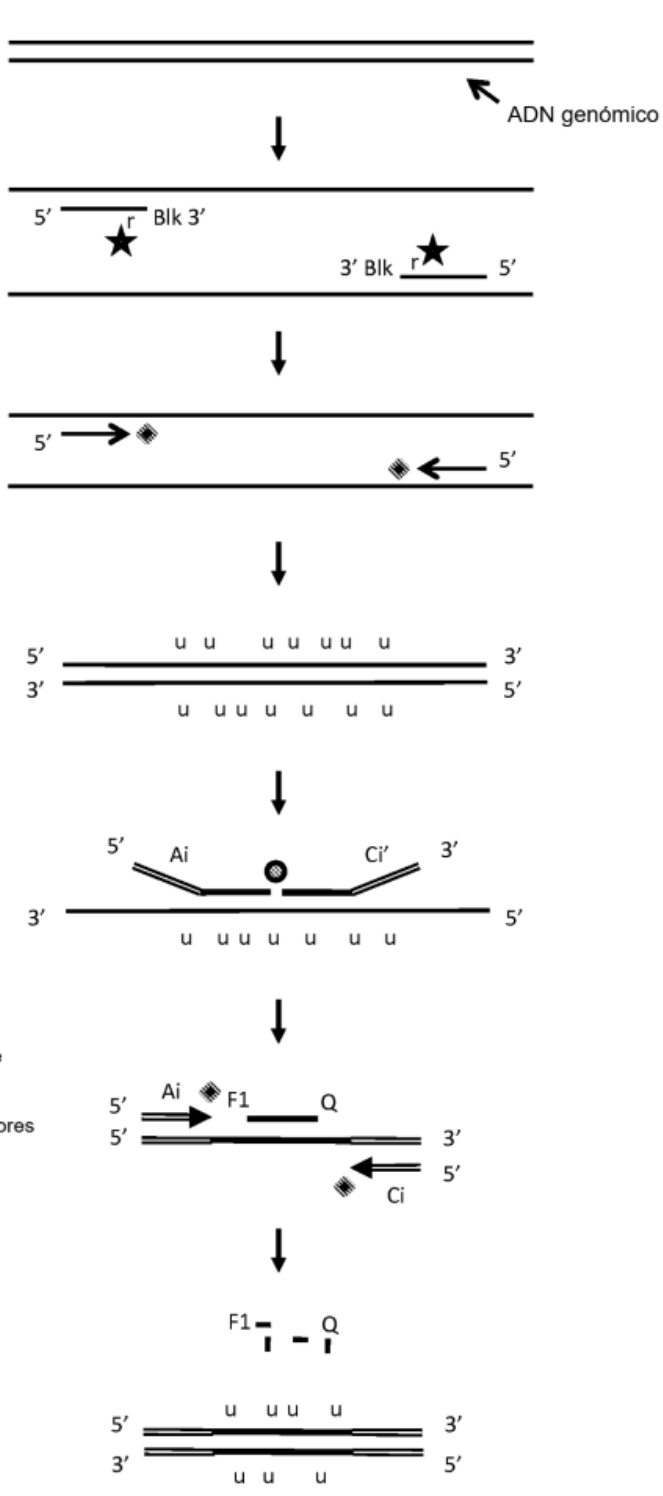


Figura 40

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNlc.

B. Tratar con UDG para prevención de arrastres, y amplificar las regiones que contienen mutaciones usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Ligadura específica de la mutación los oligonucleótidos (Mt) contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR, mientras que las sondas naturales (Wt) no. El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana.

E. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos no bloqueados en 5' y fosforilado en 3'entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

F. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci'). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura,

G. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

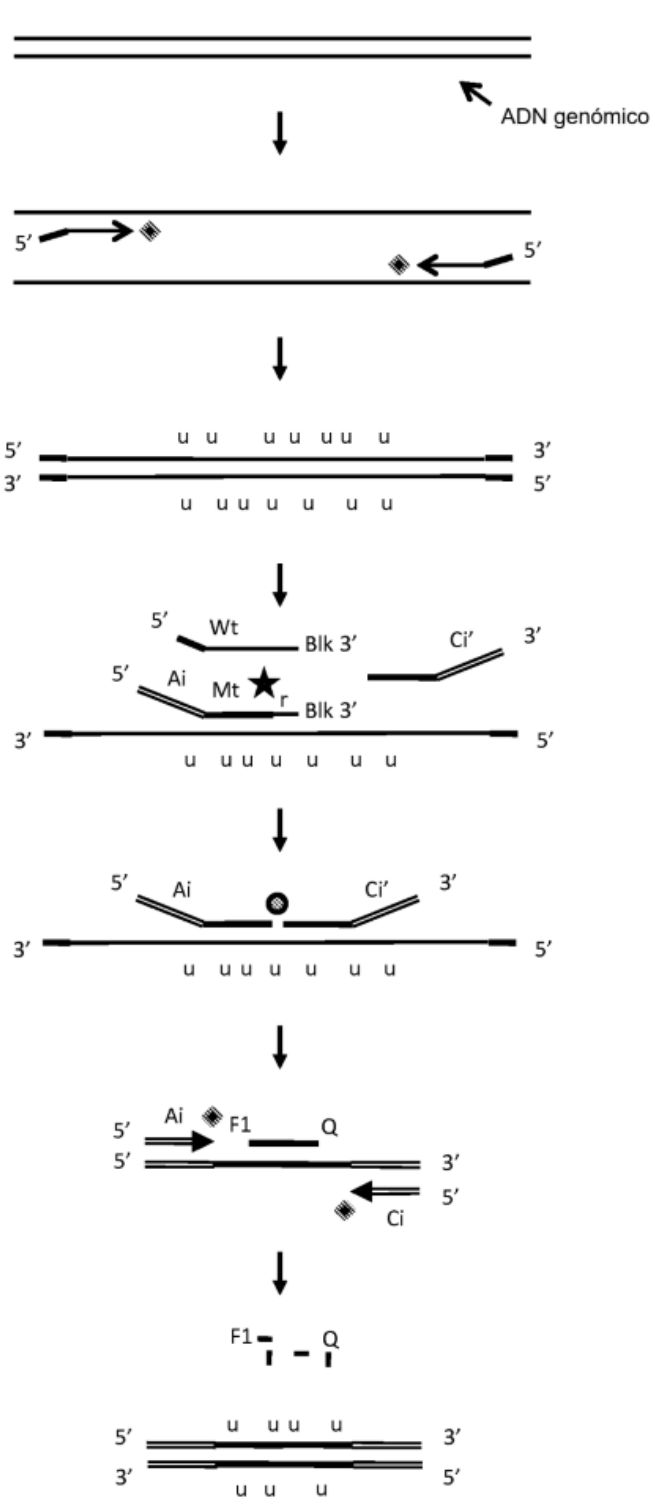


Figura 41

A. Reacción de PCR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNlc.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, distribuir por alícuotas en 12, 24, 48 o 96 pocillos, y amplificar las regiones que contienen mutaciones usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos con ligadura específica de la mutación (Mt) contienen colas para la posterior detección FRET, mientras que las sondas naturales (Wt) no. El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana.

E. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos no bloqueados en 5' y fosforilado en 3'entre sí.

F. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

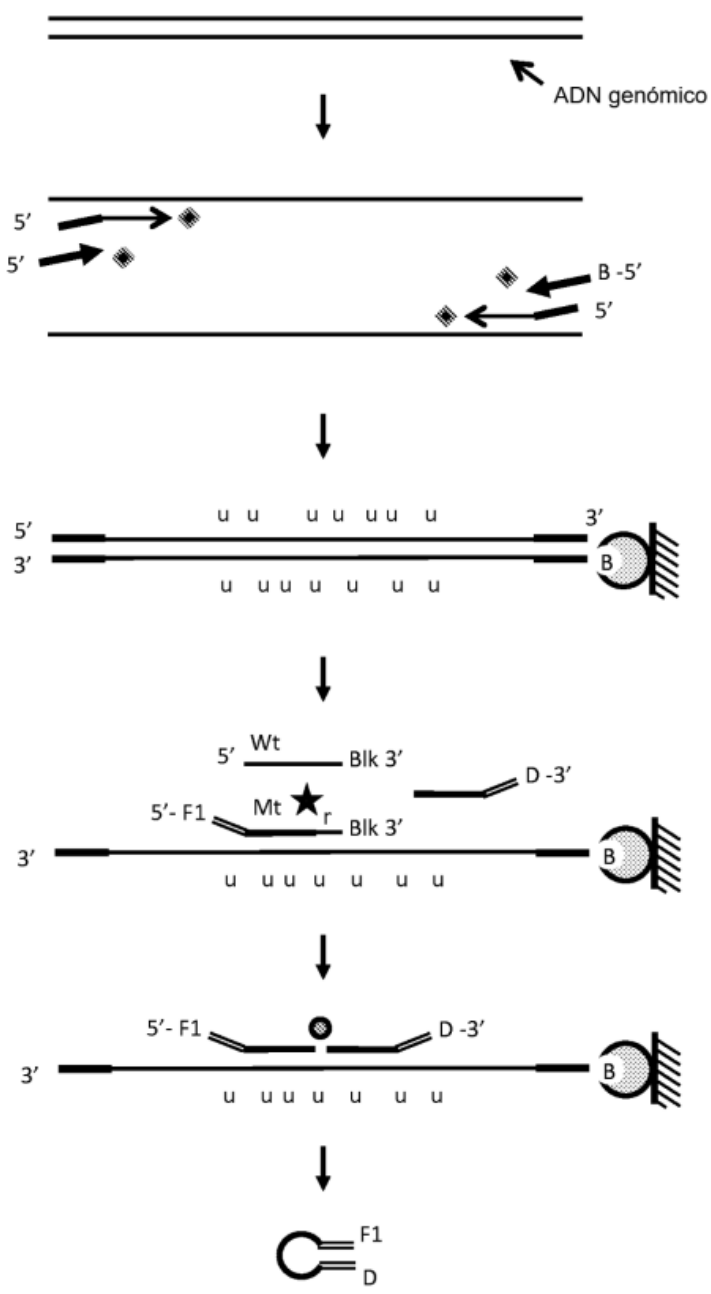


Figura 42

A. Reacción de PCR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNlc.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, distribuir por alícuotas en 12, 24, 48 o 96 pocillos, y amplificar las regiones que contienen mutaciones usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos con ligadura específica de la mutación (Mt) se solapan en la mutación base y contienen colas para la posterior detección FRET, mientras que las sondas naturales (Wt) no. La actividad 5'-nucleasa de la polimerasa escinde solamente la base solapante en 5' correspondiente y la solapa adicional, dejando un 5-fosfato competente para ligadura.

E. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos en 5' y en 3' no bloqueados fosforilados entre sí.

F. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

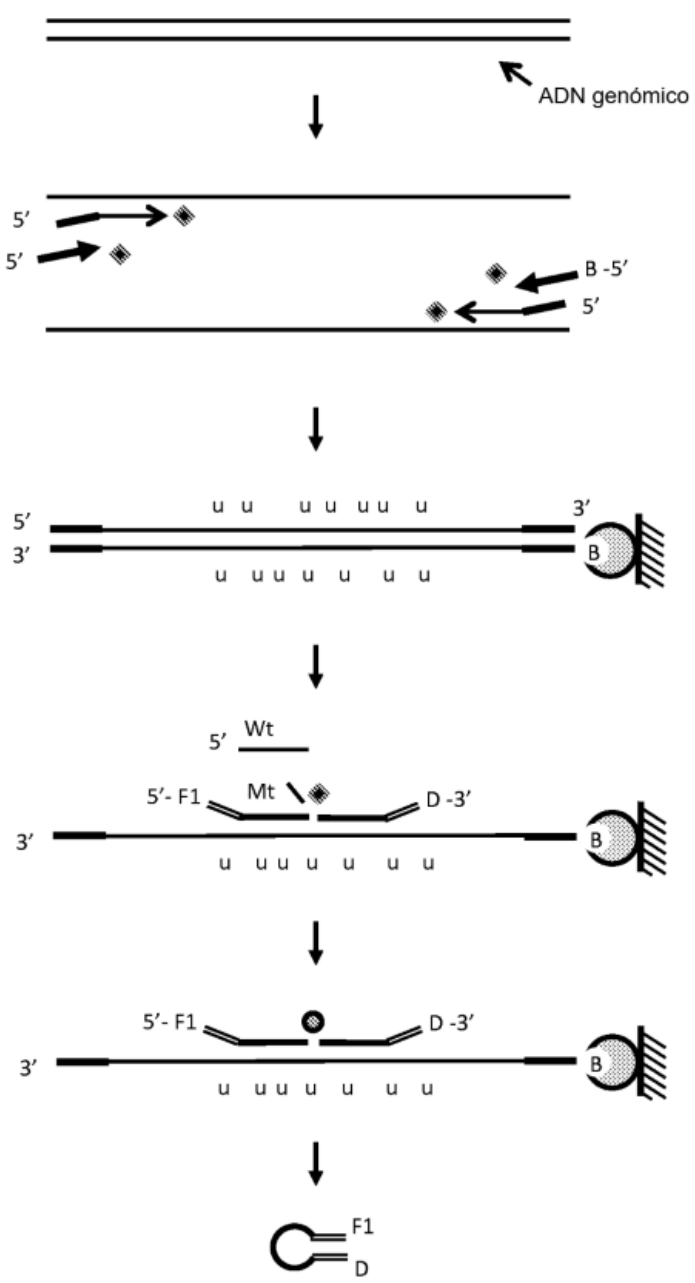


Figura 43

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNlc.

B. Tratar con UDG para prevención de arrastres, y amplificar las regiones que contienen mutaciones usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR).

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos con ligadura específica de la mutación contienen marcadores (Ai, Bi'-Ci') para posterior amplificación por PCR. La ligase une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir por alícuotas entre pocillos independientes para detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, que también destruye los amplicones de la diana original. Solamente los auténticos productos de la LDR se amplificarán cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai).

F. Los productos de ADN bicatenario de la PCR; el bloqueante de la polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que la temperatura disminuye, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad nucleasa 5'->3' de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres).

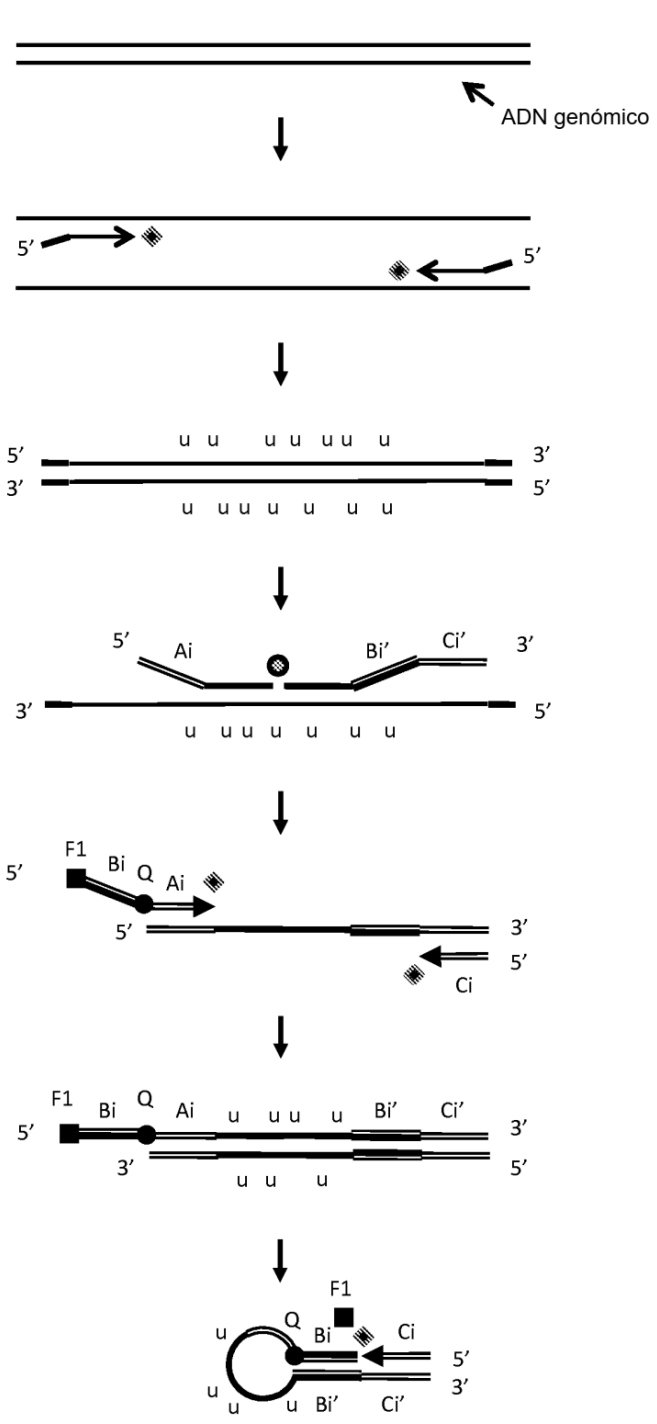
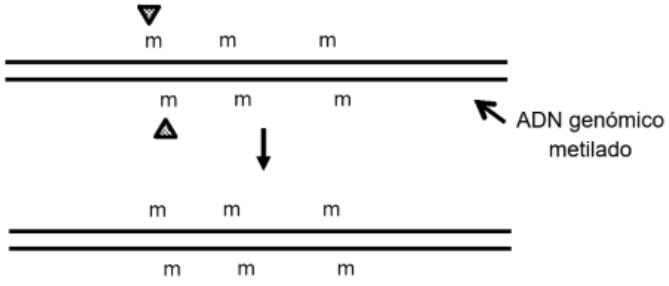
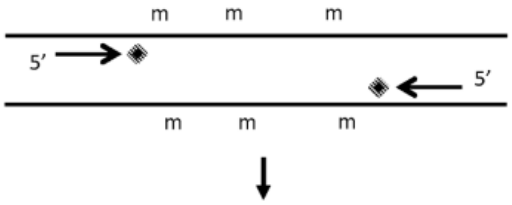


Figura 44

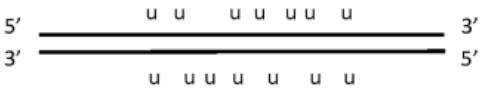
A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNlc. Opcional: enriquecer en ADN metilado usando anticuerpos. Tratar con endonucleasas de restricción sensibles a metilo Bshl236I (CG^CG) y HinPII (G^CGC), y UNG (37ºC, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres.



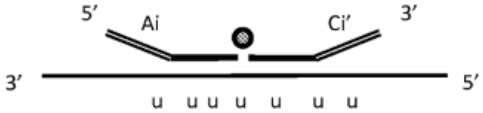
B. Amplificar las regiones que contienen metilo usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)



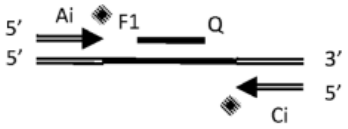
C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. (Los productos carecen de grupos metilo, proporcionando protección adicional.)



D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la región metilada contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.



E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura,



F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)



Figura 45

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNIc. Tratar con BshI236I (CG^CG) y HinPII (G^CGC), y UNG (37ºC, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres.

B. Amplificar las regiones que contienen metilo usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específico de la región metilada contienen marcadores (Ai, Bi'-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

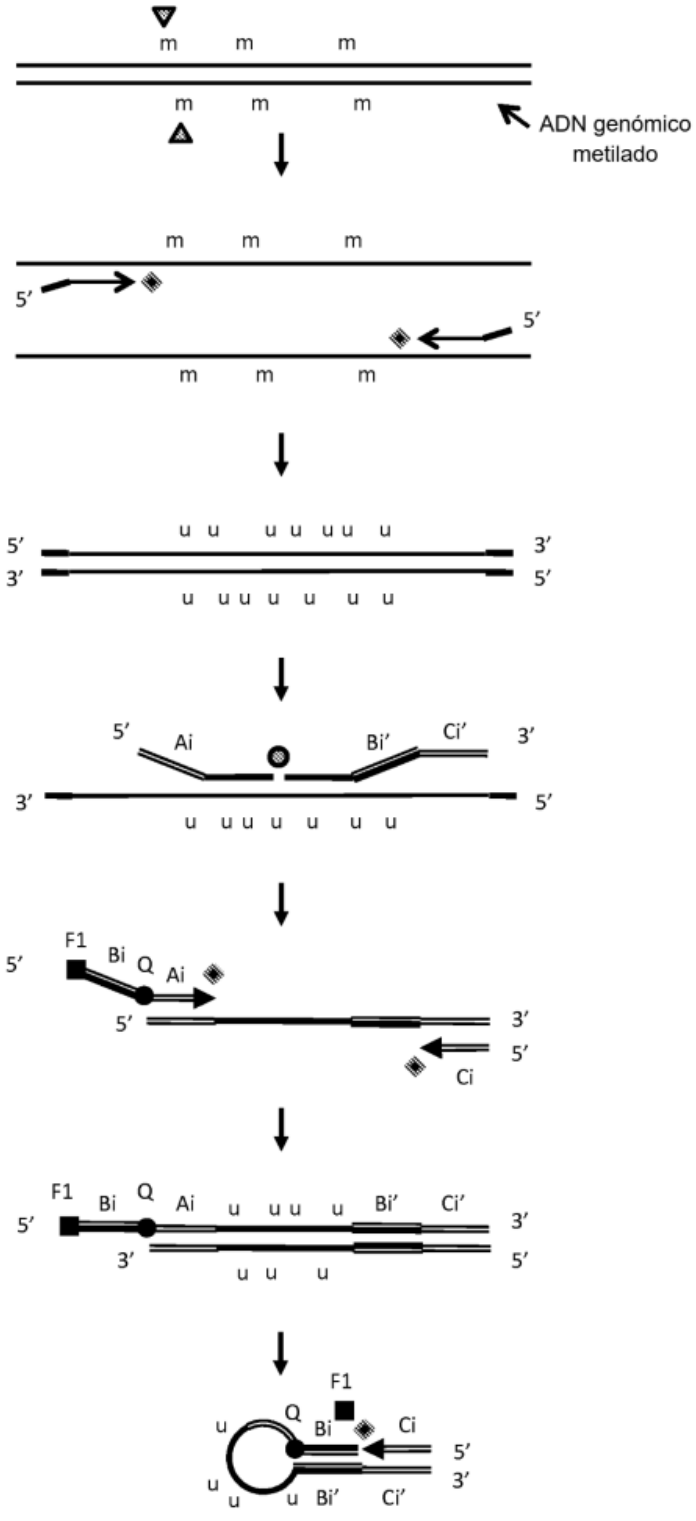


Figura 46

A. Reacción de PCR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNlc. Opcional: enriquecer en ADN metilado usando anticuerpos. Tratar con endonucleasas de restricción sensibles a metilo BshI236I (CG^CG) y HinPII (G^CGC), y UNG (37ºC, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres.

B. Distribuir por alícuotas en 12, 24, 48 o 96 pocillos, y amplificar las regiones que contienen metilo usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, 5' que permite la prevención de arrastres. 3' (Los productos carecen de grupos metilo, proporcionando protección adicional.) Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la región metilada contienen colas para la posterior amplificación por FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí.

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

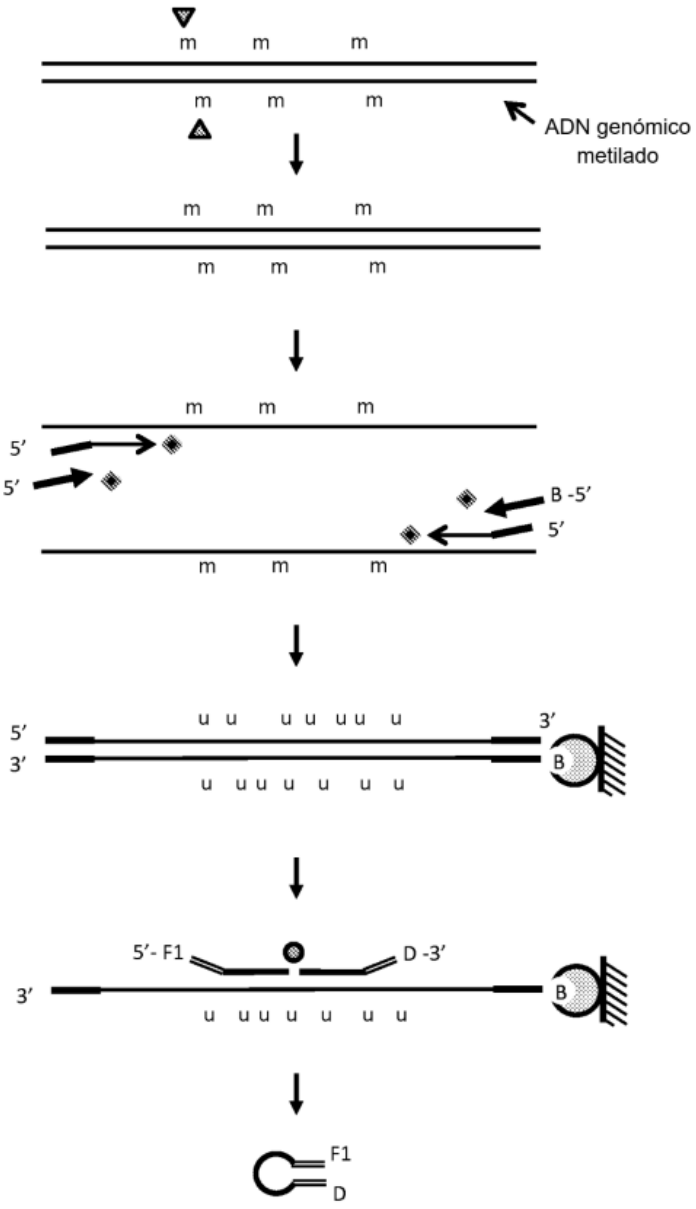


Figura 47

A. Reacción de Nucleasa-Ligadura-PCR-qPCR con prevención de arrastres para detectar metilación. Aislar ADN genómico o ADNlc. Tratar con HaeIII (GGˆCC) y endonucleasas de restricción sensibles a metilo BshI236I (CGˆCG) y HinPII (GᴬCGC), y UNG (37ºC, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres.

B. Ligar un oligonucleótido en forma de horquilla que contiene la secuencia marcadora (Ai') para liberar nuevamente el fosfato de la hebra molde.

C. Tratar con HinPII y BshI236I a 37ºC, después destruir térmicamente las endonucleasas activando la polimerasa Taq. Los cebadores específicos de locus (que contienen la secuencia marcadora Ci) se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando están unidos a la diana, y se extienden con olimerasa, cuya actividad 5' nucleasa digiere la porción en 5' de la horquilla para generar el complemento de la diana con la secuencia Ai'. La horquilla no ligada se extiende sobre sí misma.

D. Amplificar las regiones que contienen metilo usando PCR (y dUTP) con los cebadores marcadores Ai y Ci. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

E. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. (Los productos carecen de grupos metilo, proporcionando protección adicional.) Distribuir por alícuotas entre pocillos independientes para detección Taqman usando cebadores específicos de locus y una sonda Taqman.

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

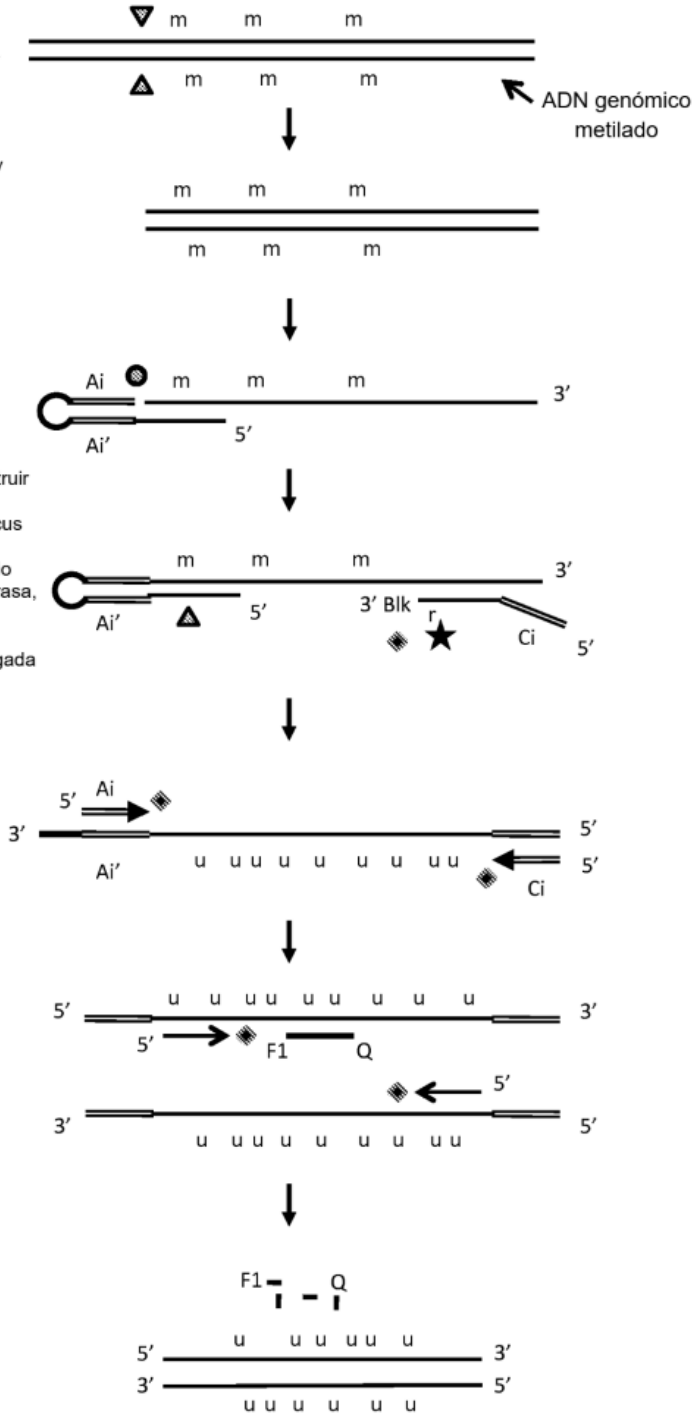


Figura 48

A. Reacción de Nucleasa-Ligadura-PCR-qPCR con prevención de arrastres para detectar metilación. Aislar ADN genómico o ADNlc. Tratar con HaeIII (GG˚CC), BshI236I (CG˚CG) y HinPII (G˚CGC), y UNG.

B. Ligar un oligonucleótido en forma de horquilla que contiene la secuencia marcadora (Ai') para liberar nuevamente el fosfato de la hebra molde.

C. Tratar con HinPII y BshI236I a 37ºC, después destruir térmicamente las endonucleasas activando la polimerasa Taq. Los cebadores específicos de locus (que contienen la secuencia marcadora Ci) se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando están unidos a la diana, y se extienden con polimerasa, cuya actividad 5' nucleasa digiere la porción en 5' de la horquilla para generar el complemento de la diana con la secuencia Ai'.

D. Amplificar las regiones que contienen metilo usando PCR (y dUTP) con los cebadores marcadores Ai y Ci. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

E. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Distribuir por alícuotas entre pocillos independientes para detección UniTaq, y amplificar usando cebadores específicos de locus con colas Aj y Bj-Cj, así como cebadores específicos UniTaq (F1-Bj-Q-Aj y Cj).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bj y Bj'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

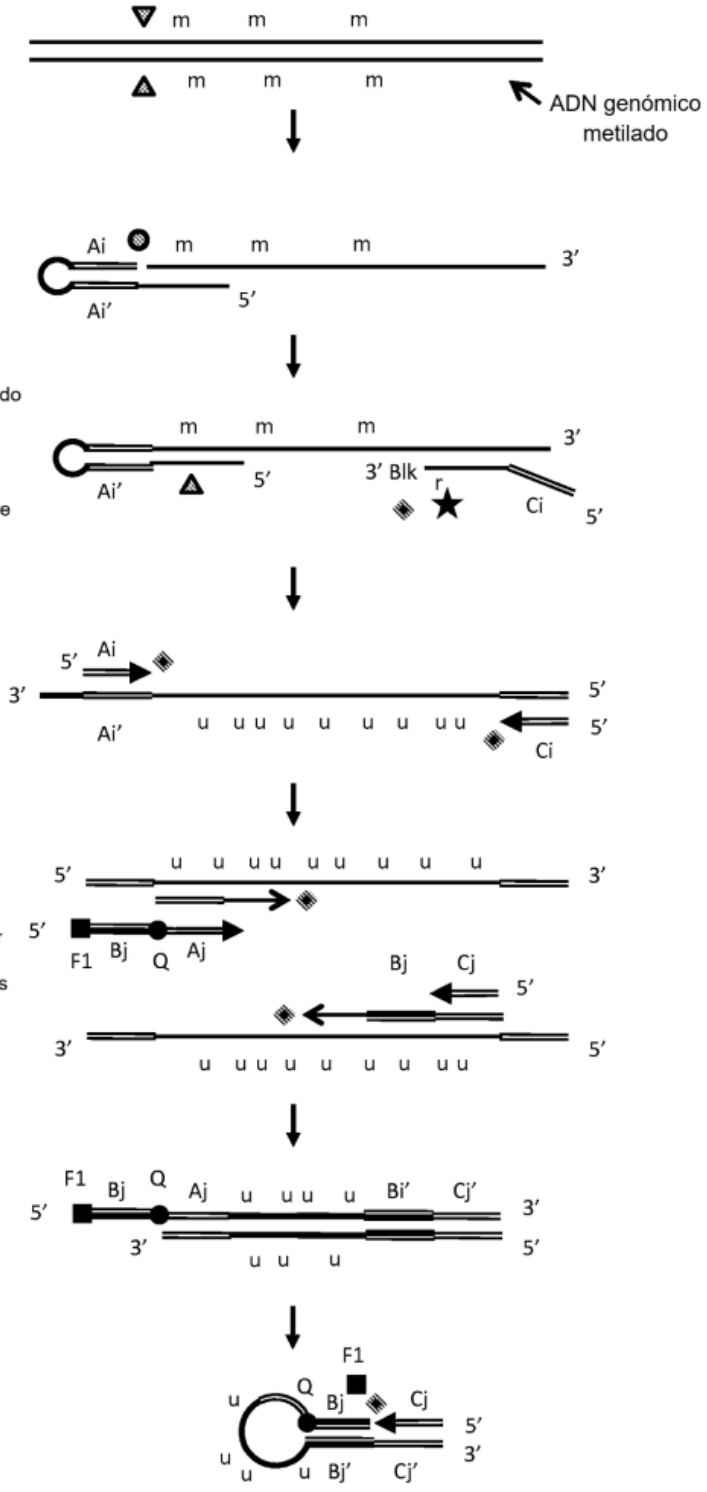


Figura 49

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNlc. Tratar con BshI236I (CG^CG) y UNG (37ºC, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres. Tratar con bisulfito, lo que convierte las hebras en no complementarias.

B. Hibridar cebadores específicos de locus en presencia de BstUI (CG^CG), que escinde el ADN arrastrado. Los cebadores se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana. Amplificar las regiones que contienen metilo usando PCR (y dUTP). Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. El oligonucleótido bloqueante se puede usar para limitar la amplificación del ADN no metilado original (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. (Los productos carecen de grupos metilo, proporcionando protección adicional.)

D. Los oligonucleótidos de ligadura específico de la región metilada contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

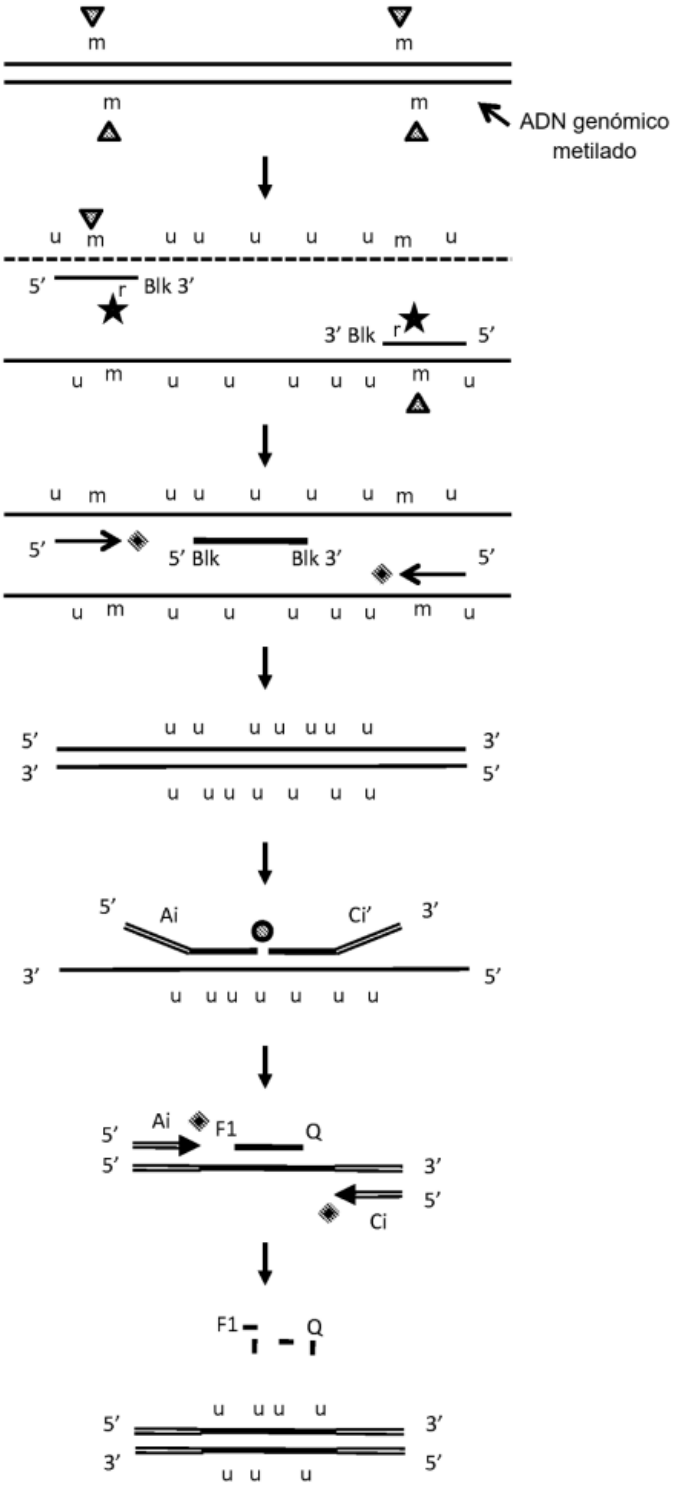


Figura 50

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNIc. Tratar con BshI236I (CG^CG) y UNG (37ºC, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres. Tratar con bisulfito, lo que convierte las hebras en no complementarias.

B. Hibridar cebadores específicos de locus en presencia de BstUI (CG^ACG), que escinde el ADN arrastrado. Los cebadores se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana. Amplificar las regiones que contienen metilo usando PCR (y dUTP). Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. El oligonucleótido bloqueante se puede usar para limitar la amplificación del ADN no metilado original (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específico de la región metilada contienen marcadores (Ai, Bi-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal.

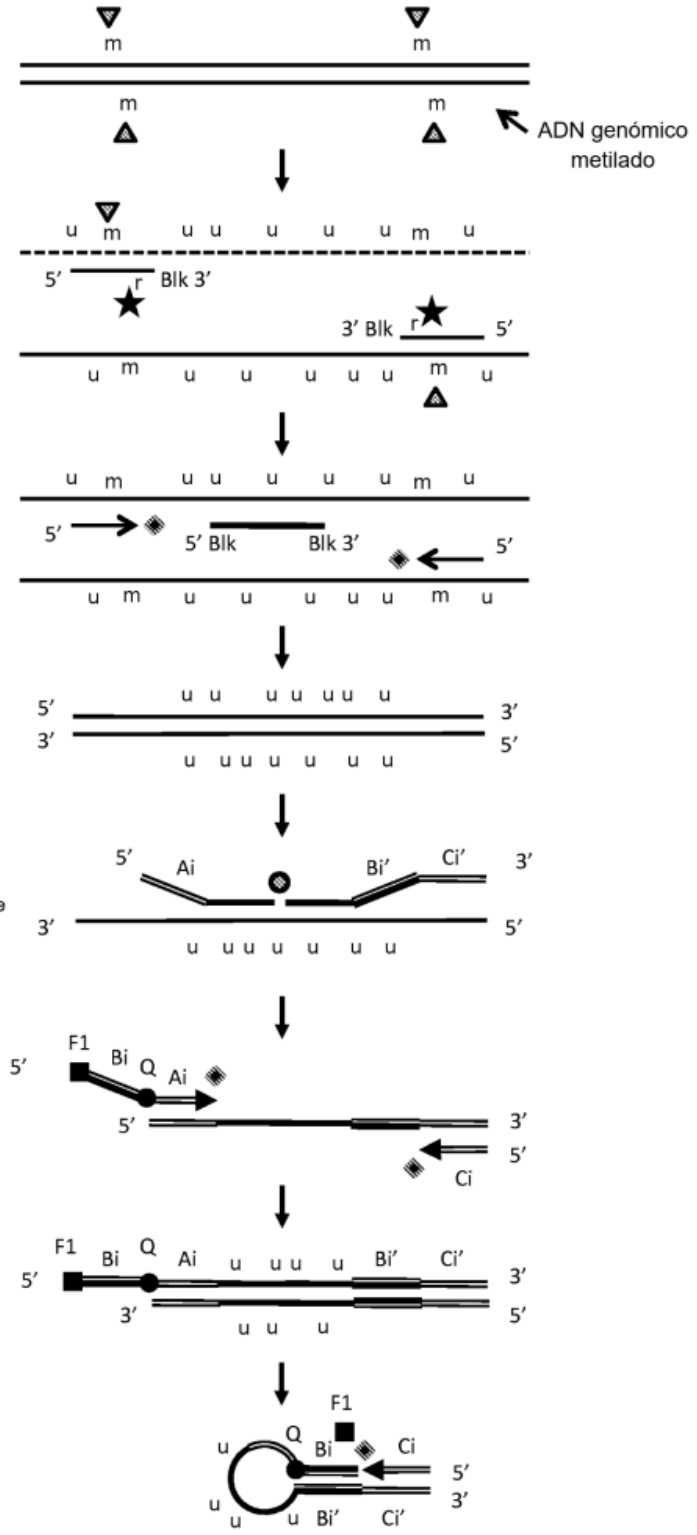


Figura 51

A. Reacción de PCR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones. Aislar ADN genómico o ADNlc. Tratar con BshI236I (CG^CG) y UNG (37°C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres. Tratar con bisulfito, lo que convierte las hebras en no complementarias.

B. Hibridar cebadores específicos de locus en presencia de BstUI (CG^ACG), que escinde el ADN arrastrado. Los cebadores se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana. Distribuir por alícuotas en 12, 24, 48 o 96 pocillos, y amplificar las regiones que contienen metilo usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'. El oligonucleótido bloqueante se puede usar para limitar la amplificación del ADN no metilado original.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. 5' (Los productos carecen de grupos metilo, 3' lo que proporciona protección adicional.) Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la región metilada contienen colas para la posterior amplificación por FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí.

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

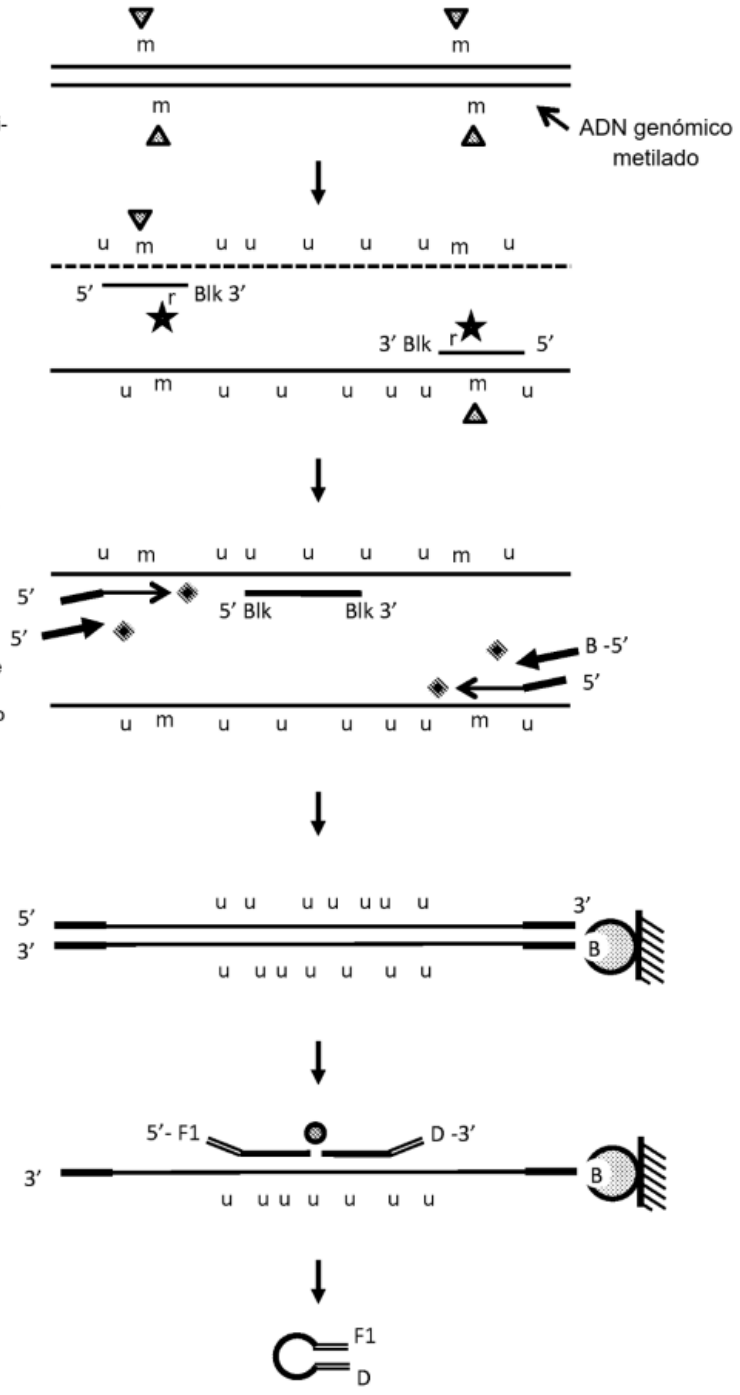


Figura 52

A. Reacción de PCR-qPCR con prevención de arrastres para detectar metilación. Aislar ADN genómico o ADNlc. Tratar con BshI236I (CG^CG) y UNG (37°C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres. Tratar con bisulfito, lo que convierte las hebras en no complementarias.

B. Hibridar cebadores específicos de locus en presencia de BstUI (CG^CG), que escinde el ADN arrastrado. Los cebadores se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana. Amplificar las regiones que contienen metilo usando PCR con dNTP. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los oligonucleótidos bloqueantes se pueden usar para limitar la amplificación del ADN no metilado original. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR están no metilados, lo que proporciona protección frente a arrastres.

D. Distribuir por alícuotas entre pocillos independientes para detección Taqman usando cebadores específicos de locus y una sonda Taqman. Se usan oligonucleótidos bloqueantes opcionales para limitar la amplificación del ADN no metilado original

E. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

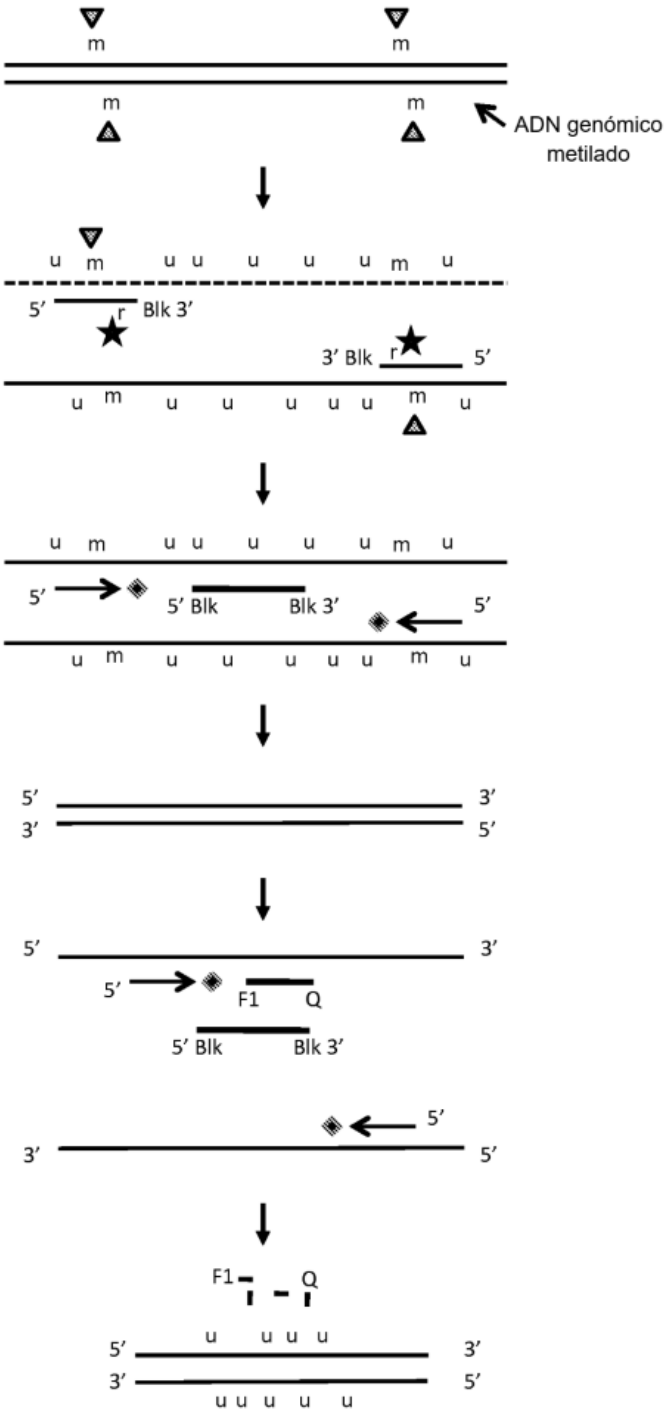


Figura 53

A. Visión general: Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar translocaciones en el ARNm. Ilustración de translocaciones entre dos genes mostradas para el ADN.

B. Se ilustran ejemplos de uniones por fusión entre los exones 1-b, 2-b y 3-b en los ARNm. Aislar el ARNm a partir de eritrocitos completos, exosomas o CTC. Generar ADNc usando transcriptasa inversa y un cebador complementario del exón b. Amplificar por PCR usando cebadores directos con los exones 1, 2 y 3. Independientemente del punto de rotura de la translocación, los cebadores amplificarán el fragmento más pequeño que contenga la región de unión del exón.

C. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión contienen marcadores (Ai, Ci' para las sondas Taqman individuales; o Ai, Bi-Ci para sondas UniTaq) para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí, si son perfectamente complementarios en la unión. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando PCR en tiempo real.

D. Cuando se utilizan cebadores específicos de la marca (Ai, Ci) para amplificar los productos de la LDR del conjunto superior, cada sonda TaqMan expande la unión de ligadura, y se puede puntuar individualmente. Cuando se usan cebadores específicos de UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci), para amplificar los productos de la LDR del conjunto inferior, el mismo conjunto de cebadores puntúa la translocación dada, independientemente de la unión al exón específica.

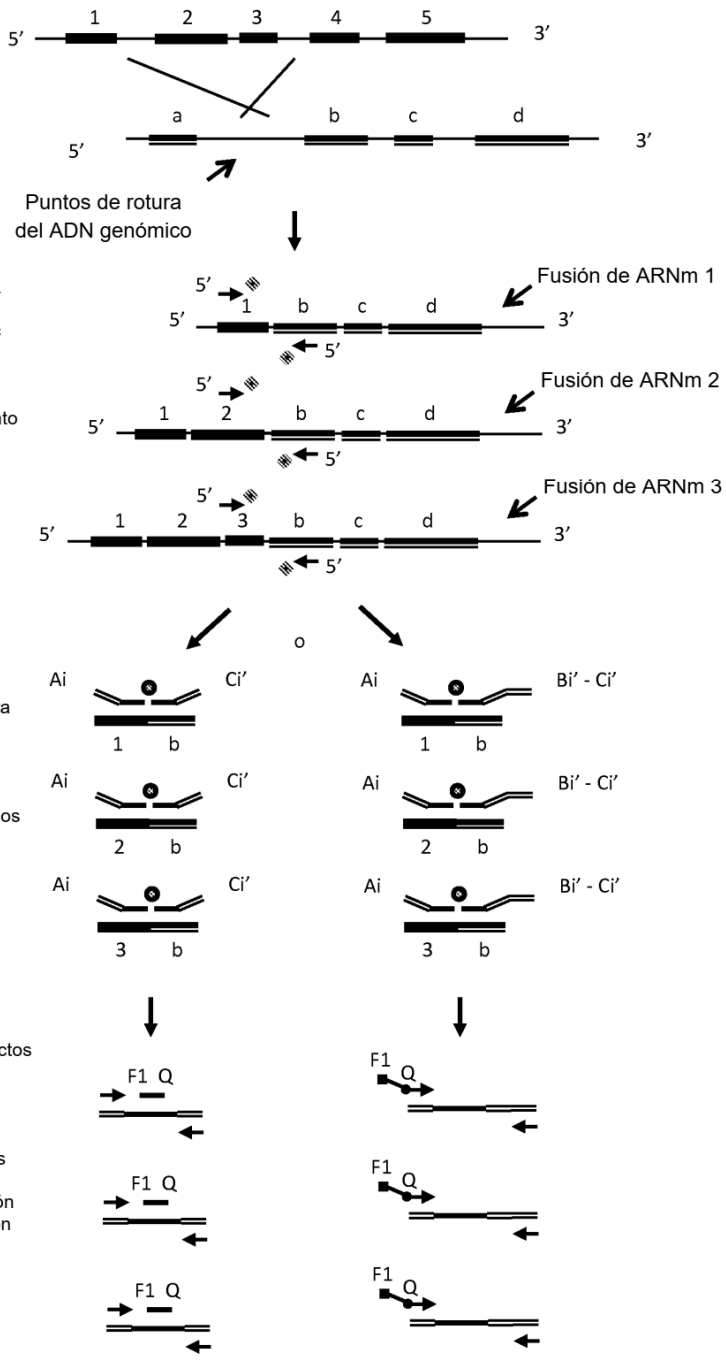


Figura 54

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar translocaciones en el ARNm. Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos del exón contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

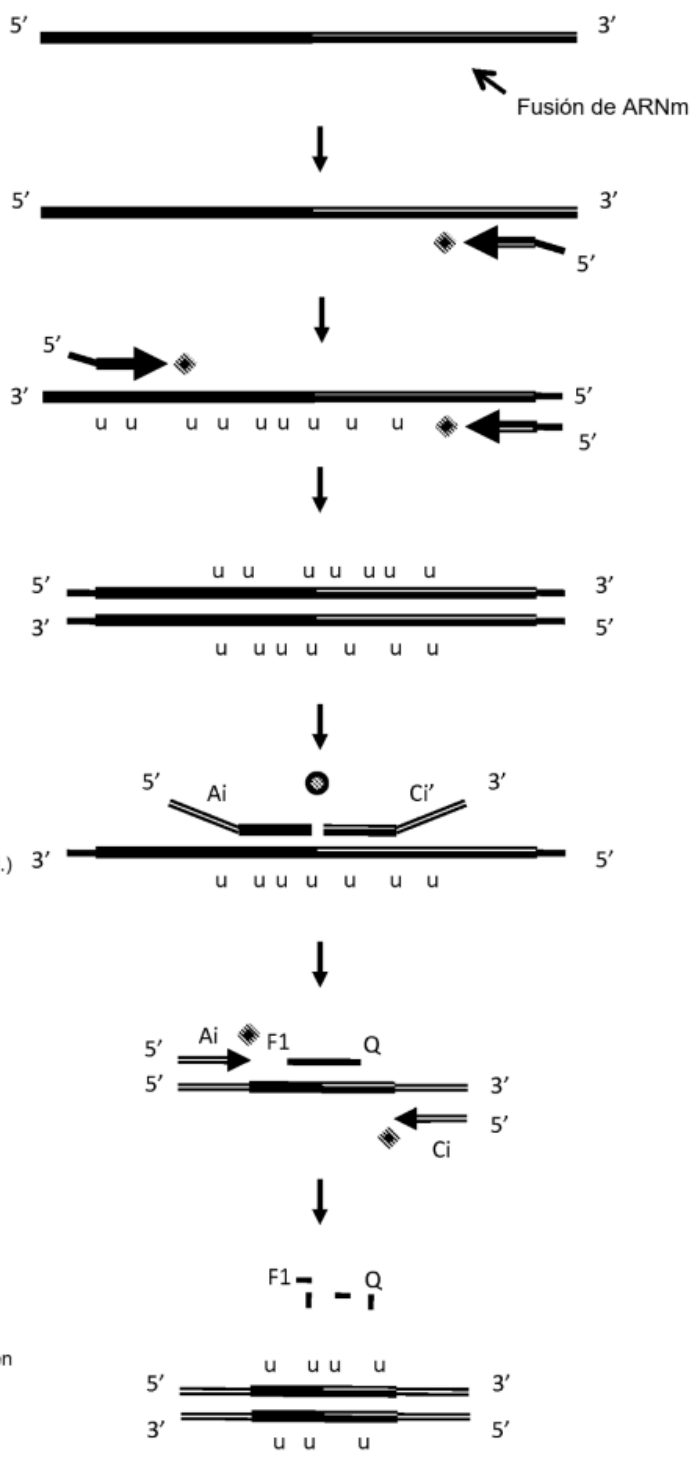


Figura 55

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar translocaciones en el ARNm. Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Bi-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal.

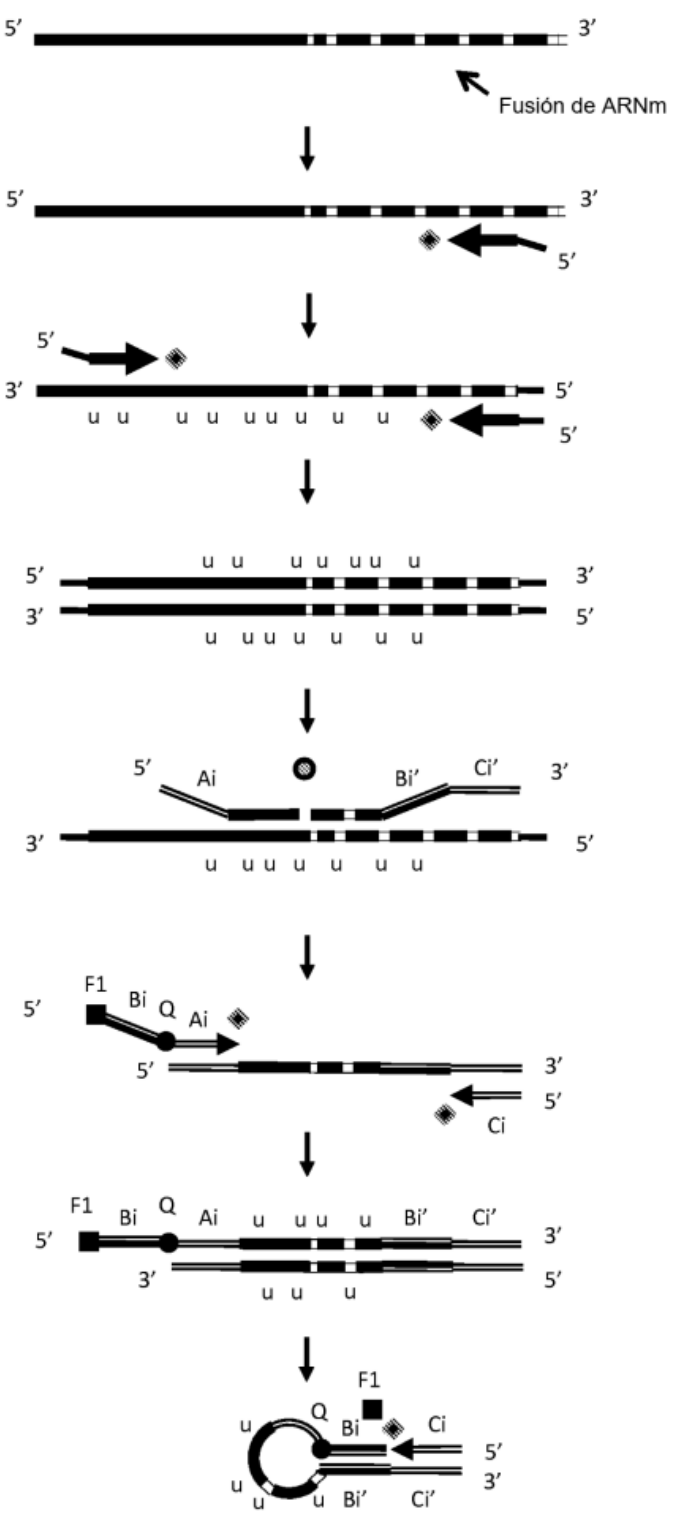


Figura 56

A. Reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastres para detectar translocaciones en el ARNm. Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos, y destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen colas para la posterior amplificación por FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

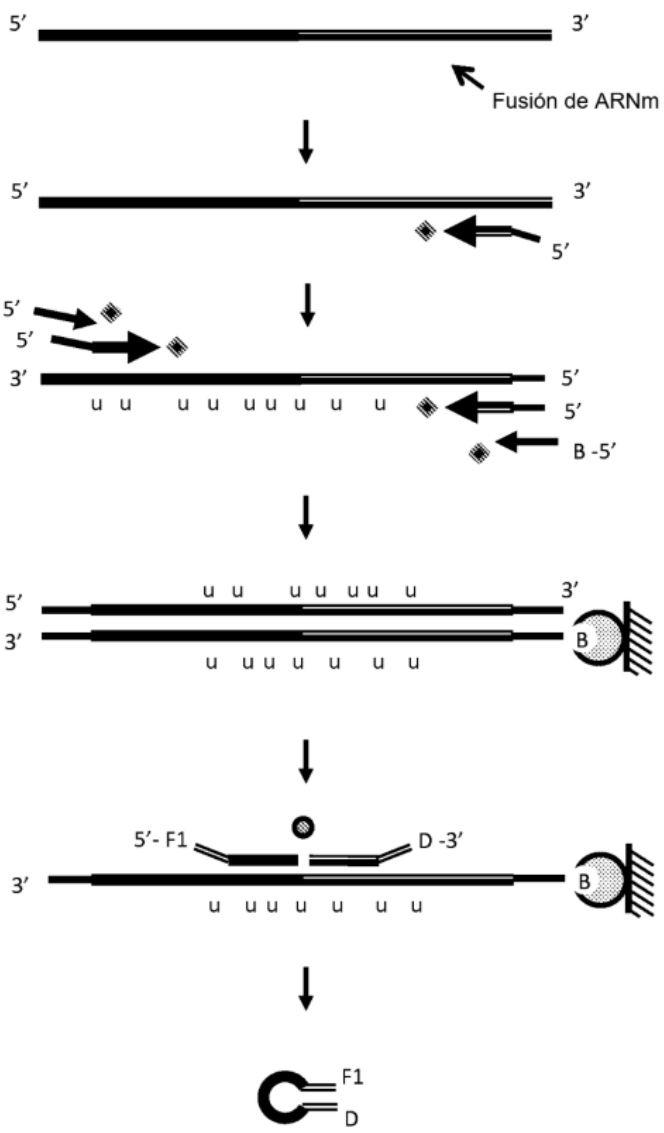


Figura 57

A. Visión general: Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar el corte y empalme alternativo. Ilustración del gen con 5 exones mostrados para el ADN.

B. Se ilustra un ejemplo de ARNm normal (1-2-3a-4) y una variante de corte y empalme alternativo (1-2-3b-4). Aislar el ARNm a partir de eritrocitos completos, exosomas o CTC. Generar ADNc usando transcriptasa inversa y un cebador complementario del exón 4. Amplificar por PCR usando el cebador directo del exón **2,** generando amplicones de ambas variantes de corte y empalme.

C. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión contienen marcadores (Ai, Ci' para las sondas Taqman individuales; o Ai, Bi-Ci para sondas UniTaq) para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí, si son perfectamente complementarios en la unión. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando PCR en tiempo real.

D. Cuando se utilizan cebadores específicos de la marca (Ai, Ci) para amplificar los productos de la LDR del conjunto superior, cada sonda TaqMan expande la unión de ligadura, y se puede puntuar individualmente. Cuando se usan cebadores específicos de UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci), para amplificar los productos de la LDR del conjunto inferior, un conjunto de cebadores puntúa una unión de ligadura dada.

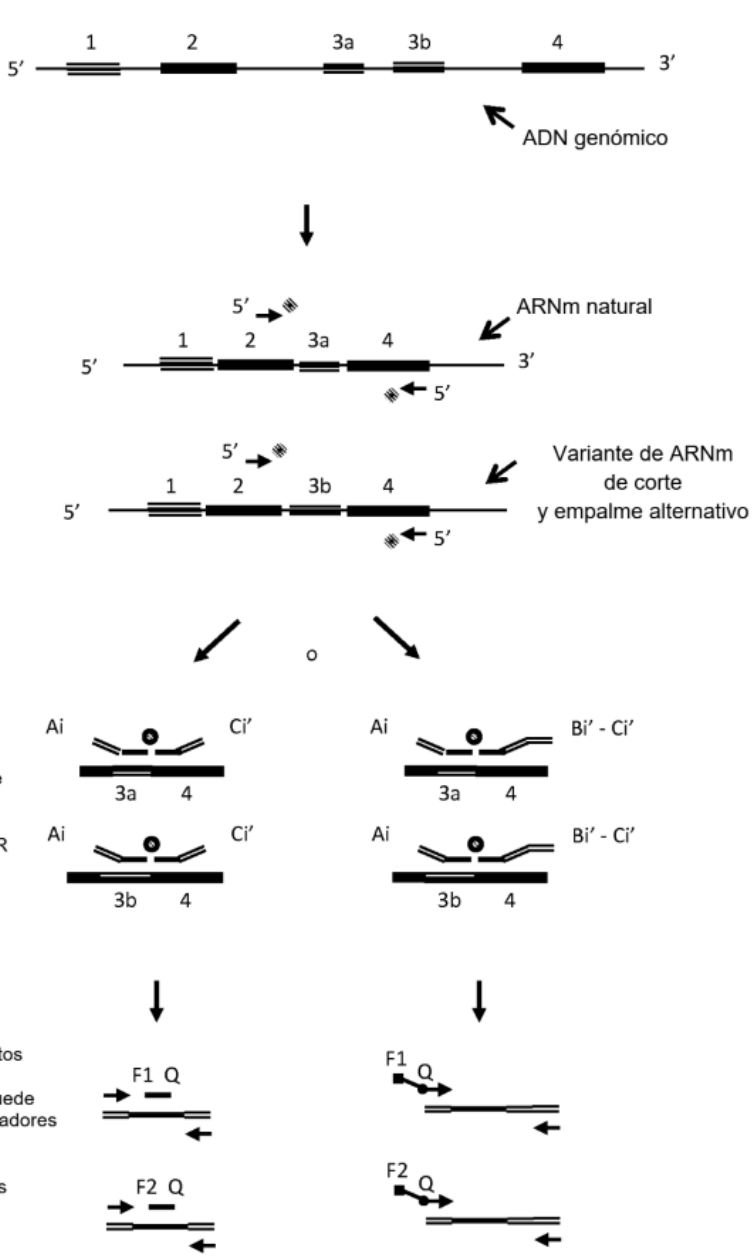


Figura 58

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para cuantificar el transcrito natural y el de corte y empalme alternativo (3a vs 3b). Aislar el ARN.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosilasa), destruir térmicamente. Usar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar un número limitado de ciclos de amplificación por PCR (12-20) para mantener relaciones relativas de diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases para evitar dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión al exón contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligase une covalentemente dos oligonucleótidos entre si. Distribuir por alícuotas para su detección (los productos de la LDR no se amplifican por ninguno de los cebadores de la PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones de la diana original. Solamente los producto de la LDR auténticos se amplificarán cuando se use la PCR (y dUTP) con cebadores específicos del marcador (Ai, Ci). Cada sonda Taqman amplía la unión de ligadura.

F. La actividad nucleasa 5'->3' de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar la señal. Los valores de Ct relativos reflejan la cantidad relativa de cada transcrito.

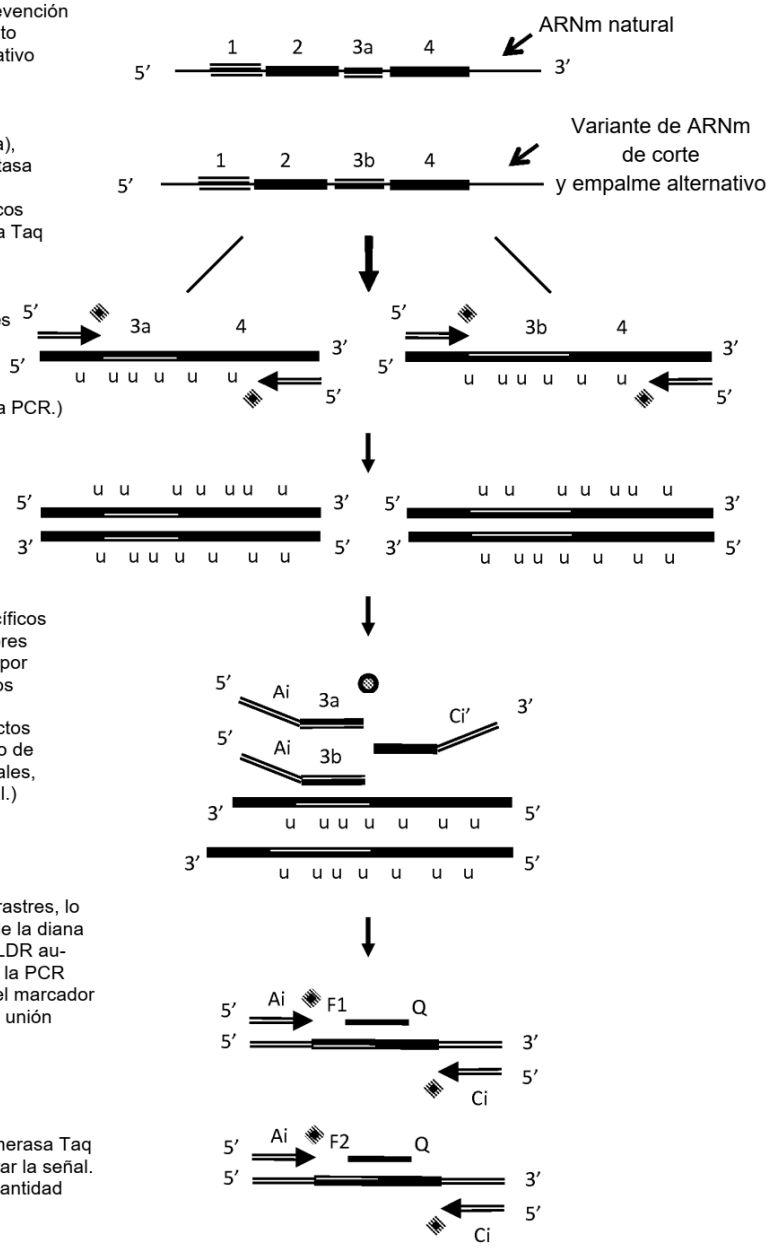


Figura 59

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para cuantificar el transcrito natural y el de corte y empalme alternativo (3a vs 3b). Aislar el ARN.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosilasa), destruir térmicamente. Usar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar un número limitado de ciclos de amplificación por PCR (12-20) para mantener relaciones relativas de diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases para evitar dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR).

C. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión al exón contienen marcadores (Ai, Bi-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligase une covalentemente dos oligonucleótidos entre si. Distribuir por alícuotas para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones de la diana original. Solamente los producto de la LDR auténticos se amplificarán cuando se use la PCR (u dUTP) con cebadores específicos del marcador (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

F. Los productos de ADN bicatenarios de la PCR (no se muestra); el bloqueante de la polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que la temperatura disminuye, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad nucleasa 5'->3' de la polimerasa Taq extiende el cebador C1 y libera el grupo fluorescente para generar la señal. Los valores de Ct relativos reflejan la cantidad relativa de cada transcrito.

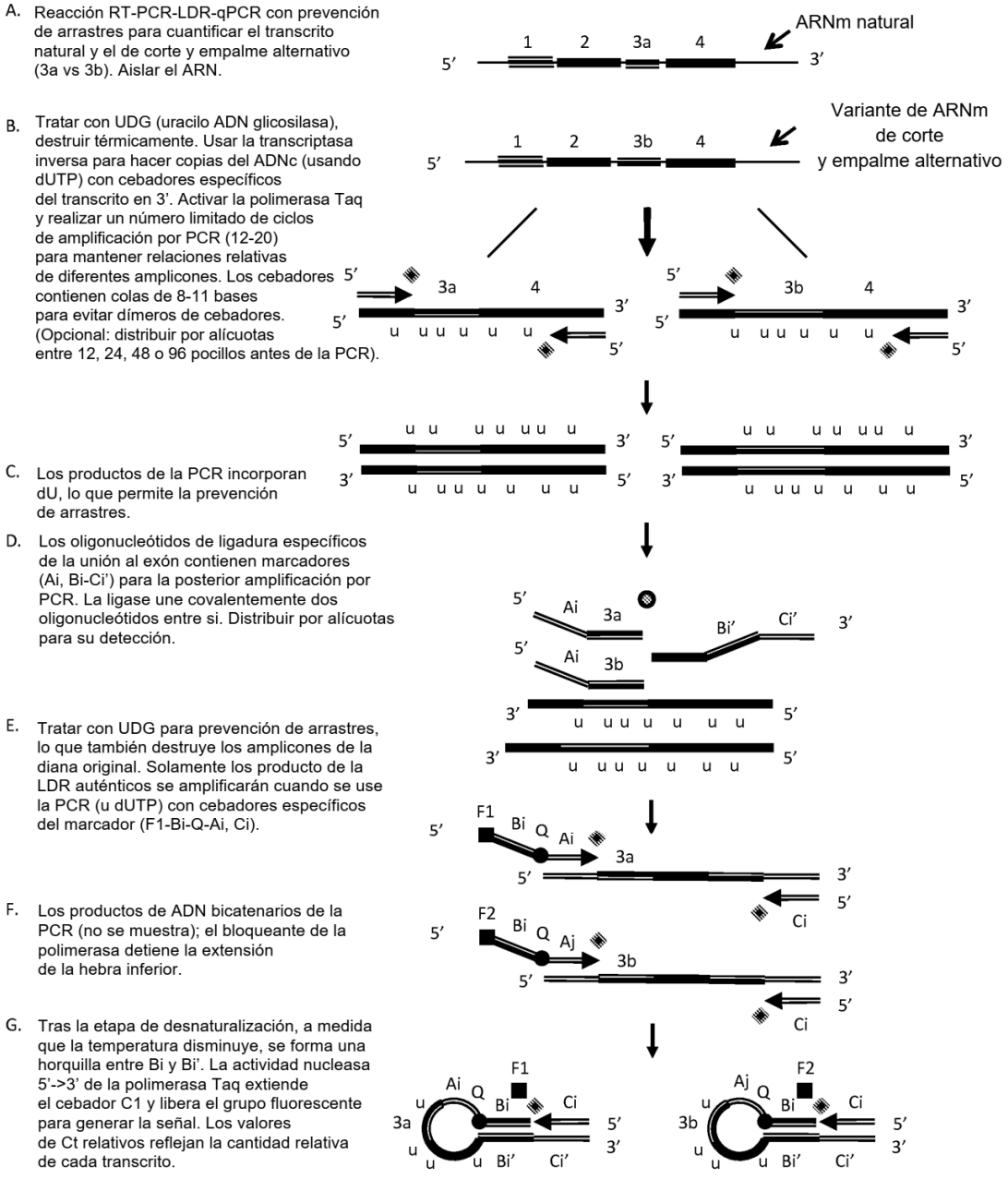


Figura 60

A. Reacción de RT-PCR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el transcrito natural y el de corte y empalme alternativo (3a vs. 3b). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos, y destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen colas para la posterior amplificación por FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET

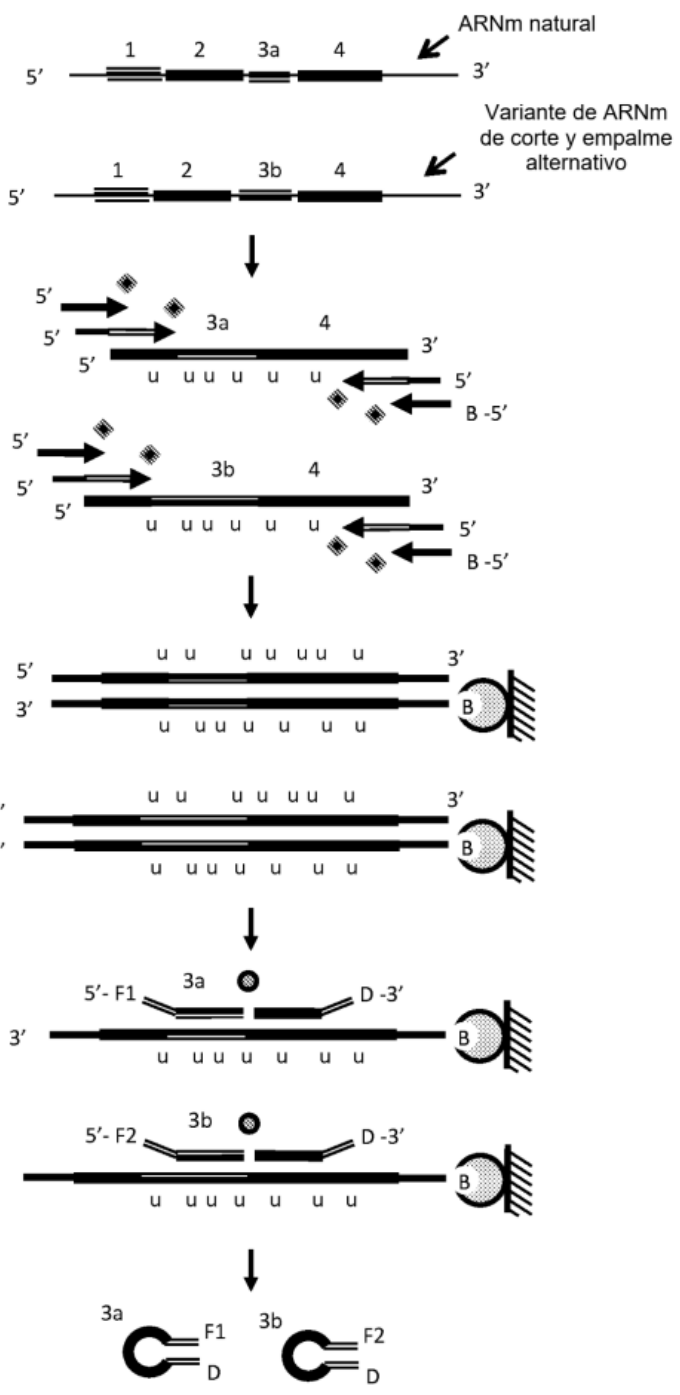


Figura 61

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar un transcrito de corte y empalme alternativo (por ejemplo, 3b) de bajo nivel. Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. El cebador específico del exón no amplifica el transcrito wt.
Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores.
(Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

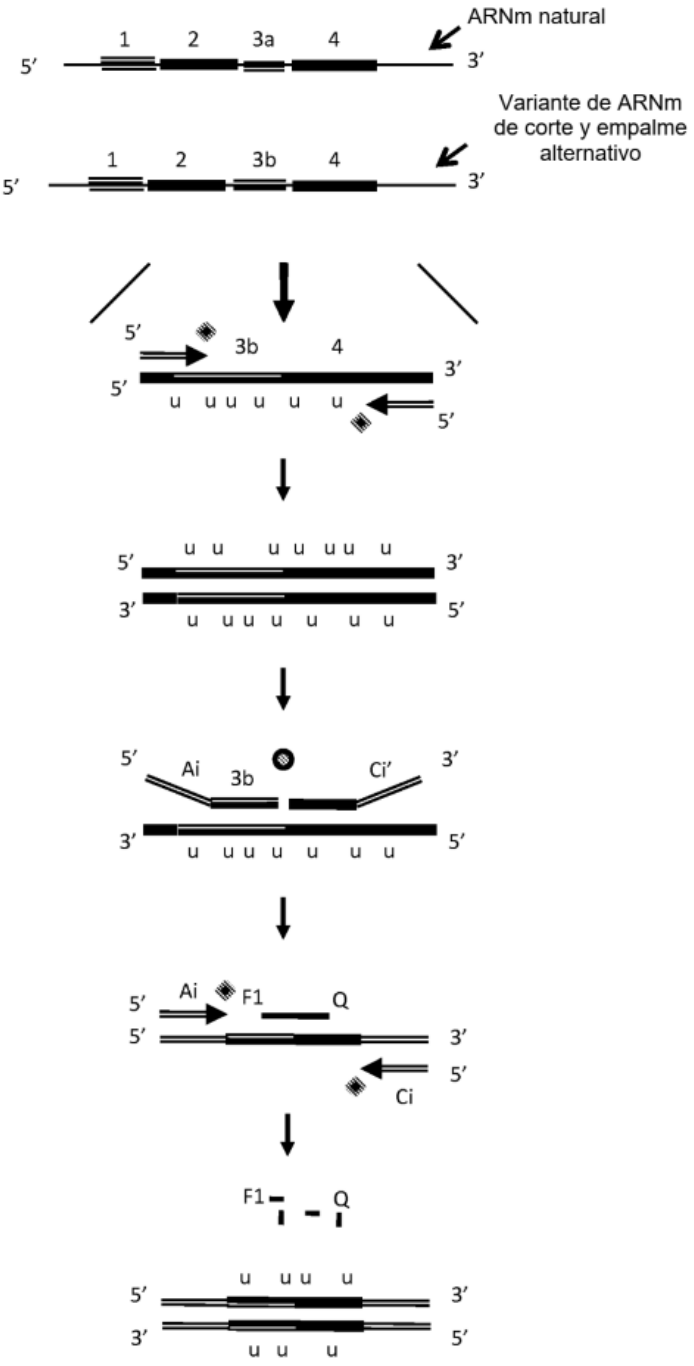


Figura 62

A. Reacción PCR-LDR con prevención de arrastre para detectar un transcrito de corte y empalme alternativo (por ejemplo, 3b) de bajo nivel. Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. El cebador específico del exón no amplifica el transcrito wt. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Bi-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-bi-Q-Ai, Ci).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal.

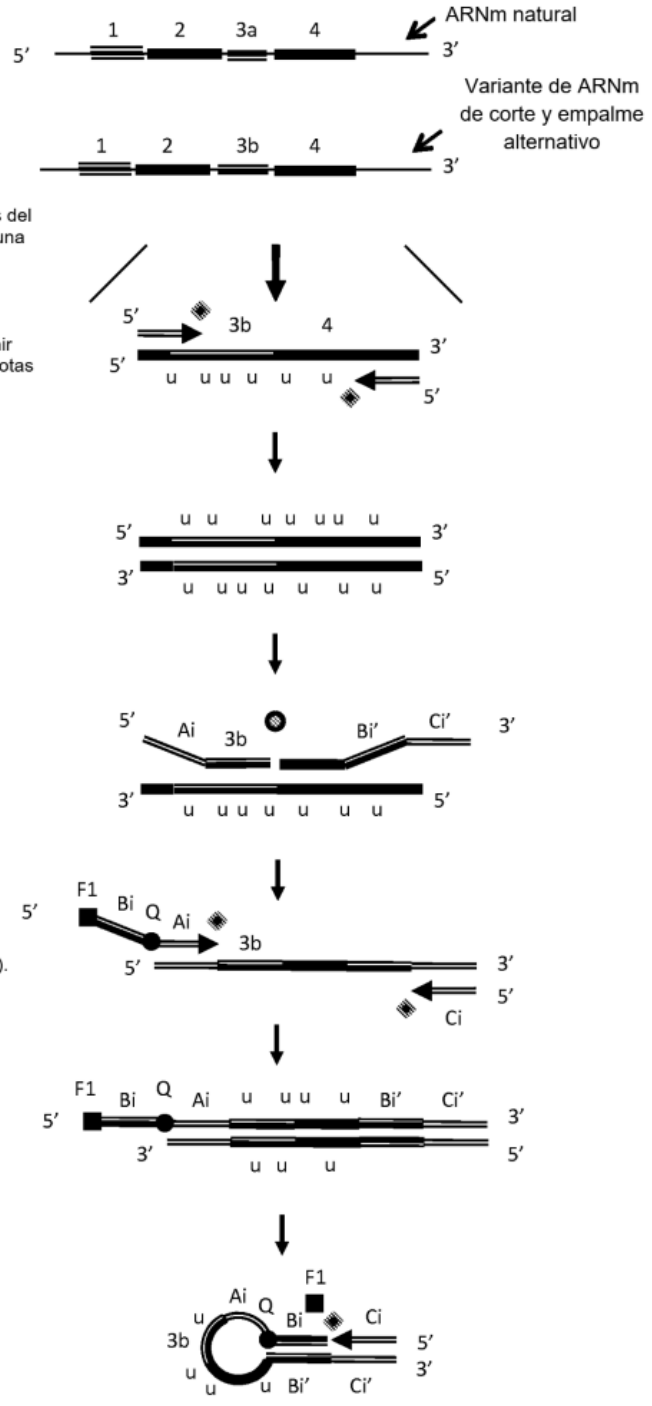


Figura 63

A. Reacción PCR-LDR con prevención de arrastre para detectar un transcrito de corte y empalme alternativo (por ejemplo, 3b) de bajo nivel. Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos, y destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen colas para la posterior amplificación por FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

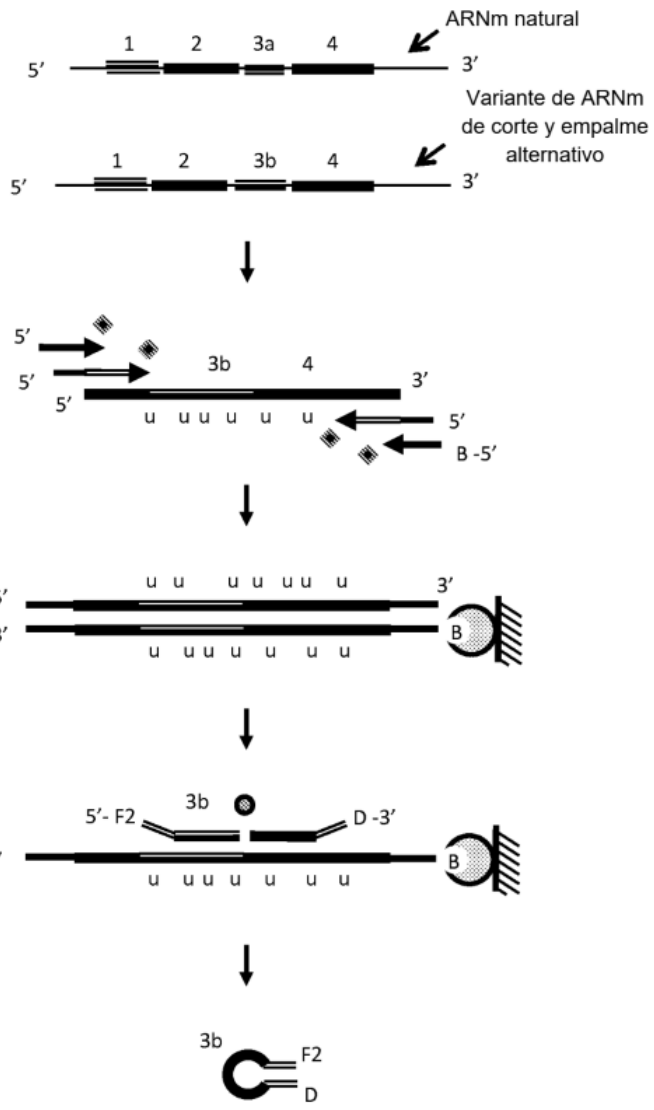


Figura 64

A. Visión general: Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar el corte y empalme alternativo. Ilustración del gen con 3 exones, y un sitio de inicio alternativo y un primer exón, mostrados para el ADN.

B. Se ilustra un ejemplo de ARNm normal (1-2-3) y una variante de corte y empalme alternativo (1a-2-3). Aislar el ARNm a partir de eritrocitos completos, exosomas o CTC. Generar ADNc usando transcriptasa inversa y un cebador complementario del exón 2. Amplificar por PCR usando cebadores directos con los exones 1 y 1a, generando amplicones de ambas variantes de corte y empalme.

C. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión contienen marcadores (Ai, Ci' para las sondas Taqman individuales; o Ai, Bi-Ci para sondas UniTaq) para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí, si son perfectamente complementarios en la unión. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando PCR en tiempo real.

D. Cuando se utilizan cebadores específicos de la marca (Ai, Ci) para amplificar los productos de la LDR del conjunto superior, cada sonda TaqMan expande la unión de ligadura, y se puede puntuar individualmente. Cuando se usan cebadores específicos de UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci), para amplificar los productos de la LDR del conjunto inferior, un conjunto de cebadores puntúa una unión de ligadura dada.

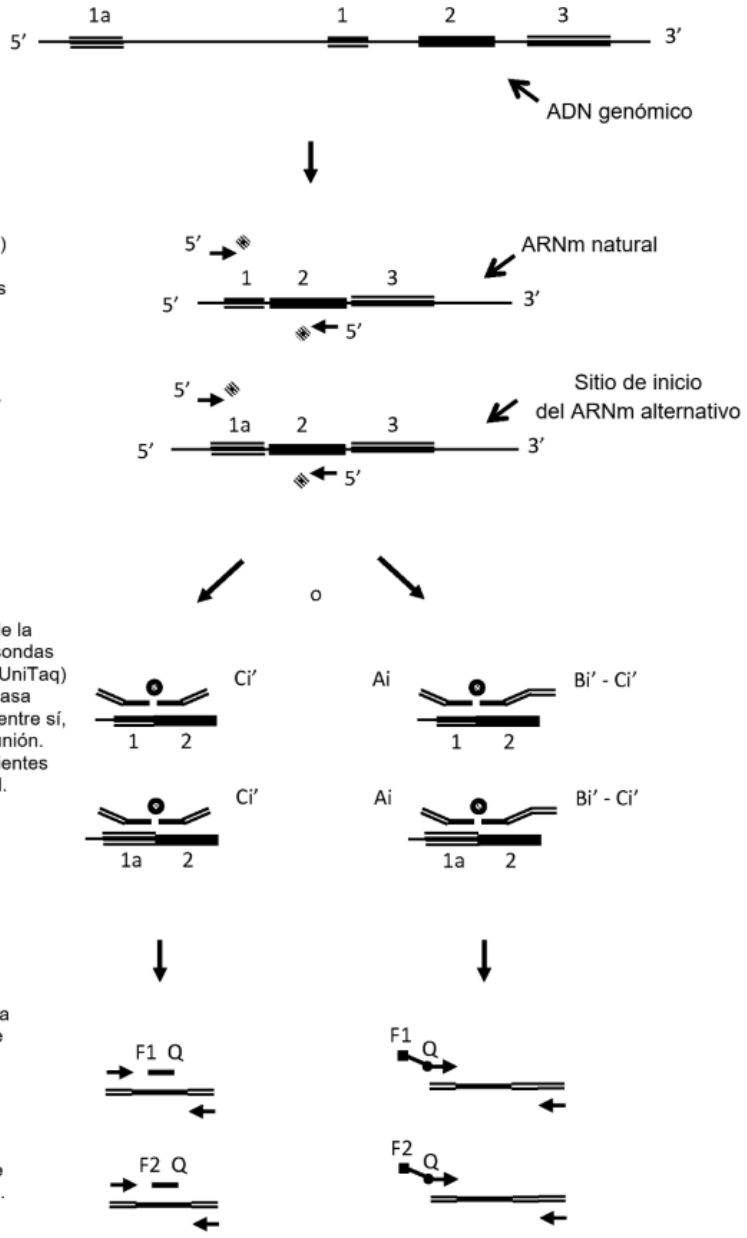


Figura 65

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para cuantificar el sitio de inicio de la transcripción natural y alternativo (1 vs. Ia). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura,

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. Los valores relativos de Ct reflejan la cantidad relativa de cada transcrito.

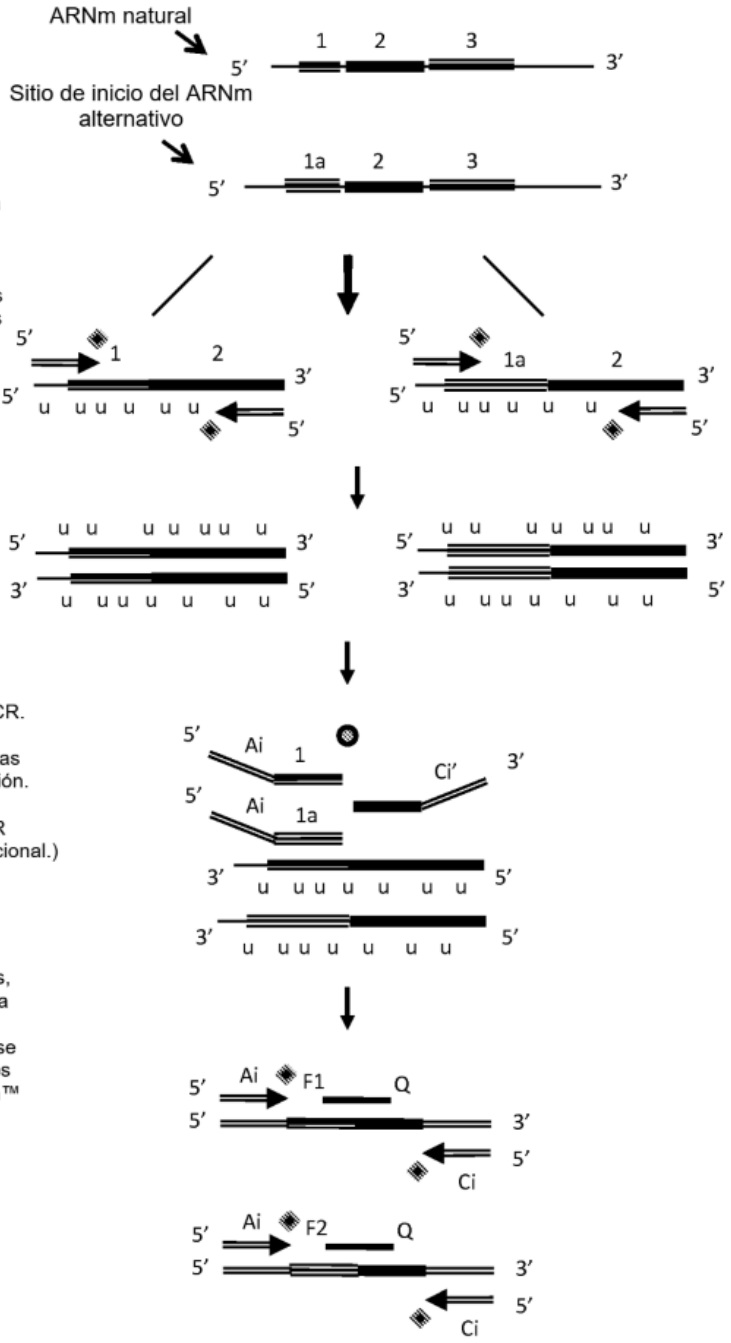


Figura 66

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para cuantificar el sitio de inicio de la transcripción natural y alternativo (1 vs. la). Aislar el ARNm

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura,

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. Los valores relativos de Ct reflejan la cantidad relativa de cada transcrito.

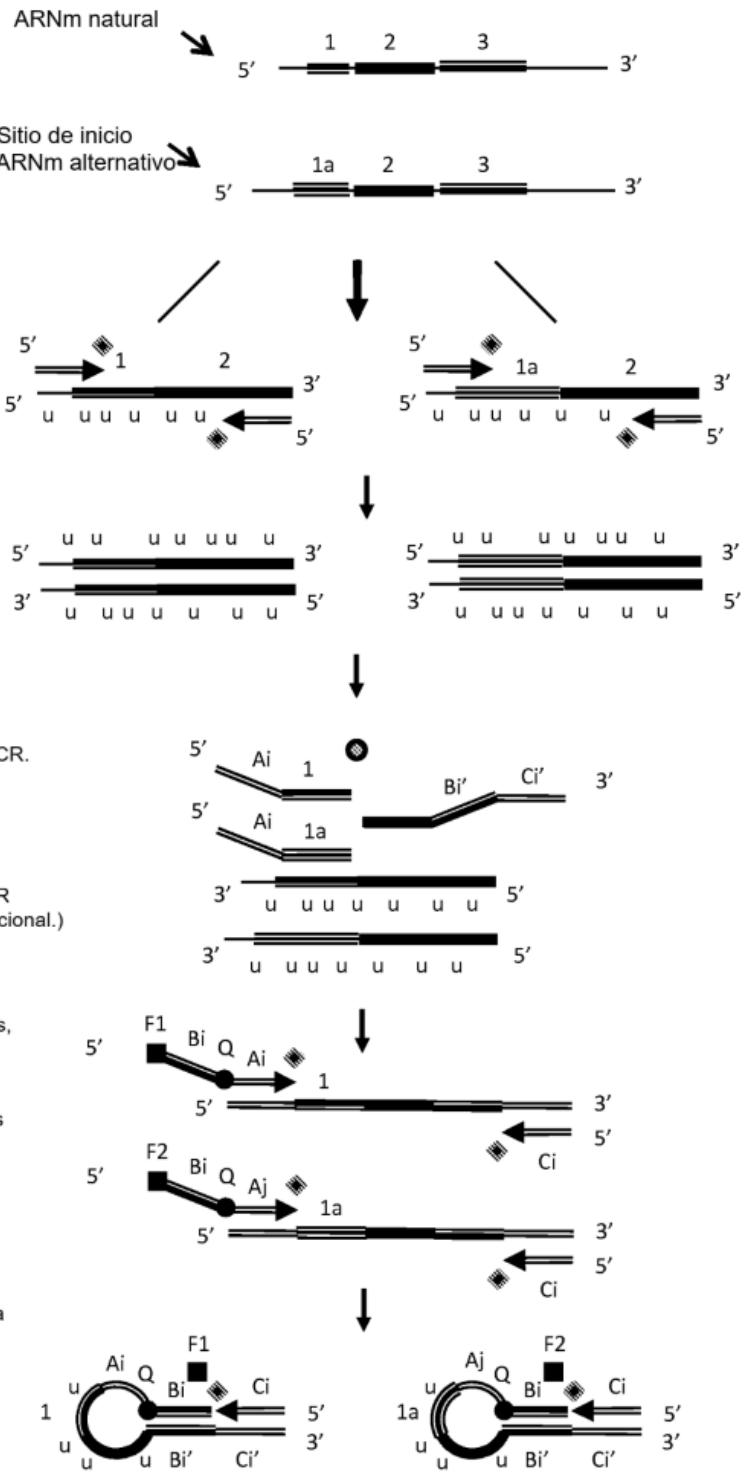


Figura 67

A. Reacción RT-PCR-qPCR
con prevención de arrastres
para cuantificar el sitio de inicio
de la transcripción natural y alternativo
(1 vs. la). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG
(uracilo ADN glicosidasa)
para prevención de arrastres, distribuir
por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos,
y destruir térmicamente.
Utilizar la transcriptasa inversa
para hacer copias del ADNc (usando dUTP)
con cebadores específicos del transcrito en 3'.
Activar la polimerasa Taq y realizar
una amplificación de ciclos limitadas (12-20)
para mantener las relaciones relativas
entre los diferentes amplicones.
Los cebadores contienen colas universales
(con 8-11 bases idénticas para prevenir
dímeros de cebadores), lo que también
permite una amplificación universal
del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU,
que permite la prevención de arrastres.
Separar el producto de los cebadores
y capturar el producto biotinilado
sobre un soporte sólido

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos
de la unión del exón contienen colas
para la posterior amplificación por FRET.
La ligasa une covalentemente los dos
oligonucleótidos entre sí.
(Los productos de la LDR no se amplifican
con ninguno de los cebadores de PCR o LDR
originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores
no ligados. Desnaturalizar el producto
de la diana, después detectar
y enumerar la señal FRET

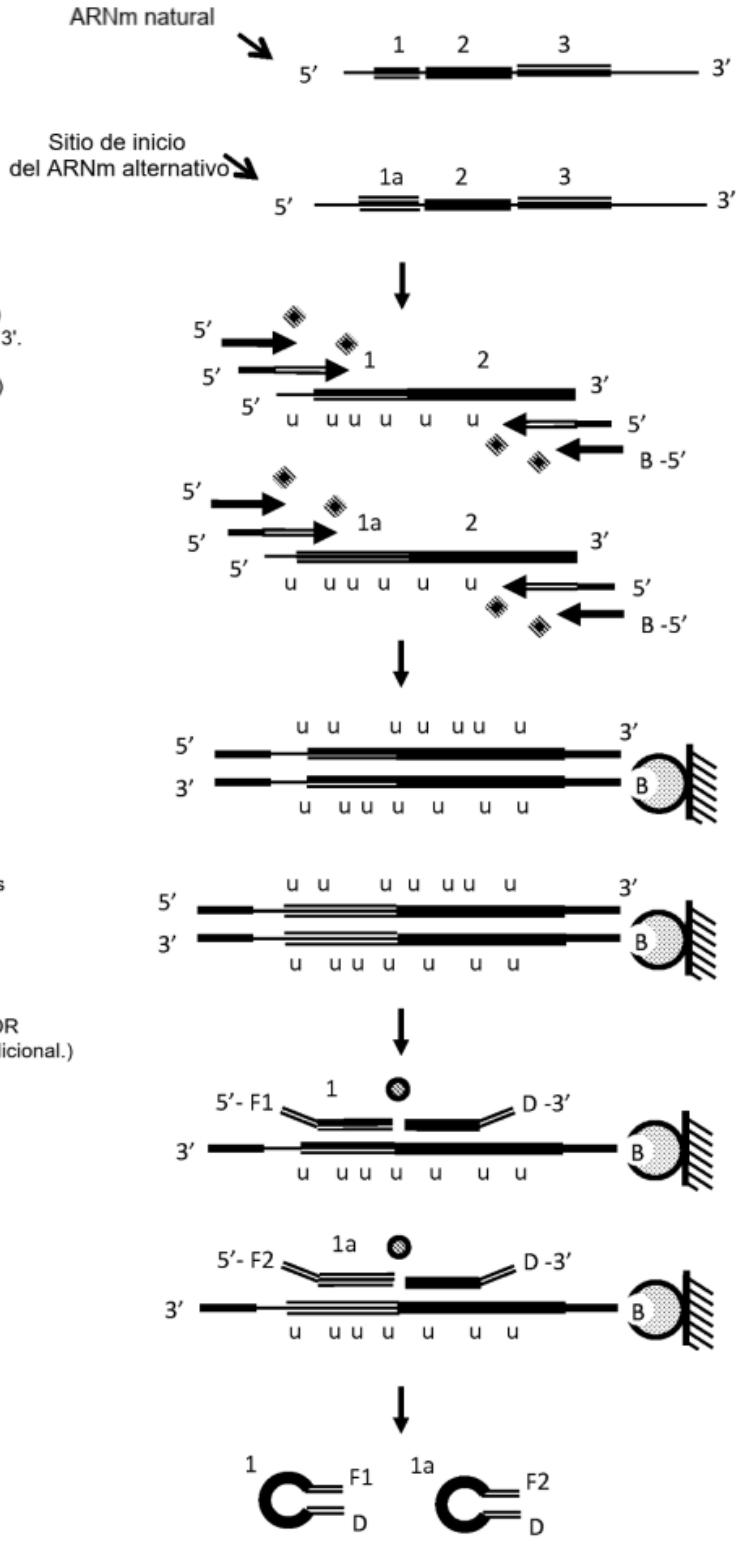


Figura 68

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para cuantificar el sitio de inicio de la transcripción natural y alternativo (1 vs. la). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan expande la unión de ligadura,

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres)

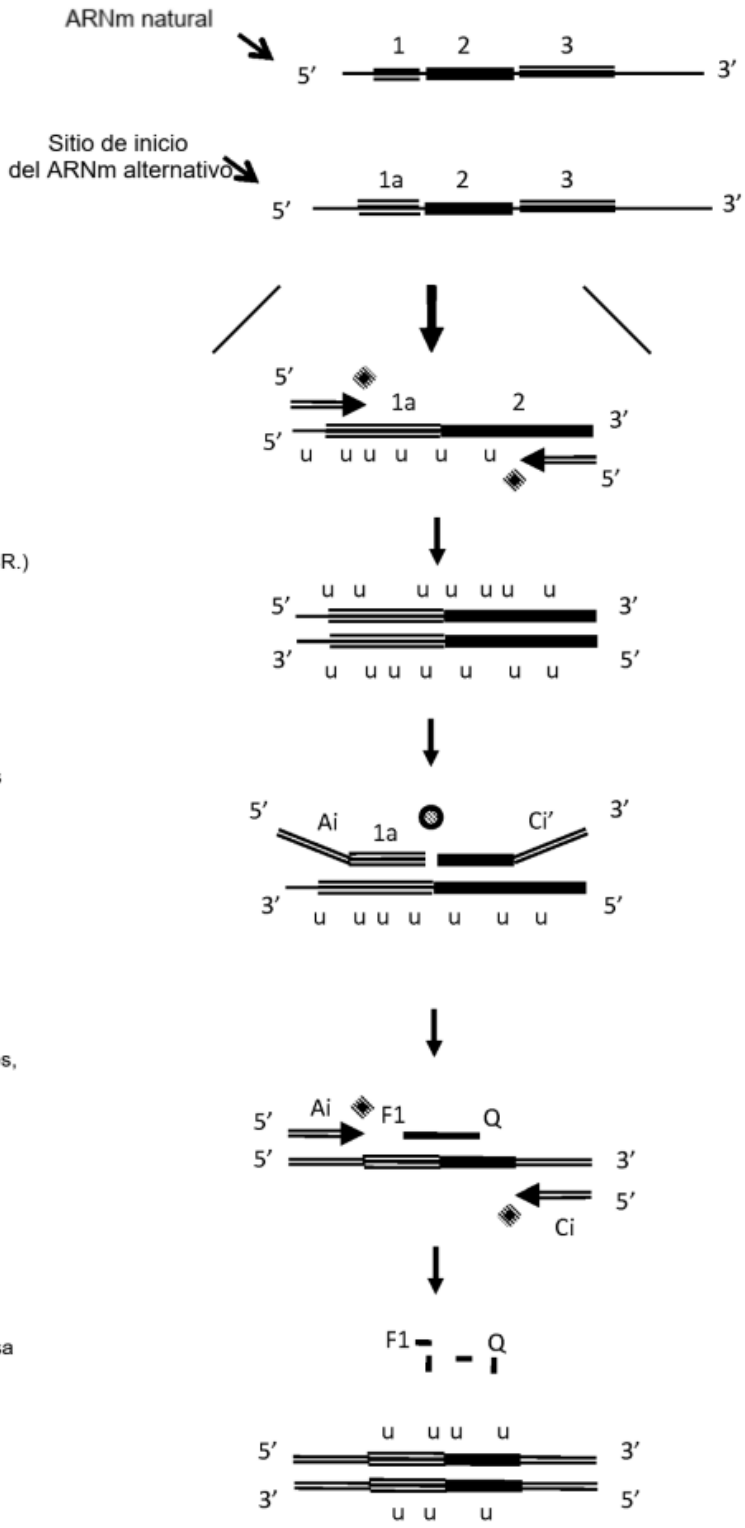


Figura 69

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para cuantificar el sitio de inicio de la transcripción alternativo de bajo nivel (1 vs. la). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. El cebador específico del exón no amplifica el transcrito wt. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Bi-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal.

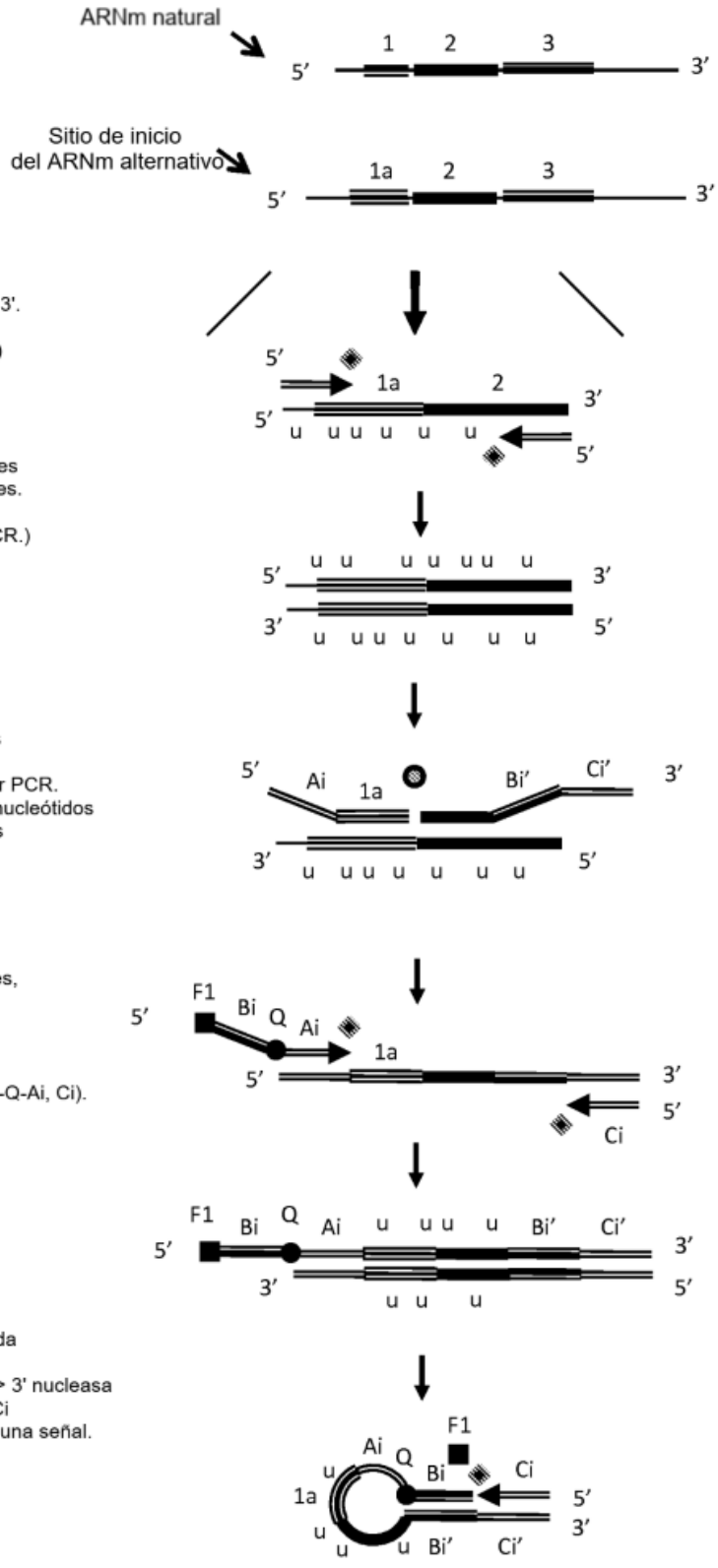


Figura 70

A. Reacción RT-PCR-qPCR con prevención de arrastres para cuantificar el sitio de inicio de la transcripción alternativo de bajo nivel (1 vs. la). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos, y destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen colas para la posterior amplificación por FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

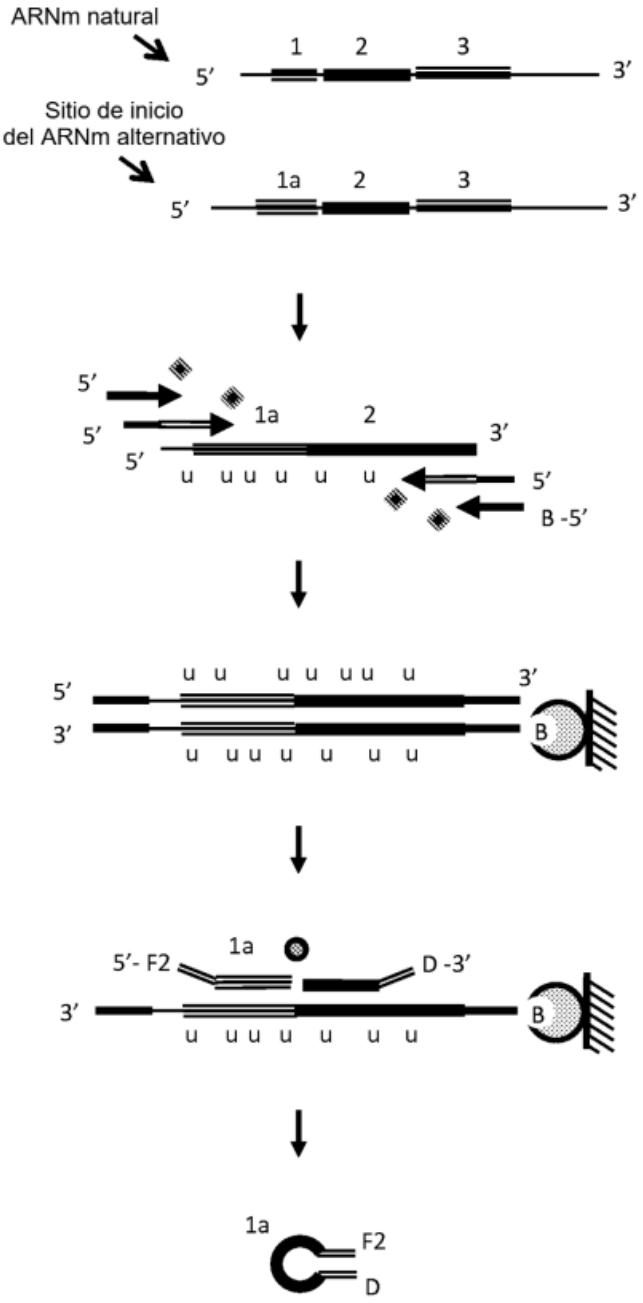


Figura 71

A. Visión general: Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar la deleción de exones. Ilustración del gen con 5 exones y 4 intrones mostrado para el ADN.

B. Ejemplo de dos ARNm, uno normal (e1-e2-e3-e4-e5) y uno con deleción de exones. Aislar el ARNm de eritrocitos completos, exosomas o CTC. Generar ADNc usando transcriptasa inversa y un cebador complementario del exón 5. Amplificar por PCR usando cebadores directos para los exones e3 y e4, generar amplicones de ambas variantes de corte y empalme.

C. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Ci' para sondas individuales Taqman; o Ai, Bi-Ci para sondas UniTaq) para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí, si son perfectamente complementarios en la unión. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando PCR en tiempo real.

D. Cuando se utilizan cebadores específicos del marcador (Ai, Ci) para amplificar los productos de la LDR del conjunto superior, cada sonda Taqman amplía la unión de ligadura, y se puede puntuar individualmente. Cuando se utilizan cebadores específicos de UniTaq (F1-Bi-Q-Ai,Ci) para amplificar los productos de la LDR del conjunto inferior, un conjunto de cebadores dado puntúa una unión por ligadura dada.

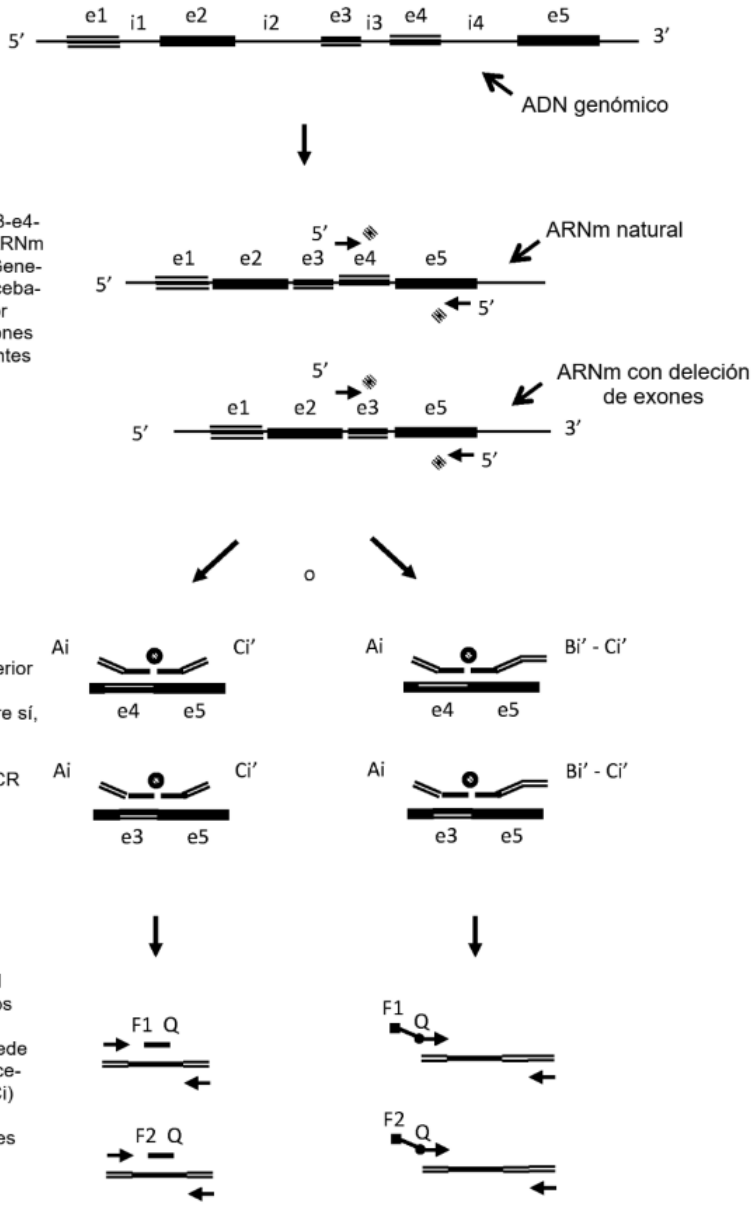


Figura 72

72

A. Reacción de RT-PCR-LDR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el transcrito natural y el de corte y empalme alternativo (deleción de exones). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. Los valores relativos de Ct reflejan la cantidad relativa de cada transcrito.

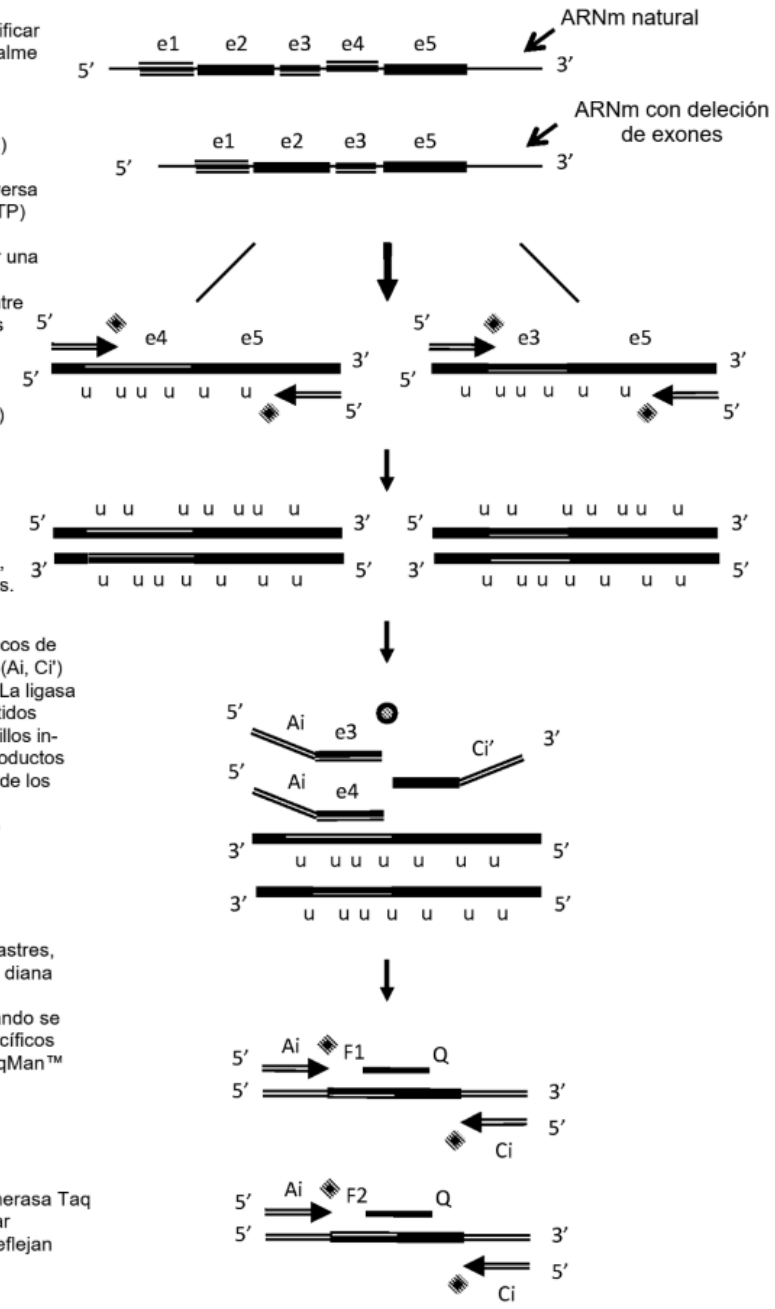


Figura 73

A. Reacción de RT-PCR-LDR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el transcrito natural y el de corte y empalme alternativo (deleción de exones). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Bi-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR (no mostrados); el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal. Los valores relativos de Ct reflejan la cantidad relativa de cada transcrito.

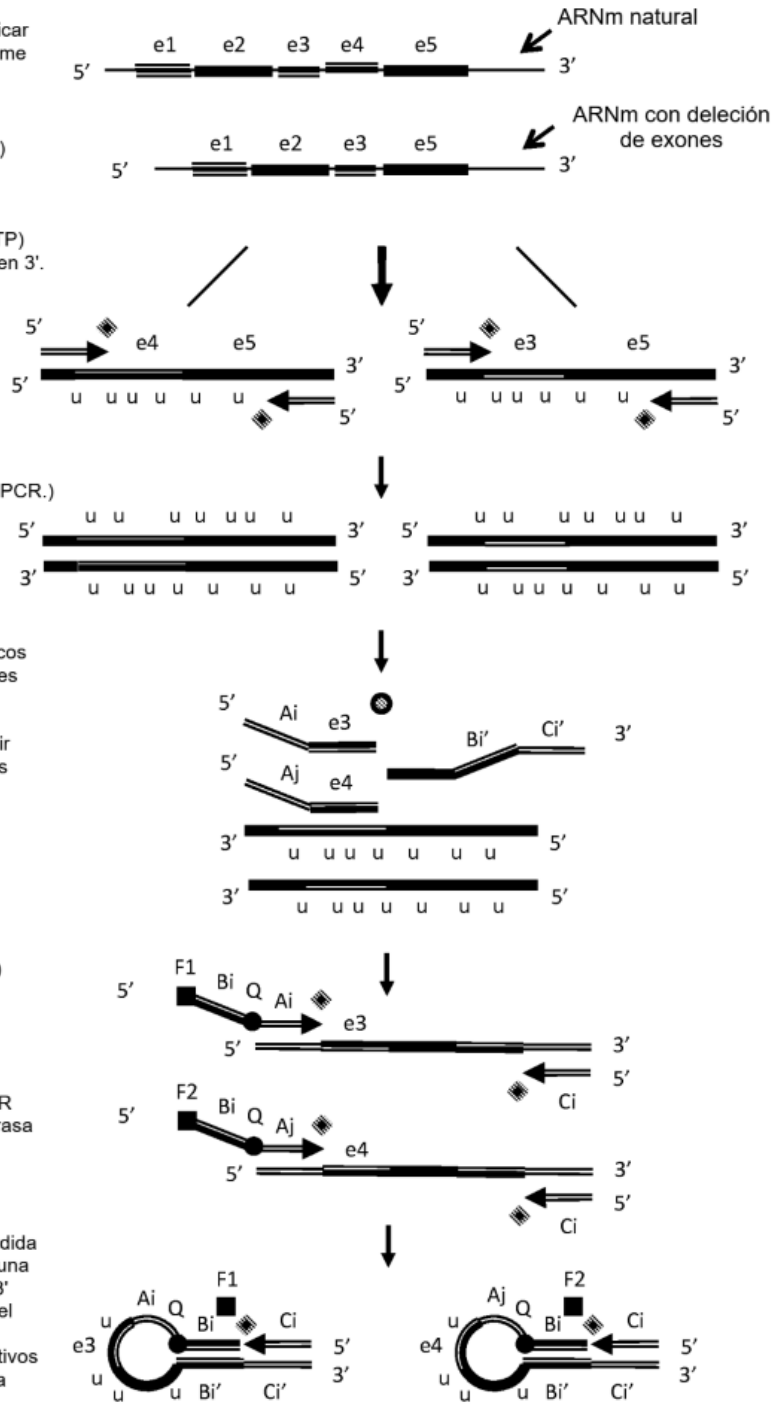


Figura 74

A. Reacción de RT-PCR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el transcrito natural y el de corte y empalme alternativo (deleción de exones). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos, y destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones.
Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen colas para la posterior amplificación por FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

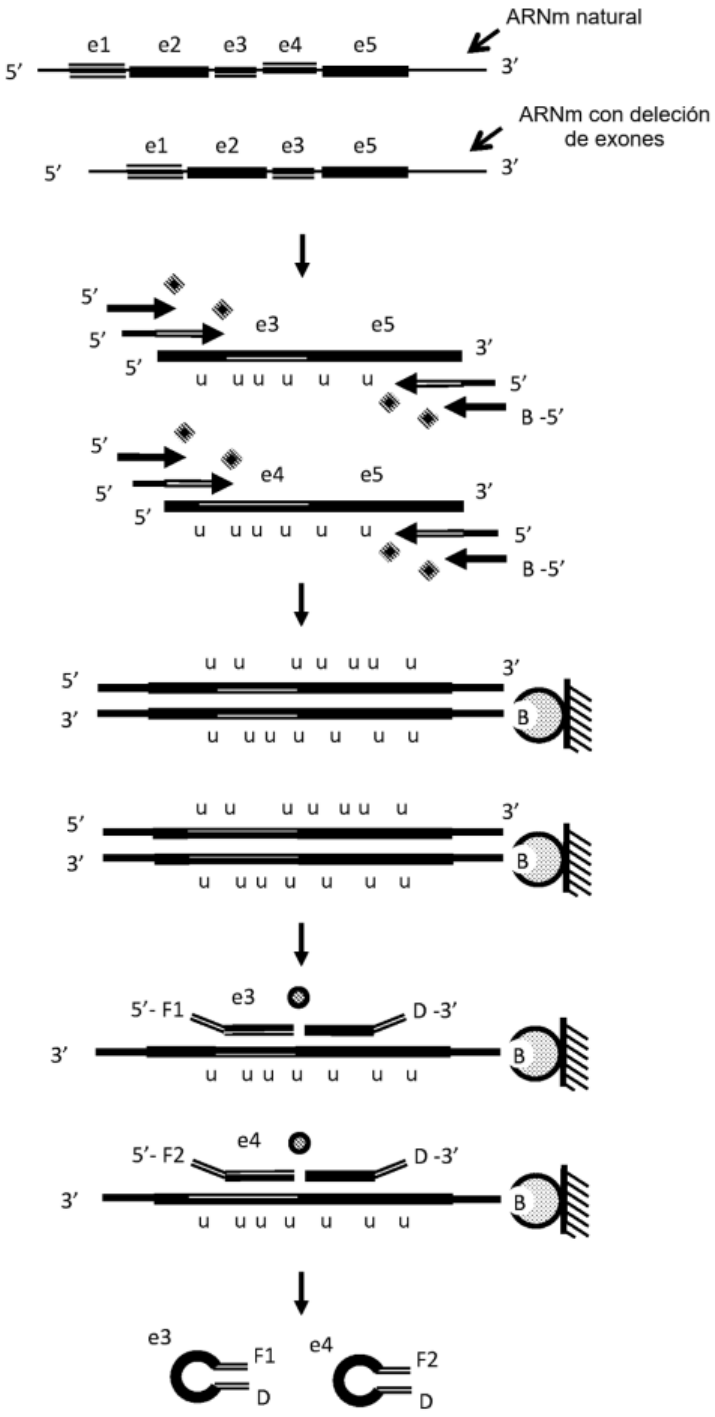


Figura 75

A. Reacción de RT-PCR-LDR-qLDR con prevención de arrastres para detectar el transcrito de corte y empalme alternativo de bajo nivel (deleción de exones). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. El bloqueo de los oligonucleótidos suprime la amplificación del transcrito natural. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR incorporan dU, para permitir la prevención de arrastres.)

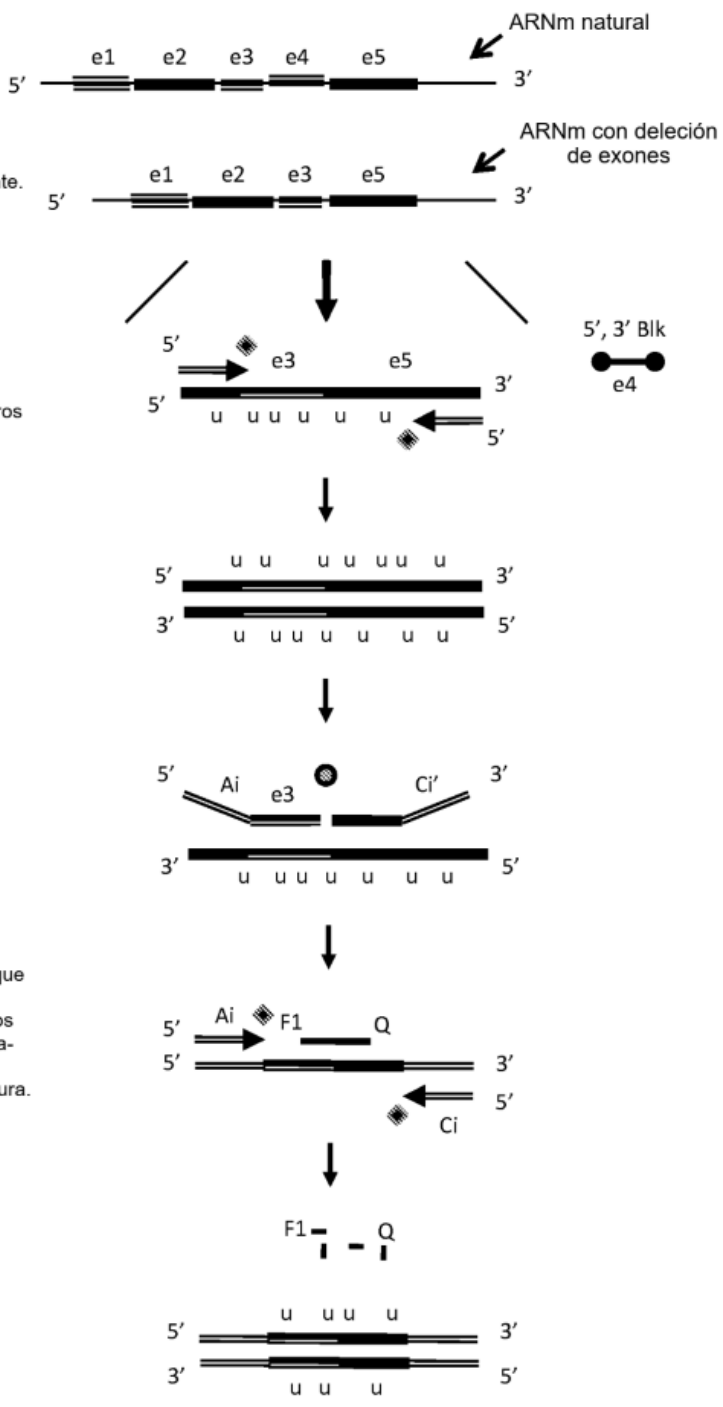


Figura 76

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar un transcrito de corte y empalme alternativo (deleción de exones) de bajo nivel. Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. El bloqueo del oligonucleótido suprime la amplificación del transcrito wt. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Bi-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal.

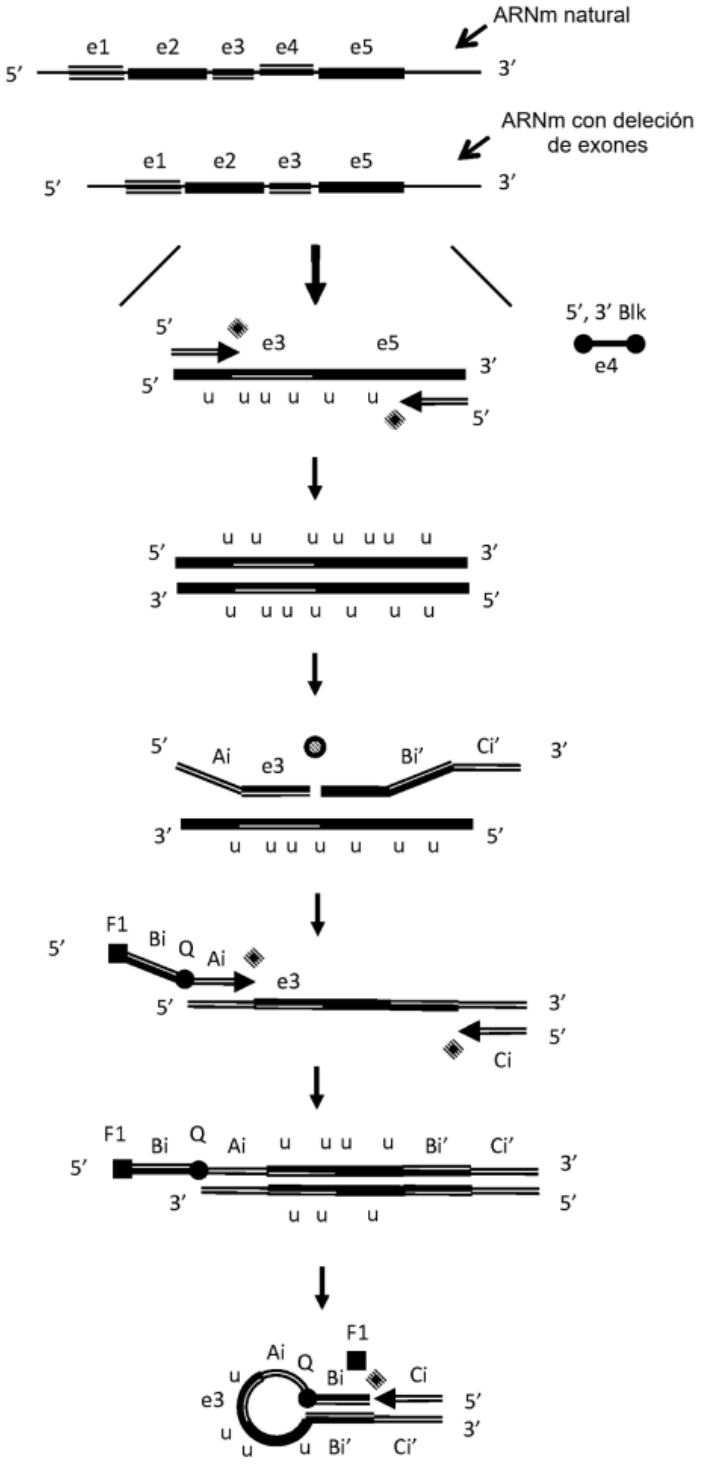


Figura 77

A. Reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre para detectar un transcrito de corte y empalme alternativo (deleción de exones) de bajo nivel. Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos, y destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. El bloqueo del oligonucleótido suprime la amplificación del transcrito wt.
Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen colas para la posterior amplificación por FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

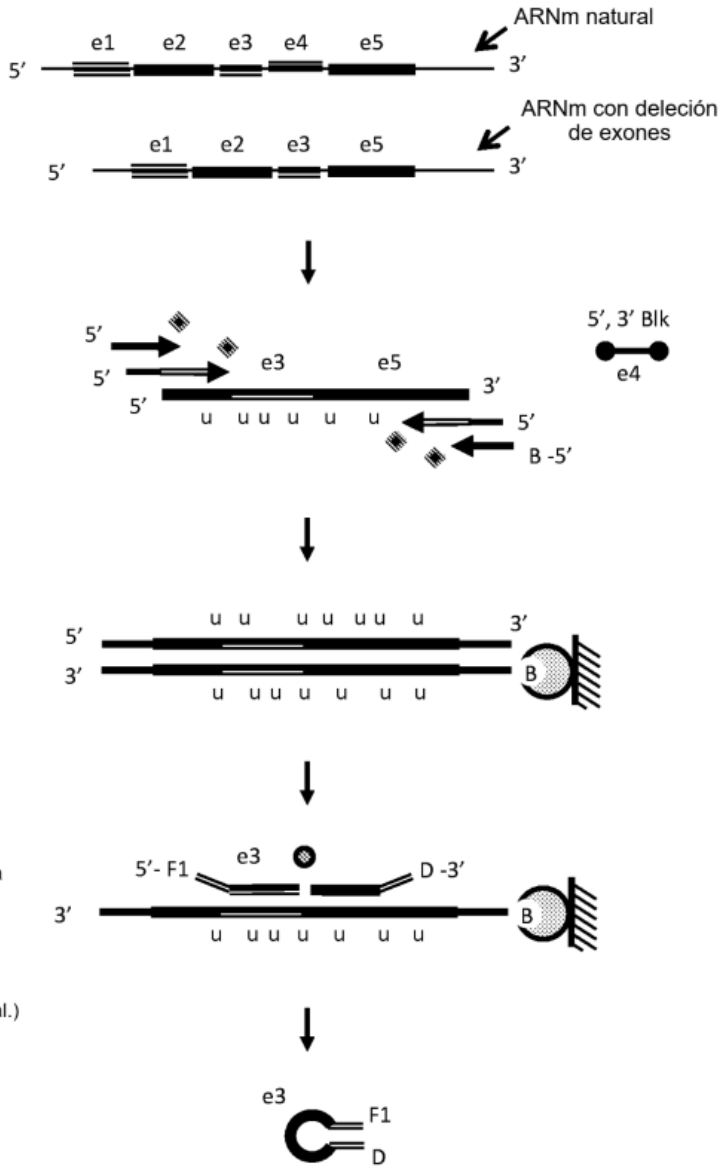
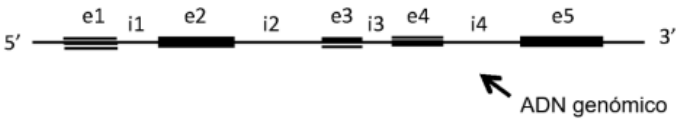
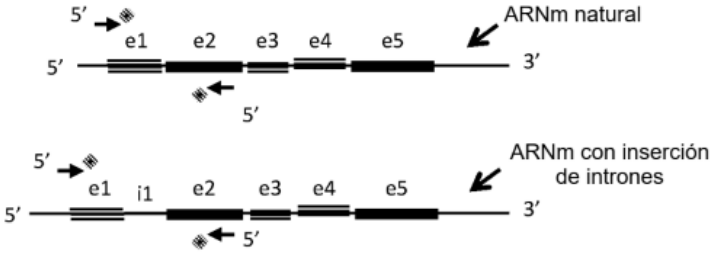


Figura 78

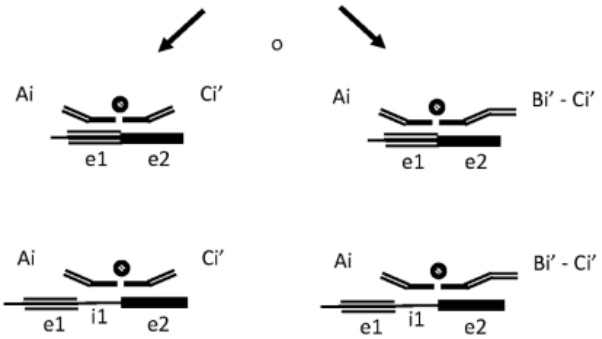
A. Visión general: Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar el corte y empalme alternativo con inserción de intrones. Ilustración del gen con 5 exones y 4 intrones mostrados para el ADN.



B. Se ilustra un ejemplo de ARNm normal (el-e2-e3-e4-e5) y con inserción de intrones (el-il-e2-e3-e4-e5). Aislar el ARNm a partir de eritrocitos completos, exosomas o CTC. Generar ADNc usando transcriptasa inversa y un cebador complementario del exón e2. Amplificar por PCR usando el cebador directo del exón e1, generando amplicones de ambas variantes de corte y empalme.



C. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión contienen marcadores (Ai, Ci' para las sondas Taqman individuales; o Ai, Bi-Ci para sondas UniTaq) para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí, si son perfectamente complementarios en la unión. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección usando PCR en tiempo real.



D. Cuando se utilizan cebadores específicos de la marca (Ai, Ci) para amplificar los productos de la LDR del conjunto superior, cada sonda TaqMan expande la unión de ligadura, y se puede puntuar individualmente. Cuando se usan cebadores específicos de UniTaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci), para amplificar los productos de la LDR del conjunto inferior, un conjunto de cebadores puntúa una unión de ligadura dada.

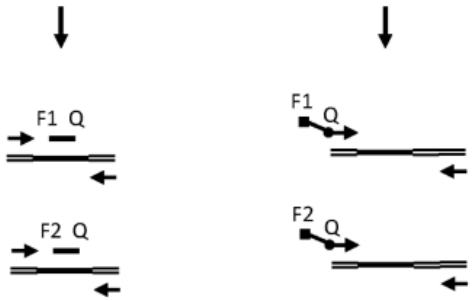


Figura 79

A. Reacción de RT-PCR-LDR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el transcrito natural y el de corte y empalme alternativo (inserción de intrones). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. Los valores relativos de Ct reflejan la cantidad relativa de cada transcrito.

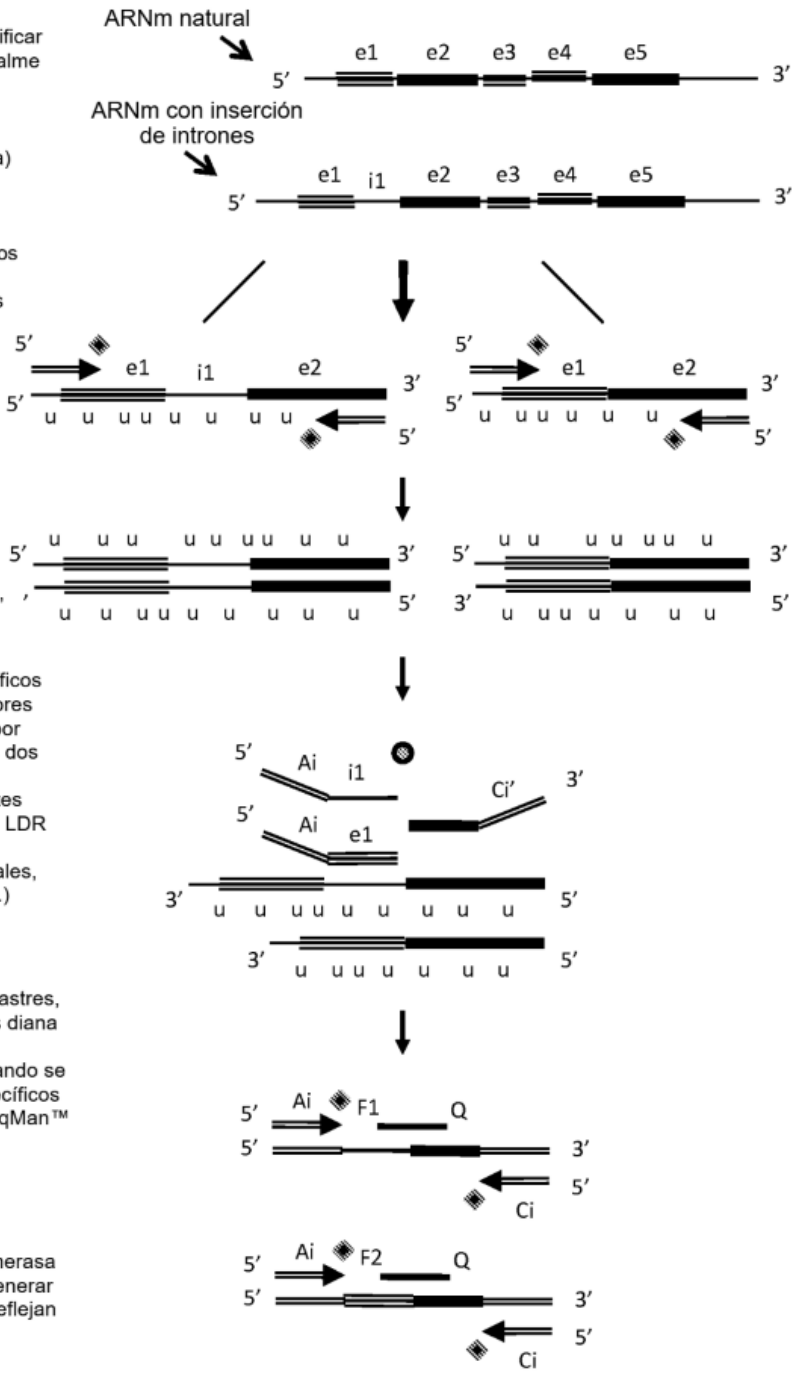


Figura 80

A. Reacción de RT-PCR-LDR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el transcrito natural y el de corte y empalme alternativo (inserción de intrones). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastre, destruir térmicamente. Utilizar transcriptasa inversa para hacer una copia de ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcripto 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitada (1-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores (Opcionalo: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Bi-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR (no mostrados); el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal. Los valores relativos de Ct reflejan la cantidad relativa de cada transcrito.

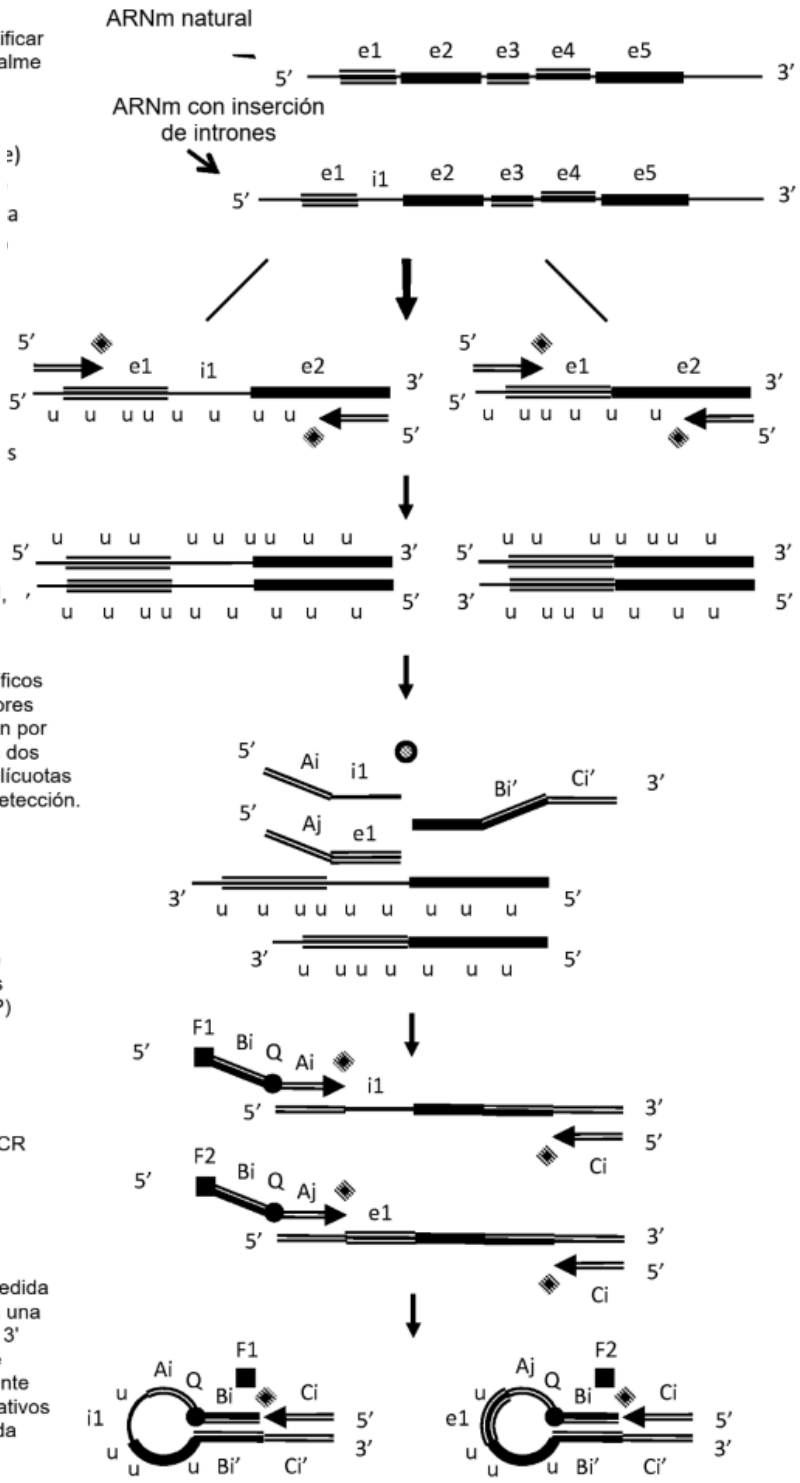


Figura 81

A. Reacción de RT-PCR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el transcrito natural y el de corte y empalme alternativo (inserción de intrones). Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos, y destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen colas para la posterior amplificación por FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET

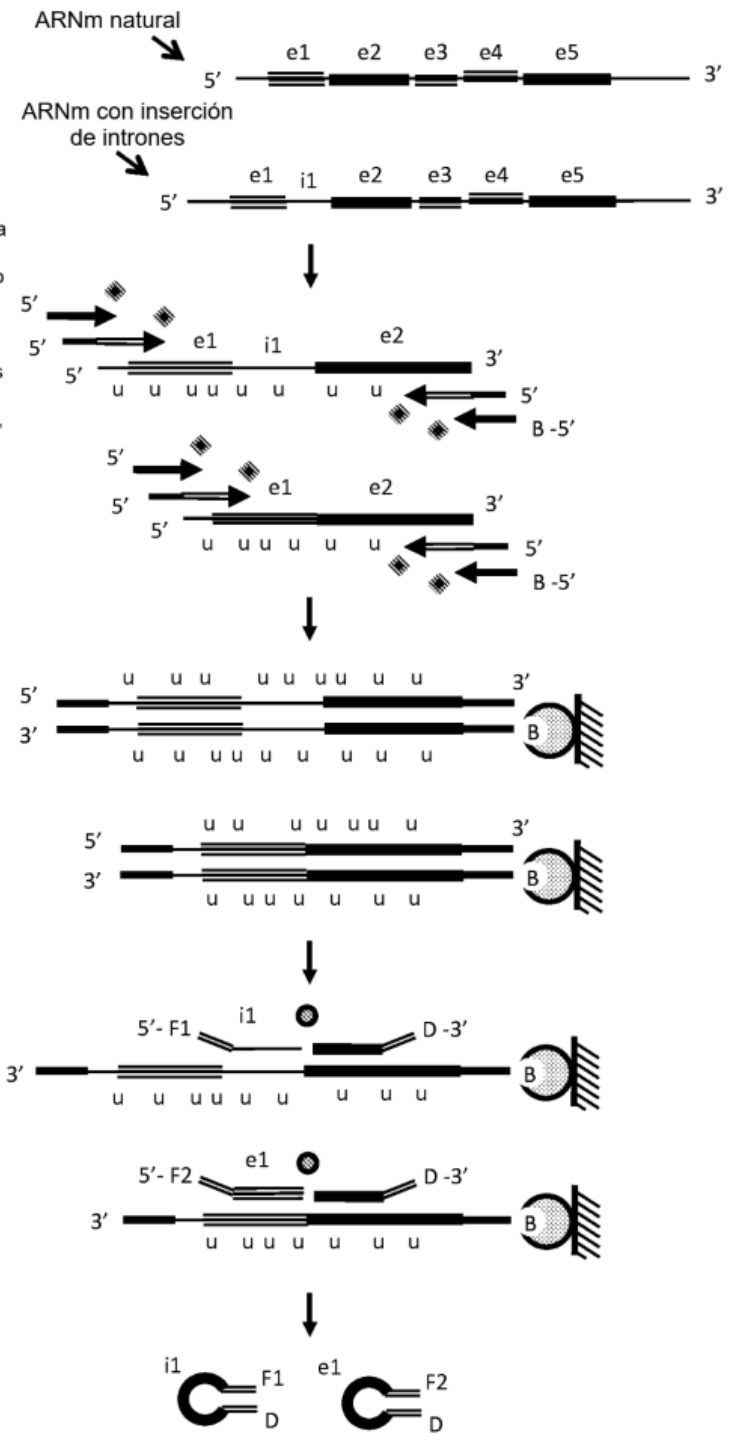


Figura 82

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar un transcrito de corte y empalme alternativo (inserción de intrones) de bajo nivel. Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. El cebador específico del intrón no amplifica el transcrito wt. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

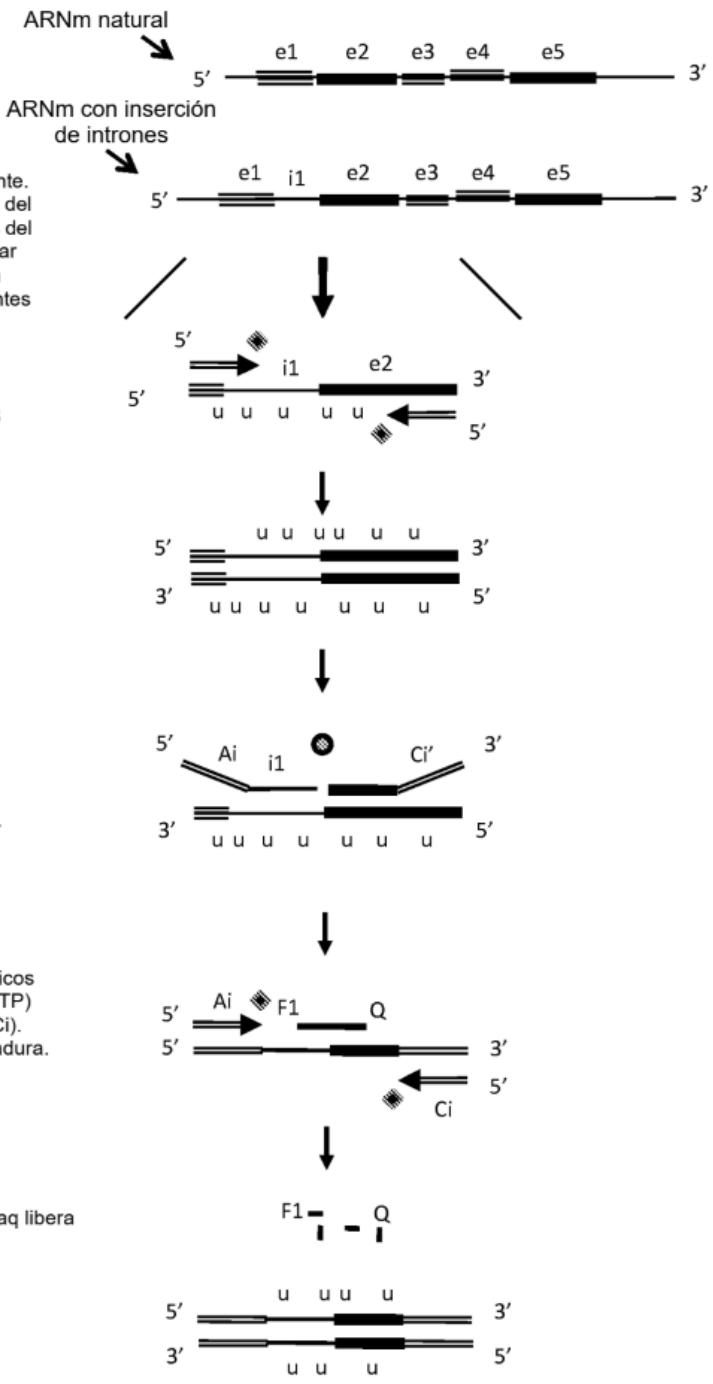


Figura 83

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para detectar un transcrito de corte y empalme alternativo (inserción de intrones) de bajo nivel. Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. El cebador específico del intrón no amplifica el transcrito wt. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen marcadores (Ai, Bi-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal.

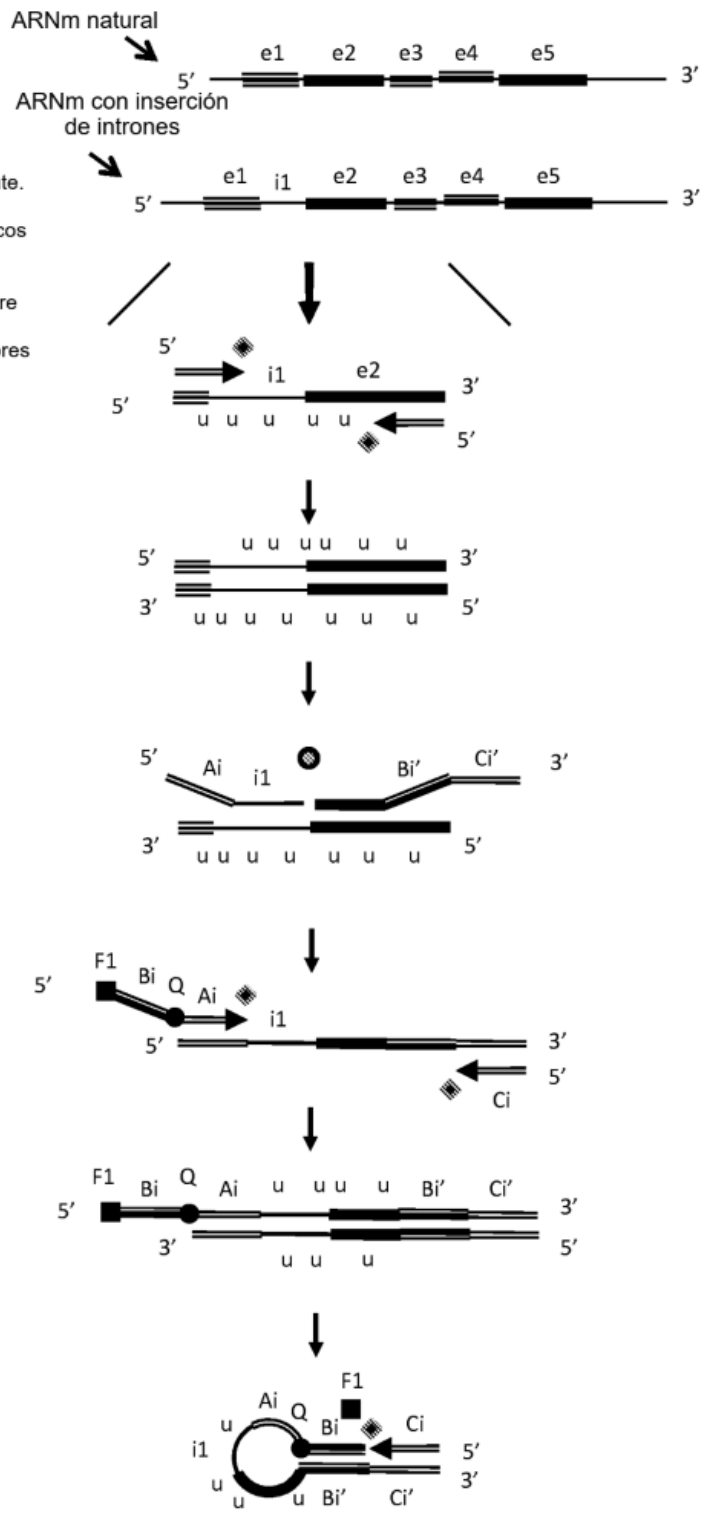


Figura 84

A. Reacción PCR-LDR con prevención de arrastre para detectar un transcrito de corte y empalme alternativo (inserción de intrones) de bajo nivel. Aislar el ARNm.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos, y destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. El cebador específico del intrón no amplifica el transcrito wt. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la unión del exón contienen colas para la posterior amplificación por FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

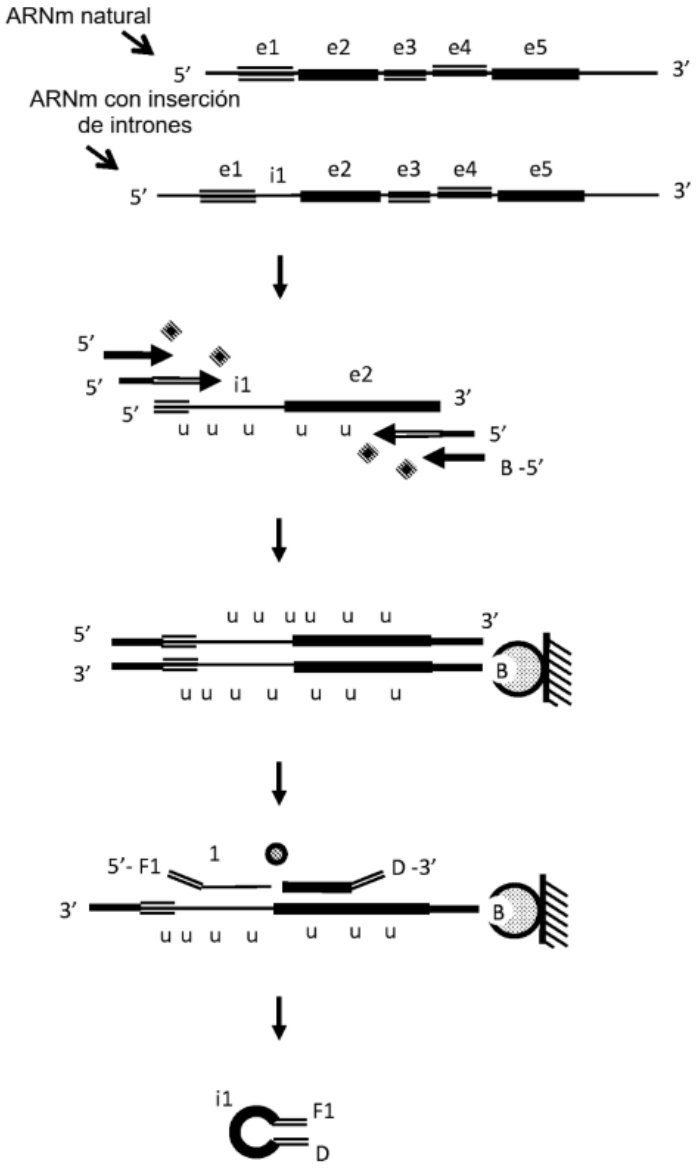


Figura 85

A. Reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para enumerar el número de copias de ADN. Aislar el ADN tumoral de las CTC o exosomas específicos de tumor.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres y amplificar regiones cromosómicas usando la PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones.
Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores.
Para una enumeración precisa, distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de locus contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci).
Cada sonda TaqMan expande la unión de ligadura.

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. Determinar el número de copias según la señal procedente de los pocillos donde la distribución original era de una copia/pocillo.

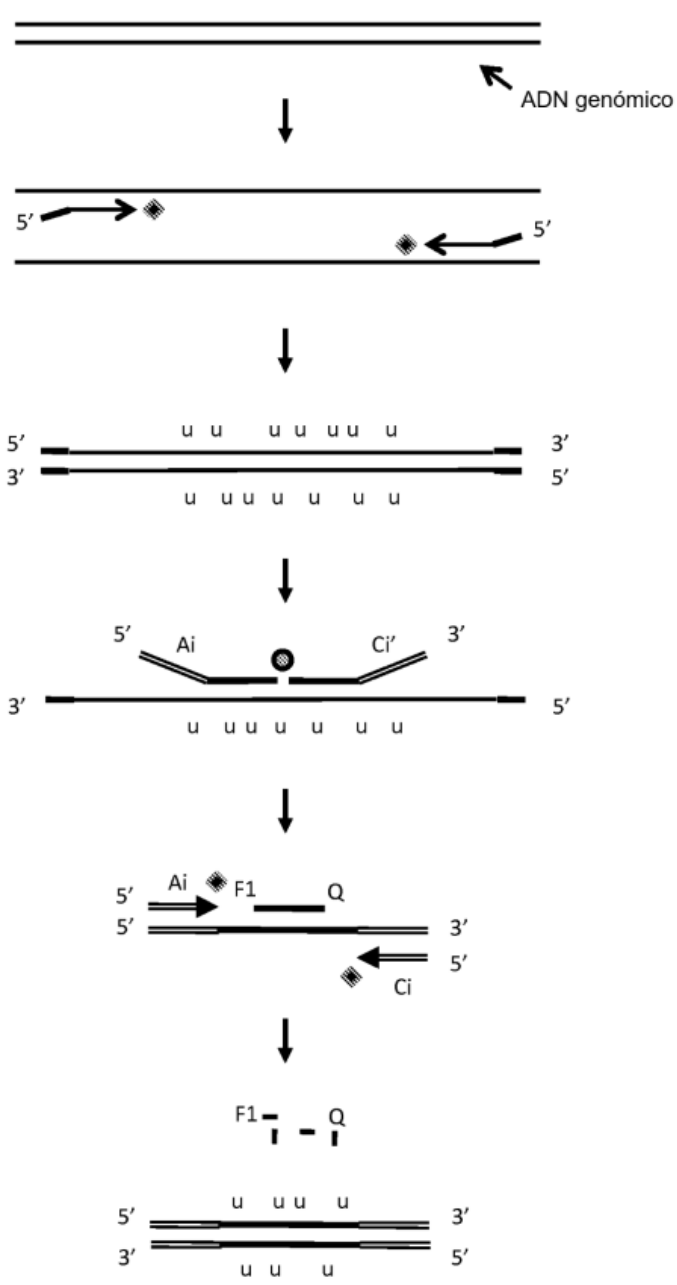


Figura 86

A. Reacción PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para enumerar el número de copias de ADN. Aislar el ADN tumoral de las CTC o exosomas específicos de tumor.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres y amplificar regiones cromosómicas usando la PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Para una enumeración precisa, distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de locus contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de UniTaq (F1-Bi-Q-Ai-Ci),

F. Productos de la PCR de ADN bicatenario; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que la temperatura disminuye, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad nucleasa 5'->3' de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal. Determinar el número de copia según la señal procedente de los pocillos donde la distribución original es de una copia/pocillo

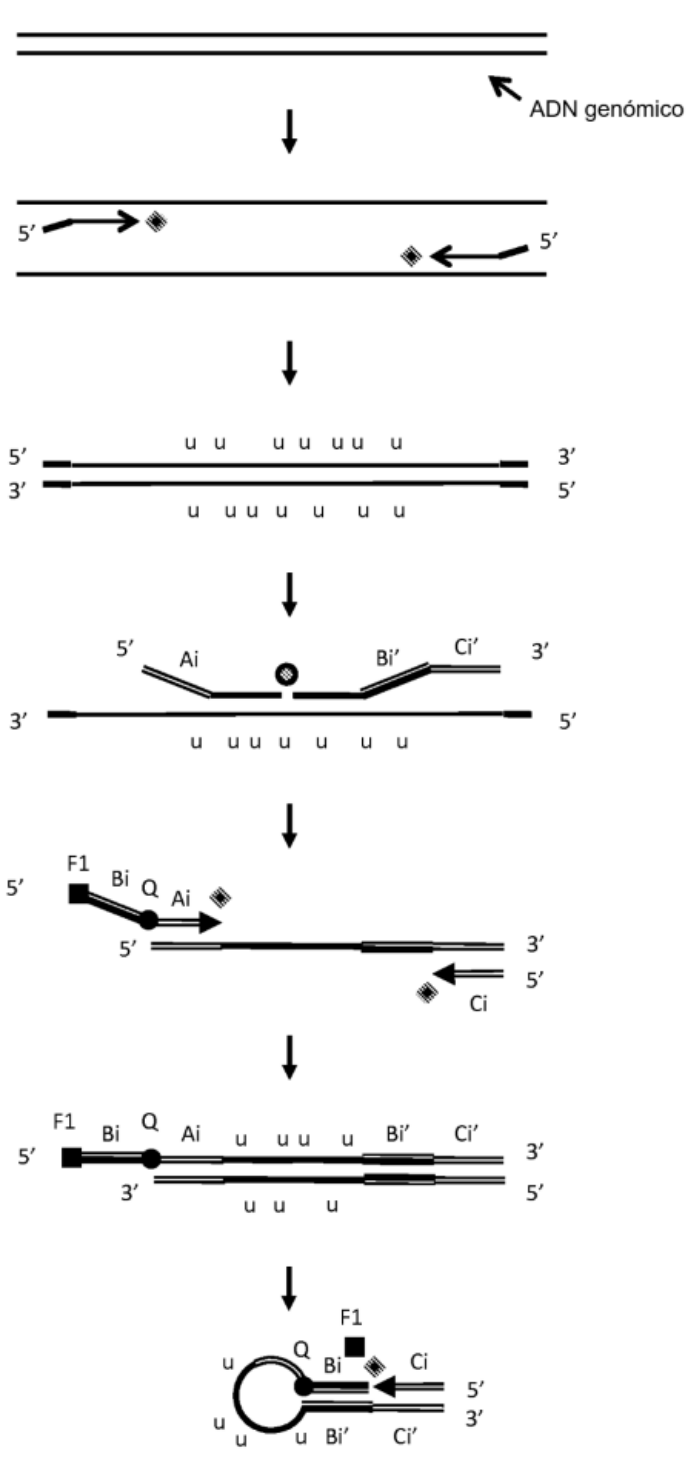


Figura 87

A. Reacción PCR-qPCR con prevención de arrastre para enumerar el número de copias de ADN. Aislar el ADN tumoral a partir de CTC o exosomas específicos de tumor.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, distribuir por alícuotas en 12, 24, 48 o 96 pocillos, y amplificar las regiones que contienen mutaciones usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitada (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos con ligadura específica de locus contienen colas para la posterior detección FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET. Determinar el número de copias basándose en la señal procedente de los pocillos donde la distribución original era una copia/pocillo.

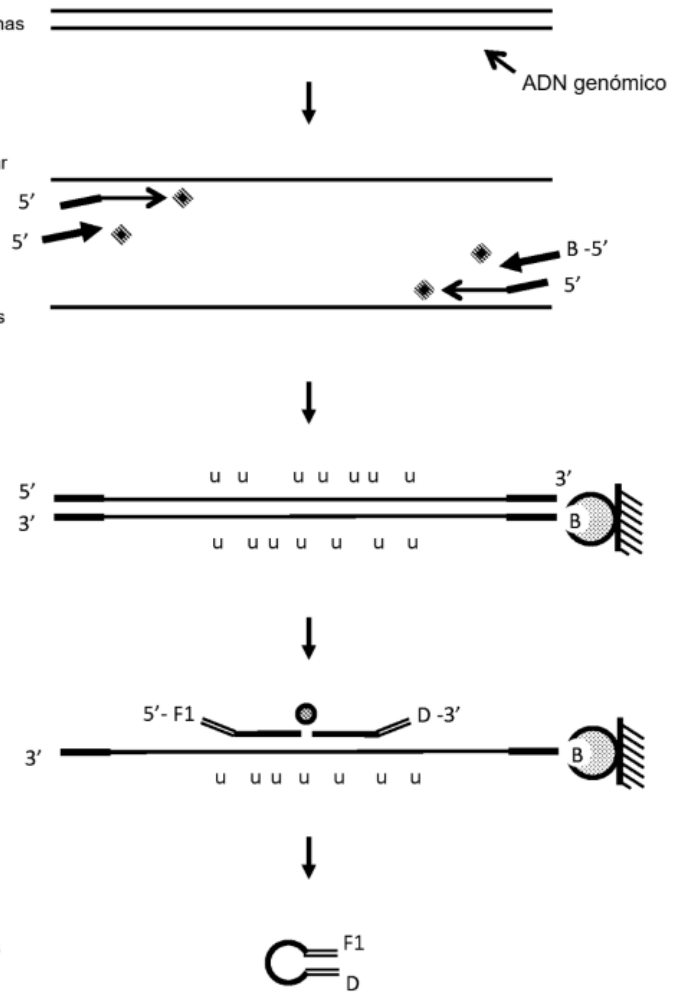


Figura 88

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para enumerar el número de copias de ARN. Aislar el ARNm a partir de eritrocitos completos, exosomas o CTC.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Para una enumeración precisa, distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de locus contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. Determinar el número de copias basándose en la señal procedente de los pocillos donde la distribución original era una copia/pocillo.

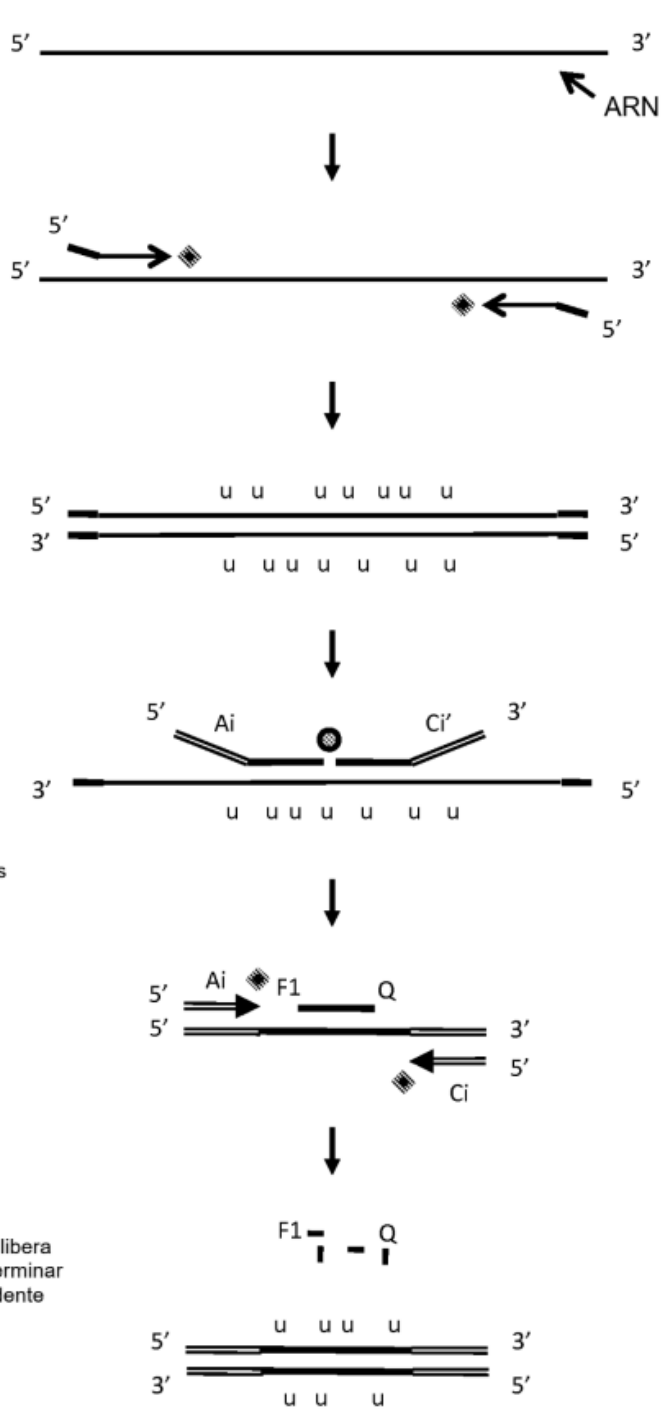


Figura 89

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastre para enumerar el número de copias de ARN. Aislar el ARNm a partir de eritrocitos completos, exosomas o CTC.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. Para una enumeración precisa, distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de locus contienen marcadores (Ai, Bi'-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal. Determinar el número de copias basándose en la señal procedente de los pocillos donde la distribución original era una copia/pocillo.

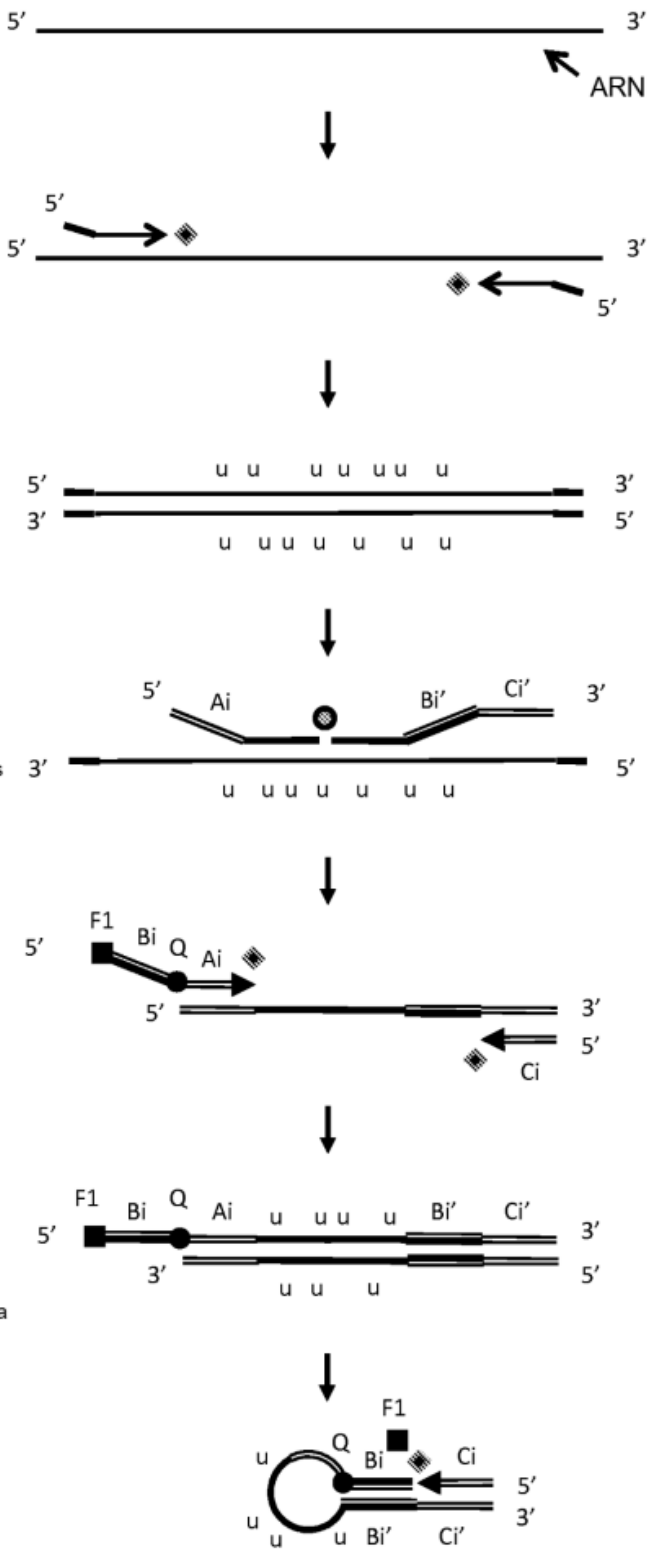


Figura 90

A. Reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastre para enumerar el número de copias de ARN. Aislar el ARNm a partir de eritrocitos completos, exosomas o CTC.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, y distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos. Utilizar la transcriptasa inversa para hacer copias del ADNc (usando dUTP) con cebadores específicos del transcrito en 3'. Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitadas (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas universales (con 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores), lo que también permite una amplificación universal del cebador para agregar un biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos con ligadura específica de locus contienen colas para la posterior detección FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET. Determinar el número de copias basándose en la señal procedente de los pocillos donde la distribución original era una copia/pocillo.

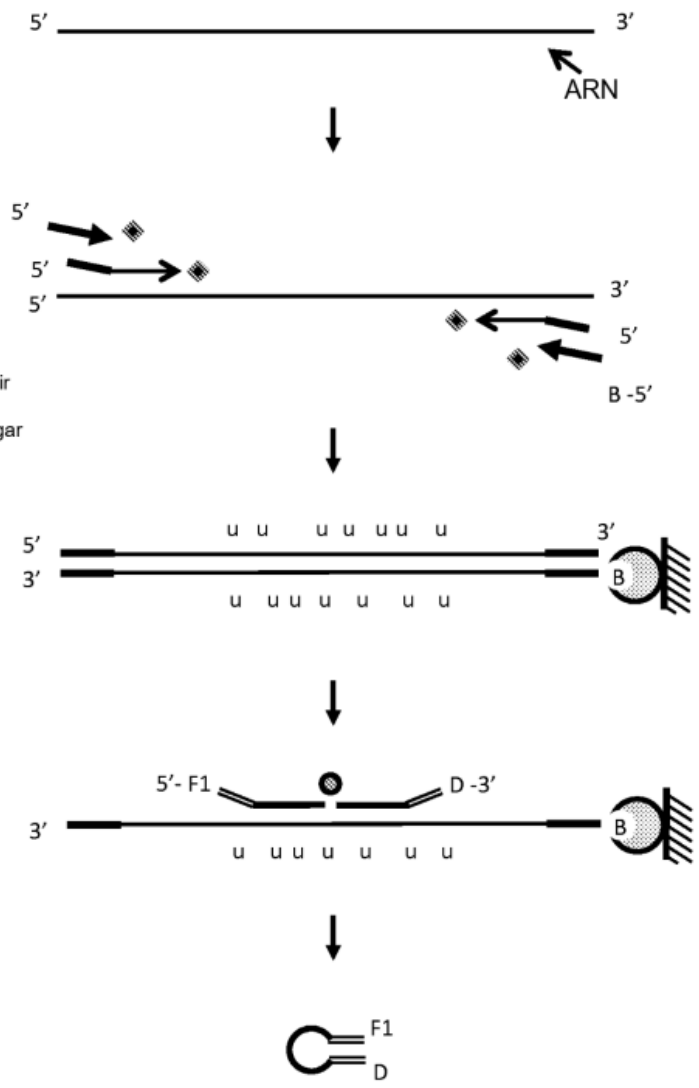


Figura 91

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para cuantificar el miARN. Aislar el miARN de exosomas.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Hibridar la sonda complementaria con el extremo 3' del miARN diana, que contiene una horquilla, una marca (Tj) y un grupo bloqueante. Extender el extremo 3' del cebador de bucle con transcriptasa inversa (usando dUTP). Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitada (12-20) por PCR usando cebadores puente y marcador (Ti, Tj), para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la secuencia de miARN contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

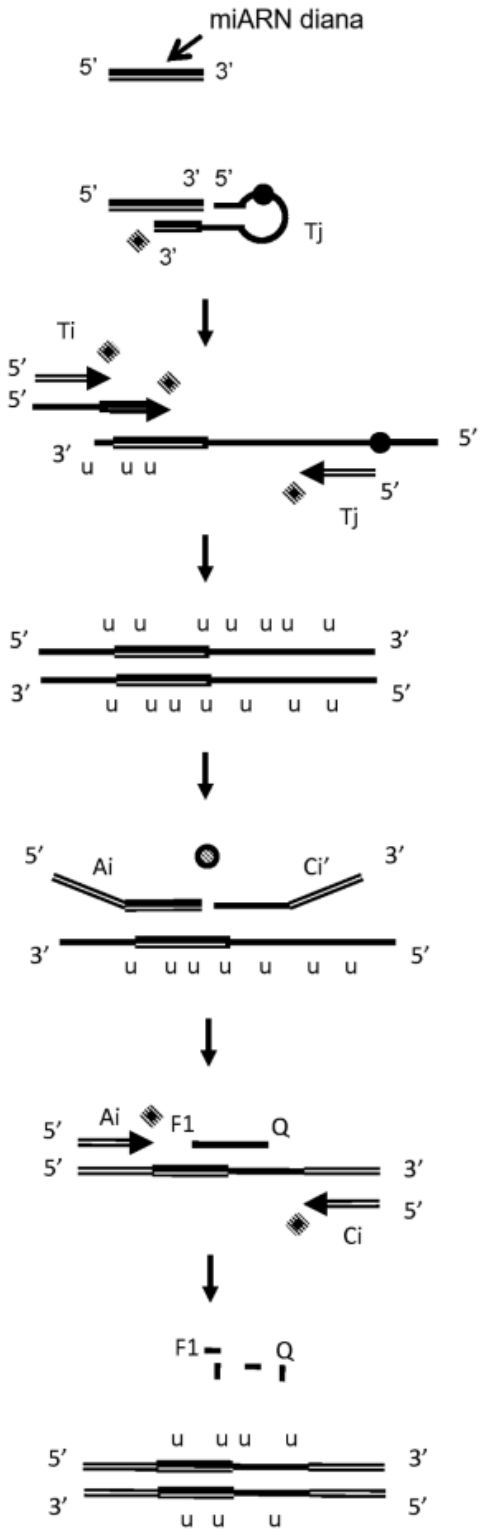


Figura 92

A. Reacción RT-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para cuantificar el miARN. Aislar miARN de exosomas.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Hibridar la sonda complementaria con el extremo 3' del miARN diana, que contiene una horquilla, una marca (Tj) y un grupo bloqueante. Extender el extremo 3' del cebador de bucle con transcriptasa inversa (usando dUTP). Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitada (12-20) por PCR usando cebadores puente y marcador (Ti, Tj), para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la secuencia de miARN contienen marcadores (Ai, Bi-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal.

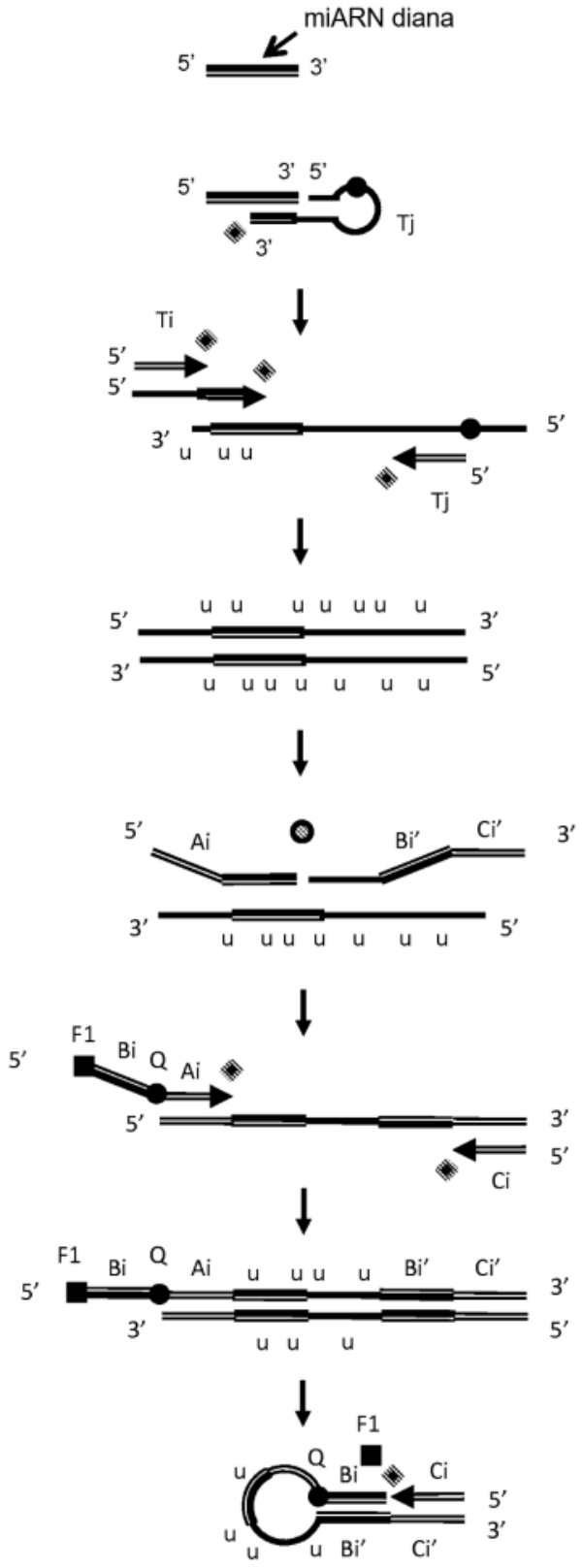


Figura 93

A. Reacción RT-PCR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el miARN. Aislar el miARN de exosomas.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, y distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos. Hibridar la sonda complementaria con el extremo 3' del miARN diana, que contiene una horquilla, una marca (Tj) y un grupo bloqueante. Extender el extremo 3' del cebador de bucle con transcriptasa inversa (usando dUTP). Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitada (12-20) por PCR usando cebadores puente y marcador (Ti, Tj), para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores, conteniendo un cebador biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos con ligadura específica de miARN contienen colas para la posterior detección FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

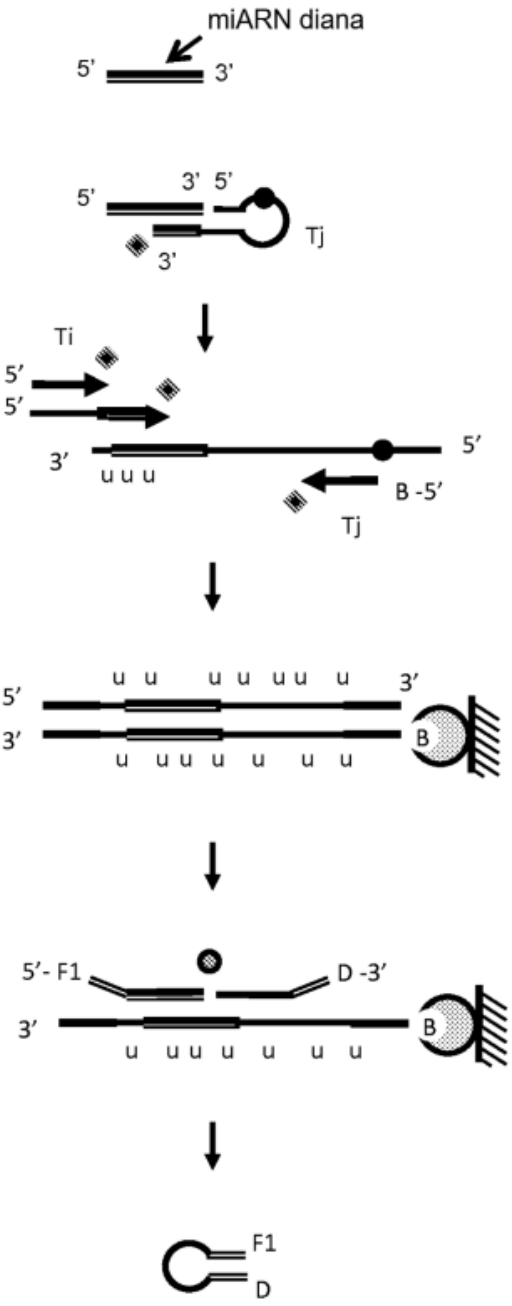


Figura 94

A. Reacción Ligadura-RT-PCR-LDR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el miARN. Aislar miARN de exosomas.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Ligar la sonda complementaria con el extremo 3' del miARN diana, que contiene una horquilla, una marca (Tj') y un grupo bloqueante. Extender con el cebador Tj y la transcriptasa inversa (usando dUTP). Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitada (12-20) por PCR usando cebadores puente y marcador (Ti, Tj), para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la secuencia de miARN contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.

F. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

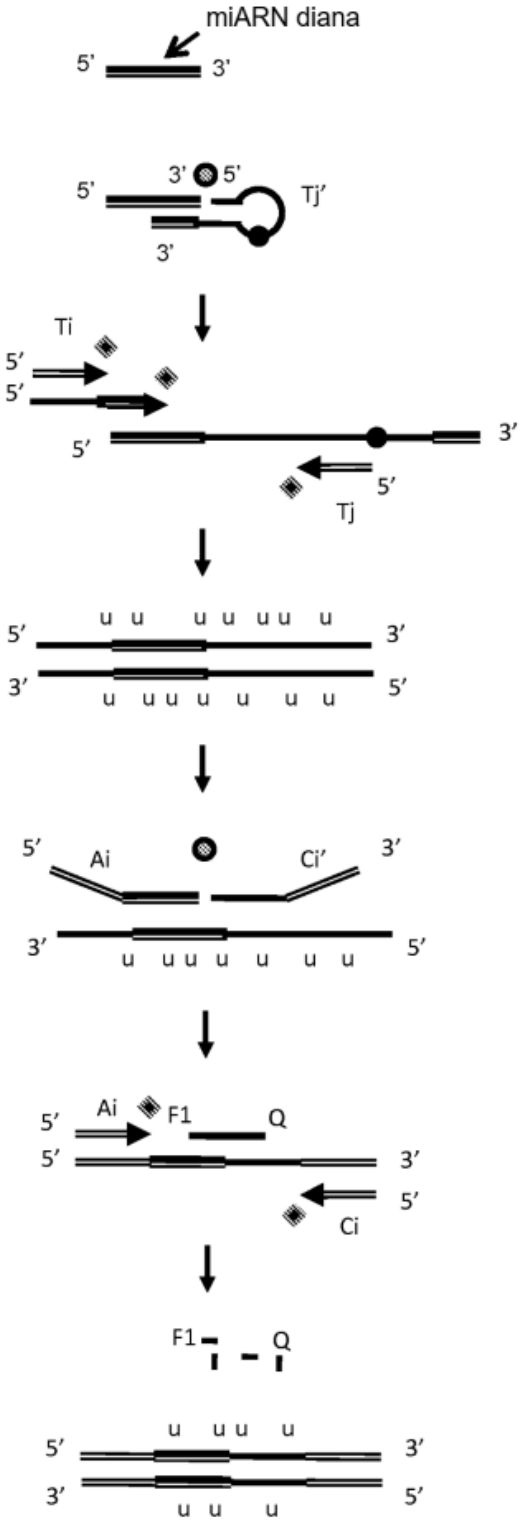


Figura 95

A. Reacción Ligadura-RT-PCR-LDR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el miARN. Aislar miARN de exosomas.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Ligar la sonda complementaria con el extremo 3' del miARN diana, que contiene una horquilla, una marca (Tj') y un grupo bloqueante. Extender con el cebador Tj y la transcriptasa inversa (usando dUTP). Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitada (12-20) por PCR usando cebadores puente y marcador (Ti, Tj), para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la secuencia de miARN contienen marcadores (Ai, Bi-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

E. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (Ai, Ci).

F. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

G. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal.

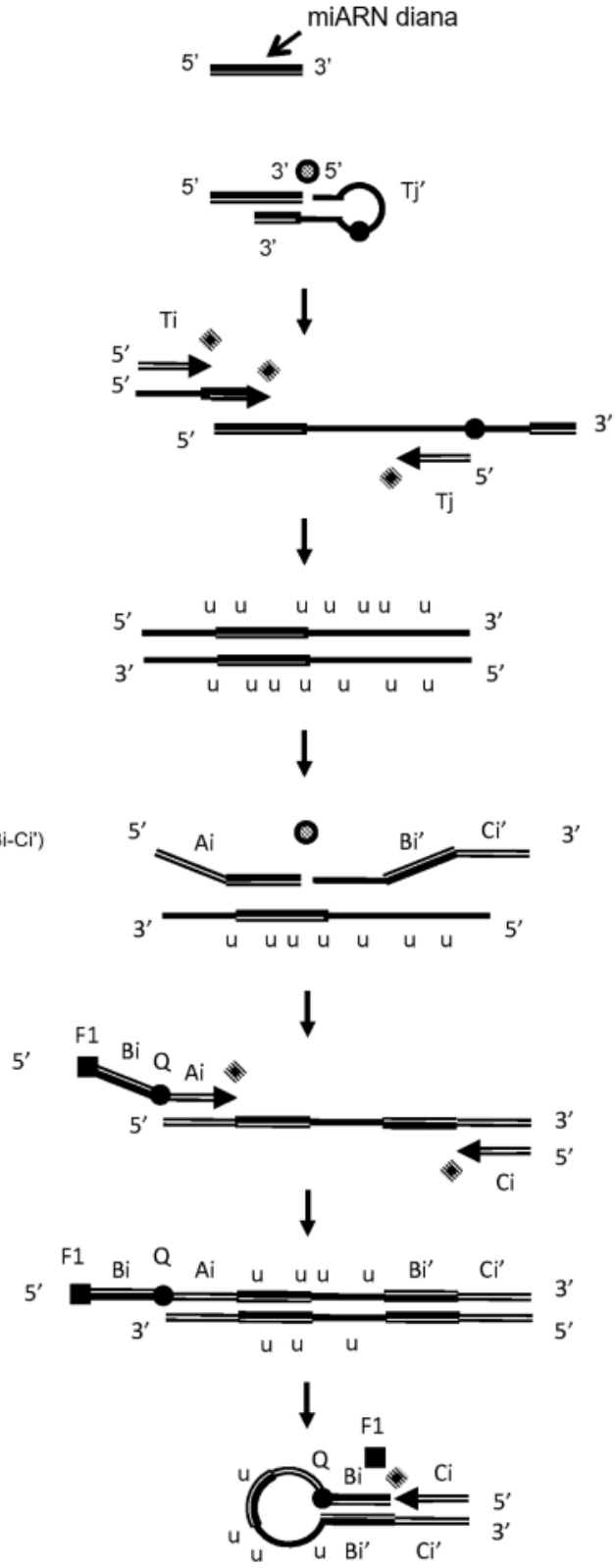


Figura 96

A. Reacción Ligadura-RT-PCR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el miARN. Aislar miARN de exosomas.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, y distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos. Ligar la sonda complementaria con el extremo 3' del miARN diana, que contiene una horquilla, una marca (Tj') y un grupo bloqueante. Extender con el cebador Tj y la transcriptasa inversa (usando dUTP). Activar la polimerasa Taq y realizar una amplificación de ciclos limitada (12-20) por PCR usando cebadores puente y marcador (Ti, Tj), para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores, conteniendo un cebador biotina en 5'.

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos con ligadura específica de miARN contienen colas para la posterior detección FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

E. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

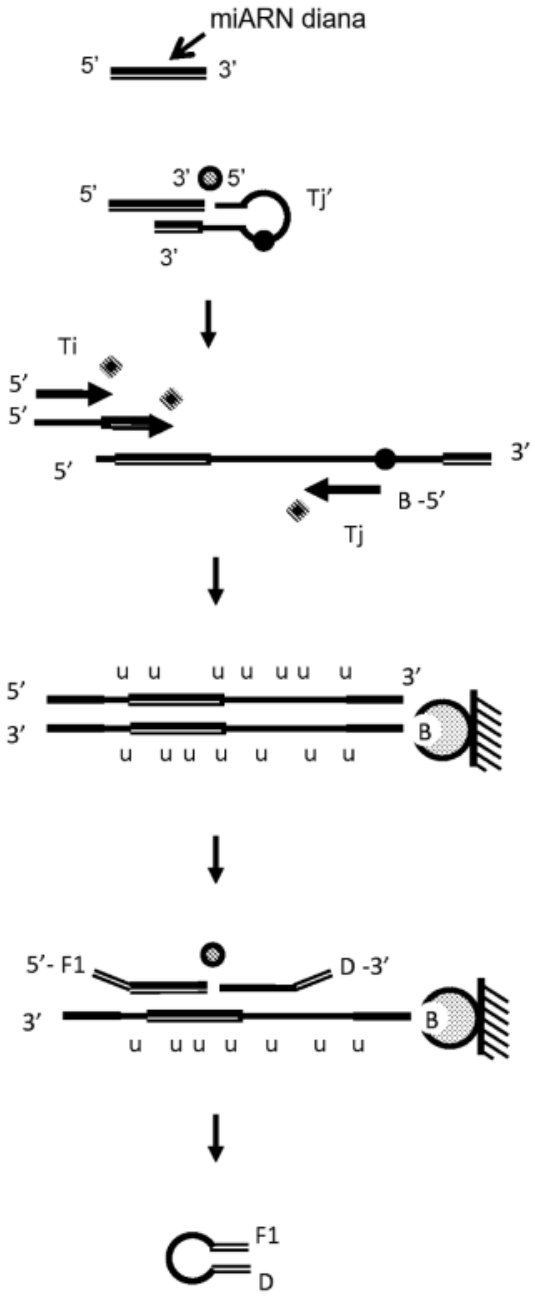


Figura 97

A. Reacción Ligadura-RT-PCR-LDR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el miARN.
Aislar miARN de exosomas.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Ligar la sonda complementaria con el extremo 3' del miARN diana, que contiene una horquilla, una marca (Tj') y un grupo bloqueante. Extender con el cebador Tj y la transcriptasa inversa (usando dUTP).

C. Los cebadores de puente específicos de miARN se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando están unidos a la diana. Realizar una amplificación de ciclos limitada (12-20) por PCR usando cebadores marcadores (Ti, Tj), para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones.
Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores.
(Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

D. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

E. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la secuencia de miARN contienen marcadores (Ai,Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

F. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (Ai, Ci). Cada sonda Taqman expande la unión de ligadura.

G. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.)

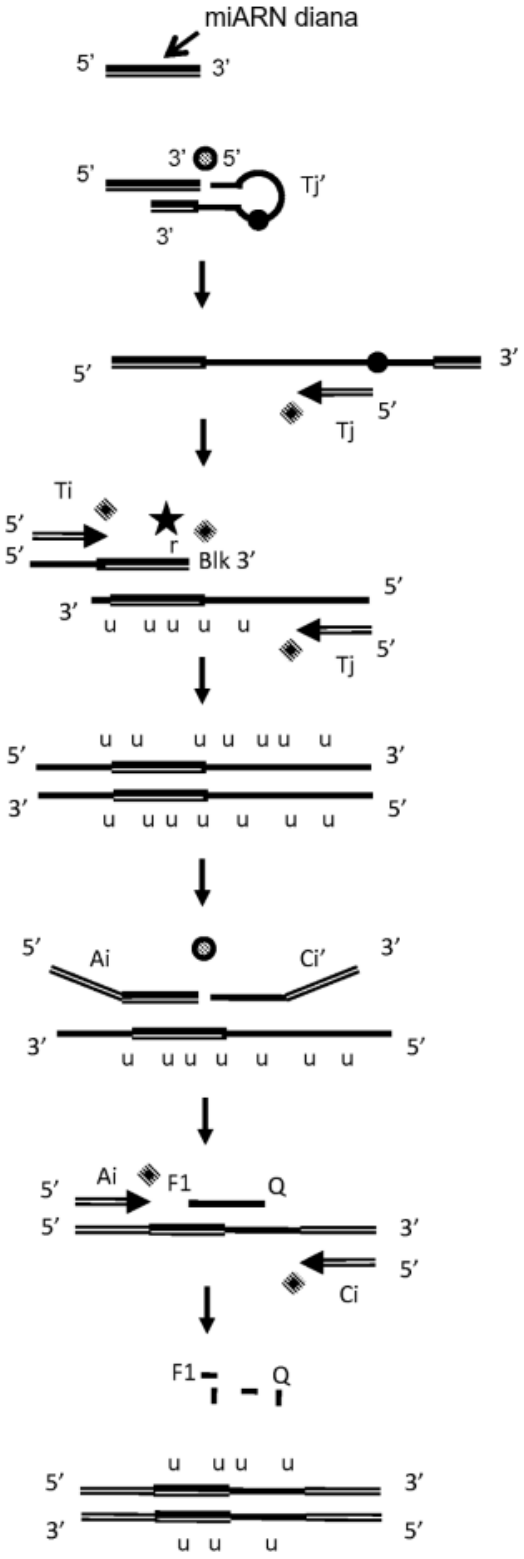


Figura 98

A. Reacción Ligadura-RT-PCR-LDR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el miARN. Aislar el miARN de exosomas.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, destruir térmicamente. Ligar la sonda complementaria con el extremo 3' del miARN diana, que contiene una horquilla, una marca (Tj') y un grupo bloqueante. Extender con el cebador Tj y la transcriptasa inversa (usando dUTP).

C. Los cebadores puente específicos de miARN se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana. Realizar una amplificación de ciclos limitada (12-20) por PCR usando cebadores marcadores (Ti, Tj), para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

D. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

E. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la secuencia de miARN contienen marcadores (Ai, Bi-Ci') para la posterior amplificación por PCR. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

F. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

G. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

H. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal.

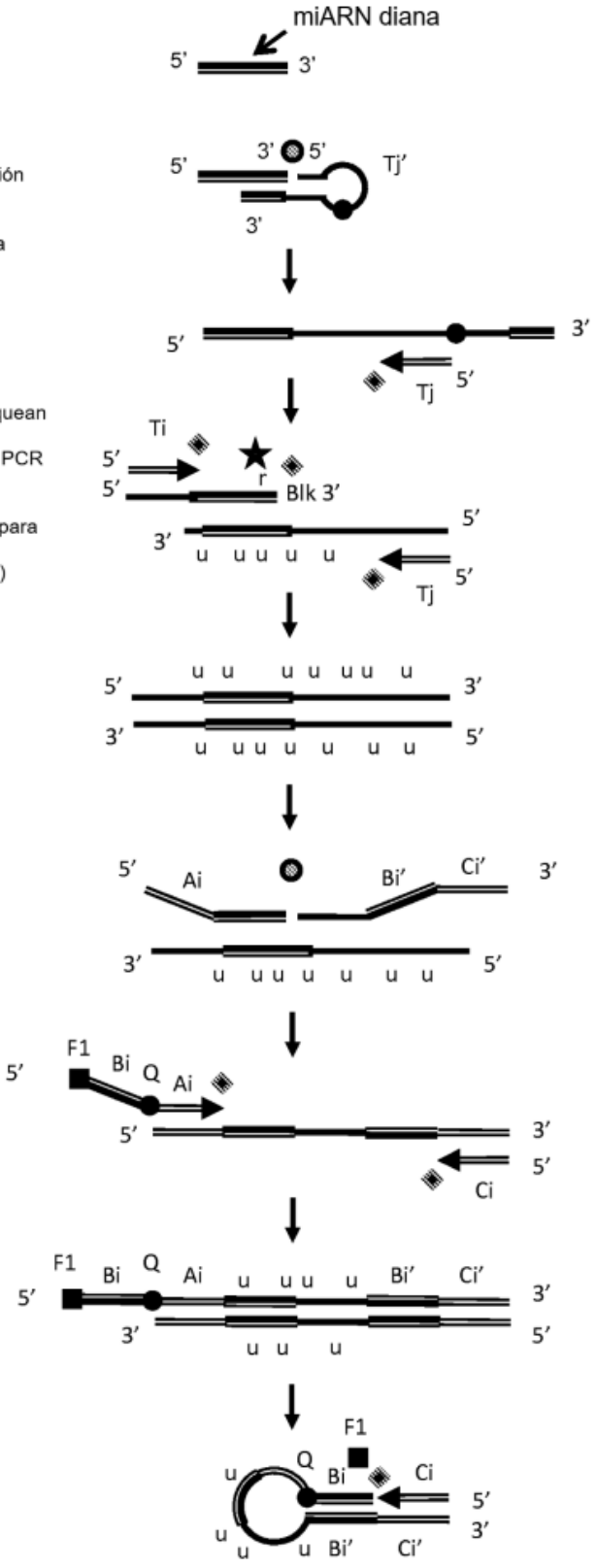


Figura 99

A. Reacción Ligadura-RT-PCR-qLDR con prevención de arrastres para cuantificar el miARN. Aislar miARN de exosomas.

B. Tratar con UDG (uracilo ADN glicosidasa) para prevención de arrastres, y distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos. Ligar la sonda complementaria con el extremo 3' del miARN diana, que contiene una horquilla, una marca (Tj') y un grupo bloqueante. Extender con el cebador Tj y la transcriptasa inversa (usando dUTP).

C. Los cebadores puente específicos de miARN se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana. Realizar una amplificación de ciclos limitada (12-20) por PCR usando cebadores marcadores (Ti, Tj), para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. Los cebadores contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores, conteniendo un cebador biotina en 5'.

D. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

E. Los oligonucleótidos con ligadura específica de miARN contienen colas para la posterior detección FRET. La ligasa une covalentemente los dos oligonucleótidos entre sí. (Los productos de la LDR no se amplifican con ninguno de los cebadores de PCR o LDR originales, lo que proporciona protección adicional.)

F. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

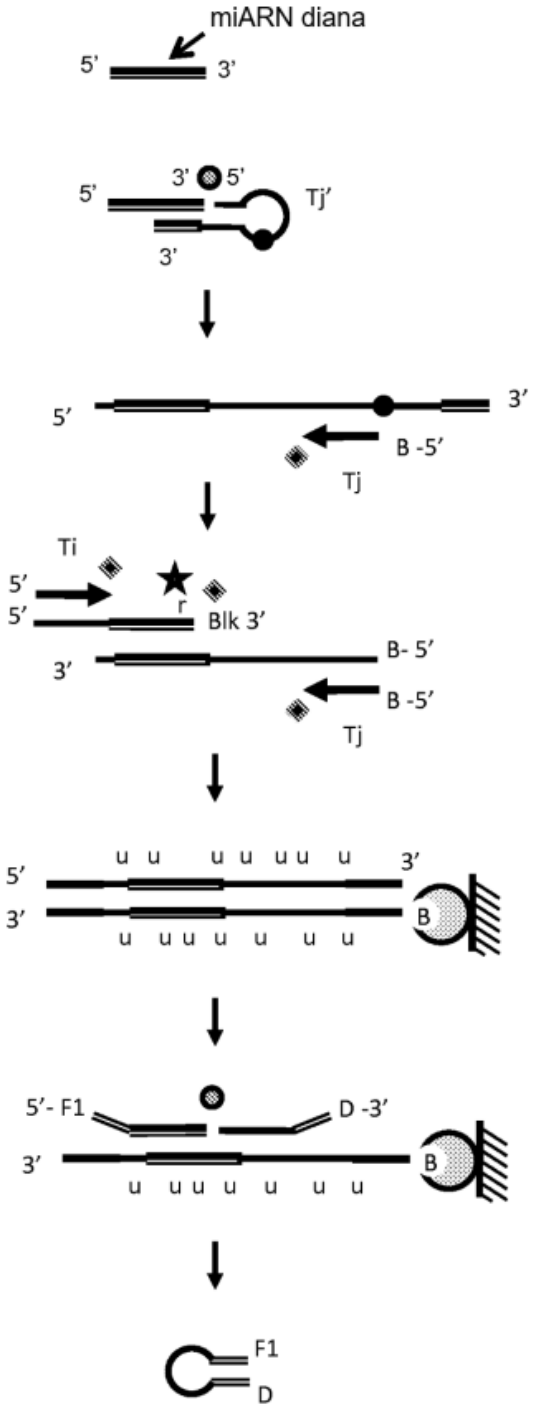
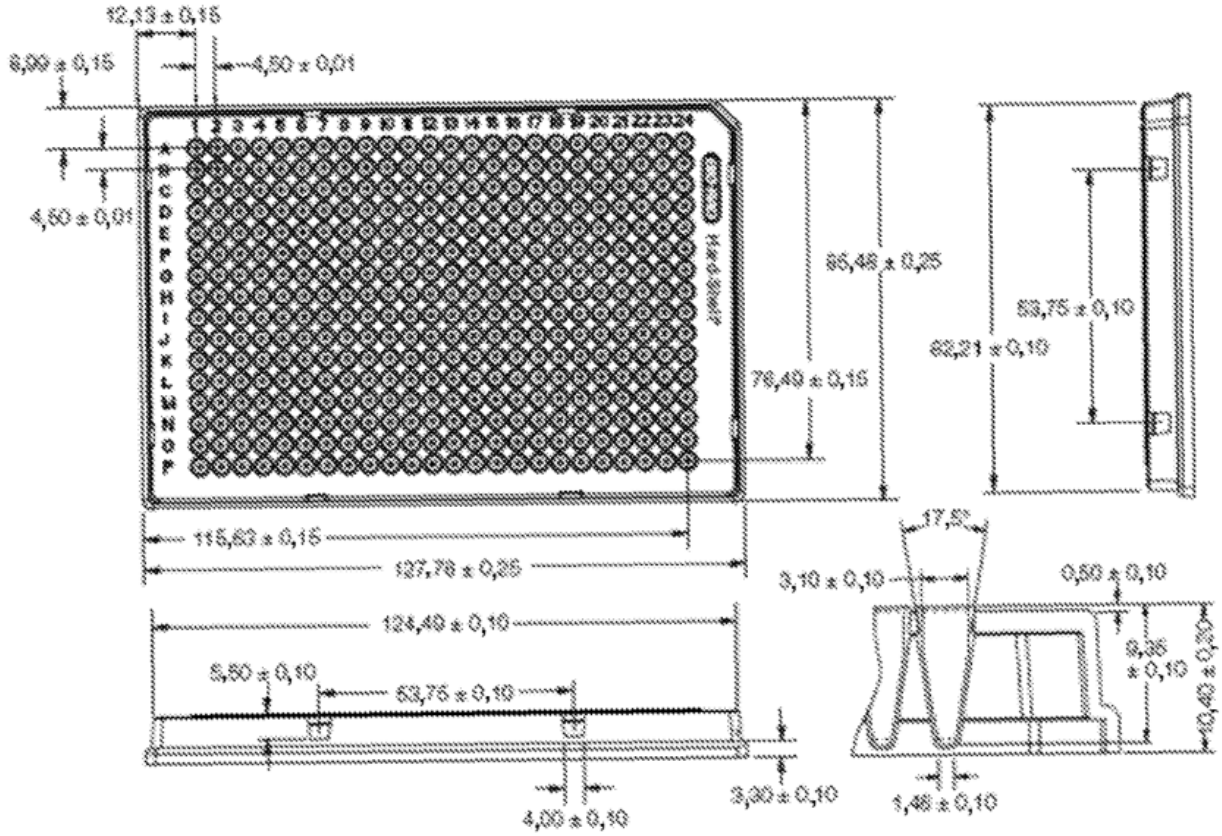
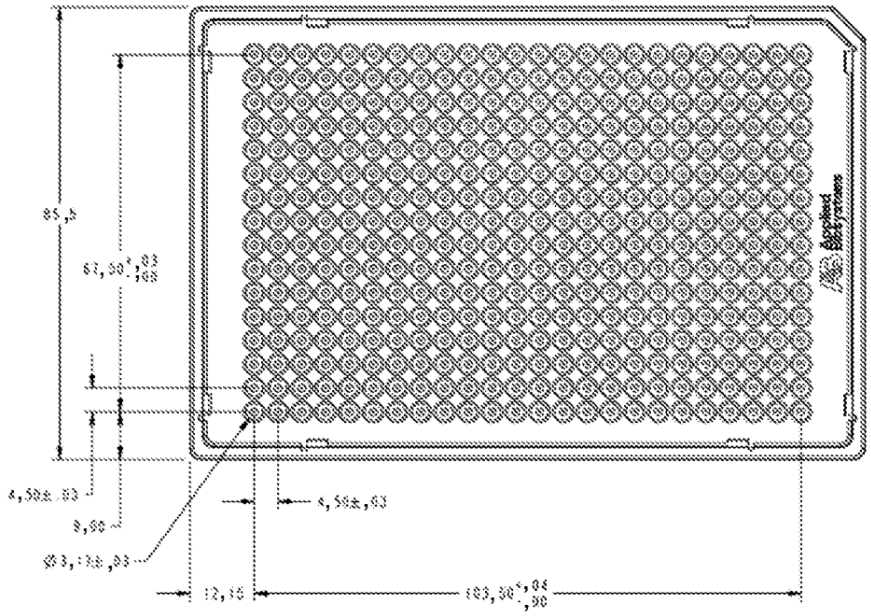


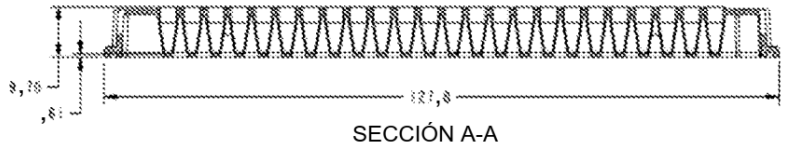
Figura 100



Ningún dibujo está hecho a escala.
Todas las dimensiones son en mm, salvo que se indique otra cosa.

Figura 101





SECCIÓN A-A

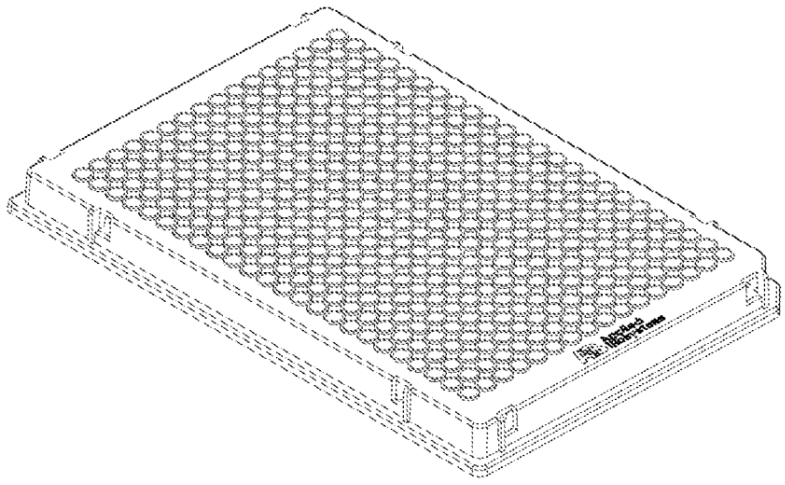


Figura 102

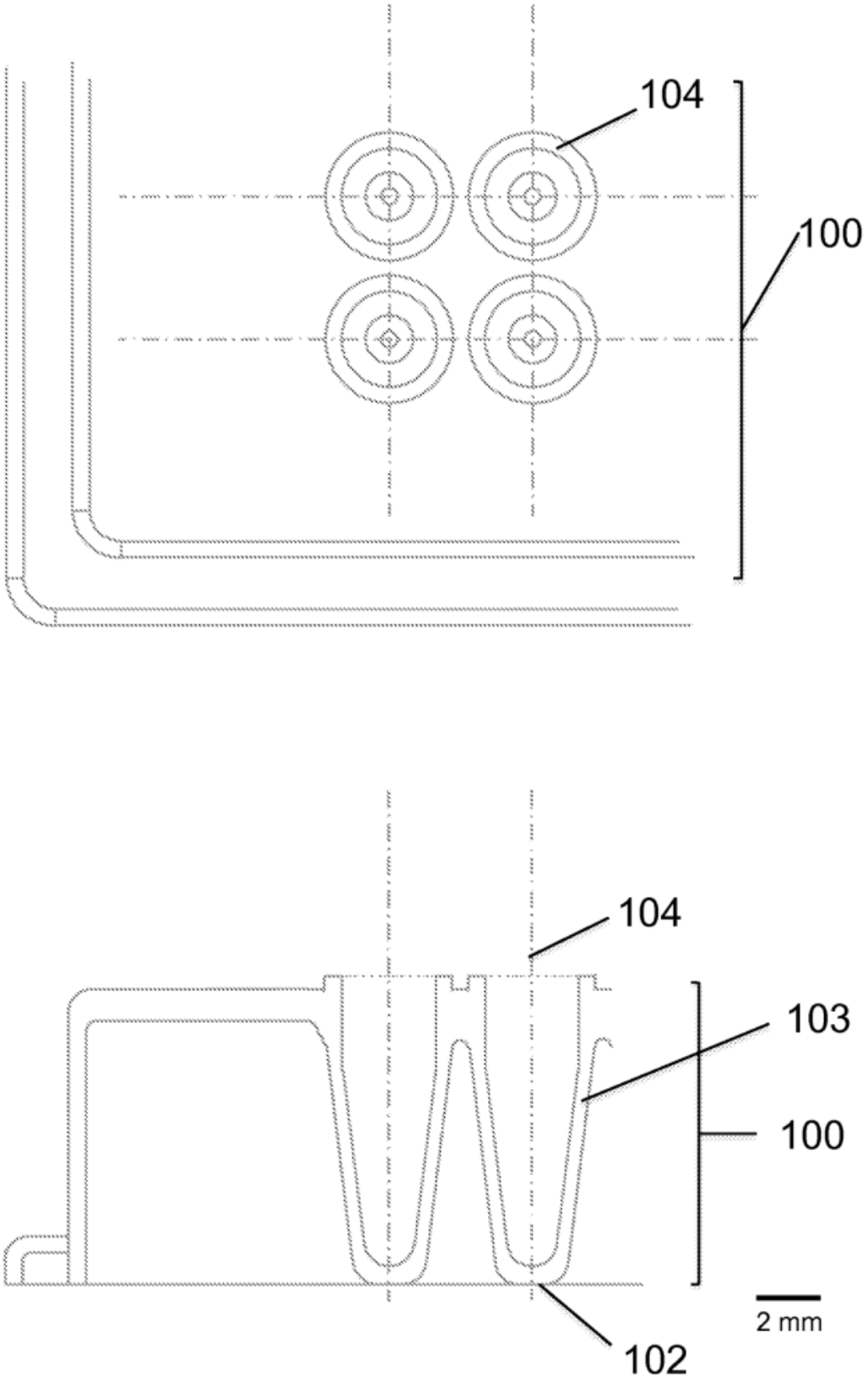


Figura 103

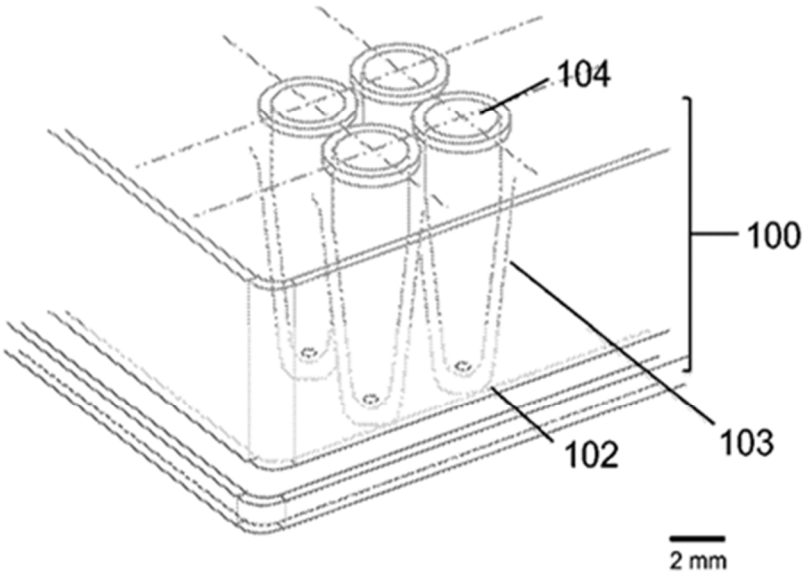
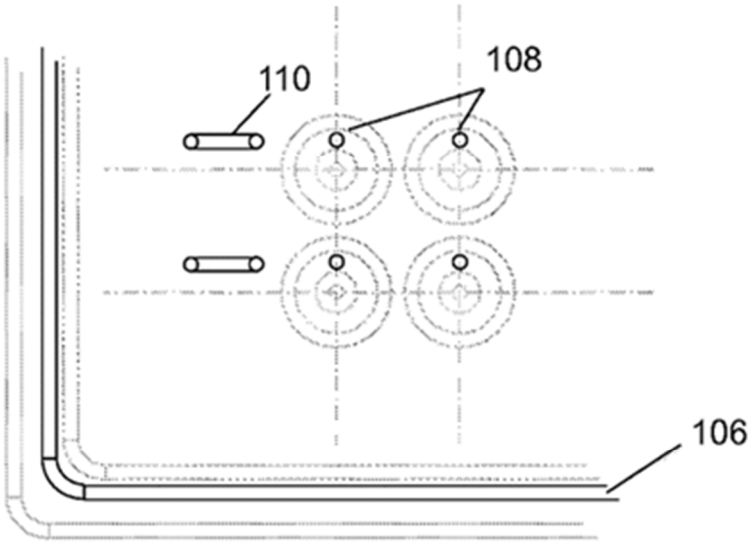


Figura 104



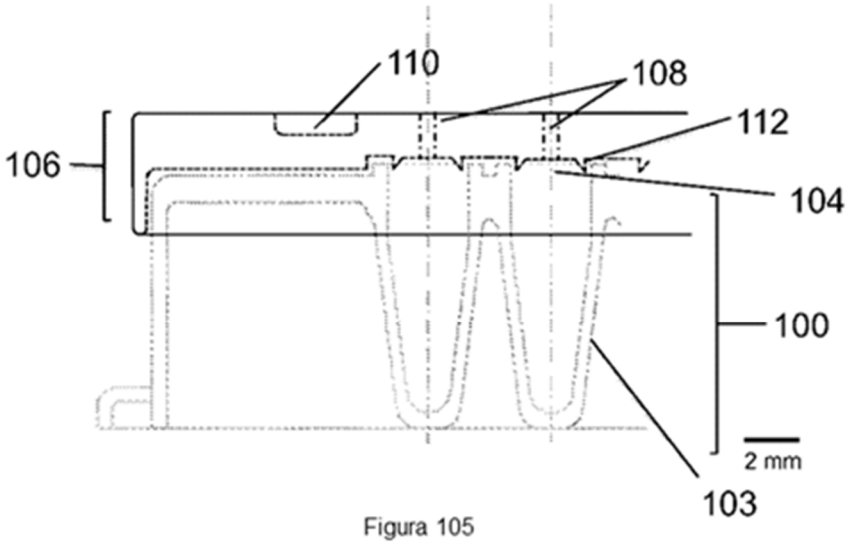


Figura 105

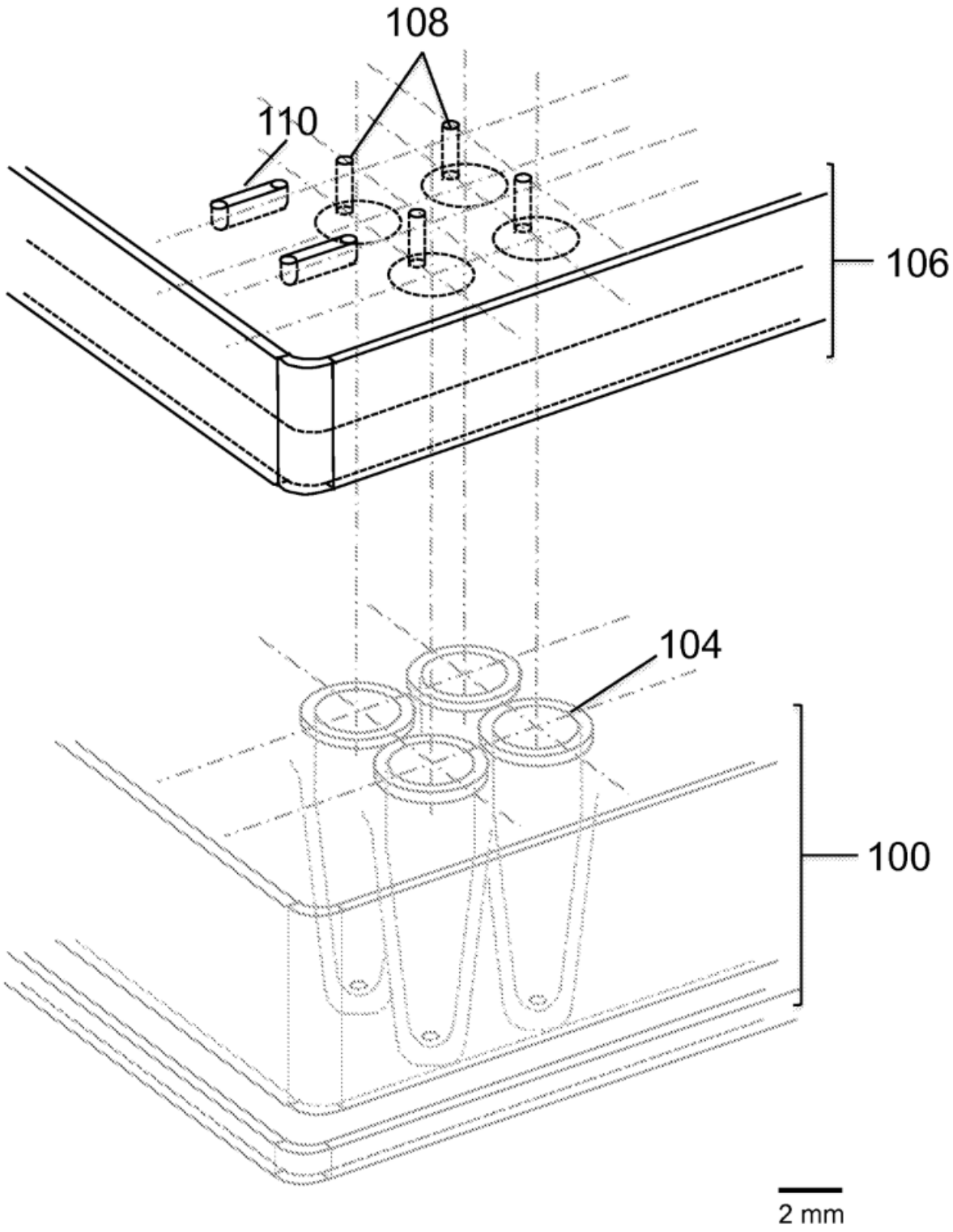


Figura 106

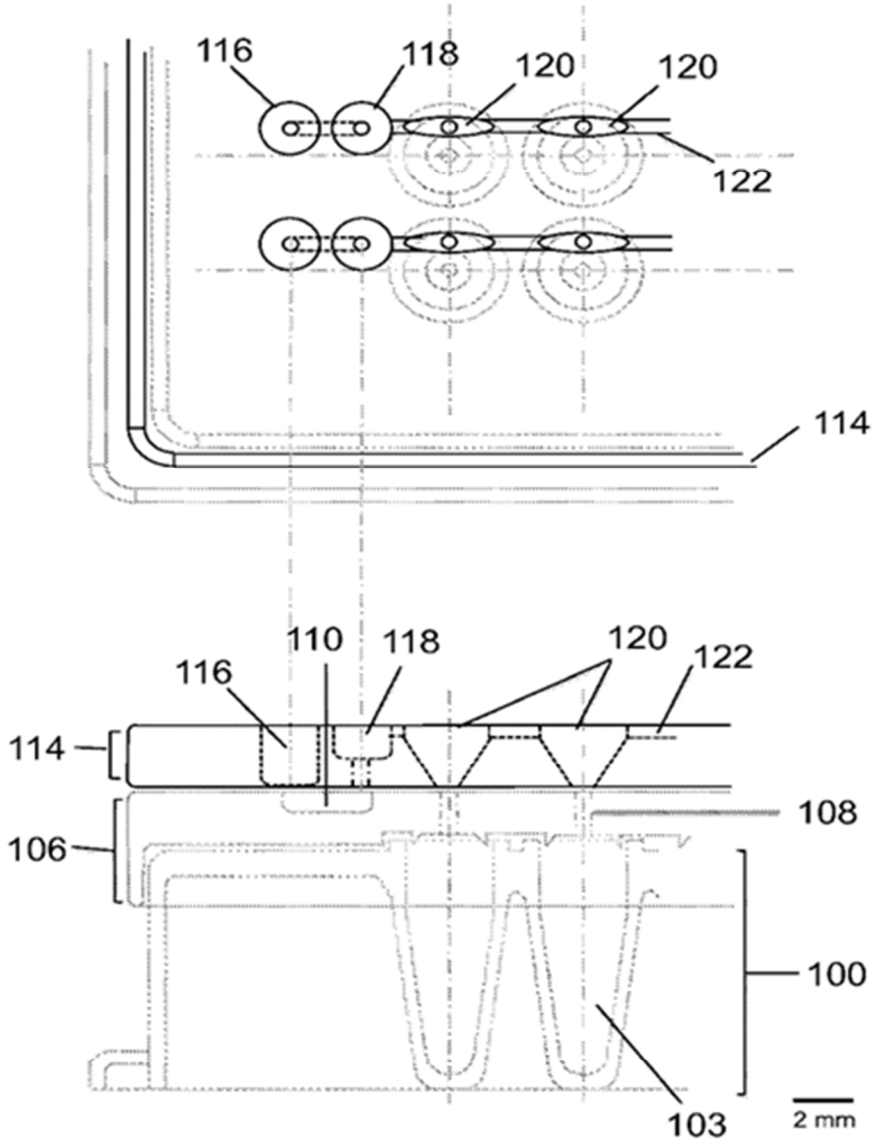

116
118
120
120
122
114
110
118
120
122
116
114
108
106
100
103
2 mm

Figura 107

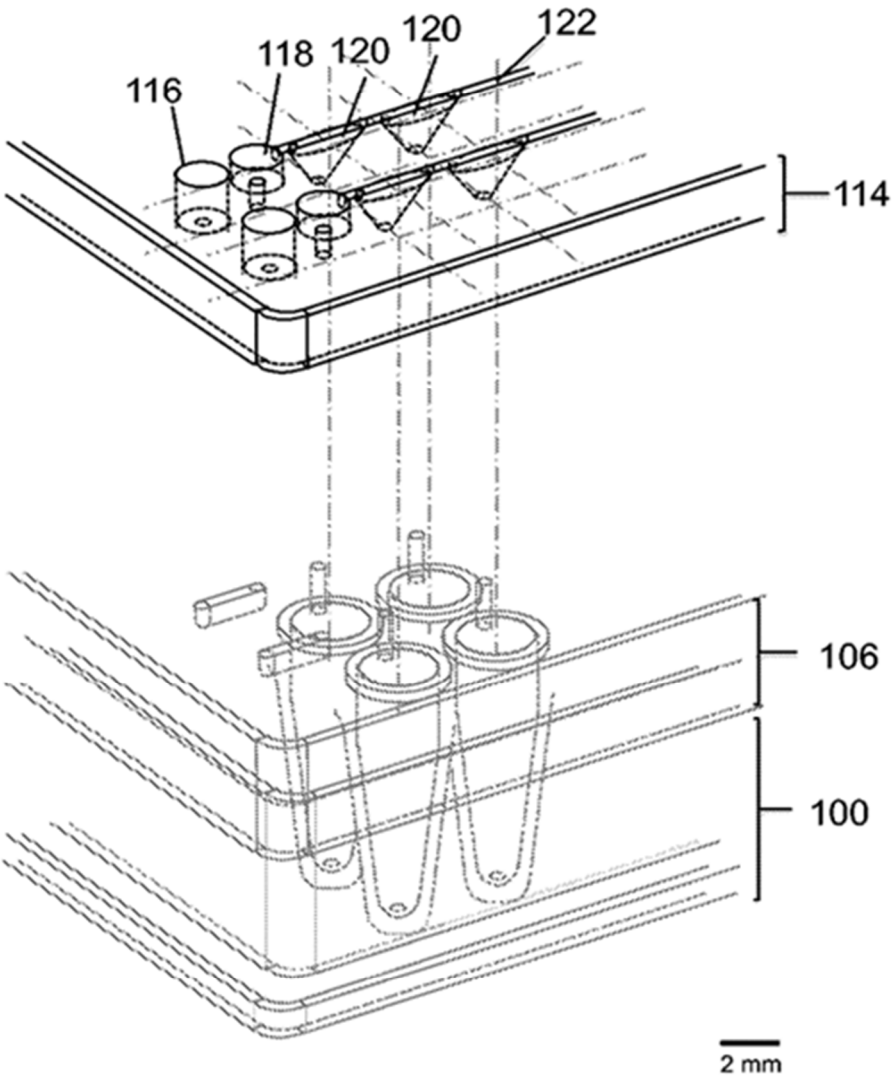


Figura 108

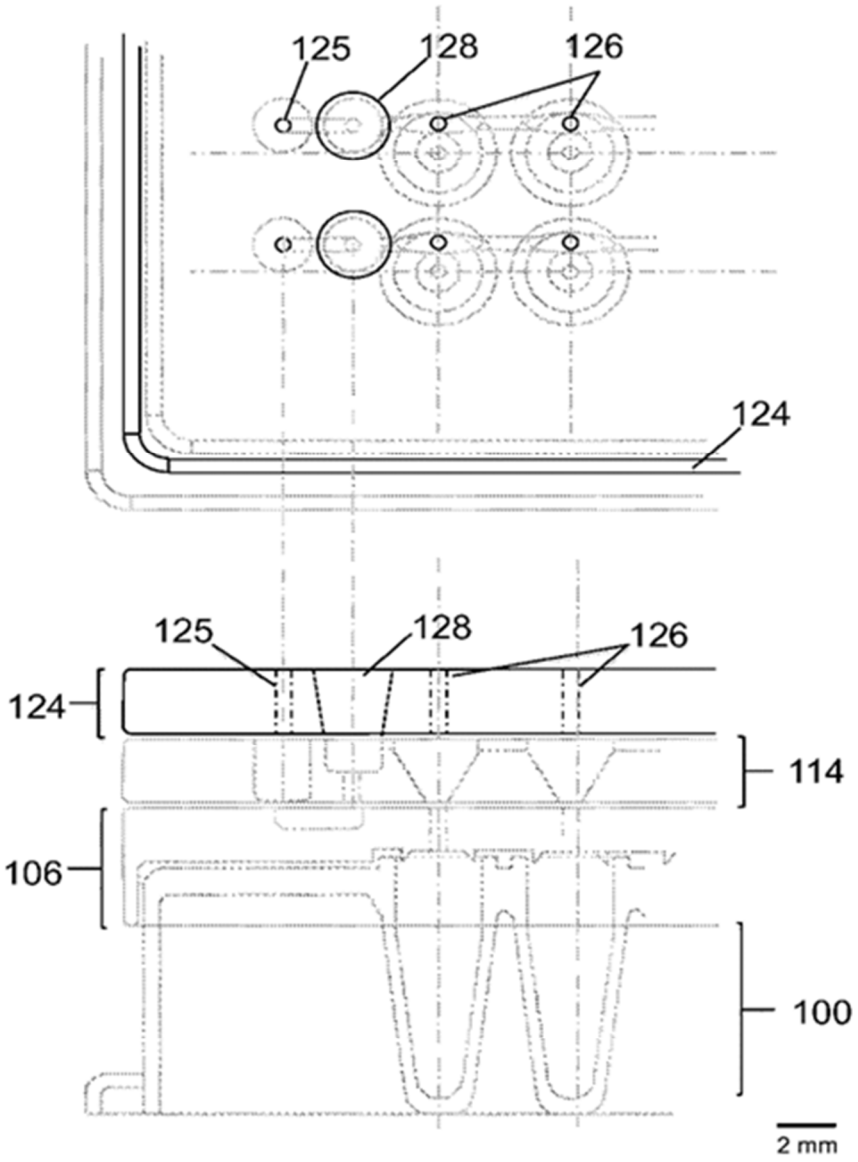


Figura 109

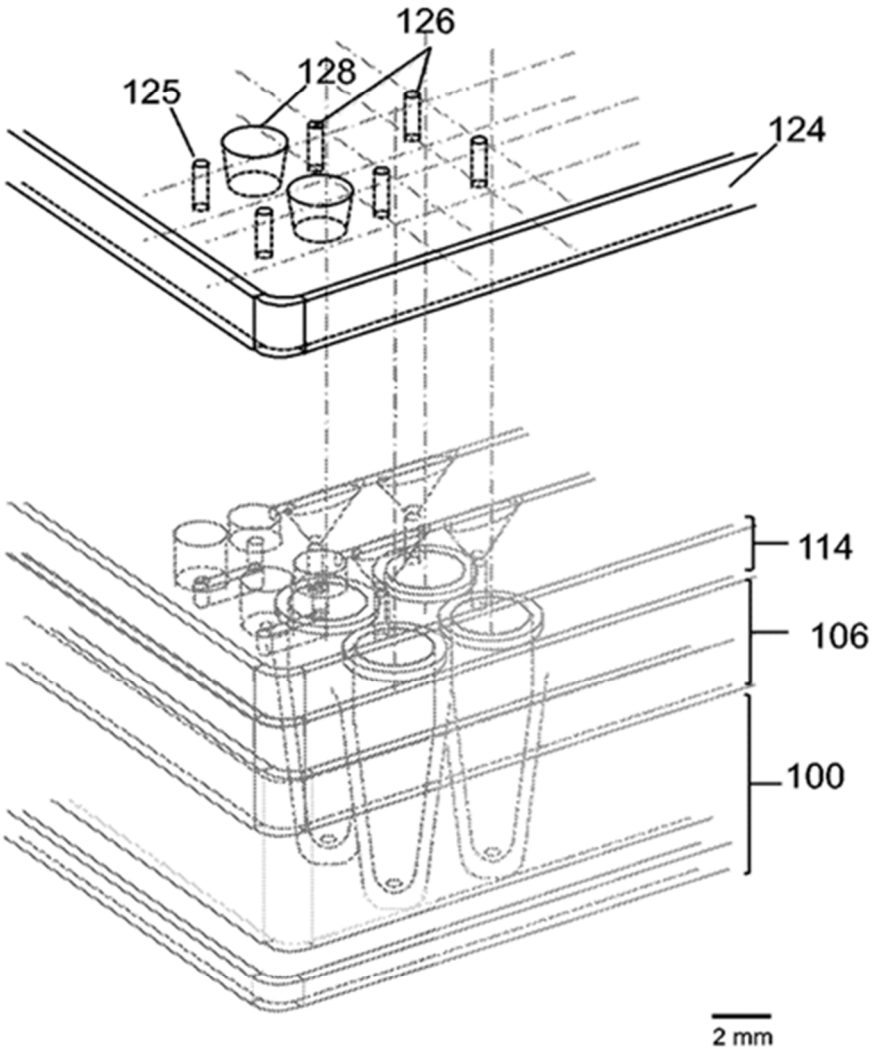


Figura 110

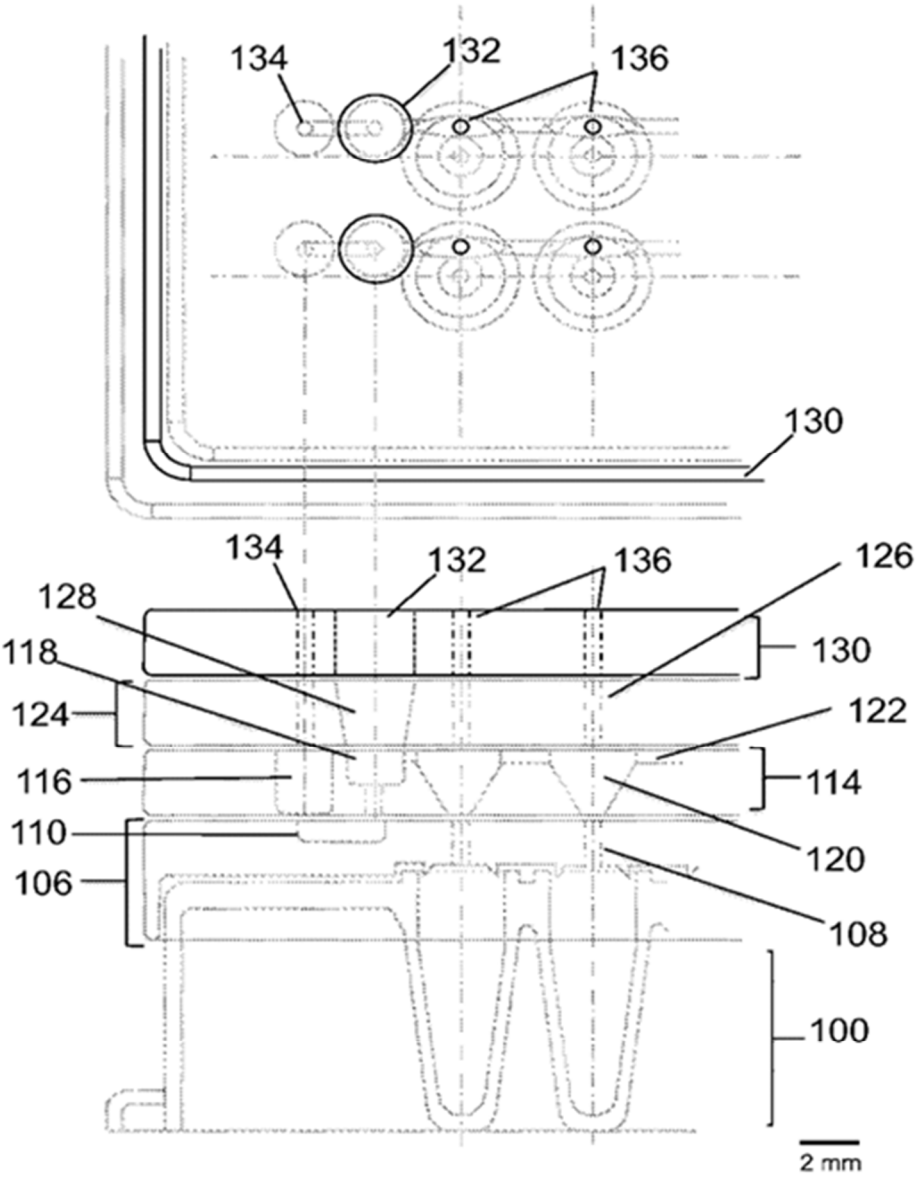

134
132
136
130
134
132
136
126
128
130
118
124
122
116
114
110
120
106
108
100
2 mm

Figura 111

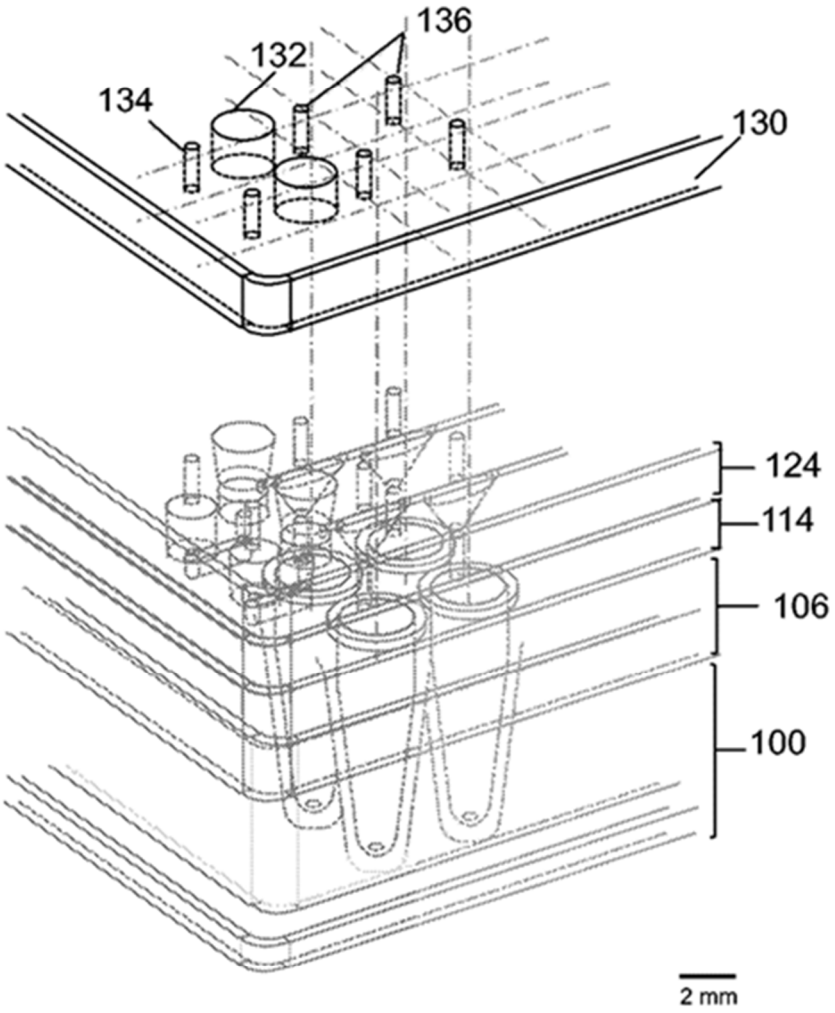


Figura 112

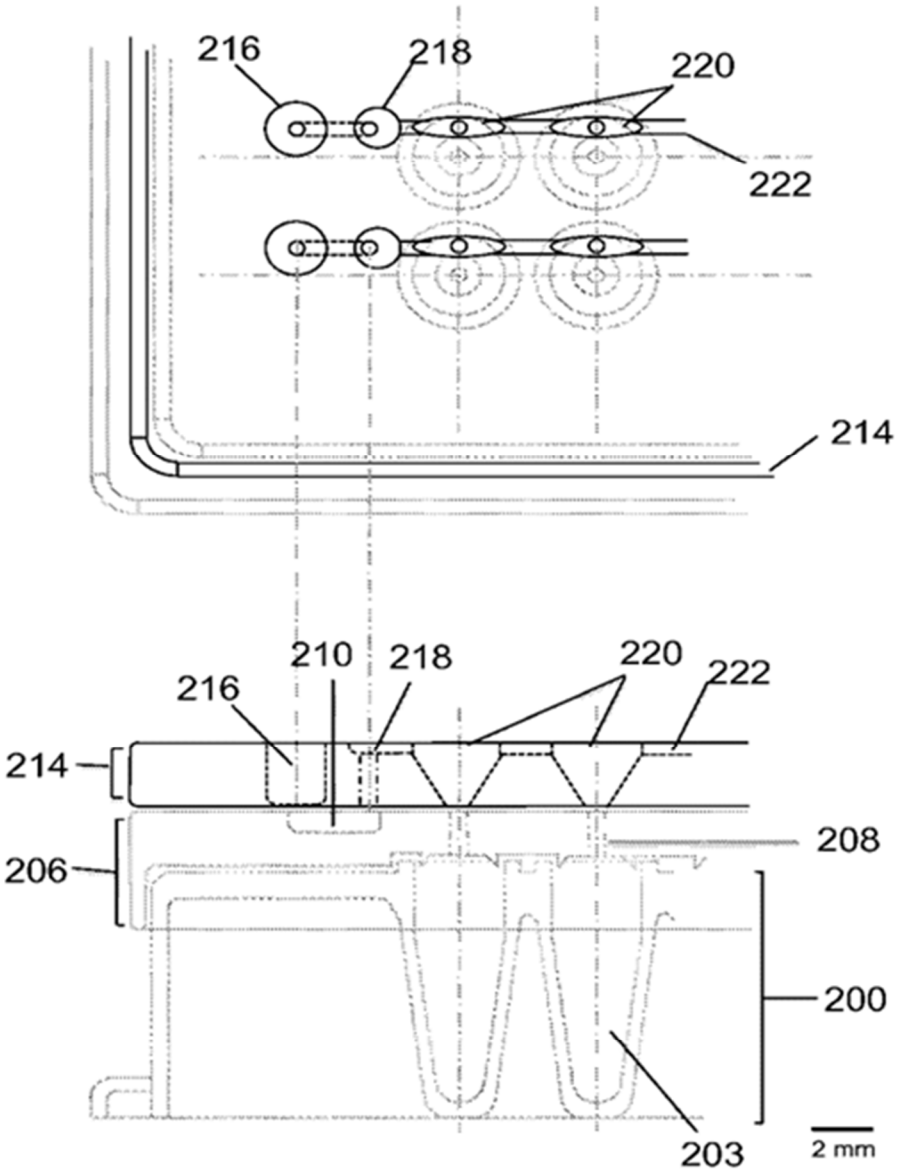


Figura 113

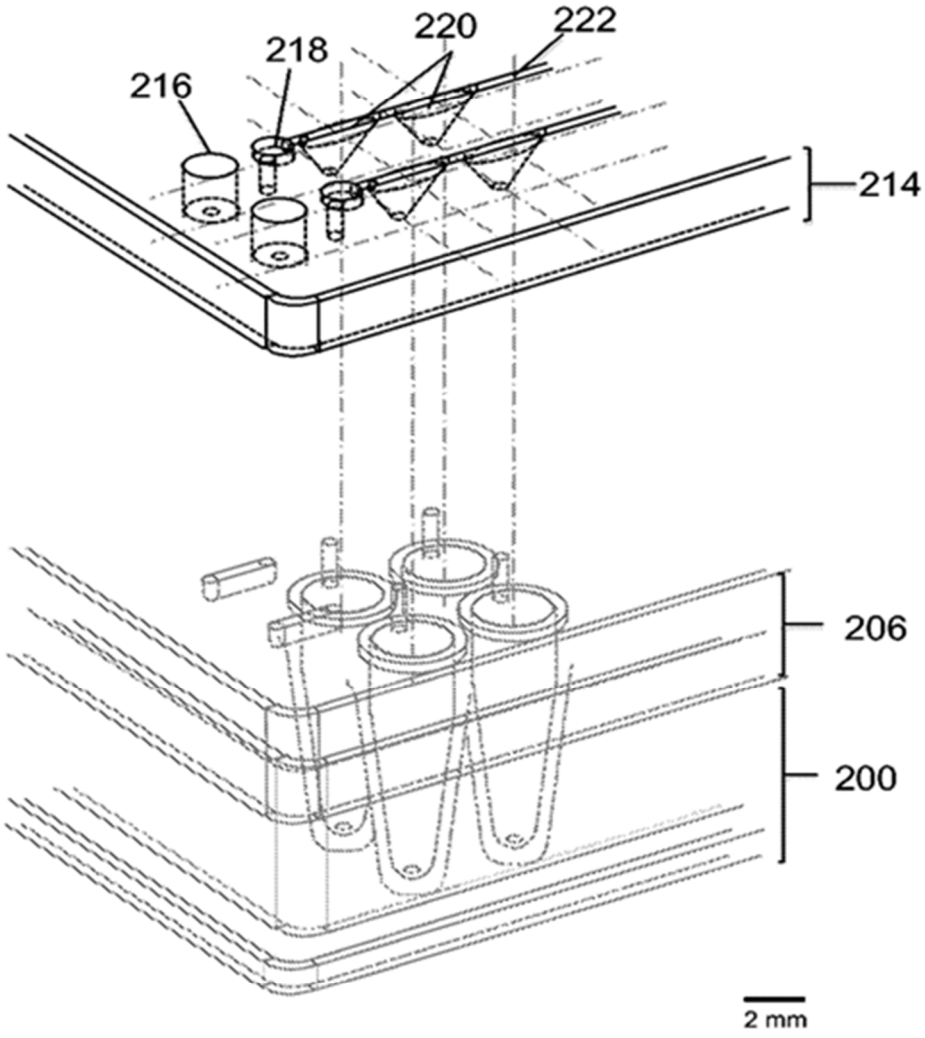


Figura 114

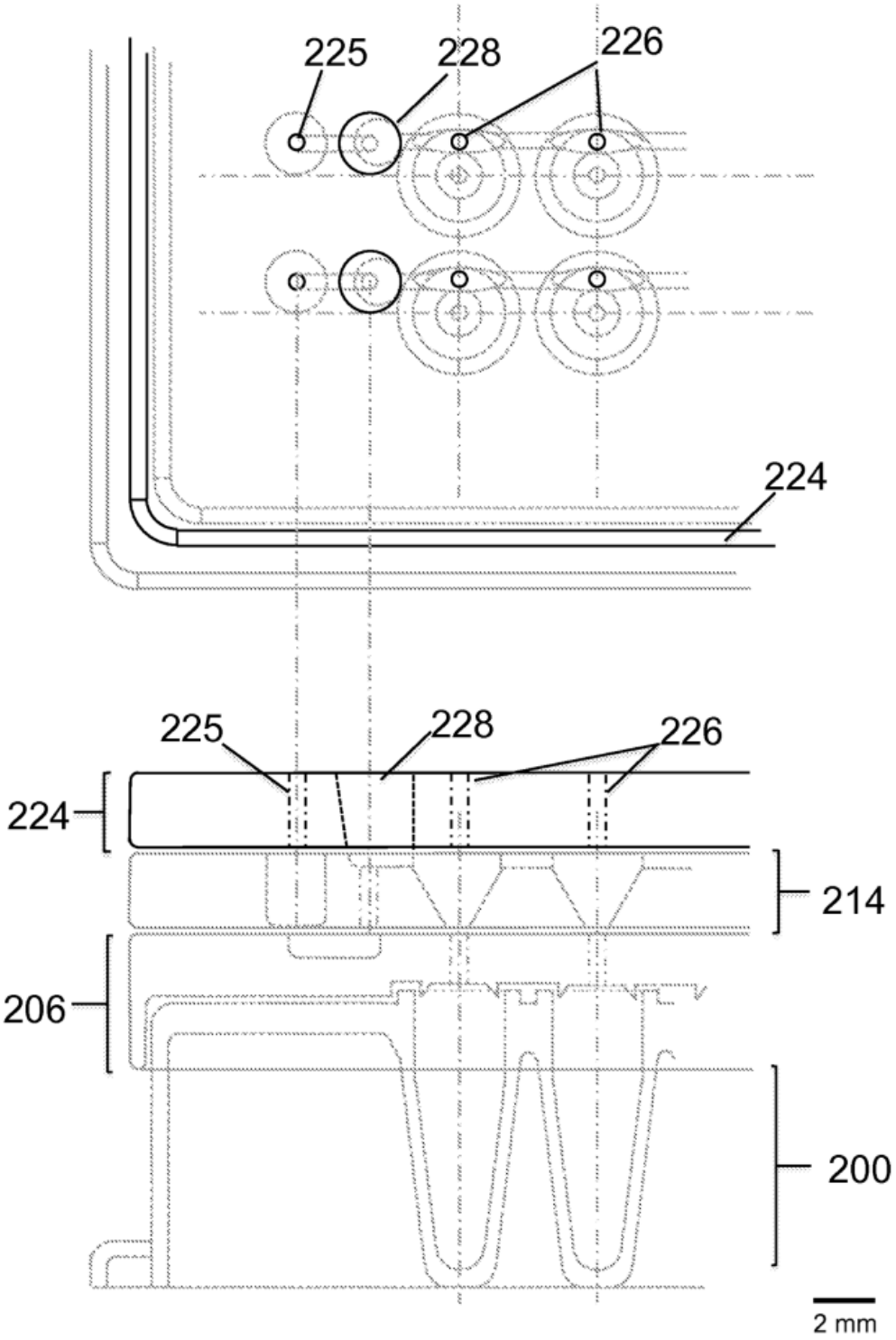


Figura 115

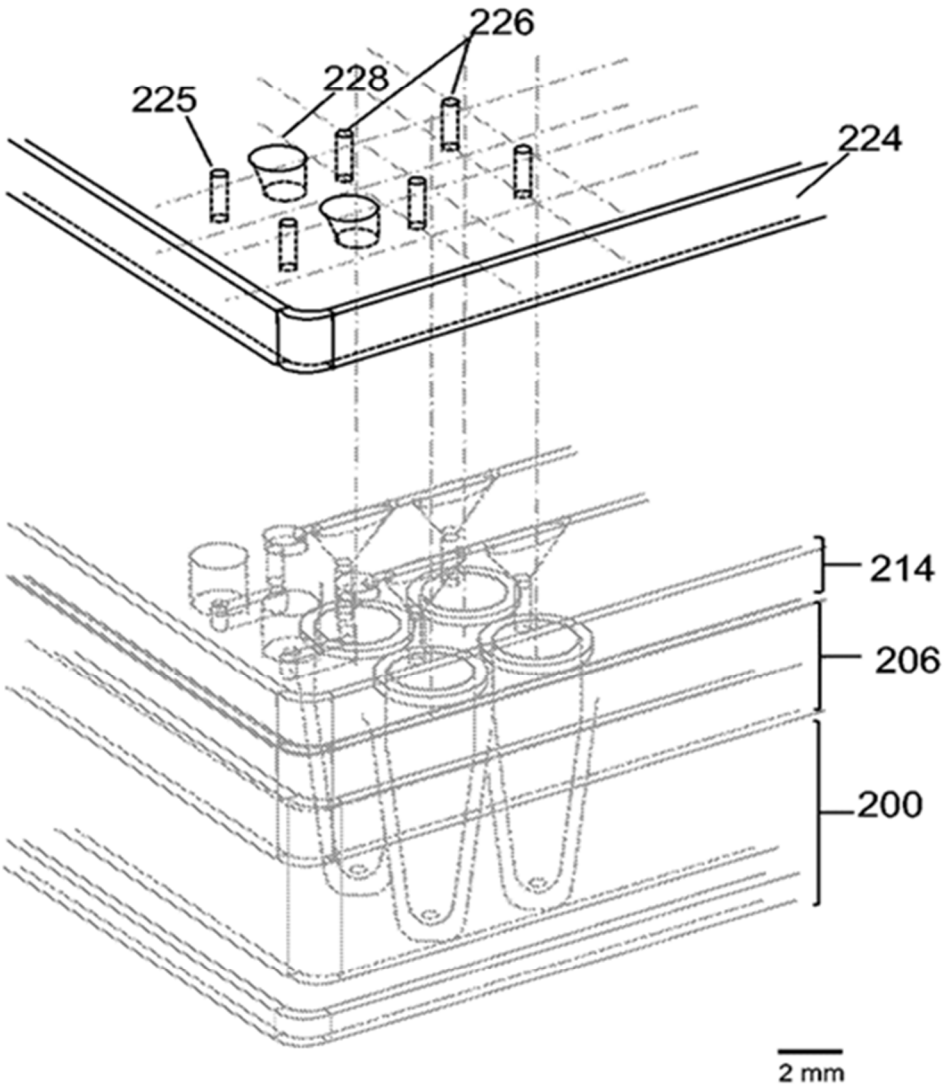


Figura 116

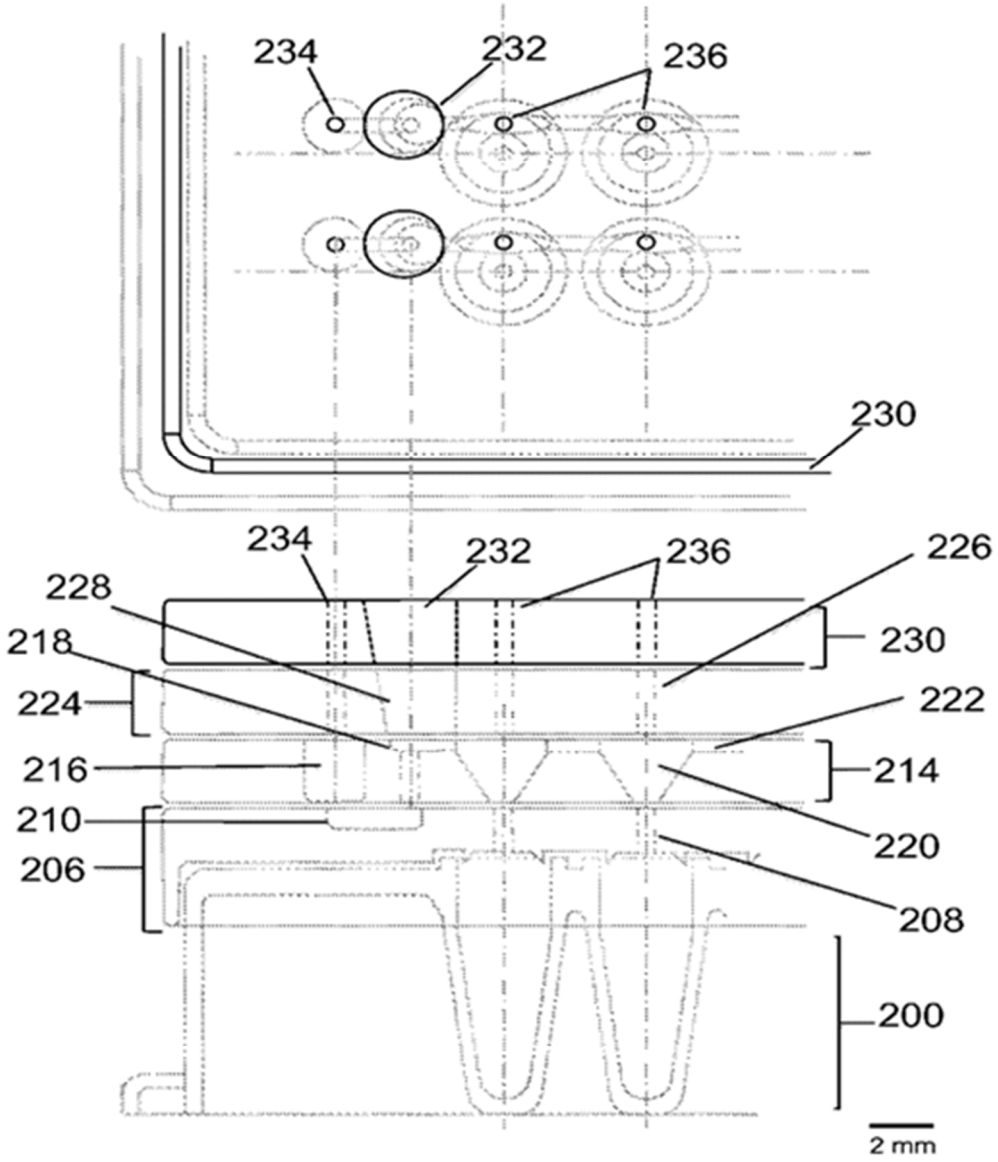

234
232
236
230
234
232
236
226
228
230
218
224
222
216
214
210
220
206
208
200
2 mm

Figura 117

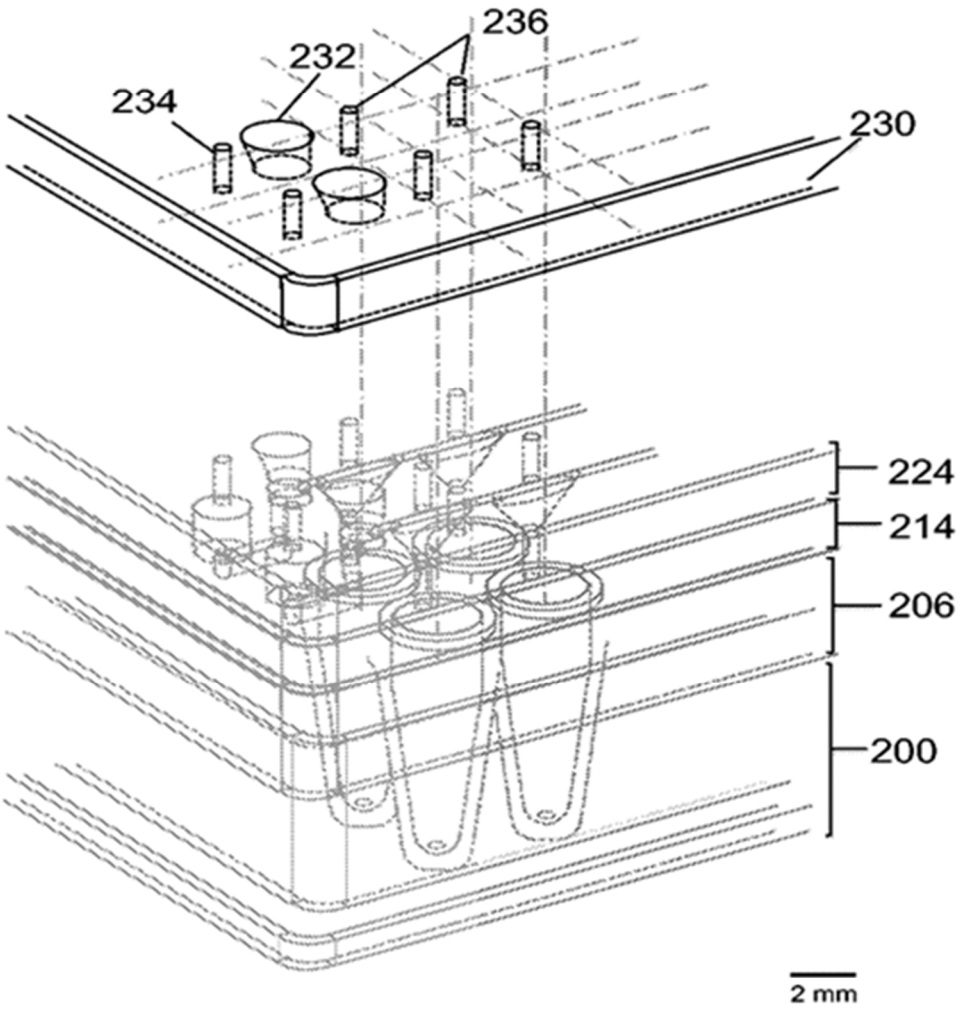


Figura 118

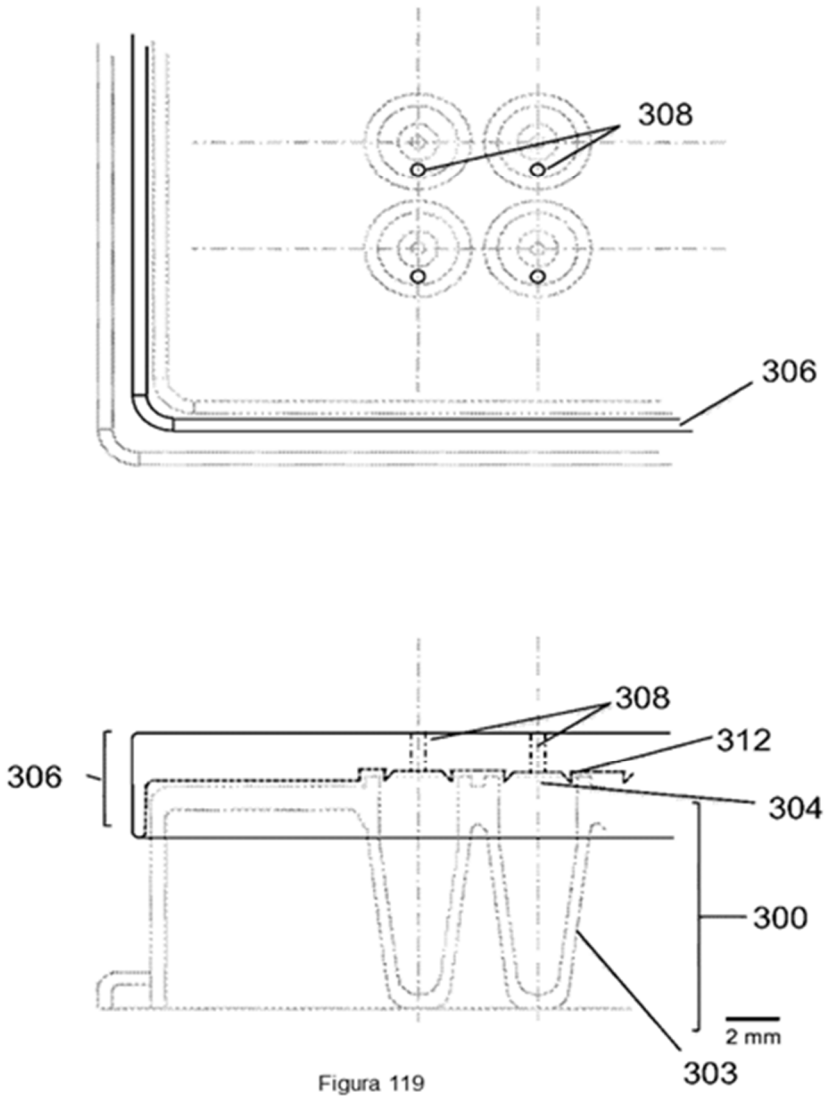


Figura 119

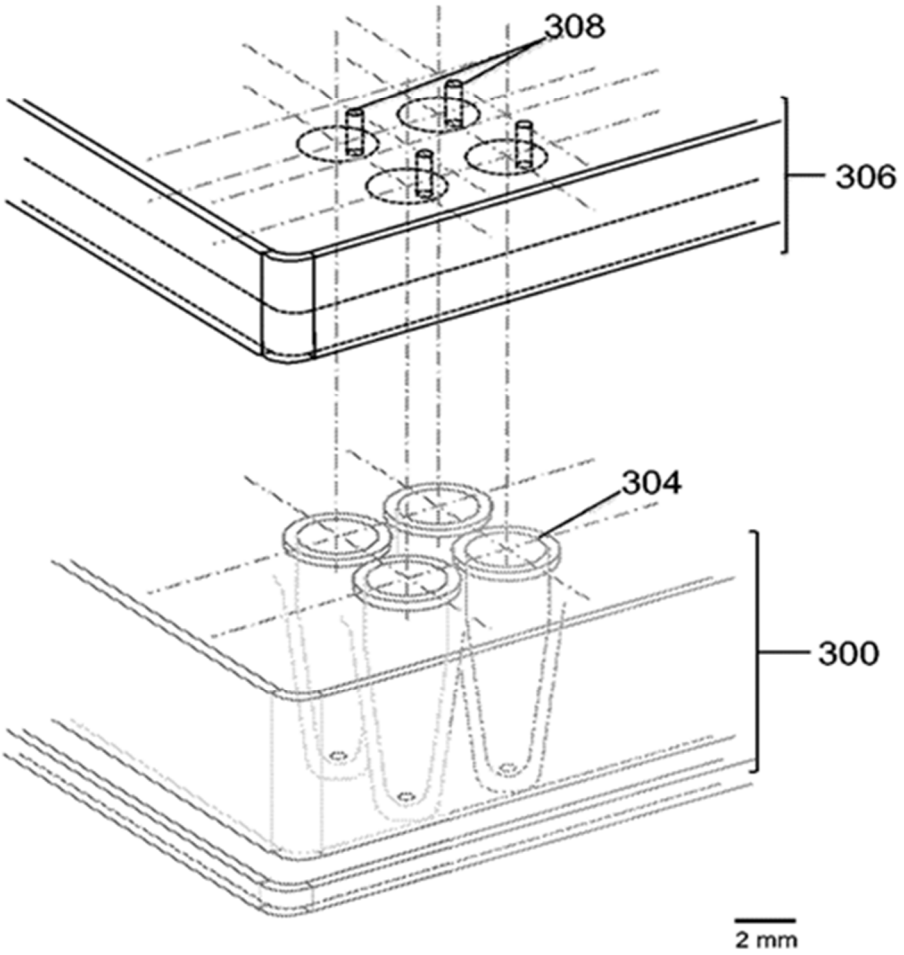


Figura 120

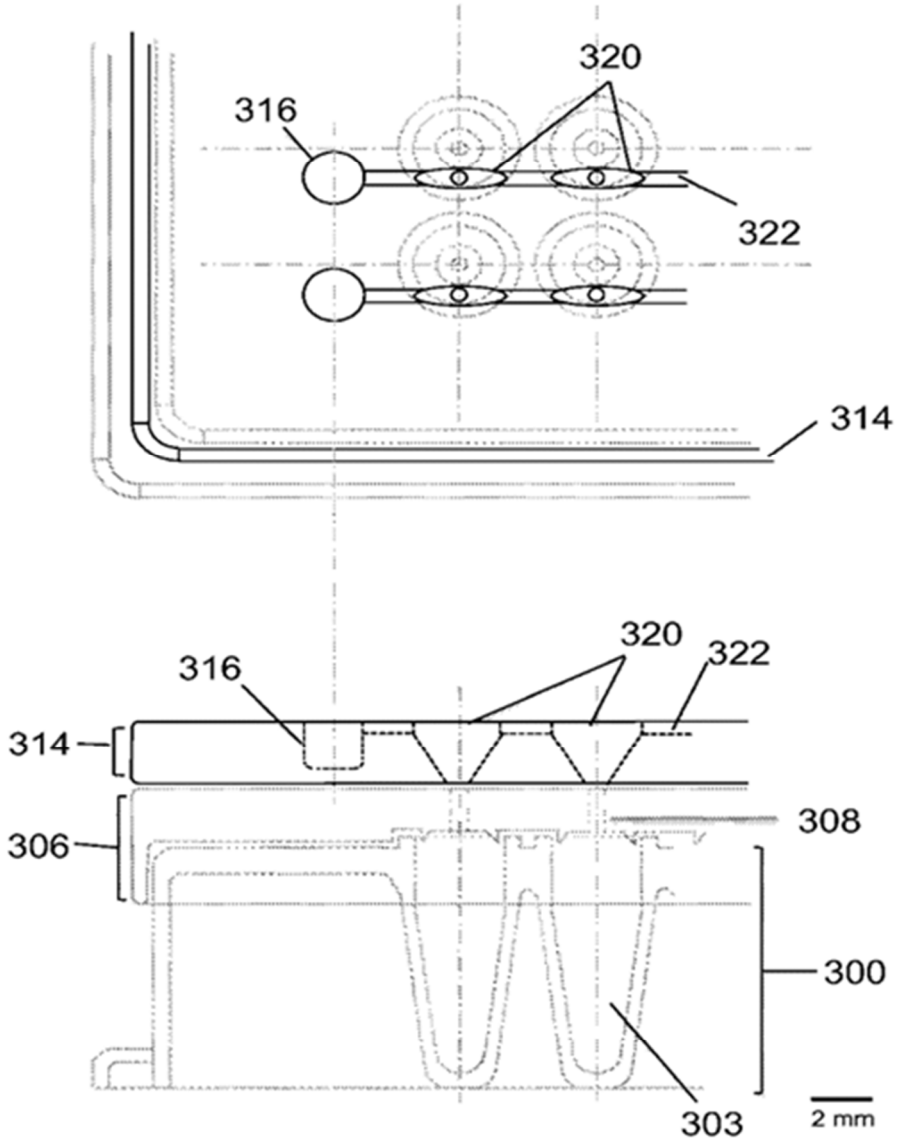


Figura 121

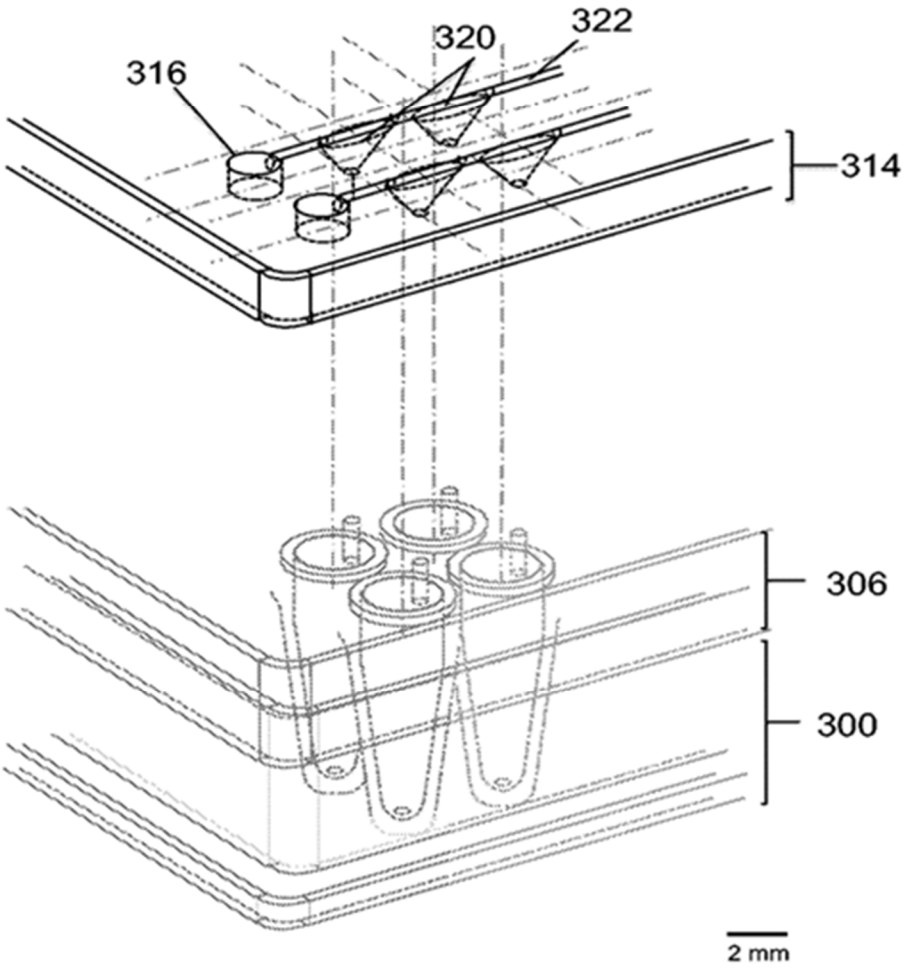


Figura 122

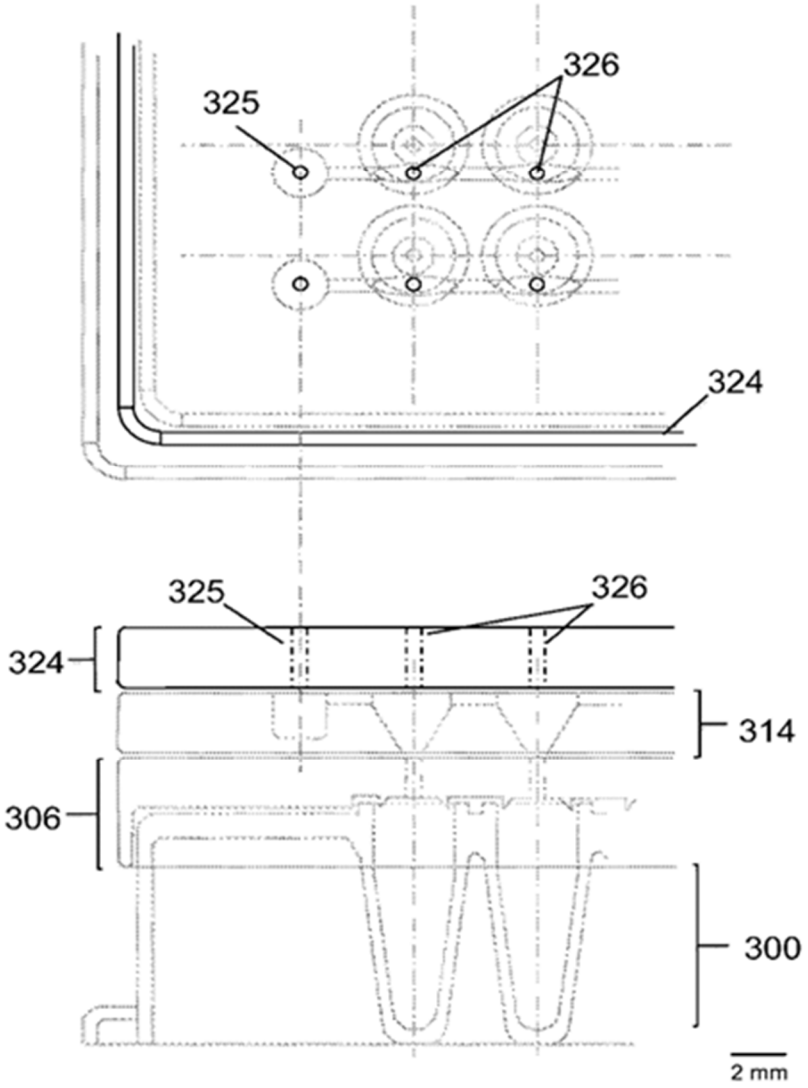


Figura 123

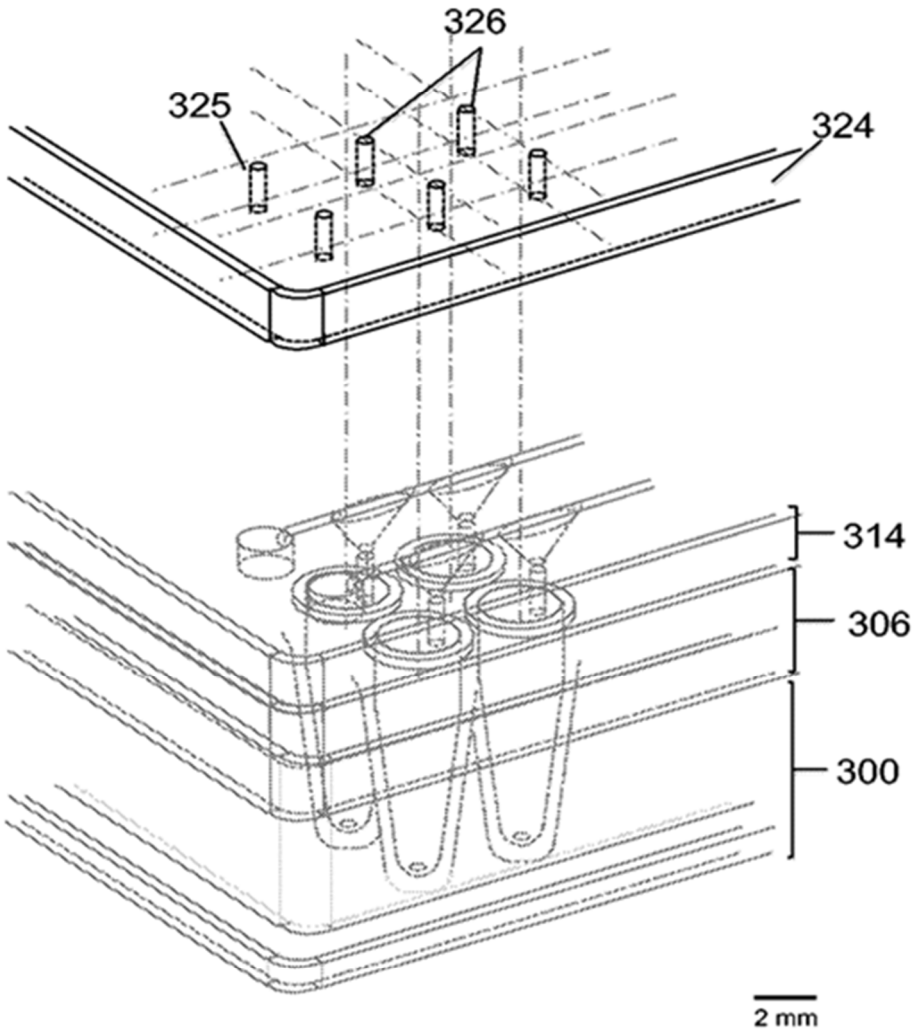


Figura 124

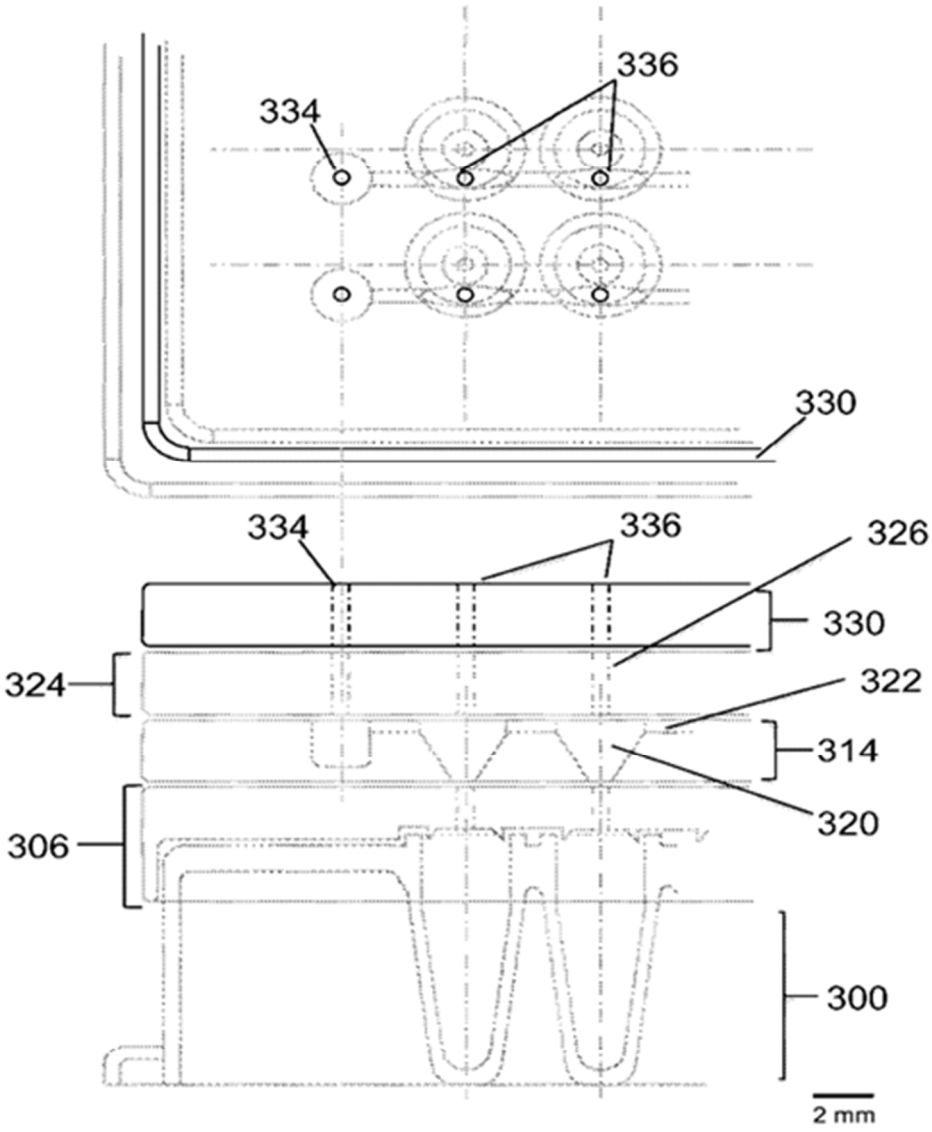


Figura 125

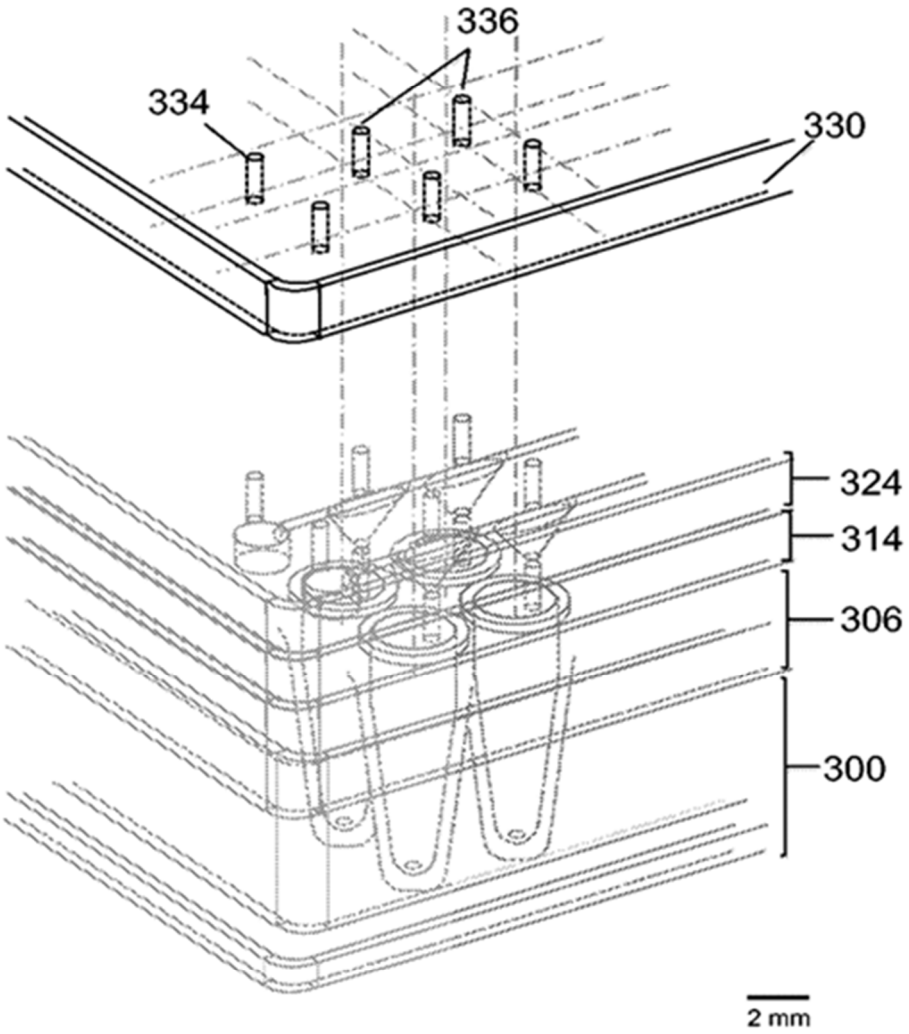


Figura 126

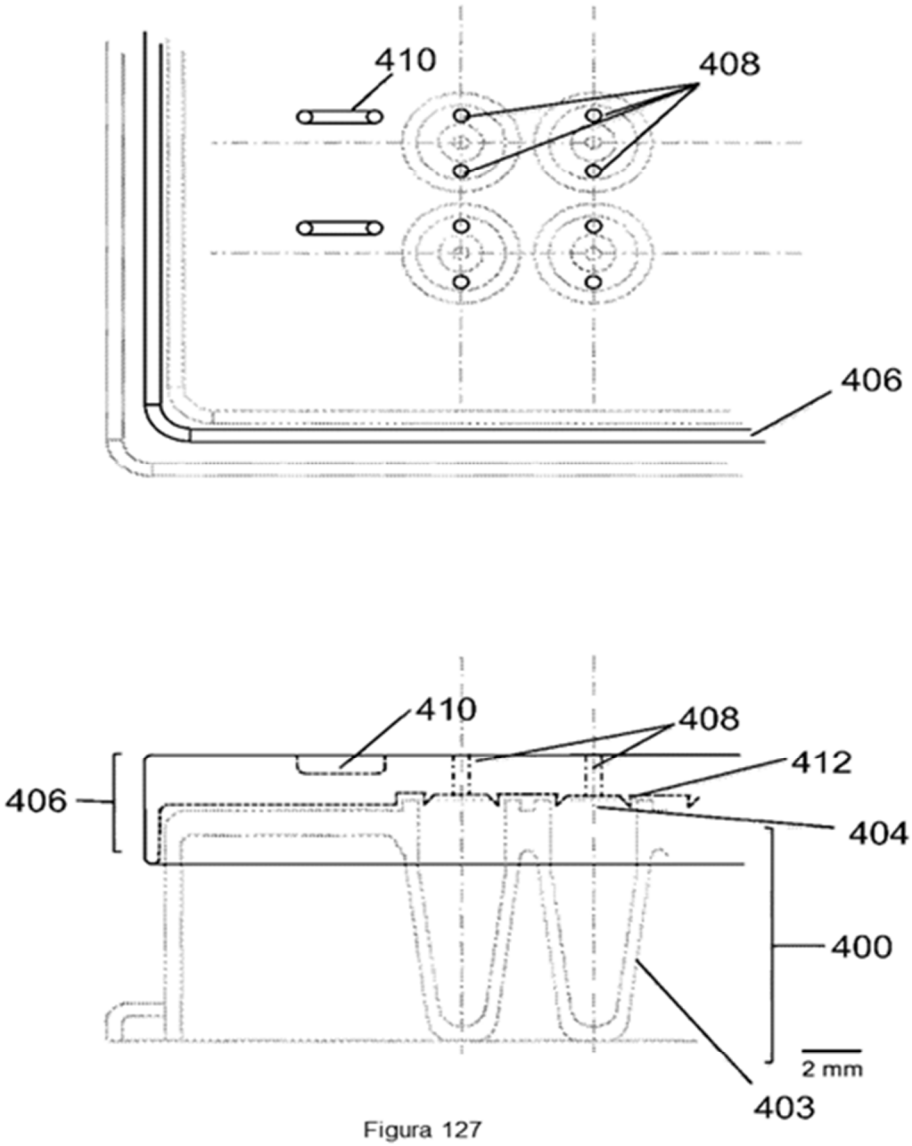


Figura 127

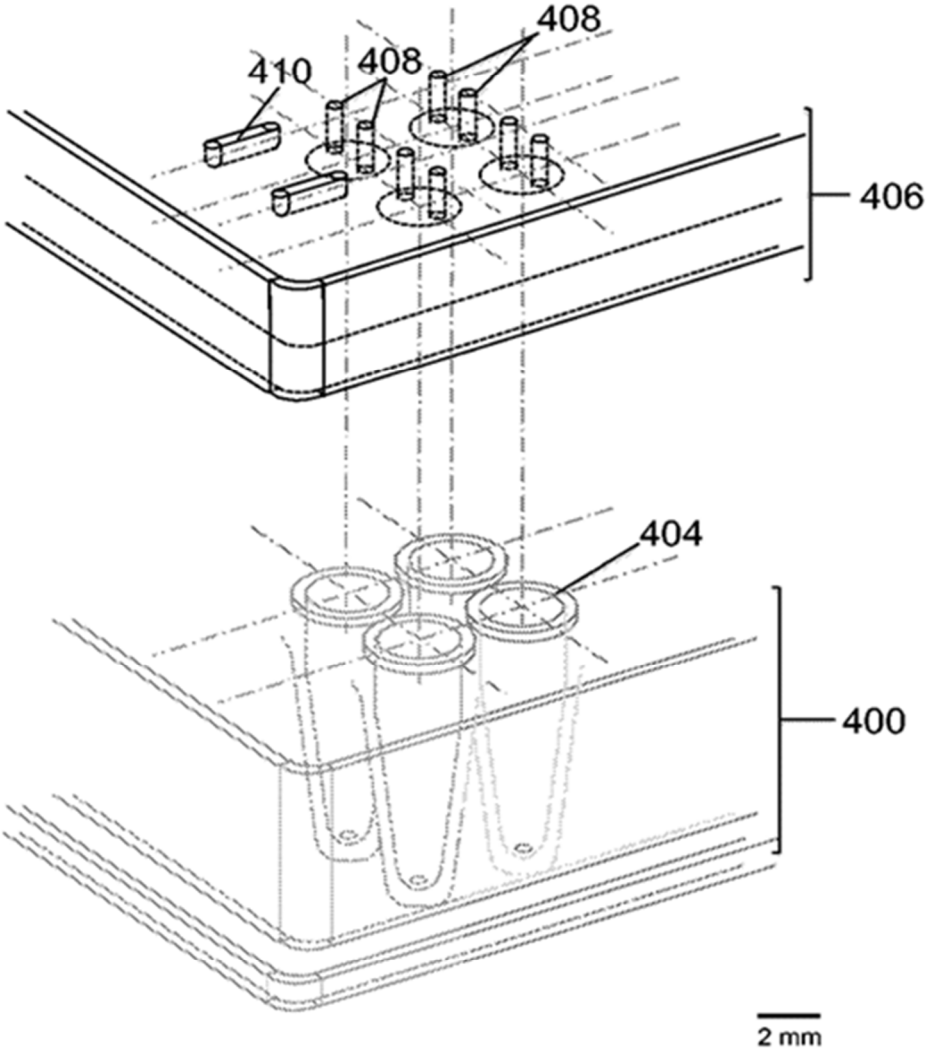


Figura 128

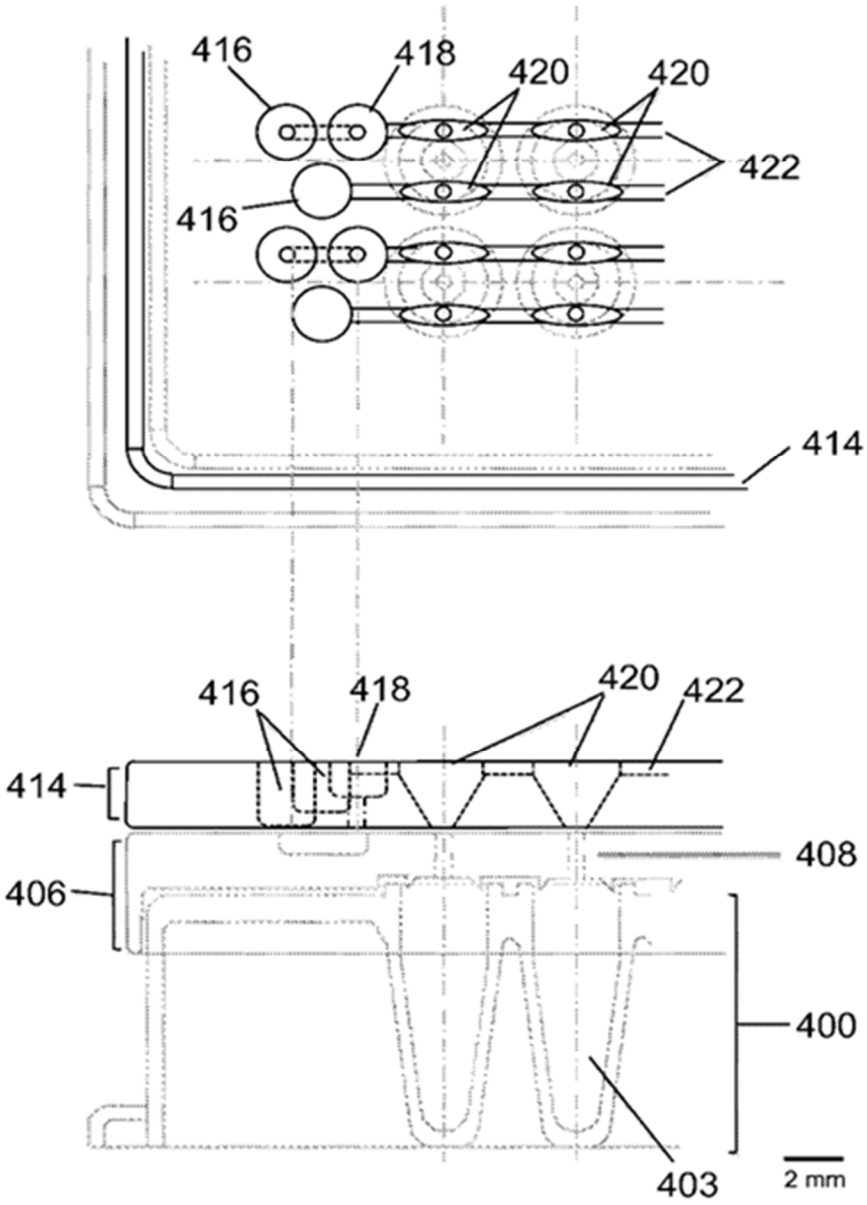

416
418
420
420
422
416
414
416
418
420
422
414
408
406
400
403
2 mm

Figura 129

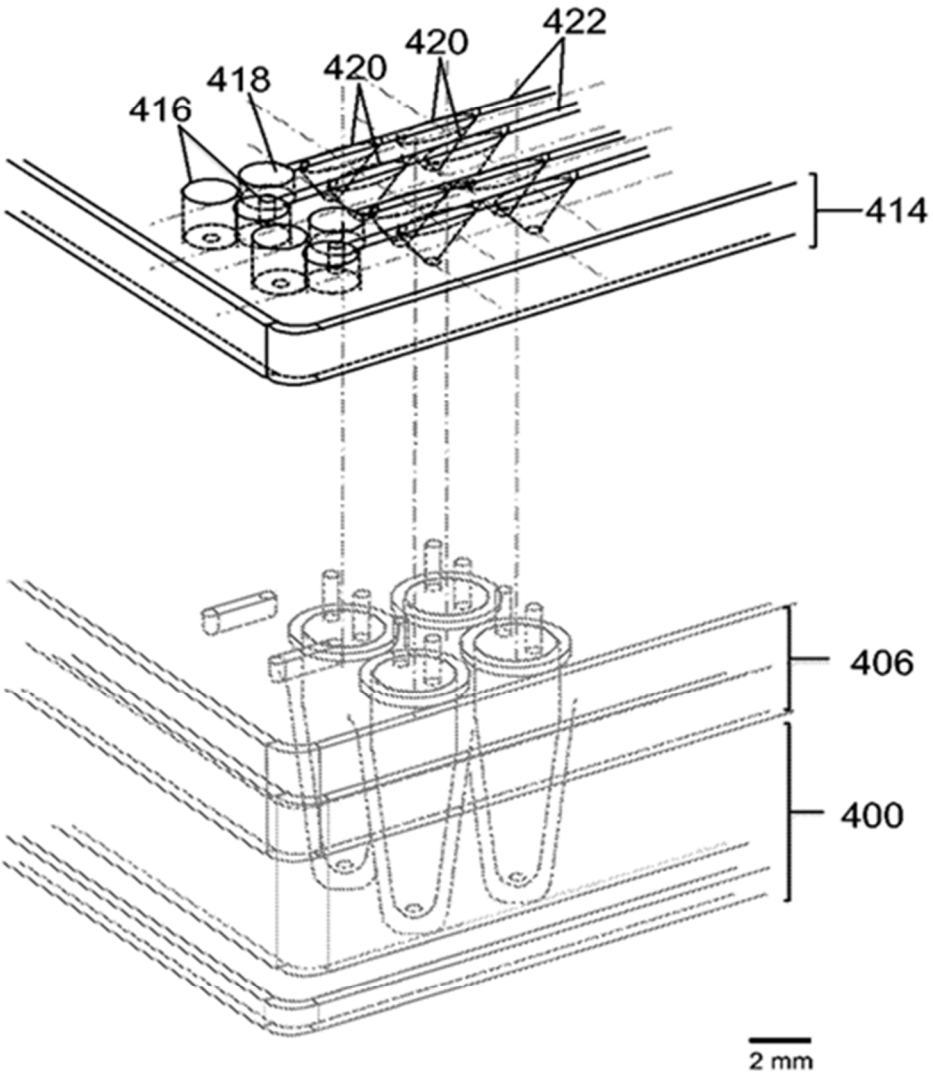


Figura 130

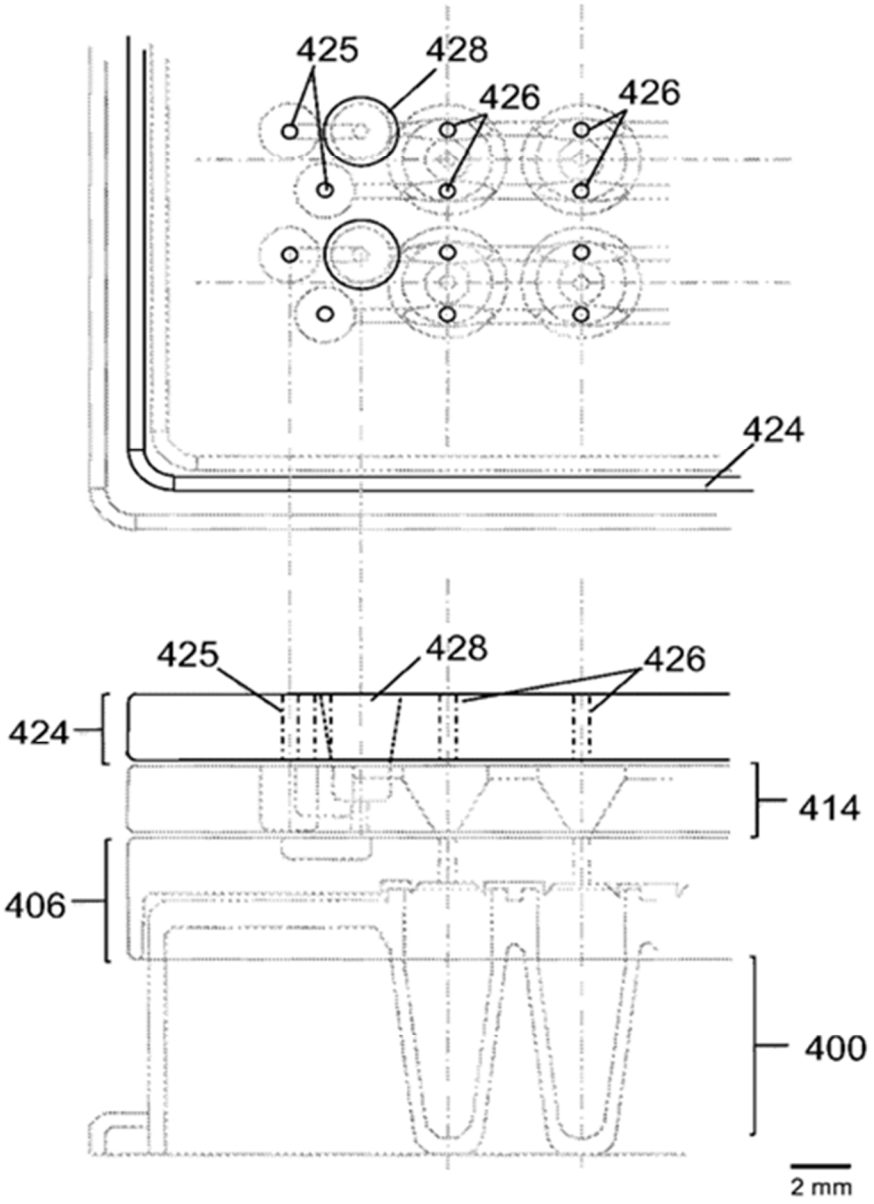


Figura 131

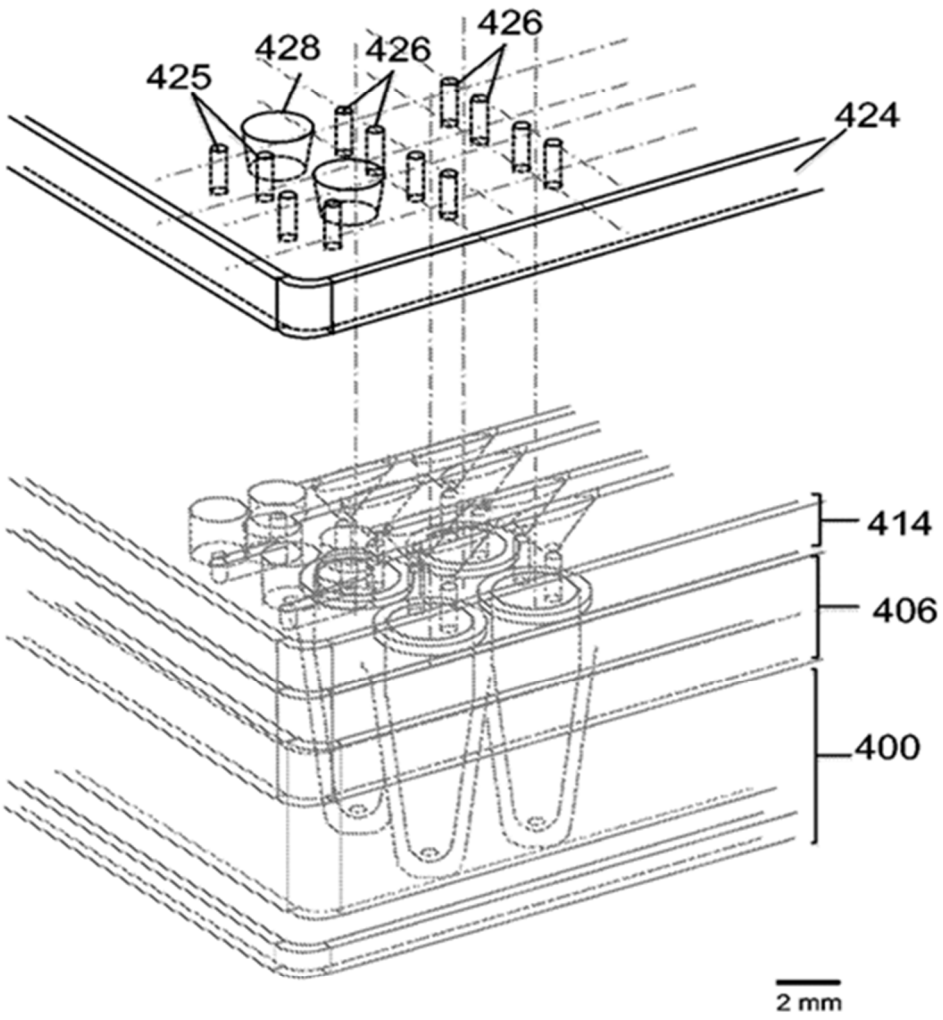


Figura 132

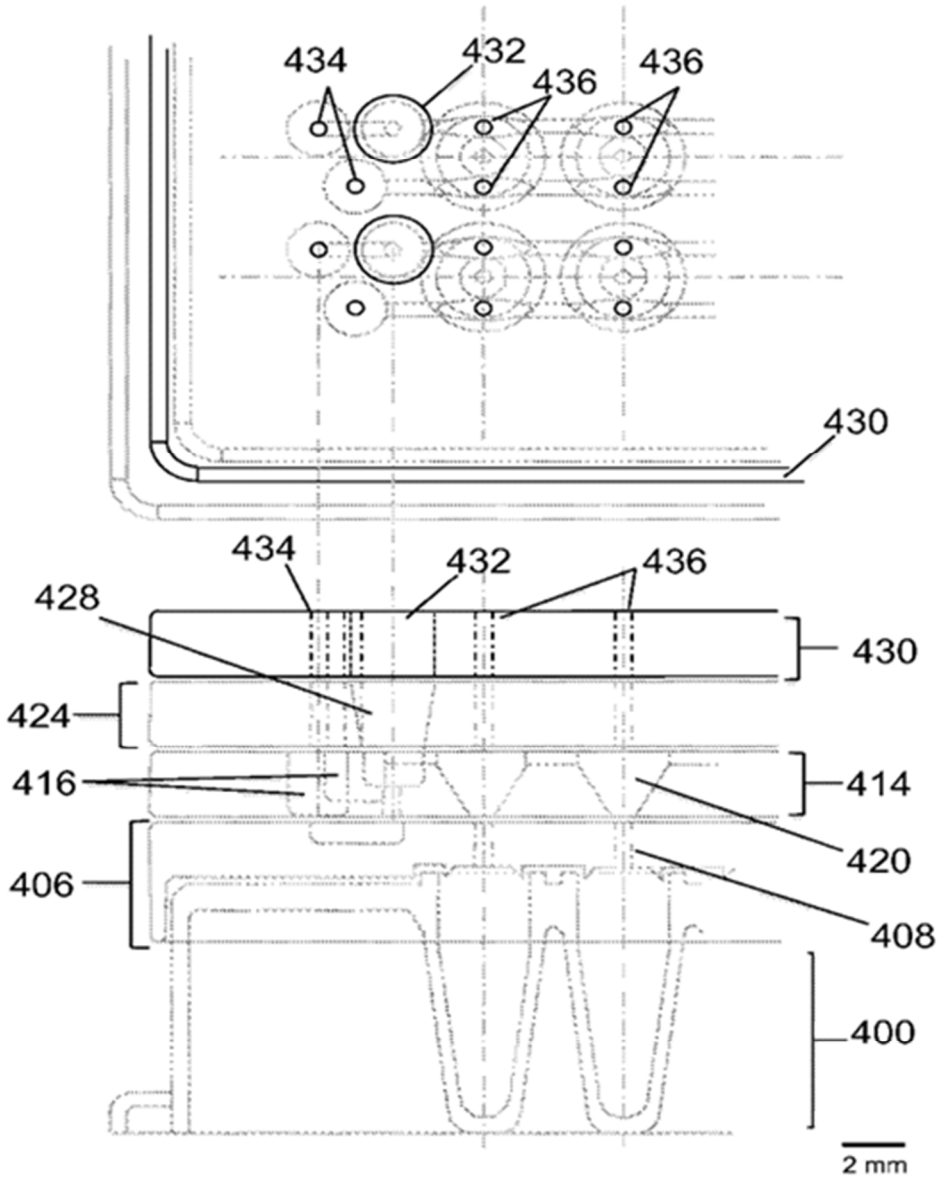

434
432
436
436
430
434
432
436
428
430
424
416
414
420
406
408
400
2 mm

Figura 133

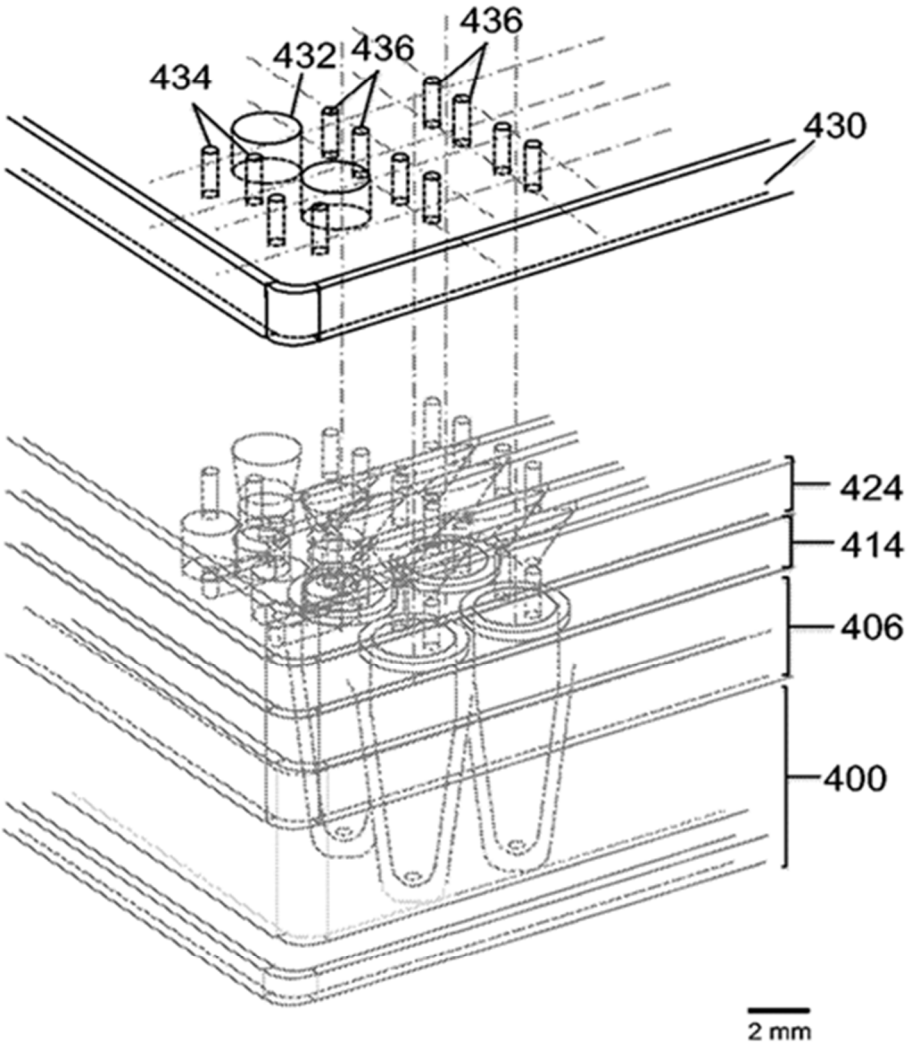


Figura 134

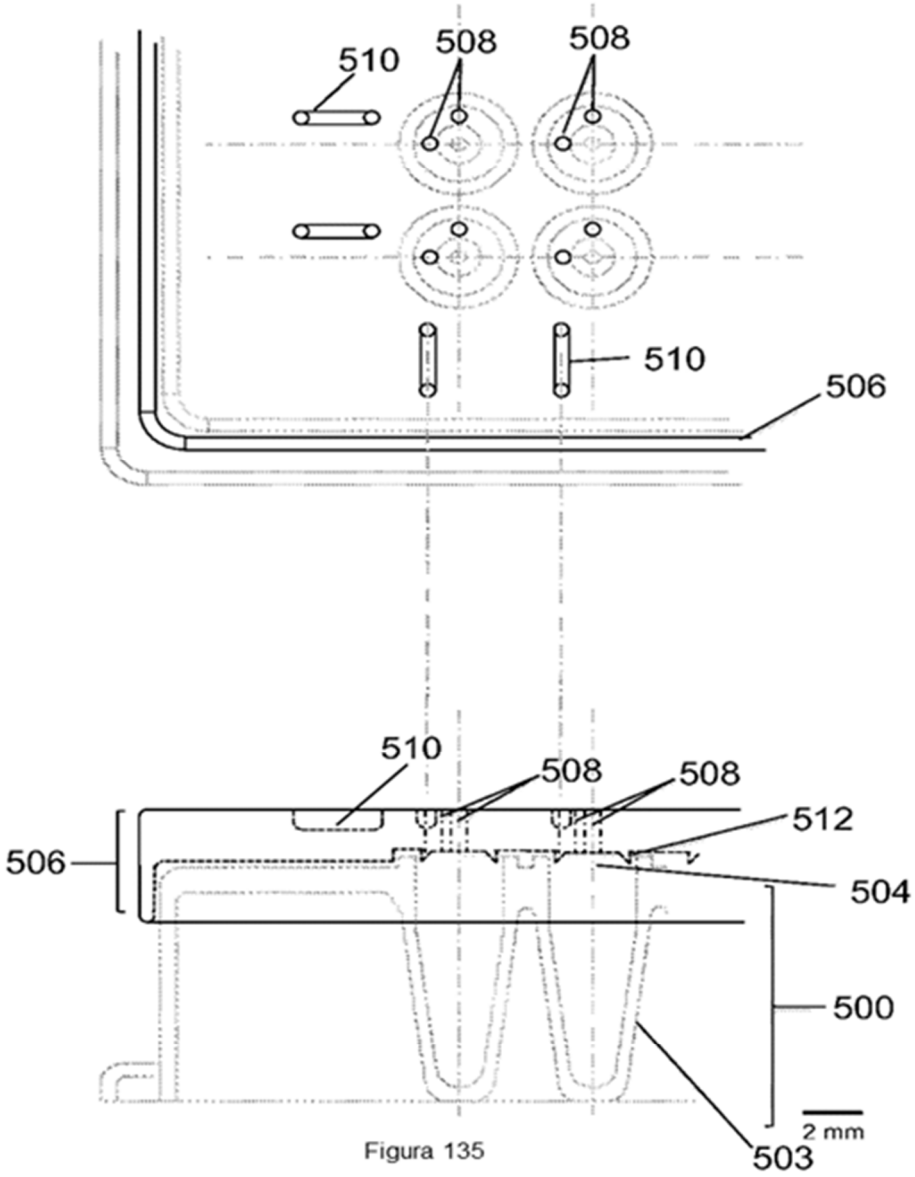


Figura 135

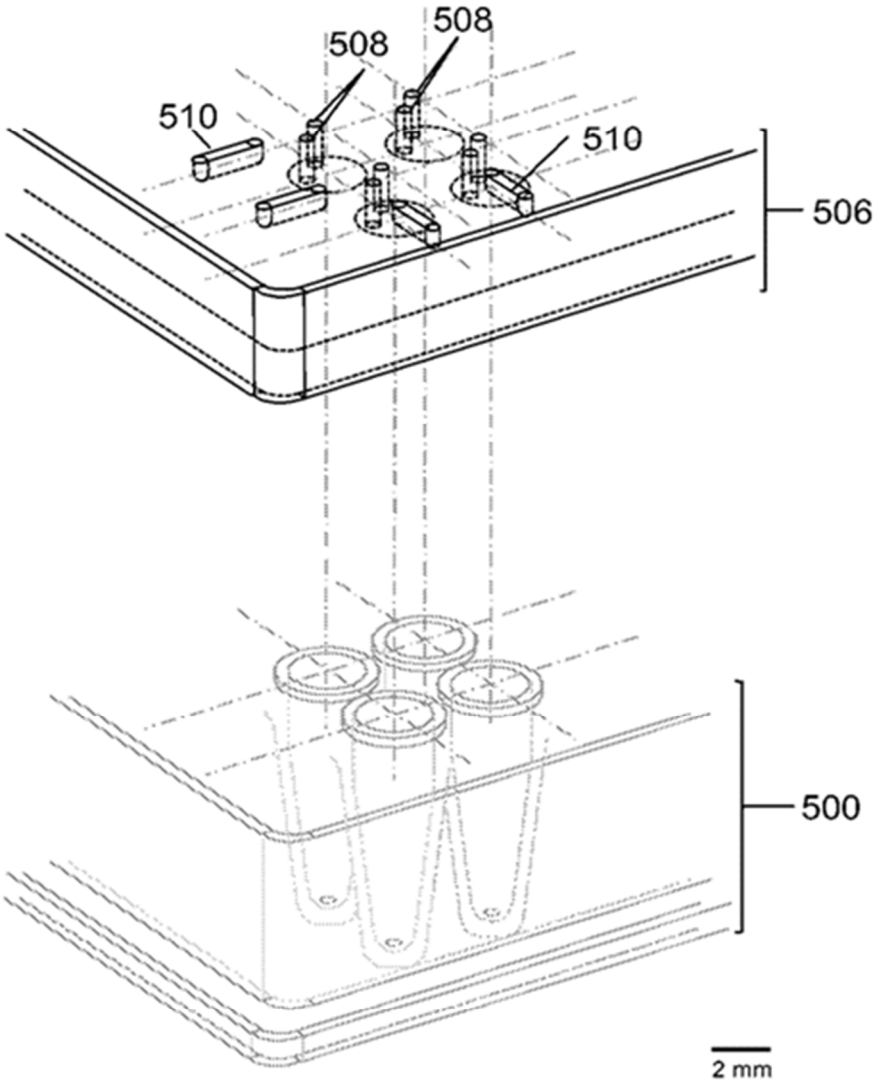


Figura 136

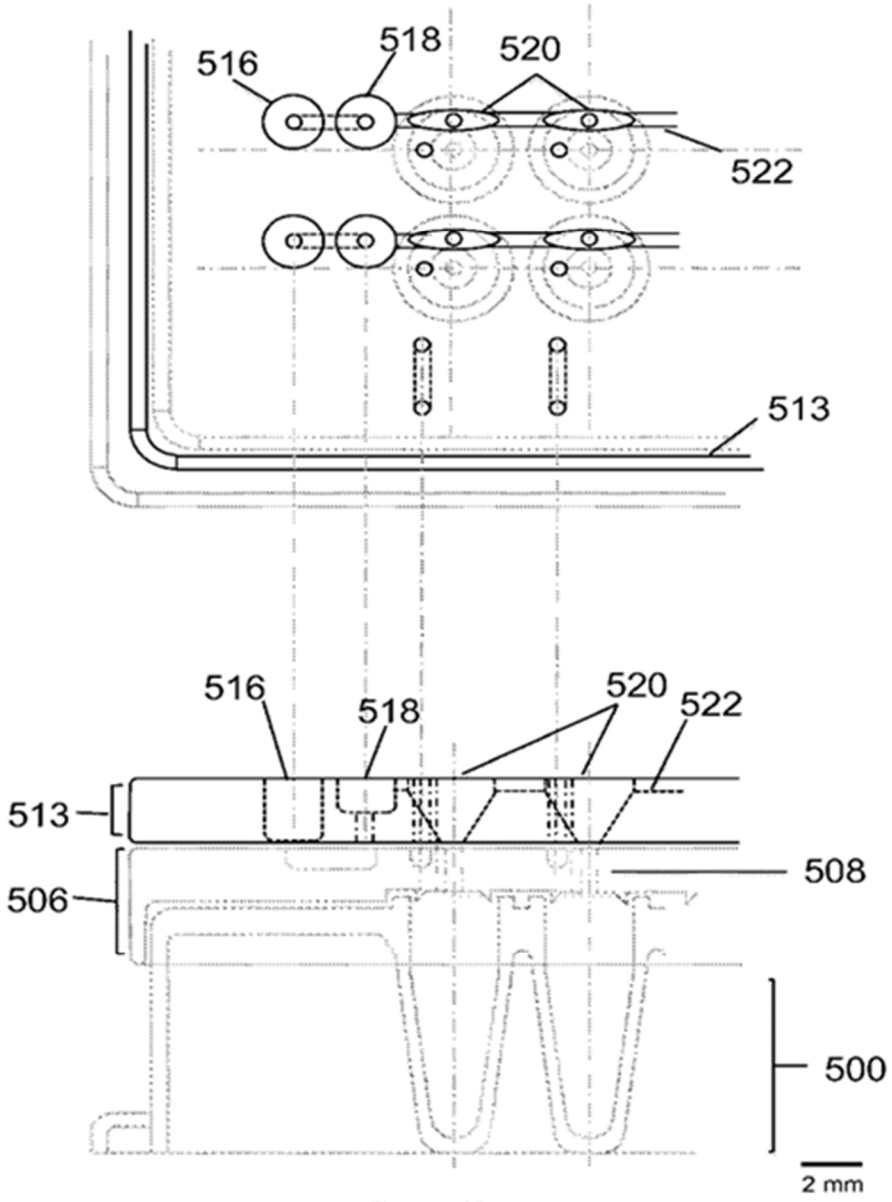


Figura 137

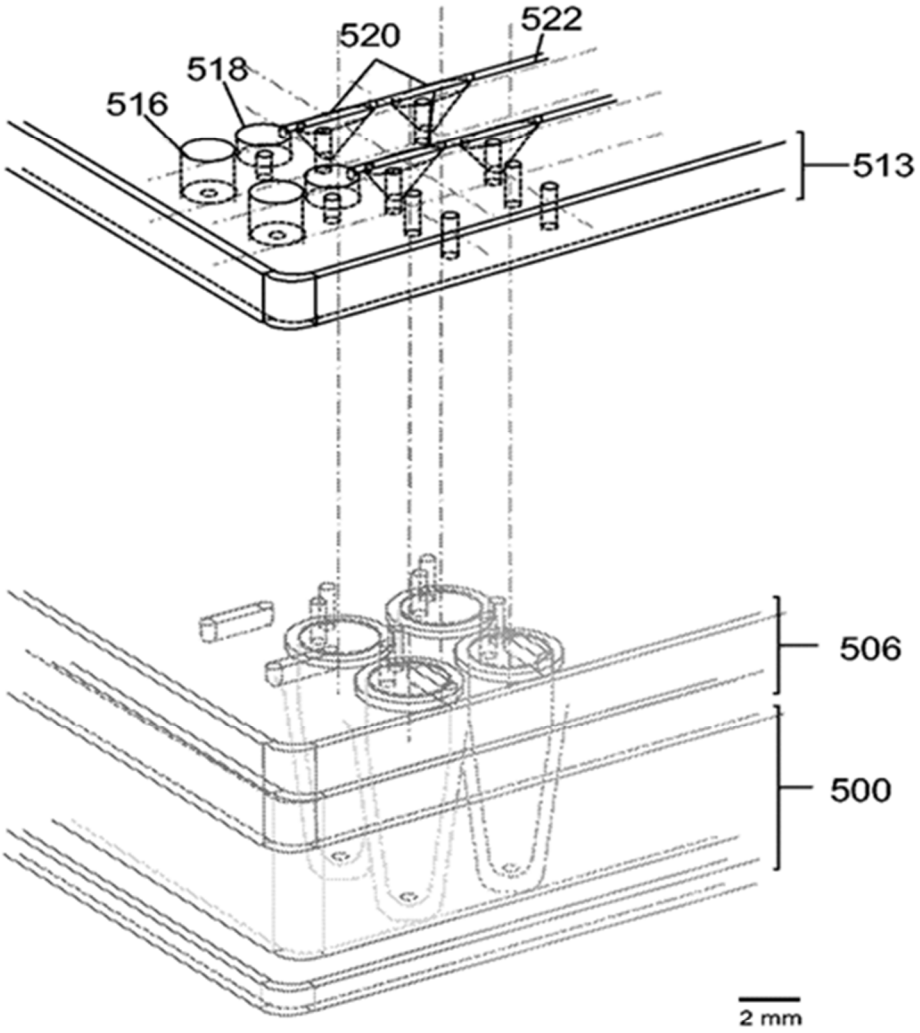


Figura 138

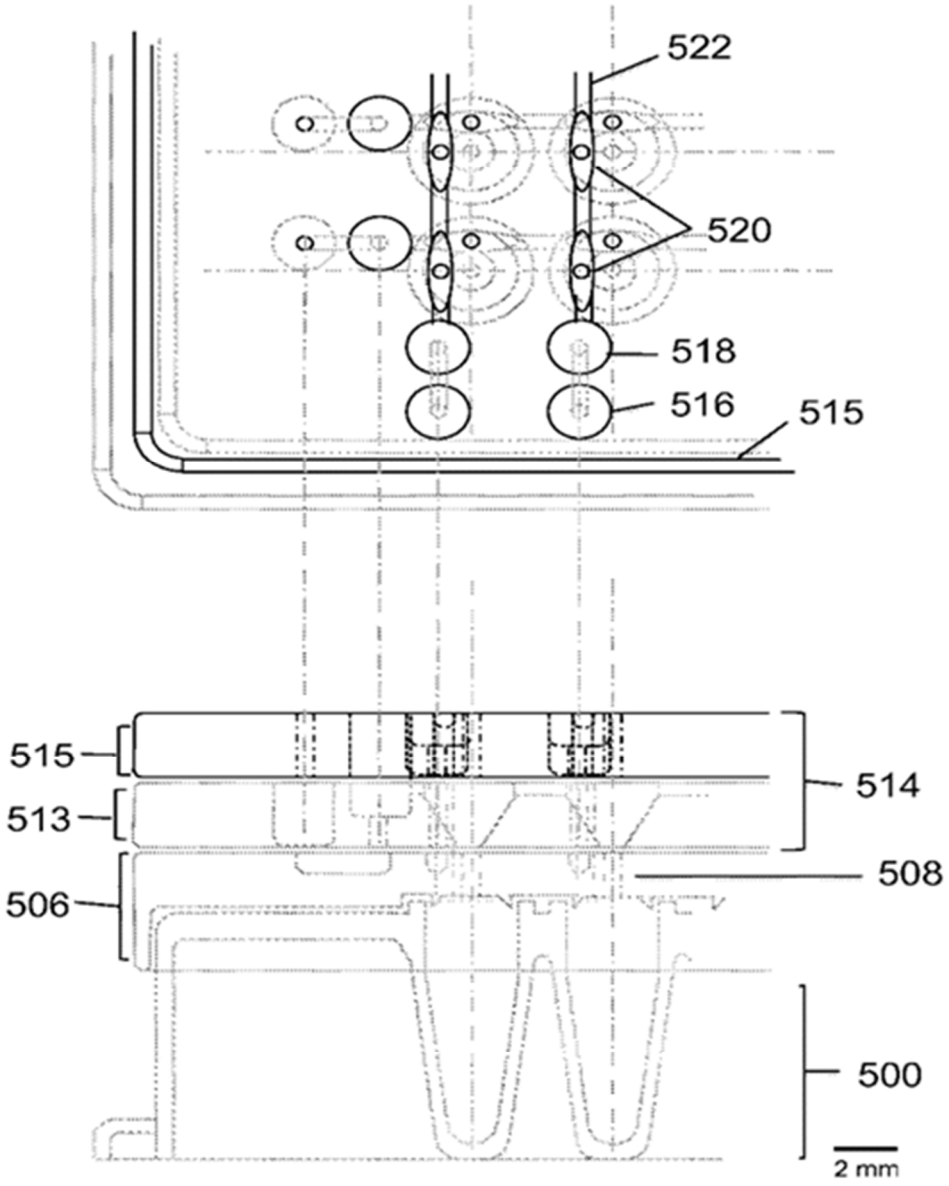


Figura 139

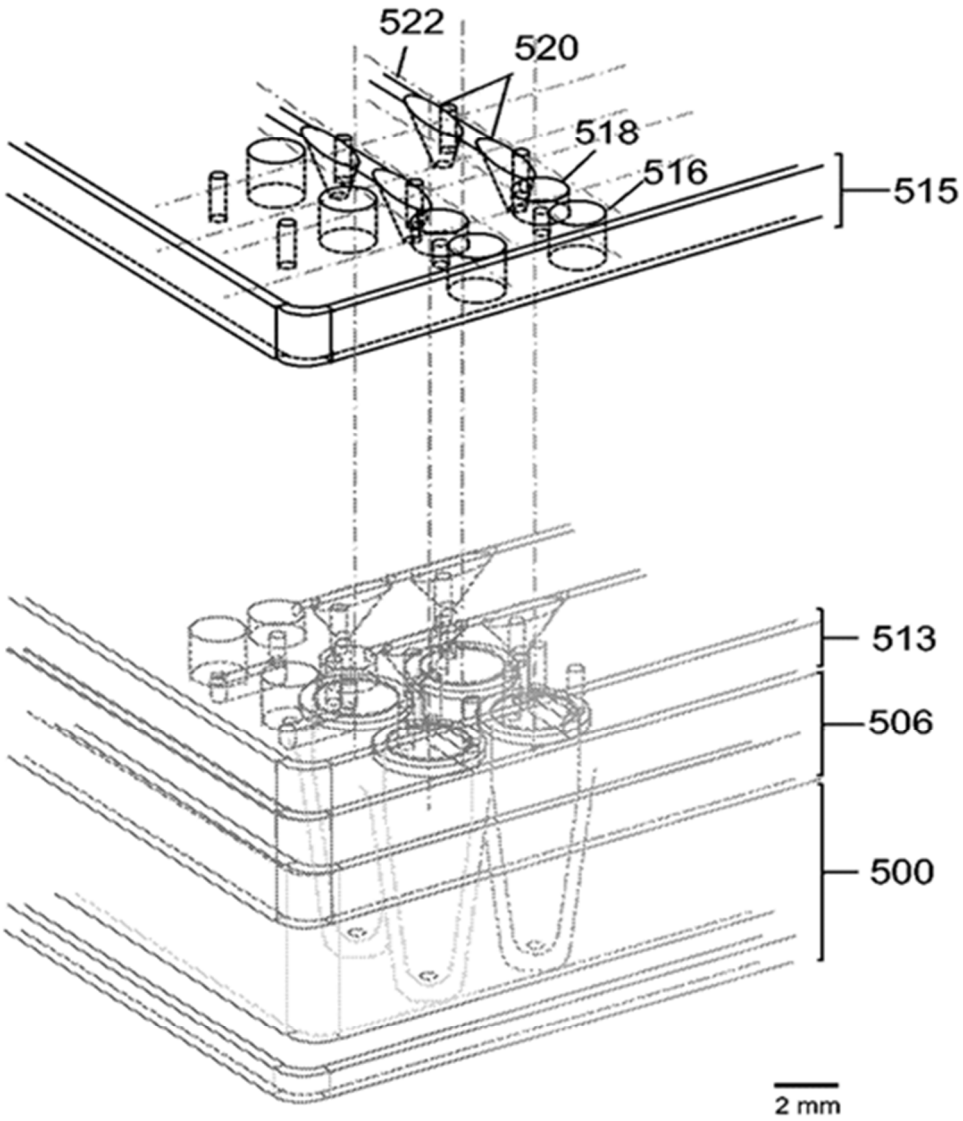


Figura 140

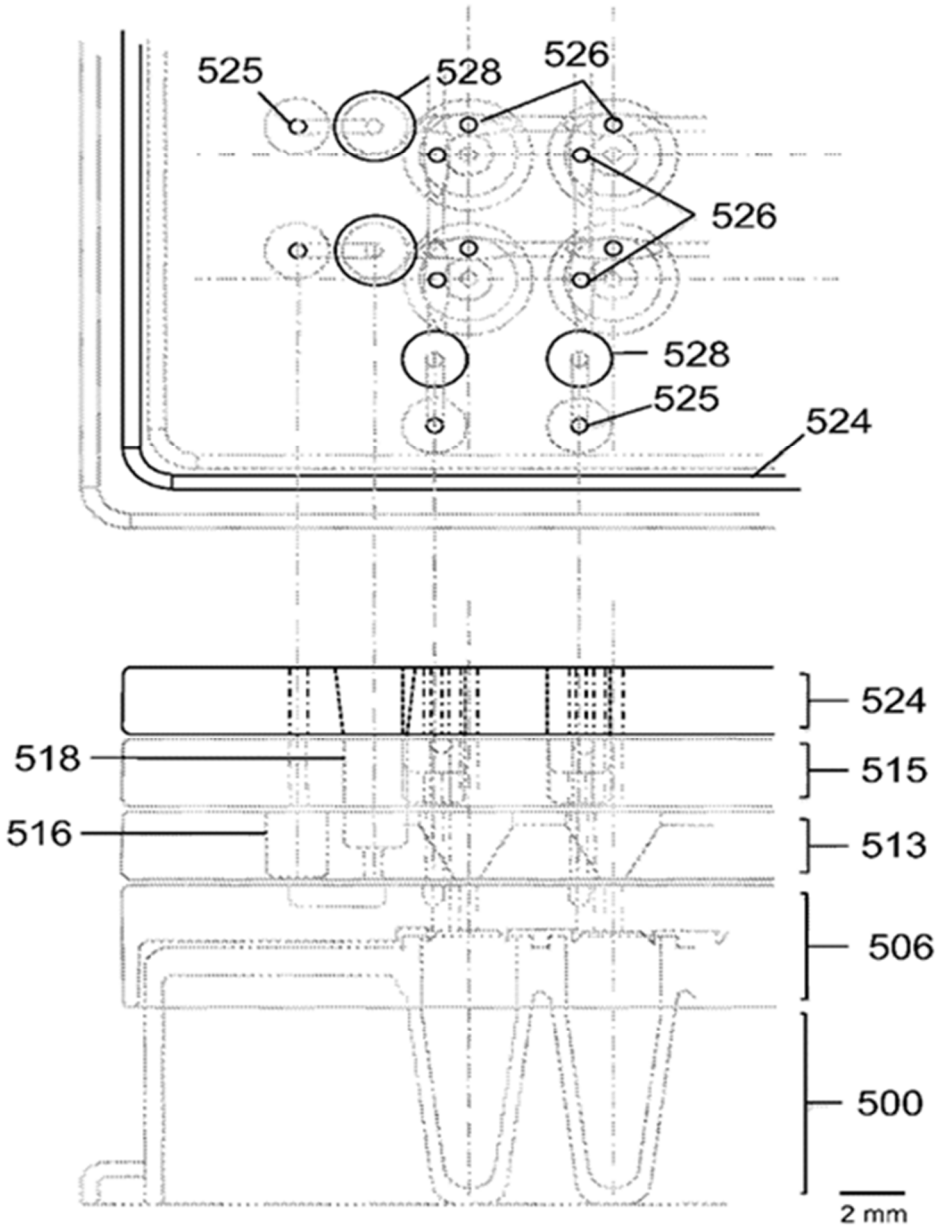


Figura 141

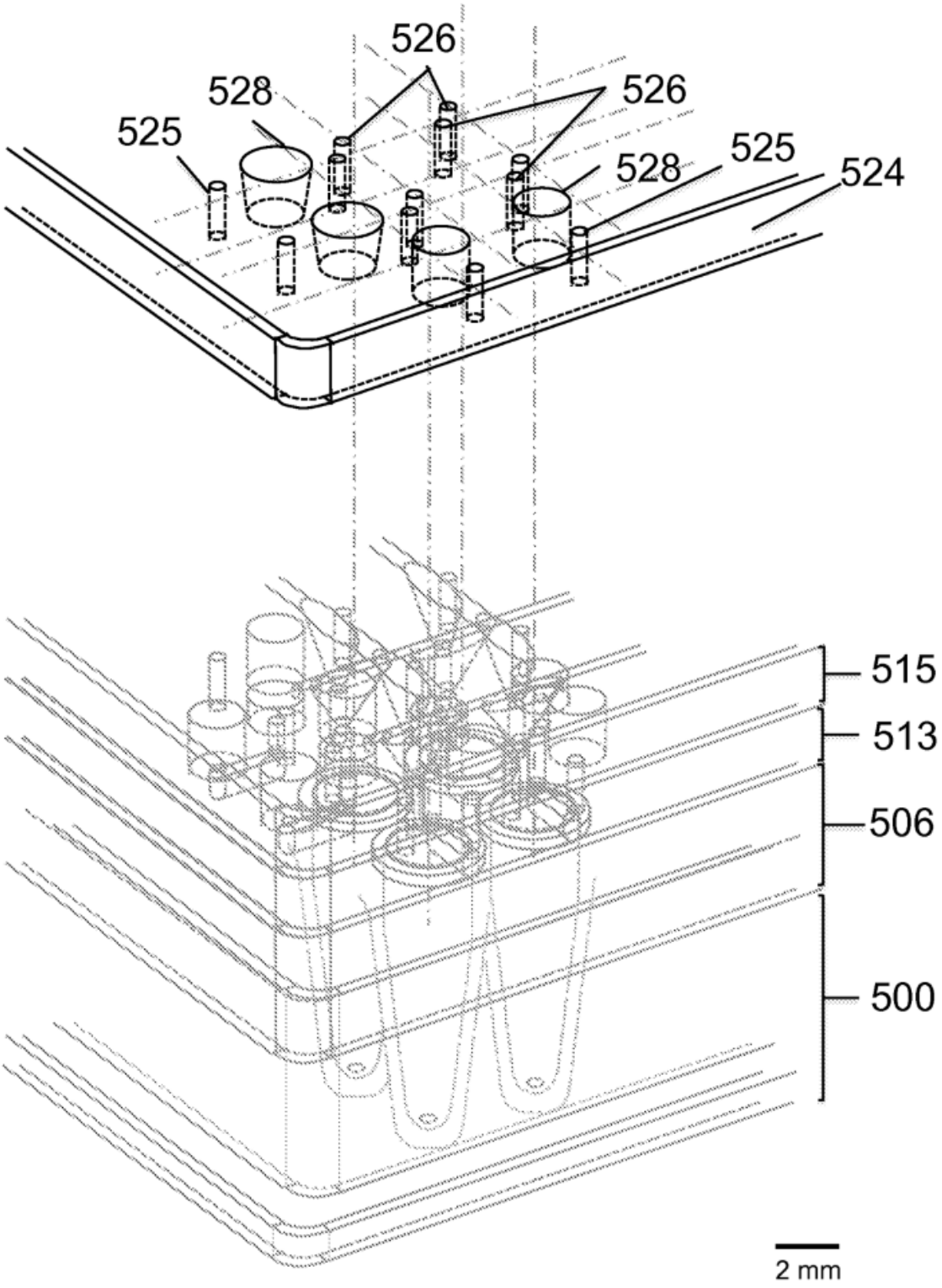


Figura 142

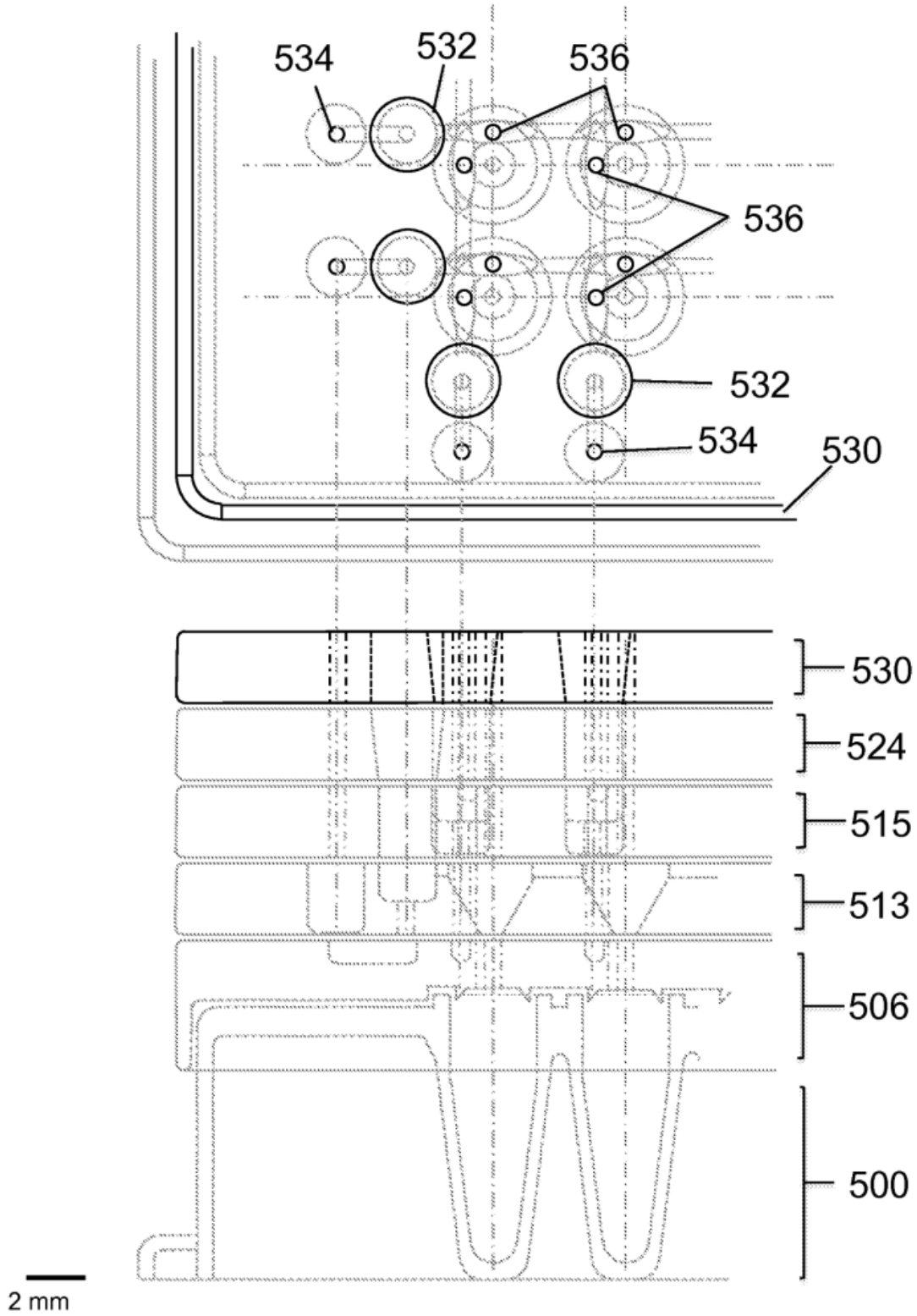


Figura 143

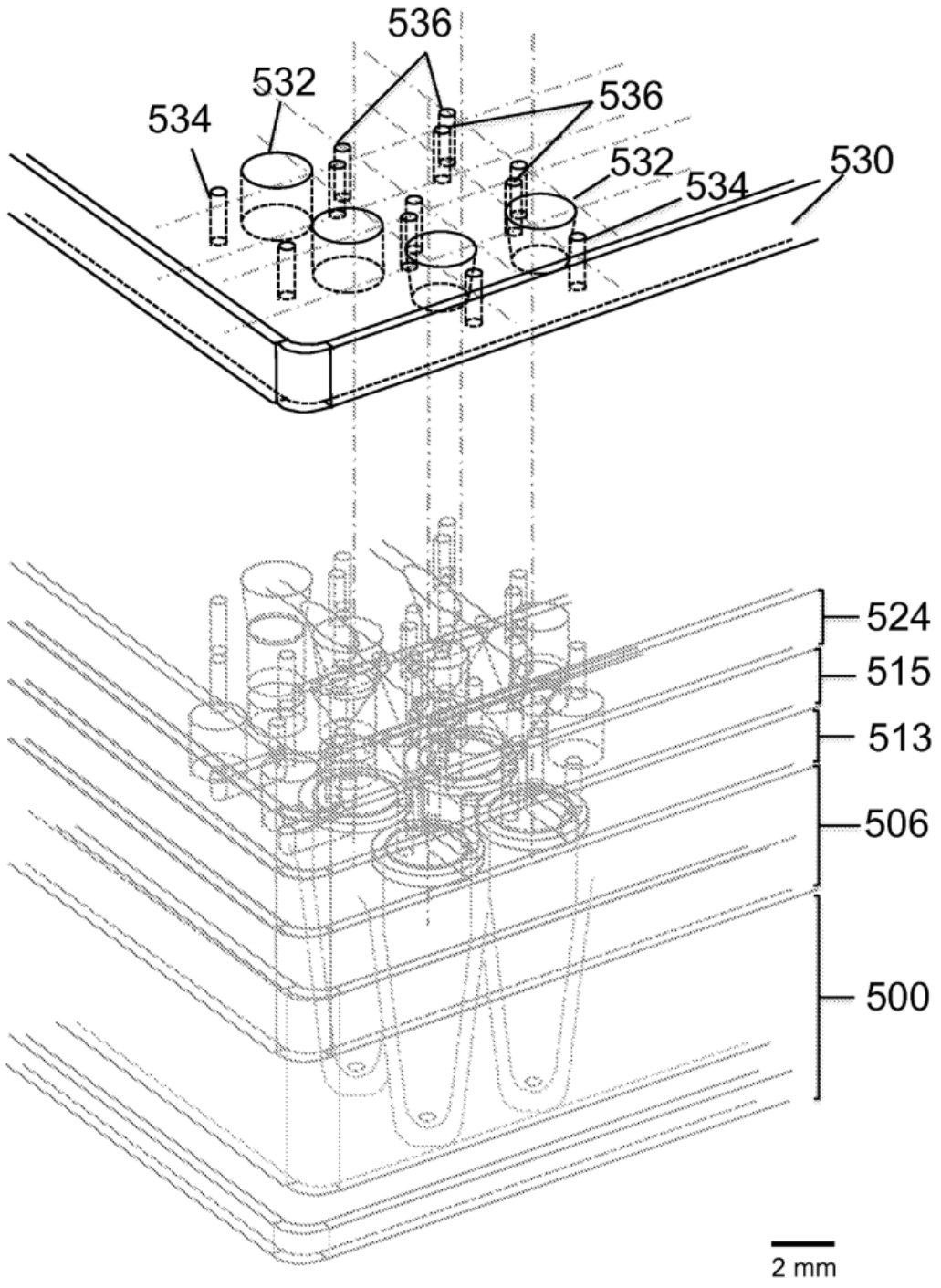
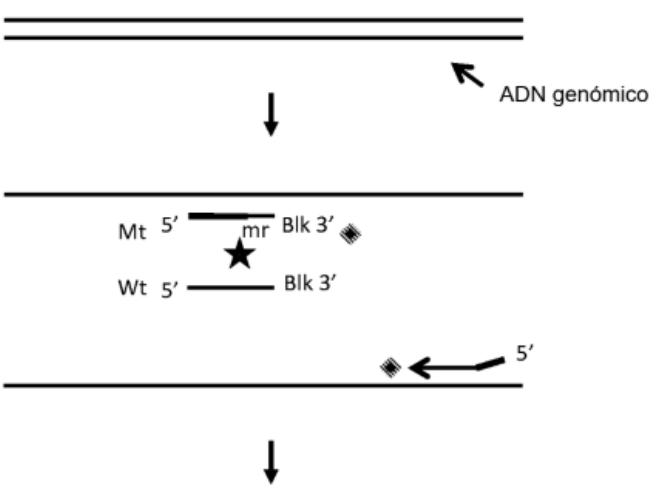


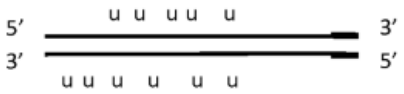
Figura 144

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones de bajo nivel. Aislar ADN genómico o ADNlc.

B. Tratar con UDG para prevención de arrastres. Los cebadores específicos del locus en dirección 5' contienen bases de ribosa específicas de la mutación (mr), que se eliminan con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana, desbloqueando de esta forma el cebador. Los cebadores con secuencia Wt permanecen bloqueados. Amplificar preferentemente las regiones que contienen mutaciones usando PCR (y dUTP). Los cebadores en dirección 3' contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)



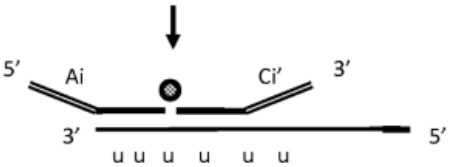
C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.



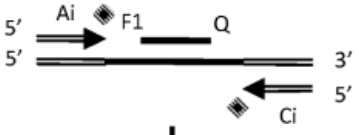
D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la mutación (Mt) contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR, mientras que las sondas naturales (Wt) no. El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana.



E. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos no bloqueados específicos de mutación en 5' y fosforilados en 3' entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.



F. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci'). Cada sonda TaqMan expande la unión de ligadura.



G. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)



Figura 145

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR
con prevención de arrastres
para detectar mutaciones de bajo nivel.
Aislar ADN genómico o ADNlc.

B. Tratar con UDG para prevención de arrastres.
Los cebadores específicos del locus en dirección 5'
contienen bases de ribosa específicas de la mutación
(mr), que se eliminan con ARNasaH2 solamente
cuando se unen a la diana, desbloqueando
de esta forma el cebador. Los cebadores
con secuencia Wt permanecen bloqueados.
Amplificar preferentemente las regiones
que contienen mutaciones usando PCR (y dUTP).
Los cebadores en dirección 3' contienen colas
de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros
de cebadores.
(Opcional: distribuir por alícuotas
entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU,
que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la mutación (Mt)
contienen marcadores (Ai, Bi', Ci') para la posterior amplificación
por PCR, mientras que las sondas naturales (Wt) no. El cebador
de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar
escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente
cuando se hibrida con la diana.

E. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos
no bloqueados específicos de mutación en 5'
y fosforilados en 3' entre sí.
Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes
para su detección.

F. Tratar con UDG para prevención de arrastres,
lo que también destruye los amplicones
diana originales.
Solamente se amplificarán los auténticos productos
de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP)
con cebadores específicos de UniTaq (F1-Bi-Q-Ai-Ci).

G. Productos de la PCR de ADN bicatenario;
el bloqueador de la polimerasa detiene
la extensión de la hebra inferior.

H. Tras la etapa de desnaturalización,
a medida que la temperatura disminuye,
se forma una horquilla entre Bi y Bi'.
La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq
extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente
para generar una señal.
(Los productos de la PCR
que contienen dU para prevención de arrastres.)

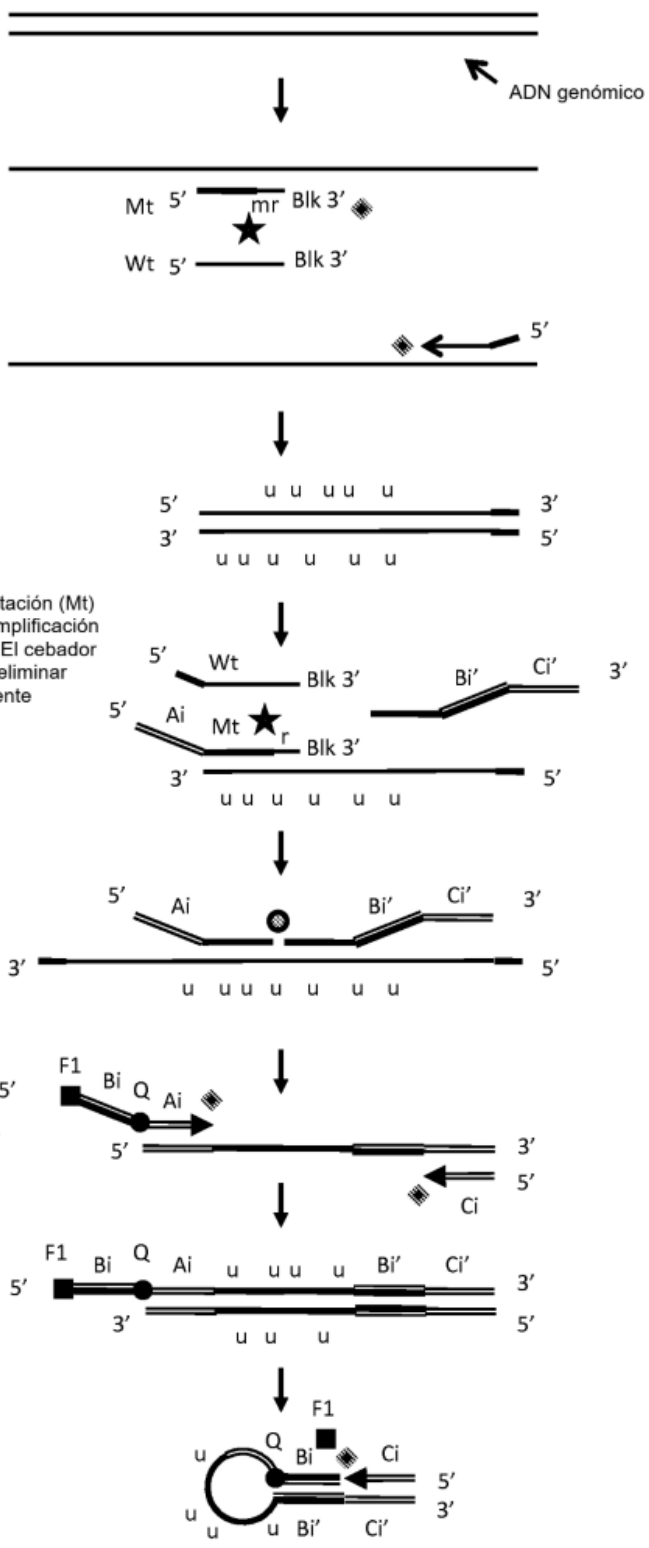


Figura 146

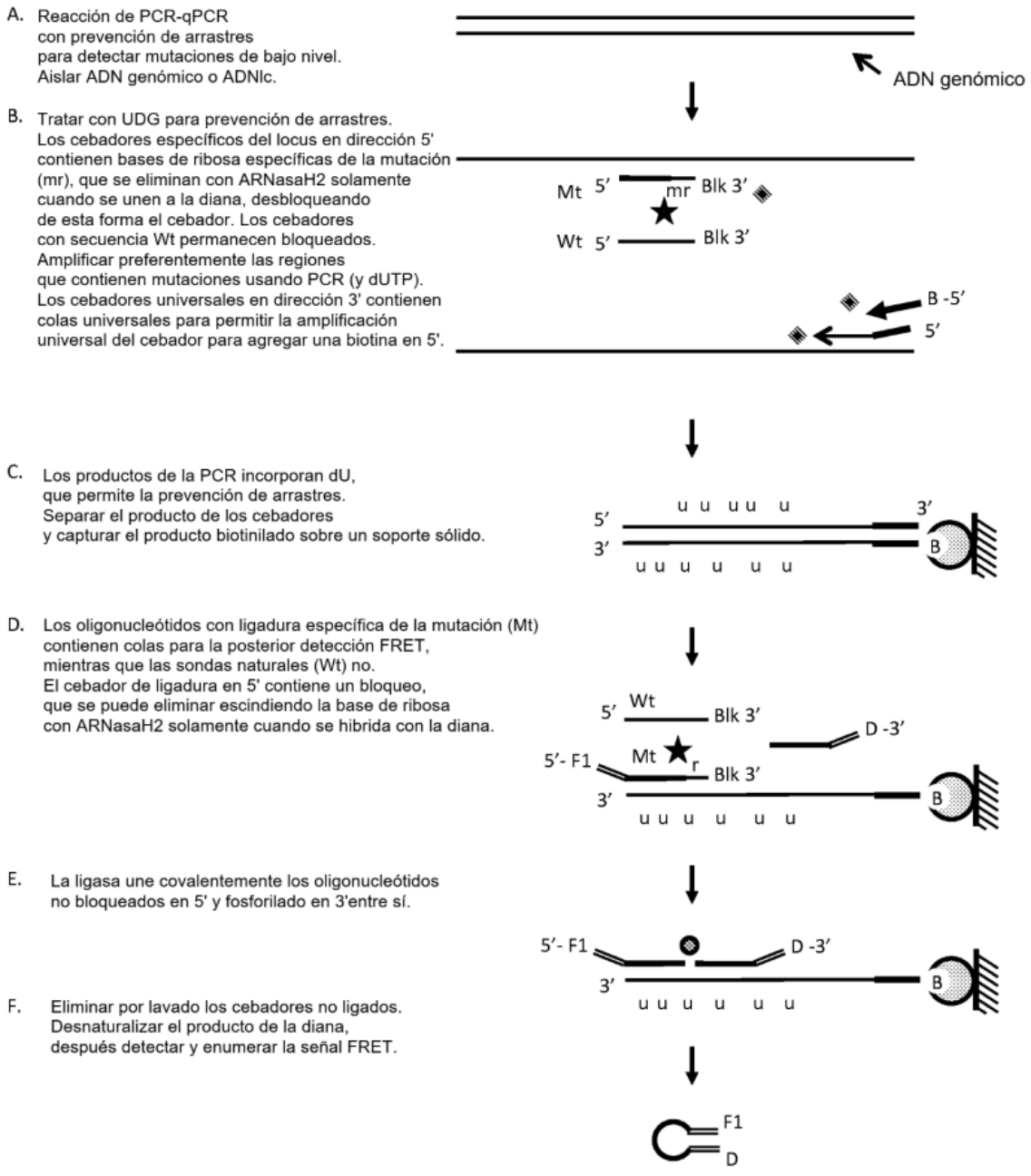
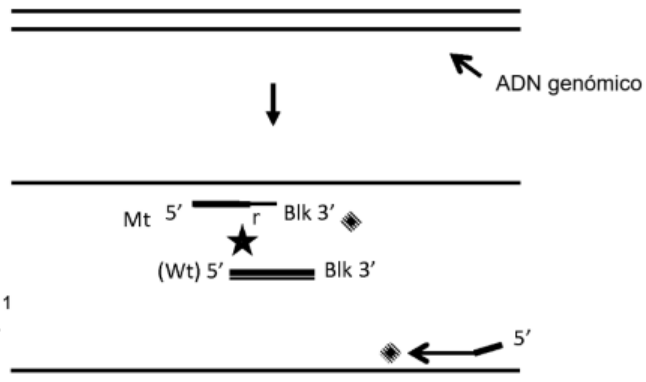

A. Reacción de PCR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones de bajo nivel. Aislar ADN genómico o ADNlc.
ADN genómico
B. Tratar con UDG para prevención de arrastres. Los cebadores específicos del locus en dirección 5' contienen bases de ribosa específicas de la mutación (mr), que se eliminan con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana, desbloqueando de esta forma el cebador. Los cebadores con secuencia Wt permanecen bloqueados. Amplificar preferentemente las regiones que contienen mutaciones usando PCR (y dUTP). Los cebadores universales en dirección 3' contienen colas universales para permitir la amplificación universal del cebador para agregar una biotina en 5'.
Mt 5' mr Blk 3'
Wt 5' Blk 3'
B -5'
5'
C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.
5'
3'
u u u u u
B
D. Los oligonucleótidos con ligadura específica de la mutación (Mt) contienen colas para la posterior detección FRET, mientras que las sondas naturales (Wt) no. El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana.
5' Wt Blk 3'
D -3'
5'- F1
Mt r Blk 3'
E. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos no bloqueados en 5' y fosforilado en 3'entre sí.
F. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.
F1
D

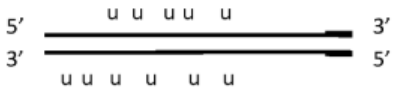
Figura 147

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones de bajo nivel. Aislar ADN genómico o ADNlc.

B. Tratar con UDG para prevención de arrastres. Los cebadores específicos del locus en dirección 5' contienen bases de ribosa (r), que se eliminan con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana, desbloqueando de esta forma el cebador. Sondas bloqueantes de LNA o PNA Wt facilitan la amplificación preferente de las regiones que contienen mutaciones usando la PCR (y dUTP). Los cebadores en dirección 3' contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)



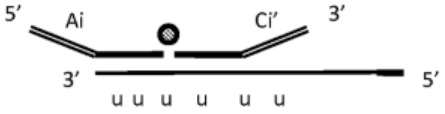
C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.



D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la mutación (Mt) contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR. Las sondas bloqueantes de LNA o PNA suprimen la ligadura a la secuencia natural. El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana.



E. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos no bloqueados específicos de mutación en 5' y fosforilados en 3' entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.



F. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci'). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.



G. La actividad nucleasa 5'->3' de polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar señal. (Productos de PCR incorporan dU, permitiendo la prevención de arrastre.)

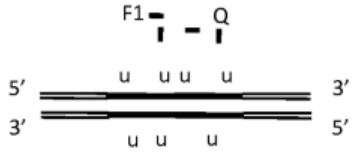


Figura 148

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones de bajo nivel. Aislar ADN genómico o ADNlc.

B. Tratar con UDG para prevención de arrastres. Los cebadores específicos del locus en dirección 5' contienen bases de ribosa (r), que se eliminan con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana, desbloqueando de esta forma el cebador. Sondas bloqueantes de LNA o PNA Wt facilitan la amplificación preferente de las regiones que contienen mutaciones usando la PCR (y dUTP). Los cebadores en dirección 3' contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la mutación (Mt) contienen marcadores (Ai, Bi', Ci') para la posterior amplificación por PCR. Las sondas bloqueantes de LNA o PNA suprimen la ligadura a la secuencia natural. El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana.

E. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos no bloqueados específicos de mutación en 5' y fosforilados en 3' entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

F. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

G. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

H. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

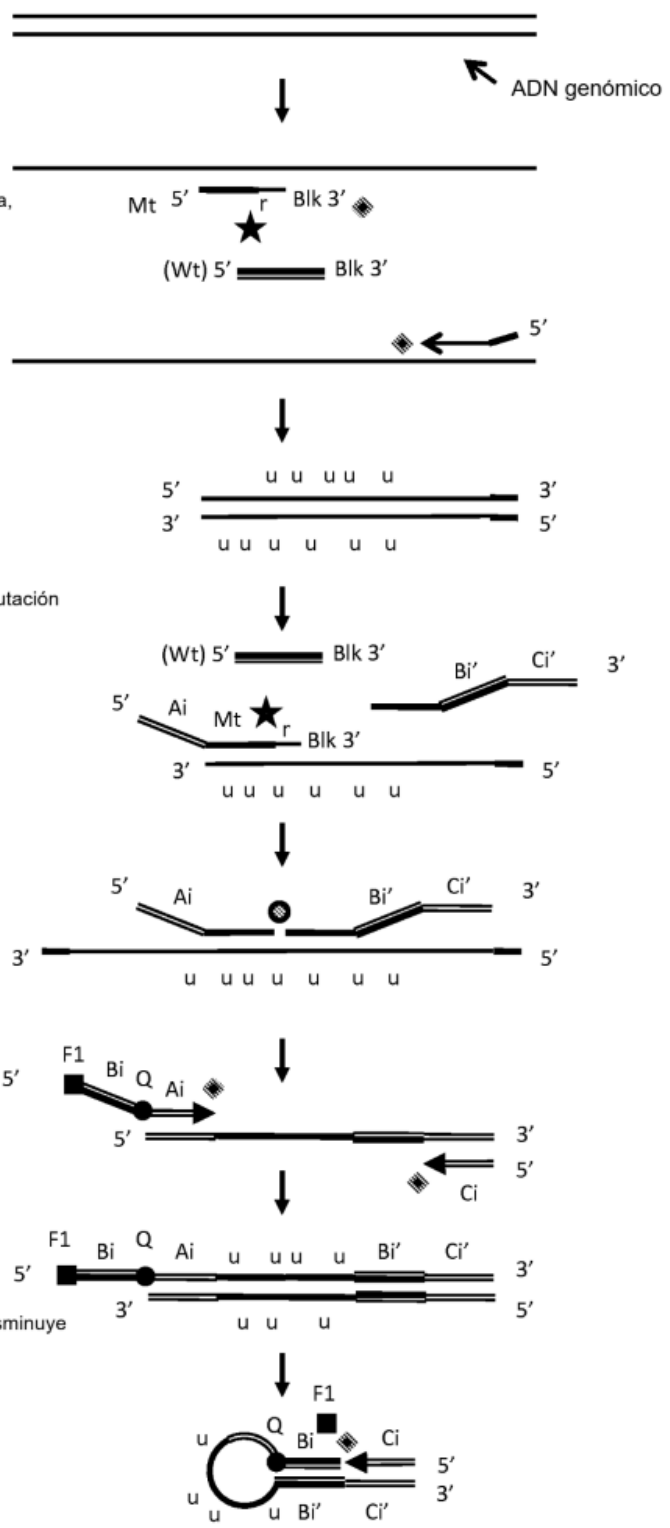
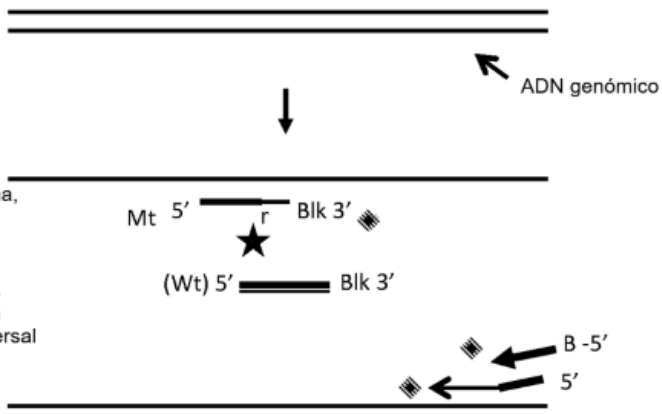


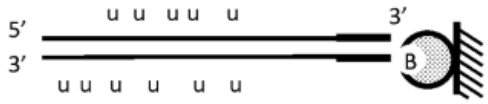
Figura 149

A. Reacción de PCR-qPCR
con prevención de arrastres
para detectar mutaciones de bajo nivel.
Aislar ADN genómico o ADNlc.

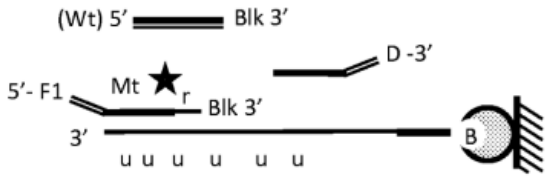
B. Tratar con UDG para prevención de arrastres.
Los cebadores específicos del locus en dirección 5'
contienen bases de ribosa (r), que se eliminan
con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana,
desbloqueando de esta forma el cebador.
Sondas bloqueantes de LNA o PNA Wt facilitan
la amplificación preferente de las regiones
que contienen mutaciones usando la PCR (y dUTP).
Los cebadores universales en dirección 3' contienen
colas universales para permitir la amplificación universal
del cebador para agregar una biotina en 5'.
(Opcional: distribuir por alícuotas
entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)



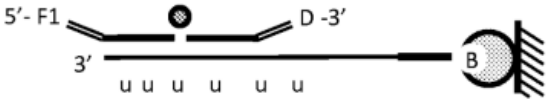
C. Los productos de la PCR incorporan dU,
que permite la prevención de arrastres.
Separar el producto de los cebadores
y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.



D. Los oligonucleótidos con ligadura específica de la mutación
(Mt) contienen colas para la posterior detección FRET.
Las sondas bloqueantes de LNA o PNA
suprimen la ligadura a la secuencia natural.
El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo,
que se puede eliminar escindiendo la base
de ribosa con ARNasaH2 solamente
cuando se hibrida con la diana.



E. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos
no bloqueados en 5' y fosforilado en 3'entre sí.



F. Eliminar por lavado los cebadores no ligados.
Desnaturalizar el producto de la diana,
después detectar y enumerar la señal FRET.



Figura 150

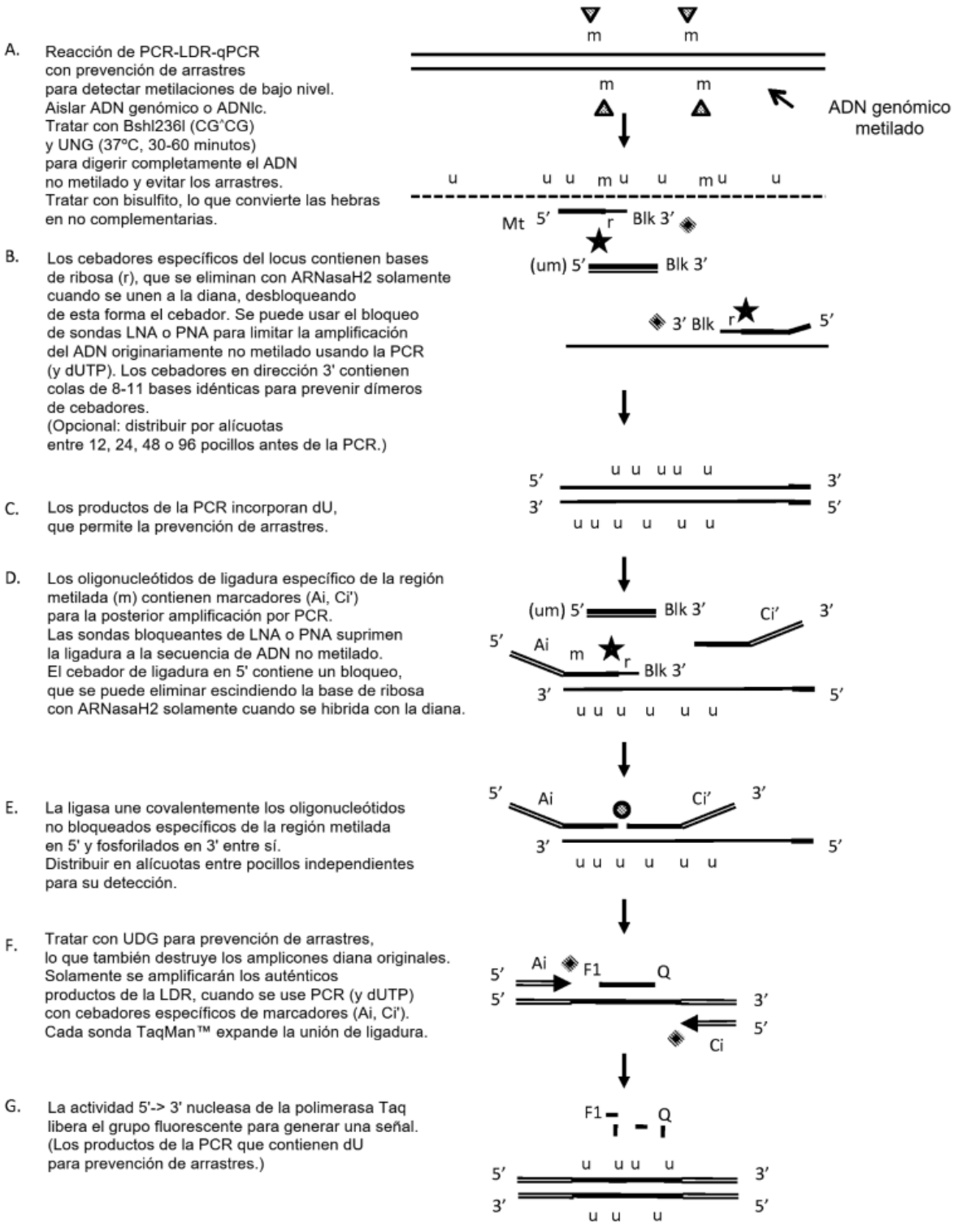

A.
Reacción de PCR-LDR-qPCR
con prevención de arrastres
para detectar metilaciones de bajo nivel.
Aislar ADN genómico o ADNlc.
Tratar con BshI236I (CG^CG)
y UNG (37°C, 30-60 minutos)
para digerir completamente el ADN
no metilado y evitar los arrastres.
Tratar con bisulfito, lo que convierte las hebras
en no complementarias.
ADN genómico metilado
B.
Los cebadores específicos del locus contienen bases
de ribosa (r), que se eliminan con ARNasaH2 solamente
cuando se unen a la diana, desbloqueando
de esta forma el cebador. Se puede usar el bloqueo
de sondas LNA o PNA para limitar la amplificación
del ADN originariamente no metilado usando la PCR
(y dUTP). Los cebadores en dirección 3' contienen
colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros
de cebadores.
(Opcional: distribuir por alícuotas
entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)
C.
Los productos de la PCR incorporan dU,
que permite la prevención de arrastres.
D.
Los oligonucleótidos de ligadura específico de la región
metilada (m) contienen marcadores (Ai, Ci')
para la posterior amplificación por PCR.
Las sondas bloqueantes de LNA o PNA suprimen
la ligadura a la secuencia de ADN no metilado.
El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo,
que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa
con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana.
E.
La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos
no bloqueados específicos de la región metilada
en 5' y fosforilados en 3' entre sí.
Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes
para su detección.
F.
Tratar con UDG para prevención de arrastres,
lo que también destruye los amplicones diana originales.
Solamente se amplificarán los auténticos
productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP)
con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci').
Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.
G.
La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq
libera el grupo fluorescente para generar una señal.
(Los productos de la PCR que contienen dU
para prevención de arrastres.)
m
u
Mt
5′
3′
r
Blk
(um)
Ai
Ci′
Ci
F1
Q

Figura 151

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar metilaciones de bajo nivel. Aislar ADN genómico o ADNlc. Tratar con BshI236I (CG^CG) y UNG (37ºC, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres. Tratar con bisulfito, lo que convierte las hebras en no complementarias.

B. Los cebadores específicos del locus contienen bases de ribosa (r), que se eliminan con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana, desbloqueando de esta forma el cebador. Se puede usar el bloqueo de sondas LNA o PNA para limitar la amplificación del ADN originariamente no metilado usando la PCR (y dUTP). Los cebadores en dirección 3' contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la región metilada (m) contienen marcadores (Ai, Bi', Ci') para la posterior amplificación por PCR. Las sondas bloqueantes de LNA o PNA suprimen la ligadura a la secuencia de ADN no metilado. El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana.

E. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos no bloqueados específicos de la región metilada en 5' y fosforilados en 3' entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

F. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se usa PCR (y dUTP) con cebadores específicos de Unitaq (F1-Bi-Q-Ai, Ci).

G. Productos de ADN bicatenarios de la PCR; el bloqueante de polimerasa detiene la extensión de la hebra inferior.

H. Tras la etapa de desnaturalización, a medida que disminuye la temperatura, se forma una horquilla entre Bi y Bi'. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq extiende el cebador Ci y libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

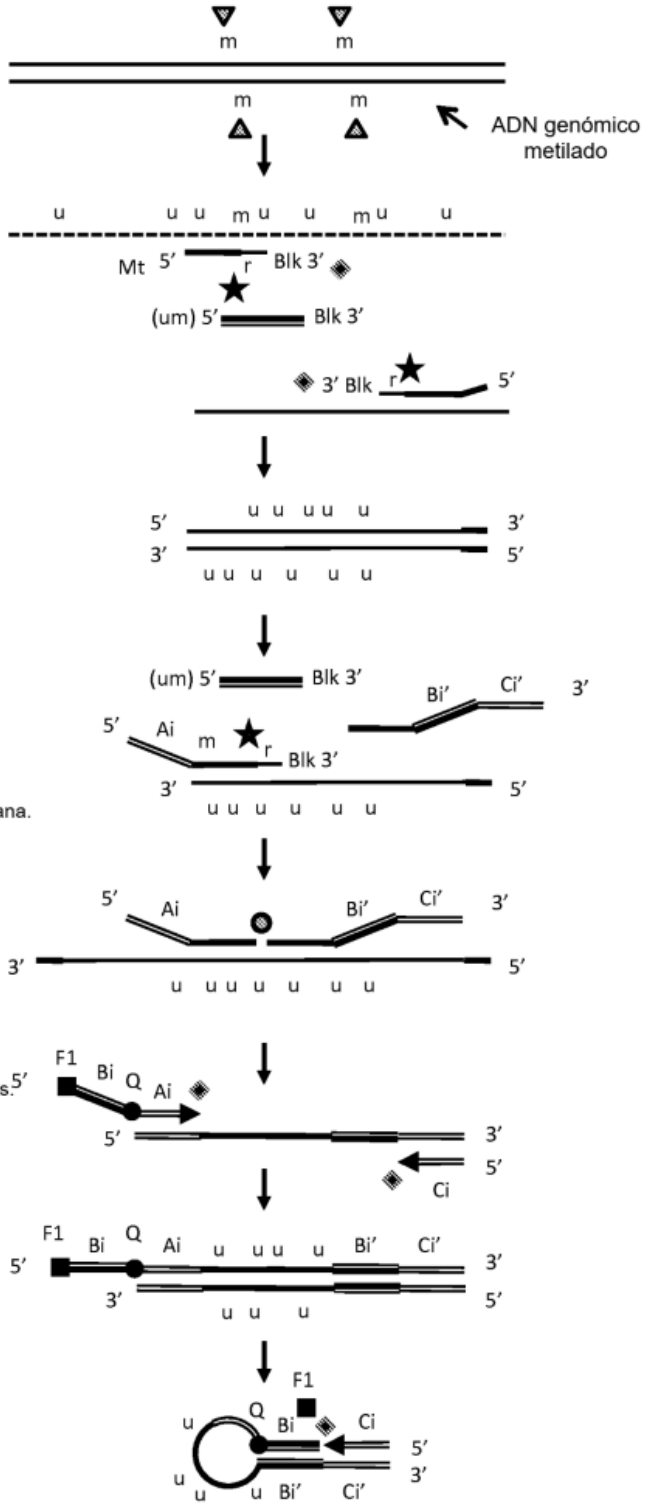


Figura 152

A. Reacción de PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar metilaciones de bajo nivel. Aislar ADN genómico o ADNlc. Tratar con BshI236I (CG^CG) y UNG (37°C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres. Tratar con bisulfito, lo que convierte las hebras en no complementarias.

B. Los cebadores específicos del locus contienen bases de ribosa (r), que se eliminan con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana, desbloqueando de esta forma el cebador. Se puede usar el bloqueo de sondas LNA o PNA para limitar la amplificación del ADN originariamente no metilado usando la PCR (y dUTP). Los cebadores universales en dirección 3' contienen colas universales para permitir la amplificación universal del cebador para agregar una biotina en 5'. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido.

D. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de la región metilada (m) contienen colas para la posterior amplificación por FRET. Las sondas bloqueantes de LNA o PNA suprimen la ligadura a la secuencia de ADN no metilado. El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana.

E. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos no bloqueados en 5' y fosforilado en 3'entre sí.

F. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET

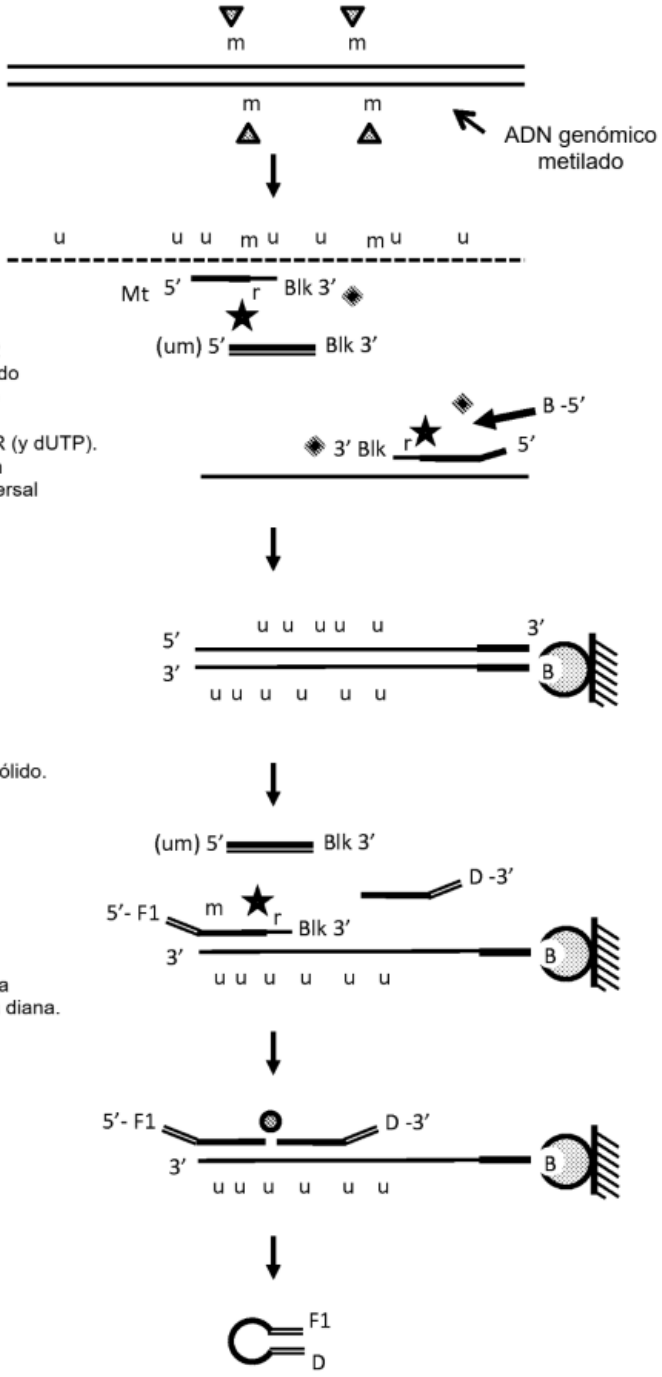


Figura 153

A. Reacción de PCR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones de bajo nivel. Aislar ADN genómico o ADNlc.

B. Tratar con UDG para prevención de arrastres. Los cebadores específicos del locus en dirección 5' también contienen secuencias complementarias de las secuencia Wt superior, que se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana. Amplificar las regiones que contienen mutaciones usando la PCR (y dUTP). Los cebadores universales en dirección 3' contienen colas con 8-11 bases idénticas para evitar los dímeros de cebadores. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. (Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres.)

D. En detalle: la PCR se realiza con una polimerasa que carece de actividad nucleasa 5', nucleasa 3' y de desplazamiento de cadena.
(i) La desnaturalización de la hebra inferior Wt da como resultado una horquilla con emparejamiento perfecto en 3', que se extiende mediante polimerasa.
(ii) La desnaturalización de la hebra inferior Mt da como resultado una horquilla con emparejamientos incorrectos en el extremo 3', que generalmente no se extiende con la polimerasa.
(iii) La etapa de desnaturalización de la hebra superior da como resultado una horquilla en el lado 5', que se desnaturaliza durante la etapa extendida de la PCR (72ºC).

E. (i) Tras la extensión de la horquilla en el ADN natural, la secuencia en horquilla extendida no se desnaturaliza a 72ºC y evita que el cebador en 5' genere una hebra superior de longitud completa.
(ii) La secuencia en horquilla del ADN mutante no se extiende, y por tanto se desnaturaliza a 72ºC, lo que permite que el cebador en 5' genere una hebra superior de longitud completa.
(iii) Análogamente, el producto de la hebra superior se desnaturaliza a 72ºC, lo que permite que la polimerasa genere una hebra inferior de longitud completa. La diferencia en la preferencia por la extensión de la horquilla de los cebadores en 5' con el molde (i) natural y (ii) mutante da cono resultado la amplificación preferente del ADN mutante

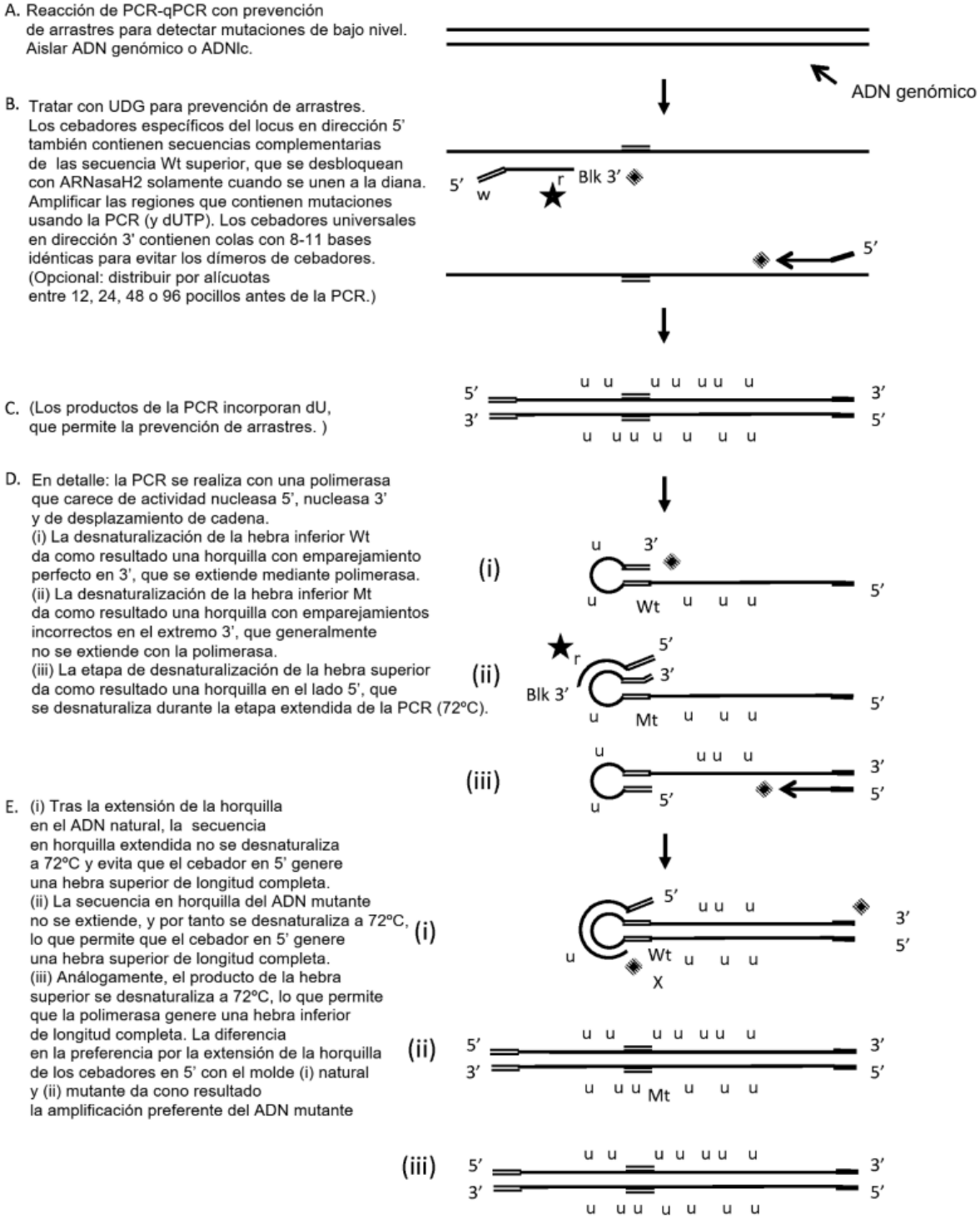


Figura 154

F. (Los productos de la PCR incorporan dU, lo que permite la prevención de arrastres. Opcional: la secuencia natural de un extremo se puede eliminar con una endonucleasa de restricción.)

G. Ligadura específica de la mutación los oligonucleótidos (Mt) contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR, mientras que (opcional) la sonda natural (Wt) no. El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana. (Opcional: la secuencia natural del extremo 3' se puede eliminar con una exonucleasa III.)

H. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos no bloqueados en 5' y fosforilado en 3'entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección

I. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci'). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura,

J. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

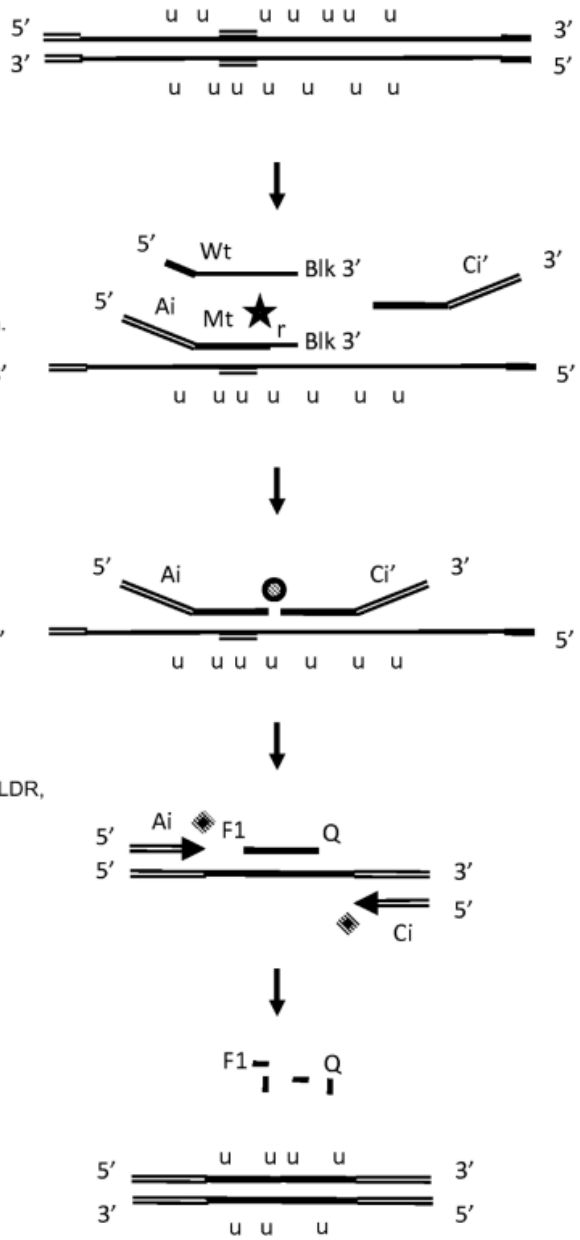


Figura 154 (cont.)

A. Reacción de Bucle-PCR-qPCR con prevención de arrastres para detectar mutaciones de bajo nivel. Aislar ADN genómico o ADNlc

B. Tratar con UDG para prevención de arrastres. Los cebadores específicos de locus en dirección 5' complementarias de la secuencia Wt de la hebra superior, y se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana. Amplificar las regiones que contienen mutaciones usando PCR (y dUTP). Los cebadores universales en dirección 3' contienen colas universales para permitir la amplificación universal del cebador para agregar una biotina en 5'. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

D. En detalle: Se llevó a cabo la PCR con una polimerasa que carecía de nucleasa en 5', 3' nucleasa, y actividad de desplazamiento de cadena, (i) La desnaturalización de la hebra inferior Wt da como resultado una horquilla con un emparejamiento perfecto en el extremo 3', que se extiende mediante polimerasa, (i) La desnaturalización de la hebra inferior Mt da como resultado una horquilla con un emparejamiento incorrecto el extremo 3', que generalmente no se extiende mediante polimerasa, (iii) La desnaturalización de la hebra superior da como resultado una horquilla en el lado 5', que se desnaturaliza durante la etapa de extensión de la PCR (72ºC).

E. (i) Después de la extensión del bucle en horquilla del ADN natural, la secuencia en horquilla extendida no se desnaturaliza a 72ºC y evita que el cebador en dirección 5' genere una hebra superior de longitud completa, (ii) La secuencia de horquilla del ADN mutante no se extiende y, por tanto, se desnaturaliza a 72ºC, lo que permite que el cebador en dirección 3' genere la hebra superior de longitud completa, (iii) Análogamente, el producto de la hebra superior se desnaturaliza a 72ºC, permitiendo que la polimerasa genere una hebra inferior de longitud completa. La diferencia en la preferencia de extensión de la horquilla de los cebadores en dirección 5' con (i) moldes naturales y (ii) moldes mutantes da como resultado la amplificación preferente del ADN mutante.

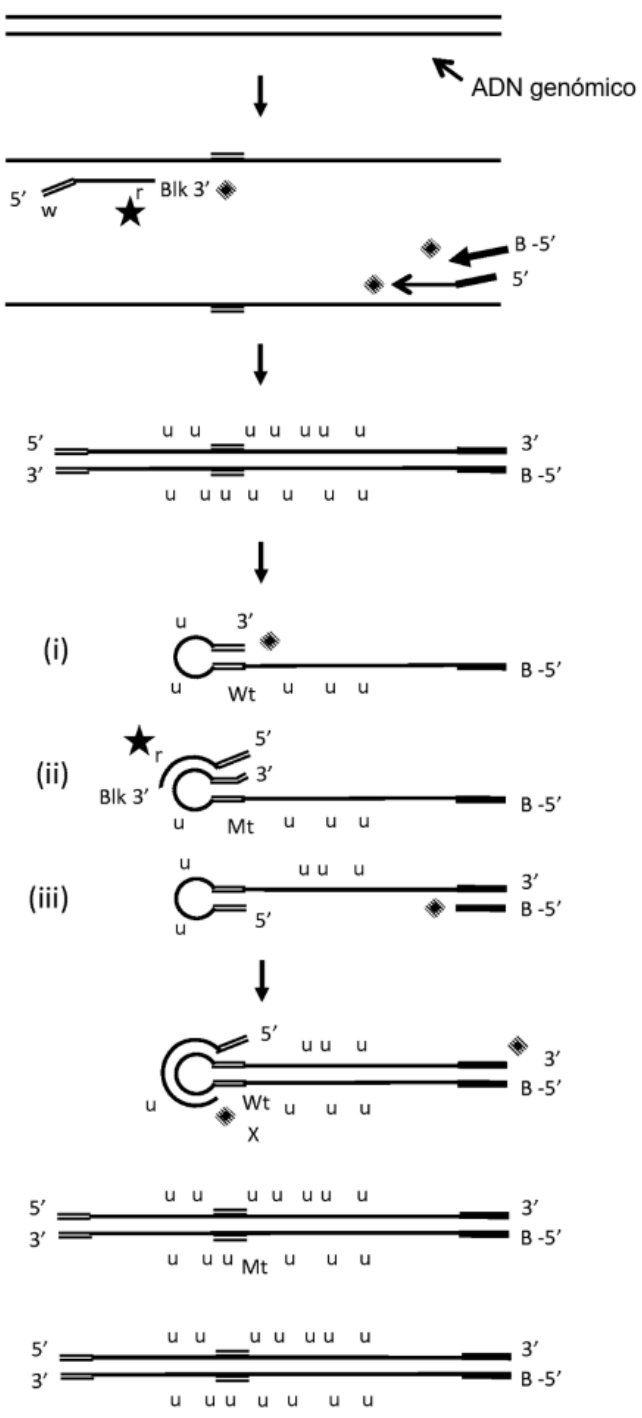


Figura 155

F. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado sobre un soporte sólido. Opcional: la secuencia natural de un extremo se puede eliminar con una endonucleasa de restricción.

G. Los oligonucleótidos con ligadura específica de la mutación (Mt) contienen colas para la posterior detección FRET, mientras que (opcional) la sonda atural (Wt) no. El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana. (Opcional: la secuencia natural del extremo 3' se puede eliminar con una exonucleasa III.)

H. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos no bloqueados en 5' y fosforilado en 3'entre sí.

I. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar y enumerar la señal FRET.

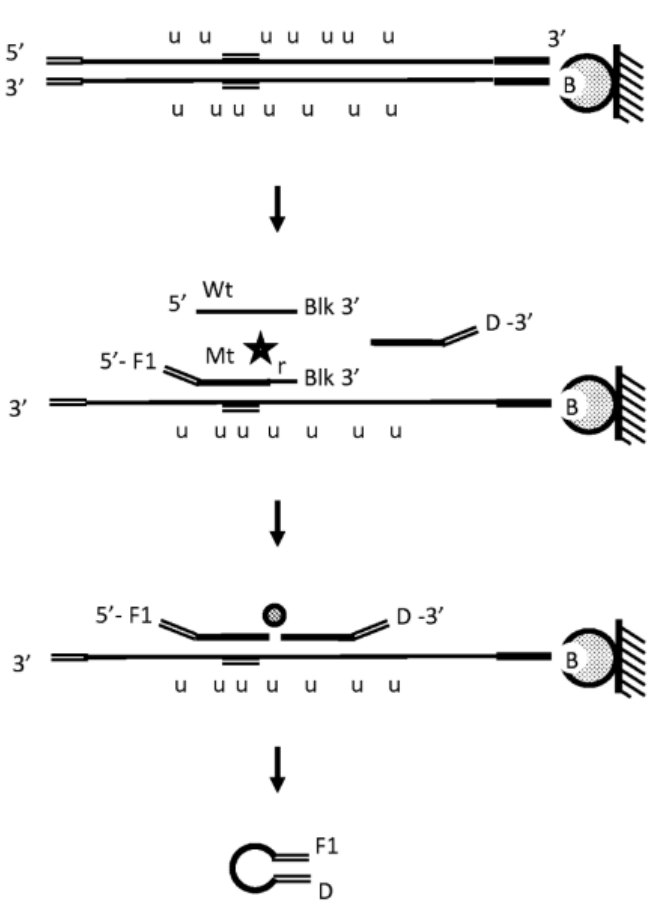


Figura 155 (Cont.)

A. Reacción de Bucle-PCR-LDR-qPCR con prevención de arrastres para detectar metilaciones de bajo nivel. Aislar ADN genómico o ADNlc. Tratar con BshI236I (CG^CG) y UDG (37ºC, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres. Tratar con bisulfito, lo que convierte las hebras en no complementarias.

B. Los cebadores específicos de locus en dirección 5' también contienen secuencias en 5' complementarias de la secuencia no metilada tratada con bisulfito de la hebra superior, y se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana. Amplificar las regiones que contienen metilación usando PCR (y dUTP).
Los cebadores en dirección 3' contienen colas de 8-11 bases idénticas para prevenir dímeros de cebadores.
(Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

D. En detalle: Se llevó a cabo la PCR con una polimerasa que carecía de nucleasa en 5', 3' nucleasa, y actividad de desplazamiento de cadena, (i) La desnaturalización de la hebra inferior no metilada da como resultado una horquilla con un emparejamiento perfecto en el extremo 3', que se extiende mediante polimerasa.
(ii) La desnaturalización de la hebra inferior metilada da como resultado una horquilla con emparejamientos incorrectos, que generalmente no se extiende mediante polimerasa, (iii) La desnaturalización de la hebra superior da como resultado una horquilla en el lado 5', que se desnaturaliza durante la etapa de extensión de la PCR (72ºC).

E. (i) Después de la extensión del bucle en horquilla del ADN no metilado, la secuencia en horquilla extendida no se desnaturaliza a 72ºC y evita que el cebador en dirección 5' genere una hebra superior de longitud completa,
(ii) La secuencia de horquilla del ADN metilado no se extiende y, por tanto, se desnaturaliza a 72ºC, lo que permite que el cebador en dirección 3' genere la hebra superior de longitud completa.
(iii) Análogamente, el producto de la hebra superior se desnaturaliza a 72ºC, permitiendo que la polimerasa genere una hebra inferior de longitud completa. La diferencia en la preferencia de extensión de la horquilla de los cebadores en dirección 5' con (i) moldes no metilados y (ii) moldes metilados da como resultado la amplificación
preferente del ADN metilado.

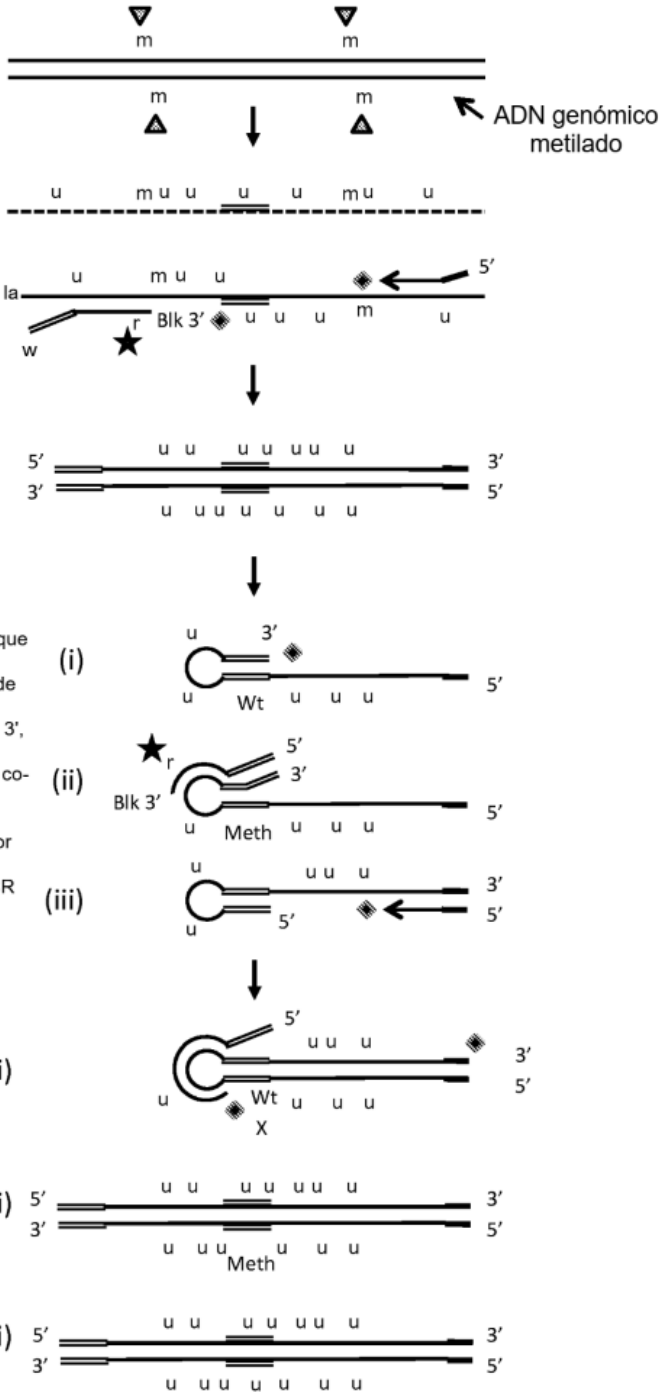


Figura 156

F. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Opcional: la secuencia de un extremo complementario de una región no metilada se puede eliminar con una endonucleasa de restricción.

G. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de metilación (Met) contienen marcadores (Ai, Ci') para la posterior amplificación por PCR, mientras que (opcional) la sonda no metilada (Umet) no. El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana. (Opcional: la secuencia natural del extremo 3' se puede eliminar con una exonucleasa III.)

H. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos no bloqueados en 5' y fosforilado en 3'entre sí. Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección.

I. Tratar con UDG para prevención de arrastres, lo que también destruye los amplicones diana originales. Solamente se amplificarán los auténticos productos de la LDR, cuando se use PCR (y dUTP) con cebadores específicos de marcadores (Ai, Ci'). Cada sonda TaqMan™ expande la unión de ligadura.

J. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

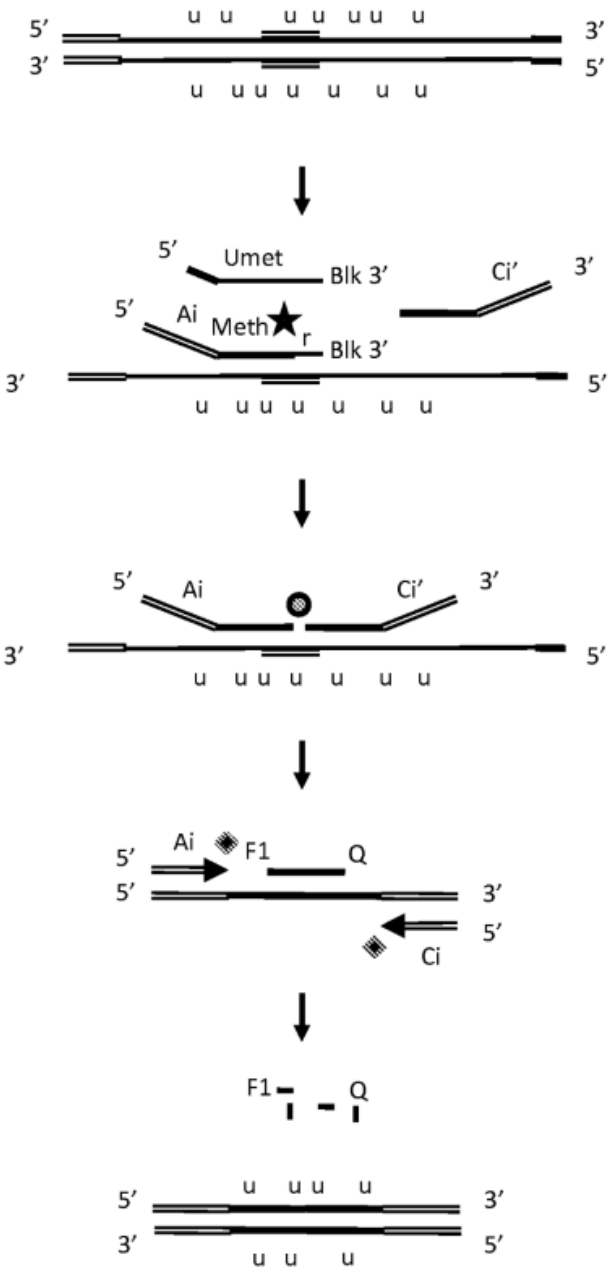


Figura 156 (Cont.)

A. Reacción de Bucle-PCR-qLDR con prevención de arrastres para detectar metilaciones de bajo nivel. Aislar ADN genómico o ADNlc. Tratar con BshI236I (CG^CG) y UDG (37ºC, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres. Tratar con bisulfito, lo que convierte las hebras en no complementarias.

B. Los cebadores específicos de locus en dirección 5' también contienen secuencias en 5' complementarias de la secuencia no metilada tratada con bisulfito de la hebra inferior, y se desbloquean con ARNasaH2 solamente cuando se unen a la diana. Amplificar las regiones que contienen metilación usando PCR (y dUTP). Los cebadores universales en dirección 3' contienen colas universales para permitir la amplificación universal del cebador para agregar una biotina en 5'. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)

C. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)

D. En detalle: Se llevó a cabo la PCR con una polimerasa que carecía de nucleasa en 5', 3' nucleasa, y actividad de desplazamiento de cadena, (i) La desnaturalización de la hebra inferior no metilada da como resultado una horquilla con un emparejamiento perfecto en el extremo 3', que se extiende mediante polimerasa, (ii) La desnaturalización de la hebra inferior metilada da como resultado una horquilla con emparejamientos incorrectos, que generalmente no se extiende mediante polimerasa, (iii) La desnaturalización de la hebra superior da como resultado una horquilla en el lado 5', que se desnaturaliza durante la etapa de extensión de la PCR (72ºC).

E. (i) Después de la extensión del bucle en horquilla del ADN no metilado, la secuencia en horquilla extendida no se desnaturaliza a 72ºC y evita que el cebador en dirección 5' genere una hebra superior de longitud completa, (ii) La secuencia de horquilla del ADN metilado no se extiende y, por tanto, se desnaturaliza a 72ºC, lo que permite que el cebador en dirección 3' genere la hebra superior de longitud completa, (iii) Análogamente, el producto de la hebra superior se desnaturaliza a 72ºC, permitiendo que la polimerasa genere una hebra inferior de longitud completa. La diferencia en la preferencia de extensión de la horquilla de los cebadores en dirección 5' con (i) moldes no metilados y (ii) moldes metilados da como resultado la amplificación preferente del ADN metilado.

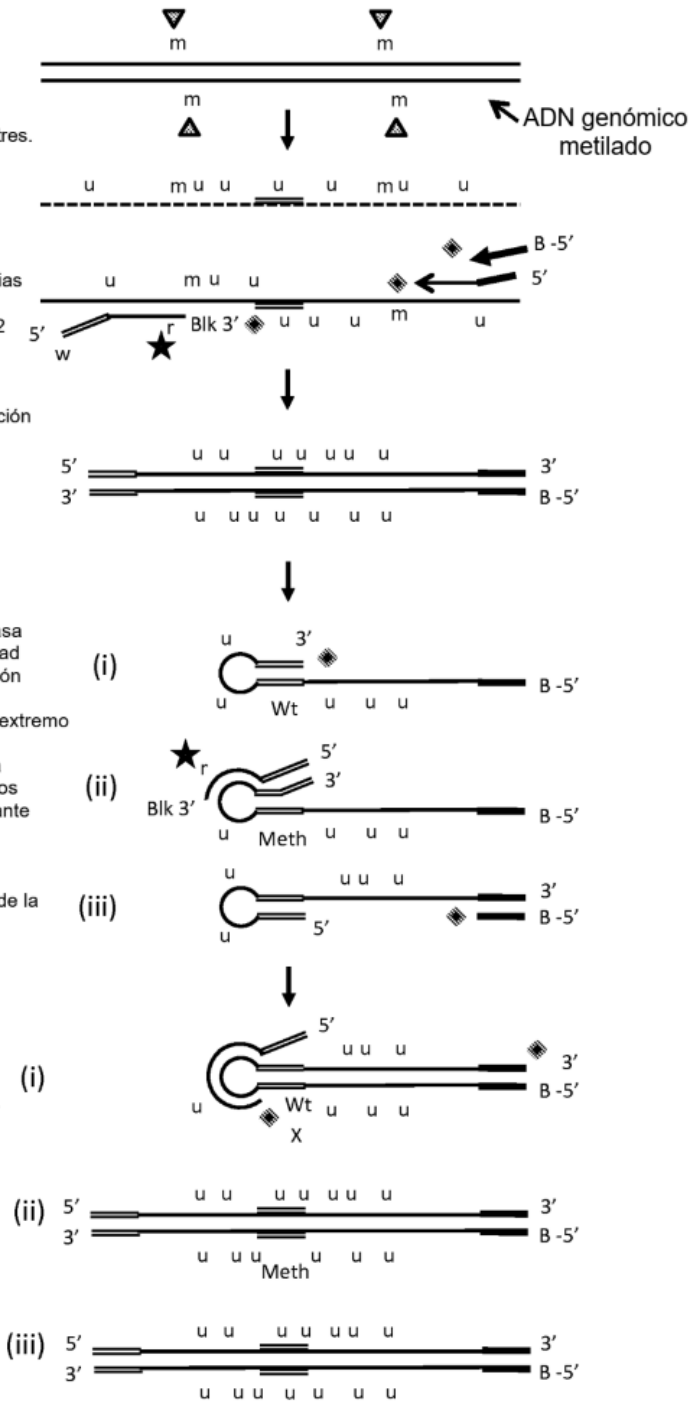


Figura 157

F. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. Separar el producto de los cebadores y capturar el producto biotinilado en un soporte sólido. Opcional: la secuencia de un extremo complementario de una región no metilada se puede eliminar con una endonucleasa de restricción.

G. Los oligonucleótidos de ligadura específicos de metilación (Met) contienen colas para la posterior detección por FRET, mientras que (opcional) la sonda no metilada (Umet) no. El cebador de ligadura en 5' contiene un bloqueo, que se puede eliminar escindiendo la base de ribosa con ARNasaH2 solamente cuando se hibrida con la diana. (Opcional: la secuencia natural del extremo 3' se puede eliminar con una exonucleasa III.)

H. La ligasa une covalentemente los oligonucleótidos no bloqueados en 5' y fosforilado en 3'entre sí.

I. Eliminar por lavado los cebadores no ligados. Desnaturalizar el producto de la diana, después detectar, y enumerar la señal FRET.

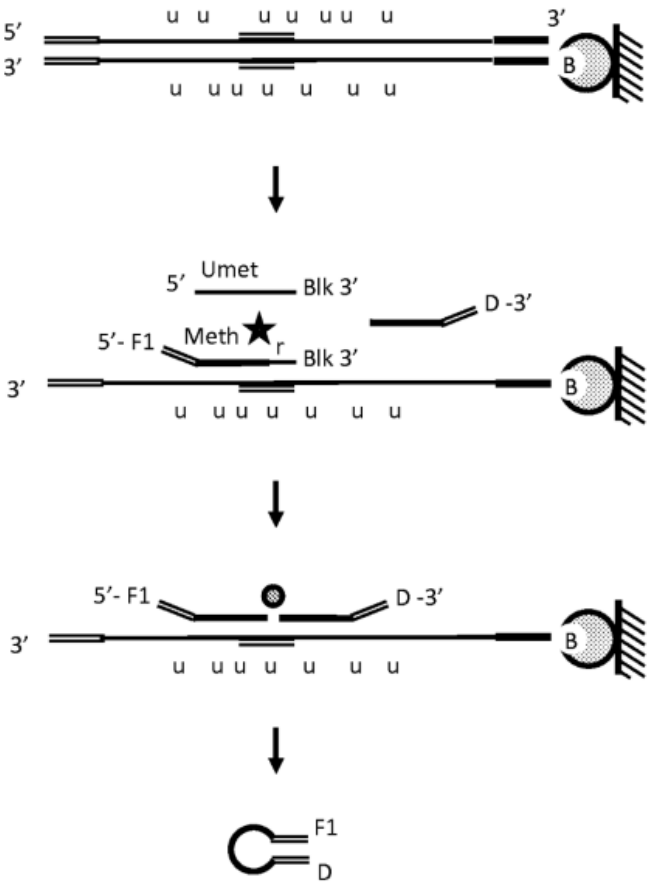


Figura 157 (Cont.)

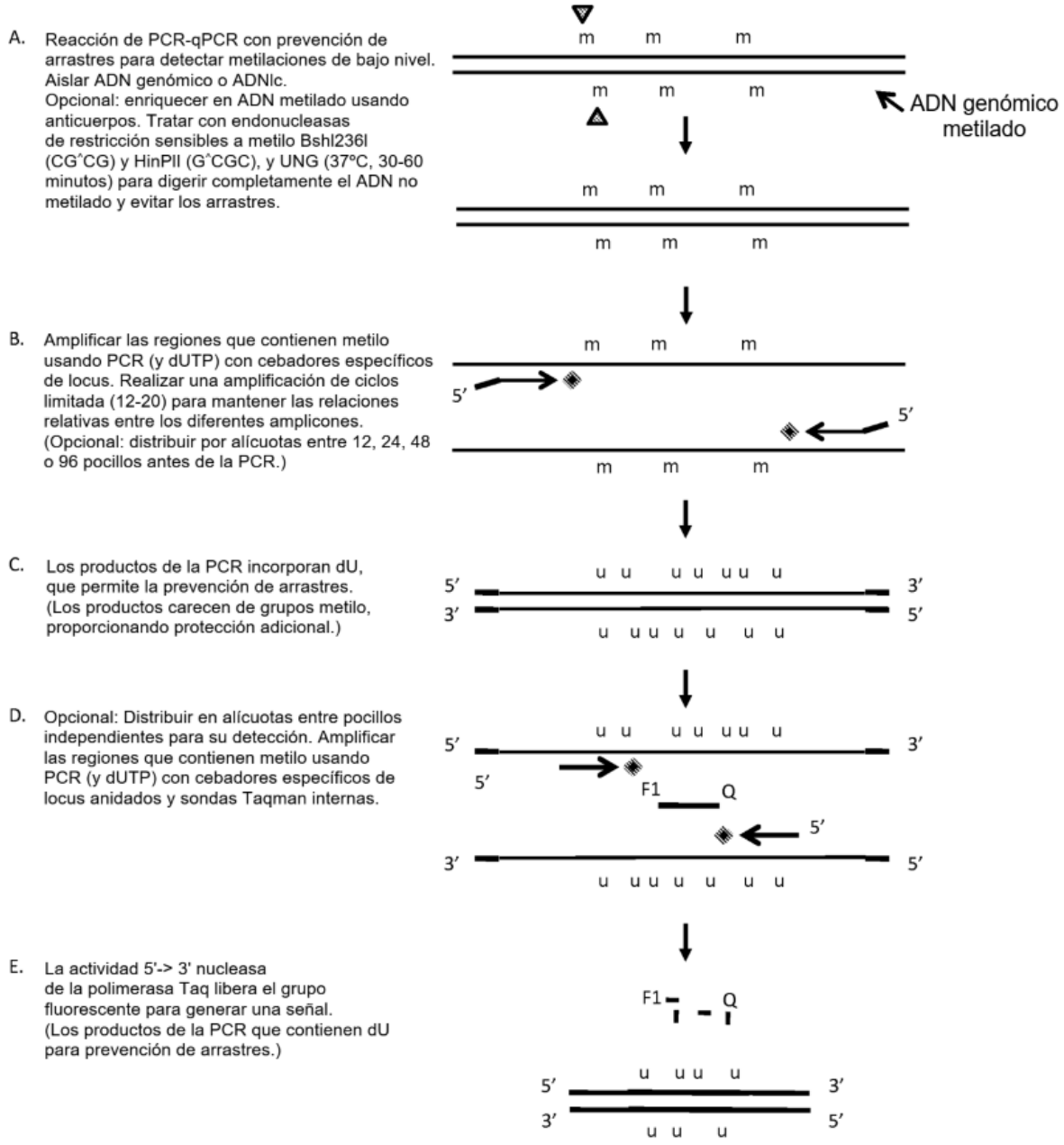

A. Reacción de PCR-qPCR con prevención de arrastres para detectar metilaciones de bajo nivel. Aislar ADN genómico o ADNlc. Opcional: enriquecer en ADN metilado usando anticuerpos. Tratar con endonucleasas de restricción sensibles a metilo BshI236I (CG^CG) y HinPII (G^CGC), y UNG (37°C, 30-60 minutos) para digerir completamente el ADN no metilado y evitar los arrastres.
ADN genómico metilado
B. Amplificar las regiones que contienen metilo usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus. Realizar una amplificación de ciclos limitada (12-20) para mantener las relaciones relativas entre los diferentes amplicones. (Opcional: distribuir por alícuotas entre 12, 24, 48 o 96 pocillos antes de la PCR.)
C. Los productos de la PCR incorporan dU, que permite la prevención de arrastres. (Los productos carecen de grupos metilo, proporcionando protección adicional.)
D. Opcional: Distribuir en alícuotas entre pocillos independientes para su detección. Amplificar las regiones que contienen metilo usando PCR (y dUTP) con cebadores específicos de locus anidados y sondas Taqman internas.
E. La actividad 5'-> 3' nucleasa de la polimerasa Taq libera el grupo fluorescente para generar una señal. (Los productos de la PCR que contienen dU para prevención de arrastres.)
F1
Q

Figura 158

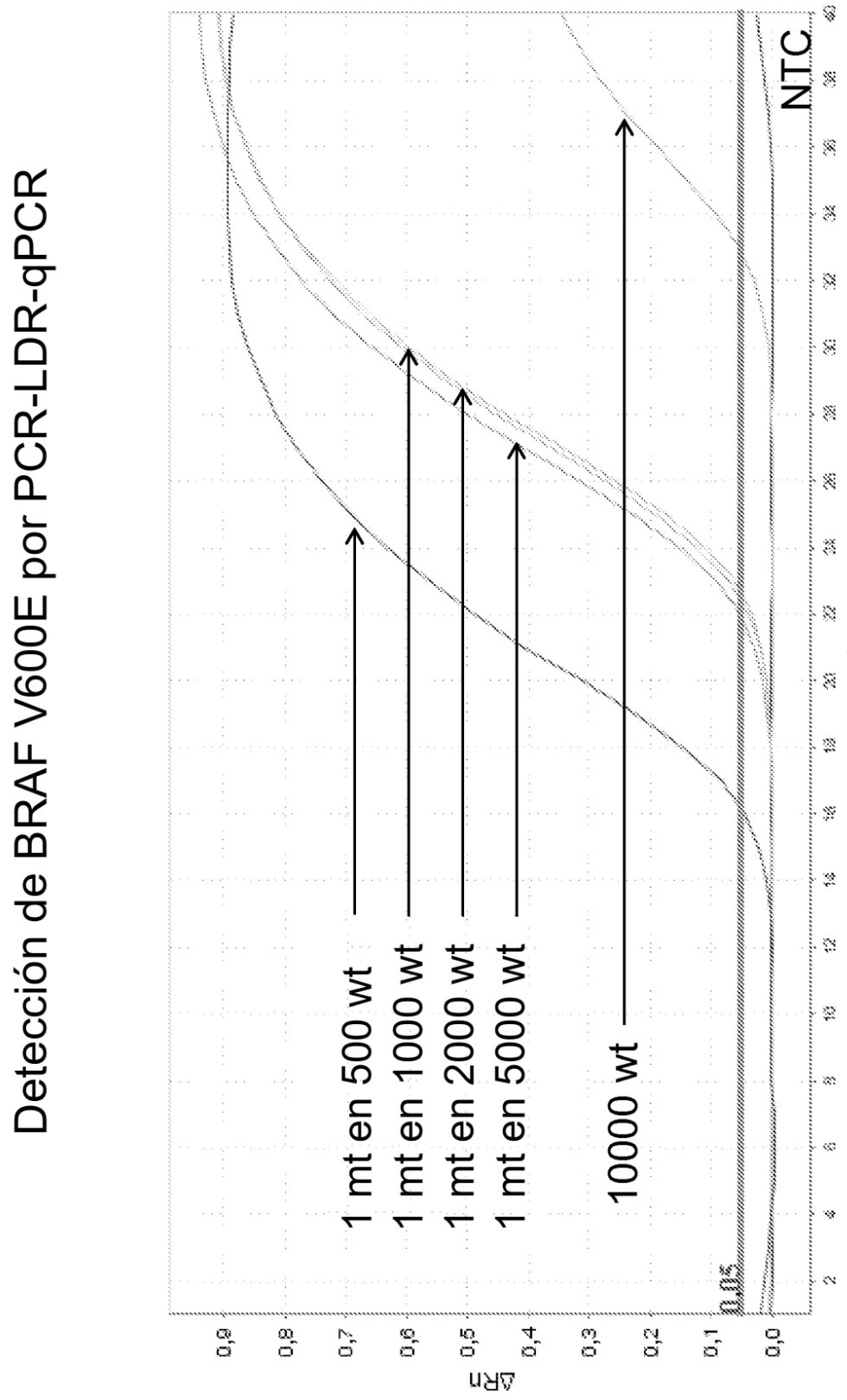

Detección de BRAF V600E por PCR-LDR-qPCR
ΔRn
Ciclo
1 mt en 500 wt
1 mt en 1000 wt
1 mt en 2000 wt
1 mt en 5000 wt
10000 wt
NTC
umbral

Figura 159

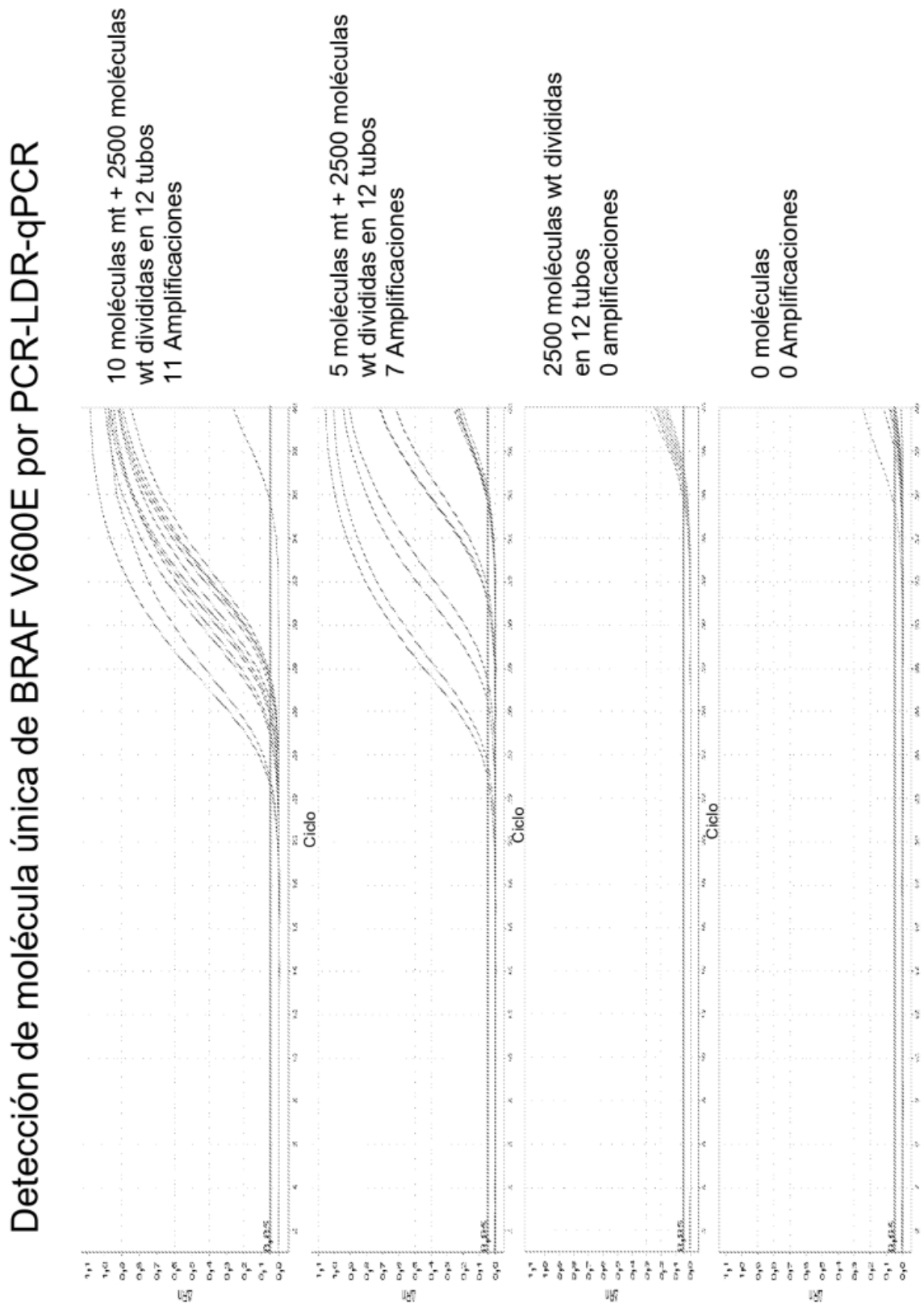

Detección de molécula única de BRAF V600E por PCR-LDR-qPCR
10 moléculas mt + 2500 moléculas wt divididas en 12 tubos
11 Amplificaciones
5 moléculas mt + 2500 moléculas wt divididas en 12 tubos
7 Amplificaciones
2500 moléculas wt divididas en 12 tubos
0 amplificaciones
0 moléculas
0 Amplificaciones
Ciclo
Ciclo
Ciclo
Ciclo

Figura 160

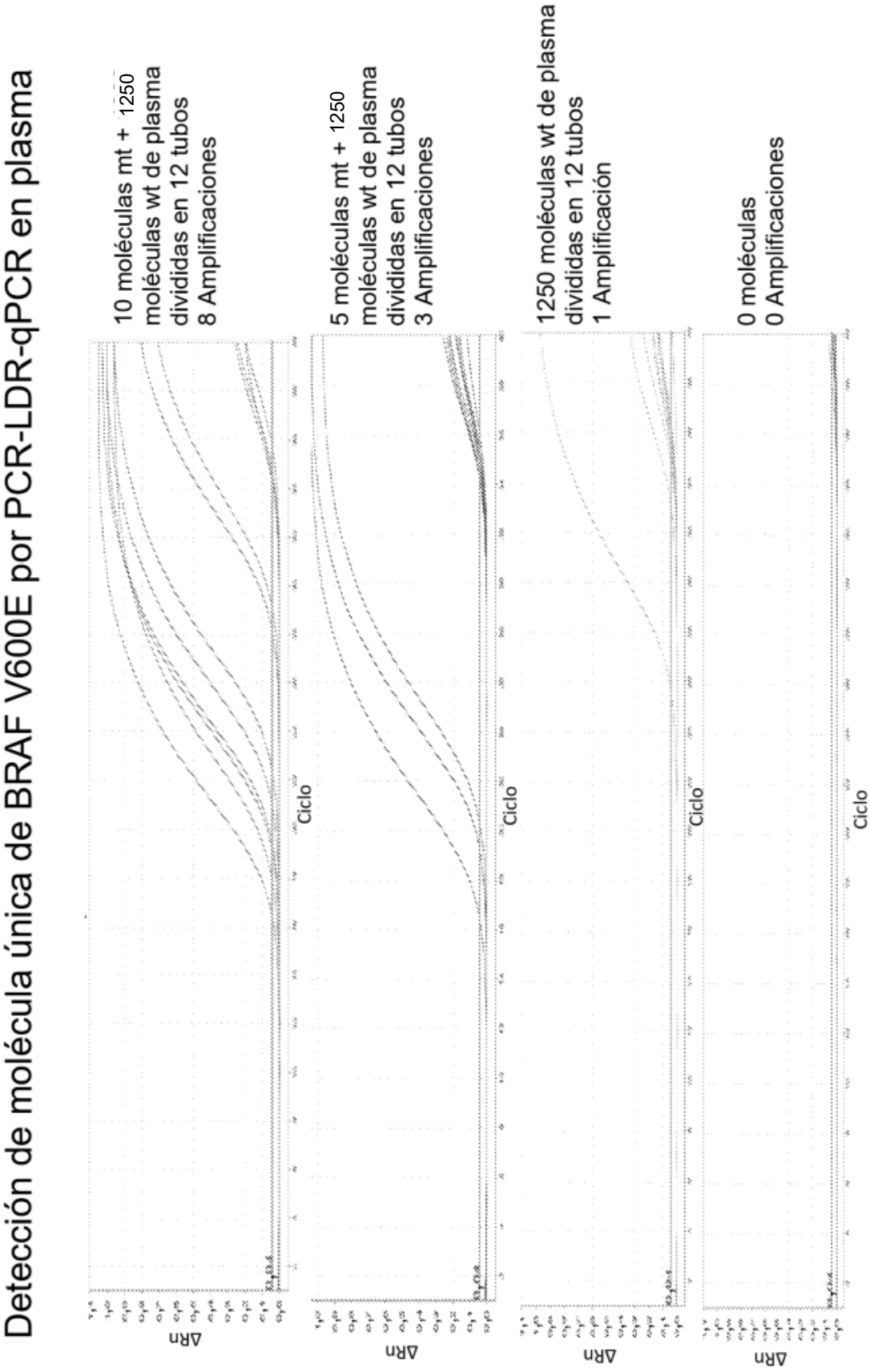

Detección de molécula única de BRAF V600E por PCR-LDR-qPCR en plasma
10 moléculas mt + 1250 moléculas wt de plasma divididas en 12 tubos
8 Amplificaciones
5 moléculas mt + 1250 moléculas wt de plasma divididas en 12 tubos
3 Amplificaciones
1250 moléculas wt de plasma divididas en 12 tubos
1 Amplificación
0 moléculas
0 Amplificaciones
ΔRn
Ciclo

Figura 161

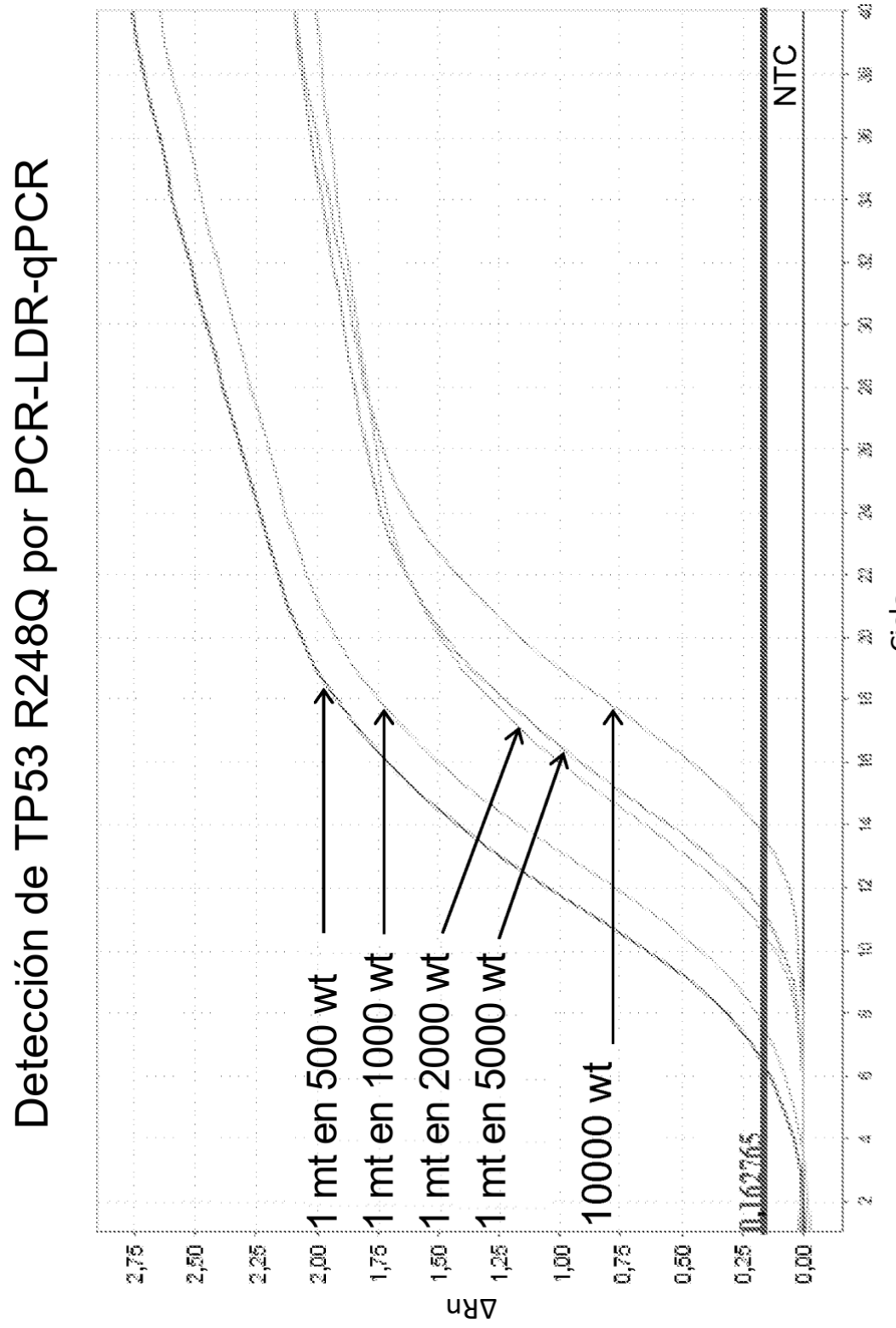

Detección de TP53 R248Q por PCR-LDR-qPCR
ΔRn
Ciclo
1 mt en 500 wt
1 mt en 1000 wt
1 mt en 2000 wt
1 mt en 5000 wt
10000 wt
NTC
0,1627765

Figura 162

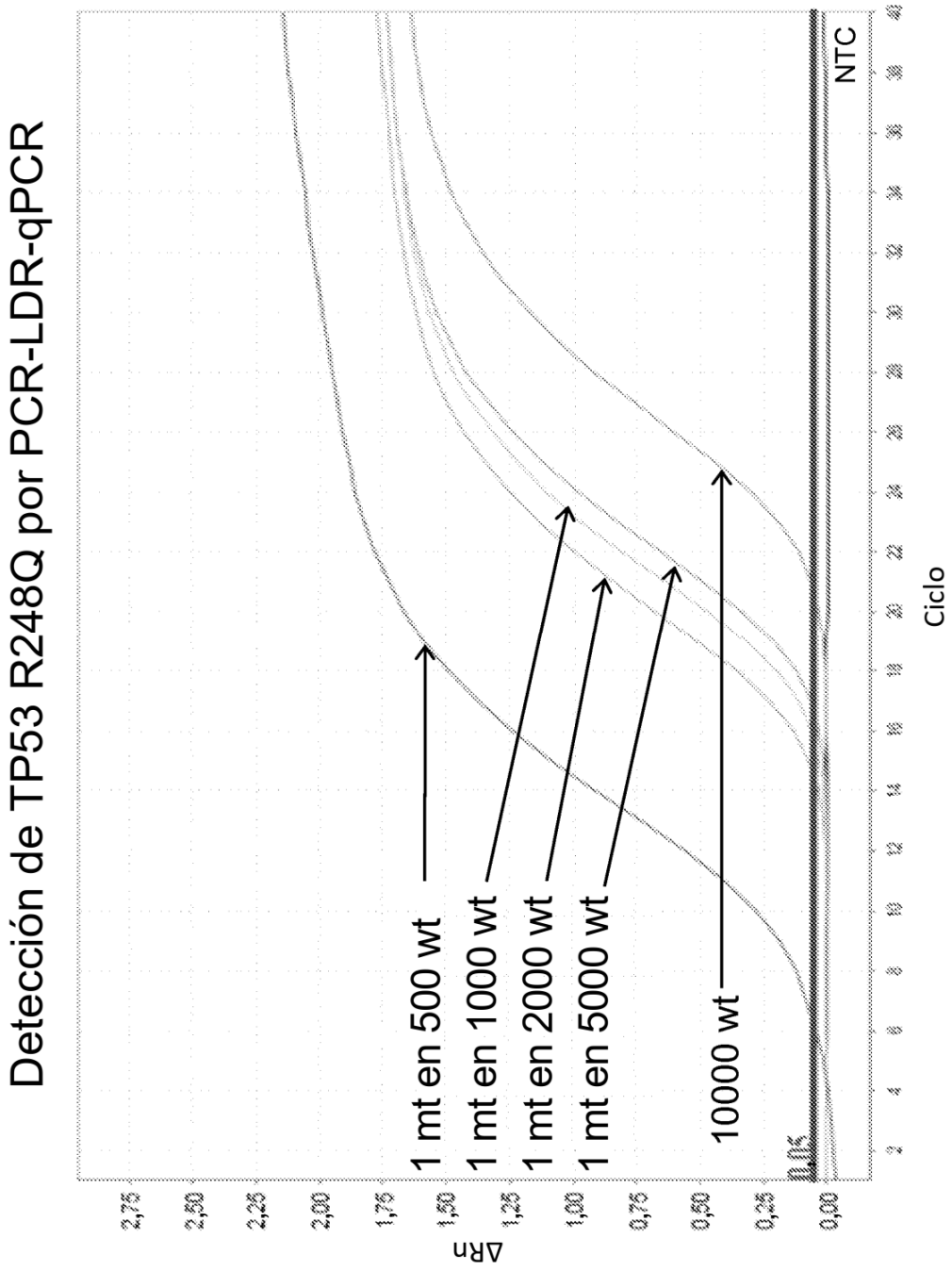

Detección de TP53 R248Q por PCR-LDR-qPCR
ΔRn
Ciclo
1 mt en 500 wt
1 mt en 1000 wt
1 mt en 2000 wt
1 mt en 5000 wt
10000 wt
NTC

Figura 163

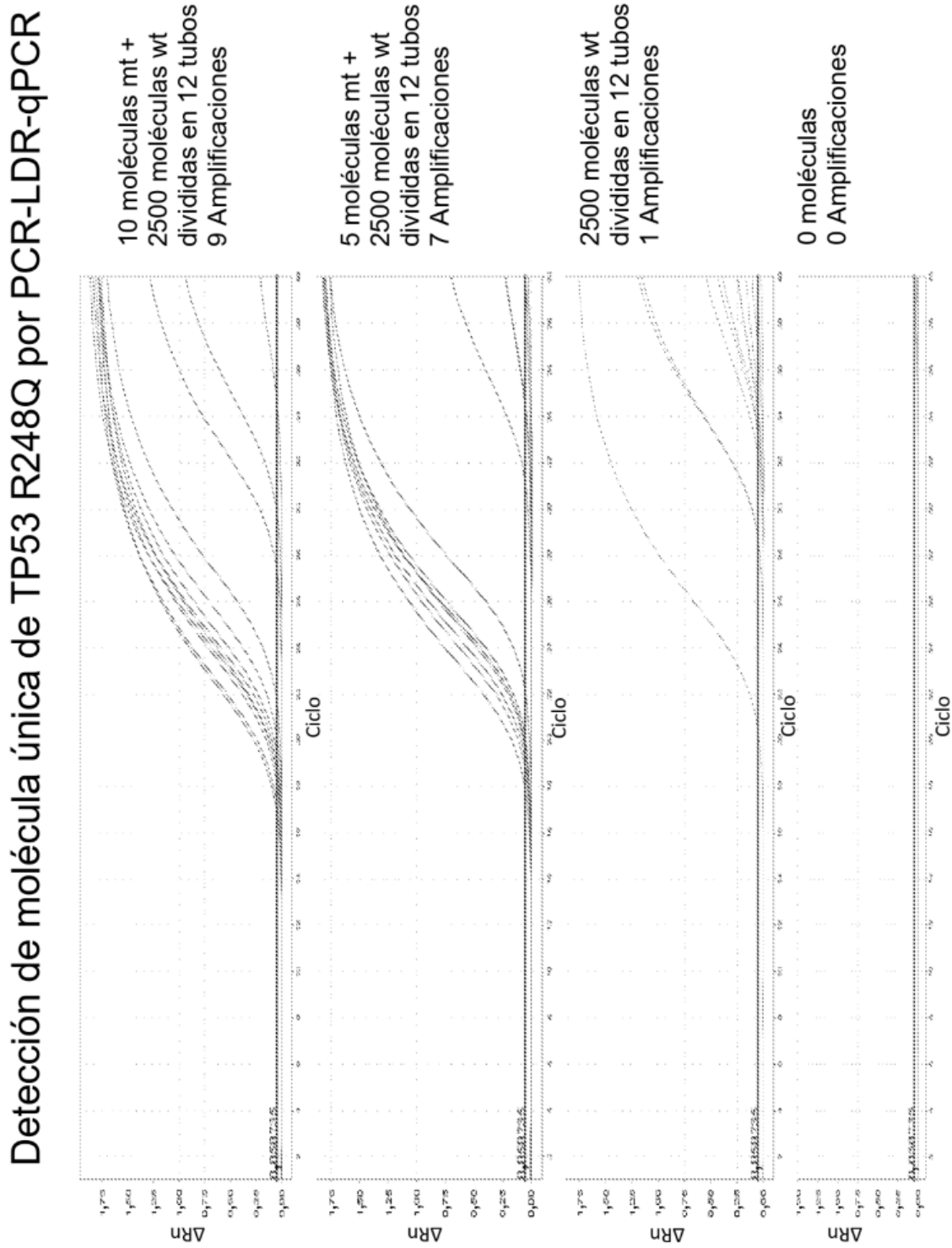

Detección de molécula única de TP53 R248Q por PCR-LDR-qPCR
10 moléculas mt +
2500 moléculas wt
divididas en 12 tubos
9 Amplificaciones
5 moléculas mt +
2500 moléculas wt
divididas en 12 tubos
7 Amplificaciones
2500 moléculas wt
divididas en 12 tubos
1 Amplificaciones
0 moléculas
0 Amplificaciones
ΔRn
Ciclo

Figura 164

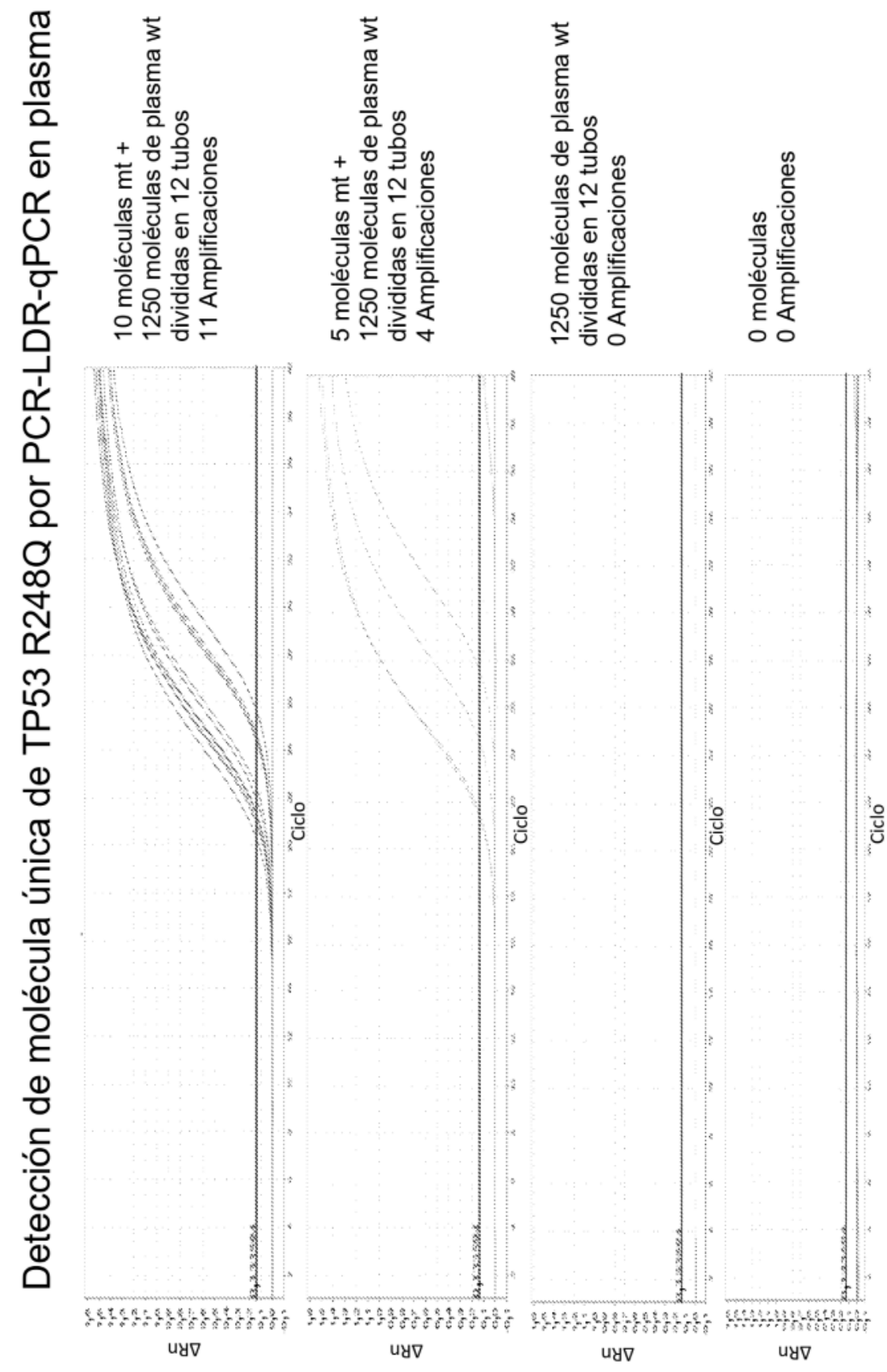

Detección de molécula única de TP53 R248Q por PCR-LDR-qPCR en plasma
10 moléculas mt +
1250 moléculas de plasma wt
divididas en 12 tubos
11 Amplificaciones
5 moléculas mt +
1250 moléculas de plasma wt
divididas en 12 tubos
4 Amplificaciones
1250 moléculas de plasma wt
divididas en 12 tubos
0 Amplificaciones
0 moléculas
0 Amplificaciones
ΔRn
Ciclo

Figura 165

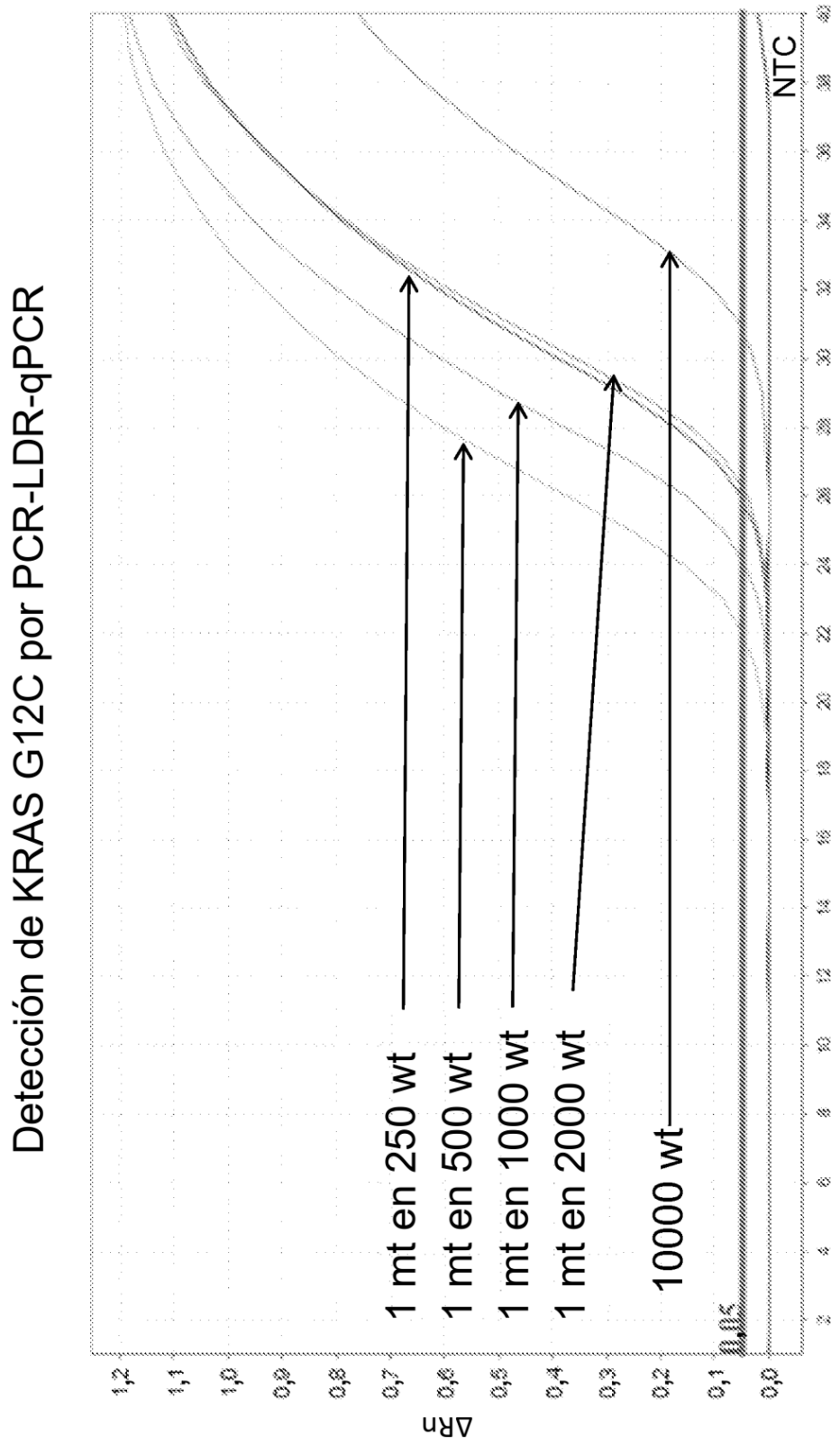

Detección de KRAS G12C por PCR-LDR-qPCR
ΔRn
Ciclo
1 mt en 250 wt
1 mt en 500 wt
1 mt en 1000 wt
1 mt en 2000 wt
10000 wt
NTC
0,05

Figura 166

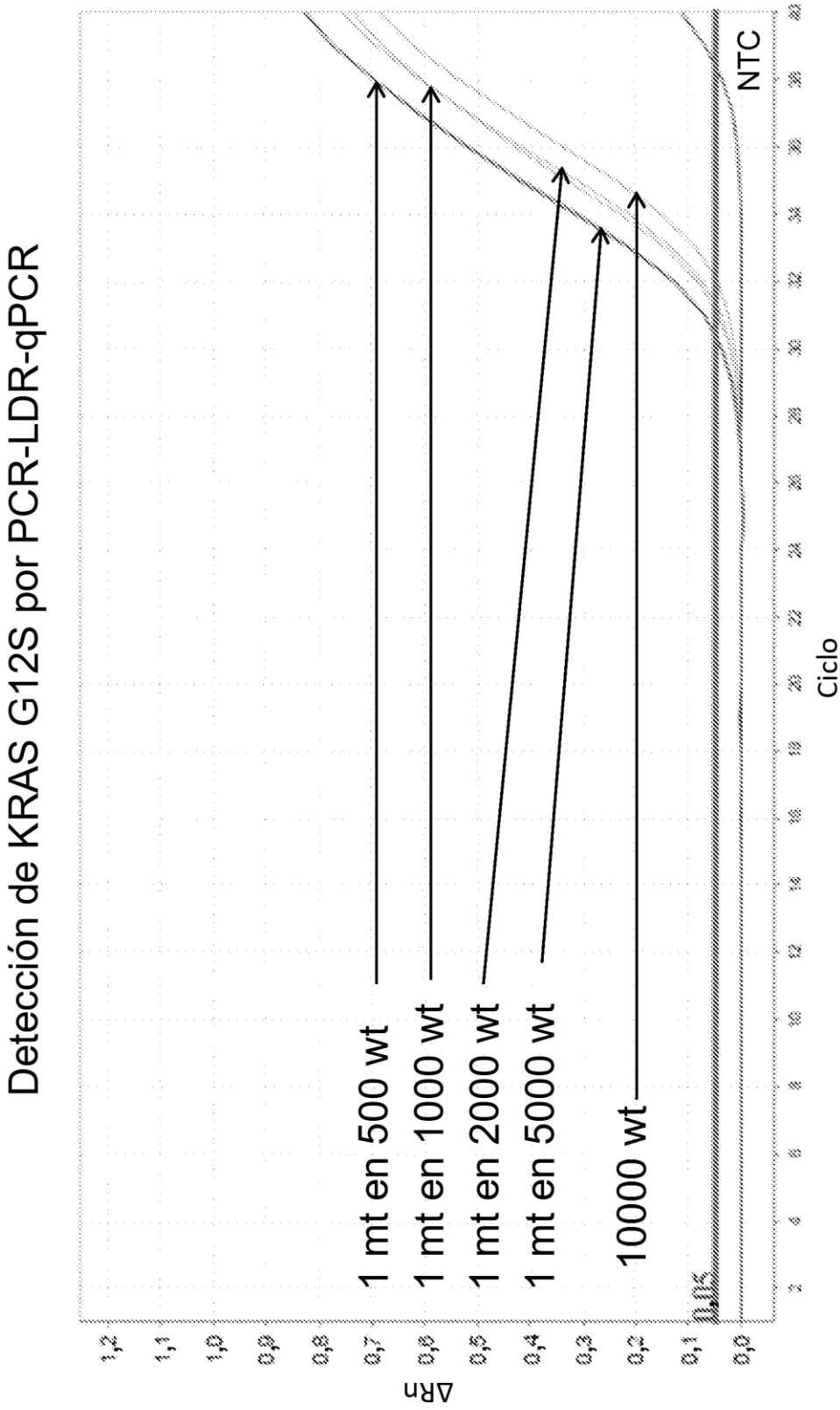

Detección de KRAS G12S por PCR-LDR-qPCR
ΔRn
Ciclo
1 mt en 500 wt
1 mt en 1000 wt
1 mt en 2000 wt
1 mt en 5000 wt
10000 wt
NTC
0,05

Figura 167

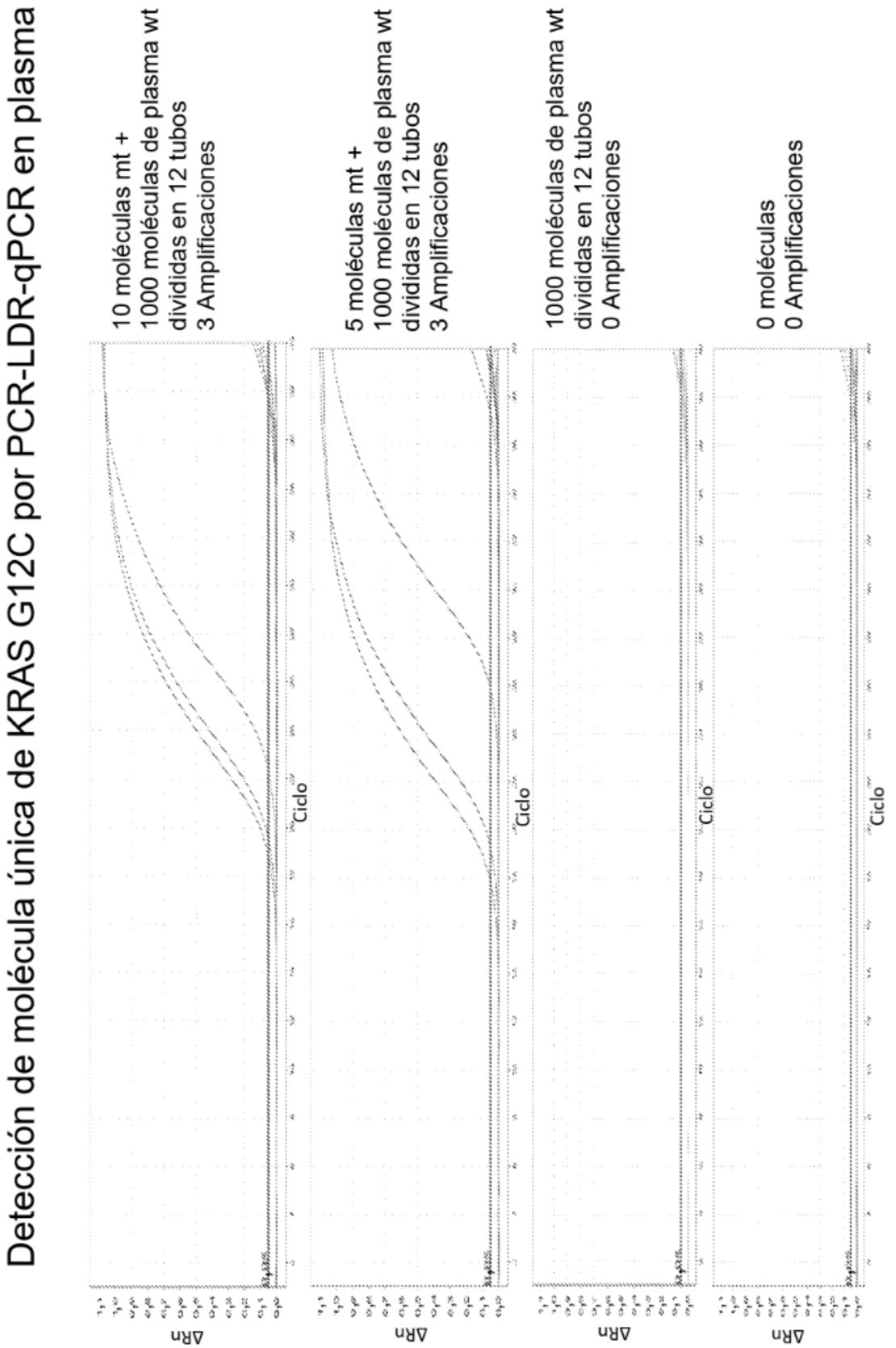

Detección de molécula única de KRAS G12C por PCR-LDR-qPCR en plasma
10 moléculas mt +
1000 moléculas de plasma wt
divididas en 12 tubos
3 Amplificaciones
5 moléculas mt +
1000 moléculas de plasma wt
divididas en 12 tubos
3 Amplificaciones
1000 moléculas de plasma wt
divididas en 12 tubos
0 Amplificaciones
0 moléculas
0 Amplificaciones
ΔRn
Ciclo

Figura 168

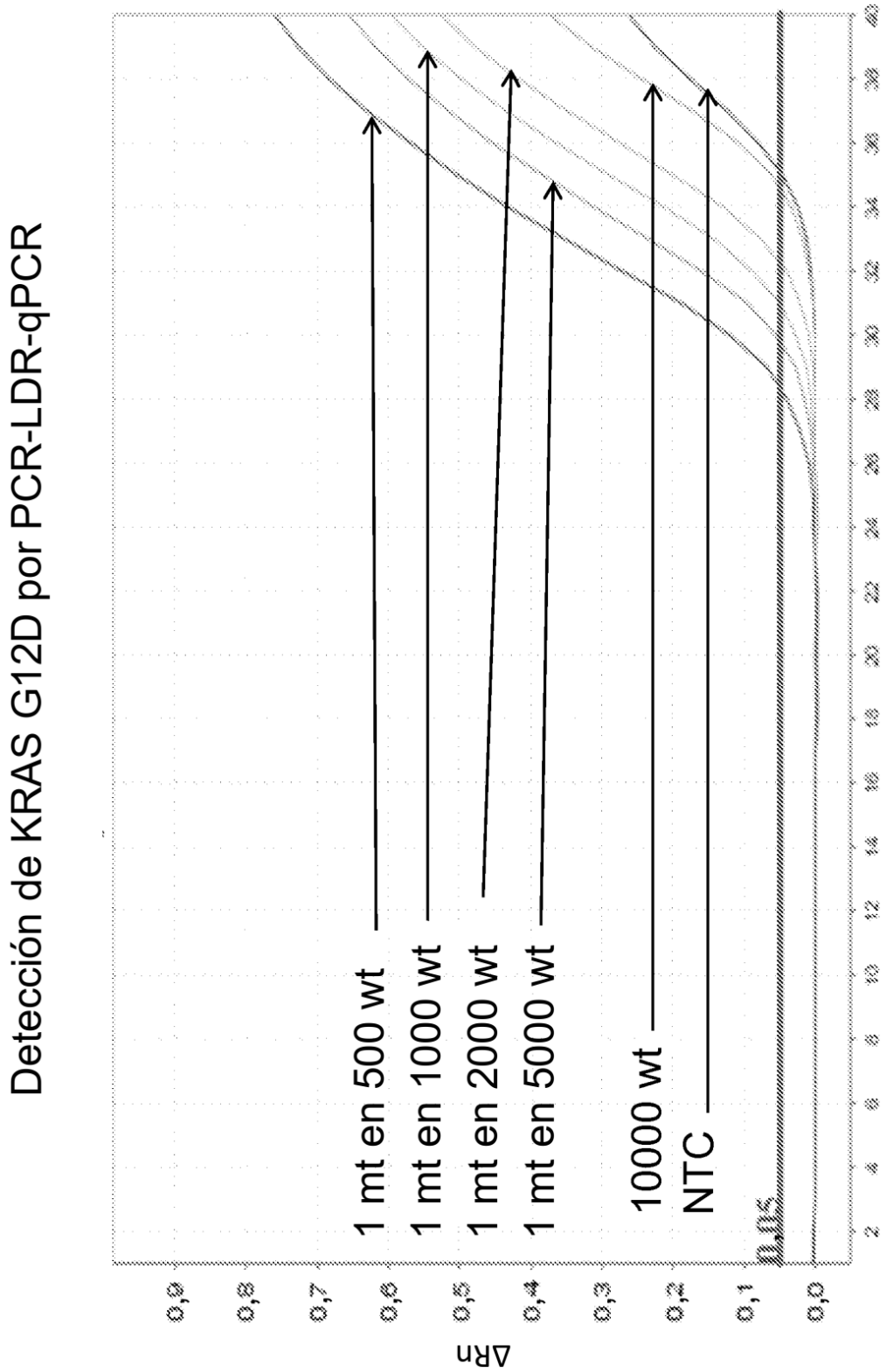

Detección de KRAS G12D por PCR-LDR-qPCR
ΔRn
Ciclo
1 mt en 500 wt
1 mt en 1000 wt
1 mt en 2000 wt
1 mt en 5000 wt
10000 wt
NTC
0,015

Figura 169

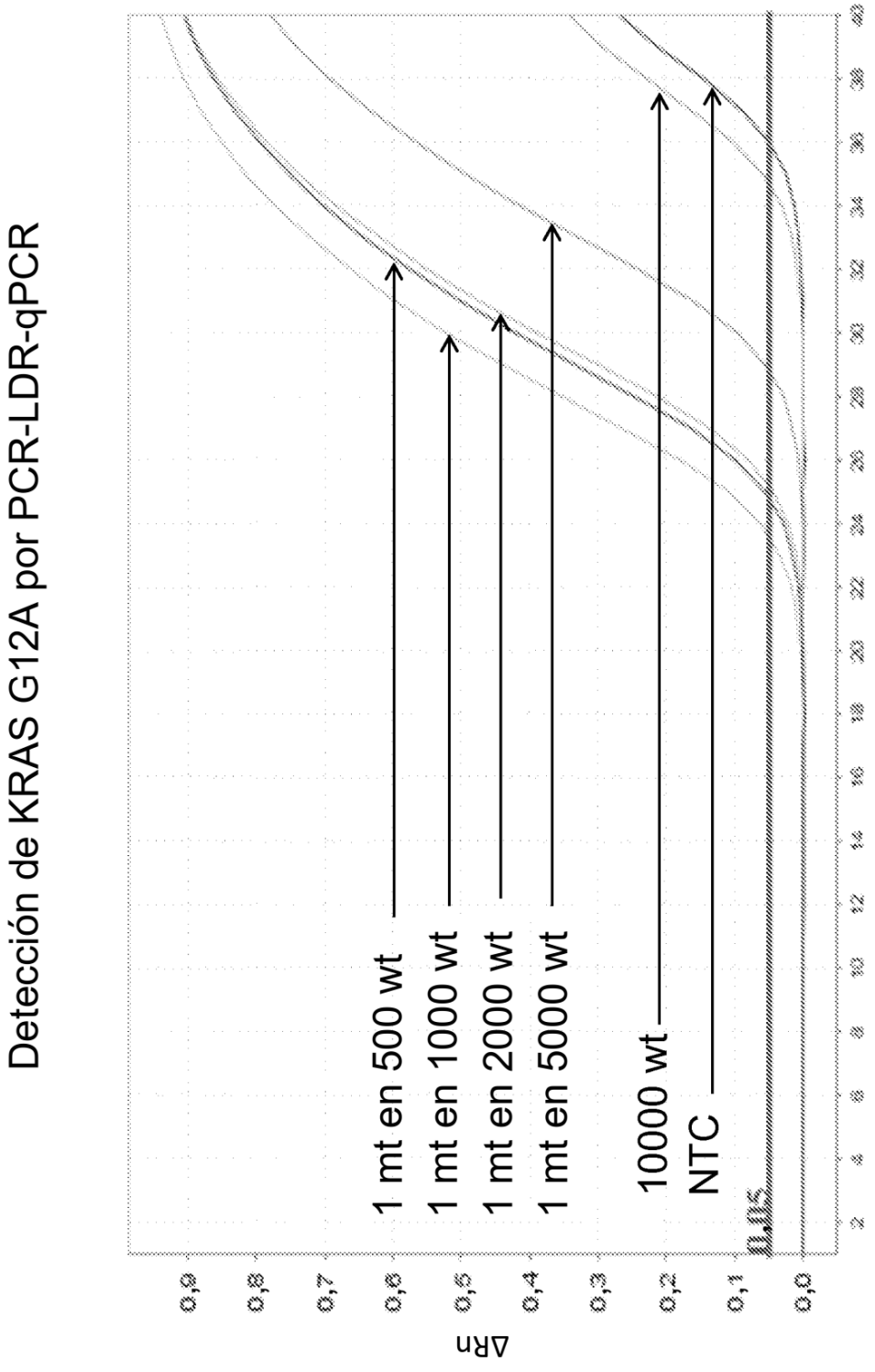

Detección de KRAS G12A por PCR-LDR-qPCR
ΔRn
Ciclo
1 mt en 500 wt
1 mt en 1000 wt
1 mt en 2000 wt
1 mt en 5000 wt
10000 wt
NTC
UMS

Figura 170

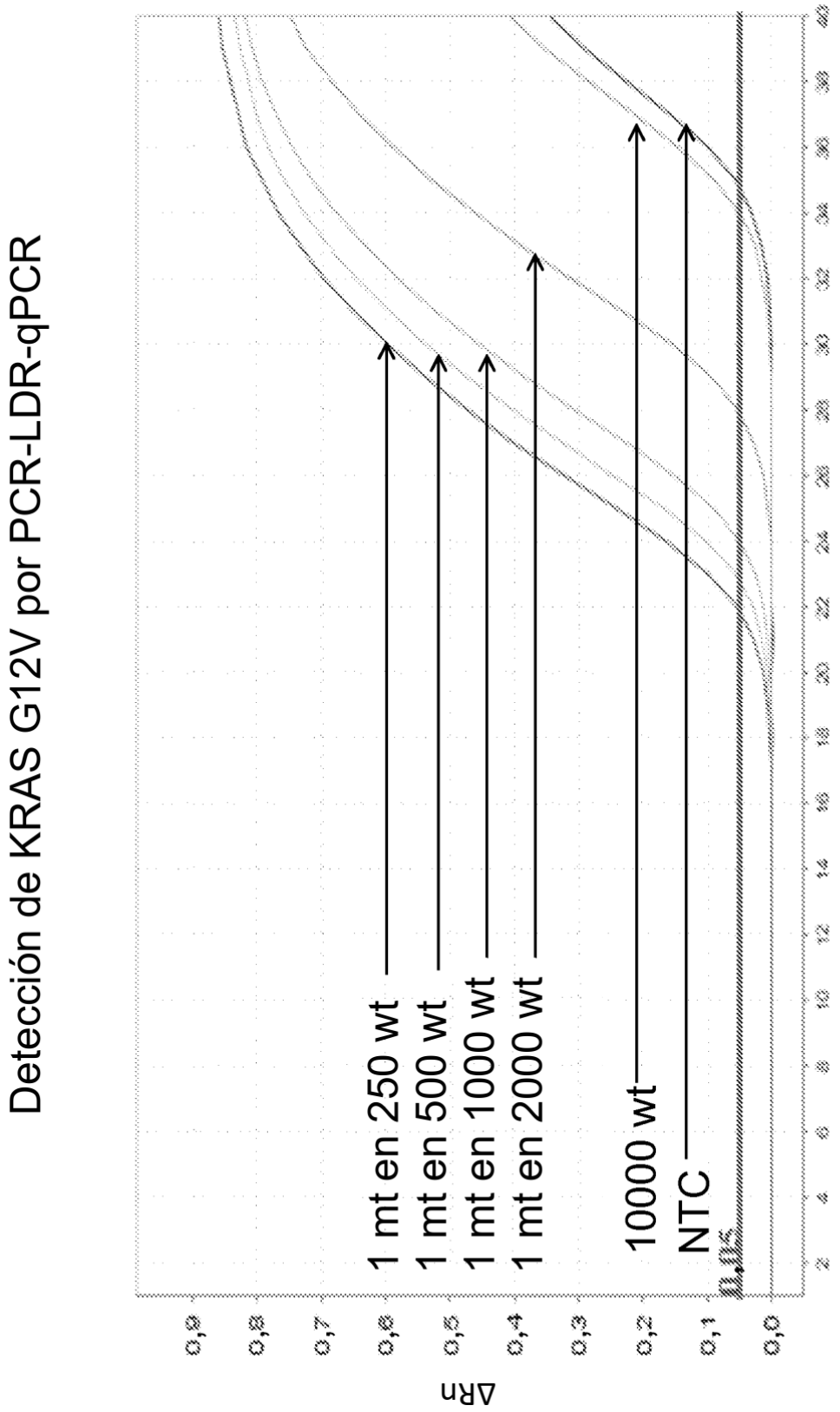

Detección de KRAS G12V por PCR-LDR-qPCR
ΔRn
Ciclo
1 mt en 250 wt
1 mt en 500 wt
1 mt en 1000 wt
1 mt en 2000 wt
10000 wt
NTC

Figura 171

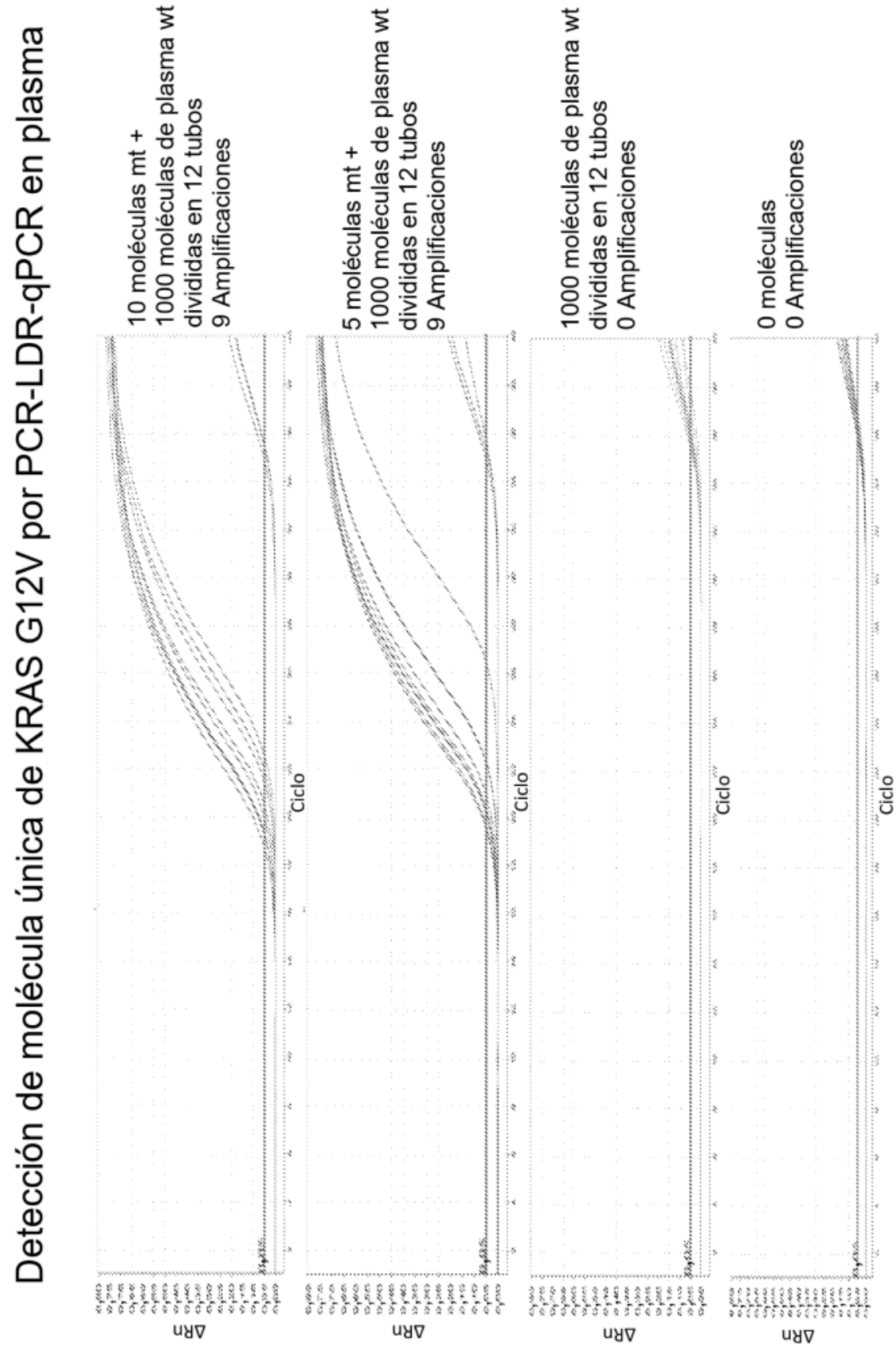

Detección de molécula única de KRAS G12V por PCR-LDR-qPCR en plasma
10 moléculas mt +
1000 moléculas de plasma wt
divididas en 12 tubos
9 Amplificaciones
5 moléculas mt +
1000 moléculas de plasma wt
divididas en 12 tubos
9 Amplificaciones
1000 moléculas de plasma wt
divididas en 12 tubos
0 Amplificaciones
0 moléculas
0 Amplificaciones
ΔRn
Ciclo

Figura 172

Detección de metilación a VIM-S3 por PCR-LDR-qPCR

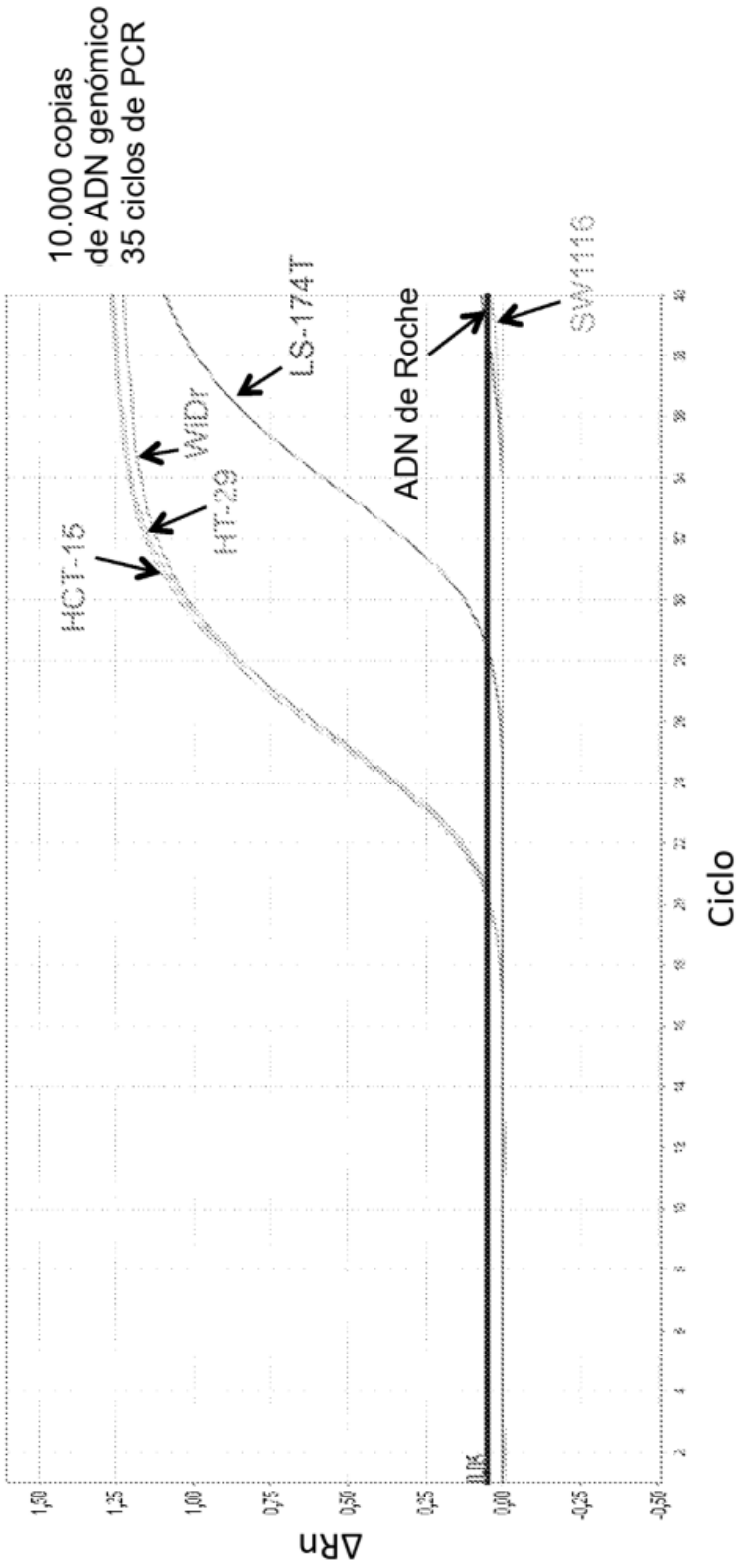


Figura 173

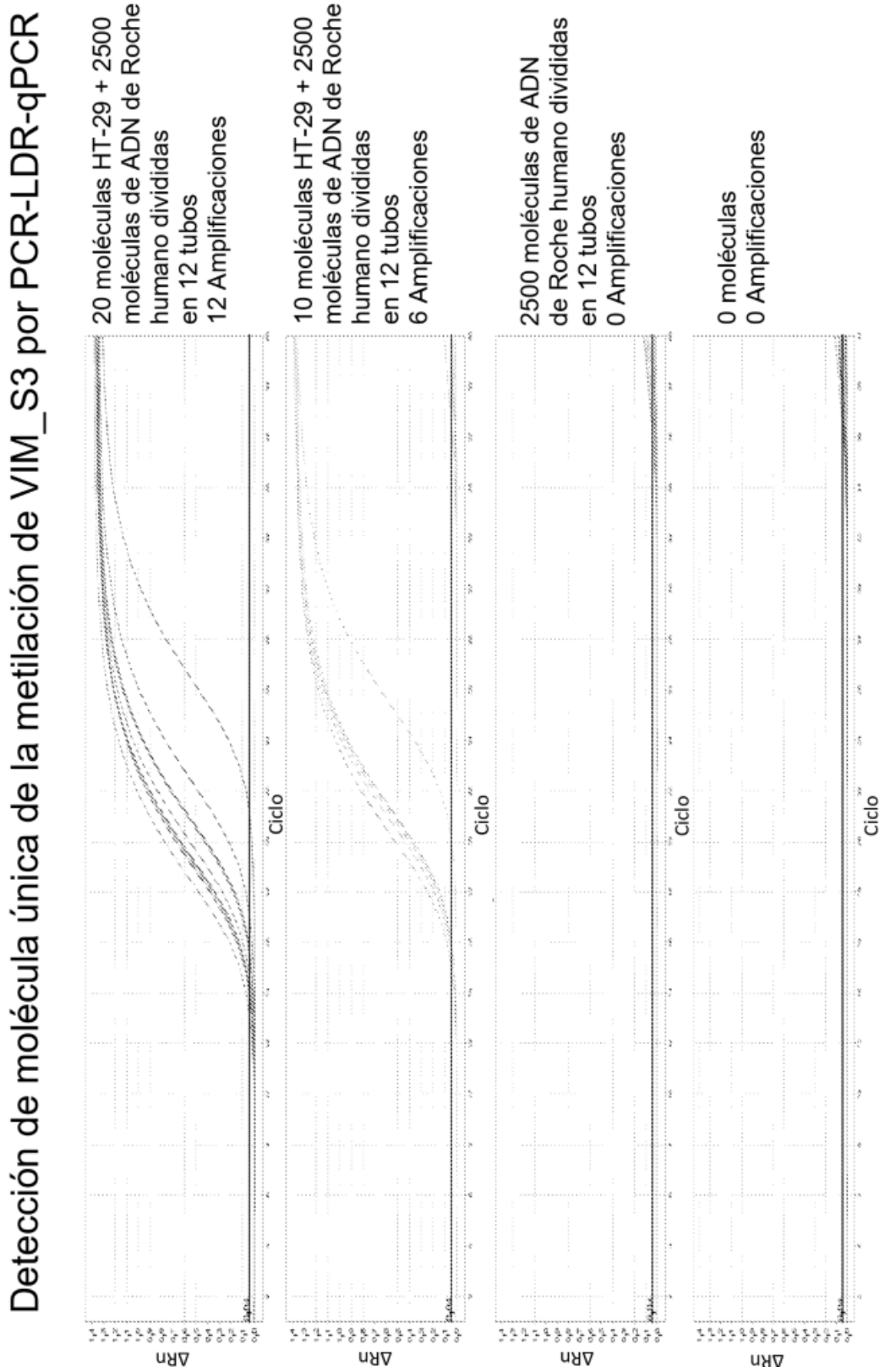

Detección de molécula única de la metilación de VIM_S3 por PCR-LDR-qPCR
20 moléculas HT-29 + 2500 moléculas de ADN de Roche humano divididas en 12 tubos
12 Amplificaciones
10 moléculas HT-29 + 2500 moléculas de ADN de Roche humano divididas en 12 tubos
6 Amplificaciones
2500 moléculas de ADN de Roche humano divididas en 12 tubos
0 Amplificaciones
0 moléculas
0 Amplificaciones
ΔRn
Ciclo

Figura 174

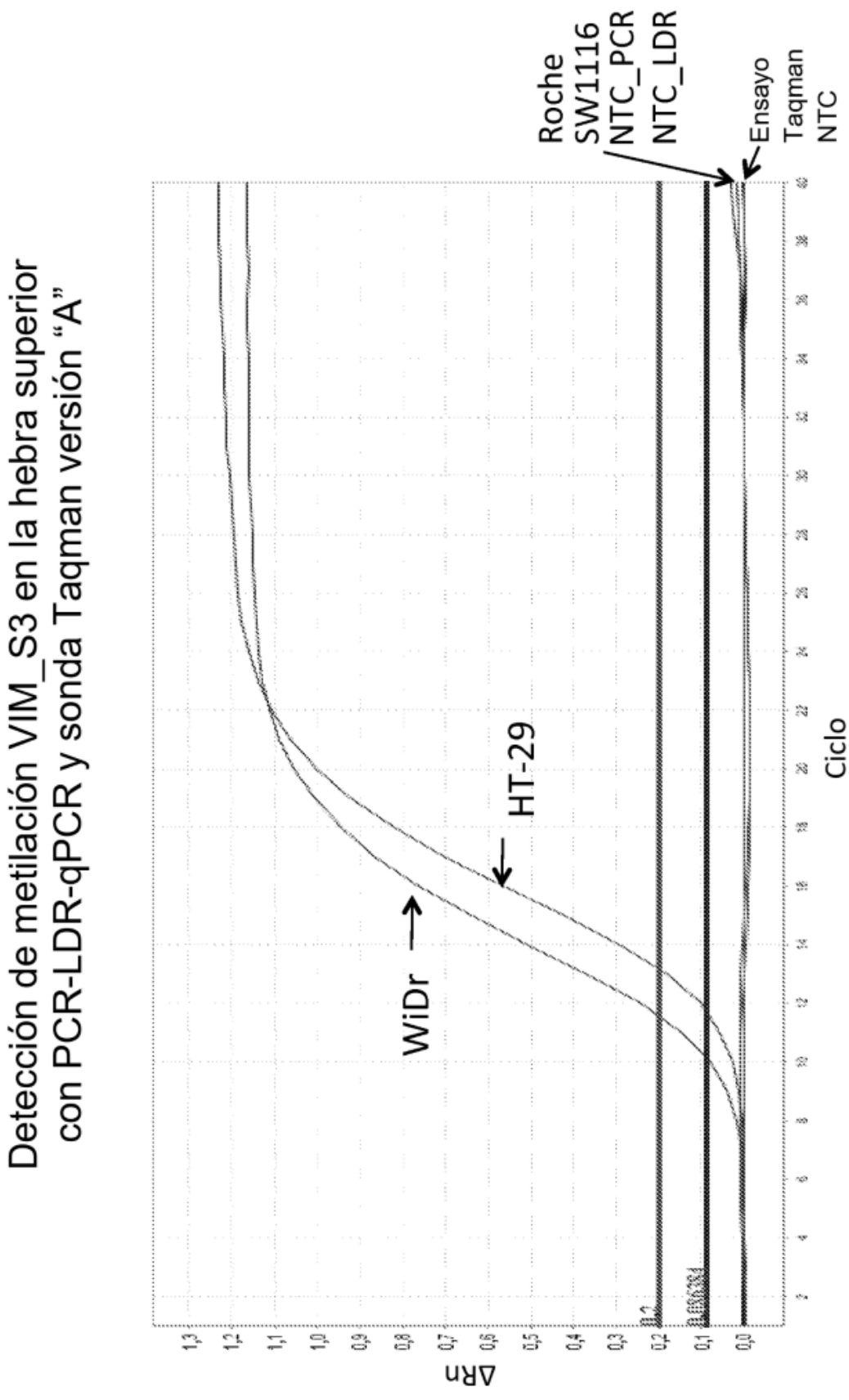

Detección de metilación VIM_S3 en la hebra superior con PCR-LDR-qPCR y sonda Taqman versión "A"
Roche SW1116 NTC_PCR NTC_LDR
Ensayo Taqman NTC
WiDr
HT-29
ΔRn
Ciclo

Figura 175

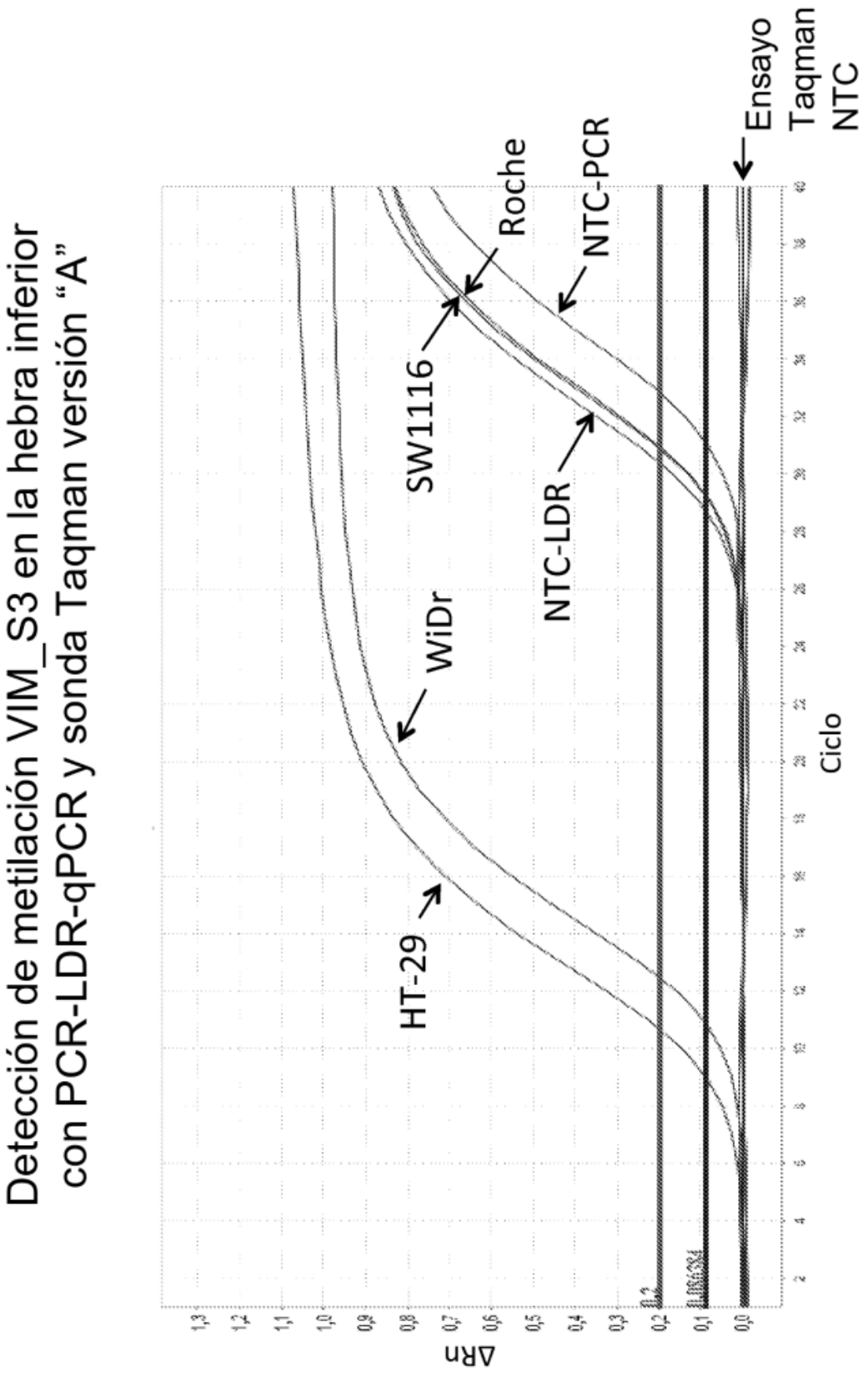

Detección de metilación VIM_S3 en la hebra inferior
con PCR-LDR-qPCR y sonda Taqman versión "A"
ΔRn
Ciclo
HT-29
WiDr
SW1116
Roche
NTC-LDR
NTC-PCR
Ensayo
Taqman
NTC

Figura 176

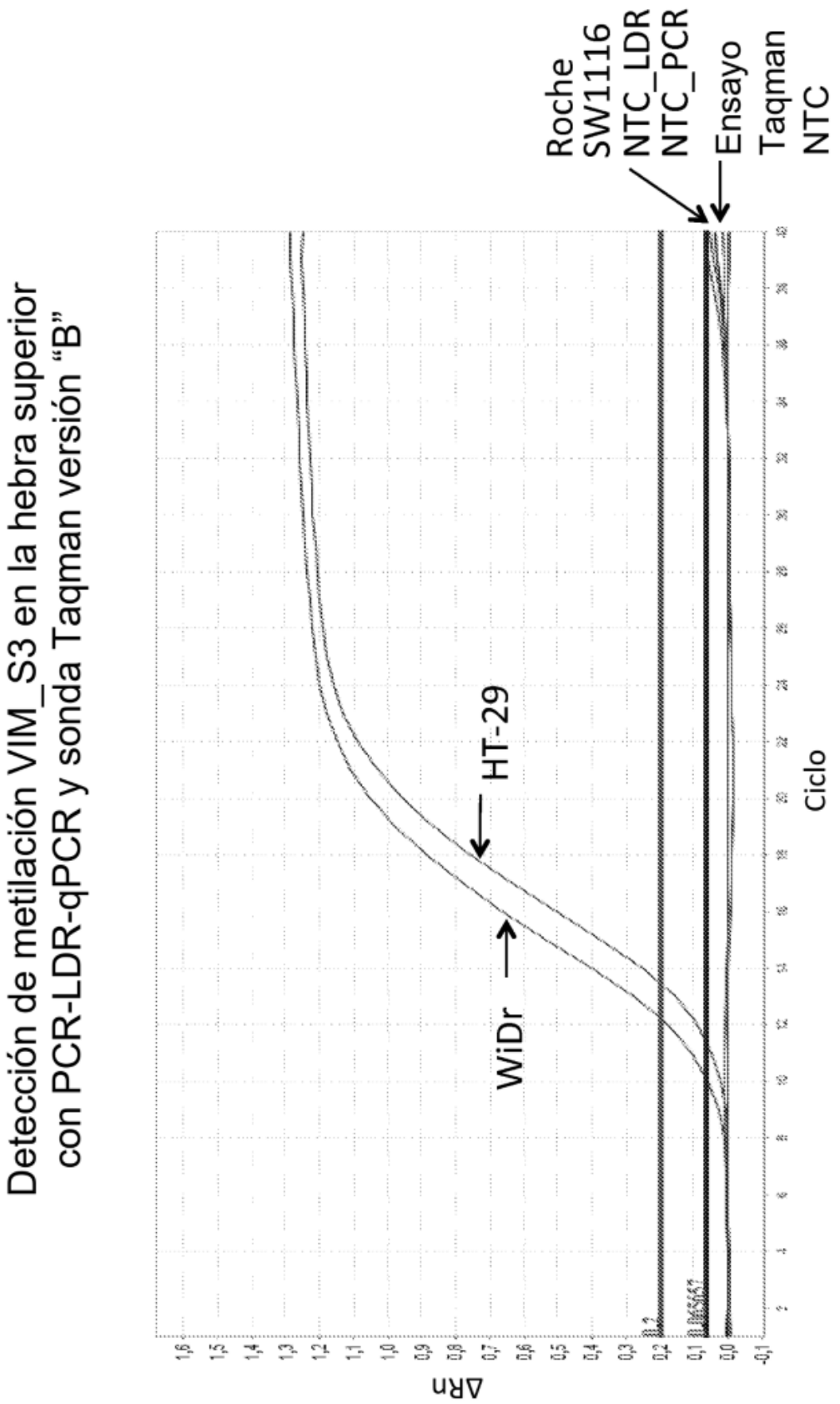

Detección de metilación VIM_S3 en la hebra superior
con PCR-LDR-qPCR y sonda Taqman versión "B"
Roche SW1116
NTC_LDR
NTC_PCR
Ensayo Taqman
NTC
HT-29
WiDr
ΔRn
Ciclo

Figura 177

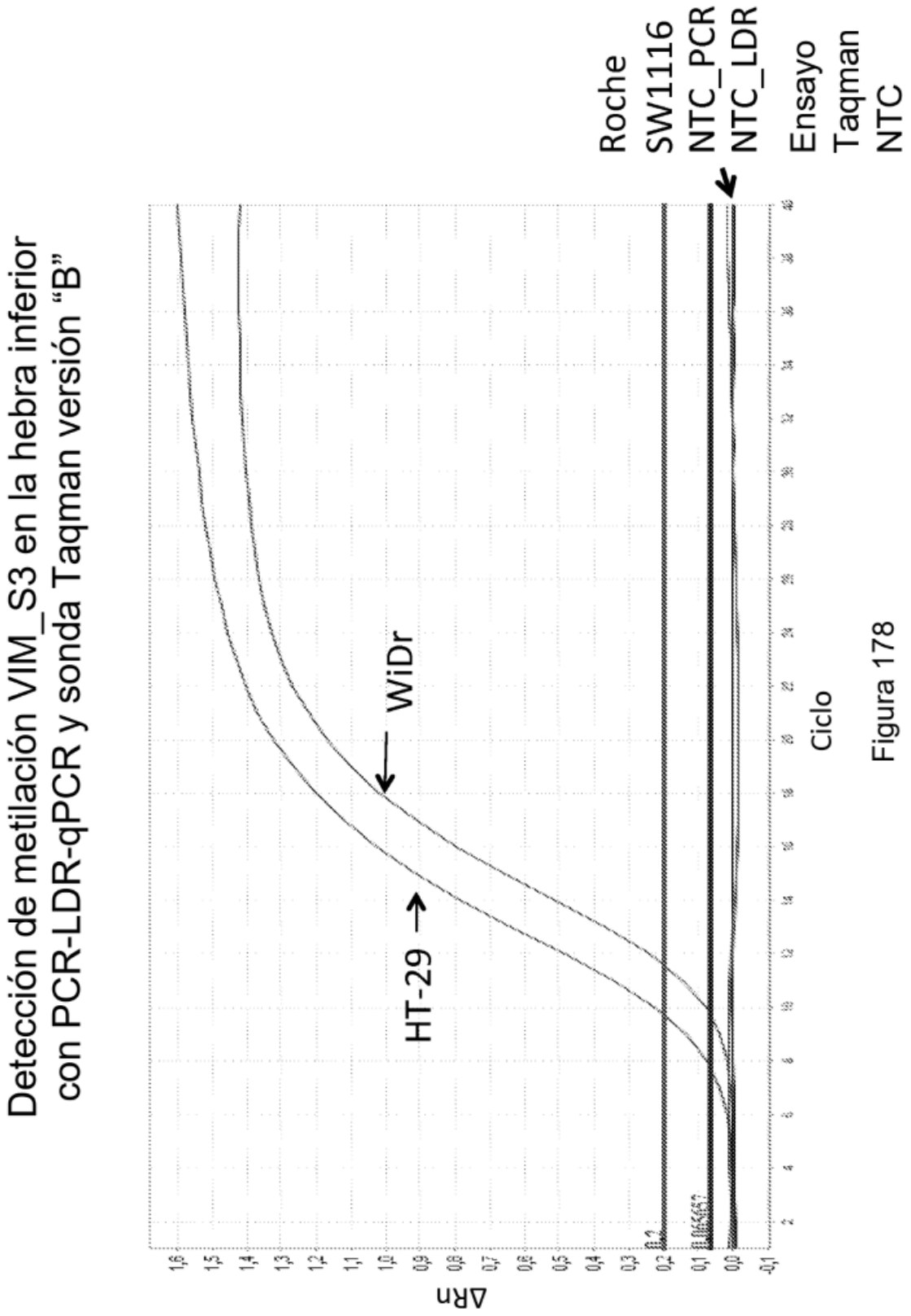

Detección de metilación VIM_S3 en la hebra inferior
con PCR-LDR-qPCR y sonda Taqman versión "B"
Roche
SW1116
NTC_PCR
NTC_LDR
Ensayo
Taqman
NTC
WiDr
HT-29
ΔRn
Ciclo

Figura 178