



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 194 985**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

H01J 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA LIMITADA

T7

96 Número de solicitud europea: **96910464 .5**

96 Fecha de presentación : **18.03.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0815261**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.2003**

54 Título: **Diagnóstico de ADN basado en la espectrometría de masas.**

30 Prioridad: **17.03.1995 US 406199**

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.12.2003**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea limitada BOPI: **01.08.2011**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea limitada: **01.08.2011**

73 Titular/es: **SEQUENOM, Inc.**
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es: **Köster, Hubert;**
Tang, Kai;
Fu, Dong-Jing;
Siegirt, Carsten W.;
Little, Daniel P.;
Higgings, G. Scott;
Braun, Andreas;
Darnhofer-Demar, Brigitte y
Jurinke, Christian

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 194 985 T7

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico de ADN basado en la espectrometría de masas.

5 Antecedentes de la invención

La información genética de todos los organismos vivos (por ejemplo animales, plantas y microorganismos) está codificada en el ácido desoxirribonucleico (ADN). En los humanos, el genoma completo está comprendido por aproximadamente 100.000 genes localizados en 24 cromosomas (The Human Genome, T. Strachan, BIOS Scientific Publishers, 1992). Cada gen codifica una proteína específica que después de su expresión mediante la transcripción y la traducción, desempeña una función bioquímica específica en una célula viva. Los cambios en una secuencia de ADN se conocen como mutaciones y pueden dar como resultado proteínas con actividades bioquímicas alteradas o incluso pérdidas; esto a su vez puede provocar una enfermedad genética. Las mutaciones incluyen delecciones, inserciones o alteraciones de nucleótidos (es decir, mutaciones puntuales). Las mutaciones puntuales pueden ser “mutaciones de sentido erróneo”, dando como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos de un proteína o “sin sentido” codificando un codón de terminación y produciendo así una proteína truncada.

Actualmente se conocen más de 3000 enfermedades genéticas (Human Genome Mutations, D.N. Cooper y M. Krawczak, BIOS Publishers, 1993), incluyendo hemofilias talasemias, distrofia muscular de Duchenne (DMD), enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Alzheimer y fibrosis quística (CF). Además de los genes mutados, que dan como resultado enfermedades genéticas, ciertos defectos de nacimiento son el resultado de anomalías cromosómicas como trisomía 21 (síndrome de Down), Trisomía 13 (síndrome de Patau), trisomía 18 (síndrome de Edward), monosomía X (síndrome de Turner) y otras aneuploidías del cromosoma sexual como el síndrome de Klinefelter (XXY). Además, existe una creciente evidencia de que ciertas secuencias de ADN pueden predisponer a un individuo a cualquiera de numerosas enfermedades como diabetes, arterosclerosis, obesidad, diversas enfermedades autoinmunitarias y cáncer (por ejemplo colorectal, de mama, de ovario, de pulmón).

Los virus, bacterias, hongos y otros organismos infecciosos contienen secuencias de ácidos nucleicos distintivos, que son diferentes de las secuencias contenidas en la célula hospedadora. Por lo tanto, los organismos infecciosos pueden detectarse e identificarse también basándose en sus secuencias de ADN específicas.

Dado que una secuencia de aproximadamente 16 nucleótidos es estadísticamente específica incluso para el tamaño del genoma humano, pueden usarse secuencias de ácidos nucleicos relativamente cortas para detectar genes normales y defectuosos en los organismos superiores y para detectar microorganismos infecciosos (por ejemplo bacterias, hongos, protistas y levaduras) y virus. Las secuencias de ADN pueden servir incluso como huella genética para la detección de individuos diferentes en la misma especie (Thompson, J. S. y M. W. Thompson, editores, *Genetics in Medicine*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA (1986).

Actualmente se están usando diversos métodos para detectar el ADN. Por ejemplo, pueden identificarse secuencias de ácidos nucleicos comparando la movilidad de un fragmento de ácido nucleico amplificado con un patrón conocido por electroforesis en gel, o por hibridación con una sonda, que es complementaria a la secuencia a identificar. La identificación, sin embargo, puede lograrse únicamente si el fragmento de ácido nucleico se marca con una función indicadora sensible (por ejemplo radiactiva (^{32}P , ^{35}S), fluorescente o quimioluminiscente). Sin embargo, los marcadores radiactivos pueden ser peligrosos y las señales que producen decaen con el tiempo. Los marcadores no isotópicos (por ejemplo los fluorescentes) padecen una falta de sensibilidad y debilitación de la señal cuando se usan láser de alta intensidad. Además, al realizar el marcaje, la electroforesis y la detección subsiguiente son procedimientos laboriosos, requieren mucho tiempo y son propensos a errores. La electroforesis es particularmente propensa a errores, dado que el tamaño o el peso molecular del ácido nucleico no puede correlacionarse directamente con la movilidad en la matriz de gel. Es sabido que los efectos específicos de la secuencia, las estructuras secundarias y las interacciones con la matriz de gel provocan artefactos.

Los métodos para identificar las secuencias de ácidos nucleicos que requieren el uso de la electroforesis y/o el marcaje de ácidos nucleicos con funciones indicadoras se describen por ejemplo en los documentos WO 93/20236, JP6294796, Landegren y cols., Science, (1998), Págs. 229-237, EP-A-412883, WO 92/15712, WO 91/13075, y WO 91/15600.

En general, la espectrometría de masas proporciona un medio para “pesar” las moléculas individuales ionizando las moléculas en vacío y haciéndolas “volar” mediante volatilización. Con la influencia de combinaciones de campos eléctricos y magnéticos, los iones siguen trayectorias que dependen de su masa (m) y carga (z) individuales. En el intervalo de moléculas con peso molecular bajo, la espectrometría de masas ha sido desde hace tiempo parte del repertorio físico-orgánico rutinario para el análisis y caracterización de moléculas orgánicas mediante la determinación de la masa del ion molecular progenitor. Además, al disponer las colisiones de este ion molecular progenitor con otras partículas (por ejemplo átomos de argón), el ion molecular se fragmenta formando iones secundarios mediante la denominada disociación inducida por colisión (CID). El patrón/ruta de fragmentación muy a menudo permite derivar información estructural detallada. Muchas de las aplicaciones de los métodos espectrométricos son conocidas en la técnica, en particular en las ciencias, y pueden encontrarse resumidas en *Methods in Enzymology*, Vol. 193: “Mass Spectrometry” (J.A. McCloskey, editor), 1990, Academic Press, New York.

Debido a las aparentes ventajas analíticas de la espectrometría de masas para proporcionar una elevada sensibilidad de detección, la exactitud de las mediciones de masas, la información estructural detallada mediante CID en conjunción con una configuración de EM/EM y velocidad, así como la transferencia de datos online a un ordenador, ha habido un interés considerable en el uso de la espectrometría de masas para el análisis estructural de ácidos nucleicos. Revisiones recientes que resumen este campo incluyen K. H. Schram, "Mass Spectrometry of Nucleic Acid Components. Biomedical Applications of Mass Spectrometry" 34, 203-287 (1990); y P. F. Crain, "Mass Spectrometric Techniques in Nucleic Acid Research", *Mass Spectrometry Reviews* 9, 505-554 (1990).

Sin embargo, los ácidos nucleicos son biopolímeros muy polares que son muy difíciles de volatilizar. En consecuencia, la detección espectrométrica de masas se ha limitado a oligonucleótidos sintéticos de bajo peso molecular para determinar la masa del ión molecular progenitor y a través de esto, confirmar la secuencia de oligonucleótidos ya conocida, o alternativamente, confirmando la secuencia conocida a través de la generación de iones secundarios (iones fragmentados) mediante CID en una configuración EM/EM utilizando, en particular, para la ionización y la volatilización, el método del bombardeo con átomos rápidos (espectrometría de masas por FAB) o la desorción de plasma (espectrometría de masas PD). Como ejemplo, se ha descrito la aplicación de FAB al análisis de bloques diméricos protegidos para la síntesis química de oligodesoxinucleótidos (Köster y cols., *Biomedical Environmental Mass Spectrometry* 14, 111-116 (1987)).

Dos técnicas de ionización/desorción más recientes son electropulverización/ionpulverización (ES) y la desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI). La espectrometría de masas ES ha sido introducida por Fenn y cols. (*J. Phys. Chem.* 88, 4451-59 (1984); Solicitud de PCR n° WO 90/14148) y las aplicaciones actuales se resumen en artículos de revistas recientes (R.D. Smith y cols., *Anal. Chem.* 62, 882-899 (1990) y B. Ardrey, *Electrospray Mass Spectrometry, Spectroscopy Europe*, 4 10-18 (1992)). Se han publicado los pesos moleculares de un tetradecanucleótido (Covey y cols. "The Determination of Protein, Oligonucleotide and Peptide Molecular Weights by Ionspray Mass Spectrometry", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2, 249-256 (1988)), y de un 21-mero (*Methods in Enzymology*, 193, "Mass Spectrometry" (McCloskey, editor), págs. 425, 1990, Academic Press, New York). Más frecuentemente se usa un analizador de masas, un cuadrupolo. La determinación de pesos moleculares en cantidades femtomolares de muestra es muy exacta debido a la presencia de múltiples picos de iones todos los cuales pueden usarse para el cálculo de la masa.

La espectrometría de masas MALDI, por el contrario, puede ser particularmente atractiva cuando se usa una configuración de tiempo de vuelo (TOF) como analizador de masas. La espectrometría de masas MALDI-TOF ha sido introducida por Hillenkamp y cols. ("Matrix Assisted UV-Laser Desorption/Ionization: A New Approach to Mass Spectrometry of Large Biomolecules", *Biological Mass spectrometry* (Burlingame y McCloskey, editores), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, págs. 49-60, 1990). Dado que, en la mayoría de los casos, no se producen picos de iones moleculares múltiples con esta técnica, los espectros de masas, en principio, parecen más simples que los de la espectrometría de masas de ES.

Aunque se han desorbido y volatilizado moléculas de ADN hasta un peso molecular de 410.000 daltons (Williams y cols., "Volatilización of High Molecular Weight DNA by Pulsed Láser Ablation of Frozen Aqueous Solutions", *Science*, 246, 1585-87 (1989), esta técnica hasta la fecha ha mostrado únicamente una resolución muy baja (ácidos oligotimidílicos de hasta 18 nucleótidos, Huth-Fehre y cols., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 6, 209-13 (1992); fragmentos de ADN hasta 500 nucleótidos de longitud K. Tang y cols., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8, 727-730 (1994); y un ADN de doble cadena de 28 pares de bases (Williams y cols., "Time-of-Flight Mass Spectrometry of Nucleic Acids by Láser Ablation and Ionization from a Frozen Aqueous Matrix", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 4, 348-351 (1990).

La patente japonesa n° 59-131909 describe un instrumento, que detecta los fragmentos de ácidos nucleicos separados ya sea por electroforesis, cromatografía líquida o por filtración en gel de alta velocidad. La detección por espectrometría de masas se logra incorporando en los ácidos nucleicos átomos que normalmente no ocurren en el ADN como S, Br, I o Ag, Au, Pt, Os, Hg.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona procesos espectrométricos de masas para detectar una secuencia de ácidos nucleicos particular en una muestra biológica. Dependiendo de la secuencia a detectar, los procesos pueden usarse, por ejemplo, para diagnosticar (por ejemplo prenatal o postnatalmente), una enfermedad genética o anomalía cromosómica; una predisposición a una enfermedad o estado (por ejemplo obesidad, arteriosclerosis, cáncer), o una infección por un organismo patógeno (por ejemplo virus, bacteria parásito, u hongo); o para proporcionar información relativa a la identificación, herencia, o compatibilidad (por ejemplo el fenotipado de HLA).

En una primera realización una o más moléculas de ácido nucleico de detección (por ejemplo un oligonucleótido o un oligonucleotidomimético) que es complementario al sitio de detección diana se hibrida con el sitio de detección diana y se elimina el oligonucleótido de detección no hibridado. El producto se ioniza y volatiliza y después se analiza por espectrometría de masas en la que la detección del oligonucleótido de detección por espectrometría de masas indica la presencia del ácido nucleico diana en la muestra biológica.

Una molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de ácido nucleico a detectar (es decir, la diana) puede inmovilizarse inicialmente sobre un soporte sólido. La inmovilización puede lograrse, por ejemplo, basándose en la hibridación entre una parte de la molécula de ácido nucleico diana, que es diferente del sitio de detección diana y una molécula de ácido nucleico de captura, que ha sido inmovilizada previamente sobre un soporte sólido. Alternativamente, la inmovilización puede lograrse por unión directa de la molécula de ácido nucleico diana y el soporte sólido. Preferiblemente, hay un espaciador (por ejemplo una molécula de ácido nucleico) entre la molécula de ácido nucleico y el soporte.

En realizaciones preferidas, el sitio de detección diana se amplifica antes de la detección y las moléculas de ácido nucleico se acondicionan. En una realización adicional preferida, las secuencias de detección diana se disponen en un formato que permite detecciones simultáneas múltiples (multiplexado), así como procesamiento en paralelo usando sistemas matriciales de oligonucleótidos ("placas de ADN").

En una segunda realización, la inmovilización de la molécula de ácido nucleico es una etapa opcional. Una vez que se ha obtenido una molécula de ácido nucleico a partir de una muestra biológica, la secuencia de detección diana se amplifica y se detecta directamente por espectrometría de masas. En realizaciones preferidas, el sitio de detección diana y/o los oligonucleótidos de detección se acondicionan antes de la detección por espectrometría de masas. En otra realización preferida, los sitios de detección diana amplificados se disponen en un formato que permite múltiples detecciones simultáneas (multiplexado), así como procesamiento en paralelo usando sistemas matriciales de oligonucleótidos ("placas de ADN").

En una tercera realización, las moléculas de ácido nucleico que se han replicado a partir de una molécula de ácido nucleico obtenida a partir de una muestra biológica puede digerirse específicamente usando una o más nucleasas (usando desoxirribonucleasas para ADN o ribonucleasas para ARN). Los fragmentos se analizan por espectrometría de masas en la que la determinación del peso molecular de los fragmentos indica si está presente la secuencia de ácidos nucleicos. Los eventos de hibridación y los pesos moleculares reales de los las secuencias diana proveen información sobre si y dónde están presentes las mutaciones en el gen. Los fragmentos pueden capturarse sobre un soporte sólido que porta las secuencias complementarias correspondientes. El sistema matricial puede analizarse punto por punto usando la espectrometría de masas. El ADN puede digerirse de forma similar usando un cóctel de nucleasas incluyendo endonucleasas de restricción. En una realización preferida, los fragmentos de ácido nucleico se acondicionan antes de la detección por espectrometría de masas.

En otra realización al menos un cebador con una base en el extremo 3' complementario a un alelo (mutante o normal) se hibrida con una molécula de ácido nucleico que contiene el alelo. Se usan un polimerasa apropiada y un conjunto completo de nucleosidotrifosfatos o únicamente uno de los nucleosidotrifosfatos en reacciones separadas para dar una extensión del cebador diferente. Únicamente si el cebador está hibridado de forma apropiada (es decir apareamiento incorrecto nº 3') y si se añade el nucleósido correcto (es decir, complementario) será extendido el cebador. Los productos pueden resolverse por cambios en el peso molecular según se determine por espectrometría de masas.

En una quinta realización un cebador de ácidos nucleicos que es complementario a una parte del sitio de detección diana que es adyacente al sitio de una mutación se hibrida con la molécula de ácido nucleico. La adición de un conjunto completo de didesoxinucleósidos, 3'-deseoxinucleósidotrifosfatos (por ejemplo pppAdd, pppTdd, pppCdd y pppGdd) o ribonucleótidotrifosfatos y una polimerasa permite que se extienda sobre el cebador sólo un didesoxinucleósido, 3'deseoxinucleósido o ribonucleótidotrifosfato que es complementario al nucleótido diana. El producto se ioniza y volatiliza y después se analiza por espectrometría de masas en la que la detección del cebador por espectrometría de masas determina la identidad del nucleótido diana.

La molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de ácidos nucleicos a detectar (es decir la diana) puede inmovilizarse inicialmente sobre un soporte sólido. La inmovilización puede lograrse, por ejemplo, basándose en la hibridación entre una parte de la molécula de ácido nucleico de captura, que está distante del sitio de detección diana y una molécula de ácido nucleico de captura, que ha sido previamente inmovilizada sobre un soporte sólido. De forma alternativa, la inmovilización puede lograrse por unión directa de la molécula de ácido nucleico y el soporte sólido. Preferiblemente, existe un espaciador (por ejemplo una molécula de ácido nucleico) entre la molécula de ácido nucleico diana y el soporte.

En una sexta realización, un ácido nucleico diana se hibrida con un oligonucleótido complementario que se hibrida con la diana en una región que incluye una mutación M. Después, el heterobycatenario se pone en contacto con un agente que puede escindir específicamente en una porción no hibridada (por ejemplo una endonucleasa específica de cadena sencilla), de forma que un apareamiento incorrecto, que indica la presencia de una mutación, da como resultado la escisión del ácido nucleico diana. Los dos productos de la escisión pueden detectarse por espectrometría de masas.

En una séptima realización, que se basa en la reacción en cadena de la ligasa (LRC), un ácido nucleico diana se hibrida con un conjunto de eductos del ligamiento y una ligasa de ADN termoestable, de forma que las educciones del ligamiento se ligan covalentemente entre sí, formando un producto de ligamiento. El producto del ligamiento puede detectarse después por espectrometría de masas y compararse con un valor conocido. Si la reacción se realiza de forma cíclica, el producto del ligamiento obtenido puede amplificarse para facilitar la detección de pequeños volúmenes del

ácido nucleico diana. La selección entre los cebadores naturales y mutados en el punto de ligamiento puede dar como resultado la detección de una mutación puntual.

Los procesos de la invención proporcionan una exactitud y fiabilidad aumentada de la detección de ácidos nucleicos por espectrometría de masas. Además, los procesos permiten controles rigurosos para prevenir resultados de falso negativo o falso positivo. Los procesos de la invención evitan las etapas electroforéticas; el mareaje y detección subsiguiente de una etiqueta. De hecho se estima que el procedimiento completo, incluyendo el aislamiento, amplificación y análisis espectrométrico de masas de los ácidos nucleicos lleva sólo aproximadamente 2-3 horas. Por lo tanto los presentes procesos descritos de la invención son más rápidos y menos caros de realizar que los sistemas de detección de ADN existentes. Además, debido a que los presentes procesos descritos permiten identificar y al mismo tiempo detectar los fragmentos de ácidos nucleicos por sus pesos moleculares específicos (un patrón físico no ambiguo), los procesos descritos son también mucho más exactos y fiables que los procedimientos disponibles actualmente.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A es un diagrama que muestra un proceso para realizar el análisis espectrométrico de masas en el sitio de detección diana (TDS) contenido en una molécula de ácido nucleico (T), que se ha obtenido de una muestra biológica. Una secuencia de captura específica (C) se une al soporte sólido (SS) mediante un espaciador (S). La secuencia de captura se elige para hibridarse específicamente con una secuencia complementaria de la molécula de ácido nucleico (T), conocida como sitio de captura diana (TCS). El espacio (S) facilita la hibridación sin impedimentos. Entonces se pone en contacto con el TDS una secuencia de ácidos nucleicos de detección (D), que es complementaria al TDS. La hibridación entre D y TDS puede detectarse por espectrometría de masas.

La Figura 1B es un diagrama que muestra un proceso para realizar un análisis espectrométrico de masas al menos en un sitio de detección diana (aquí TDS 1 y TDS 2) mediante ligamiento directo sobre un soporte sólido. La secuencia diana (T) que contiene el sitio de detección diana (TDS 1 y TDS 2) se inmoviliza sobre un soporte sólido mediante la formación de un enlace reversible o irreversible formado entre una función apropiada (L') en la molécula de ácido nucleico diana (T) y una función adecuada (L) en el soporte sólido. Las secuencias de ácidos nucleicos de detección (aquí D1 y D2), que son complementarias a un sitio de detección diana (TDS 1 o TDS 2) se ponen entonces en contacto con el TDS. La hibridación entre TDS 1 y D1 y/o TDS 2 y D2 puede detectarse y distinguirse basándose en las diferencias en el peso molecular.

La Figura 1C es un diagrama que muestra un proceso para detectar una secuencia natural (D^{wt}) y/o mutante (D^{mut}) en una molécula de ácido nucleico diana (T). Como en la Figura 1A, una secuencia de captura específica (C) se une sobre un soporte sólido (SS) mediante un espaciador (S). Además, la secuencia de captura se elige para interactuar específicamente con una secuencia complementaria de la secuencia diana (T), el sitio de captura diana (TCS) a detectar mediante la hibridación. Sin embargo, si el sitio de detección diana (TDS) incluye una mutación, X, que cambia el peso molecular, los sitios de detección diana mutados pueden distinguirse de los naturales mediante espectrometría de masas. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico de detección (D) se diseña de forma que la mutación esté en medio de la molécula y por lo tanto no puede dar un híbrido estable si el oligonucleótido de detección natural (D^{wt}) se pone en contacto con la secuencia de detección diana, por ejemplo, como un control. La mutación puede detectarse también si el oligonucleótido de detección mutado (D^{mut}) con la base correspondiente en la posición mutada se usa para la hibridación. Si se obtiene una molécula de ácido nucleico de una muestra biológica es heterocigótica para la secuencia particular (es decir, contiene tanto D^{wt} como D^{mut}), tanto D^{wt} como D^{mut} se unirán a la cadena apropiada y la diferencia de masas permitirá que se detecten simultáneamente tanto D^{wt} como D^{mut} .

La Figura 2 es un diagrama que muestra un proceso en el que se detectan varias mutaciones de forma simultánea en la secuencia diana empleando los oligonucleótidos de detección correspondientes. Las diferencias de peso molecular entre los oligonucleótidos de detección D1, D2 y D3 deben ser los suficientemente grandes de forma que sea posible la detección simultánea (multiplexado). Esto puede lograrse mediante la secuencia misma (composición o longitud) o introduciendo funciones para la modificación de la masa M1-M3 en el oligonucleótido de detección.

La Figura 3 es un diagrama que muestra todavía un formato de detección multiplexado más. En esta realización, la diferenciación se logra empleando diferentes secuencias de captura específicas que están inmovilizadas en una posición específica sobre una superficie plana (por ejemplo un "sistema matricial de placas"). Si hay presentes diferentes secuencias diana T1-Tn, sus sitios de captura diana TCS1-TCSn interactúan con secuencias de captura inmovilizadas complementarias C1-Cn. La detección se logra empleando oligonucleótidos de detección de masas apropiadamente diferenciadas D1-Dn, que se diferencian en la masa ya sea por sus secuencias o por las funciones que modifican la masa M1-Mn.

La Figura 4 es un diagrama que muestra un formato en el que un sitio de captura diana (TCS) se incorpora a la secuencia diana usando la amplificación por PCR. Únicamente se captura una cadena, la otra se elimina (por ejemplo basándose en la interacción entre las perlas magnéticas recubiertas con biotina y estreptavidina). Si la biotina se une al cebador 1 la otra cadena puede marcarse apropiadamente mediante un TCS. La detección es como se describe anteriormente por la interacción de un oligonucleótido D de detección específico con el sitio de detección diana TDS correspondiente mediante la espectrometría de masas.

ES 2 194 985 T7

La Figura 5 es un diagrama que muestra como la amplificación (aquí los productos de la reacción en cadena de la ligasa (LCR) pueden prepararse y detectarse por espectrometría de masas. La diferenciación de las masas puede lograrse mediante las funciones que modifican la masa (M1 y M2) unidas a los cebadores (P1 y P4 respectivamente). La detección por espectrometría de masas puede lograrse directamente (es decir, sin emplear inmovilización y sitios de captura diana (TCS)). Las reacciones de LCR múltiples pueden realizarse en paralelo proporcionando un sistema matricial ordenado de secuencias de captura (C). Este formato permite la separación de los productos de ligamiento y la identificación punto por punto mediante la espectrometría de masas si la diferenciación de masas es insuficiente.

La Figura 6A es un diagrama que muestra el análisis espectrométrico de una molécula de ácido nucleico, que ha sido amplificada mediante un procedimiento de amplificación de la transcripción. Una secuencia de ARN se captura mediante su secuencia TCS, de forma que los sitios de detección diana mutados pueden detectarse como anteriormente usando oligonucleótidos de detección apropiados (D).

La Figura 6B es un diagrama que muestra el multiplexado para detectar dos sitios diferentes (mutados) en el mismo ARN de forma simultánea usando oligonucleósidos de detección de masa modificada M1-D1 y M2-D2.

La Figura 6C es un diagrama de un procedimiento de multiplexado diferentes para la detección de mutaciones específicas empleando didesoxinucleósido o 3'-desoxinucleosidotrifosfatos de masa modificada y una ADN polimerasa dependiente de ARN. Alternativamente, pueden emplearse ARN polimerasa dependiente de ADN y ribonucleótidos trifosfatos. Este formato permite la detección simultánea de las cuatro posibilidades de las bases en el sitio de la mutación (X).

La Figura 7A es un diagrama que muestra un proceso para realizar un análisis espectrométrico de masas en un sitio de detección diana (TDS) contenido en una única molécula de ácido nucleico (T), que se ha obtenido a partir de una muestra biológica. Una secuencia de captura específica (C) se une sobre un soporte sólido (SS) mediante un espaciador (S). La secuencia de captura se elige para hibridarse específicamente con una secuencia complementaria en T conocida como sitio de captura de la diana (TCS). Una molécula de ácido nucleico que es complementaria con una porción del TDS se hibrida al TDS 5' del sitio de una mutación (X) en el TDS. La adición de un conjunto completo de didesoxinucleósidos o 3'-desoxinucleosidotrifosfatos (por ejemplo pppAdd, pppTdd, pppCdd y pppGdd) y una ADN polimerasa dependiente de ADN permite la adición únicamente de uno didesoxinucleósido o 3'-desoxinucleosidotrifosfato que es complementario a X.

La Figura 7B es un diagrama que muestra un proceso para realizar un análisis espectrométrico para determinar la presencia de una mutación en un sitio de mutación potencial (M) en un molécula de ácido nucleico. Este formato permite el análisis simultáneo de ambos alelos (A) y (B) de una molécula de ácido nucleico de cadena doble, de forma que puede proveerse un diagnóstico de normal homocigótico, mutante homocigótico o heterocigótico. Los alelos A y B se hibridan cada uno con oligonucleótidos complementarios ((C) y (D) respectivamente), que se hibridan con A y B en una región que incluye M. Cada heterobicaína se pone en contacto entonces con una endonucleasa específica de una única cadena, de forma que un apareamiento incorrecto en M, indicando la presencia de una mutación, da como resultado la escisión de (C) y/o (D), que pueden entonces detectarse por espectrometría de masas.

La Figura 8 es un diagrama que muestra cómo ambas cadenas de un ADN diana pueden prepararse para ser detectadas usando vectores de transcripción que tiene dos promotores diferentes en localizaciones opuestas (por ejemplo el promotor SP6 y T7). Este formato es particularmente útil para detectar sitios de detección diana heterocigóticos (TDS). Al emplear la ARN polimerasa de SP6 o T7 pueden transcribirse ambas cadenas separada o simultáneamente. Ambos ARN pueden capturarse específicamente y detectarse simultáneamente usando oligonucleótidos de detección de masas diferenciadas. Esto puede lograrse bien directamente en solución o por procesamiento paralelo de muchas secuencias diana en un sistema matricial ordenado de secuencias de captura inmovilizadas específicamente.

La Figura 9 es un diagrama que muestra como el ARN preparado como se describe en las Figuras 6, 7 y 8 puede digerirse específicamente usando una o más ribonucleasas y los fragmentos capturados en soporte sólido que portan las secuencias complementarias correspondientes. Los eventos de hibridación y los pesos moleculares reales de las secuencias diana capturada proveen información sobre si y donde están presentes las mutaciones en el gen. El sistema matricial puede analizarse punto por punto usando la espectrometría de masas. El ADN puede digerirse de forma similar usando un cóctel de nucleasas incluyendo endonucleasas de restricción. Las mutaciones pueden detectarse mediante pesos moleculares diferentes de fragmentos específicos individuales comparados con los pesos moleculares de los fragmentos naturales.

La Figura 10A muestra un espectro resultante del experimento descrito en el siguiente Ejemplo 1. El panel i) muestra la absorbancia del 26-mero antes de la hibridación. El panel ii) muestra el filtrado de la centrifugación después de la hibridación. El panel iii) muestra los resultados después del primer lavado con citrato amónico 50 mM. El panel iv) muestra los resultados después del segundo lavado con citrato amónico 50 mM.

La Figura 10B muestra un espectro resultante del experimento descrito en el Ejemplo 1 siguiente después de tres etapas de lavado/centrifugado.

La Figura 10C muestra un espectro resultante del experimento descrito en el Ejemplo 1 siguiente mostrando la desorción exitosa del 26-mero hibridado de las perlas.

ES 2 194 985 T7

La Figura 11 muestra un espectro resultante del experimento descrito en el Ejemplo 1 siguiente mostrando la desorción exitosa del 40-mero hibridado de las perlas. La eficiencia de la detección sugiere que pueden desorberse también fragmentos mucho más largos de 40-meros.

5 La Figura 12 muestra un espectro resultante del experimento descrito en el Ejemplo 2 siguiente mostrando la desorción exitosa del 18-mero y 19-mero por espectrometría de masas, la mezcla (arriba), enfatizando los picos de que resultan del 18-mero (centro) y enfatizando los picos que resultan del 19-mero (abajo).

10 La Figura 13 es una representación gráfica del proceso para detectar la mutación de la fibrosis quística $\Delta F508$ como se describe en el Ejemplo 3.

La Figura 14 es un espectro de masas del producto de extensión del ADN de un homocigótico normal para $\Delta F508$.

La Figura 15 es un espectro de masas del producto de extensión del ADN de un heterocigótico mutante para $\Delta F508$.

15 La Figura 16 es un espectro de masas del producto de extensión del ADN de un homocigótico normal para $\Delta F508$.

La Figura 17 es un espectro de masas del producto de extensión del ADN de un homocigótico mutante para $\Delta F508$.

20 La Figura 18 es un espectro de masas del producto de extensión del ADN de un heterocigótico mutante para $\Delta F508$.

La Figura 19 es una representación gráfica de diversos procesos para realizar el genotipado de la apolipoproteína E.

25 La Figura 20 muestra la secuencia de ácidos nucleicos de la apolipoproteína E normal (codificada por el alelo E3) y otros isotipos codificados por los alelos E2 y E4.

La Figura 21A muestra un patrón de restricción compuesto para diversos genotipos de apolipoproteína E.

30 La Figura 21B muestra el patrón de restricción obtenido en un gel de agarosa MetPhor al 3,5% para diversos genotipos de apolipoproteína E.

La Figura 21C muestra el patrón de restricción obtenido en un gel de poliacrilamida al 12% para diversos genotipos de apolipoproteína E.

35 La Figura 22A es una gráfica que muestra los pesos moleculares de los fragmentos de 91, 83, 72, 48 y 35 pares de bases obtenidos por escisión con enzimas de restricción de los alelos E2, E3 y E4 de la apolipoproteína E.

40 La Figura 22B son los espectros de masas del producto de restricción de una apolipoproteína homocigótica E4 de genotipo E.

La Figura 23A son los espectros de masas del producto de restricción de una apolipoproteína homocigótica E3 de genotipo E.

45 La Figura 23B son los espectros de masas del producto de restricción de una apolipoproteína homocigótica E3/E4 de genotipo E.

50 La Figura 24 es una autorradiografía de un gel de poliacrilamida al 7,5% en el que se cargó el 10% (5 μ l) de cada PCR. *Muestra M*: digerido con *AluI* de pBR322; *muestra 1*: VHB positivo por análisis serológico; *muestra 2*: también VHB positivo; *muestra 3*: sin análisis serológico pero con un nivel aumentado de transaminasas, lo que indica enfermedad hepática; *muestra 4*: VHB negativo; *muestra 5*: VHB positivo por análisis serológico; *muestra 6*: VHB negativo (-) control negativo; (+) control positivo). La tinción se realizó con bromuro de etidio.

55 La Figura 25A es un espectro de masas de la muestra 1, que es VHB positivo. La señal en 20754 Da representa el producto de PCR relacionado con VHB (67 nucleótidos, masa calculada: 20375 Da). La señal de masa en 10390 Da representa la señal $[M + 2H]^{2+}$ (calculada: 10376 Da).

60 La Figura 25B es un espectro de masas de la muestra 3, que es VHB negativo correspondiendo a los ensayos de PCR, serológico y punteado. Sin embargo se detecta de forma no ambigua en 20751 Da (calculada: 20753 Da). La señal de masas en 10397 Da representa el ión molecular $[M + 2H]^{2+}$ (calculada: 10378 Da).

La Figura 25C es un espectro de masas de la muestra 4, que es VHB negativo, pero CMV positivo. Como es de esperar, no pudo obtenerse ninguna señal específica para VIH.

65 La Figura 26 muestra una parte del gen *LacI* de *E. coli* con sitios de unión de los oligonucleótidos complementarios usados en la reacción en cadena de la ligasa (LCR). Aquí se presenta la secuencia natural. La mutante contiene una mutación puntual en el pb 191 que es también el sitio de ligamiento (negrita). La mutación es una transición de C a T (G a A respectivamente). Esto provoca un apareamiento incorrecto T-G con el oligo A (y un apareamiento incorrecto con el oligo B, respectivamente).

ES 2 194 985 T7

La Figura 27 es un gel de poliacrilamida al 7,5% teñido con bromuro de etidio. M: longitud de cadena estándar (ADN de pUC19, digerido con *MspI*). Línea 1: LCR con plantilla normal. Línea 2: LCR con plantilla mutante. Línea 3: (control) LCR sin plantilla. El producto de ligamiento (50 pb) se generó únicamente en el reactivo positivo que contiene la plantilla natural.

La Figura 28 es un cromatograma de HPLC de dos PCR positivas combinadas.

La Figura 29 muestra un cromatograma de HPLC las mismas condiciones pero se usaron plantillas mutantes. La reducida señal del producto de ligamiento es debida a ligamiento sin plantilla de los eductos o a un ligamiento en un apareamiento incorrecto (G-T, A-C). La señal de “falso positivo” es significativamente menor que la señal del producto de ligamiento con la plantilla natural representada en la Figura 28. El análisis de los eductos de ligamiento da como resultado picos dobles porque dos de los oligonucleótidos están fosforilados en 5’.

Figura 30 En a se representa el patrón complejo de la señal obtenido mediante análisis por EM MALDI-TOF de la solución de ADN ligasa de *Pfu*. En b se muestra el espectro MALDI-TOF de una LCR no purificada. La señal de masa de 67569 Da probablemente representa la ADN ligasa de *Pfu*.

La Figura 31 muestra un espectro MALDI-TOF de dos LCR positivos unidos (a). La señal en 7523 Da representa el oligo A no ligado (calculada: 7521 Da) mientras que la señal en 15449 Da representa el producto de ligamiento (calculada: 15450 Da). La señal en 3774 Da es la señal $[M+2H]^{2+}$ del oligo A. Las señales en el intervalo de masas por debajo de 2000 Da se deben a los iones de la matriz. El espectro corresponde a la línea 1 en la figura 2A y al cromatograma de la figura 2b. En b se muestra un espectro de dos LCR negativas combinadas (plantilla mutante). La señal en 7517 Da representa oligo A (calculada: 7521 Da). En c se muestra un espectro de dos reacciones de control unidas (con ADN de esperma de salmón como plantilla). Las señales en el intervalo de masas en torno a 2000 Da se deben a Tween20.

La Figura 32 muestra el espectro obtenido de dos LCR combinadas en las que sólo se usó ADN de esperma de salmón como control negativo, sólo pudo detectarse el oligo A, como se esperaba.

La Figura 33 muestra un espectro de dos LCR positivas combinadas (a). La purificación se realizó con una combinación de ultrafiltración y DynaBeads con estreptavidina como se describe en el texto. La señal en 15448 Da representa el producto de ligamiento (calculada: 15450 Da). La señal en 5727 representa oligo A (calculada: 7521 Da). Las señales en 3761 Da es la señal $[M+2H]^{2+}$ de oligo A, mientras que la señal en 5140 Da es la señal de $[M+3H]^{2+}$ del producto de ligamiento. En b se muestra el espectro de dos LCR negativos combinados (sin plantilla). La señal en 7514 Da representa oligo A (calculada: 7521 Da).

La Figura 34 es una presentación esquemática de la oligo extensión de bases del cebador de detección de la mutación b usando ddTTP (A) o ddCTP (B) en la mezcla de reacción, respectivamente. El cálculo de la masa teórica se da entre paréntesis. La secuencia que se muestra es parte del exón 10 del gen CFTR que porta la mutación de fibrosis quística más común $\Delta F508$ y las mutaciones más inusuales $\Delta I507$ así como Ile506Ser.

La Figura 35 es un espectro de EM MALDI-TOF registrado directamente de los cebadores extendidos de las oligo bases para la detección de la mutación. Los espectros en la parte superior de cada panel (ddTTP o ddCTP, respectivamente) muestran el cebador hibridado (CF508) sin reacción de extensión adicional. La plantilla de diagnóstico se indica debajo de cada espectro y se escriben las masas moleculares observadas/esperadas en paréntesis.

La Figura 36 muestra la porción de la secuencia de ADN de pRFc1 que se usó como plantilla para la amplificación por PCR de los ácidos nucleicos 99-mero y 200-mero no modificados que contienen 7-desazapurina así como las secuencias de los 19-mero cebadores y los dos 18-meros cebadores inversos.

La Figura 37 muestra la porción de la secuencia de nucleótidos de ADN de RFI M13mp18 que se usó para la amplificación por PCR de ácidos nucleicos 103-mero que contenían 7-desazapurina. También se muestran las secuencias de nucleótidos de los cebadores de 17-mero usados en la PCR.

La Figura 38 muestra el resultado de una electroforesis en gel de poliacrilamida de productos de PCR purificados y concentrados para análisis mediante EM MALDI-TOF. M: marcador de longitud de cadena, línea 1: producto de PCR 99-mero que contiene 7-desazapurina, línea 2: 99-mero no modificado, línea 3: 103-mero que contiene 7-desazapurina y línea 4: producto de PCR 103-mero no modificado.

Figura 39: un autorradiograma de electroforesis en gel de poliacrilamida de reacciones de PCR realizadas con cebadores marcados con 5’- ^{32}P 1 y 4. Líneas 1 y 2: producto de PCR 103-mero modificado con 7-desazapurina (contajes de 53321 y 23520), líneas 3 y 4: 200-mero no modificado y modificado con 7-desazapurina (contajes de 71123 y 39582) y líneas 5 y 6: 99-mero no modificado y modificado con 7-desazapurina (contajes de 173216 y 94400).

Figura 40 a) Espectro de masas MALDI-TOF de los productos de PCR 103-mero no modificados (suma de doce espectros de disparo único). El valor medio de las masas calculado para las dos cadenas únicas (31768 u y 31759 u) es 31763 u. Resolución de masas: 18. b) espectro de masas MALDI-TOF del producto de PCR 103-mero que contiene

7-desazapurina (suma de tres espectros de disparo único). El valor medio de las masas calculado para las dos cadenas únicas (31727 u y 31719 u) es 31723 u. Resolución de masas: 67.

Figura 41: a) Espectro de masas MALDI-TOF del producto de PCR 99-mero no modificado (suma de veinte espectros de disparo único). Los valores de las masas calculados para las dos cadenas únicas: 30261 u y 30794 u. b) espectro de masas MALDI-TOF del producto de PCR de 99-mero que contiene 7-desazapurina (suma de doce espectros de disparo único). Los valores medios de las masas calculadas para las dos cadenas únicas: 30224 u y 30750 u.

Figura 42: a) Espectro de masas MALDI-TOF del producto de PCR 200-mero no modificado (suma de 30 espectros de disparo único). El valor medio de las masas calculado para las dos cadenas únicas (61873 u y 61595 u) es 61734 u. Resolución de masas: 28. b) espectro de masas MALDI-TOF del producto de PCR 200-mero que contiene 7-desazapurina (suma de 30 espectros de disparo único). El valor medio de las masas calculado para las dos cadenas únicas (61772 u y 61514 u) es 61643 u. Resolución de masas: 39.

Figura 43: a) Espectro de masas MALDI-TOF del producto de PCR de 100-mero con cebadores ribomodificados. El valor medio de las masas calculado para las dos cadenas únicas (30529 u y 31095 u) es 30812 u. b) espectro de masas MALDI-TOF del producto de PCR 100-mero tras la escisión hidrolítica del cebador. El valor medio de las masas calculado para las dos cadenas únicas (25104 u y 25229 u) es 25167 u. El valor medio de los cebadores escindidos (5437 u y 5918 u) es 5677 u.

La Figura 44 A-D muestra el espectro de masas MALDI-TOF de las cuatro escaleras de secuenciación obtenidas del 39-mero plantilla (SEC. ID. N°: 13), que se inmovilizó sobre perlas de estreptavidina mediante una biotilación 3'. Se usó un 14-mero cebador (SEC. ID. N°: 14) en la secuenciación.

La Figura 45 muestra un espectro de masas MALDI-TOF de una secuenciación en estado sólido de una 78-mero plantilla (SEC. ID. N°: 15) que se inmovilizó sobre perlas de estreptavidina mediante una biotilación 3'. Se usaron un 18-mero cebador (SEC. ID. N°: 16) y ddGTP en la secuenciación.

La Figura 46 muestra un esquema en el que cebadores de ADN dobles con colgante capturan plantillas de ADN específicas y sirven también como cebadores para la secuenciación de estado sólido.

La Figura 47A-D muestra espectros de masas MALDI-TOF obtenidos a partir de un 23-mero marcado por fluorescencia en 5' (SEC. ID. N°: 19) hibridado con un 18-mero biotilado en 3' (SEC. ID. N°: 20), dejando un colgante de 5 bases, que captura una 5-mero plantilla (SEC. ID. N°: 21).

La Figura 48 muestra un fluorograma de apilado de los mismos productos obtenidos a partir de la reacción descrita en la Figura 35, pero realizado en un secuenciador de ADN convencional.

Descripción detallada de la invención

En general, la presente invención provee procesos de espectrometría de masas para detectar una secuencia de ácidos nucleicos en una muestra biológica. Según se usa en este documento, el término "muestra biológica" se refiere a cualquier material obtenido de cualquier fuente viva (por ejemplo humano, animal, vegetal, bacteria, hongo, protista, virus). Para ser usada en la invención, la muestra biológica debe contener una molécula de ácido nucleico. Los ejemplos de muestras biológicas adecuadas para usar en la presente invención incluyen: materiales sólidos (por ejemplo tejido, precipitados celulares, biopsias) y fluidos biológicos (por ejemplo orina, sangre, saliva, fluido amniótico, enjuague bucal).

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden aislarse de una muestra biológica particular usando uno cualquiera de diversos procedimientos, que son bien conocidos en la técnica, siendo el procedimiento de aislamiento elegido apropiado para la muestra biológica en particular. Por ejemplo, pueden ser útiles los procedimientos de congelado-descongelado y lisis alcalina para obtener moléculas de ácidos nucleicos de materiales sólidos; los procedimientos de calor y lisis alcalina pueden ser útiles para obtener moléculas de ácidos nucleicos en por en la orina; y la extracción con proteinasa K puede usarse para obtener ácidos nucleicos de la sangre (Rolff, A y cols. PCR: Clinical Diagnosis and Research, Springer (1994)).

Para obtener una cantidad adecuada de moléculas de ácidos nucleicos en las que realizar la espectrometría de masas, puede ser necesaria la amplificación. Los ejemplos de procedimientos de amplificación apropiados para usarse en la invención incluyen: clonación (Sambrook y cols, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (C.R. Newton y A. Graham, PCR, BIOS Publishers, 1994), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Wiedmann, M., y cols, (1994) *PCR Methods Appl.* Vol. 3, Págs. 57-64; F. Barany *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 189-93 (1991), amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) (G. Terrance Walter y cols., *Nucleic Acids Res.* 22, 2670-77 (1994)) y variaciones tales como RT-PCR (Higuchi, y cols., *Bio/Technology* 11: 1026-1030 (1993)), la amplificación específica de alelo (ASA) y procesos basados en la transcripción.

Para facilitar el análisis espectrométrico de masas, puede inmovilizarse sobre un soporte sólido una molécula de ácido nucleico que contiene una secuencia de ácidos nucleicos a detectar. Los ejemplos de soportes sólidos apropiados incluyen perlas (por ejemplo de gel de sílice, de vidrio de poro controlado, magnéticas, de Sephadex/Sepharose, de celulosa) superficies planas o placas (por ejemplo filtros de fibra de vidrio, superficies de vidrio, superficies metálicas (acero, oro, plata, aluminio, cobre y sílice), capilares, plásticos (por ejemplo membranas de polietileno, polipropileno, poliamida, difluoruro de polivinilideno o placas de microtitulación)); o puntas o salientes hechos de materiales similares que comprenden perlas o superficies planas o perlas colocadas en pocillos en superficies planas como pastillas (por ejemplo pastillas de silicio).

La inmovilización puede lograrse, por ejemplo, basándose en la hibridación entre una secuencia de ácidos nucleicos de captura, que ha sido ya inmovilizada sobre el soporte y una secuencia de ácidos nucleicos complementaria, que se contiene también en la molécula de ácido nucleico que contiene la secuencia de ácidos nucleicos a detectar (Figura 1A). Para que la hibridación entre las moléculas de ácidos nucleicos complementarias no sea entorpecida por el soporte, el ácido nucleico de captura puede incluir una región espaciadora de al menos aproximadamente cinco nucleótidos de longitud entre el soporte sólido y la secuencia de ácidos nucleicos de captura. La cadena doble formada será escindida por influencia de pulso de láser y puede iniciarse la desorción. La secuencia base unida al soporte sólido puede representarse a través de oligorribonucleótidos naturales así como análogos (por ejemplo esqueletos de fosfodiéster tiomodificado o fosfotriéster) o empleando oligonucleotidomiméticos como los análogos de ANP (véase por ejemplo Nielsen y cols., *Science*, 254, 1497 (1991)) que hacen la secuencia base menos susceptible a la degradación enzimática y por lo tanto aumentan la estabilidad global de la secuencia base de captura unida al soporte sólido.

De forma alternativa, puede ligarse directamente un sitio de detección diana sobre un soporte sólido mediante un enlace reversible o irreversible entre una función apropiada (L') en la molécula de ácido nucleico diana (T) y un función adecuada (L) o la molécula de captura (Figura 1B). Un enlace reversible puede ser uno tal que si se escinde en condiciones de espectrometría de masas (es decir un enlace fotoescindible, como un complejo de transferencia de cargas o un enlace lábil, que se forma entre radicales orgánicos relativamente estables). Además, el ligamiento puede formarse siendo L' un grupo de amonio cuaternario, en cuyo caso, preferiblemente la superficie del soporte sólido porta cargas negativas que repelen el esqueleto de ácidos nucleicos con carga negativa y así facilitan la desorción requerida para el análisis mediante un espectrómetro de masas. La desorción puede ocurrir bien por el calor creado mediante el pulso de láser y/o dependiendo de L' por la absorción específica de la energía láser que está en resonancia con el cromóforo L'.

Por ejemplo, el enlace L-L' puede ser de un tipo de enlace disulfuro (escindible químicamente, por ejemplo, mediante mercaptoetanol o ditioeritrol), un sistema de biotina/estreptavidina, un derivado heterobifuncional o un grupo de tritiléter (Köster y cols., "A Versatile Acid-Labile Linker for Modification of Synthetic Biomolecules", *Tetrahedron Letters* 31, 7095 (1990)) que puede escindirse en condiciones levemente ácidas así como en condiciones de espectrometría de masas, un grupo de levulinilo escindible en condiciones casi neutras con un tampón de hidrazinio/acetato, un enlace arginina-arginina o lisina-lisina escindible mediante una enzima endopeptidasa como la tripsina o un enlace pirofosfato escindible mediante una pirofosfatasa, o un enlace ribonucleotídico entre la secuencia del oligodesoxinucleótido, que puede escindirse, por ejemplo mediante una ribonucleasa o una base.

Las funciones L y L', pueden formar también un complejo de transferencia de carga y de ese modo formar el ligamiento L-L' temporal. Dado que en muchos casos la "banda de transferencia de carga" puede determinarse por espectrometría UV/vis (véase por ejemplo *Organic Charge Transfer Complexes* de R. Foster, Academic Press, 1969), la energía láser puede ajustarse a la energía correspondiente de la longitud de onda de transferencia de cargas, pudiendo así, iniciarse una desorción específica del soporte sólido. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden servir varias combinaciones para este fin y que la función de donante puede ser en el soporte sólido o asociada a la molécula de ácido nucleico a detectar o viceversa.

En otra estrategia más, puede generarse un ligamiento L-L' reversible formando homolíticamente radicales relativamente estables. Con la influencia del pulso láser, tendrá lugar la desorción (como se explica anteriormente) así como la ionización en la posición del radical. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden seleccionarse otros radicales orgánicos y que, en relación con las energías de disociación necesarias para escindir homolíticamente el enlace entre ellos, puede seleccionarse una longitud de onda láser (véase por ejemplo *Reactive Molecules* de C. Wentrup, John Wiley & Sons, 1984).

También puede incorporarse una función L' de anclaje a una secuencia de captura de diana (TCS) usando cebadores apropiados durante un procedimiento de amplificación, como PCR (Figura 4), LCR (Figura 5) o amplificación de la transcripción (Figura 6A).

Antes del análisis espectrométrico de masas, puede ser útil "acondicionar" las moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo para disminuir la energía láser necesaria para la volatilización y/o para minimizar la fragmentación. El acondicionamiento se realiza preferiblemente mientras está inmovilizado un sitio de detección diana. Un ejemplo de acondicionamiento es la modificación del esqueleto de fosfodiéster de la molécula de ácido nucleico (por ejemplo intercambio de cationes), que puede ser de utilidad para eliminar el ensanchamiento de los picos debido a una heterogeneidad de los cationes unidos por unidad nucleotídica. Al poner en contacto una molécula de ácido nucleico con un agente de alquilación como un alquilyoduro, yodoacetamida, β -yodoetanol, 0 2,3-epoxi-1-propanol, los enlaces

monotiofosfodiéster de una molécula de ácido nucleico pueden transformarse en un enlace fosfotriéster. Del mismo modo, los enlaces fosfodiéster pueden transformarse en derivados sin carga empleando cloruros de trialkilsililo. El acondicionamiento adicional implica la incorporación de nucleótidos que reducen la sensibilidad a la despurinación (fragmentación durante EM) como N7- o N9-desazapurinanucleótidos, o bloques de construcción de ARN o usando triésteres de oligonucleótidos o incorporando funciones fosforotioato que están alquiladas o empleando oligonucleótido miméticos como ANP.

Para ciertas aplicaciones, puede ser de utilidad detectar simultáneamente más de un locus (mutado) en un fragmento de ácidos nucleicos capturado particular (en un punto de un sistema matricial) o puede ser de utilidad realizar un procesamiento paralelo usando sistemas matriciales de oligonucleótidos u oligonucleótido miméticos en diversos soportes sólidos. El "multiplexado" puede lograrse mediante diversas metodologías diferentes. Por ejemplo, pueden detectarse diversas mutaciones simultáneamente en la secuencia diana empleando las moléculas de detección (sondas) correspondientes (por ejemplo oligonucleótidos u oligonucleótido miméticos). Sin embargo, las diferencias en el peso molecular entre los oligonucleótidos de detección D1, D2 y D3 deben ser lo suficientemente grandes para que sea posible la detección simultánea (multiplexado). Esto puede lograrse ya sea por la secuencia en sí misma (composición o longitud) o por la introducción de funciones que modifican la masa M1-M3 en el oligonucleótido de detección (Figura 2).

Los restos que modifican la masa pueden unirse, por ejemplo, al extremo 5' del oligonucleótido (M^1), a la nucleobase (o bases) (M^2 , M^7), al esqueleto de fosfato (M^3), y a la posición 2' del nucleósido (nucleósidos) (M^4 , M^6) o/y a la posición del extremo 3' (M^5). Los ejemplos de restos que modifican la masa incluyen, por ejemplo, un halógeno, una azida, o del tipo XR, donde X es un grupo de enlace y R es una función que modifica la masa. La función que modifica la masa puede usarse así para introducir incrementos de masa definidos en la molécula oligonucleotídica.

Aquí la fracción que modifica la masa, M, puede unirse a la nucleobase, M^2 (en el caso de los c⁷-desazanucleósidos también a C-7, M^7), al grupo trifosfato en el fosfato alfa, M^3 , o a la posición 2' del anillo de azúcar en el nucleosido-trifosfato M^4 y M^6 . Además, la función que modifica la masa puede añadirse para afectar la terminación de la cadena, como uniéndose a la posición 3' del anillo de azúcar en el nucleosidofosfato, M^5 . Para los expertos en la técnica, está claro que muchas combinaciones pueden servir para el fin de la invención igual de bien. Del mismo modo, los expertos en la técnica reconocerán que puede modificarse también la masa de los nucleosidotrifosfatos de elongación de cadena de forma similar con numerosas variaciones y combinaciones de las funciones y posiciones de unión.

Sin limitar el alcance de la invención, la modificación de masa, M, puede introducirse para X en XR así como el uso de derivados de oligo/polietilenglicol de R. El incremento de modificación de masa en este caso es 44, es decir pueden generarse cinco especies diferentes con modificación de masa simplemente cambiando m de 0 a 4 añadiendo así unidades de masa de 45 (m=0), 89 (m=1), 133 (m=2), 177 (m=3) y 221 (m=4) a la molécula de ácido nucleico (por ejemplo el oligonucleótido de detección (D) o los nucleosidotrifosfatos (Figura 6(C)), respectivamente). Los oligo/polietilenglicoles pueden estar también monoalquilados por un alquilo inferior como metilo, etilo, propilo, isopropilo, t-butilo y similares. Se ilustra también una selección de funciones de ligamiento, X. Pueden usarse otras reacciones en los compuestos de masa modificada, como por ejemplo, los recientemente descritos en *Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach*, F. Eckstein, Editor, IRL Press, Oxford, 1991.

En otra realización más, pueden seleccionarse diversas funciones de modificación de masa, R, diferentes a los oligo/polietilenglicoles y unirse mediante reacciones de ligamiento apropiadas, X. Una modificación de masa simple puede lograrse sustituyendo H por halógenos como F, Cl, Br y/o I, o pseudohalógenos como SCN, NCS, o usando diferentes restos alquilo, arilo o aralquilo como metilo, etilo, propilo, isopropilo, t-butilo, hexilo, fenilo sustituido, bencilo, o grupos funcionales como CH_2F , CHF_2 , CF_3 , $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2(\text{C}_2\text{H}_5)$, $\text{Si}(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)_2$, $\text{Si}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$. Puede obtenerse otra modificación de masa uniendo los homo- o heteropéptidos a través de la molécula de ácido nucleico (por ejemplo detector (D)) o nucleosidotrifosfatos. Un ejemplo de utilidad para generar especies de masa modificada con un incremento de masa de 57 es la unión de oligoglicinas, por ejemplo, se logran modificaciones de masa de 74 (r=1, m=0), 133 (r=1, m=2), 188 (r=1, m=3), 245 (r=1, m=4). Pueden usarse también oligoamidas simples, por ejemplo pueden obtenerse modificaciones de masa de 74 (r=1, m=0), 88 (r=2, m=0), 102 (r=3, m=0), 116 (r=4, m=0), etc. Para los expertos en la técnica, será obvio que existen numerosas posibilidades además de las mencionadas anteriormente.

Según se usa en el presente documento, el superíndice 0-i designa nucleótidos, cebadores o marcadores con una diferencia de masa de i + 1. En algunos casos, el superíndice 0 puede designar una especie no modificada de un reactivo particular. Si, por ejemplo, se va a detectar a la vez más de una especie de ácidos nucleicos, entonces pueden usarse i + 1 oligonucleótidos diferentes de detección con masas modificadas (D^0 , D^1 , ..., D^i) para distinguir cada especie de oligonucleótidos de detección de masa modificada (D) de los otros en la espectrometría de masas.

Pueden usarse diferentes oligonucleótidos de detección de masa modificada para detectar simultáneamente todas las posibles variaciones/mutantes (Figura 6B). De forma alternativa, pueden detectarse todas las permutaciones de las cuatro bases en el sitio de una mutación diseñando y posicionando un oligonucleótido de detección de forma que sirva como cebador para la ADN/ARN polimerasa (Figura 6C). Por ejemplo, pueden incorporarse también las modificaciones de masa durante el proceso de amplificación.

La Figura 3 muestra un formato de detección multiplexada diferente, en el que la diferenciación se logra empleando secuencias de captura diferentes que se inmovilizan específicamente en una posición sobre una superficie plana (por ejemplo un “sistema matricial de placas”). Si hay presentes diferentes secuencias diana T1-Tn, sus sitios de captura diana TCS1-TCSn interactuarán específicamente con secuencias de captura inmovilizadas complementarias C1-Cn.

5 La detección se logra empleando oligonucleótidos de detección con diferenciaciones de masa apropiadas D1-Dn, con masas diferenciadas ya sea por sus secuencias o por funciones de modificación de masas M1-Mn.

Los formatos de espectrometría de masas preferidos para usarse en la invención son la desorción/ionización asistida por láser (MALDI), electropulverización (ES), resonancia de ión-ciclotrón (ICR) y Transformada de Fourier. Para el ES, las muestras, disueltas en agua o en un tampón volátil, se inyectan de forma continua o discontinua en una interfase de ionización a presión atmosférica (API) y después se analiza su masa mediante un cuadrupolo. La generación de múltiples picos iónicos que pueden obtenerse usando la espectrometría de masas ES puede aumentar la exactitud de la determinación de la masa. Puede obtenerse información incluso más detallada de la estructura específica usando una configuración de cuadrupolo EM/EM.

En la espectrometría de masas MALDI, pueden usarse diversos analizadores de masas, por ejemplo instrumentos de sector magnético/deflexión magnética en configuraciones de modo de cuadrupolo único o triple (EM/EM), Transformada de Fourier y tiempo de vuelo (TOF) como se conoce en la técnica de la espectrometría de masas. Para el proceso de desorción/ionización, pueden usarse numerosas combinaciones de matriz/láser. Pueden emplearse también configuraciones de trampa de iones y reflectrón.

Pueden usarse los procesos de espectrometría de masas descritos anteriormente, por ejemplo, para diagnosticar cualquiera de las más de 3000 enfermedades genéticas conocidas actualmente (por ejemplo hemofilias, talasemias, distrofia muscular de Duchenne (DMD), enfermedad de Huntington (HD), enfermedad de Alzheimer y fibrosis quística (CF)) o todavía por identificar.

El siguiente Ejemplo 3 proporciona un método de espectrometría de masas para detectar una mutación ($\Delta F508$) del gen regulador de la conductividad transmembranosa en la fibrosis quística (CFTR) que difiere únicamente en tres pares de bases (900 daltons) del gen CFTR natural. Como se describe adicionalmente en el Ejemplo 3, la detección se basa en una reacción de extensión de base única de oligonucleótidos competitiva de tubo único (COSBE) usando un par de cebadores con la base del extremo 3' complementaria a cualquiera de los dos alelos normal o mutante. Al hibridarse y añadirse una polimerasa y el nucleosidotrifosfato una base cadena abajo, se extienden únicamente aquellos cebadores hibridados de forma apropiada (es decir sin apareamiento incorrecto en el extremo 3'); los productos se resuelven por desplazamientos del peso molecular determinados mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización desorción por láser asistida por matriz. Para el polimorfismo $\Delta F508$ de la fibrosis quística, los cebadores 28-mero “normal” (N) y 30-mero “mutante” (M) generan 29- y 31-meros de los homocigotos N y M, respectivamente, y ambos para los heterocigotos. Dado que los pesos moleculares del cebador y el producto son relativamente bajos (< 10 kDa) y la diferencia de masas entre éstos es al menos la de una unidad nucleotídica de ~300 Da, la instrumentación de baja resolución es adecuada para tales mediciones.

Además de los genes mutados, que dan como resultado la enfermedad genética, ciertos defectos de nacimiento son resultado de anomalías cromosómicas como trisomía 21 (síndrome de Down), Trisomía 13 (síndrome de Patau), trisomía 18 (síndrome de Edward), monosomía X (síndrome de Turner) y otras aneuploidías del cromosoma sexual como el síndrome de Klinefelter (XXY).

Además, existen cada vez más pruebas de que ciertas secuencias de ADN pueden predisponer a un individuo a cualquiera de numerosas enfermedades como diabetes, arteriosclerosis, obesidad, diversas enfermedades autoinmunitarias y cáncer (por ejemplo colorectal, de mama, de ovario, de pulmón); anomalía cromosómica (ya sea de forma prenatal o postnatal); o una predisposición a una enfermedad o estado (por ejemplo obesidad, arteriosclerosis, cáncer). Además, la detección de “huellas genéticas de ADN”, por ejemplo polimorfismos, tales como “secuencias microsátélites”, son de utilidad para determinar la identidad o herencia (por ejemplo paternidad o maternidad).

El siguiente Ejemplo 4 proporciona un método de espectrometría de masas para identificar cualquiera de las tres isoformas diferentes de apolipoproteína E humana, que codifican los alelos E2, E3, y E4. Aquí pueden usarse los pesos moleculares de los fragmentos de ADN obtenidos después de la restricción con endonucleasas de restricción adecuadas para detectar la presencia de una mutación.

Dependiendo de la muestra biológica, puede preformarse un diagnóstico de una enfermedad genética, aneuploidía cromosómica o predisposición genética ya sea de forma pre o postnatal.

Los virus, bacterias, hongos y otros organismos infecciosos contienen secuencias de ácidos nucleicos distintivas, que se diferencian de las secuencias contenidas en la célula hospedadora. La detección o cuantificación de secuencias de ácidos nucleicos que son específicas del organismo infeccioso es importante para diagnosticar o controlar la infección. Los ejemplos de virus que causan enfermedades que infectan humanos y animales y que pueden detectarse mediante los procesos descritos incluyen: *Retroviridae* (por ejemplo virus de inmunodeficiencia humana, como VIH-1 (denominados también HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, véase Ratner, L. y cols., *Nature*, Vol. 313, Págs. 227-284 (1985); Wain Hobson, S. y cols., *Cell*, Vol. 40: Págs 9-17 (1985)); VIH-2 (véase Guyader y cols., *Nature*, Vol. 328, Págs. 662-669 (1987); publicación de patente europea nº 0 269 520; Chakraborti y cols., *Nature*, Vol. 328, Págs. 543-

547 (1987); y solicitud de patente europea nº 0 655 501); y otros aislados, como VIH-LP (publicación internacional nº WO 94/00562 titulada "A Novel Human Immunodeficiency Virus") *Picornaviridae* (por ejemplo, virus de la polio, virus de la hepatitis A, (Gust, I.D., y cols., *Intervirolgy*, Vol. 20, Págs 1-7 (1983), enterovirus, virus Cocksackie humano, rinovirus, ecovirus); *Calciviridae* (por ejemplo cepas que provocan gastroenteritis); *Togaviridae* (por ejemplo virus de la encefalitis equina, virus de rubéola); *Flaviridae* (por ejemplo virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); *Coronaviridae* (por ejemplo coronavirus); *Rhabdoviridae* (por ejemplo virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); *Filoviridae* (por ejemplo virus del ébola); *Paramyxoviridae* (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de parotiditis, virus del sarampión, virus de sincitio respiratorio); *Orthomyxoviridae* (por ejemplo virus de la gripe); *Bunyaviridae* (por ejemplo virus de hantaan, virus de bunga, flebovirus y virus de Naira); *Arenaviridae* (virus de la fiebre hemorrágica); *Reoviridae* (por ejemplo reovirus, orbivirus y rotavirus); *Birnaviridae*; *Hepadnaviridae* (virus de la Hepatitis B); *Parvoviridae* (parvovirus); *Papovaviridae* (virus del papiloma, virus del polioma); *Adenoviridae* (la mayoría de los adenovirus); *Herpesviridae* (virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, virus de la varicella zoster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); *Poxviridae* (virus de la viruela, virus vaccinia, virus de la viruela); e *Iridoviridae* (por ejemplo el virus de la fiebre porcina africana); y virus sin clasificar (por ejemplo los agentes etiológicos de encefalopatías espongiformes, el agente de la hepatitis delta (que se piensa que es un satélite deficiente del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no-A no-B (clase 1= de transmisión interna; clase dos= de transmisión parenteral (es decir, Hepatitis C); virus de Norwalk y relacionados y astrovirus).

Los ejemplos de bacterias infecciosas incluyen: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria sp.* (por ejemplo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansaii*, *M. gordonae*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* grupo A), *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* Grupo B); *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sp. anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter sp.* patógenas, *Enterococcus sp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium sp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasturella multocida*, *Bacteriodes sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, y *Actinomyces israelii*.

Los ejemplos de hongos infecciosos incluyen: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Otros organismos infecciosos (es decir protistas) incluyen: *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii*.

El siguiente Ejemplo 5 proporciona una PCR progresiva y método basado en el espectrofotómetro de masas que se usó para detectar el ADN del virus de la hepatitis B (VHB) en muestras de sangre. De forma similar, pueden detectarse otros virus transmitidos por la sangre (por ejemplo VIH-1, VIH-2, virus de la hepatitis C (HCV), virus de la hepatitis A (HAV) y otros virus de la hepatitis (por ejemplo, hepatitis no-A, no-B, hepatitis G, hepatitis E), citomegalovirus, y virus del herpes simple (HSV)) cada uno individualmente o en combinación basándose en los métodos aquí descritos.

Dado que la secuencia de aproximadamente 16 nucleótidos es estadísticamente específica (incluso para un genoma tan grande como el genoma humano), pueden usarse secuencias de ácidos nucleicos relativamente cortas para detectar genes normales y deficientes en organismos superiores y para detectar microorganismos infecciosos (por ejemplo bacterias, hongos, protistas y levaduras) y virus. Las secuencias de ADN pueden servir como huella genética para la detección de individuos diferentes dentro de la misma especie. (Thompson, J.S. y M.W. Thompson, editores, *Genetics in Medicine*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, PA (1986).

Un proceso para detectar una secuencia de tipo natural (D^{wt}) y/o una mutante (D^{mut}) en una molécula de ácido nucleico diana (T) se muestra en la Figura 1C. Una secuencia de captura específica (C) se une sobre un soporte sólido (ss) mediante un espaciador (s). Además, la secuencia de captura se elige para interactuar específicamente con una secuencia complementaria de la molécula de ácido nucleico diana (T), conocida como sitio de captura diana (TCS) para ser detectada mediante la hibridación. Sin embargo, si el sitio de detección diana (TDS) incluye una mutación, X, que aumenta o disminuye el peso molecular, el TDS mutado puede distinguirse del natural mediante espectrometría de masas. Por ejemplo, en el caso de una inserción de una base de adenina (dA), la diferencia de los pesos moleculares entre D^{wt} y D^{mut} debe ser de unos 314 daltons.

Preferiblemente, el ácido nucleico de detección (D) se diseña de tal forma que la mutación debe estar en mitad de la molécula y las regiones que la flanquean son lo suficientemente cortas para que no se forme un híbrido estable si el oligonucleótido de detección normal (D^{wt}) se pone en contacto la secuencia de detección mutada diana como control. La mutación puede detectarse también si el oligonucleótido de detección mutado (D^{mut}) se usa para la hibridación con la base correspondiente en la posición mutada. Si un ácido nucleico obtenido de una muestra biológica es heterocigoto para la secuencia particular (es decir contiene tanto D^{wt} como D^{mut}), tanto D^{wt} como D^{mut} estarán unidas a la cadena apropiada y la diferencia de las masas permitirá la detección simultánea de D^{wt} y D^{mut} .

El proceso de esta invención hace uso de la información de la secuencia conocida de la secuencia diana y de los sitios de mutación conocidos. Aunque también pueden detectarse nuevas mutaciones. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 8, la transcripción de una molécula de ácido nucleico obtenida de una muestra biológica puede digerirse específicamente usando una o más nucleasas y los fragmentos capturados sobre un soporte sólido que portan las secuencias de ácidos nucleicos complementarias. La detección de la hibridación y los pesos moleculares de las

secuencias diana capturadas proporcionan la información sobre si y donde está presente una mutación génica. De forma alternativa, el ADN puede escindir-se mediante una o más endonucleasas específicas para formar una mezcla de fragmentos. La comparación de los pesos moleculares entre las mezclas de fragmentos normales y mutantes da como resultado la detección de la mutación.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitaciones en modo alguno. La publicación de solicitud de patente internacional número WO 94/1601 se titula *DNA Sequencing by Mass Spectrometry*; y la publicación de solicitud de patente internacional con número de publicación WO 94/21822 se titula "DNA sequencing by Mass Spectrometry Via Exonuclease Degradation".

Ejemplo 1

Desorción MALDI-TOF de nucleótidos directamente sobre soportes sólidos

Se funcionalizó 1 g de CPG (Vidrio de poro controlado) con 3-(trietoxisilil)-epoxipropano para formar grupo OH en la superficie del polímero. Una síntesis de oligonucleótidos estándar con 13 mg del OH-CPG en un aparato MilliGen DNA Synthesizer (Milligen, Modelo 7500) empleando β -cianoetil-fosfoamiditas (Köster y cols., *Nucleic Acids Res.*, **12**, 4539 (1994) y grupos protectores de N TAC (Köster y cols., *Tetrahedron*, **37**, 362 (1981)) se realizó para sintetizar una secuencia de oligonucleótidos 3'-T5-50mero en la que 50 nucleótidos son complementarios a una "hipotética" secuencia de 50-mero. T₅ sirve como espaciador. La desprotección con amonio saturado en metanol a temperatura ambiente durante 2 horas dio de acuerdo con la determinación del grupo DMT CPG que contenía aproximadamente 10 μ mol del 55-mero/g de CPG. Este 55-mero sirvió como plantilla para hibridaciones con 26-meros (con el grupo 5'-DMT) y un 40-mero (sin el grupo DMT). El volumen de reacción es 100 μ l y contiene aproximadamente 1 μ mol de 55-mero unido a CPG como plantilla, una cantidad equimolar de oligonucleótidos en solución (26-mero o 40-mero) en Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, MgCl₂ 10 mM y NaCl 25 mM. La mezcla se calentó durante 10' a 65°C y se enfrió a 37°C durante 30' (hibridación). El oligonucleótido que no había sido hibridado a la plantilla unida al polímero se eliminaron por centrifugación y tres etapas subsiguientes de lavado/centrifugado con 100 μ l cada uno de citrato amónico 50 mM helado. Las perlas se secaron al aire con solución de matriz (ácido 3-hidroxipicolínico/citrato amónico 10 mM en acetonitrilo/agua, 1:1), y se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. Los resultados se presentan en las Figuras 10 y 11.

Ejemplo 2

Desorción y diferenciación por electropulverización (ES) de un 18-mero y un 19-mero

Se analizaron simultáneamente fragmentos de ADN con una concentración de 50 pmol/ μ l en 2-propanol/carbonato amónico 10 mM (1/9, v/v) con un espectrómetro de masas de electropulverización.

La exitosa desorción y diferenciación de un 18-mero y 19-mero por espectrometría de masas por electropulverización se muestra en la Figura 12.

Ejemplo 3

Detección de la mutación de la fibrosis quística, $\Delta F508$, mediante extensión didesoxi de etapa única y análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

Materiales y métodos

Amplificación por PCR e inmovilización de cadena. La amplificación se realizó con cebadores específicos del exón 10 usando condiciones estándar de PCR (30 ciclos: 1' a 95°C, 1' a 55°C, 2' a 72°C); el cebador inverso se marcó en 5' con biotina y se purificó en columna (Oligopurification Cartridge, Cruachem). Después de la amplificación los productos de PCR se purificaron por separación en columna (Qiagen Quickspin) y se inmovilizaron sobre perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynabeads, Dynal, Noruega) de acuerdo con su protocolo estándar; el ADN se desnaturalizó usando NaOH 0,1 M y se lavó con NaOH 0,1 M, tampón 1 x B+W y tampón TE para eliminar la cadena homosentido no biotinilada.

Condiciones COSBE. Las perlas que contenían cadena antisentido ligada se resuspendieron en 18 μ l de mezcla de reacción 1 (2 μ l 10X tampón de *Taq*, 1 μ l (1 unidad) Polimerasa de *Taq*, 2 μ l de dGTP 2 mM, y 13 μ l de H₂O) y se incubó a 80°C durante 5' antes de añadir la mezcla de reacción 2 (100 ng cada uno de cebadores COSBE). Se redujo la temperatura a 60°C y las mezclas se incubaron a durante un periodo de 5' de hibridado/extensión; las perlas se lavaron entonces en acetato de trietilamonio 25 mM (TEAA) seguido de citrato amónico 50 mM.

Secuencias de cebadores. Todos los cebadores se sintetizaron en un aparato Expedite 8900 DNA Synthesizer de Biosystems usando reacciones de fosforamidita convencionales (Sinha y cols. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**: 4539. Los cebadores COSBE (ambos que contenían un apareamiento incorrecto intencional una base antes del extremo 3') fueron

ES 2 194 985 T7

los usados en un estudio anterior de ARMS (Ferrie y cols., (1992) *Am J Hum Genet* 51:251-262) con la excepción de que las dos bases se eliminaron del extremo 5' de los normales:

Ex10 PRC (directa): 5'-BIO-GCA AGT GAA TCC TGA GCG TG-3' (SEC. ID. N°: 1)

Ex10 PRC (inversa): 5'-GTC TGA AGG GTT CAT ATG C-3' (SEC. ID. N°: 2)

COSBE ΔF508-N: 5'-ATC TAT ATT CAT CAT AGG AAA CAC CAC A-3' (28-mero) (SEC. ID. N°: 3)

COSBE ΔF508-M: 5'-GTA TCT ATA TTC ATC ATA GGA AAC ACC ATT-3' (30-mero) (SEC. ID. N°: 4)

Espectrometría de masas. Después de lavar, las perlas se resuspendieron en 1 μ l de H₂O 18 Mohm/cm. 300 μ l cada uno de matriz (Wu y cols., 1993) solución (ácido 3-hidroxipicolínico 0,7 M citrato amónico dibásico en H₂O:CH₃CN 1:1) y perlas resuspendidas (Tang y cols. (1995) *Rapid Commun. Mass Spectrom* 8:727-730) se mezclaron en una diana muestra y se dejaron secar al aire. Se sembraron hasta 20 muestras en un disco diana sonda para introducirse en la región fuente de un aparato Visions 2000 de Termo Bioanalysis (anteriormente Finnigan) de MALDI-TOF sin modificar operado en modo reflector con 5 y 20 kV en la diana y el dinodo de conversión respectivamente. Los pesos moleculares medios teóricos (M_r (calc)) se calcularon a partir de las composiciones atómicas. El software provisto por el vendedor se usó par determinar los centroides de los picos usando una calibración externa; 1 08 Da se ha restado de éstos para corregir la masa del protón que porta la carga para dar los valores M_r (exp) del texto.

Esquema. Al hibridarse al molde unido, los cebadores N y M (8508,6 y 9148,0 Da, respectivamente) se presentan con dGTP; únicamente los cebadores con pareado de bases de Watson-Crick apropiados en la posición (V) variable son extendidos por la polimerasa. Así, si V se empareja con la base del extremo 3' de N, N se extiende para dar un producto de 8837,9 Da (N+1). Del mismo modo, si V se empareja de forma apropiada al extremo M, M se extiende para dar un producto de 9477,3 Da M+1.

Resultados

Las figuras 14-18 muestran los espectros de masas representativos de los productos de la reacción COSBE. Se obtuvieron mejores resultados cuando los productos de la PCR se purificaron antes de unir la cadena antisentido biotinilada.

Ejemplo 4

Diferenciación de isoformas de la apolipoproteína humana E por espectrometría de masas

La apolipoproteína E (Apo E), un componente proteínico de las lipoproteínas, juega un papel esencial en el metabolismo lipídico. Por ejemplo, está implicado en el transporte del colesterol, el metabolismo de partículas lipoproteínicas, inmunorregulación y activación de numerosas enzimas lipolíticas.

Hay tres isoformas comunes de Apo E humana (codificadas por los alelos E2, E3 y E4). El más común es el alelo E3. Se ha demostrado que el alelo E2 disminuye el nivel de colesterol en el plasma y por lo tanto puede tener un efecto protector contra el desarrollo de la arteriosclerosis. Finalmente, la isoforma E4 se ha correlacionado con un aumento de los niveles de colesterol, confiriendo predisposición a la arteriosclerosis. Por lo tanto, la identidad del alelo apo E de un individuo particular es un determinante importante del riesgo del desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Como se muestra en la Figura 19, puede obtenerse de un sujeto una muestra de ADN que codifica la apolipoproteína E, amplificarse (por ejemplo vía PCR); y el producto de PCR puede digerirse usando una enzima apropiada (por ejemplo CfoI). El resultado de la digestión de restricción obtenido puede analizarse entonces por varios medios. Como se demuestra en la Figura 20, los tres isotipos de apolipoproteína E (E2, E3 y E4) tiene secuencias de ácidos nucleicos diferentes y por lo tanto también tienen valores de peso molecular diferenciabiles.

Como se muestra en la Figura 21 A-C, los genotipos de apolipoproteína E diferentes exhiben patrones de restricción diferentes en un gel de agarosa MetPhor al 3,5% o gel de poliacrilamida al 12%. Como se muestra en las Figuras 22 y 23, los diversos genotipos de apolipoproteína E pueden determinarse también de forma exacta y rápida por espectrometría de masas.

Ejemplo 5

*Detección del virus de la hepatitis B en muestras de suero*5 *Materiales y métodos**Preparación de las muestras*

10 La extracción en fenol/cloroformo de ADN viral y la precipitación final en etanol se hizo de acuerdo con protocolos estándar.

Primera PCR

15 Cada reacción se realizó con 5 μ l de la preparación de ADN de suero. Se usaron 15 pmoles de cada cebador y 2 unidades de ADN polimerasa de Taq (Perkin Elmer, Weiterstat, Alemania). La concentración final de cada dNTP fue de 200 μ M, el volumen de reacción final era 50 μ l. 10 x tampón de PCR (Perkin Elmer, Weiterstadt, Alemania) contenía Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, gelatina al 0,01% (p/v).

20 Secuencias de los cebadores:

Cebador 1: 5'-GCTTTGGGGCATGGACATTGACCCGTATAA-3' (SEC. ID. N°: 5)

25 Cebador 2: 5'-CTGACTACTAATTCCCTGGATGCTGGGTCT-3' (SEC. ID. N°: 6)

PCR progresiva

30 Cada reacción se realizó bien con 1 μ l de la primera reacción o con una dilución 1:10 de la primera PCR como plantilla, respectivamente. Se usaron 100 pmol de cada cebador, 2,5 u de ADN polimerasa de *Pfu*(exo-) (Stratagene, Heidelberg, Alemania), una concentración final de 200 μ M de cada dNTP y 5 μ l de tampón de *Pfu* 10 x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,75, KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, MgSO₄ 20 mM, Tritón X-100 al 1%, BSA 1 mg/ml, (Stratagene, Heidelberg, Alemania) en un volumen final de 50 μ l. Las reacciones se realizaron en un termociclador (OmniGene, MWG-Biotech, Ebersberg, Alemania) usando el siguiente programa: 92°C durante 1 minuto, 60°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto con 20 ciclos. Secuencia de oligodesoxinucleótidos (comprados purificados por HPLC en MWG-Biotech, Ebersberg, Alemania):

40 VHB13: 5'-TTGCCTGAGTGCAAGTATGGT-3' (SEC. ID. N°: 7)

VHB15bio: Biotin-5'-AGCTCTATATCGGGAAGCCT-3' (SEC. ID. N°: 8)

45 *Purificación de productos de PCR*

Para registrar cada espectro, se usó una PCR, 50 μ l (realizada como se describe anteriormente). La purificación se hizo de acuerdo con el siguiente procedimiento: la ultrafiltración se realizó usando unidades de filtración Ultrafree-MC (Millipore, Eschborn, Alemania) de acuerdo con el protocolo del proveedor centrifugando a 8000 rpm durante 20 minutos. Se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se resuspendieron 25 μ l de Dynabeads con estreptavidina (10 μ g/ μ l) (Dyna, Hamburgo, Alemania) en 25 μ l de tampón B/W (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 2 M). Esta suspensión se añadió a las muestras de PCR todavía en la unidad de filtración y la mezcla se incubó con agitación suave durante 15 minutos a temperatura ambiente. La suspensión se transfirió en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y el sobrenadante se eliminó con ayuda de un Magnetic Particle Collector, MPC, (Dyna, Hamburgo, Alemania). Las perlas se lavaron dos veces con 50 μ l de solución de citrato amónico 0,7 M, pH 8,0 (el sobrenadante se eliminó cada vez usando MPC). La escisión de las perlas puede lograrse usando formamida a 90°C. El sobrenadante se secó en una speedvac durante aproximadamente una hora y se resuspendió en 4 μ l de agua ultrapura (MilliQ UF plus, Millipore, Eschborn, Germany). Esta preparación se usó para análisis por EM MALDI-TOF.

60 *EM MALDI-TOF*

Se pipeteó medio microlitro de la muestra sobre el soporte de las muestras, después inmediatamente se mezcló con 0,5 μ l de solución de matriz (ácido 3-hidroxipicolínico 0,7 M, acetonitrilo al 50%, citrato amónico 70 mM). Esta mezcla se secó a temperatura ambiente y se introdujo en el espectrómetro de masas. Se tomaron todos los espectros en modo iónico positivo usando un aparato Finnigan MAT Vision 200 Finnigan (Finnigan MAT, Bremen, Alemania), provisto con un reflectrón (fuente de iones de 5 keV, postaceleración de 20 keV) y un láser de nitrógeno de 337 nm. El calibrado se realizó con una mezcla de un 40-mero y un 100-mero. Cada muestra se midió con diferentes energías

láser. En las muestras negativas, el producto de PCR no se detectó ni con energías láser menores ni mayores. En las muestras positivas el producto de la PCR se detectó en diferentes lugares de la siembra y también con energías de láser variables.

5

Resultados

Se usó un sistema de PCR progresiva para la detección de ADN de VHB en muestras de sangre que empleaban oligonucleótidos complementarios a la región c del genoma de VHB (cebador 1: comenzando en la posición de mapa 1763, el cebador 2 comenzando en la posición del mapa 2032 de la cadena complementaria) que codifica el antígeno contra la cápsula de VHB (VHBcAg). El ADN se aisló del suero de pacientes de acuerdo con protocolos estándar. Se realizó una primera PCR con el ADN de estas preparaciones usando un primer conjunto de cebadores. Si estaba presente el ADN de VHB en la muestra se generaba un fragmento de ADN de 269 pb.

En la segunda reacción, se usaron los cebadores que eran complementarios a una región dentro del fragmento de PCR. Si había presentes productos de PCR relacionados con VHB en un primer fragmento de ADN de 67 pb (véase la Fig. 25A) en esta PCR progresiva. El uso de un sistema de PCR progresiva para la detección proporciona una alta sensibilidad y sirve también como control específico de la PCR externa (Rofls, A. y cols., PCR: Clinical Diagnosis and Research, Springer, Heidelberg, 1992). Otra ventaja adicional es que la cantidad de fragmentos generados en la segunda PCR es lo suficientemente alta como para asegurar una detección sin problemas aunque no pueden evitarse las pérdidas en las purificaciones.

Las muestras se purificaron usando ultrafiltración para eliminar los cebadores antes de la inmovilización sobre Dynabeads con estreptavidina. Esta purificación se hizo porque los fragmentos de cebadores más cortos se inmovilizan con rendimientos más altos sobre las perlas debido a razones estéricas. La inmovilización se realizó directamente sobre la membrana de ultrafiltración para evitar la pérdida de sustancias debido a la absorción inespecífica sobre la membrana. Después de la inmovilización, las perlas se lavaron con citrato amónico para realizar el intercambio de iones (Pieles, U. y cols. (1993) Nucleic Acids Res 21:3191 -3196). El ADN inmovilizado se escindió de las perlas usando amoniaco al 25% que permite la escisión de ADN de las perlas en un tiempo muy corto, pero no da como resultado la introducción de cationes de sodio.

Las PCR progresivas y el análisis por MALDI-TOD se realizaron sin saber los resultados de los análisis serológicos. Debido a la desconocida valoración del virus, cada muestra de la primera PCR se usó sin dilución como plantilla en una dilución 1:10, respectivamente.

35

La muestra 1 se extrajo de un paciente con infección por VHB crónica activa que dio positivo en las pruebas de antígenos de HBs y HBe pero negativo en un análisis de dot blot. La muestra 2 era una muestra de suero de un paciente con un infección de VHB activa y una viremia masiva que dio positivo en el análisis por dot blot. La muestra 3 era una muestra de suero desnaturalizada por lo tanto no pudo hacerse ningún análisis serológico pero se detectó un nivel aumentado de transaminasas indicando enfermedad hepática. En un análisis de autorradiografía (Figura 24), la primera PCR de esta muestra fue negativa. Sin embargo, había ciertas evidencias de infección por VHB. Esta muestra es de interés para el análisis por MALDI-TOF, debido a que demuestra que pueden detectarse incluso niveles bajos de productos de PCR después del procedimiento de purificación. La muestra 4 era de un paciente que se curó de una infección de VHB. Las muestras 5 y 6 se recogieron en pacientes con una infección por VHB crónica activa.

45

La Figura 24 muestra los resultados de un análisis de PAGE de las reacciones de PCR progresivas. Se revela claramente un producto de PCR en las muestras 1, 2, 3, 5 y 6. En la muestra 4 no se generó ningún producto de PCR, de hecho es negativa para VHB, de acuerdo con los análisis serológicos. Los controles negativo y positivo se indican mediante + y -, respectivamente. Son visibles artefactos en las líneas 2, 5, 6 y + si no se usaba la plantilla no diluida. Estos artefactos no se generaban si la plantilla se usaba en una dilución 1:10. En la muestra 3, el producto de PCR era únicamente detectable si la plantilla no estaba diluida. Los resultados del análisis de PAGE están de acuerdo con los datos obtenidos mediante análisis serológico excepto para la muestra 3 como se analiza anteriormente.

50

La Figura 25A muestra un espectro de masas de un producto de PCR progresivo para la muestra número 1 generada y purificada como se describe anteriormente. La señal en 20754 Da representa el producto de PCR monocatenario (calculada: 20735 Da, como la masa media de ambas cadenas del producto de PCR escindido de las perlas). La diferencia de la masa calculada y la masa obtenida es 19 Da (0,09%). Como se muestra en la Fig. 25A, la muestra número 1 generó una gran cantidad de producto de PCR, dando como resultado una detección no ambigua.

55

La Fig. 25B muestra un espectro obtenido de la muestra número 3. Como se describe en la Fig. 24, la cantidad de producto de PCR generado en esta sección es significativamente inferior a la de la muestra número 1. Sin embargo, el producto de la PCR se demuestra claramente con una masa de 20751 Da (calculada 20735). La diferencia de masas es de 16 Da (0,08%). El espectro descrito en la Fig. 25C se obtuvo de la muestra número 4 que es negativa para VHB (como se muestra también en la Fig. 24). Como era de esperar no pudieron detectarse señales correspondientes al producto de la PCR. Todas las muestras que se ven en la Fig. 25 se analizaron por EM MALDI-TOF, por lo que el producto de la PCR se detectó en todas las muestras positivas para VHB, pero no en las muestras negativas para VHB. Estos resultados se reprodujeron en diversos experimentos independientes.

65

Ejemplo 6

Análisis de los productos de la reacción en cadena de la ligasa mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

5 *Materiales y métodos**Oligodesoxinucleótidos*

10 Excepto el biotinilado y todos los oligonucleótidos se sintetizaron en una escalera de 0,2 μ mol en un aparato MilliGen 7500 DNA Synthesizer (Millipore, Bedford, MA, USA) usando el método de β -cianoetilfosfoamidita (Sinha, N.D. y cols., (1984) *Nucleic Acids Res.*, vol. 12, Págs. 4539-4577). Los oligodesoxinucleótidos se purificaron por RP-HPLC y se desprotegeron de acuerdo con protocolos estándar. El oligodesoxinucleótido (purificado por HPLC) se compró en Biometra, Gottingen, Alemania.

15 Secuencias y masas calculadas de los oligonucleótidos usados:

Oligodesoxinucleótido A: 5'-p-TTGTGCCACGCGTTGGGAATGTA (7521 Da) (SEC. ID. N°: 9).

20 Oligodesoxinucleótido B: 5'-p-ACCAACGACTGTTTGGCCGCCAGTTG (7948 Da) (SEC. ID. N°: 10).

Oligodesoxinucleótido C: 5'-bio-TACATTCCCAACCGCGTGGCACAAC (7960 Da) (SEC. ID. N°: 11).

25 Oligodesoxinucleótido D: 5'-p-AACTGGCGGGCAAACAGTCGTTGCT (7708 Da) (SEC. ID. N°: 12).

Fosforilación en 5' de los oligonucleótidos A y D

30 Esta se realizó con polinucleótido quinasa (Boehringer, Mannheim, Alemania) de acuerdo con procedimientos publicados, los oligonucleótidos fosforilados en 5' se usaron sin purificar para la LCR.

Reacción en cadena de la ligasa

35 La LCR se realizó con ADN ligasa de *Pfu* y un kit de reacción en cadena de la ligasa (Stratagene, Heidelberg, Alemania) que contenía dos phagemid de pBluescript KII. Uno que portaba el gen *lacI* de *E. coli* natural y el otro un mutante de este gen con una mutación de punió único en el pb 191 del gen *lacI*.

40 Se usaron las siguientes condiciones de LCR para cada reacción: 100 pg de plantilla de ADN (0,74 fmol) con 500 pg de ADN de esperma de salmón sonificado como vehículo, 25 ng (3,3 pmol) de cada oligonucleótido fosforilado en 5', 20 ng (2,5 pmol) de cada oligonucleótido no fosforilado, 4 U de ADN ligasa de *Pfu* en un volumen final de 20 μ l tamponado mediante tampón de reacción de ADN ligasa de *Pfu* (Stratagene, Heidelberg, Alemania). En un experimento modelo se usó un 50-mero (1 fmol) sintetizado químicamente como plantilla, en este caso también oligo C estaba biotinilado. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador (OmniGen, MWG-Biotech, Ebersberg, Alemania) con el siguiente programa: 4 minutos a 92°C, 2 minutos a 60°C y 25 ciclos de 20 segundos a 92°C, 40 segundos a 60°C. Experto para el análisis por HPLC se usó el educto C del ligamiento biotinilado. En un experimento control los oligonucleótidos biotinilados y no-biotinilados revelaron los mismos resultados en gel de electroforesis. Las reacciones se analizaron en geles de poliacrilamida al 7,5%. Producto de ligamiento: 1 (oligo A y B) masa calculada: 1540 Da, producto de ligamiento 2 (oligo C y D) masa calculada: 15387 Da.

SMART-HPLC

55 Se realizó una HPLC de intercambio de iones (IE HPLC) en el sistema SMART (Pharmacia, Freiburg, Alemania) usando una columna Pharmacia Mono Q, PC 1,6/5. Los eluyentes fueron el tampón A (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM y NaCl 0,3 M a pH 8,0) y tampón B (igual que A, pero NaCl 1 M). Comenzando con A al 100% durante 5 minutos con una velocidad de flujo de 50 μ l/min, se aplicó un gradiente del 0 al 70% de B en 30 minutos, después se aumentó a B al 100% en 2 minutos y se mantuvo en B al 100% durante 5 minutos. Se inyectaron dos volúmenes de LCR combinados (40 μ l) con plantilla normal o mutante.

Preparación de muestras para EM MALDI-TOF

65 Preparación de ADN inmovilizado: Para registrar cada espectro se combinaron dos LCR (realizadas como se describe anteriormente) y se diluyeron 1:1 con un tampón 2 x B/W (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, NaCl 2 M). A las mezclas se añadieron 5 μ l de estreptavidina DynaBeads (Dyna, Hamburgo, Alemania), se dejó que la mezcla se uniera agitando ligeramente durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante usando

un Magnetic Particle Collector, MPC, (Dyna, Hamburgo, Alemania) y las perlas se lavaron dos veces con 50 μ l de solución de citrato amónico 0,7 M, (pH 8,0) (el sobrenadante se eliminó cada vez usando el MPC). Las perlas se resuspendieron en 1 μ l de agua ultrapura (MilliQ, Millipore, Bedford, MA, USA). Esta suspensión se usó directamente para el análisis por EM MALDI-TOF como se describe a continuación.

Combinación de ultrafiltración y DynaBeads de estreptavidina: para registrar el espectro se combinaron dos LCRs (realizadas como se describe anteriormente), diluidas 1:1 con 2 x tampón B/W y concentradas con una unidad de filtrado 5000 NMWL Ultrafree-MC (Millipore, Eschborn, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de concentrar, las muestras se lavaron con 300 μ l de 1 x tampón B/W y se añadieron a DynaBeads de estreptavidina. Las perlas se lavaron una vez con la unidad de filtrado Ultrafree-MC con 300 μ l de 1 x tampón B/W y se procesaron como se describe anteriormente. Se resuspendieron las perlas en 30 a 50 μ l de tampón de B/W y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Se eliminó el sobrenadante y las perlas se lavaron dos veces con 50 μ l de citrato amónico 0,7 M (pH 8,0). Finalmente, las perlas se lavaron una vez con 30 μ l de acetona y se resuspendieron en 1 μ l de agua ultrapura. La mezcla de ligamiento después de inmovilizar las perlas se usó para el análisis por EM MALDI-TOF como se describe a continuación.

EM MALDI-TOF

Se pipeteó una suspensión de las perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina con el ADN inmovilizado sobre el soporte de las muestras, después inmediatamente se mezcló con 0,5 μ l de solución de matriz (ácido 3-hidroxipicolínico 0,7 M, acetonitrilo al 50%, citrato amónico 70 mM). Esta mezcla se secó a temperatura ambiente y se introdujo en el espectrómetro de masas. Se tomaron todos los espectros en modo iónico positivo usando un aparato Finnigan MAT Vision 2000 Finnigan (Finnigan MAT, Bremen, Alemania), provisto con un reflectrón (fuente de iones de 5 keV, postaceleración de 20 keV) y un láser de nitrógeno (337 nm). Para el análisis de ADN ligasa de *Pfu* se mezclaron 0,5 μ l de la solución sobre el soporte de las muestras con 1 μ l de solución de matriz y se preparó como se describe anteriormente. Para el análisis de LCR no purificado se mezcló 1 μ l de una LCR con 1 μ l de solución de matriz.

Resultados y análisis

El gen *lacI* de *E. coli* sirvió como sistema modelo simple para investigar la idoneidad de EM MALDI-TOF como método de detección para los productos generados en reacciones en cadena de la ligasa. Este sistema de plantillas consiste en un gen *lacI* de *E. coli* normal en un phagemid y un gen *lacI* de *E. coli* que porta una mutación puntual en el pb 191 (transición de C a T) en el mismo phagemid. Se usaron cuatro oligonucleótidos diferentes, que se ligaban únicamente si estaba presente el gen *lacI* de *E. coli* natural (Figura 26).

Se optimizaron las condiciones de la LCR usando DNA ligasa de *Pfu* para obtener al menos 1 pmol de producto de ligamiento en cada reacción positiva. Las reacciones de ligamiento se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y HPLC en el sistema SMART (Figuras 27, 28 y 29). La Figura 27 muestra un PAGE de una LCT positiva con plantilla natural (línea 1), una LCR negativa con la plantilla mutante (1 y 2) y un control negativo que contiene enzimas, oligonucleótidos y sin plantilla. La electroforesis claramente muestra que el producto de ligamiento (50 pb) se produjo únicamente en la reacción con la plantilla normal mientras que ni la plantilla que porta la mutación puntual ni la reacción de control con el ADN de esperma de salmón generaron productos de amplificación. En la Figura 28, se usó la HPLC para analizar dos LCR unidas con plantilla normal realizada en las mismas condiciones. El producto del ligamiento se reveló claramente. La Figura 29 muestra los resultados de una HPLC en la que se analizaron dos LCR combinados negativos con plantilla mutante. Estos cromatogramas confirman los datos que se muestran en la Figura 27 y los resultados tomados conjuntamente demuestran claramente que el sistema genera productos de ligamiento en una cantidad significativa únicamente si se provee la plantilla normal.

Se realizaron series de control apropiadas para determinar los tiempos de retención de los diferentes compuestos implicados en los experimentos de LCR. Estos incluyen los cuatro nucleótidos (A, B, C y D) un 50-mero sintético (con la misma secuencia que el producto de ligamiento), la plantilla de ADN normal, ADN de esperma de salmón sonificado y la ADN ligasa de *Pfu* en el tampón de ligamiento.

Para analizar que procedimiento de purificación debería usarse antes de poder analizar una reacción de LCR mediante EM MALDI-TOF, se analizaron mediante EM MALDI-TOF alícuotas de una LCR no purificada (Figura 30A) y alícuotas de la solución madre enzimática (Figura 30B). Resultó que la preparación de muestras apropiada es absolutamente necesaria dado que todas las señales en la LCR no purificada corresponden a señales obtenidas con el análisis mediante EM MALDI-TOF de la ADN ligasa de *Pfu*. Los valores de las masas calculados de oligo A y el producto de ligamiento son de 7521 Da y 15450 Da respectivamente. Los datos de la Figura 30 muestran que la solución enzimática lleva a señales de masa que no interfieren con las señales esperadas de los eductos y productos del ligamiento y por lo tanto hace imposible asignar las señales sin ambigüedad. Además, los espectros mostraron señales del detergente Tween20 que era parte del tampón de almacenamiento del tampón que influye en el comportamiento de cristalización de la mezcla de analito/matriz de forma favorable.

En un formato de purificación se usaron perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Como se muestra en un trabajo reciente, es posible la desorción directa de ADN inmovilizado mediante el pareado de bases de Watson-

Crick a un fragmento de ADN unido covalentemente a las perlas y se desorbe exclusivamente la cadena no biotinilada (Tang, K y cols., (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:3126-3131). Esta estrategia de usar ADN inmovilizado asegura que únicamente se desorba la cadena no biotinilada. Si se analiza ADN no inmovilizado se desorben ambas cadenas (Tang, K. y cols., (1994) *Rapid Comm. Mass Spectrom.* 7: 183-186) lo que da como resultado señales amplias dependiendo de la diferencia de masas entre las dos cadenas. Por lo tanto, al emplear este sistema para la LCR únicamente se desorberá el oligonucleótido A no ligado con una masa calculada de 7521 Da, y el producto de ligamiento de oligo A y oligo B (masa calculada: 15450 Da) se oligo C está biotinilado en el extremo 5' y se inmoviliza sobre perlas recubiertas de estreptavidina. Esto da como resultado una identificación simple y sin ambigüedades de los eductos y productos de la LCR.

La Figura 31A muestra un espectro de masas de MALDI-TOF obtenido a partir de dos LCR combinadas (realizadas como se describe anteriormente) purificadas en DynaBeads con estreptavidina y desorbidas directamente de las perlas mostraron que el método de purificación usado era eficiente (comparado con la Figura 30). Fue posible detectar una señal que representa el oligo A no ligado y una señal que corresponde al producto de ligamiento. La concordancia entre los valores de las masas calculado y hallado experimentalmente es remarcable y permite la asignación de pico sin ambigüedad y la detección exacta del producto de ligamiento. Por el contrario, no pudo detectarse ningún producto de ligamiento sino únicamente oligo A en el espectro obtenido de las dos LCR combinadas con plantilla mutada (Figura 31B). La especificidad y selectividad de las condiciones de la LCT y la sensibilidad de la detección por MALDI-TOF se demuestra adicionalmente al realizar la reacción de ligamiento en ausencia de una plantilla específica. La Figura 32 muestra un espectro obtenido de dos LCR combinadas en las que únicamente se usó ADN de esperma de salmón como control negativo, sólo pudo detectarse oligo A, como era de esperar.

Mientras que los resultados que se muestran en la Figura 31A pueden correlarse a la línea 1 del gel de la Figura 27, el espectro que se muestra en la Figura 31B es equivalente a la línea 2 de la Figura 27, y finalmente también el espectro de la Figura 32 corresponde a la línea 3 en la Figura 27. Los resultados son congruentes con el análisis por HPLC presentado en las Figuras 28 y 29. Mientras que tanto la electroforesis en gel (Figura 27) como la HPLC (Figuras 28 y 29) revelan un exceso o cantidades casi iguales de producto de ligamiento comparado con los eductos de ligamiento, el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF produce una señal menor para el producto de ligamiento (Figura 31A).

La menor intensidad de la señal del producto de ligamiento podría deberse a eficiencias de desorción/ionización diferentes entre un 24-mero y un 50-mero. Dado que el valor T_m de una cadena doble con 50 comparado con 24 pares de bases es significativamente mayor, podría resorberse más cantidad del 24-mero. Una reducción de la intensidad de la señal puede dar como resultado también un grado mayor de fragmentación en el caso de oligonucleótidos mayores.

Independientemente de la purificación con DynaBeads de estreptavidina, la Figura 32 revela trazas de Tween20 en la región de aproximadamente 2000 Da. Las sustancias con una consistencia viscosa, influyen negativamente el proceso de cristalización y por lo tanto puede ser perjudicial para el análisis espectrométrico de masas. El Tween20 y también el glicerol que son parte de los tampones de almacenamiento de las enzimas por lo tanto deben eliminarse completamente antes del análisis por espectrometría de masas. Por este motivo se investigó un procedimiento de purificación mejorado que incluye una etapa de ultrafiltración previa al tratamiento con DynaBeads. De hecho, esta purificación de muestra dio como resultado una mejora significativa del funcionamiento de la espectrometría de masas por MALDI-TOF.

La Figura 33 muestra los espectros obtenidos de dos LCR combinadas positiva (33 A) y negativa (33 B), respectivamente. La reacción positiva se realizó con una cadena sintetizada químicamente, de cadena sencilla de 50-mero como plantilla con una secuencia equivalente al producto de ligamiento de oligo C y D. El oligo C se biotiniló en 5'. Por lo tanto no se detectó la plantilla. Como se esperaba, únicamente pudo desorberse el producto de ligamiento de Oligo A y B (masa calculada 15450 Da) de los oligo C y D inmovilizados y ligados. Este fragmento de ADN nuevo generado se representa con la señal de masa de 15448 Da en la Figura 33A. En comparación con la Figura 32A, este espectro muestra claramente que este método de preparación de muestra produce señales con resolución e intensidad mejoradas.

Ejemplo 7

Detección de mutaciones mediante extensión de oligo bases de fase sólida de un cebador y análisis mediante espectrometría de masas MALDI-TOF

Sumario

El método de extensión de oligo bases de fase sólida detecta mutaciones puntuales y pequeñas delecciones así como pequeñas inserciones en ADN amplificado. El método se basa en la extensión de un cebador de detección que se híbrida adyacente a una posición nucleotídica variable en una plantilla amplificada capturada por afinidad, usando ADN polimerasa, una mezcla de tres dNTP, y el didesoxinucleótido que falta. Los productos resultantes se evalúan y resuelven por espectrometría de masas MALDI-TOF sin procedimientos de mareaje adicionales. El objetivo del siguiente experimento fue determinar los alelos mutante y natural de forma rápida y segura.

Descripción del experimento

El método usaba un único cebador de detección seguido de una etapa de extensión de oligonucleótidos para dar productos que difieren en longitud en algunas bases específico para los alelos mutantes o normales que pueden resolverse fácilmente mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. El método se describe usando un ejemplo del exón 10 del gen CFTR. El exón 10 de este gen porta la mutación más común en muchos grupos étnicos ($\Delta F508$) que lleva en estado homocigoto al fenotipo clínico de fibrosis quística.

*Materiales y métodos**ADN genómico*

Se obtuvo ADN genómico de individuos sanos, individuos homocigotos o heterocigotos para la mutación $\Delta F508$, y un individuo heterocigoto para la mutación 1506S. Los alelos normal y mutante se confirmaron mediante secuenciación estándar de Sanger.

Amplificación por PCR del exón 10 del gen CFTR

Los cebadores de la amplificación de PCR fueron CFEx10-F (5'-GCAAGTGAATCCTGAGCGTG-3' (SEC. ID. N°: 13) localizadas en el intrón 9 y biotiniladas) y CFEx10-R (5'-GTGTGAAGGGCGTG-3' (SEC. ID. N°: 14) localizada en el intrón 10). Se usaron cebadores con una concentración de 8 pmol. La *Taq*-polimerasa incluyendo tampón 10x se compraron de Boehringer-Mannheim y se obtuvieron dNTP de Pharmacia. El volumen total de la reacción era 50 μ l. Las condiciones de ciclado de PCR eran inicialmente 5 minutos a 95°C, seguido de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 53°C, y 30 segundos a 72°C durante 40 ciclos con un tiempo de extensión final de 5 minutos a 72°C.

Purificación de los productos de PCR

Los productos de amplificación se purificaron usando el kit de purificación de PCR de Qiagen (n° 28106) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La elución de los productos purificados de la columna se hizo en 50 μ l de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5).

Captura por afinidad y desnaturalización del ADN de cadena doble

Se transfirieron alícuotas de 10 μ l del producto de PCR purificado a un pocillo de una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (n° 1645684 de Boehringer-Mannheim o n° 95029262 de Labsystems). Subsiguientemente, se añadieron 10 μ l de tampón de incubación (fosfato sódico 80 mM, NaCl 400 mM, Tween20 al 0,4%, pH 7,5) y 30 μ l de agua. Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de tampón de lavado (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, Tween20 al 0,1%, pH 8,8). Para desnaturalizar el ADN de cadena doble se trataron los pocillos con 100 μ l de una solución de NaOH 50 mM durante 3 minutos. Por lo tanto, los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de tampón de lavado.

Reacción de extensión de oligobases

Se realizó la hibridación de 25 pmoles de cebador de detección (CF508: 5'-CTATATTCATCATAGGAAACACCA-3' (SEC. ID. N°: 15) en 50 μ l de tampón de hibridación (Tris 20 mM, KCl 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, MgSO_4 2 mM, Tritón X-100 al 1%, pH 8,75) a 50°C durante 10 minutos. Los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de tampón de lavado y una vez con 200 μ l de tampón TE. La reacción de extensión se realizó usando algunos componentes del kit de secuenciación de ADN de USB (n° 70770) y dNTP o ddNTP de Pharmacia. El volumen total de reacción era de 45 μ l, consistiendo en 21 μ l de agua, 6 μ l de tampón Sequenase, 3 μ l de solución de DTT 10 mM, 4,5 μ l de tres dNTP 0,5 mM, 4,5 μ l de la ddNTP que faltaba 2 mM, 5,5 μ l de tampón de glicerol de dilución de la enzima, 0,25 μ l de Sequenase, 2,0 y 0,25 de pirofosfatasa. La reacción se pipeteó sobre hielo y después se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y durante 5 minutos a 37°C. Por lo tanto, los pocillos se lavaron tres veces con 200 μ l de tampón de lavado y una vez con 60 μ l de una solución de citrato de NH_4 70 mM.

Desnaturalización y precipitación del cebador extendido

Se desnaturalizó en cebador extendido en 50 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido) al 10% en agua a 80°C durante 10 minutos. Para la precipitación se añadieron 10 μ l de acetato de NH_4 (pH 6,5), 0,5 μ l de glicógeno (10 mg/ml agua, Sigma n° G1765), y 100 μ l de etanol absoluto al sobrenadante y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 13.000 g durante 10 minutos se lavó el precipitado en etanol al 70% y se resuspendió en 1 μ l de agua H_2O 18 Mohm/cm.

Preparación de las muestras y análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF

La preparación de las muestras se realizó mezclando 0,3 μ l de cada una de las soluciones de matriz (ácido 3-hidroxipicolínico 0,7 M, citrato amónico dibásico 0,7 M en H₂O:CH₃CN 1:1) y del precipitado de ADN/glicógeno resuspendido en un disco diana muestra y se dejaron secar al aire. Se sembraron hasta 20 muestras en una diana sonda para introducirse en la región fuente de un aparato Visions 2000 de Termo Bioanalysis (anteriormente Finnigan) de MALDI-TOF sin modificar operado en modo reflector con 5 y 20 kV en la diana y el dinodo de conversión respectivamente. Las masas teóricas medias teóricas ($M_r(\text{calc})$) se calcularon a partir de las composiciones atómicas. Los valores de M_r ($M_r(\text{exp})$) son los de la forma monoprotonada, determinado usando una calibración externa.

10

Resultados

El objetivo del experimento era desarrollar un método rápido y seguro de detección de mutaciones independientemente de la austeridad exacta y que dé resultados elevada calidad y elevado rendimiento. Por lo tanto, se combinó una clase especial de secuenciación de ADN (extensión de oligo bases de un cebador de detección de una mutación) con la evaluación de los productos de la minisequenciación mediante espectrometría de masas (EM) de ionización desorción por láser asistida por matriz (MALDI). La disposición de tiempo de vuelo (TOF) se eligió como posible sistema de medición de masas. Para probar esta hipótesis, se realizó el examen con el exón 10 del gen CFTR, En el que algunas mutaciones podrían dar el fenotipo clínico de la fibrosis quística, la enfermedad monogenética más común entre la población de raza blanca.

La presentación esquemática de la Figura 34 muestra los productos esperados de la secuenciación corta con la masa molecular calculada teóricamente del exón 10 del gen CFTR normal y diferentes mutaciones. Los productos de la secuenciación corta se produjeron usando ddTTP (Figura 34A) o ddCTP (Figura 34B) para introducir una terminación relacionada con la secuencia definitiva en la cadena de ADN emergente. Los espectros de EM MALDI-TOF de los individuos sanos, heterocigotos para la mutación y homocigotos para la mutación se presentan en la Figura 34. Todas las muestras se confirmaron por secuenciación estándar de Sanger que no mostró discrepancias en comparación con los análisis de espectrometría de masas. La exactitud de las mediciones experimentales de las diversas masas moleculares estaba en el intervalo de menos 21,8 y 87,1 dalton (Da) del intervalo esperado. Esta es una interpretación definitiva de los resultados permitidos en cada caso. Una ventaja adicional de este procedimiento es la detección sin ambigüedades de la detección Δ I507. En la reacción de ddTTP, se detectaría el alelo normal, mientras que en la reacción ddCTP se describiría la delección de tres pares de bases.

El método descrito es altamente adecuado para la detección de mutaciones puntuales o microlesiones de ADN. La elección cuidadosa de los cebadores de detección de la mutación abrirá la ventana del multiplexado y darán un rendimiento elevado incluyendo la elevada calidad del diagnóstico genético sin necesidad de la exacta austeridad necesaria en procedimientos específicos de alelos comparables. Debido a la singularidad de la información genética, la extensión de las oligo bases del cebador de detección de la mutación es aplicable en cada gen de una enfermedad o región polimórfica en el genoma como un número variable de repeticiones en tándem (VNTR) u otros polimorfismos de nucleótido único (por ejemplo, gen de la apolipoproteína E).

Ejemplo 8

Detección de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa que contienen restos 7-desazapurina con espectrometría de masas de tiempo de vuelo de ionización desorción por láser asistida por matriz (MALDI-TOF)

Materiales y métodos

50

Amplificaciones por PCR

Los siguientes cebadores de oligodesoxinucleótidos se sintetizaron de acuerdo con reacciones de fosfoamidita estándar (Sinha, N.D., y cols., (1983) *Tetrahedron Let.* Vol. 24, Págs. 5843-5846; Sinha, N.D. y cols., (1984) *Nucleic Acids Res.*, Vol. 12, Págs. 4539-4577) en un aparato MilliGen 7500 DNA Synthesizer (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.) en escaleras de 200 nmoles o compradas de MWG-Biotech (Ebersberg, Alemania, cebador 3) y Biometra (Goettingen, Alemania, cebadores 6-7).

60	cebador 1:	5'-GTCACCCTCGACCTGCAG	(SEC. ID. Nº: 16);
	cebador 2:	5'-TTGTAAAACGACGGCCAGT	(SEC. ID. Nº: 17);
	cebador 3:	5'-CTTCCACCGCGATGTTGA	(SEC. ID. Nº: 18);
65	cebador 4:	5'-CAGGAAACAGCTATGAC	(SEC. ID. Nº: 19);

ES 2 194 985 T7

cebador 5: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT (SEC. ID. N°: 20);

cebador 6: 5'-GTCACCCTCGACCTGCAgC (g: RiboG) (SEC. ID. N°: 21);

5 cebador 7: 5'-GTTGTAAAACGAGGGCCAgT (g: RiboG) (SEC. ID. N°: 22);

10 Las cadenas de ADN de 99-mero y 200-mero (modificadas y sin modificar) así como el 100-mero modificado con ribo- y 7-desaza se amplificaron a partir de ADN de pRFc1 (10 ng, proporcionado generosamente por S. Feyerebend, Universidad de Hamburgo) en un volumen de reacción de 100 μ l que contiene 10 mmol/L de KCl, 10 mmol/L (NH₄)₂SO₄, Tris HCL a 20 mmol/L (pH = 8,8), MgSO₄ 2 mmol/L, (tampón de exo(-)*Pseudococcus furiosus* (Pfu), Pharmacia, Freiburg, Alemania), dNTP 0,2 mmol/L cada uno (Pharmacia, Freiburg, Alemania), 1 μ mol/L de cada cebador y 1 unidad de ADN polimerasa de exo(-)*Pfu* (Stratagene, Heidelberg, Alemania).

15 Para los 99-meros se usaron los cebadores 1 y 2, para los 200-meros los cebadores 1 y 3 y para los 100-meros los cebadores 6 y 7. Para obtener ácidos nucleicos modificados con 7-desazapurina, durante la amplificación de PCR se sustituyeron dATP y dGTP con 7-desaza-dATP y 7-desaza-dGTP. La reacción se realizó en un ciclador térmico (OmniGene, MWG-Biotech, Ebersberg, Alemania) usando el ciclo: desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 51°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minutos. Para todas las PCR el número de ciclos de reacción era de 30. La reacción se dejó extender durante 10 minutos más a 72°C después del último ciclo.

20 Las cadenas de ADN del 103-mero (modificadas y no modificadas) se amplificaron a partir de ADN de M13mp178 RFI (100 ng, Pharmacia, Freiburg, Alemania) en un volumen de reacción de 100 μ l usando los cebadores 4 y 5, no se cambió ninguna concentración más. La reacción se realizó usando el ciclo: desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 40°C durante 1 minuto, y extensión a 72°C durante 1 minuto. Después de 30 ciclos para el 103-mero no modificado y 40 ciclos para el 103-mero modificado respectivamente, las muestras se incubaron durante otros 10 minutos más a 72°C.

30 *Síntesis de cebadores de PCR marcados con 5'-[³²P]*

35 Los cebadores 1 y 4 se marcaron con 5'-[³²P] empleando polinucleotidoquinasa de T4 (Epicentre Technologies) y ATP-(γ -³²P). (BLU/NGG/502A, Dupont, Alemania) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Las reacciones se realizaron sustituyendo el 10% del cebador 1 y 4 en la PCR con los cebadores marcados en condiciones de reacción que, en otros aspectos, no cambiaron. Los ADN amplificados se separaron por electroforesis en gel en un gel de poliacrilamida al 10%. Se cortaron las bandas apropiadas y se contaron en un sistema de centelleo líquido Packard TRICARB 460C (Packard, CT, EE.UU.).

40 *Escisión del cebador de los productos de PCR ribomodificados*

45 El ADN amplificado se purificó usando unidades de filtrado Ultrafree-MC (30.000 NMWL), después se redisolvió en 100 μ l de NaOH 0,2 mol/L y se calentó a 95°C durante 25 minutos. Después se acidificó la solución con HCl (1 mol/L) y se purificó adicionalmente para ser analizado por MALDI-TOF empleando unidades de filtrado Ultrafree-MC (10.000 NMWL) como se describe a continuación.

50 *Purificación de productos de PCR*

55 Todas las muestras se purificaron y concentraron usando unidades Ultrafree-MC 30000 NMWL (Millipore, Eschborn, Alemania) de acuerdo con la descripción del fabricante. Después de la liofilización, los productos de PCR se redisolviéron en 5 μ l (3 μ l para el 200-mero) de agua ultrapura. Esta solución de analitos se usó directamente para las mediciones de MALDI-TOF.

EM MALDI-TOF

60 Se mezclaron alícuotas de 0,5 μ l de solución de analitos y 0,5 μ l de solución de matriz (0,7 mol/L 3-HPA y 0,07 mol/L de citrato amónico en acetonitrilo/agua (1:1, v/v)) sobre un soporte de muestras metálico plano. Después de secar a temperatura ambiente se introdujo la muestra en el espectrómetro de masas para ser analizado. El espectrómetro de masas MALDI-TOF usado era un Finnigan MAT Vision 2000 (Finnigan MAT, Bremen, Alemania). Se registraron los espectros en el modo reflector de iones positivo con una fuente de iones de postaceleración de 5 keV y 20 keV. El instrumento estaba provisto con un láser de nitrógeno (longitud de onda de 337 nm). El vacío del sistema era 3-4 $\cdot$ 10⁻⁸ hPa en la región del analizador y 1-4 $\cdot$ 10⁻⁷ hPa en la región de la fuente. Los espectros de muestras de ADN modificadas y no modificadas se obtuvieron con la misma potencia de láser relativa; se realizó un calibrado externo con una mezcla de oligodesoxinucleótidos sintéticos (7- a 50-meros).

Resultados y análisis

Síntesis enzimática de nucleótidos de 7-desazapurina que contienen ácidos nucleicos mediante PCR

Para demostrar la viabilidad de EM MALDI-TOF para el análisis rápido y sin gel de productos de PCR cortos y para investigar el efecto de la modificación de 7-desazapurina de ácidos nucleicos en condiciones de MALDI-TOF, se usaron dos sistemas diferentes de cebador-plantilla para sintetizar fragmentos de ADN. Las secuencias se presentan en las Figuras 36 y 37. Mientras que las dos cadenas independientes del producto de PCR 103-mero tenían masas casi iguales ($\Delta m=8$ u), las dos cadenas independientes del 99-mero diferían en 526 u.

Considerando que los bloques de construcción de los 7-desaza purinanucleótidos para la síntesis química de ADN son aproximadamente 160 veces más caros que los normales (Información de productos, Glen Research Corporation, Sterling, VA) y su aplicación en las reacciones estándar de β -ciano-fosfoamidita no es trivial (Información de productos, Glen Research Corporation, Sterling, VA; Schneider K y B.T. Chait (1995) *Nucleic Acids Res.* 23, 1570) el coste de los cebadores modificados con 7-desazapurina sería muy alto. Por lo tanto, para aumentar la aplicabilidad y alcance del método, todas las PCR se realizaron usando cebadores oligonucleotídicos sin modificar que están disponibles rutinariamente. La sustitución de dATP y dGTP por c^7 -dATP y c^7 -dGTP en reacciones en cadena de la polimerasa dio productos que contenían aproximadamente el 80% de nucleósidos modificados con 7-desaza-purina para el 99-mero y el 103-mero y aproximadamente el 90% para el 200-mero, respectivamente. La Tabla I muestra la composición de la base de todos los productos de PCR.

TABLA I

Composición de las bases de los productos de amplificación por PCR del 99-mero, 103-mero y 200-mero (sin modificación y modificados con 7-desazapurina)

Fragmentos de ADN ¹	C	T	A	G	c^7 -desaza-A	c^7 -desaza-G	Modif. Relat. ²
200-meros	54	34	56	56	-	-	-
200-mero s	54	34	6	5	50	51	90%
modificado							
200-mero a	56	56	34	54	-	-	-
200-mero a	56	56	3	4	31	50	92%
modificado							
103-mero s	28	23	24	28	-	-	-
103-mero s	28	23	6	5	18	23	79%
modificado							
103-mero a	28	24	23	28	-	-	-
103-mero a	28	24	7	4	16	24	78%
modificado							
99-mero s	34	21	24	20	-	-	-
99-mero s	34	21	6	5	18	15	75%
modificado							
99-mero a	20	24	21	34	-	-	-
99-mero a	20	24	3	4	18	30	87%
modificado							

¹ "s" y "a" describen cadenas "homosentido" y "antisentido" del producto de la PCR de doble cadena.

² indica la modificación relativa como porcentaje de nucleótidos modificados con 7-desazapurina de la cantidad total de purinanucleótidos.

Sin embargo, quedaba determinar si la modificación con 7-desazapurina al 80-90% es suficiente para la detección exacta por espectrometría de masas. Era por lo tanto importante determinar si *todos* los purinanucleótidos podían sustituirse durante la etapa de amplificación enzimática. Esto no era trivial dado que se había demostrado que c^7 -dATP no puede sustituir completamente el dATP en PCR si se emplea la ADN polimerasa de *Taq* (Seela, F. y al Roelling (1992) *Nucleic Acids Res.*, 20, 55-61). Afortunadamente encontramos que la ADN polimerasa de *exo(-)Pfu* podía de hecho aceptar c^7 -dATP y c^7 -dGTP en ausencia de purinatrifosfatos sin modificar. Sin embargo, la incorporación era menos eficiente lo que conllevaba un menor rendimiento de producto de PCR (Figura 38). El bromuro de etidio tiñe por intercalado entre las bases apiladas de la doble cadena de ADN. Por lo tanto las intensidades menores de las bandas en el gel teñido con bromuro de etidio pueden ser artefactos ya que las cadenas de ADN modificadas no necesitan necesariamente dar la misma intensidad de banda que las no modificadas.

Para verificar estos resultados, se repitieron las PCRs con los cebadores marcados con [^{32} P]. El autorradiograma (Figura 39) muestra claramente rendimientos menores para los productos de PCR modificados. Se cortaron las bandas del gel y se cortaron. Para todos los productos de la PCR el rendimiento de los ácidos nucleicos modificados era de aproximadamente el 50%, refiriéndose al producto de amplificación sin modificación correspondiente. Otros experimentos adicionales demostraron que *exo(-)DeepVent* y ADN polimerasa de *Vent* fueron capaces de incorporar c^7 -dATP y c^7 -dGTP durante la PCR también. El funcionamiento global, sin embargo, resultó ser mejor para la ADN polimerasa de *exo(-)Pfu* dando al menos productos secundarios durante la amplificación. Usando los tres tipos de polimerasas, se encontró que las PCR que emplean c^7 -dATP y c^7 -dGTP en lugar de sus isópteros mostraban menos reacciones secundarias dando un producto de PCR más limpio. El descenso de la aparición de los productos secundarios de la amplificación puede explicarse por una reducción de apareamientos incorrectos debido a la menor estabilidad del complejo formado a partir del cebador y la plantilla que contenía 7-desaza-purina que se sintetiza durante la PCR. Se ha descrito la reducción en el punto de fusión de una cadena doble de ADN que contenía 7-desazapurina (Mizusawa, S. y cols. (1986), *Nucleic Acids Res.*, 14, 1319-1324). Además de las tres polimerasas especificadas anteriormente (ADN polimerasa de *exo(-) Deep Vent*, ADN polimerasa de *Vent* y ADN polimerasa de *exo(-)(Pfu)*), se prevé que pueden usarse otras polimerasas como el la ADN polimerasa del fragmento Klenow extenso de *E. coli*, *Sequenase*, ADN polimerasa de *Taq* y ADN polimerasa U AmpliTaq. Además, cuando la plantilla es de ARN, pueden usarse ARN polimerasas, como SP6 o la ARN polimerasa de 17.

Espectrometría de masas MALDI-TOF de productos de PCR modificados y sin modificar

Los productos de PCR de 99-mero, 103-mero y 200-mero se analizaron mediante EM MALDI-TOF. Basándose en experiencias anteriores, se sabía que el grado de despumación depende de la energía láser usada para la desorción e ionización del analito. Dado que debía investigarse la influencia de la modificación de 7-desazapurina en la fragmentación debida a la despurinación, se midieron todos los espectros con la misma energía láser relativa.

Las Figuras 40a y 40b muestran los espectros de masas de los ácidos nucleicos del 103-mero modificado y no modificado. En el caso de la del 103-mero modificado, la fragmentación provoca una amplia señal de $(M+H)^+$. El máximo del pico se desplaza a masas menores de forma que al masa asignada representa un valor medio de la señal $(M+H)^+$ y las señales de los iones fragmentados, en lugar de la señal $(M+H)^+$ misma. Aunque el 103-mero modificado contiene todavía aproximadamente el 20% de A y G de los cebadores oligonucleotídicos, muestra menos fragmentación que se presenta mediante señales mucho más estrechas y simétricas. Especialmente se reduce sustancialmente el residuo de los picos en la zona de masa más baja debido a la despurinación. Por lo tanto, la diferencia entre la masa medida y la calculada se reduce mucho aunque todavía es inferior a la masa esperada. Para la muestra sin modificaciones se observó una señal de $(M+H)^+$ de 31670, lo que representa una diferencia del 97 u o del 0,3% con la masa calculada. Mientras que en el caso de la masa modificada esta diferencia de masa disminuyó hasta 10 u o 0,03% (31713 u hallada, 31723 u calculada). Estas observaciones se verifican mediante un aumento significativo de la resolución de la masa de la señal de $(M+H)^+$ de las dos cadenas de la señal ($m/\Delta m = 67$ comparado con 18 para la muestra modificada con $\Delta m =$ anchura total a la mitad del máximo, fwhm). Debido a la menor diferencia de masas entre las dos cadenas (8 u) no se resolvieron sus señales individuales.

Con los resultados de los fragmentos de ADN de 99 pares de bases se hace más evidente los efectos de la mayor resolución de masa del ADN que contiene 7-desazapurina. Las dos cadenas individuales de la muestra sin modificar no se resolvieron aunque la diferencia de las masas entre las dos cadenas del producto de la PCR era muy alta con 526 u debido a la distribución desigual de las purinas y las pirimidinas (figura 41a). Por el contrario, el ADN modificado mostró picos diferentes para las dos cadenas individuales (figura 41b) que hace más profunda la superioridad de esta estrategia para la determinación de los pesos moleculares sobre los métodos de electroforesis en gel. Aunque no se obtuvo esta resolución de línea base pudo asignarse las masas individuales con una exactitud de 0,1%: $\Delta m = 27$ u para las más ligeras (masa calc. = 30224 u) y $\Delta m = 14$ u para las más pesadas (masa calc. = 30750 u). De nuevo, se vio que la anchura total en la mitad del máximo se había reducido sustancialmente para la muestra que contenía 7-desazapurina.

En el caso de 99-mero y 103-mero y los ácidos nucleicos que contienen 7-desazapurina parecen dar una mayor intensidad a pesar del hecho de que todavía contienen aproximadamente el 20% de nucleótidos de purina sin modificar. Para obtener una proporción señal-ruido a intensidades similares para las señales de $(M+H)^+$, el 99-mero no modificado requería 20 pulsos de láser en comparación con los 12 del modificado y el 103-mero requería 12 pulsos para la muestras sin modificaciones comparado con los tres del producto de la PCR que contiene 7-desazapurina nucleósido.

Comparando los espectros de los amplicones modificados y sin modificar, se encontró de nuevo una resolución mejorada en la muestra que contenía 7-desazapurina, así como mayores intensidades de señal (figuras 42a y 42b). Mientras que la señal de las cadenas individuales predomina en el espectro de la muestra modificada, la cadena doble y los dímeros de ADN y de las cadenas individuales dio la señal más fuerte para la muestra no modificada.

Puede lograrse una modificación con 7-desazapurinas de los ácidos nucleicos completa usando bien cebadores modificados en PCR o escindiendo los cebadores no modificados del producto de PCR parcialmente modificado. Debido a que los cebadores modificados se asocian a desventajas, como se describe anteriormente, se sintetizó un 100-mero usando cebadores con una ribo-modificación. Los cebadores se escindieron hidrolíticamente con NaOH de acuerdo con un método desarrollado anteriormente en nuestro laboratorio (Koester, H. y cols., *Z. Physiol. Chem.*, 359, 1570-1589). Las Figuras 10a y 10b muestran el espectro del producto de la PCR antes y después de la escisión del cebador. La Figura 10b muestra que la hidrólisis tuvo éxito: tanto el producto hidrolizado de la PCR como los dos cebadores liberados podían detectarse junto con una pequeña señal del 100-mero residual sin escindir. Este procedimiento es especialmente útil para el análisis MALDI-TOF de productos de PCR muy cortos debido a la porción de purinas sin modificar que se originan de los aumentos de los cebadores al incrementar la longitud de la secuencia amplificada.

Las notables propiedades de los ácidos nucleicos modificados con 7-desazapurina pueden explicarse por una desorción y/o ionización más efectivas, mayor estabilidad iónica y/o una menor energía de desnaturalización del ácido nucleico modificado con purina de doble cadena. El intercambio de N-7 por un grupo metina da como resultado la pérdida de un aceptador por un enlace de hidrógeno que influye la capacidad del ácido nucleico para formar estructuras secundarias debido al apareamiento de bases no de Watson-Crick (Seela, F y A. Kehne (1987) *Biochemistry*, 26, 2232-2238), que debe ser una razón para una mejor desorción durante el proceso MALDI. Además de esto, el sistema aromático de 7-desazapurina tiene una menor densidad de electrones que debilita el apareamiento de bases de Watson-Crick dando como resultado un punto de fusión menor (Mizusawa, S. y cols. (1986) *Nucleic Acids Res.*, 14, 1319-1324) de la cadena doble. Este efecto puede disminuir la energía necesaria para la desnaturalización de la cadena doble en el proceso MALDI. Estos aspectos así como la pérdida de un sitio que probablemente porte una carga positiva en el nitrógeno N-7 hacen el ácido nucleico modificado con 7-desazapurina menos polar y puede promover la efectividad de la desorción.

Debido a la ausencia de N-7 como aceptador de protones y la menor polarización del enlace C-N en 7-desazapurina nucleósidos se previene la despurinación que sigue a los mecanismos establecidos para la hidrólisis en solución. Aunque es problemática la correlación directa de las reacciones en solución y en fase de gas, puede esperarse una menor fragmentación debido a la despurinación de los ácidos nucleicos en el proceso MALDI. La despurinación puede acompañarse de pérdida de carga que disminuye el rendimiento total de las especies cargadas o puede producir productos de fragmentación cargados que disminuyen la intensidad de la señal iónica molecular no fragmentada.

La observación tanto de una sensibilidad mayor como de menores residuos de los picos de las señales de (M+H)⁺ en la zona de menor masa debido a la menor fragmentación de las muestras que contienen 7-desazapurina indica que el átomo N-7 es de hecho esencial para el mecanismo de la despumación en el proceso de MALDI-TOF. En conclusión, los ácidos nucleicos que contienen 7-desazapurina muestran claramente una mayor estabilidad iónica y sensibilidad en condiciones de MALDI-TOF y por lo tanto proporcionan una mayor exactitud de la masa y resolución de la masa.

Ejemplo 9

Secuenciación en estado sólido y detección por espectrometría de masas

Materiales y métodos

Se compraron oligonucleótidos de Operan Technologies (Alameda, CA) de forma no purificada. Se realizaron las reacciones de secuenciación sobre una superficie sólida usando reactivos del kit de secuenciación para Sequenase Versión 2.0 (Amersham, Arlington Heights, Illinois).

Secuenciación de un 39-mero diana

Complejo de secuenciación:

5'-TCTGGCCTGGTGCAGGGCCTATTGTAGTTGTGACGTACA-(A^b)_a-3' (ADN 11683) (SEC. ID. N°: 23)

3'-TCAACACTGCATGT-5' (ANP 16/ADN) (SEC. ID. N°: 24).

Para realizar la secuenciación de ADN en estado sólido, la cadena de ADN plantilla 11683 se biotiniló en 3' mediante la desoxinucleotidiltransferasa terminal. Se incubó una reacción de 30 μ l, que contenía 60 pmol de ADN 11683, 1,3 nmol de biotina 14-dATP (GIBCO BRL, Grand Island, NY), 30 unidades de transferasa terminal (Amersham, Arlington Heights, Illinois), y 1 x tampón de reacción (provisto con el enzima), se incubó a 37°C durante 1 hora. La

ES 2 194 985 T7

reacción se terminó mediante inactivación por calor de la transferasa terminal a 70°C durante 10 minutos. El producto resultante se desaló pasándolo a través de una columna espín TE-10 (Clonetech). Pudo añadirse más de una molécula de biotin-14-dATP al extremo 3' de ADN 11683. El ADN 11683 biotinilado se incubó con 0,3 mg de perlas de estreptavidina Dynal en 30 μ l de 1 x tampón de unión y lavado a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las perlas se lavaron dos veces con TE y se redisoluvieron en 30 μ l de TE, para las reacciones de secuenciación se usaron alícuotas de 10 μ l (que contenían 0,1 mg de perlas).

Se resuspendió 0,1 mg de perlas de la etapa anterior en un volumen de 10 μ l que contenía 2 μ l de 5 x tampón de Sequenase (200 mM Tris-HCl, pH 7,5, MgCl₂ 100 mM, y NaCl 250 mM) a partir del kit de Sequenase y 5 pmol del cebador correspondiente de ANP 16/ADN. La mezcla de hibridación se calentó a 70°C y se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo de 20-30 minutos. Después se añadieron 1 μ l de solución de ditiotretol 0,1 M, 1 μ l de tampón de Mn (isocitrato sódico 0,15 M y MgCl₂ 0,1 M), y 2 μ l de Sequenase diluida (3,25 unidades). La mezcla de reacción se dividió en cuatro alícuotas de 3 μ l cada una y se mezcló con mezclas de terminación (cada una consiste en 3 μ l de la mezcla de terminación apropiada: c7dATP 32 μ M, dCTP 32 μ M, c7dGTP 32 μ M, dTTP 32 μ M y 3,2 μ M de una de las cuatro ddTNP, en NaCl 50 mM). Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C durante 2 minutos. Después de completar la extensión, las perlas se precipitaron y se eliminó el sobrenadante. Las perlas se lavaron dos veces y se resuspendieron en TE y se mantuvieron a 4°C.

Secuenciación de un 78-mero diana

Complejo de secuenciación:

5'-AAGATCTGACCAGGGATTTCGGTTAGCGTGACTGCTGCTGCTGCTGCTGC
TGCTGGATGATCCGACGCATCAGATCTGG-(A^b)_n-3 (TNR.PLASM2) (SEC. ID. N°: 25)

3'-CTACTAGGCTGCGTAGTC-5' (CM1) (SEC. ID. N°: 26)

El TNR.PLASM2 diana se biotiniló y se secuenció usando procedimientos similares a los descritos en una sección anterior (secuenciación de un 39-mero diana).

Secuenciación de un 15-mero diana con una sonda parcialmente bicatenaria

5'-F-GATGATCCGACGCATCACAGCTC-3' (SEC. ID. N°: 27)

3'-b-CTACTAGGCTGCGTAGTGTCGAGAACCTTGGCT-3' (SEC. ID. N°: 28)

Se inmovilizó CM1B3B en Dynabeads M280 con estreptavidina (Dyna, Noruega) incubando 60 pmol de CM1B3B con 0,3 de perlas magnéticas en 30 μ l de NaCl 1 M y TE (1 x tampón de unión y lavado) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las perlas se lavaron dos veces con TE y se redisolieron en 30 μ l de TE, para las reacciones de secuenciación se usaron alícuotas de 10 ó 20 μ l (que contenían 0,1 ó 0,2 mg de perlas respectivamente).

La cadena doble se formó hibridando una alícuota correspondiente de perlas de la etapa previa con 10 pmol de DF11A5F (o 20 pmol de DF11a5F para 0,2 mg de perlas) en un volumen de 9 μ l que contiene 2 μ l de 5 x tampón Sequenase (Tris-HCl 200 mM, pH 7,5, MgCl₁ 100 mM, y NaCl 250 mM) del kit de Sequenase. La mezcla de hibridación se calentó a 65°C y se dejó enfriar lentamente a 37°C durante un periodo de tiempo de 20-30 minutos. Entonces se mezcló el cebador bicatenario con 10 pmol de TS1o (20 pmol de TS10 para 0,2 mg de perlas) en un volumen de 1 μ l, y la mezcla resultante se incubó adicionalmente a 37°C durante 5 minutos, a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Después se añadieron 1 μ l de solución de ditiotreitolo 0,1 M, 1 μ l de tampón de Mn (isocitrato sódico 0,15 M y MnCl₂ 0,1 M), y 2 μ l de Sequenase diluida (3,25 unidades). La mezcla de reacción se dividió en cuatro alícuotas de 3 μ l cada una y se mezcló con mezclas de terminación (cada una consiste en 4 μ l de la mezcla de terminación apropiada: dATP 16 μ M, dCTP 16 μ M, dGTP 16 μ M, dTTP 16 μ M y 1,6 μ M de una de las cuatro ddNTP, en NaCl 50 mM). Las mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos, y 37°C durante 5 minutos. Después de completar la extensión, las perlas se precipitaron y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las perlas en 20 μ l de TE y se mantuvieron a 4°C. Se extrajo una alícuota de 2 μ l (de 20 μ l) de cada tubo y se mezcló con 8 μ l de formamida, se desnaturalizaron las mezclas resultantes a 90-95°C durante 5 minutos y 2 μ l (de un total de 10 μ l) se aplicó a un secuenciador de ADN ALF (Pharmacia, Piscataway, NJ) usando un gel de poliacrilamida al 10% que contenía urea 7 M y 0,6 x TBE. La alícuota que quedaba se usó para análisis por MALDI-TOF.

Preparación e instrumentación de muestras por MALDI

Antes del análisis por MALDI, se lavaron dos veces las perlas magnéticas cargadas en escalera usando citrato amónico 50 mM y se resuspendieron en 0,5 µl de agua pura. Después se cargó la suspensión en la diana muestra del espectrómetro de masas y 0,5 µl de la solución matriz saturada (ácido 3-hidropicolínico (HPA): citrato amónico = proporción molar 10:1 en acetonitrilo al 50%). La mezcla se dejó secar antes del análisis espectrométrico de masas.

Para el análisis se usó el reflectrón TOFMS (Vision 2000, Finnigan MAT, Bremen, Alemania). Se aplicaron 5 kV en la fuente de iones y 20 kV para la postaceleración. Todos los espectros se tomaron en el modo de ión positivo y se usó un láser de nitrógeno. Normalmente, cada espectro se promedió entre más de 100 pulsos y se aplicó una corrección estándar de 25 puntos.

*Resultados y análisis**Secuenciación de estado sólido convencional*

En los métodos de secuenciación convencional, se hibrida un cebador directamente a la plantilla y después se extiende y se termina con una secuenciación dideoxi de Sanger. Normalmente, se usa un cebador biotinilado y se capturan mediante perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Después de lavar, se eluyen los productos de las perlas usando EDTA y formamida. Sin embargo, los hallazgos anteriores de los autores indicaban que únicamente la cadena hibridada de una cadena doble se desorbe y la cadena inmovilizada permanece en las perlas. Por lo tanto, es ventajoso inmovilizar la plantilla e hibridar el cebador. Después de la reacción de secuenciación y el lavado, las perlas con la plantilla inmovilizada y la escalera de secuenciación hibridada puede cargarse directamente sobre la diana del espectrómetro de masa y mezclarse con la matriz. En MALDI, únicamente la escalera de secuenciación hibridada se desorberá y se ionizará, y la plantilla inmovilizada permanecerá sobre la diana.

Primero se biotiniló una plantilla de un 39-mero (SEC. ID. N°: 23) en el extremo 3' añadiendo biotin-14-dATP con transferasa terminal. El enzima podía añadir más de una molécula de biotin-14-dATP. Sin embargo, dado que la plantilla estaba inmovilizada y permanecía sobre las perlas durante el MALDI, el número de biotin-14-dATP no afectaría al espectro de masas. Se usó un cebador de 14-mero (SEC. ID. N°: 29) para la secuenciación en estado sólido. Se muestran los espectros de masas MALDI-TOF de las cuatro escaleras de secuenciación en la Figura 34 y los valores teóricos esperados se muestran en la Tabla II.

TABLA II

1.	5' - TCTGGCCTGGTGCAGGGCCTATTGTAGTTGTGACGTACA - (A ^b) _n - 3'
2.	3' - TCAACACTGCATGT - 5'
3.	3' - ATCAACACTGCATGT - 5'
4.	3' - CATCAACACTGCATGT - 5'
5.	3' - ACATCAACACTGCATGT - 5'
6.	3' - AACATCAACACTGCATGT - 5'
7.	3' - TAACATCAACACTGCATGT - 5'
8.	3' - ATAACATCAACACTGCATGT - 5'
9.	3' - GATAACATCAACACTGCATGT - 5'
10.	3' - GGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
11.	3' - CCGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
12.	3' - CCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
13.	3' - CCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
14.	3' - TCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
15.	3' - GTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
16.	3' - CGTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
17.	3' - ACGTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
18.	3' - CACGTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
19.	3' - CCACGTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
20.	3' - ACCACGTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
21.	3' - GACCACGTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
22.	3' - GGACCACGTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
23.	3' - CCGACCACGTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
24.	3' - CCGGACCACGTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
25.	3' - ACCGGACCACGTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
26.	3' - GACCGGACCACGTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'
27.	3' - AGACCGGACCACGTCCCGGATAACATCAACACTGCATGT - 5'

ES 2 194 985 T7

TABLA II (continuación)

		Reacción A	Reacción C	Reacción G	Reacción T
5	1.				
	2.	4223,8	4223,9	4223,8	4223,8
	3.	4521,1			
10	4.		4809,2		
	5.	5122,4			
	6.	5434,6			
15	7.				5737,8
	8.	6051,1			
	9.			6379,2	
20	10.			6704,4	
	11.		6995,6		
	12.		7284,8		
25	13.		7574,0		
	14.				7878,2
	15.			8207,4	
30	16.		8495,6		
	17.	8808,8			
	18.		9097,0		
35	19.		9386,2		
	20.	9699,4			
	21.			10027,6	
40	22.			10355,8	
	23.		10644,0		
45	24.		10933,2		
	25.	11246,4			
	26.			11574,6	
50	27.	11886,8			

La reacción de secuenciación produjo una escalera relativamente homogénea, y se determinó fácilmente la secuencia completa. Un pico que apareció alrededor de 5150 en todas las reacciones no se ha identificado. Una explicación posible es que una pequeña parte de la plantilla formó algún tipo de estructura secundaria, como un bucle, que dificultó la extensión por la Sequenase. La incorporación errónea es de una importancia menor, dado que la intensidad de estos picos fue mucho menor que la de las escaleras de secuenciación. Aunque se usaron 7-desazapurinas en la reacción de secuenciación, que podrían estabilizar el enlace N-glicosídico e impedir la despurinización. La escalera completa, con una ddA en el extremo 3', apareció en la reacción A con una masa aparente de 11899,8. Sin embargo, apareció un pico más intenso de 122 en las cuatro reacciones y es probablemente debido a la adición de un nucleótido extra por la enzima Sequenase.

Podría usarse la misma técnica para secuenciar fragmentos mayores de ADN. Se biotiniló en 3' un 78-mero plantilla que contenía una repetición CTG (SEC. ID. N°: 25) mediante la adición de biotin-14-dATP con transferasa terminal. Se hibridó un 18-mero cebador (SEC. ID. N°: 26) justo por fuera de la repetición CTG de forma que pudiera secuenciarse la repetición inmediatamente después de la extensión del cebador. Se lavaron y analizaron las cuatro reacciones por EM MALDI-TOF como habitualmente. En la Figura 35 se muestra un ejemplo de la reacción G y la escalera de

TABLA III

5' - AAGATCTGACCAGGGAATTCGGTTAGCGTAGCTGCTGCTGCTGATGATCCGACGCATCCAGATCTGG - (A^B)_n - 3'

3' - CTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - CCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - ACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - GACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - CGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - ACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - GACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - GACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - ACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - GACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - CGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - ACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - GACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - CGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - ACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - GACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - CGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - ACGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - GACGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - CGACGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - ACGACGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - GACGACGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - CGACGACGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - CTGACGACGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - ACTGACGACGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - CACTGACGACGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - GCACGACGACGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - CGCAGGACGACGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

3' - TCGGCACTGACGACGACGACGACGACGACCTACTAGGCTGCGTAGTC - 5'

Tabla III. Continuación

[illegible]

ES 2 194 985 T7

TABLA III (continuación)

		ddATP	ddCTP	ddGTP	ddTTP
5	1.	5491,6	5491,6	5491,6	5491,6
	2.		5764,8		
10	3.	6078,0			
	4.			6407,2	
	5.		6696,4		
15	6.	7009,6			
	7.			7338,8	
	8.		7628,0		
20	9.	7941,2			
	10.			8270,4	
	11.		8559,6		
25	12.	8872,8			
	13.			9202,0	
	14.		9491,2		
30	15.	9804,4			
	16.			10133,6	
	17.		10422,88		
35	18.	10736,0			
	19.			11065,2	
	20.		11354,4		
40	21.	11667,6			
	22.			11996,8	
	23.		12286,0		
45	24.	12599,2			
	25.			12928,4	
	26.				13232,6
50	27.		13521,8		
	28.	13835,0			
	29.		14124,2		
55	30.			14453,4	
	31.		14742,6		
60	32.				15046,8

65

ES 2 194 985 T7

TABLA III (continuación)

5	33.	15360,0		
	34.	15673,2		
	35.		15962,4	
10	36.		16251,6	
	37.			16580,8
	38.	16894,0		
15	39.	17207,2		
	40.			17511,4
	41.		17800,6	
20	42.		18089,8	
	43.		18379,0	
	44.			18683,2
25	45.		19012,4	
	46.		19341,6	
	47.			19645,8
30	48.		19935,0	
	49.	20248,2		
	50.		20577,4	
35	51.	20890,6		
	52.			21194,4
	53.		21484,0	
40	54.			21788,2
	55.			22092,4

Secuenciación usando sondas de ADN bicatenaria para capturar y cebar

Se ha demostrado que las sondas de ADN bicatenario con colgante de cadena sencilla son capaces de capturar plantillas de ADN específicas y sirven también como cebadores para la secuenciación de estado sólido. El esquema se muestra en la Figura 46. Las interacciones de apilamiento entre una sonda bicatenaria y una plantilla de cadena sencilla permiten que un colgante de 5 bases sea suficiente para la captura. Basándose en este formato, un 23-mero marcado con fluorescencia en 5' (5'-GAT GAT CCG ACG CAT CAC AGC TC) (SEC. ID. N°: 29) se híbrida a un 18-mero biotinilado en 3' (5'-GTG ATG CGT CGG ATC ATC) (SEC. ID. N°: 30), dejando un colgante de 5 bases. Se capturó una plantilla de 15-mero (5'-TCG GTT CCA AGA GCT) (SEC. ID. N°: 31) con la cadena doble y se realizaron las reacciones de secuenciación mediante la extensión del colgante de 5 bases. Los espectros de masas MALDI-TOF se muestran en la Figura 47A-D. Todos los picos de secuenciación se resolvieron aunque a intensidades relativamente bajas. El último pico en cada reacción se debe a la adición inespecífica de un nucleótido al producto de extensión de longitud completa por la enzima Sequenase. Como comparación, se procesó los mismos productos en un secuenciador de ADN convencional y el fluorograma de apilamiento de los resultados se muestra en la Figura 48. Como puede verse en la Figura, los espectros de masas tenían el mismo patrón que el fluorograma con picos de secuenciación a una intensidad mucho menor comparado con el 23-mero cebador.

Mejoras de la espectrometría de masas MALDI-TOF como técnica de detección

La distribución de las muestras puede hacerse más homogénea y podría potencialmente aumentarse la intensidad de la señal implementando la técnica de vial de microlitro. En la práctica, las muestras pueden cargarse en pequeños

pocillos con aberturas cuadradas de $100\ \mu\text{m}$ de tamaño. Las perlas usadas en la secuenciación de estado sólido son menores de $10\ \mu\text{m}$ en diámetro, de forma que podrían encajar bien en los viales de microlitro. Los microcristales de matriz y los “puntos suaves” que contienen ADN se confinarán en el vial. Dado que el tamaño del haz de láser es de aproximadamente $100\ \mu\text{m}$ de diámetro, cubre la apertura completa del vial. Por lo tanto, será innecesaria la búsqueda de puntos suaves y puede usarse el láser de alta repetición (por ejemplo $>10\ \text{Hz}$) para adquirir los espectros. Un informe anterior ha demostrado que este dispositivo es capaz de aumentar la sensibilidad de detección de los péptidos y proteínas en diversos órdenes de magnitud comparado con la técnica convencional de preparación de muestras para MALDI.

La resolución de MALDI para el ADN debe mejorarse adicionalmente para extender el intervalo de secuenciación más allá de las 100 bases. Actualmente, al usar 3-HPA/citrato amónico como matriz y un espectrómetro de masas TOF con fuente de iones de 5 kV y postaceleración de 20 kV, la resolución de los picos del barrido de la Figura 33 (73-mero) es mayor de 200 (FWHM) lo que es suficiente para la determinación de la secuencia en este caso. Esta resolución es también la mayor publicada para los iones de ADN desorbidos para MALDI por encima del rango de 70-mero. El uso de la técnica de extracción retrasada puede potenciar adicionalmente la resolución.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para detectar una o más secuencias de ácidos nucleicos diana presentes en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

a) hibridar uno o más oligonucleótidos de detección con una o más moléculas de ácidos nucleicos y eliminar el oligonucleótido de detección no hibridado;

b) ionizar y volatilizar el producto de la etapa a); y

c) analizar el ácido nucleico ionizado y volatilizado por espectrometría de masas, en el que la detección del oligonucleótido de detección por espectrometría de masas indica la presencia de una secuencia de ácido nucleico diana en la muestra biológica.

2. Un proceso de la reivindicación 1 en el que la molécula de ácido nucleico se inmoviliza sobre un soporte sólido.

3. Un proceso de la reivindicación 2 en el que la inmovilización se logra mediante la hibridación entre una molécula de ácido nucleico de captura complementaria, que ha sido previamente inmovilizada sobre un soporte sólido, y una secuencia específica complementaria en la molécula de ácido nucleico.

4. Un proceso de la reivindicación 2, en el que la inmovilización se logra mediante unión directa de la molécula de ácido nucleico al soporte sólido.

5. Un proceso de la reivindicación 2, en el que antes de la inmovilización, se amplifica la molécula de ácido nucleico.

6. Un proceso de la reivindicación 5, en el que la molécula de ácido nucleico se amplifica mediante un procedimiento de amplificación seleccionado del grupo que consiste en: clonación, amplificación basada en la transcripción, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), y la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA).

7. Un proceso de la reivindicación 2, en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en: perlas, superficies planas, puntas, salientes y pastillas.

8. Un proceso de la reivindicación 7, en el que la inmovilización se logra mediante la hibridación entre un sistema matricial de moléculas de ácidos nucleicos de captura complementarias, que han sido previamente inmovilizadas sobre un soporte sólido, y una porción de la molécula de ácido nucleico, que es diferente de la secuencia de ácidos nucleicos diana.

9. Un proceso de la reivindicación 8, en el que las moléculas de ácidos nucleicos de captura complementarias son oligonucleótidos u oligonucleótidos miméticos.

10. Un proceso de la reivindicación 2, en el que la inmovilización es reversible.

11. Un proceso de la reivindicación 1, en el que el formato de la espectrometría de masas se selecciona del grupo que consiste en: tiempo de vuelo de ionización desorción por láser asistida por matriz (MALDI-TOF), Electropulverización (ES), Resonancia de ión-ciclotrón (ICR), Transformada de Fourier y combinaciones de las mismas.

12. Un proceso de la reivindicación 1, en el que antes de la etapa b), uno del oligonucleótido de detección y la molécula de ácido nucleico o ambos se tratan para disminuir la energía de láser requerida para la volatilización, minimizar la fragmentación o eliminar el ensanchamiento de los picos.

13. Un proceso de la reivindicación 1, en el que al menos dos oligonucleótidos u oligonucleótidos miméticos de detección son diferenciados en sus masas para detectar y distinguir al menos dos secuencias de ácidos nucleicos de forma simultánea.

14. Un proceso de la reivindicación 13, en el que la diferenciación de las masas se logra mediante diferencias en la longitud o secuencia de los, al menos dos, oligonucleótidos.

15. Un proceso de la reivindicación 13, en el que la diferenciación de las masas se logra mediante la introducción de funciones que modifican la masa en el resto base, azúcar o fosfato de los oligonucleótidos de detección.

16. Un proceso de la reivindicación 13, en el que la diferenciación de las masas se logra mediante intercambio de cationes en el enlace fosfodiéster.

17. Un proceso de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico se replica usando desoxinucleosidotrifosfatos de masa modificada y ADN polimerasa dependiente de ARN antes de la espectrometría de masas.

18. Un proceso de la reivindicación 1, en el que la molécula de ácido nucleico se replica usando ribonucleótido-trifosfatos de masa modificada y ARN polimerasa dependiente de ADN antes de la espectrometría de masas.

19. Un proceso de la reivindicación 1, en el que la secuencia de ácidos nucleicos diana es una huella genética de ADN o está implicada en una enfermedad o estado seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad genética, una anomalía cromosómica, una predisposición genética, una infección viral, una infección fúngica, una infección bacteriana y una infección por protistas.

20. Un proceso para detectar una o más secuencias de ácidos nucleicos diana presentes en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

a) amplificar una o más moléculas de ácidos nucleicos;

b) hibridar uno o más oligonucleótidos de detección con una o más moléculas de ácidos nucleicos y eliminar el oligonucleótido de detección no hibridado;

c) ionizar y volatilizar el producto de la etapa b); y

d) analizar el ácido nucleico ionizado y volatilizado por espectrometría de masas, en el que la detección del oligonucleótido de detección por espectrometría de masas indica la presencia de la secuencia de ácido nucleico diana en la muestra biológica.

21. Un proceso de la reivindicación 20, en el que la molécula de ácido nucleico se amplifica mediante un procedimiento de amplificación seleccionado del grupo que consiste en: clonación, amplificación basada en la transcripción, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), y la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA).

22. Un proceso de la reivindicación 20, en el que el espectrómetro de masas se selecciona del grupo que consiste en: tiempo de vuelo de ionización desorción por láser asistida por matriz (MALDI-TOF), Electropulverización (ES), Resonancia de ión-ciclotrón (ICR), Transformada de Fourier y combinaciones de las mismas.

23. Un proceso de la reivindicación 20, en la que antes de la etapa c), uno del oligonucleótido de detección y la molécula de ácido nucleico o ambos se tratan para disminuir la energía láser requerida para la volatilización, minimizar la fragmentación o eliminar el ensanchamiento del pico.

24. Un proceso de la reivindicación 23, en el que al menos dos oligonucleótidos u oligonucleótidos miméticos de detección son diferenciados en sus masas para detectar y distinguir al menos dos secuencias de ácidos nucleicos de forma simultánea.

25. Un proceso de la reivindicación 24, en el que la diferenciación de las masas se logra mediante funciones que modifican la masa unidas a los cebadores usados para la amplificación.

26. Un proceso de la reivindicación 24, en el que la diferenciación de las masas se logra mediante el intercambio de cationes o eliminación de la carga en el enlace fosfodiéster.

27. Un proceso de la reivindicación 20, en el que la molécula de ácido nucleico es ADN.

28. Un proceso de la reivindicación 20, en el que la molécula de ácido nucleico es ARN.

29. Un proceso de la reivindicación 20, en el que antes de la etapa c) las moléculas de ácidos nucleicos amplificados se inmovilizan sobre un soporte sólido.

30. Un proceso de la reivindicación 29, en el que la inmovilización se logra mediante la hibridación entre una molécula de ácido nucleico de captura complementaria, que ha sido previamente inmovilizada sobre un soporte sólido, y la molécula de ácido nucleico.

31. Un proceso de la reivindicación 29, en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en: perlas, superficies planas, puntas, salientes y pastillas.

32. Un proceso de la reivindicación 29, en el que la inmovilización es reversible.

33. Un proceso de la reivindicación 20 en el que la secuencia de ácidos nucleicos diana es una huella genética de ADN o indica en una enfermedad o estado seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad genética, una anomalía cromosómica, una predisposición genética, una infección viral, una infección fúngica, una infección bacteriana y una infección por protistas.

34. Un proceso para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

a) replicar una molécula de ácido nucleico;

b) digerir específicamente la molécula de ácido nucleico replicada usando al menos una nucleasa apropiada, produciendo así fragmentos digeridos; y

c) analizar los fragmentos por espectrometría de masas, en el que la determinación del peso molecular de los fragmentos indica si está presente la secuencia de ácidos nucleicos diana.

35. Un proceso de la reivindicación 34, en el que los fragmentos de ácidos nucleicos se inmovilizan sobre un soporte sólido.

36. Un proceso de la reivindicación 35, en el que el soporte sólido contiene moléculas de ácidos nucleicos de captura complementarias.

37. Un proceso de la reivindicación 35, en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en: perlas, superficies planas, puntas, salientes y pastillas.

38. Un proceso de la reivindicación 36, en el que las moléculas de ácidos nucleicos de captura complementarias son oligonucleótidos u oligonucleótidomiméticos.

39. Un proceso de la reivindicación 35, en el que la inmovilización es reversible.

40. Un proceso de la reivindicación 34, en el que el espectrómetro de masas se selecciona del grupo que consiste en: tiempo de vuelo de ionización desorción por láser asistida por matriz (MALDI-TOF), Electropulverización (ES), Resonancia de ión-ciclotrón (ICR), Transformada de Fourier y combinaciones de las mismas.

41. Un proceso de la reivindicación 34, en la que antes de la etapa c), los fragmentos de ácidos nucleicos se tratan para disminuir la energía láser requerida para la volatilización, minimizar la fragmentación o eliminar el ensanchamiento del pico.

42. Un proceso de la reivindicación 41, en el que el tratamiento es la diferenciación de masas.

43. Un proceso de la reivindicación 42, en el que la diferenciación de masas se logra mediante la introducción de funciones que modifican la masa en el resto base, azúcar o fosfato de los oligonucleótidos de detección.

44. Un proceso de la reivindicación 41, en el que el tratamiento se logra mediante intercambio de cationes en el enlace fosfodiéster.

45. Un proceso de la reivindicación 34, en el que la molécula de ácido nucleico se replica a ADN usando desoxinucleósido y/o didesoxinucleosidotrifosfatos de masa modificada y ADN polimerasa dependiente de ARN.

46. Un proceso de la reivindicación 34, en el que la molécula de ácido nucleico se replica a ARN usando ribonucleósido y/o 3' didesoxinucleosidotrifosfatos de masa modificada y ARN polimerasa dependiente de ADN.

47. Un proceso de la reivindicación 34, en el que la molécula de ácido nucleico se replica a ADN usando desoxinucleósido y/o didesoxinucleosidotrifosfatos de masa modificada y ADN polimerasa dependiente de ADN.

48. Un proceso de la reivindicación 34 en el que la secuencia de ácidos nucleicos diana es una huella genética de ADN o indica una enfermedad o estado seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad genética, una anomalía cromosómica, una predisposición genética, una infección viral, una infección fúngica, una infección bacteriana y una infección por protistas.

49. Un proceso para identificar un nucleótido diana en una molécula de ácido nucleico, que comprende las etapas de:

a) hibridar la molécula de ácido nucleico con un oligonucleótido cebador que es complementario a un sitio adyacente al nucleótido diana en una molécula de ácido nucleico;

b) poner en contacto el producto de la etapa a) con un conjunto completo de didesoxinucleosidotrifosfatos, 3'-didesoxinucleosidotrifosfatos o ribonucleotidotrifosfatos y una polimerasa, de forma que el didesoxinucleótido, 3'-deseoxinucleosido o ribonucleótidotrifosfato que es complementario al nucleótido diana se extiende en el cebador;

c) ionizar y volatilizar el producto de la etapa b); y

d) analizar el ácido nucleico ionizado y volatilizado por espectrometría de masas, en el que la detección del cebador por espectrometría de masas determina la identidad del nucleótido diana.

5 50. Un proceso de la reivindicación 49, en el que antes de la etapa a) la molécula de ácido nucleico se inmoviliza sobre un soporte sólido.

51. Un proceso para detectar una mutación en una molécula de ácido nucleico, que comprende las etapas de:

10 a) hibridar una molécula de ácido nucleico con un cebador oligonucleotídico, formando así un apareamiento incorrecto en el sitio de una mutación;

b) poner en contacto el producto de la etapa a) con una endonucleasa específica de cadena sencilla;

15 c) ionizar y volatilizar el producto de la etapa b); y

d) detectar los productos obtenidos por espectrometría de masas, en el que la presencia de más de un fragmento indica que la molécula de ácido nucleico contiene una mutación.

20 52. Un proceso para detectar una secuencia de ácidos nucleicos diana presente en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

a) obtener un ácido nucleico que contiene una secuencia de ácidos nucleicos diana a partir de una muestra biológica;

25 b) realizar al menos una hibridación de la secuencia de ácidos nucleicos diana con un conjunto de eductos de ligamiento y una ADN ligasa termoestable, formando así un producto de ligamiento;

c) ionizar y volatilizar el producto de la etapa b); y

30 d) detectar el producto de ligamiento por espectrometría de masas y comparar el valor obtenido con un valor conocido para determinar la secuencia de ácidos nucleicos diana.

35 53. Un proceso de la reivindicación 34, en el que la nucleasa es una endonucleasa.

54. Un proceso para detectar una o más secuencias de ácidos nucleicos diana en una muestra biológica que comprende:

40 a) amplificar una o más moléculas de ácidos nucleicos diana;

b) ionizar y volatilizar el producto de la etapa a); y

45 c) analizar el ácido nucleico ionizado y volatilizado por espectrometría de masas, en el que la detección de la secuencia de ácidos nucleicos mediante espectrometría de masas indica la presencia de la secuencia de ácidos nucleicos diana en la muestra biológica;

a condición de que el producto ionizado y volatilizado no sea:

50 (i) una molécula de ácido nucleico que no contiene ninguna o contiene hasta diez cargas negativas y no contiene ninguna o contiene hasta diez cargas positivas, en la que cuando la molécula de ácido nucleico no tiene cargas negativas, ésta tiene más de 17 enlaces azúcar-azúcar y cuando el ácido nucleico tiene una carga hay menos cargas que enlaces azúcar-azúcar; o

55 (ii) una molécula de ácido nucleico que comprende un enlace no fosfato cargado negativamente y en la que la carga de todos, o de hasta todos menos diez, los enlaces azúcar-azúcar de dicha molécula de ácido nucleico se han eliminado; y

60 preparándose la molécula de ácido nucleico definida en (i) y (ii) a partir de ADN molde derivado de un paciente, siendo dicho paciente en el que debe determinarse la presencia o ausencia de una mutación, y que se amplifica por PCR.

65 55. Un proceso de la reivindicación 1 ó 54, por el que puede detectarse o determinar la identidad de una enfermedad genética, anomalía cromosómica, predisposición genética a una enfermedad o estado o infección por un patógeno.

56. Un proceso de la reivindicación 2 en el que una pluralidad de ácidos nucleicos se disponen sobre un soporte sólido en un sistema matricial y cada punto del sistema matricial se somete a análisis por espectrometría de masas.

ES 2 194 985 T7

57. Uso del análisis espectrométrico de masas para detectar en una muestra biológica, una enfermedad genética, una anomalía cromosómica, una predisposición genética a una enfermedad o estado o una infección por un patógeno determinando si dicha muestra incluye una secuencia de ácidos nucleicos diana que tiene un peso molecular, según se determina por dicha espectroscopia de masas, que es característica de dicha enfermedad, anomalía, estado o infección;

a condición de que la secuencia de ácido nucleico diana no sea:

(i) una molécula de ácido nucleico que no contiene ninguna o contiene hasta diez cargas negativas y no contiene ninguna o contiene hasta diez cargas positivas, en la que cuando la molécula de ácido nucleico no tiene cargas negativas, ésta tiene más de 17 enlaces azúcar-azúcar y cuando el ácido nucleico tiene una carga hay menos cargas que enlaces azúcar-azúcar; o

(ii) una molécula de ácido nucleico que comprende un enlace no fosfato cargado negativamente y en la que la carga de todos, o de hasta todos menos diez, los enlaces azúcar-azúcar de dicha molécula de ácido nucleico se han eliminado; y

preparándose la molécula de ácido nucleico definida en (i) y (ii) a partir de ADN molde derivado de un paciente, siendo dicho paciente un paciente en el que debe determinarse la presencia o ausencia de una mutación, causando dicha mutación una enfermedad genética, y que se amplifica por PCR.

58. Uso del análisis espectrométrico de masas para obtener, de una muestra biológica, información relacionada con la identidad, herencia, o compatibilidad genética del individuo del que se obtiene la muestra determinando si dicha muestra incluye un ácido nucleico diana que tiene un peso molecular, según se determina por espectrometría de masas, que es representativo de dicha identidad, herencia o compatibilidad.

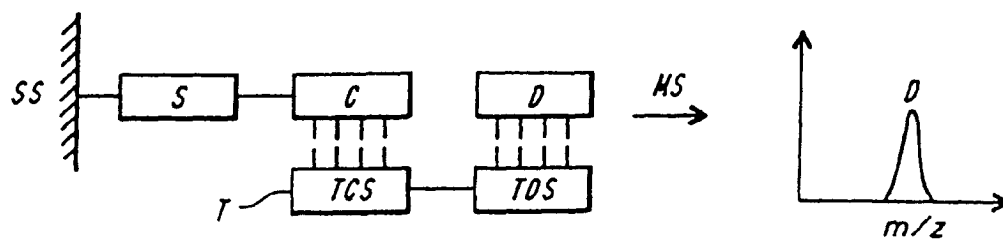


FIG. 1A

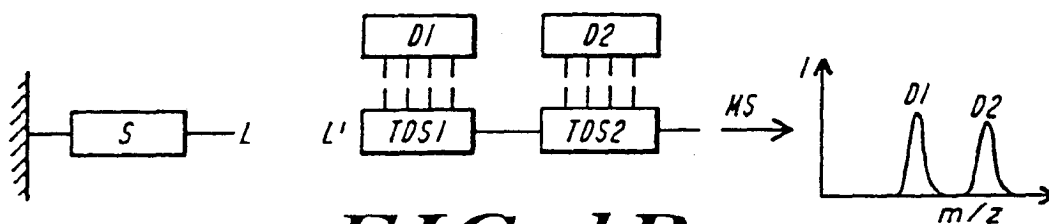
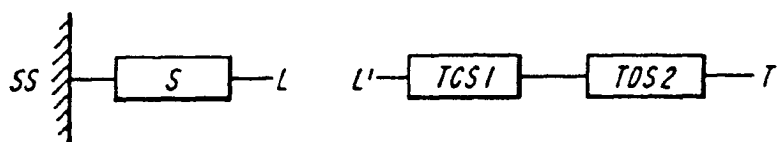


FIG. 1B

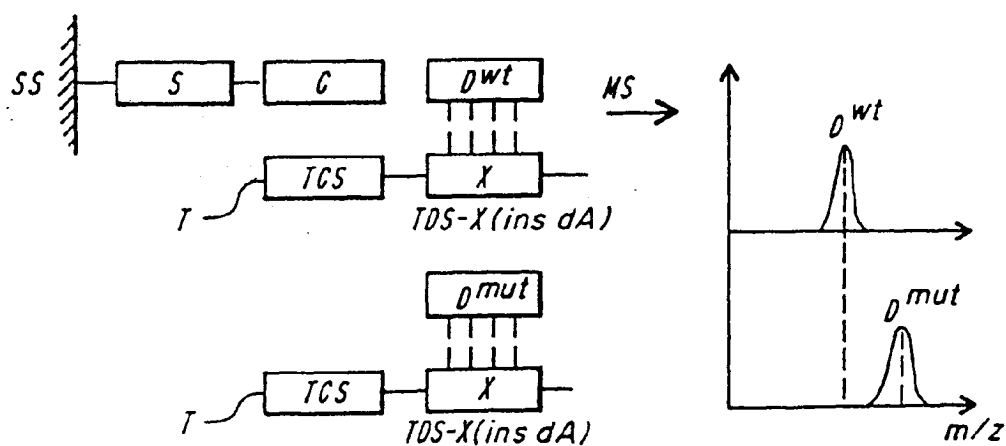


FIG. 1C

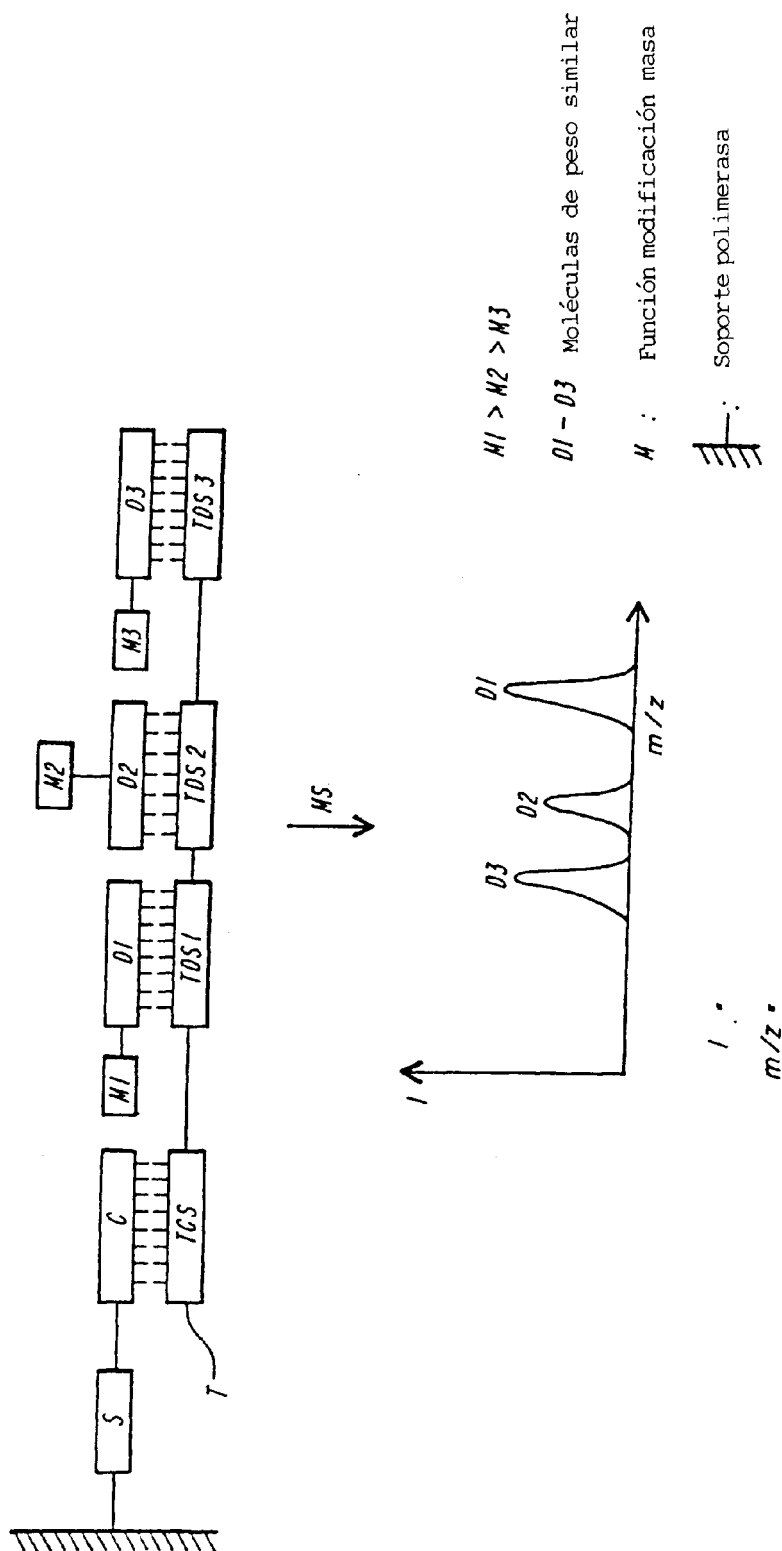


FIG. 2

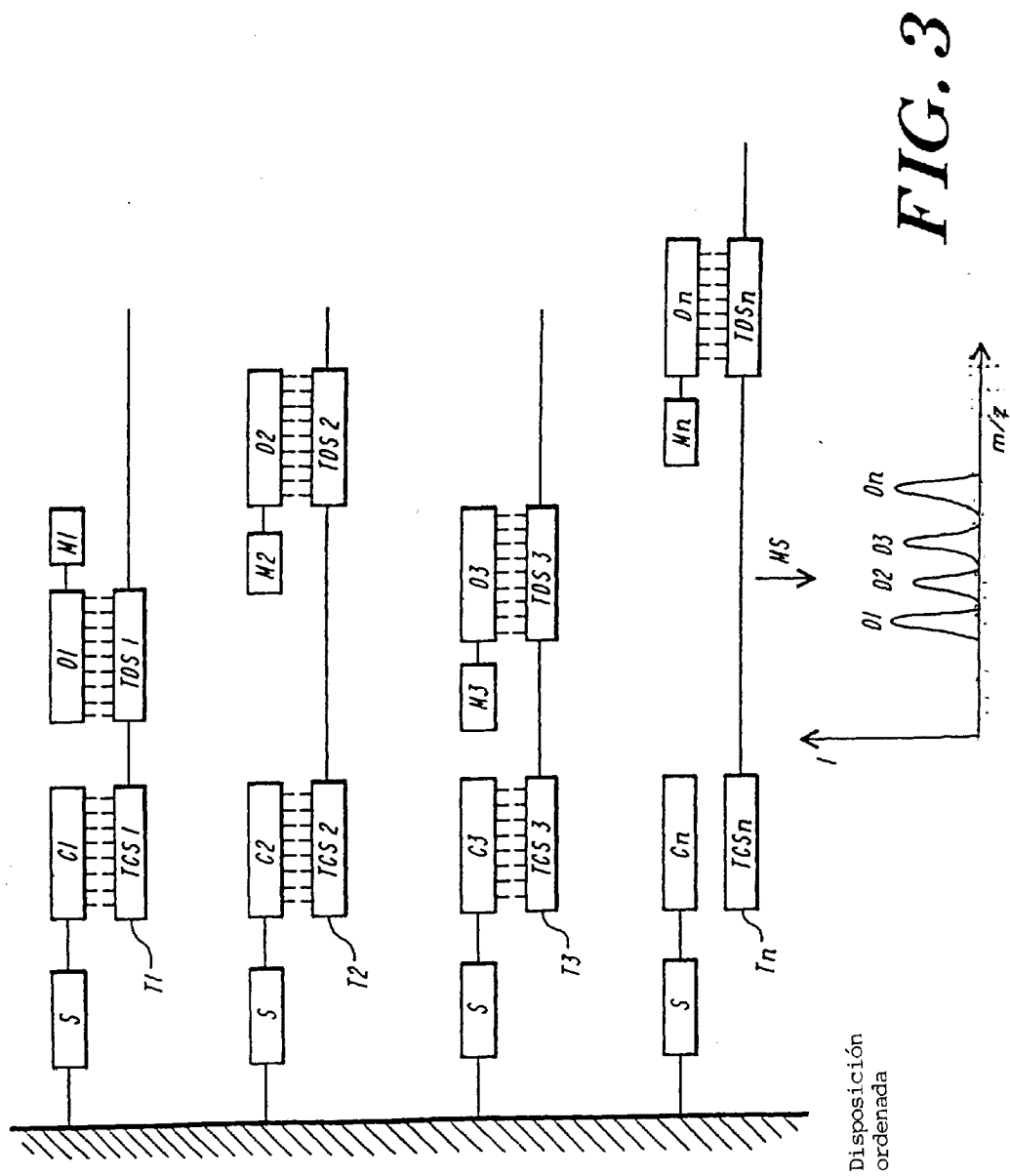
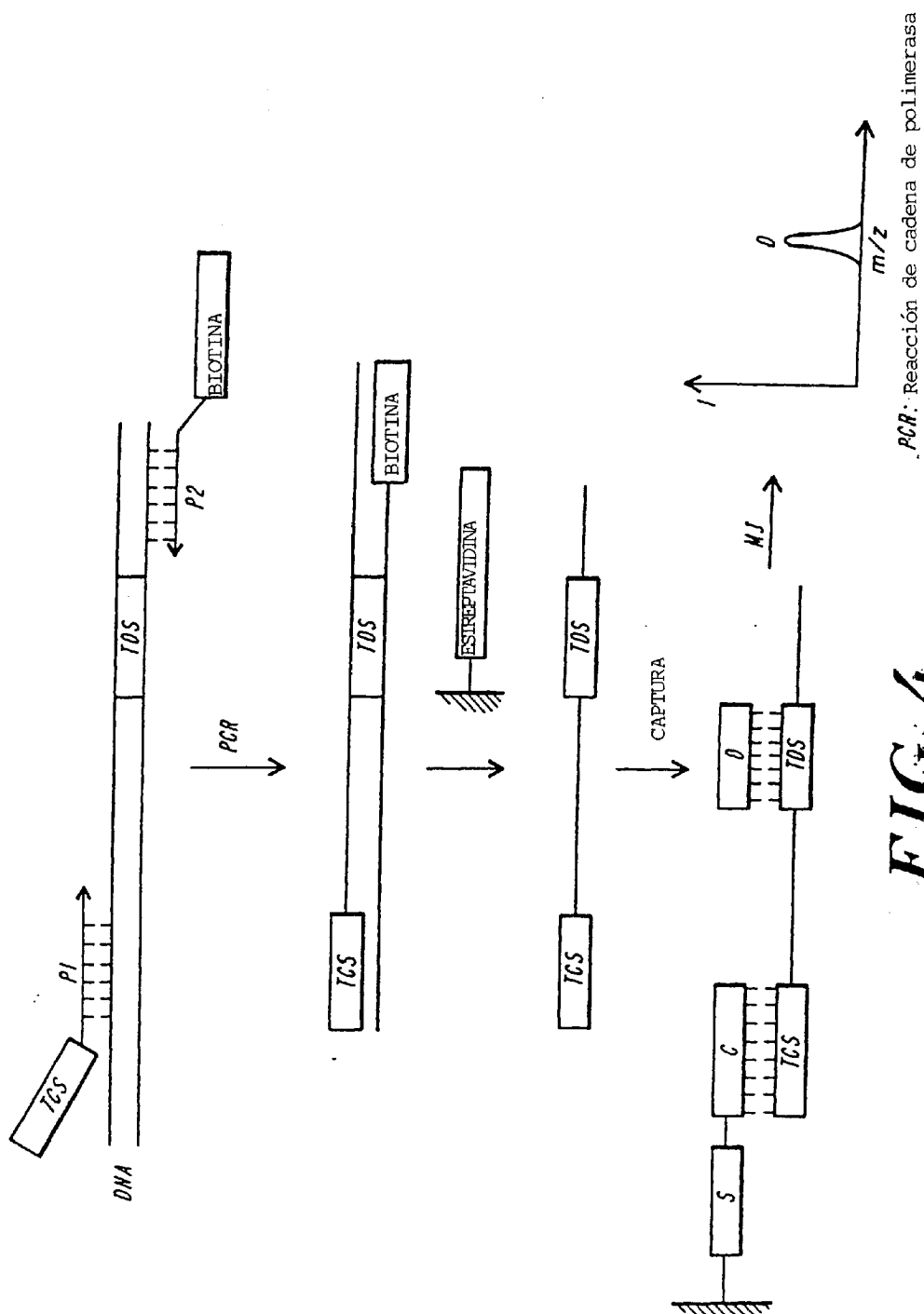
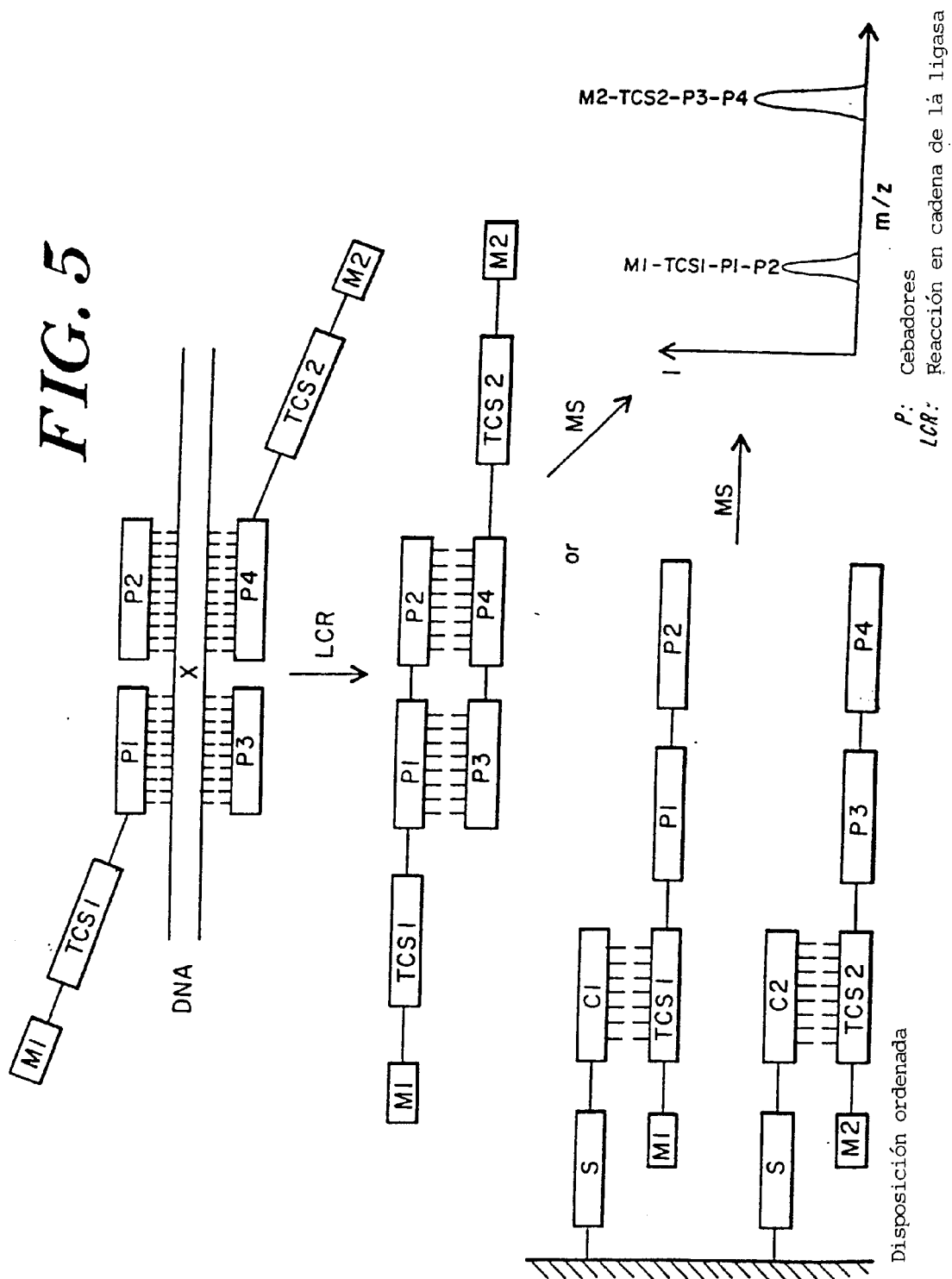


FIG. 3





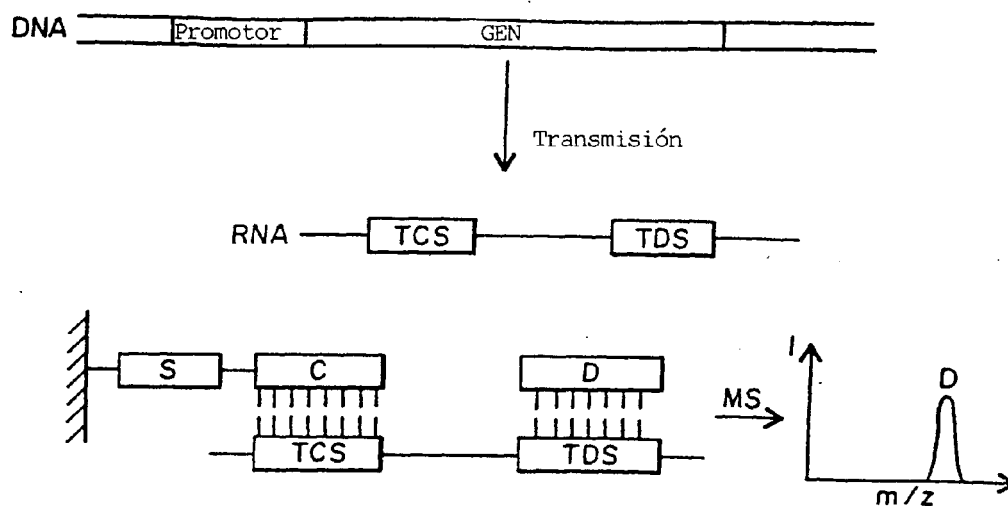


FIG. 6A

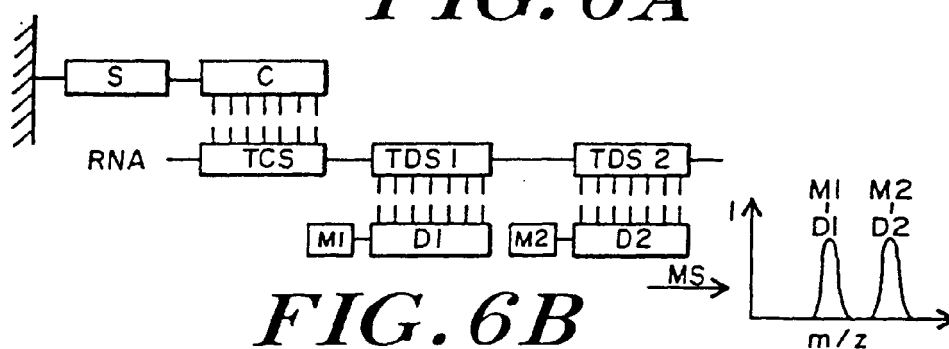


FIG. 6B

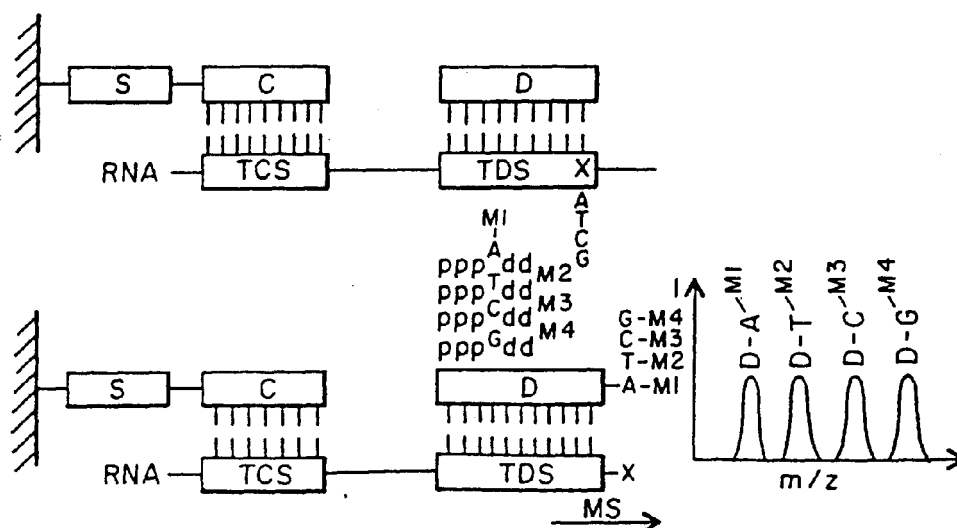


FIG. 6C

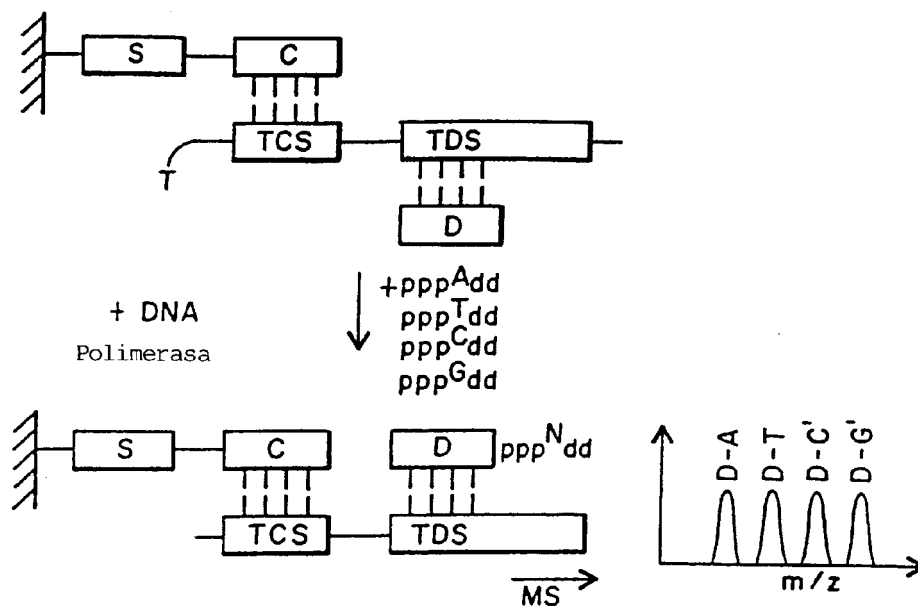


Fig. 7A

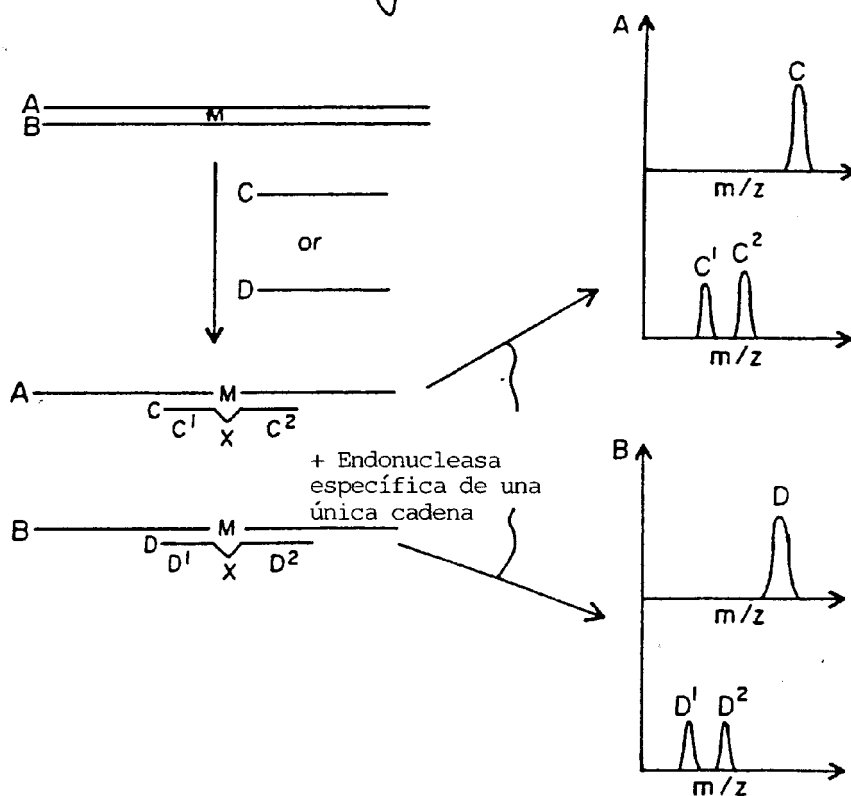


FIG. 7B

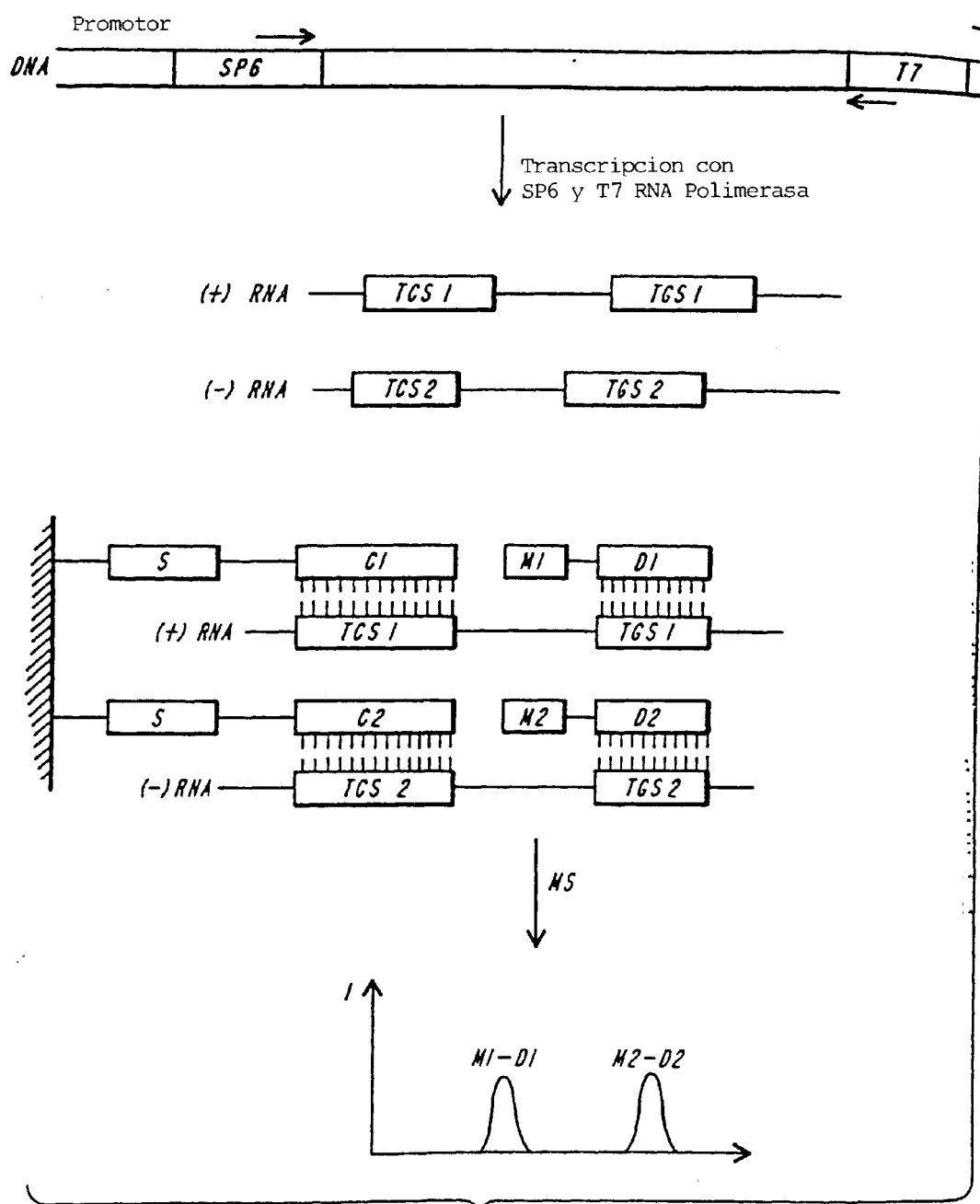


FIG. 8

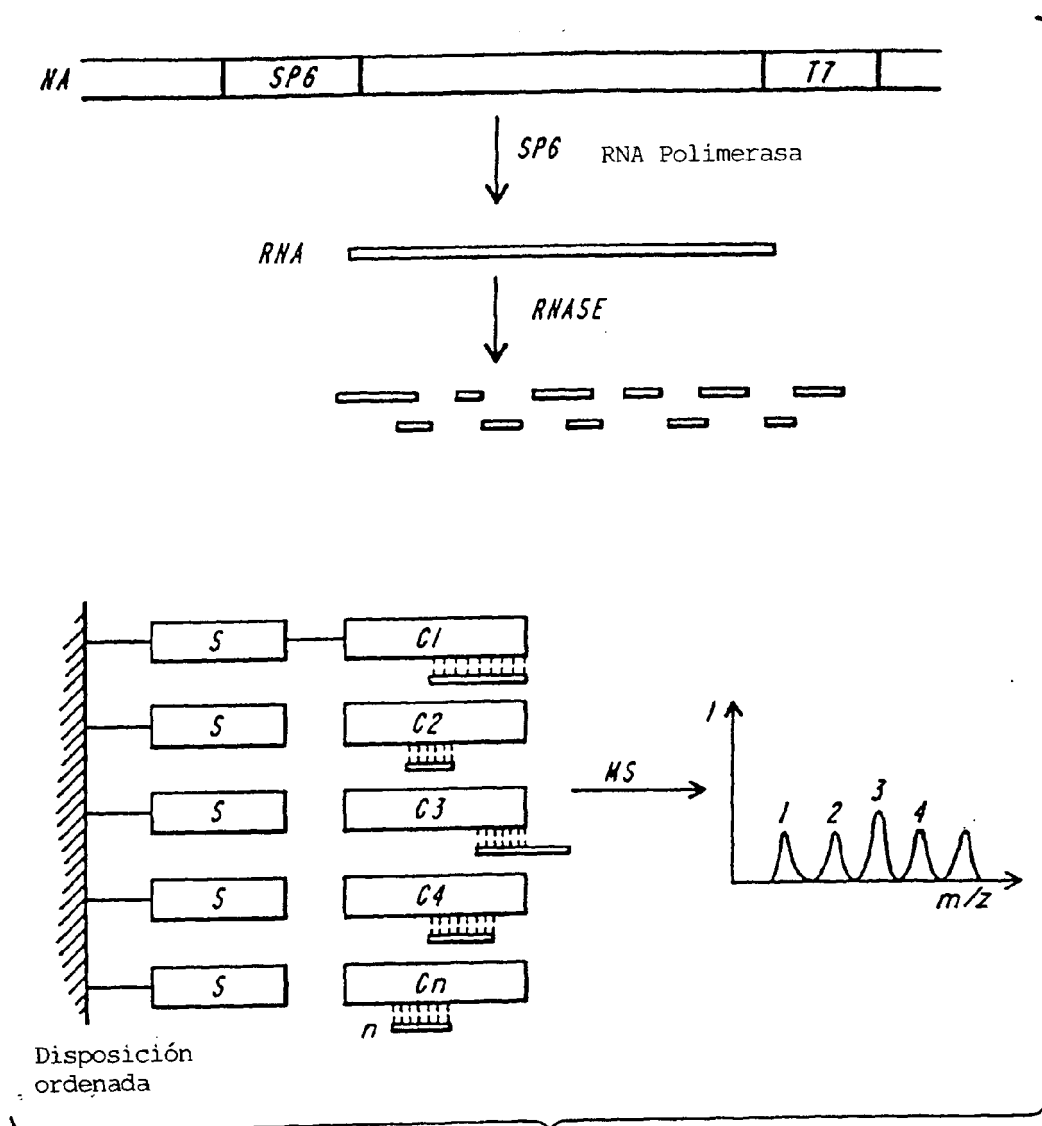
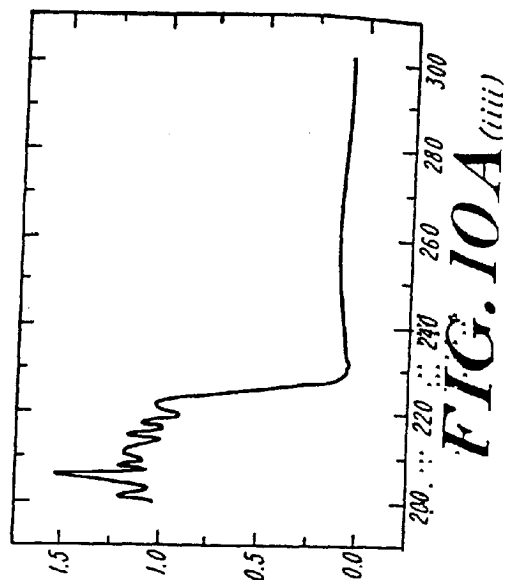
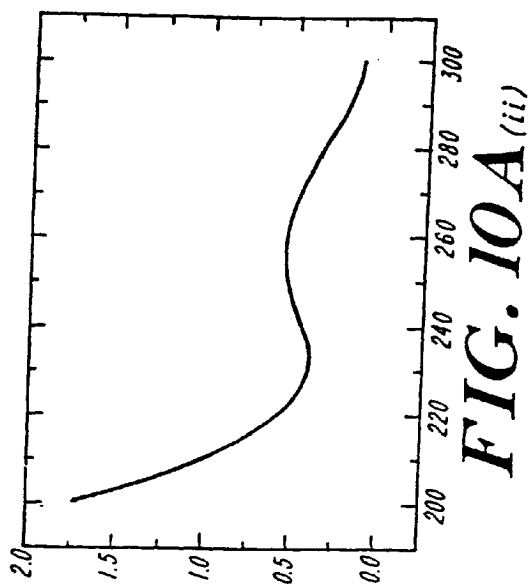
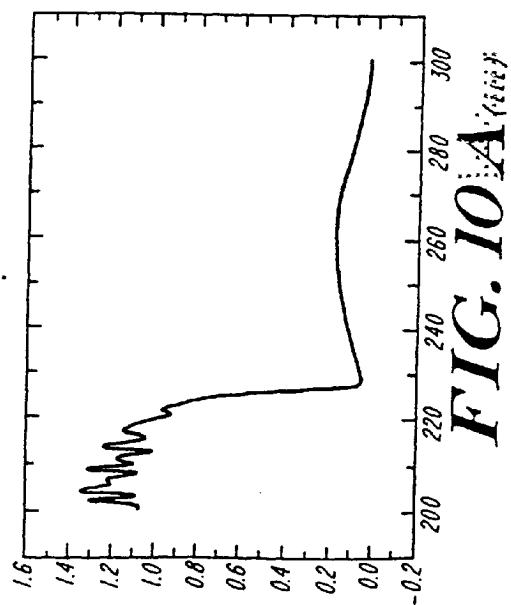
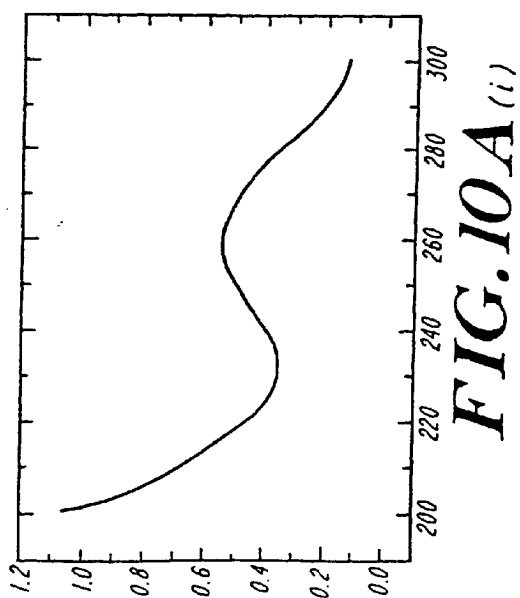


FIG. 9



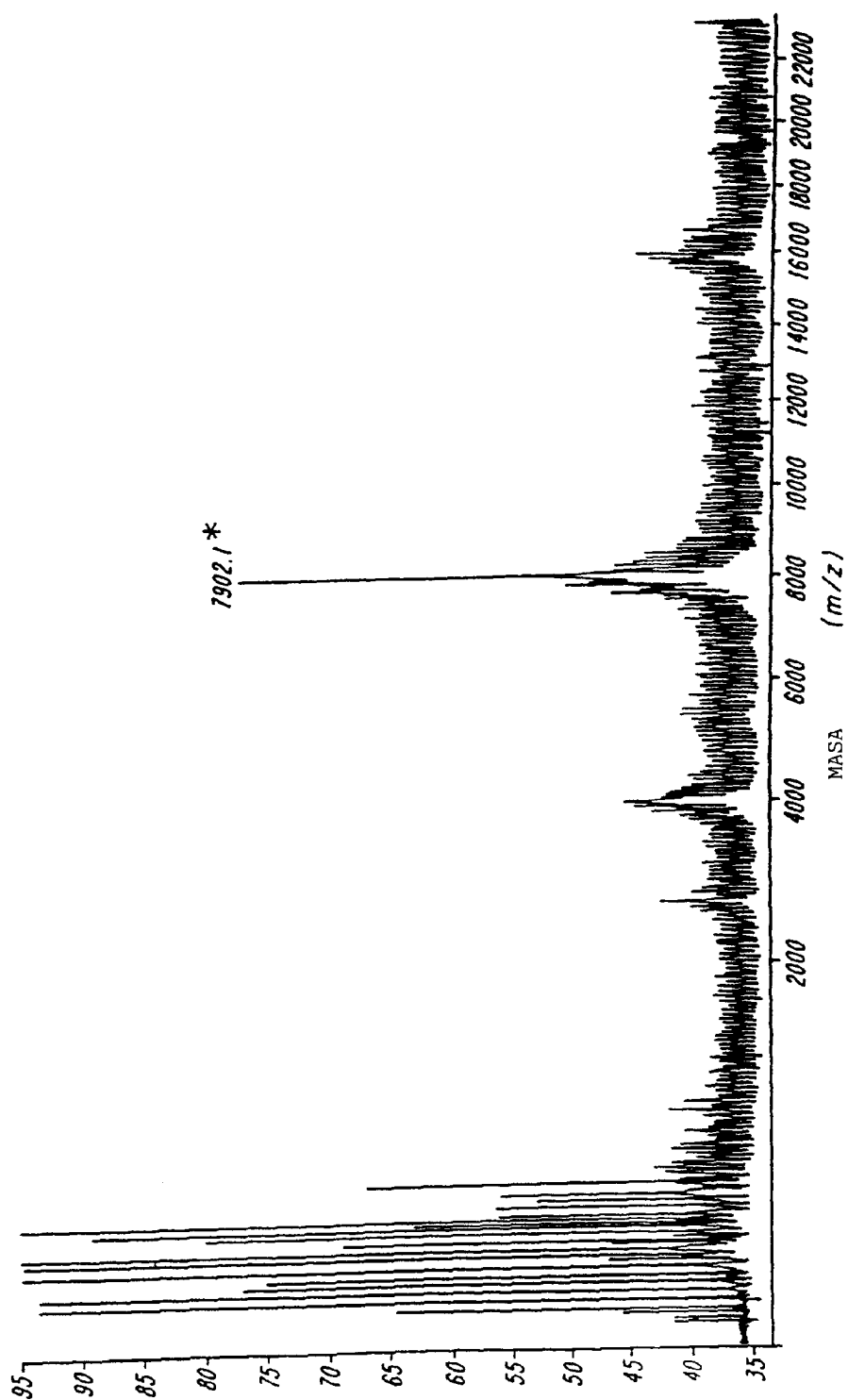


FIG. 10C

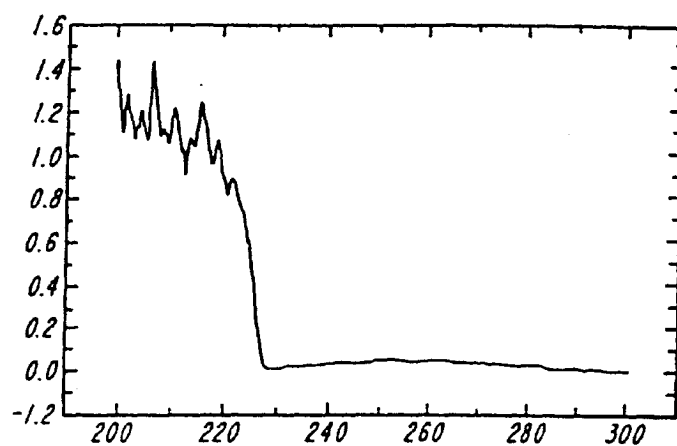


FIG. 10B

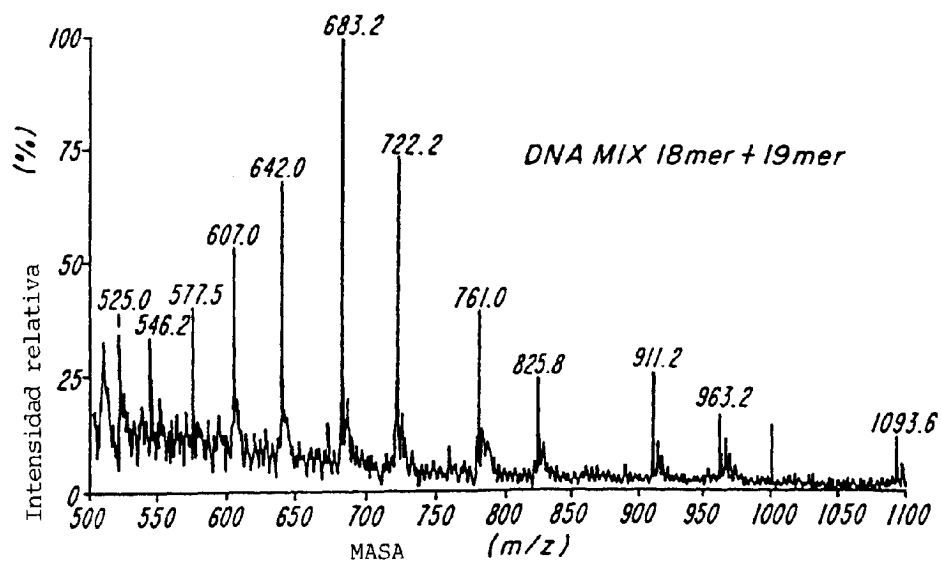


FIG. 12A

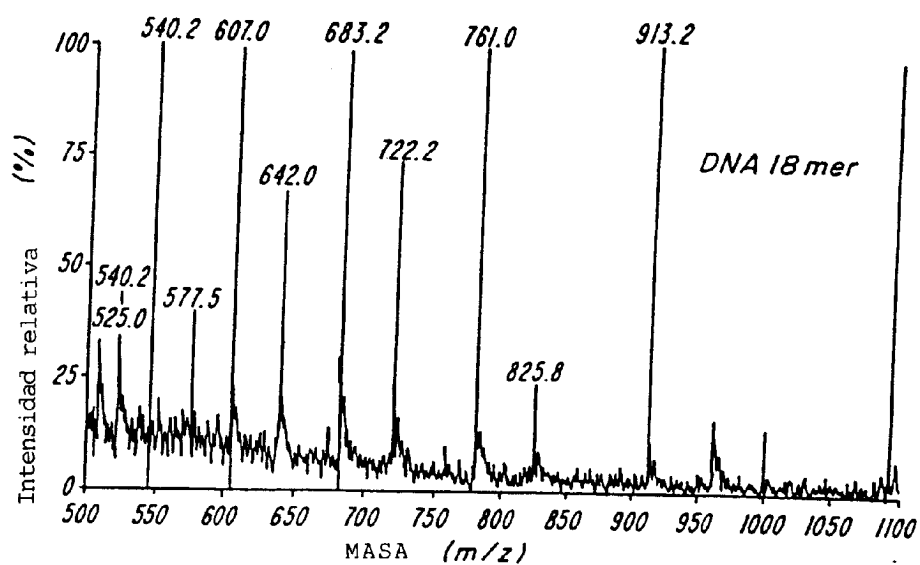


FIG. 12B

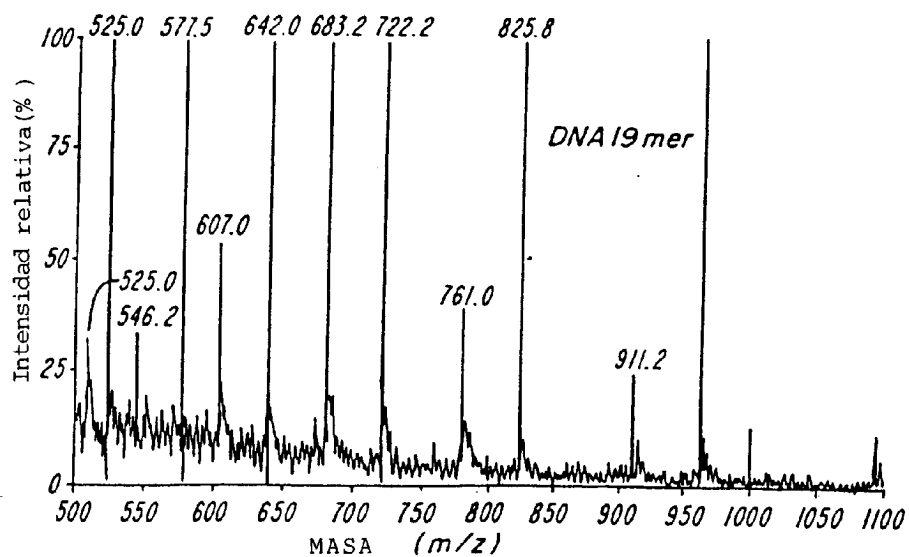
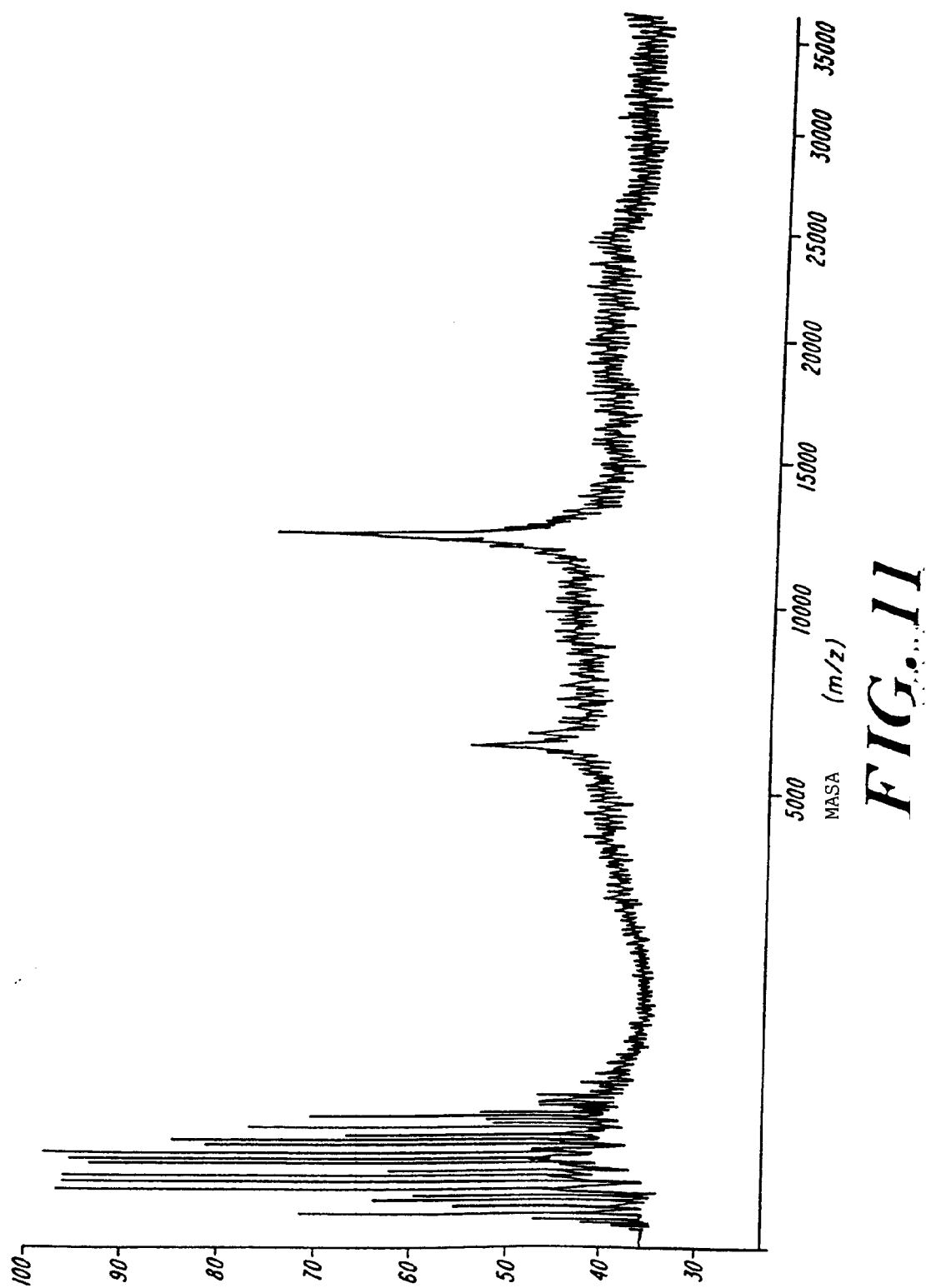


FIG. 12C



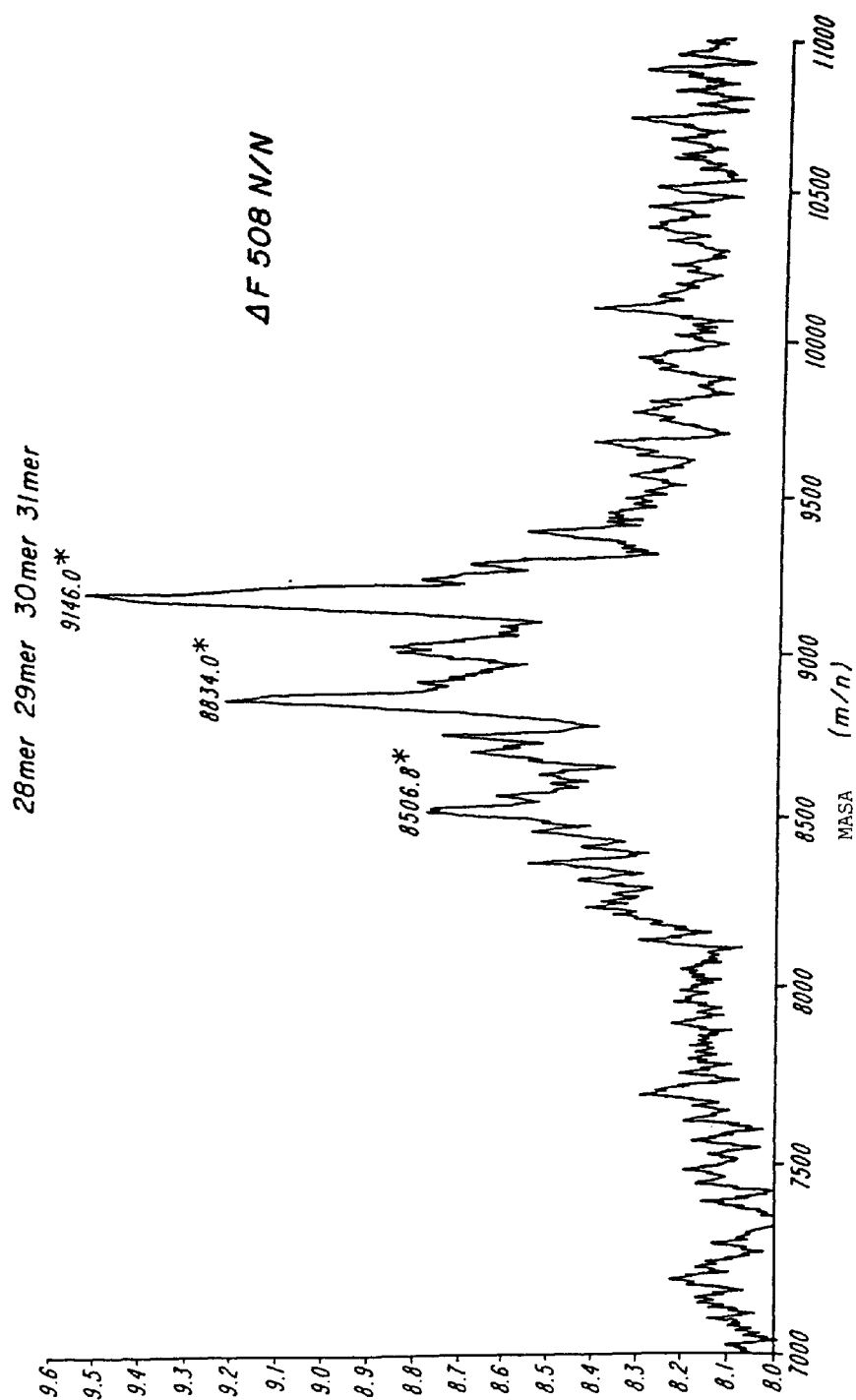


FIG. 14

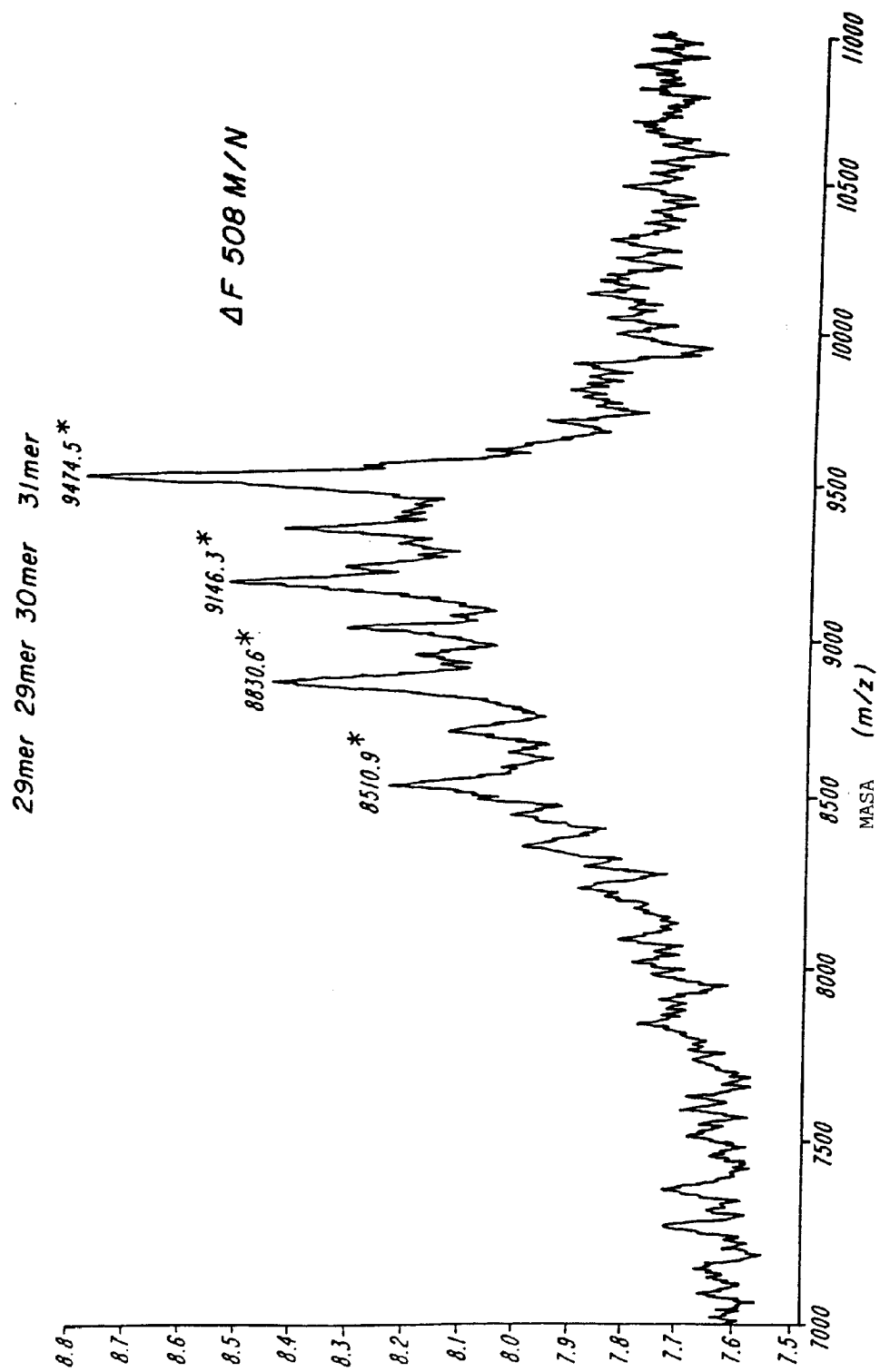


FIG. 15

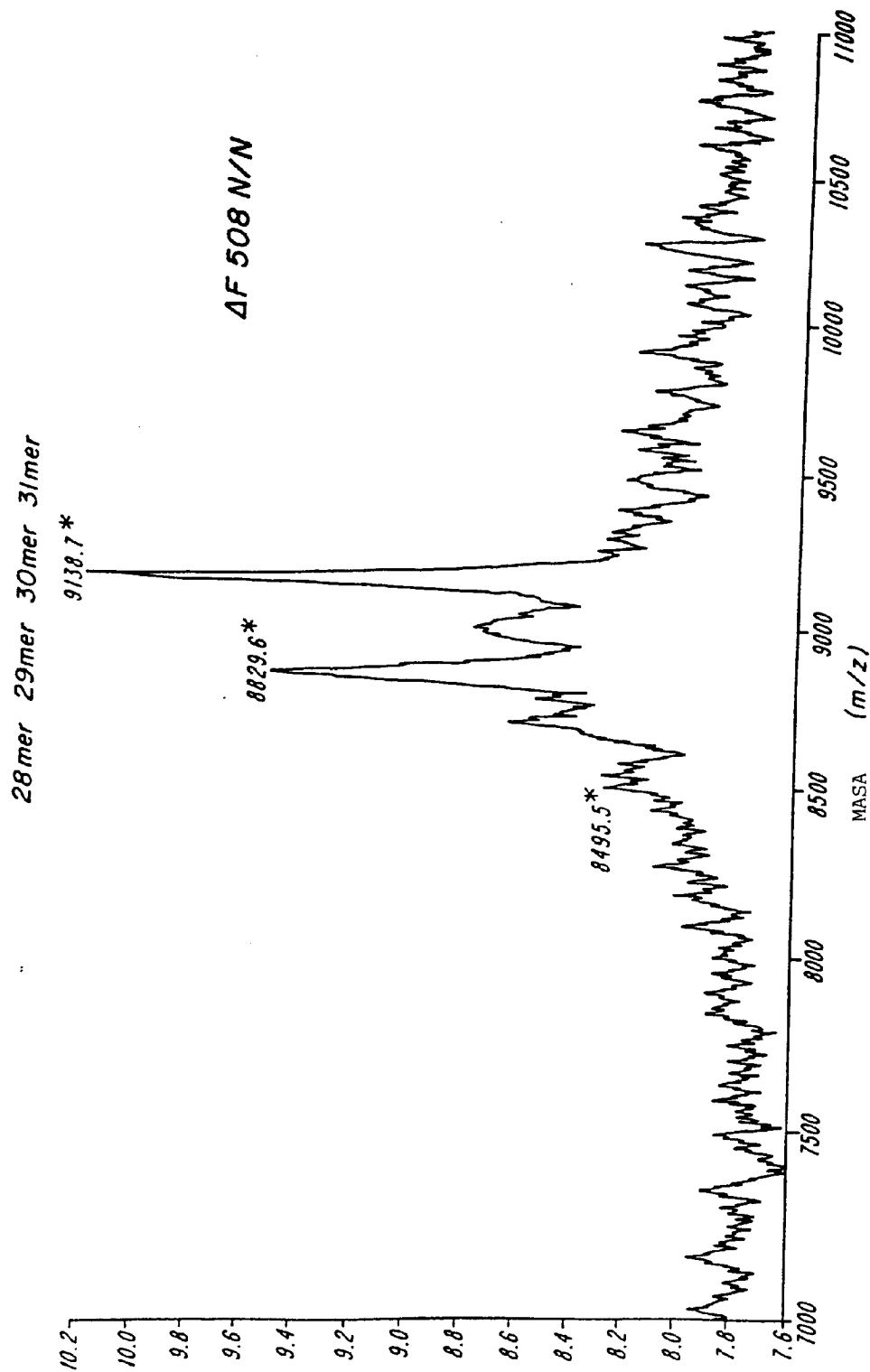


FIG. 16

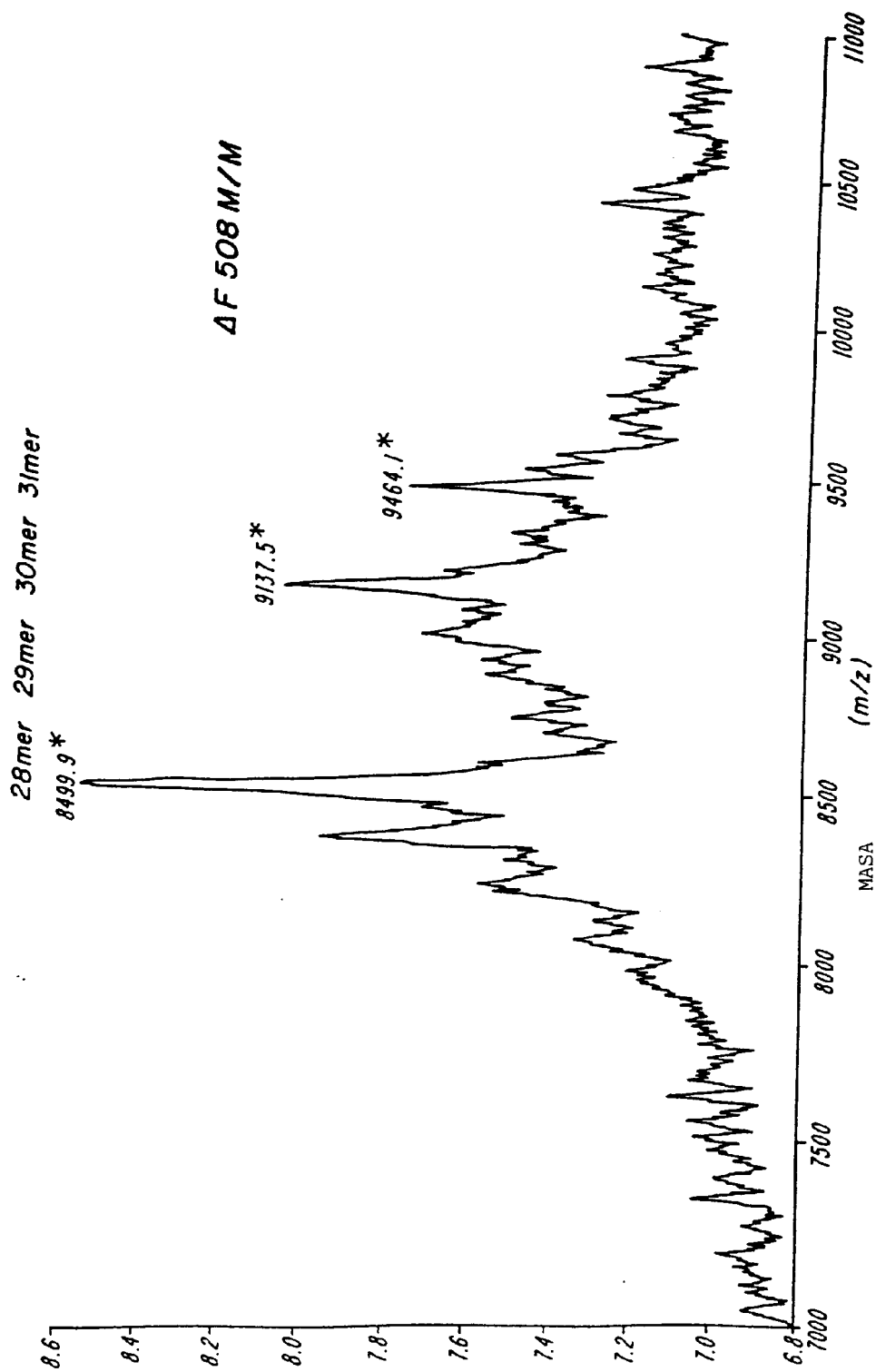


FIG. 17

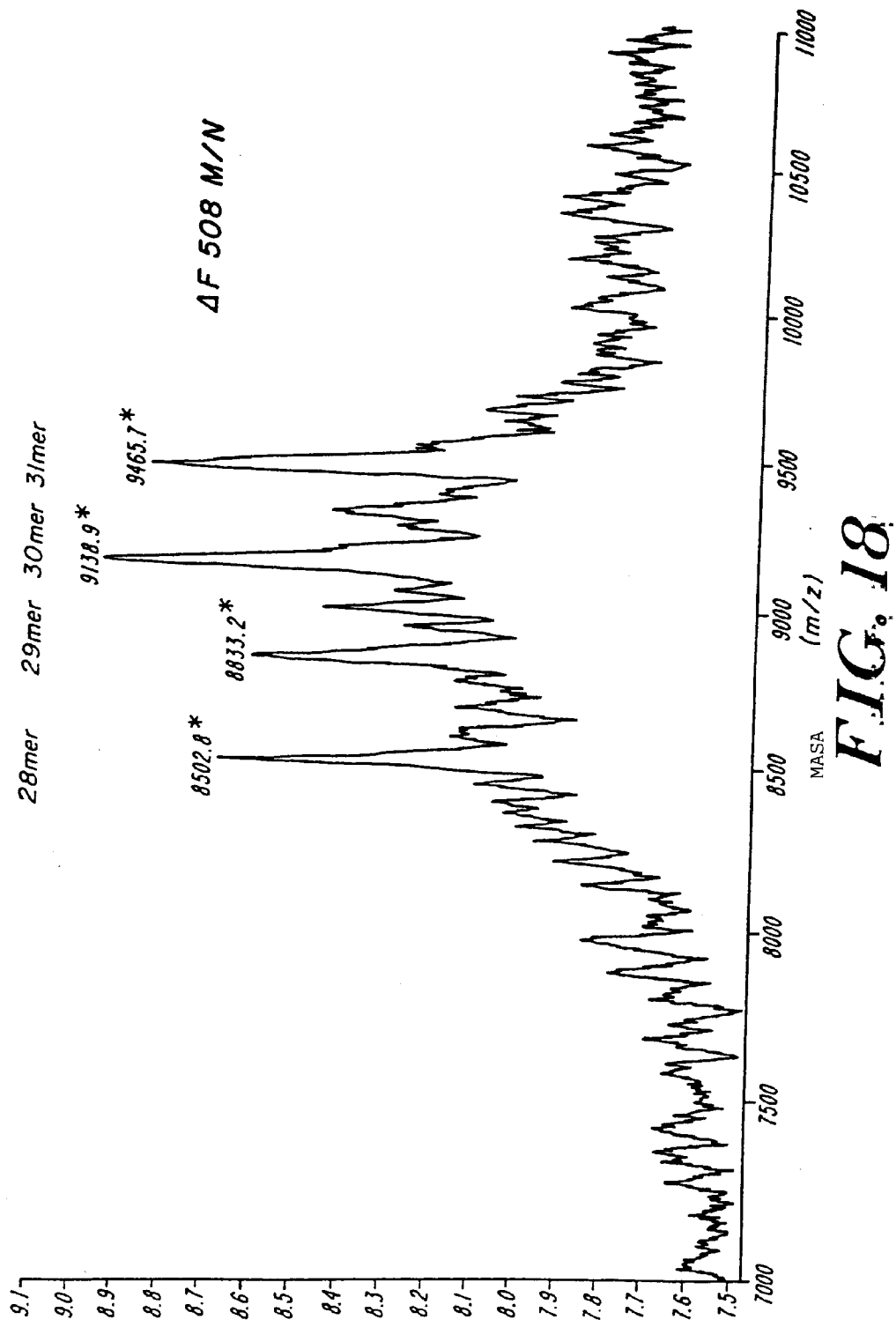


FIG. 18

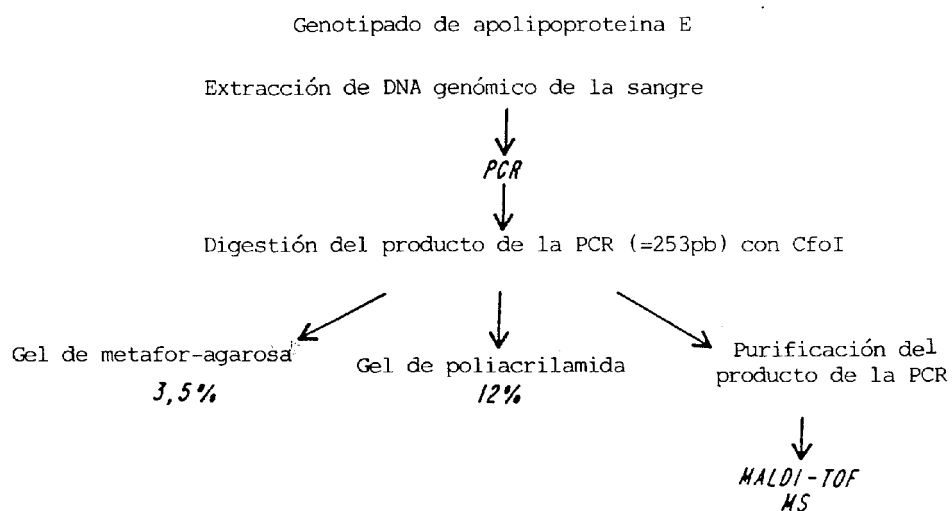


FIG. 19

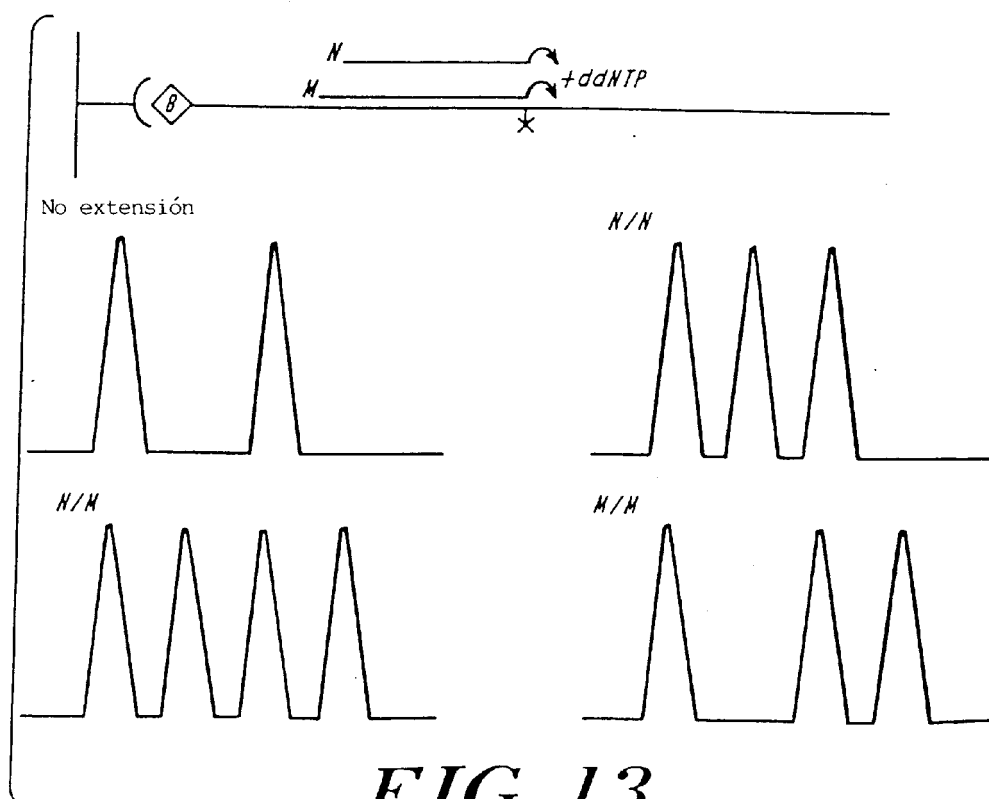


FIG. 13



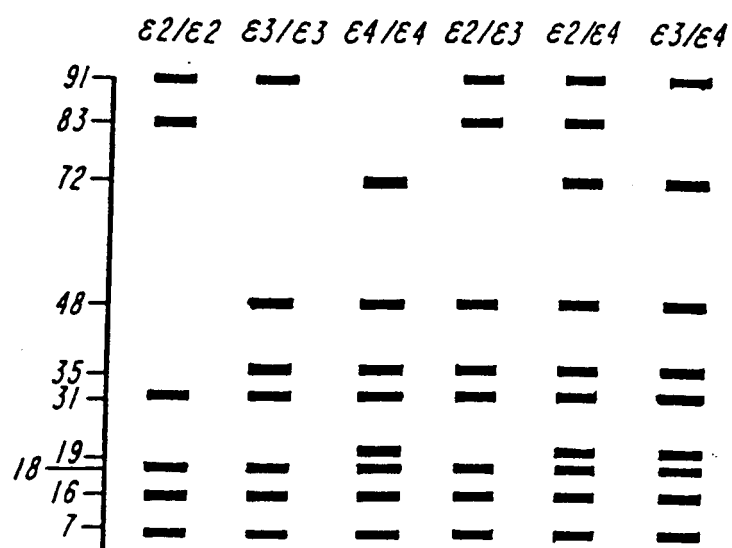


FIG. 21A

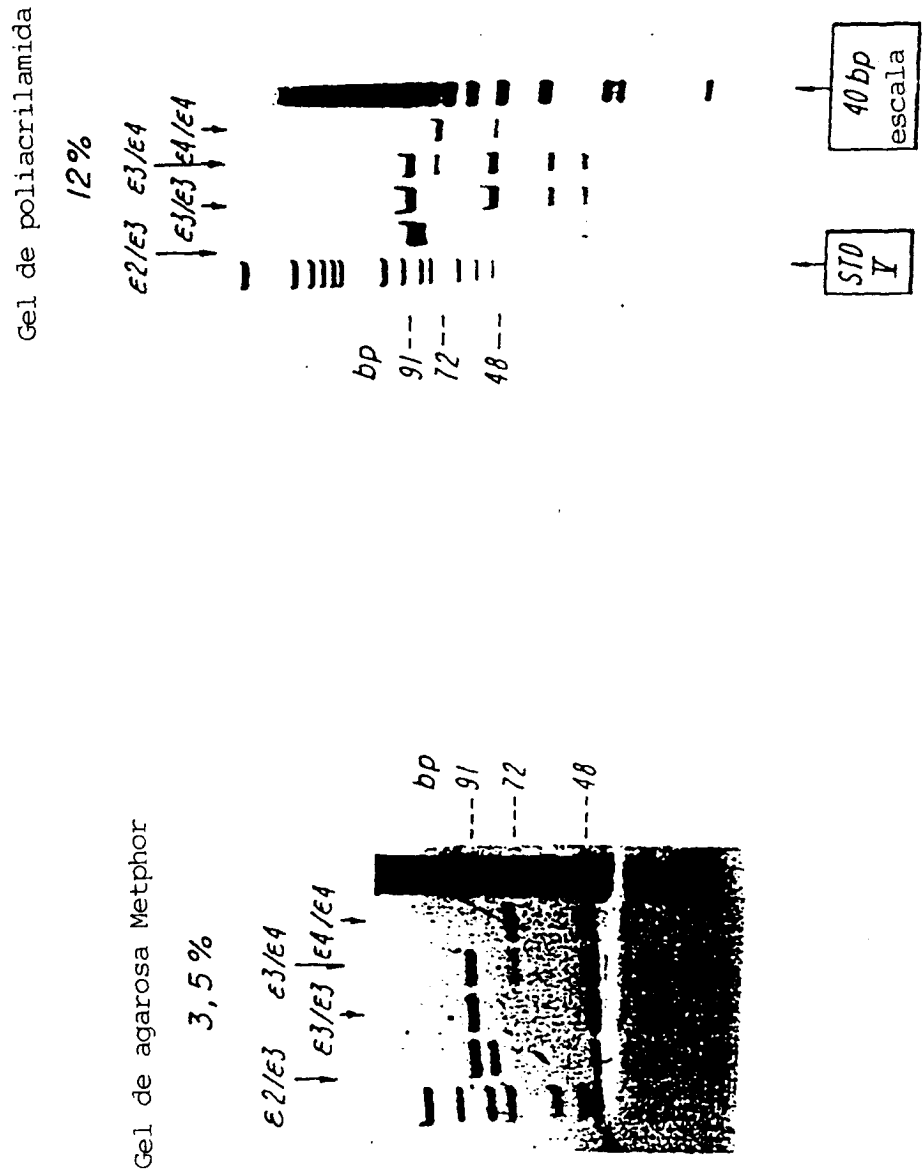


FIG. 21B

FIG. 21C

Peso molecular de fragmentos variables en Da

			$\epsilon 2/\epsilon 2$	$\epsilon 3/\epsilon 3$	$\epsilon 4/\epsilon 4$	$\epsilon 2/\epsilon 3$	$\epsilon 2/\epsilon 4$	$\epsilon 3/\epsilon 4$
91 bp	sentido	28421	X	X		X	X	X
	antisentido	27864						
83 bp	sentido	25747	X			X	X	
	antisentido	25591						
72 bp	sentido	22440			X		X	X
	antisentido	21494						
48 bp	sentido	14844		X	X	X	X	X
	antisentido	14857						
35 bp	sentido	10921		X	X	X	X	X
	antisentido	10751						

FIG. 22A

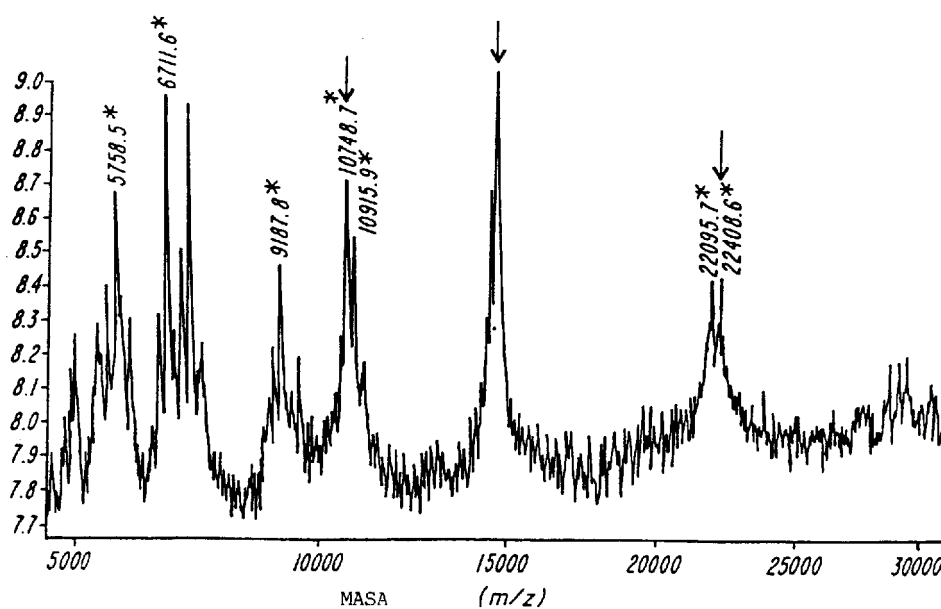


FIG. 22B

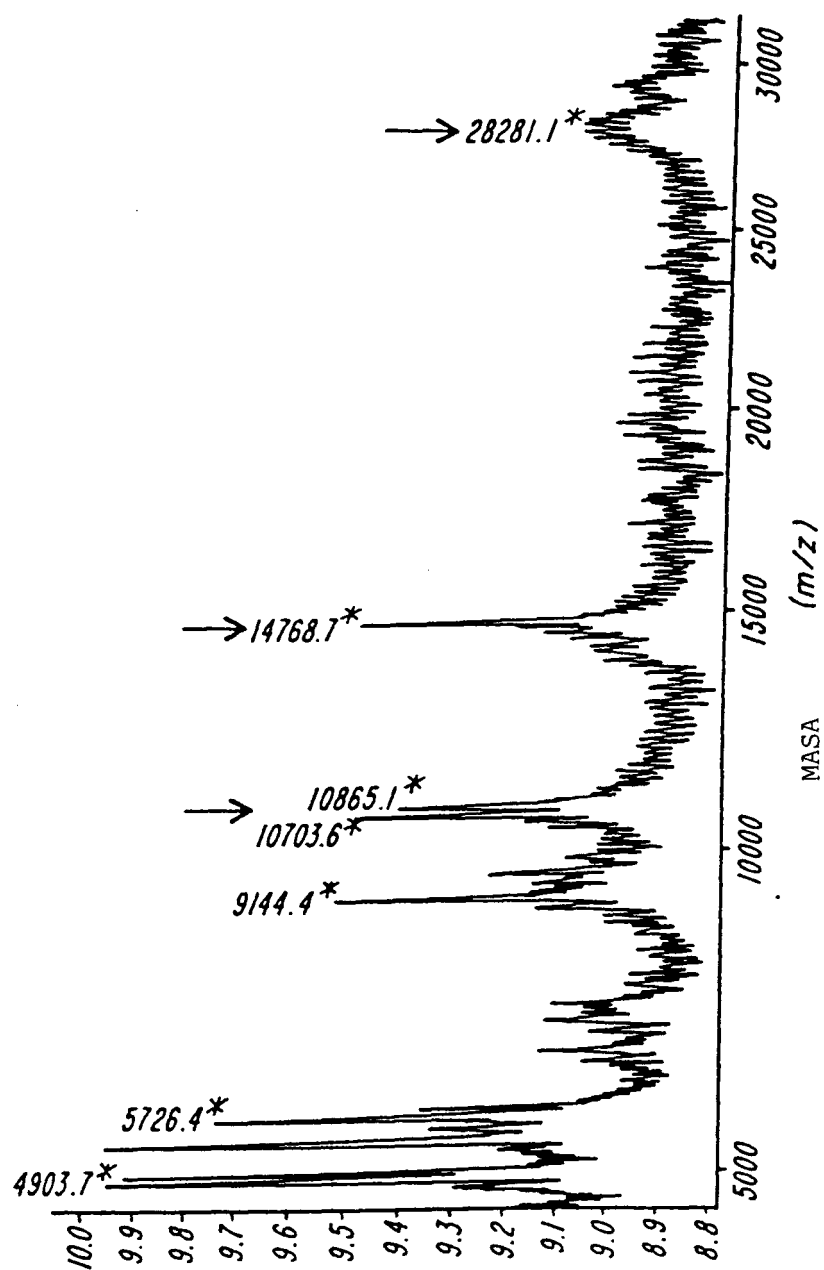


FIG. 23A

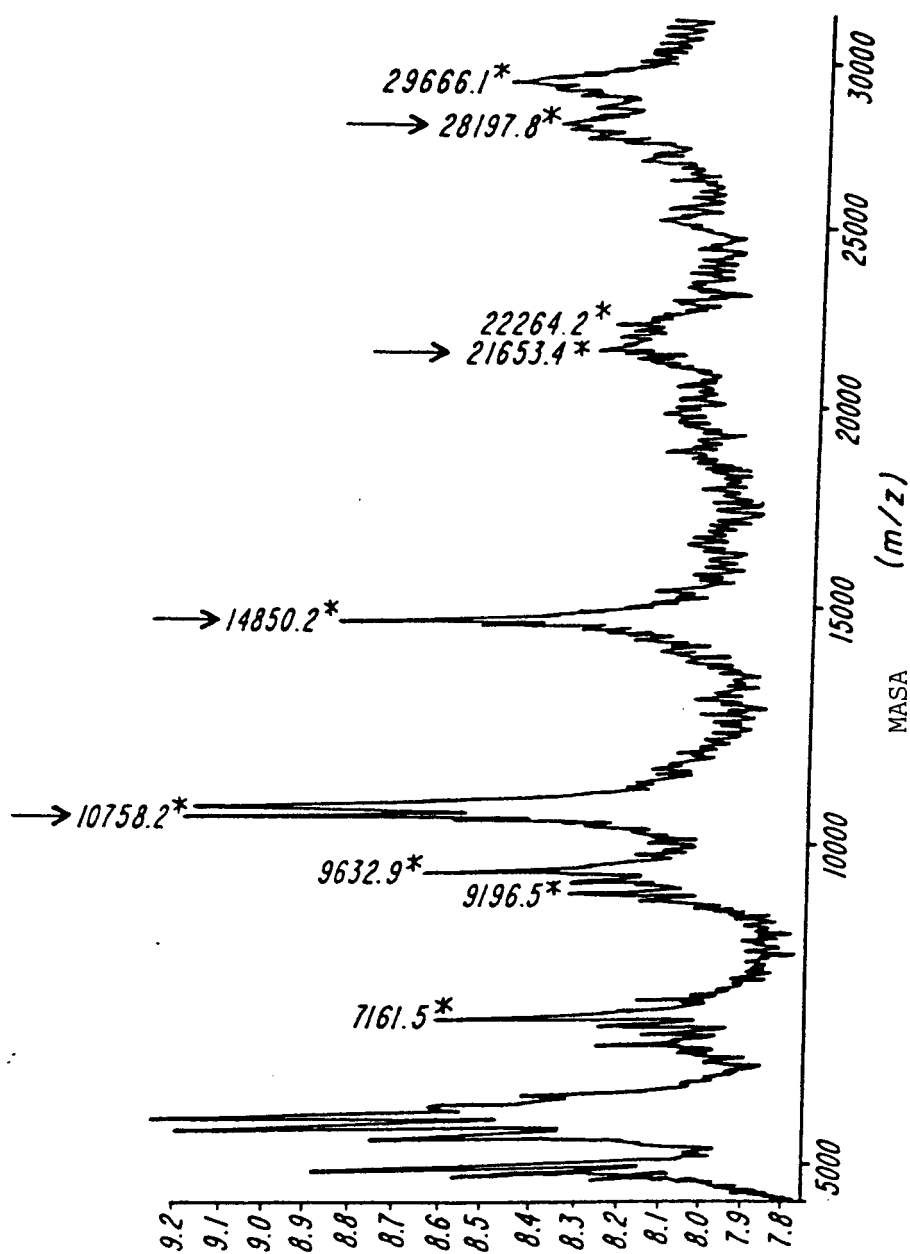


FIG. 23B

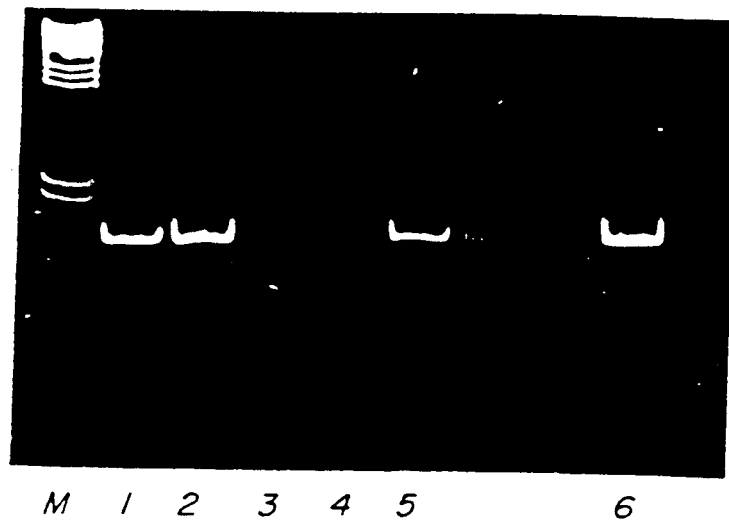


FIG. 24

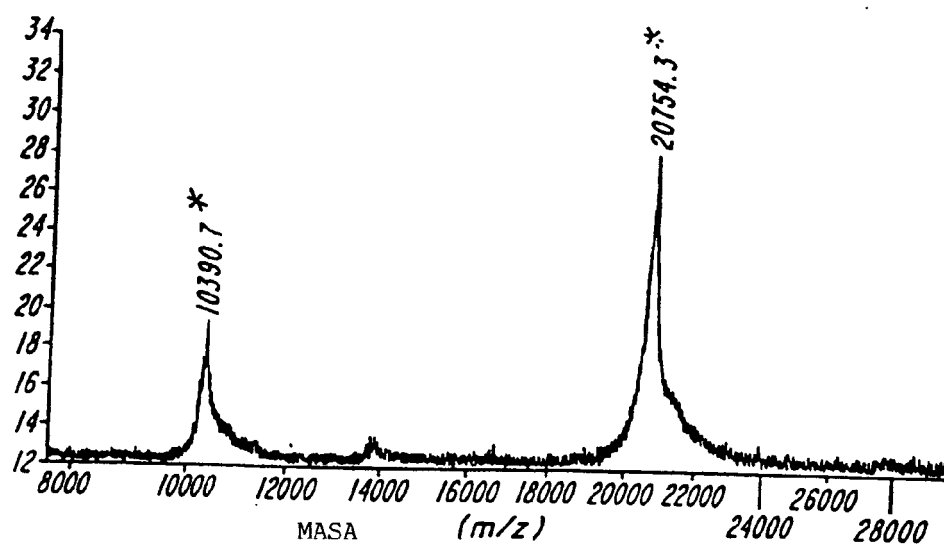


FIG. 25A

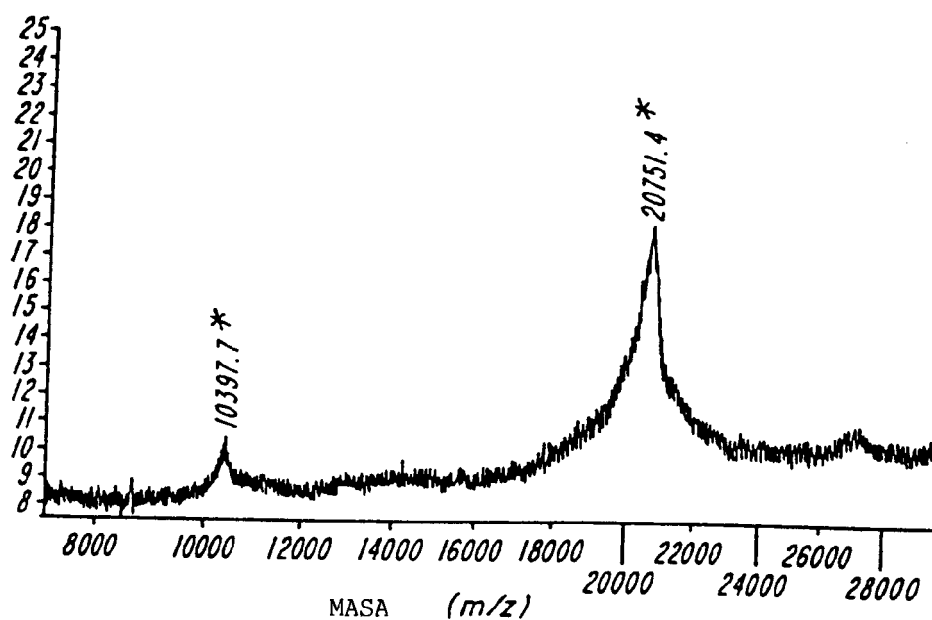


FIG. 25B

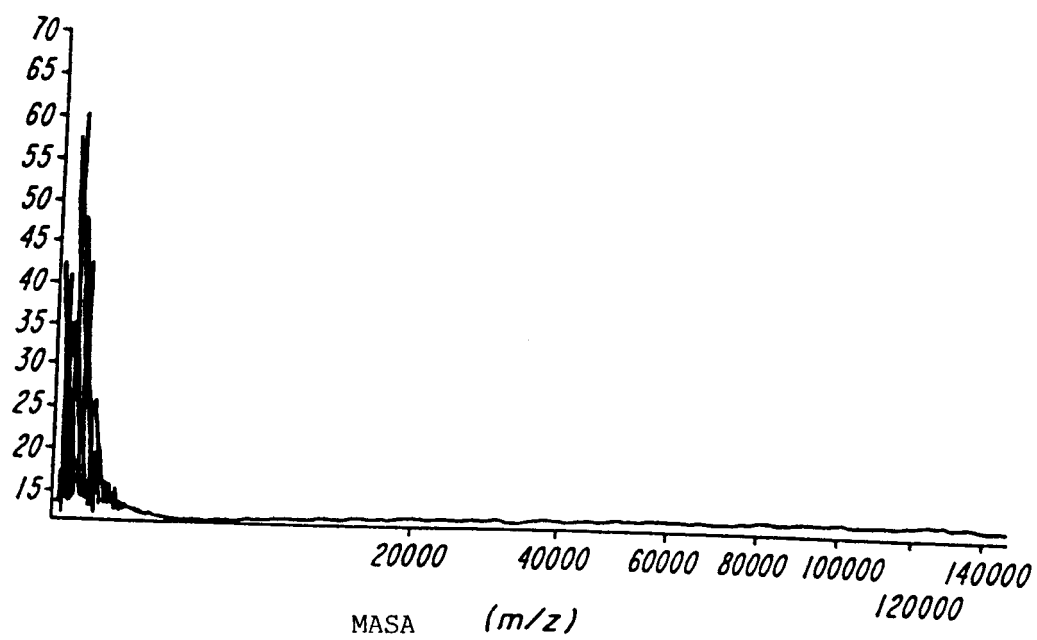


FIG. 25C

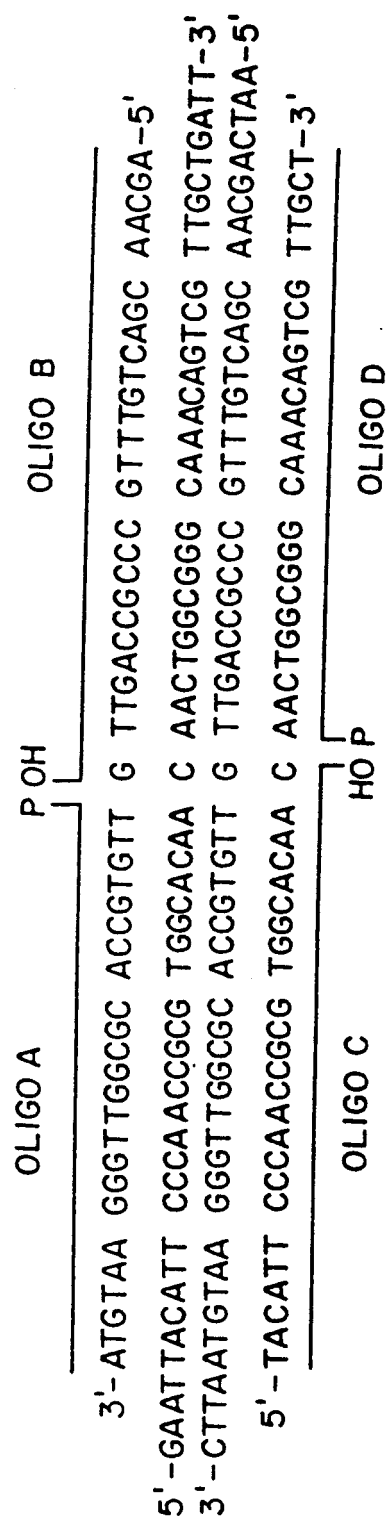


FIG. 26

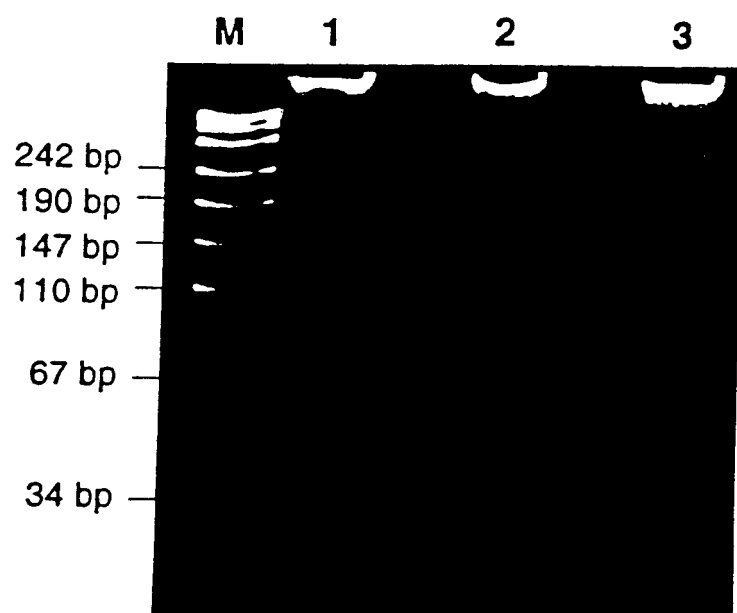


FIG. 27

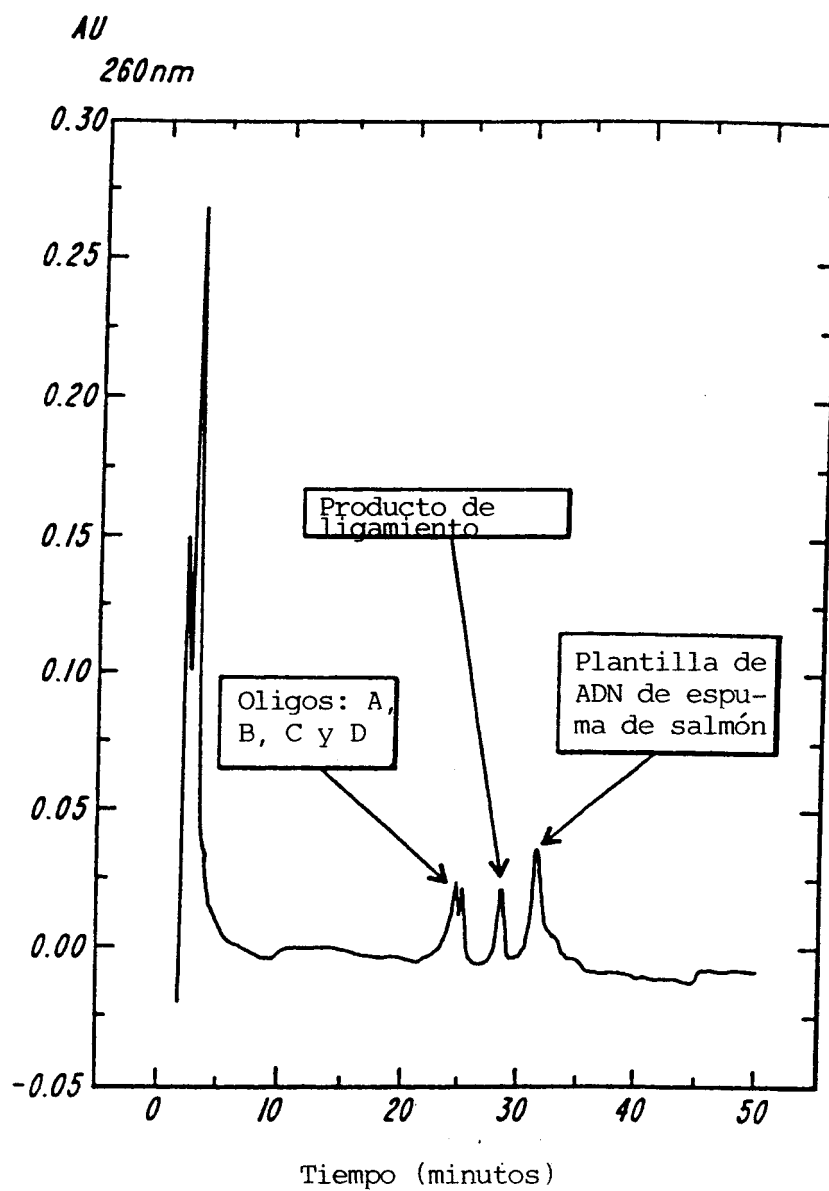


FIG. 28

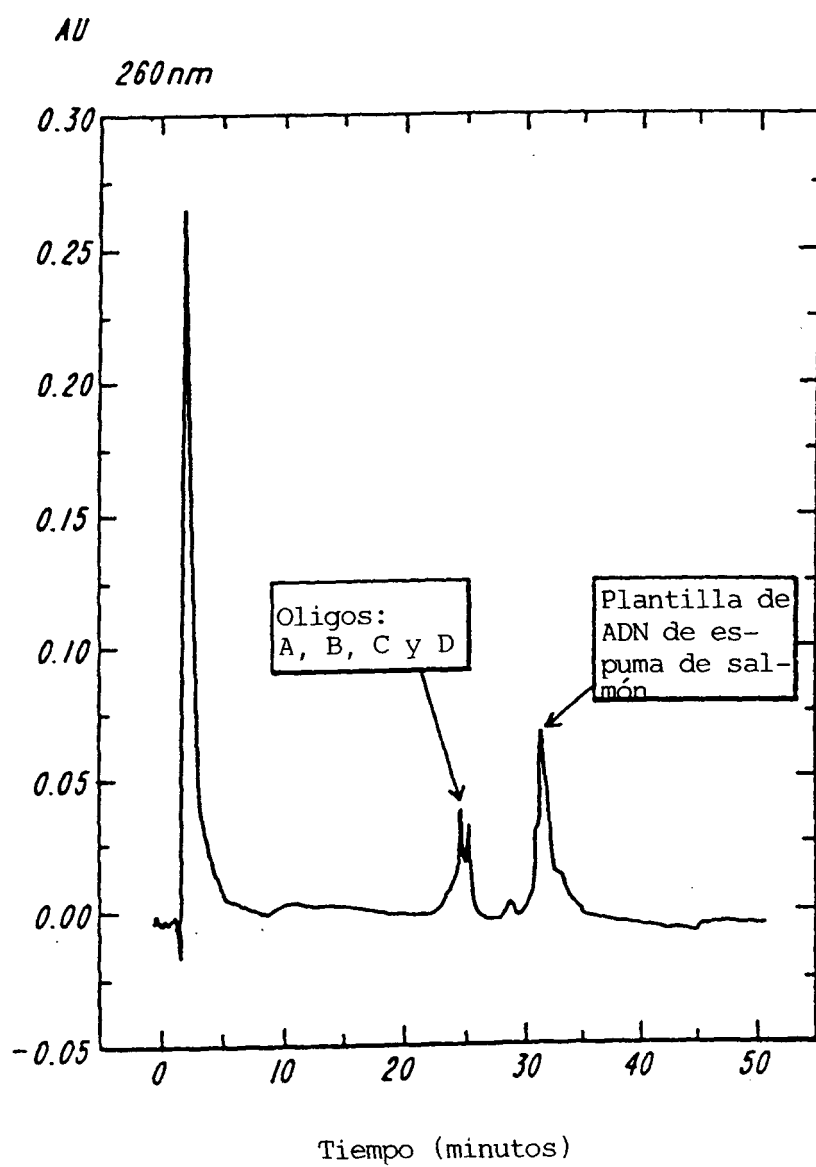


FIG. 29

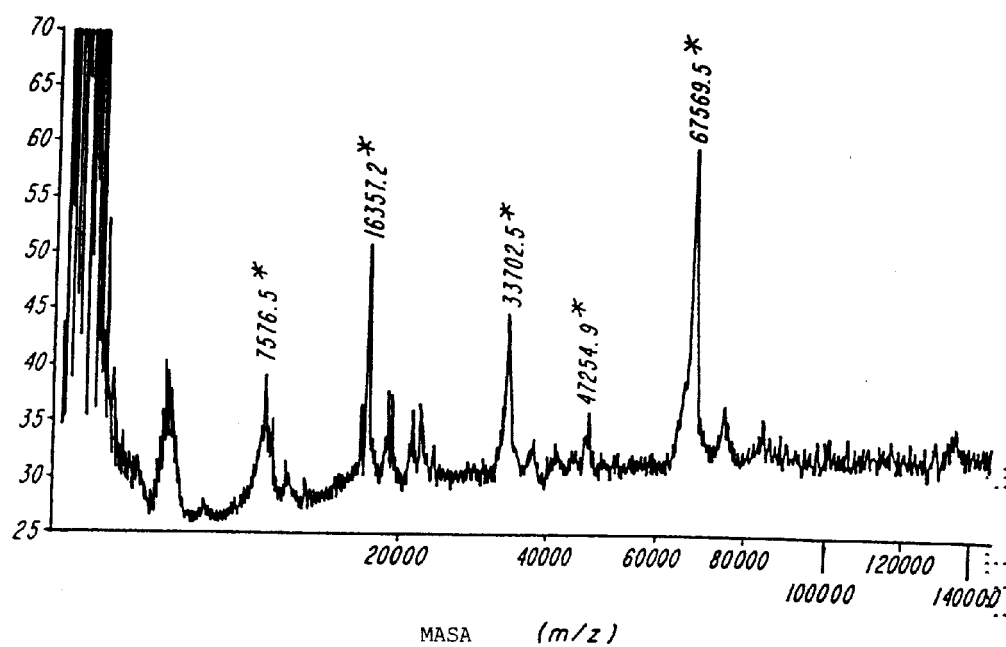


FIG. 30A

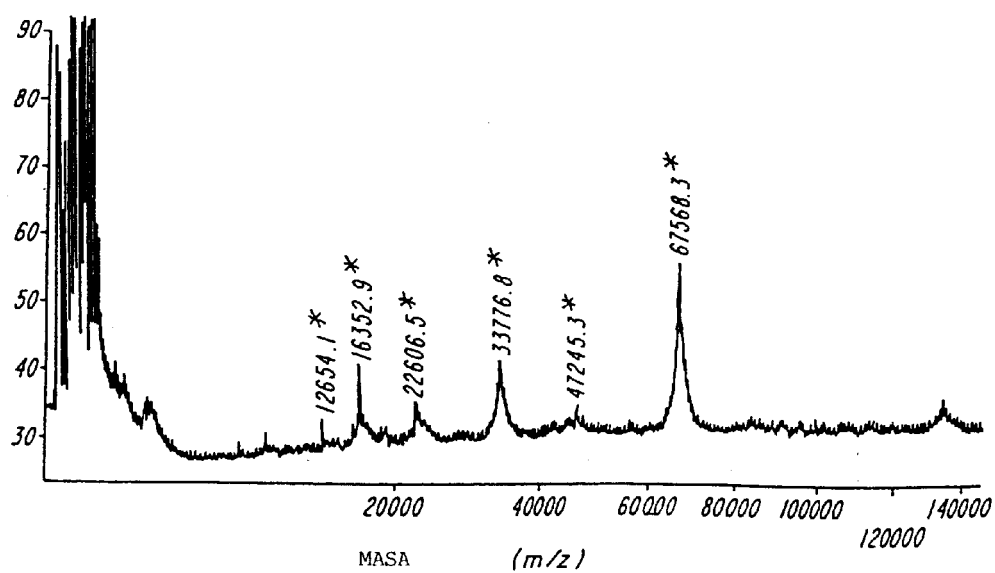


FIG. 30B

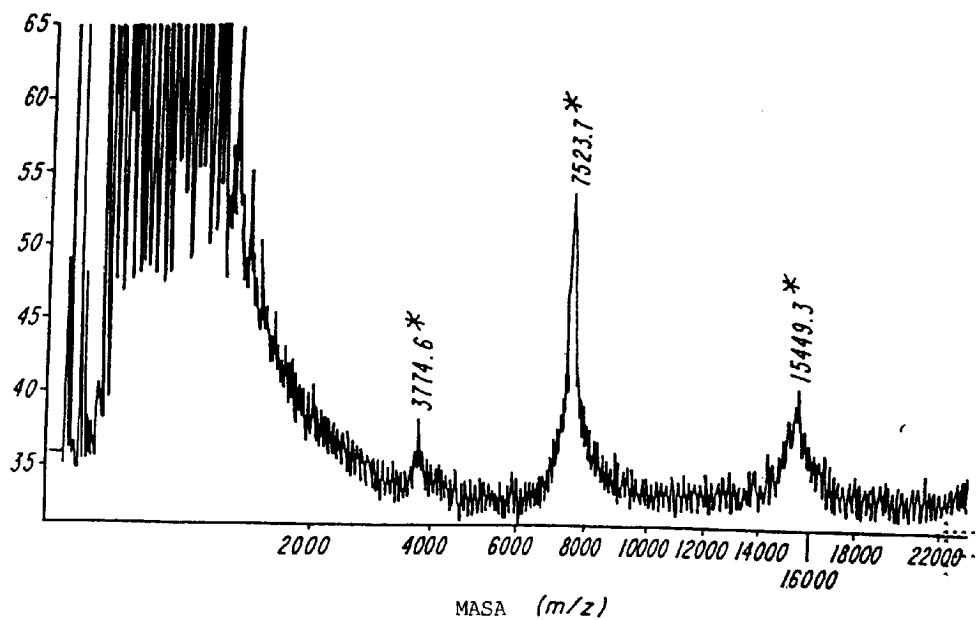


FIG. 31A

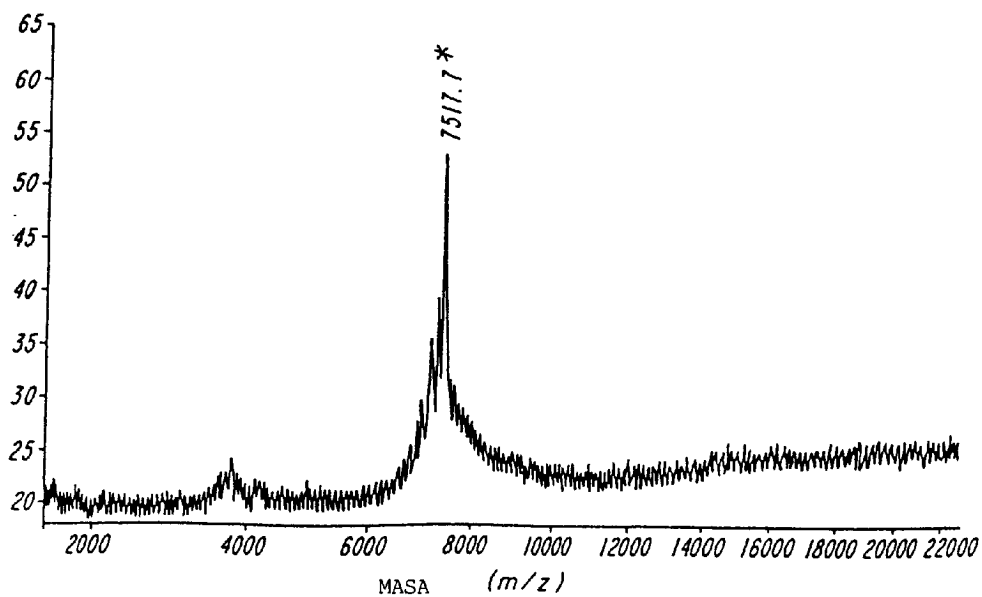


FIG. 31B

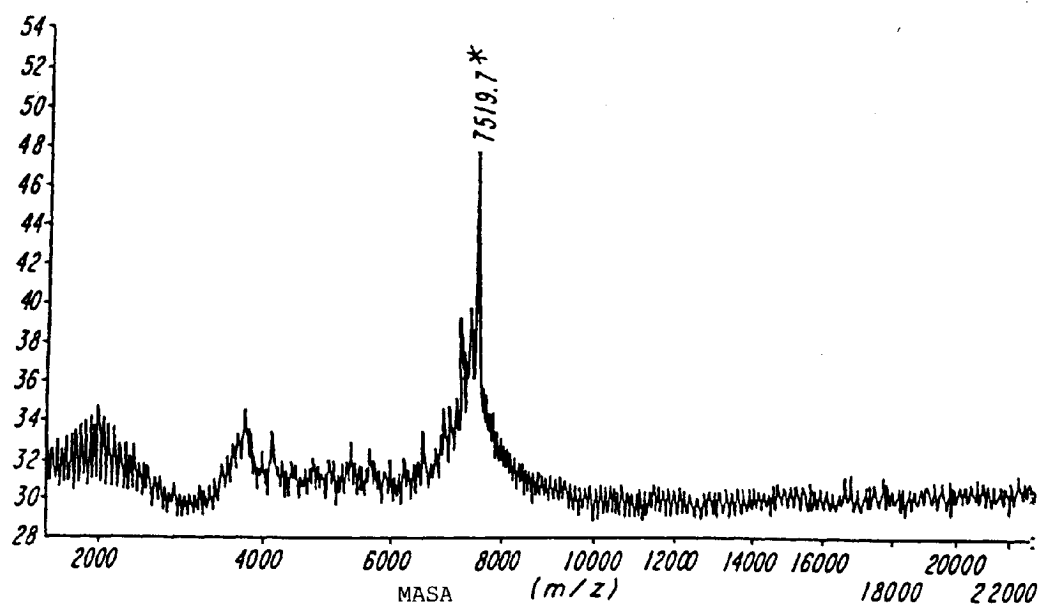


FIG. 32

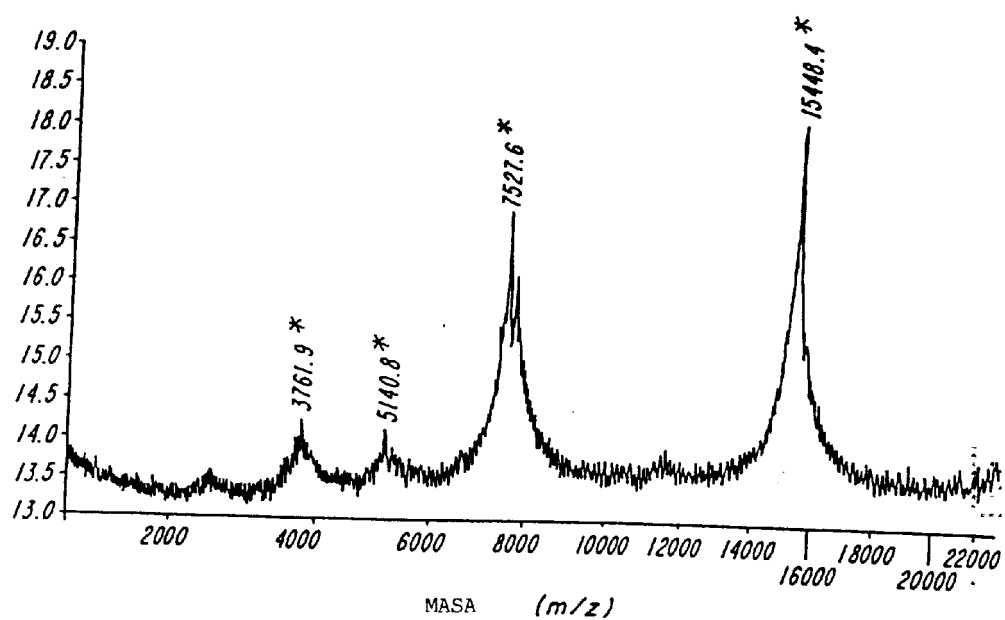


FIG. 33A

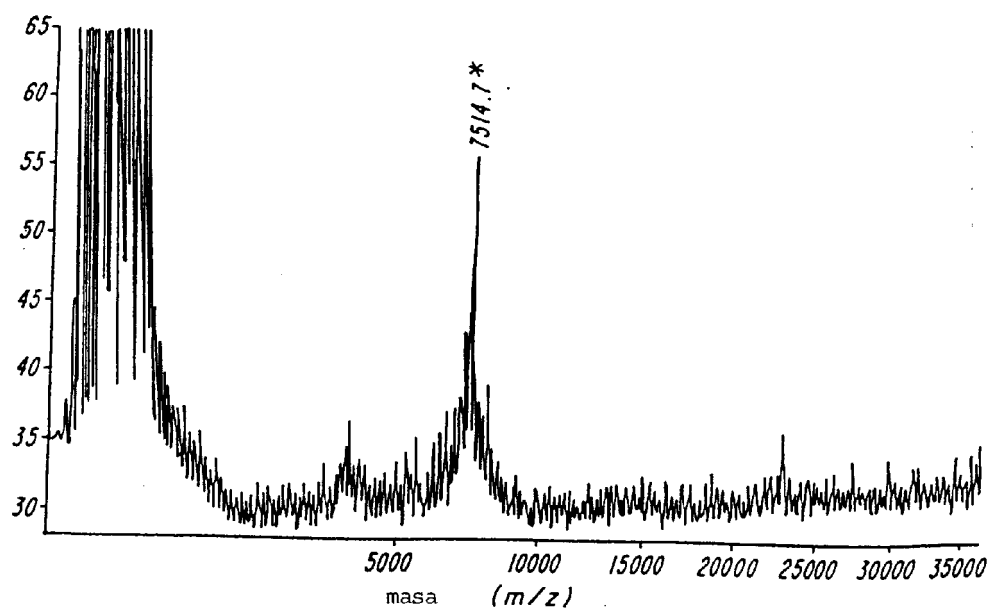


FIG. 33B

506507508
IleIlePhe
ACCATTAAAGAAATATCATCTTTGGTGTTTCCTATGATGAATATAGAAGCGTCATC
Cebador ACCACAAAGGATACTACTTTATATC (7289,8)
tipo salvaje TAGAAACCACAAAGGATACTACTTTATATC (8846,8)
ΔF508 TA---ACCACAAAGGATACTACTTTATATC (7891,2)
ΔI507 TAG---AAACCACAAAGGATACTACTTTATATC (8846,8)

FIG. 34A

506507508
IleIlePhe
ACCATTAAAGAAATATCATCTTTGGTGTTTCCTATGATGAATATAGAAGCGTCATC
Cebador ACCACAAAGGATACTACTTTATATC (7289,8)
tipo salvaje CTTTATAGTAGAAACCACAAAGGATACTACTTTATATC (11612,6)
ΔF508 CTTTATAGTA---ACCACAAAGGATACTACTTTATATC (10657,0)
ΔI507 CTTTATAG---AAACCACAAAGGATACTACTTTATATC (10666,0)
506Ser CGTAGAAACCACAAAGGATACTACTTTATATC (9465,2)

FIG. 34B

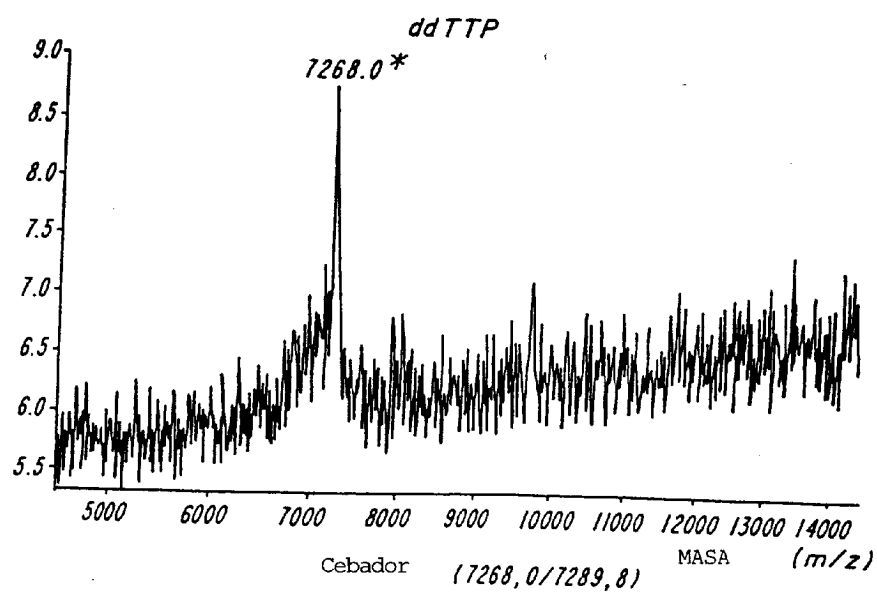


FIG. 35A

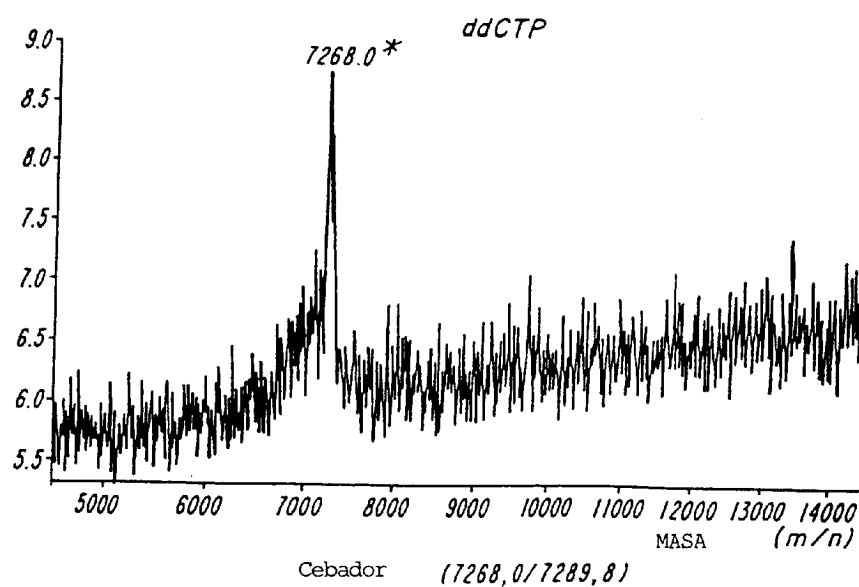


FIG. 35B

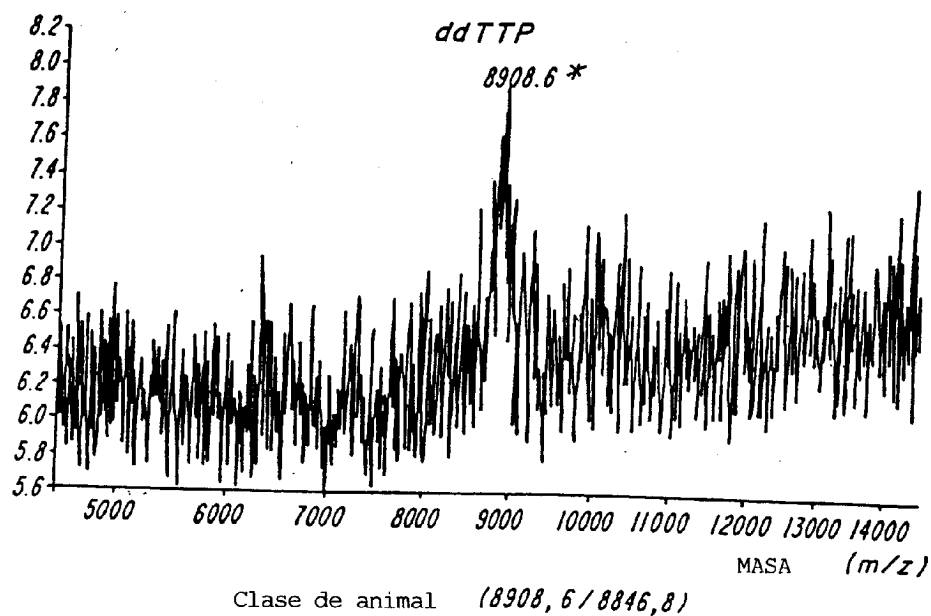


FIG. 35C

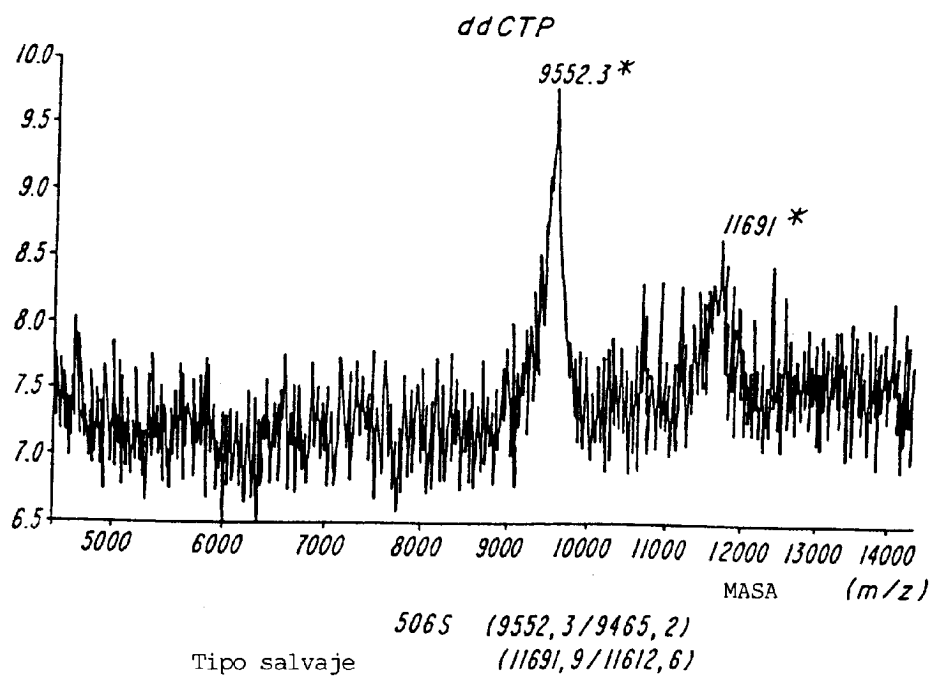


FIG. 35D

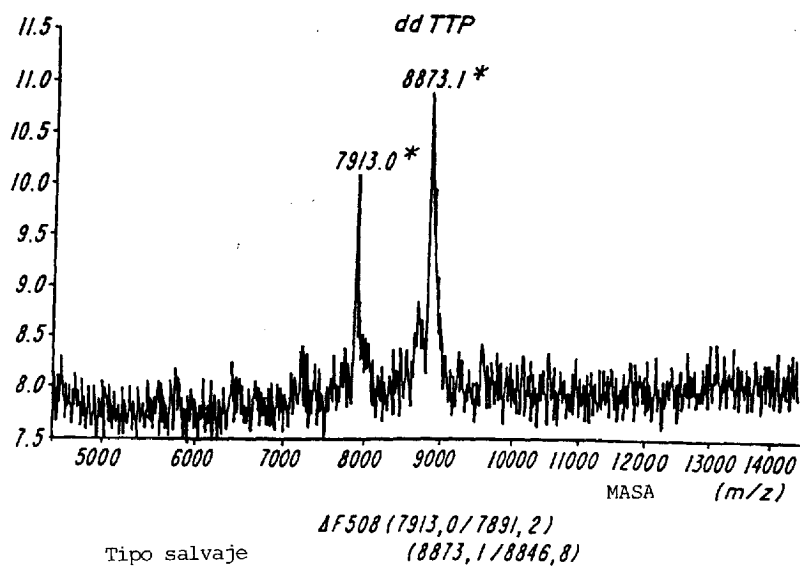


FIG. 35E

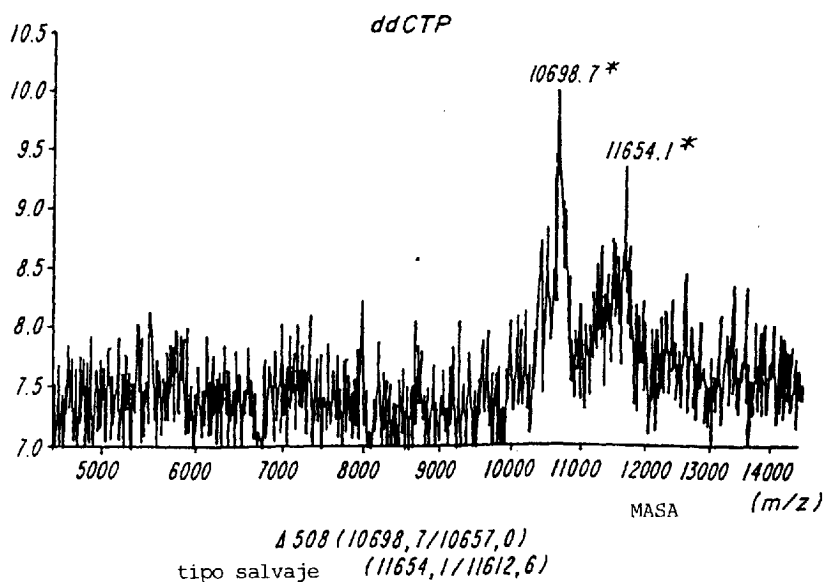
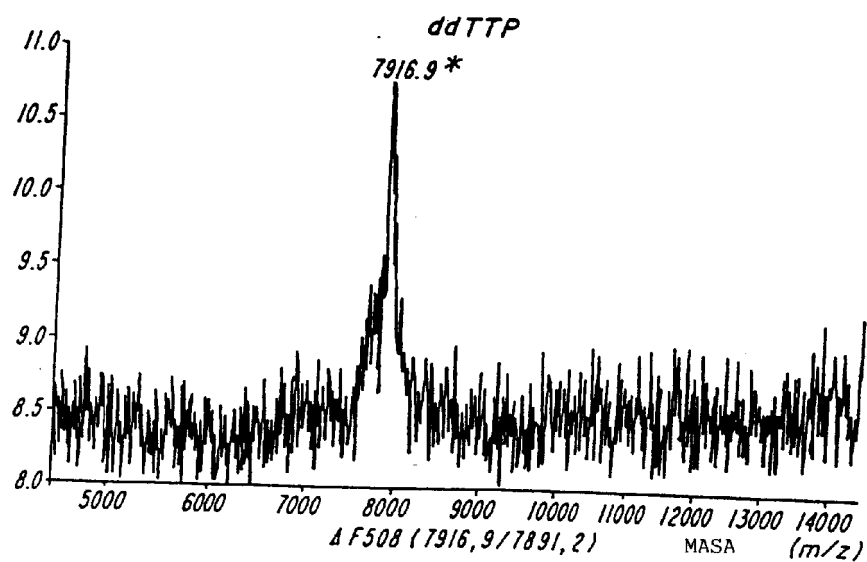
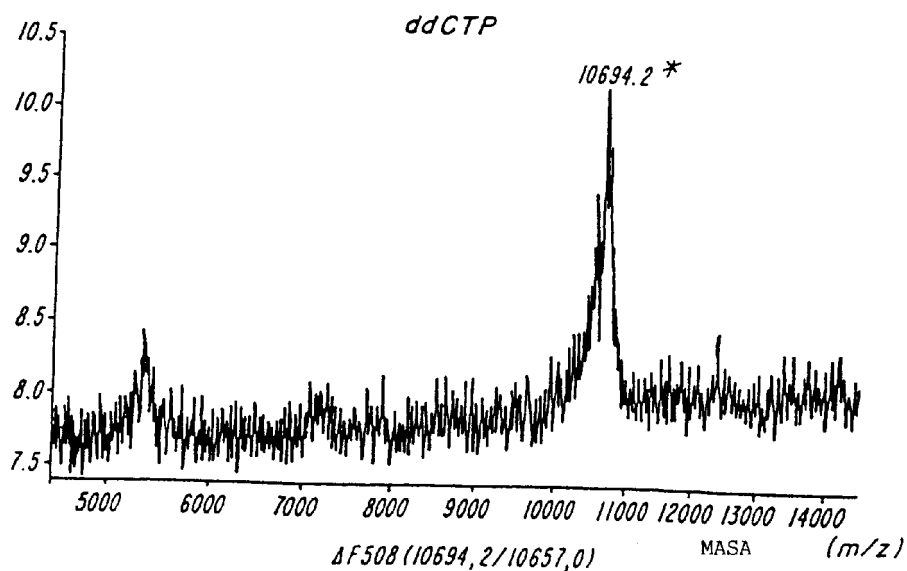


FIG. 35F



Homocigotós
FIG. 35G



Homocigotos
FIG. 35H

...AACGTGCTGCGTTCACCCGGAATGTTGAIGATTATGTCGTGCAATTGATCGGGCAGCGCGCCCGCTGTCTTTCTCGCGGCTCTGCTGCTTCAATGATGCTGCTTTCCTGCGCTTTCGACACCGGAAGGTGGCGGTACACTACTATTAACACAGACTTAACACTACCCGCTCTGCGCGGGGAGACAGAAACAGCGCCGACGCCACACTACACCGCAAGACCGGA

CTTCCACCGCGATGTTGA
18-mer cebador inverso

19-mer Cebador
TGACCGGCAGCAAAATGTT

TCGTACCCCTCCACCTGCAGCCCAAGCCTTGGCAICGACCCCAICACCAICACIAATAATGCAIAGGCTGCAGGCCAATTGCCACTGGCGCTCGTTTTACAAGCTCGTG...
ACAGTGGGAGCTCGACCGTGGCGGTCCCAAGCGCTAGCTGGTGGTGGTAGTGTATTAAGCTACGCCAGCTGCGTTAACCGTACCGGCAAGCAAAATGTTGCCAGGCAC...

CTCACCCTCCACCCTCCAG
18-mer Cebador inverso (99-mer)

FIG. 36

17-mer Cebador
 TGACCGGCGAGCAAAATG

CAGGAACAGCTATGAC
17-mer Cebador inv

FIG. 37

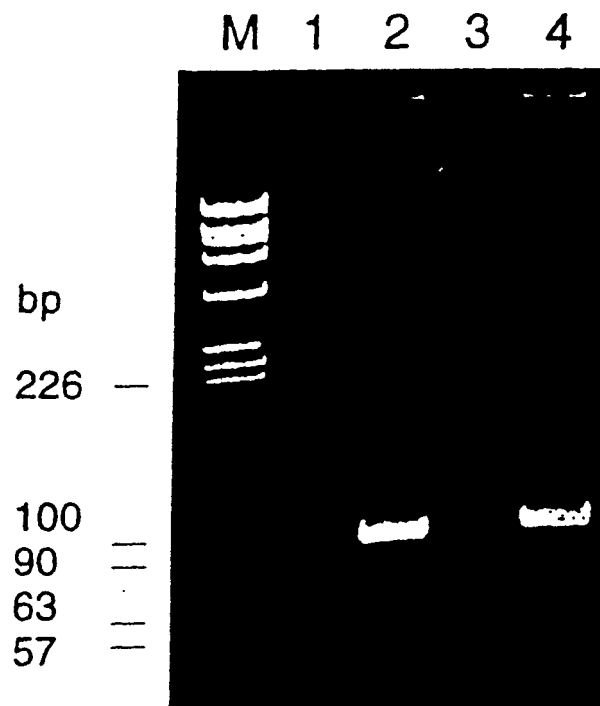


FIG. 38

1 2 3 4 5 6

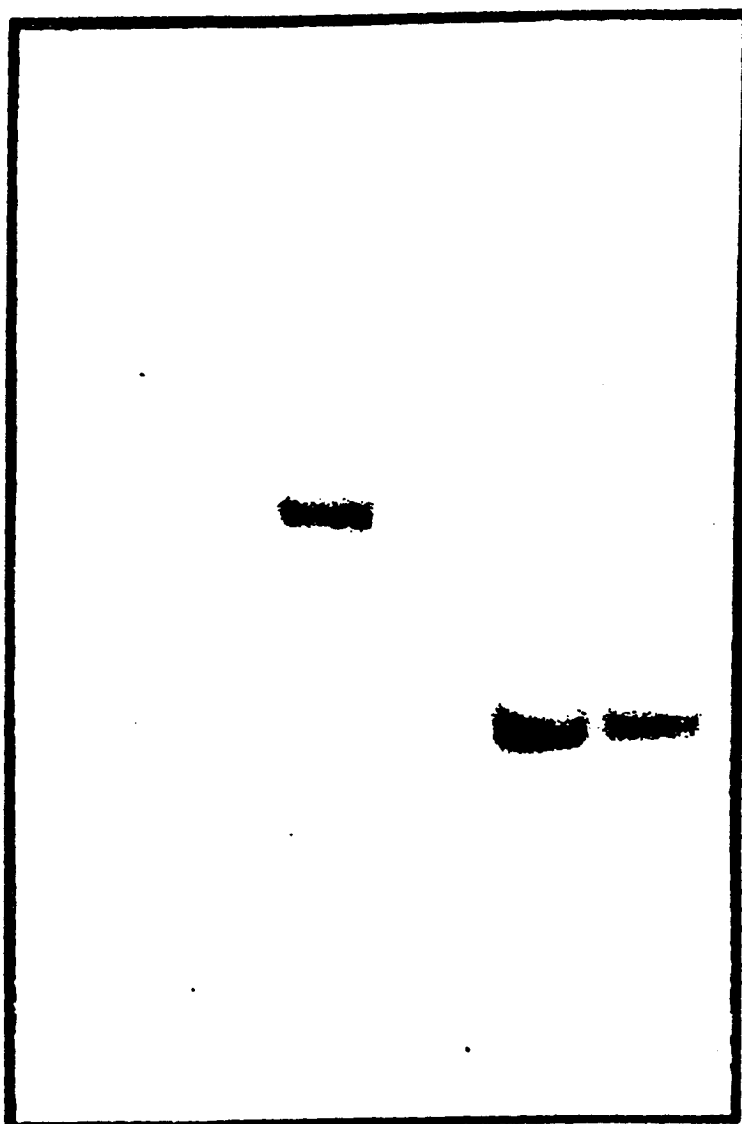


FIG. 39

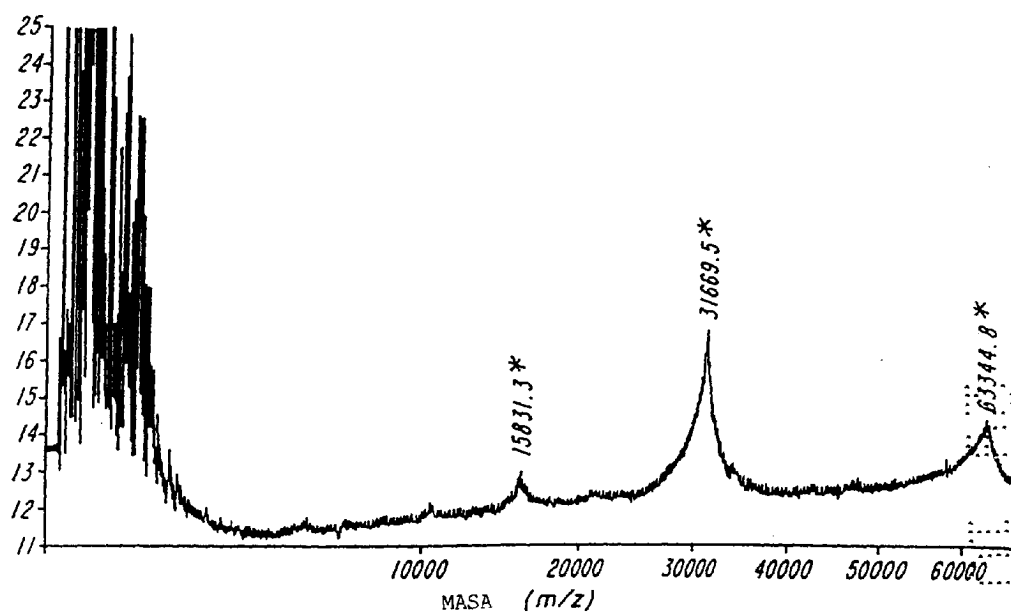


FIG. 40A

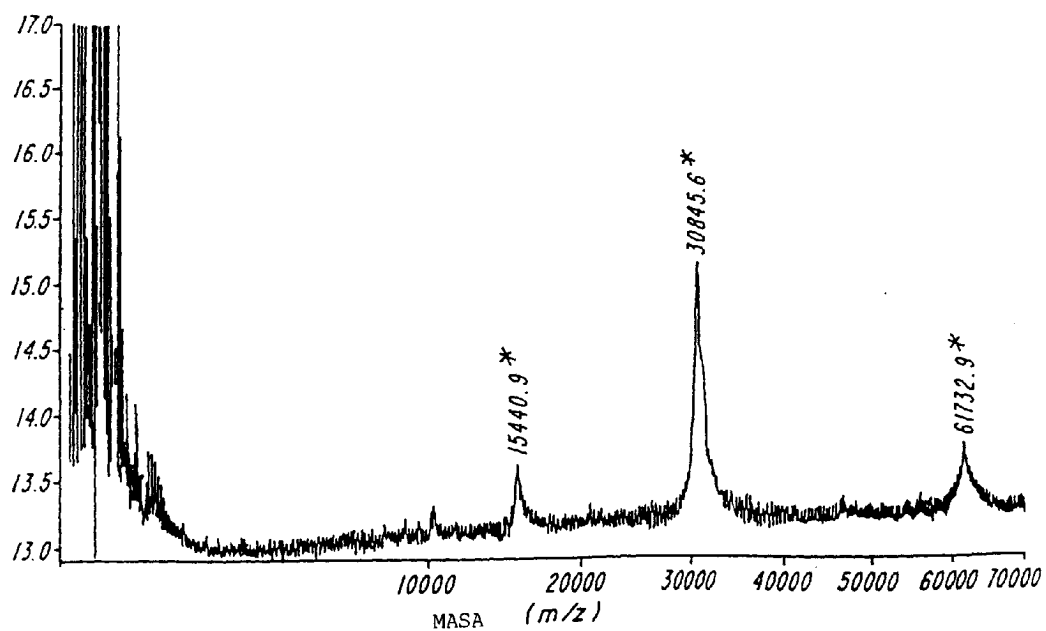


FIG. 40B

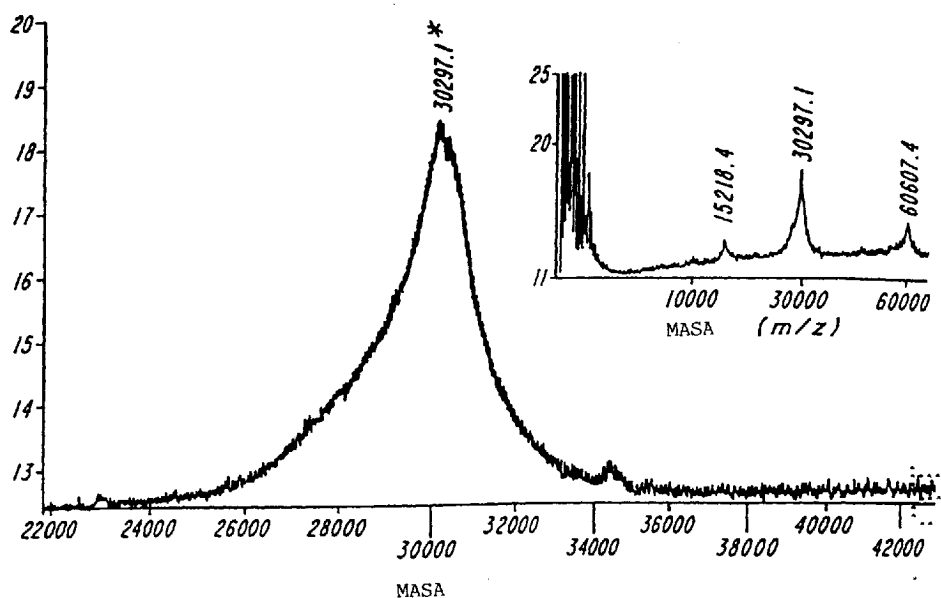


FIG. 41A

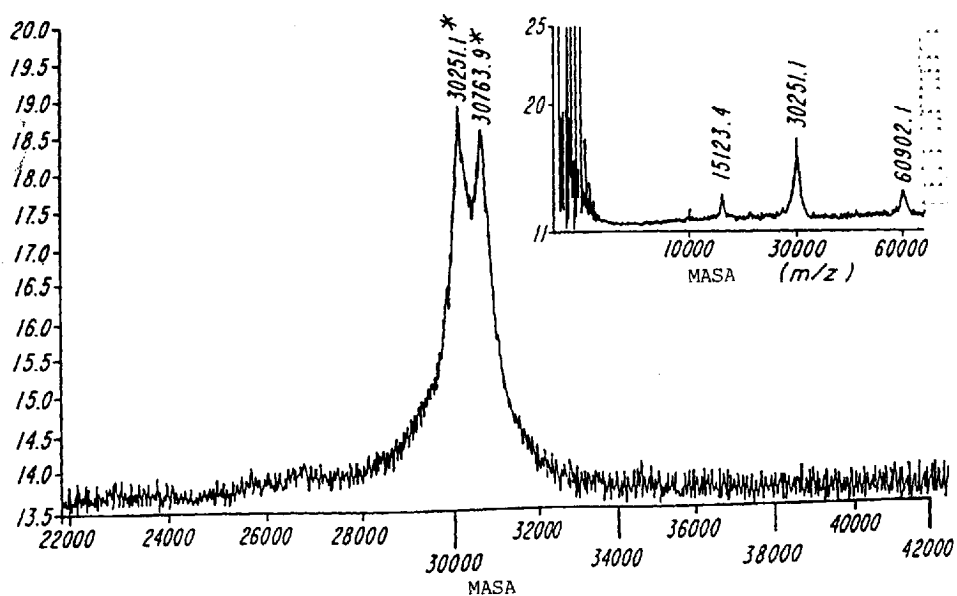


FIG. 41B

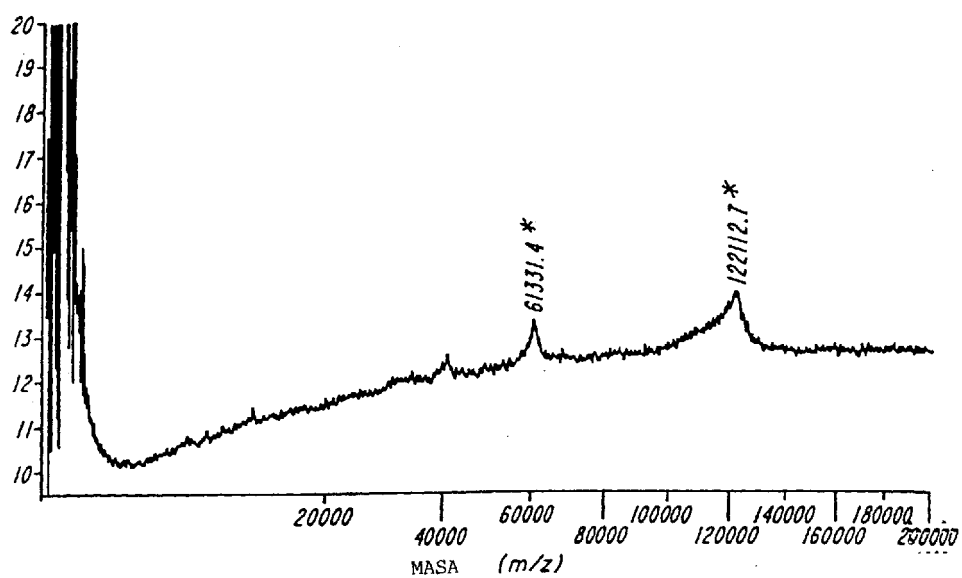


FIG. 42A

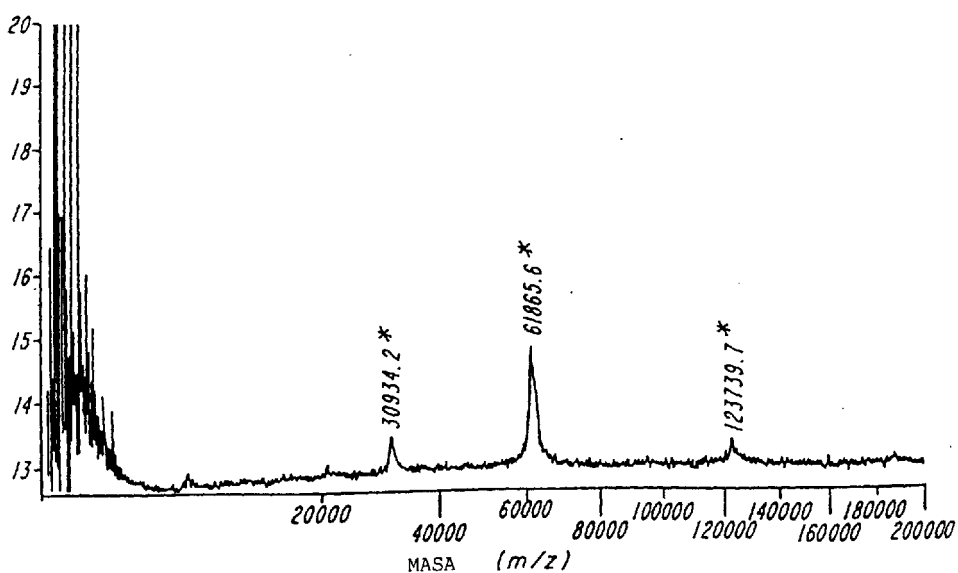


FIG. 42B

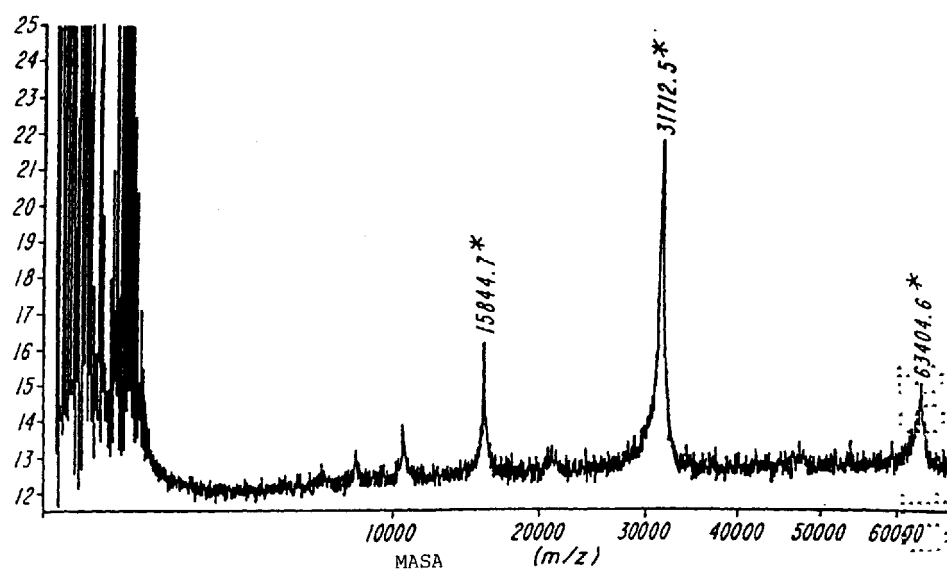


FIG. 43A

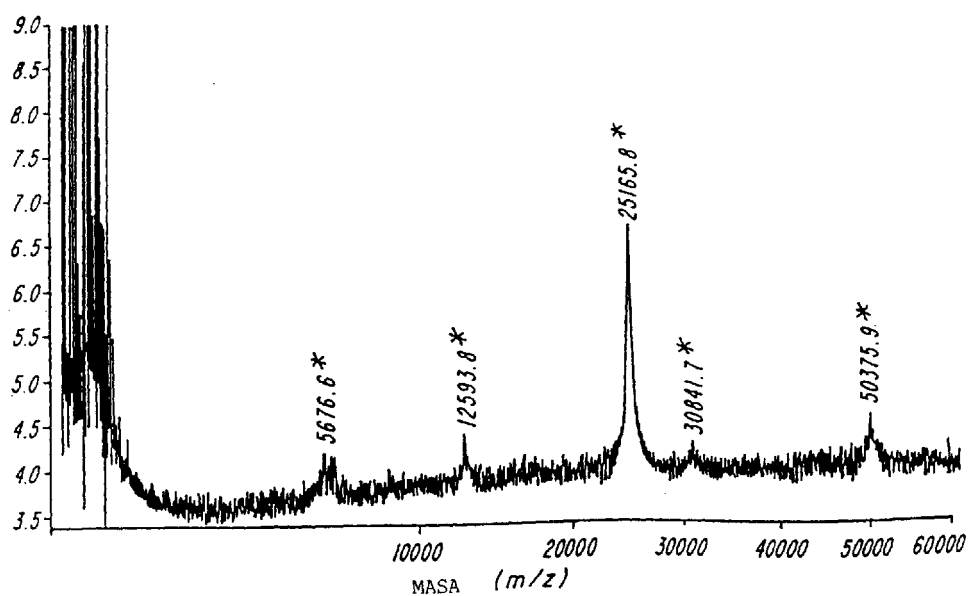


FIG. 43B

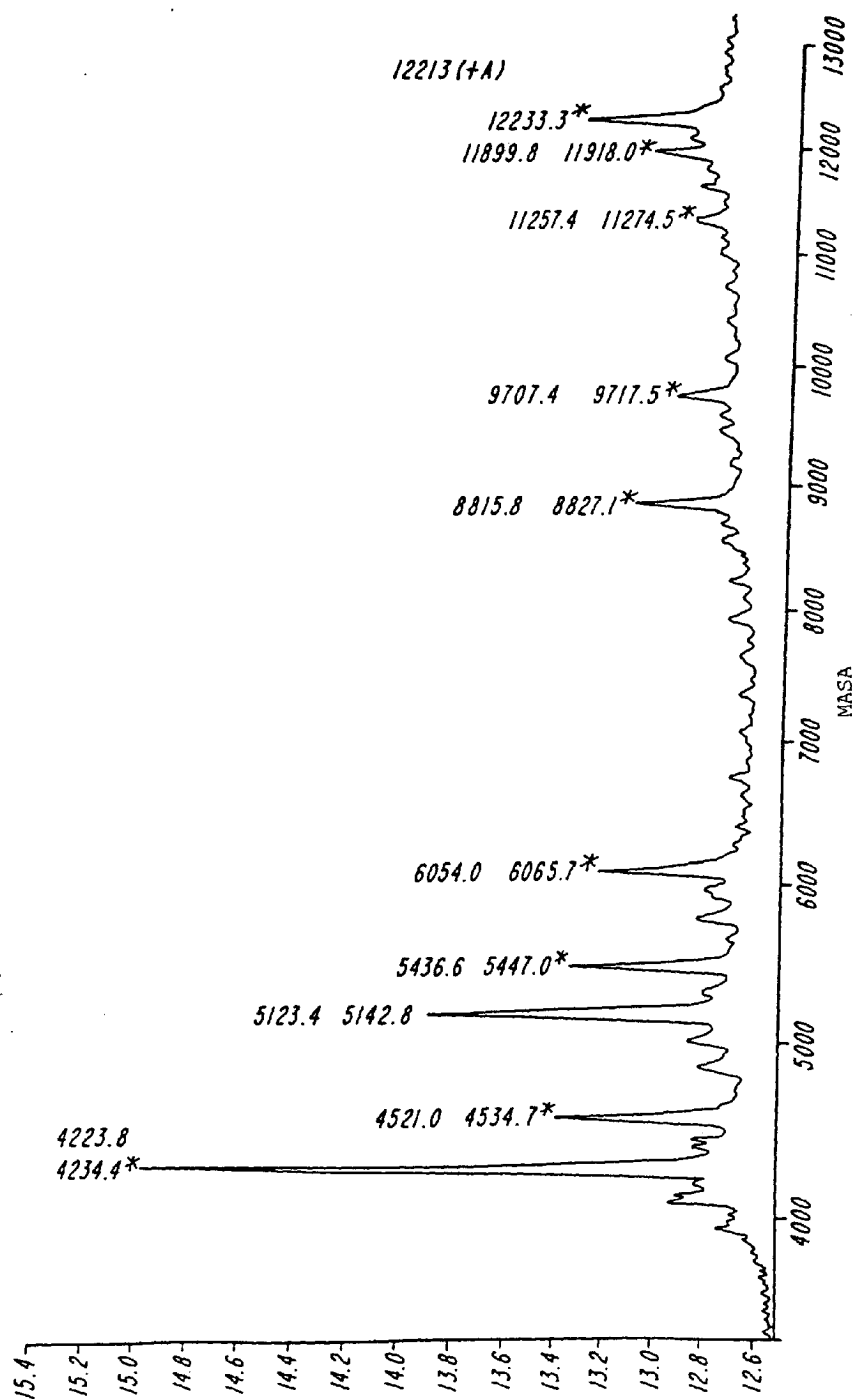


FIG. 44A

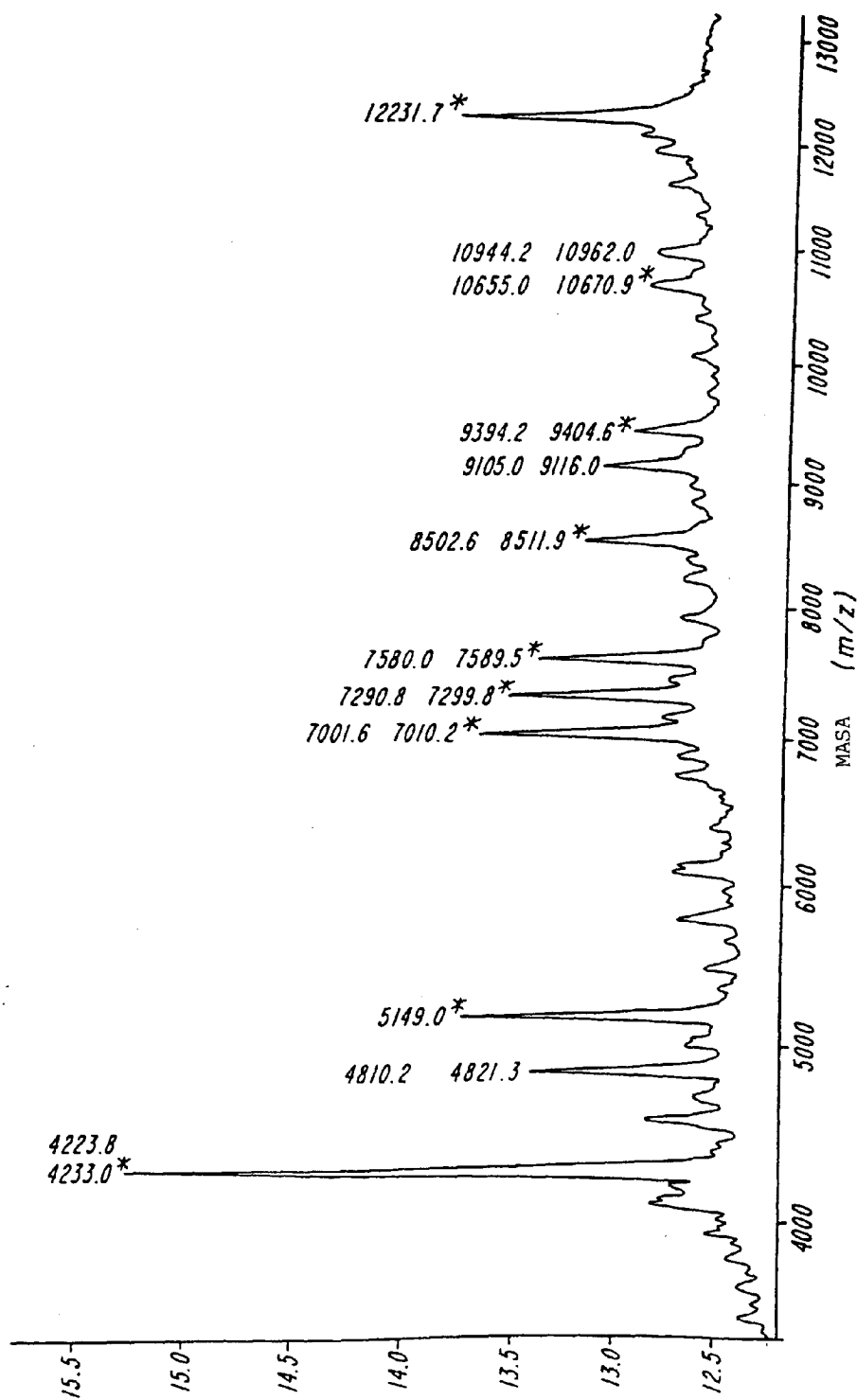


FIG. 44B

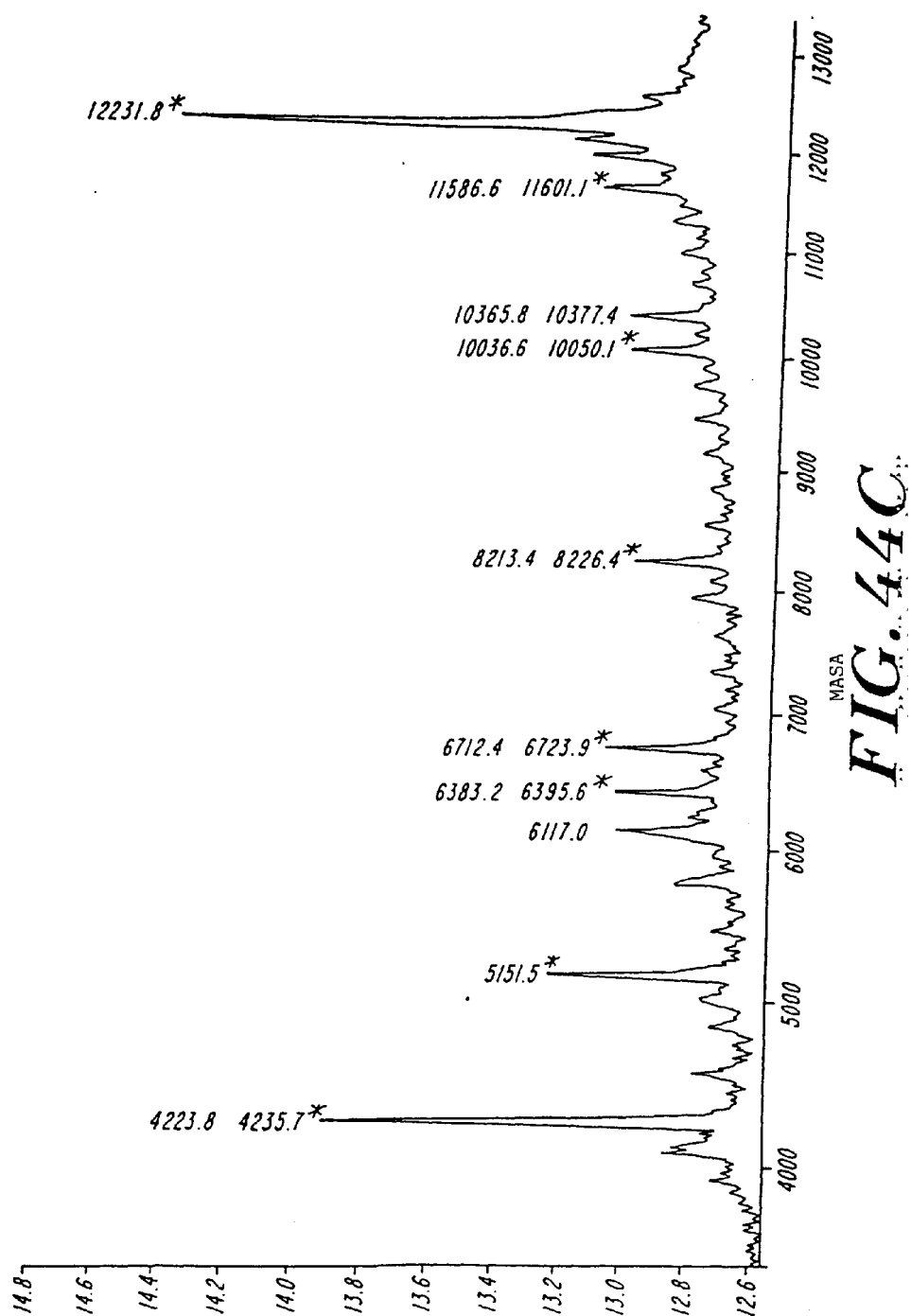


FIG. 44C

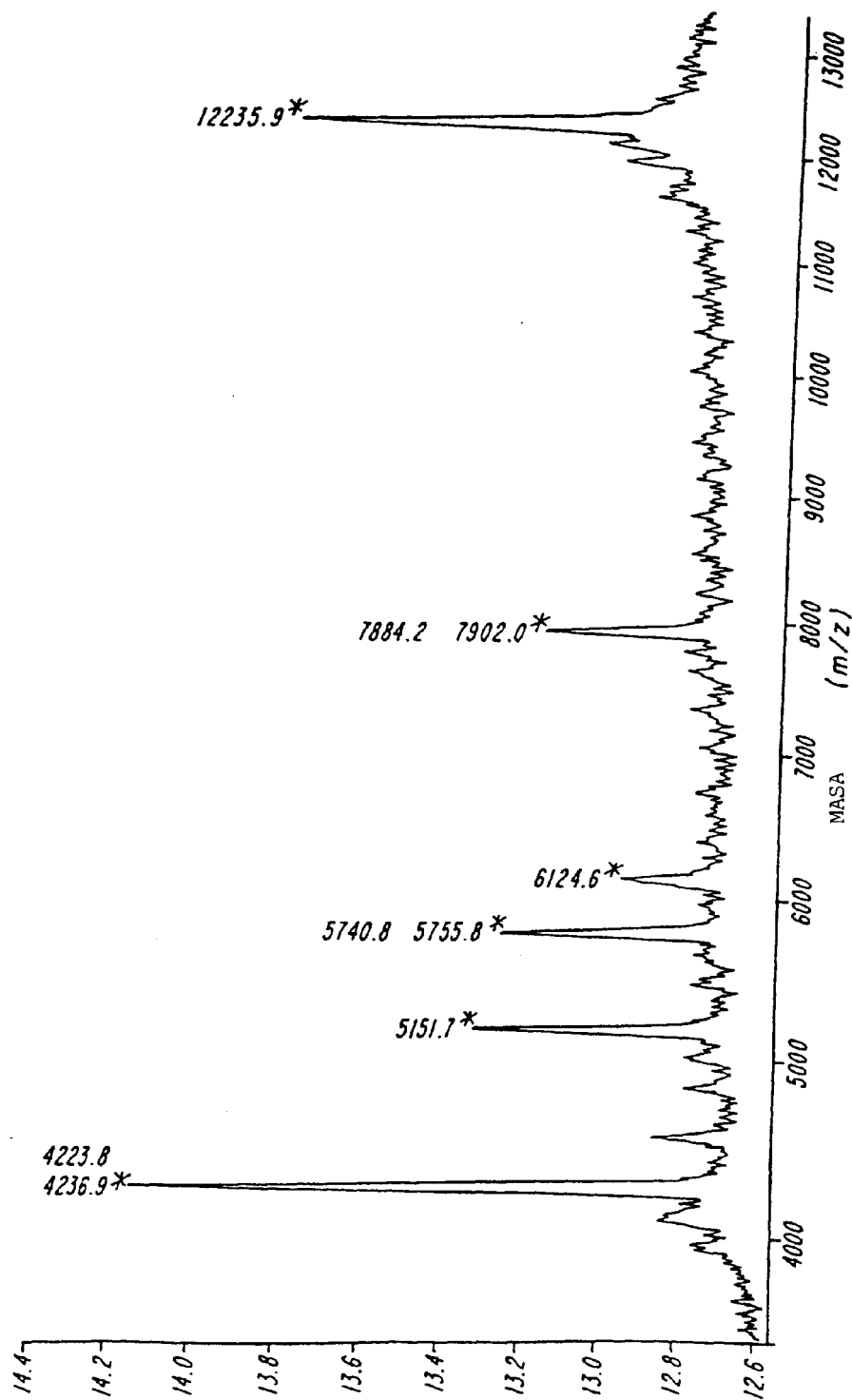


FIG. 44D

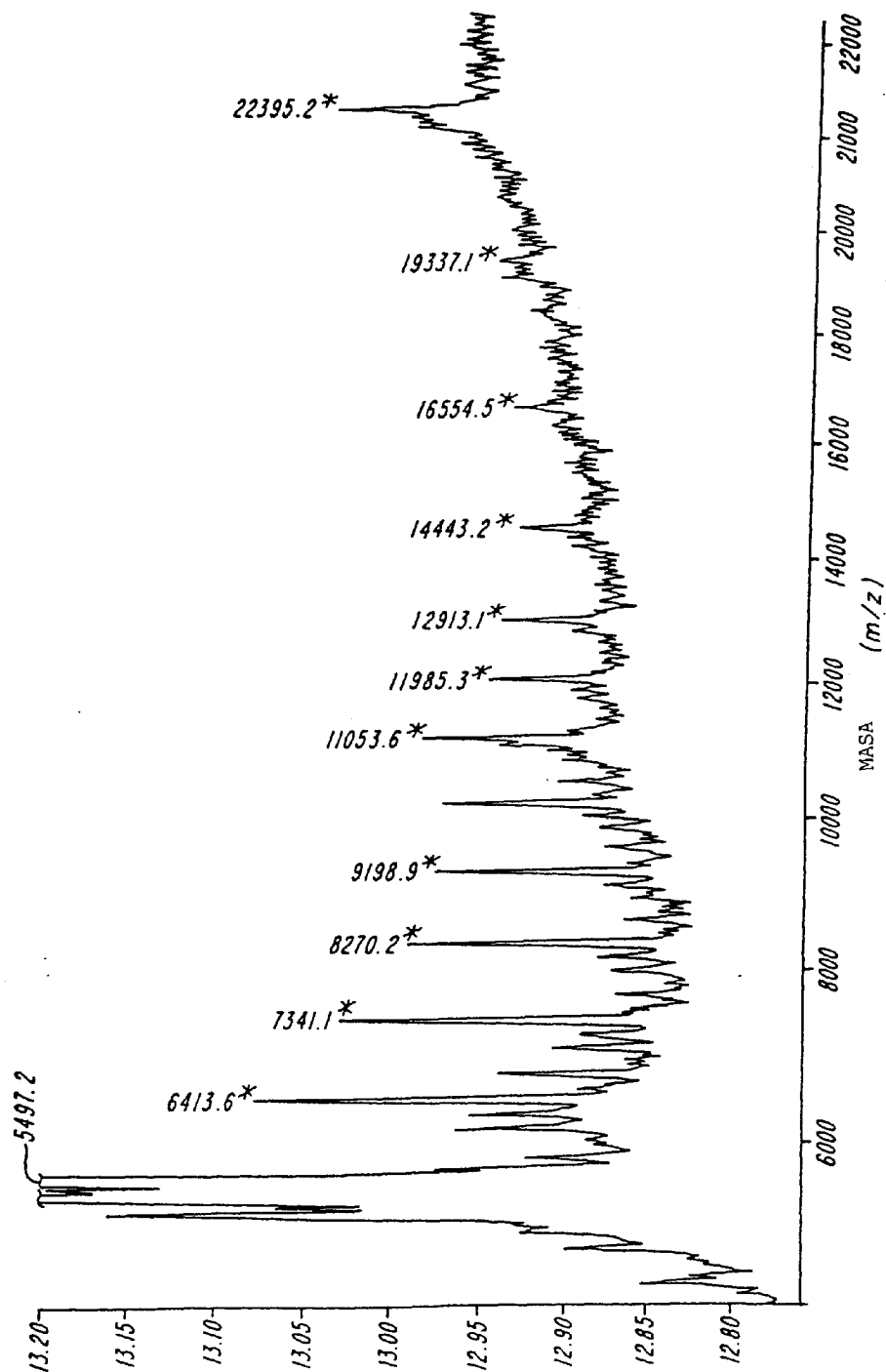


FIG. 45

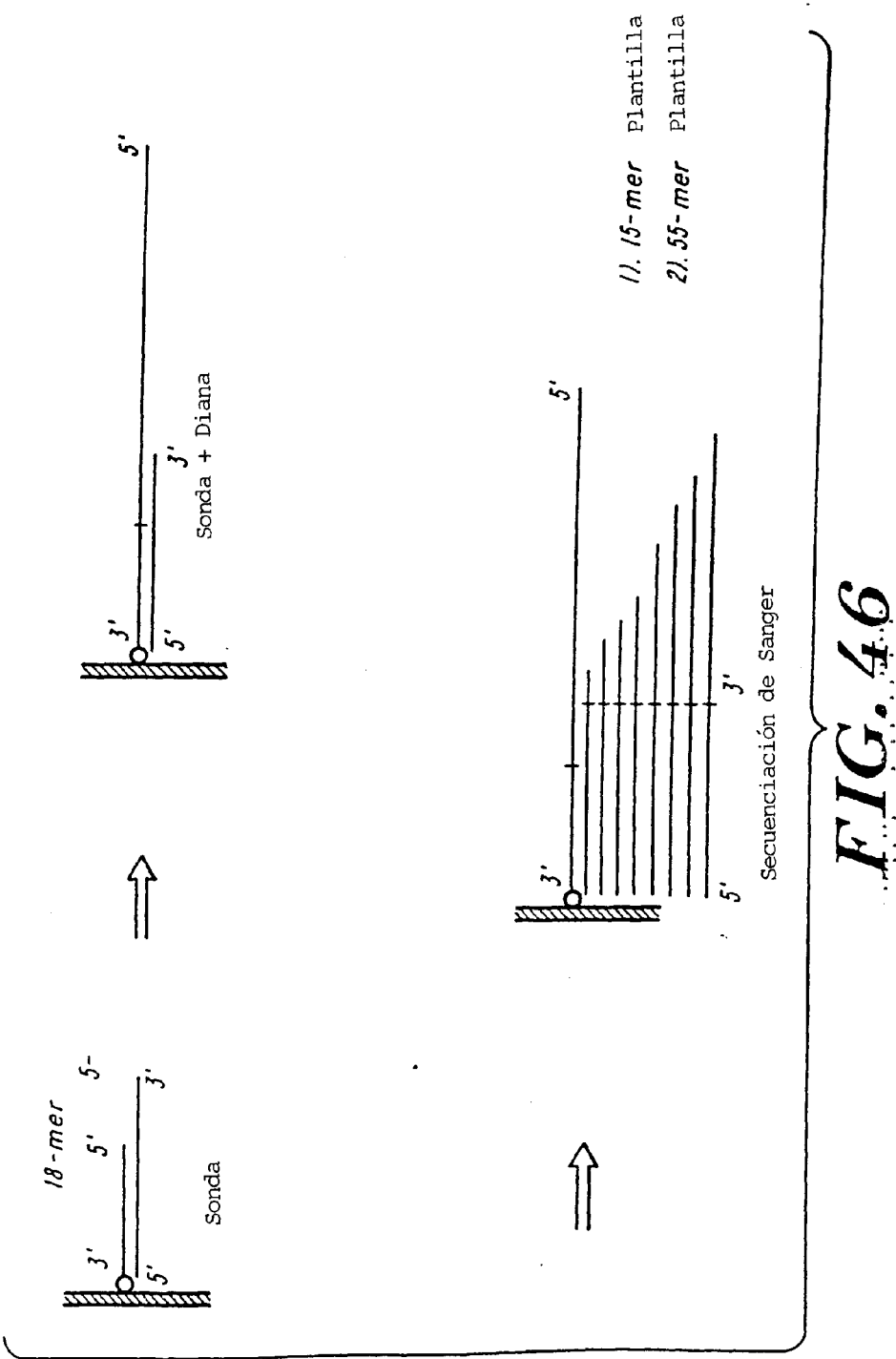


FIG. 4.6

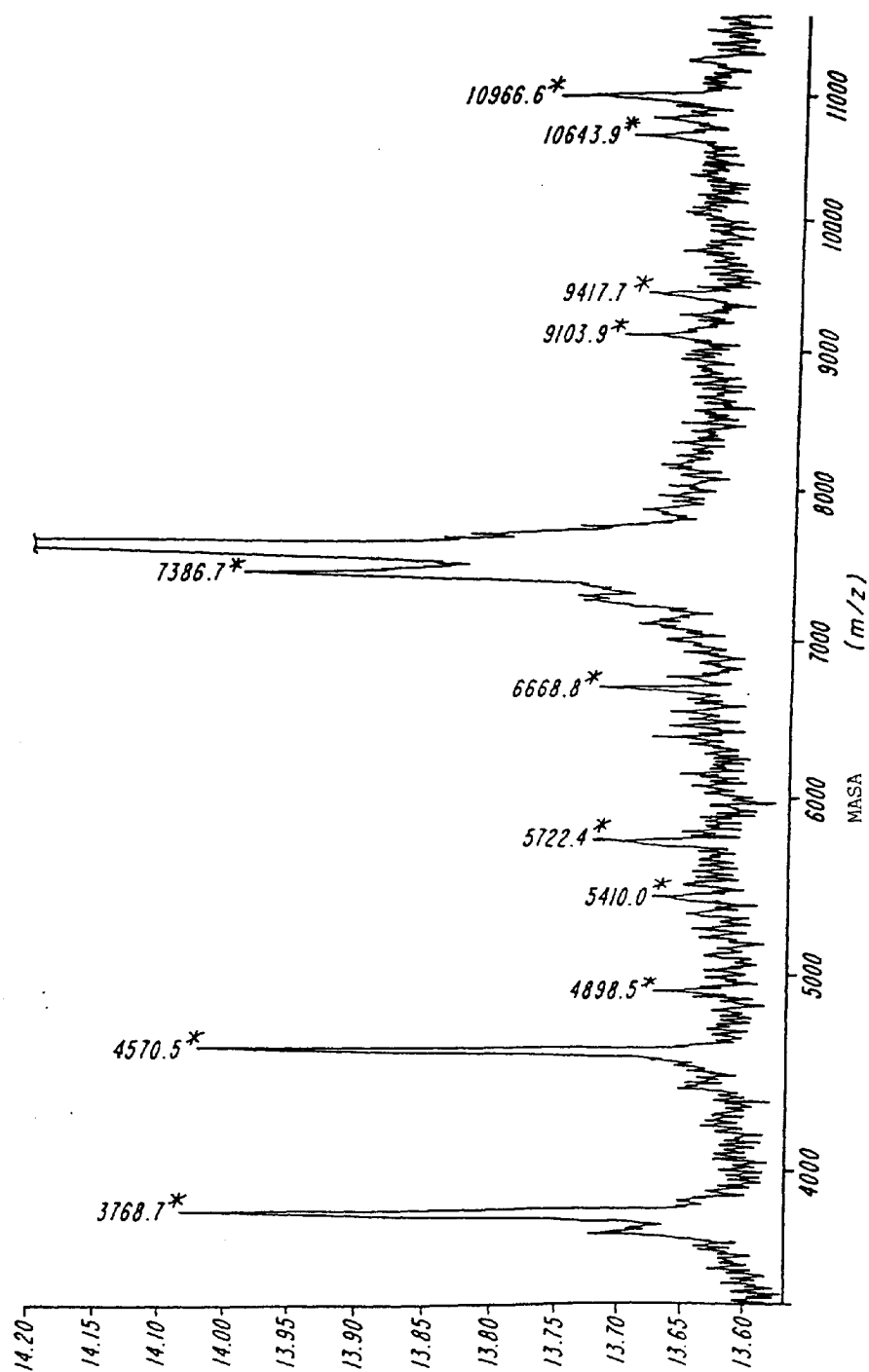


FIG. 47A

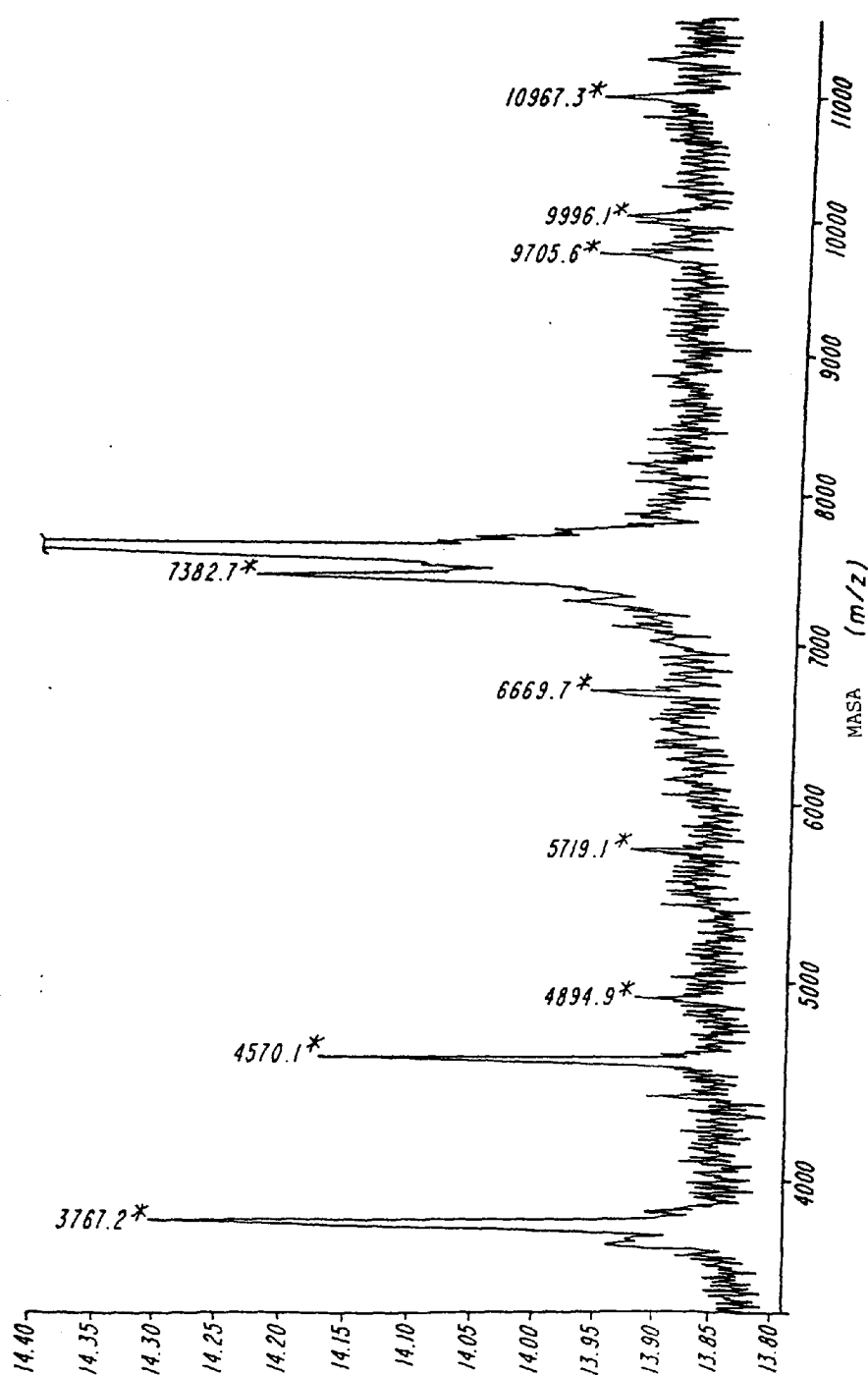


FIG. 47B

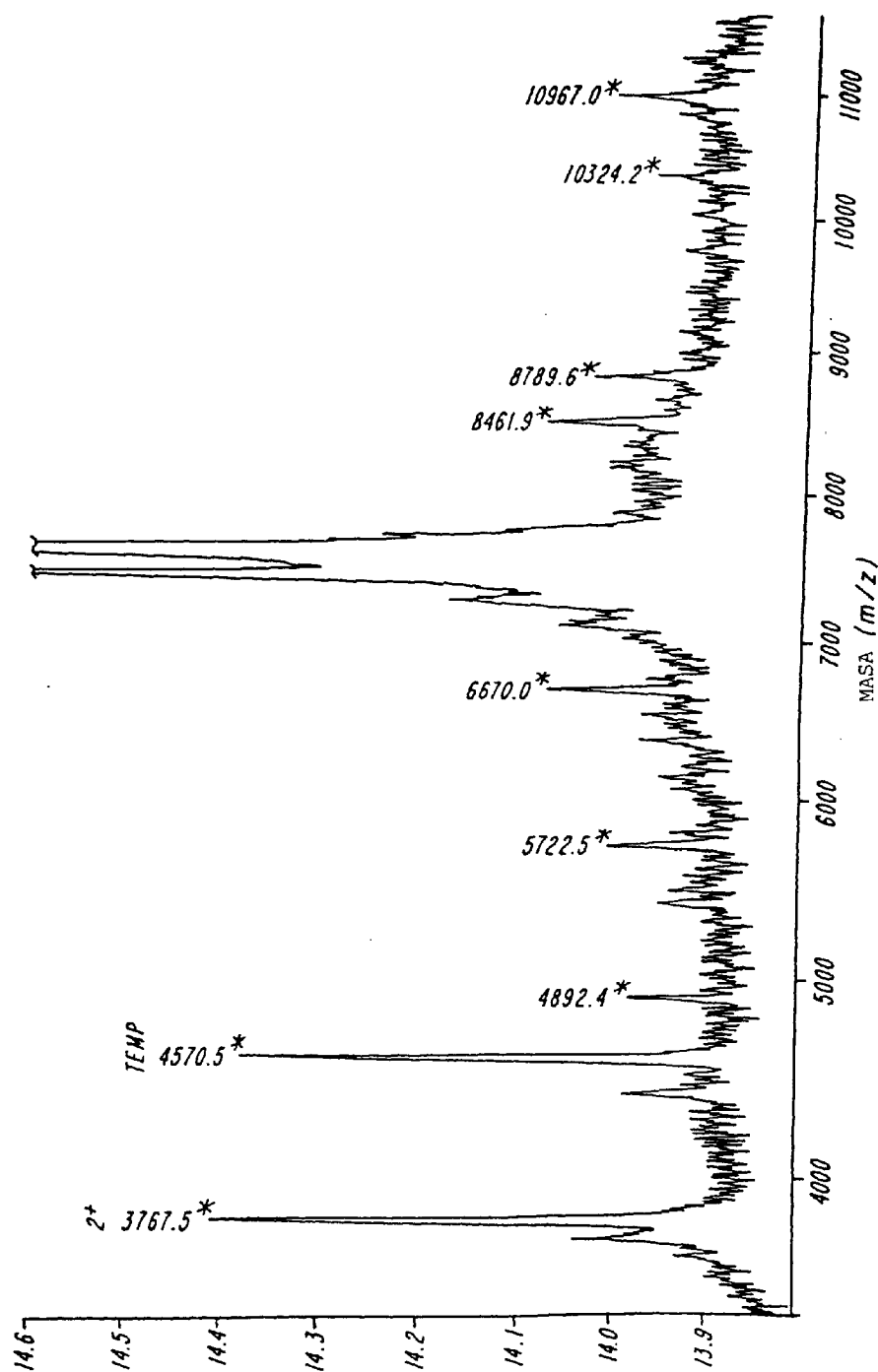


FIG. 47C

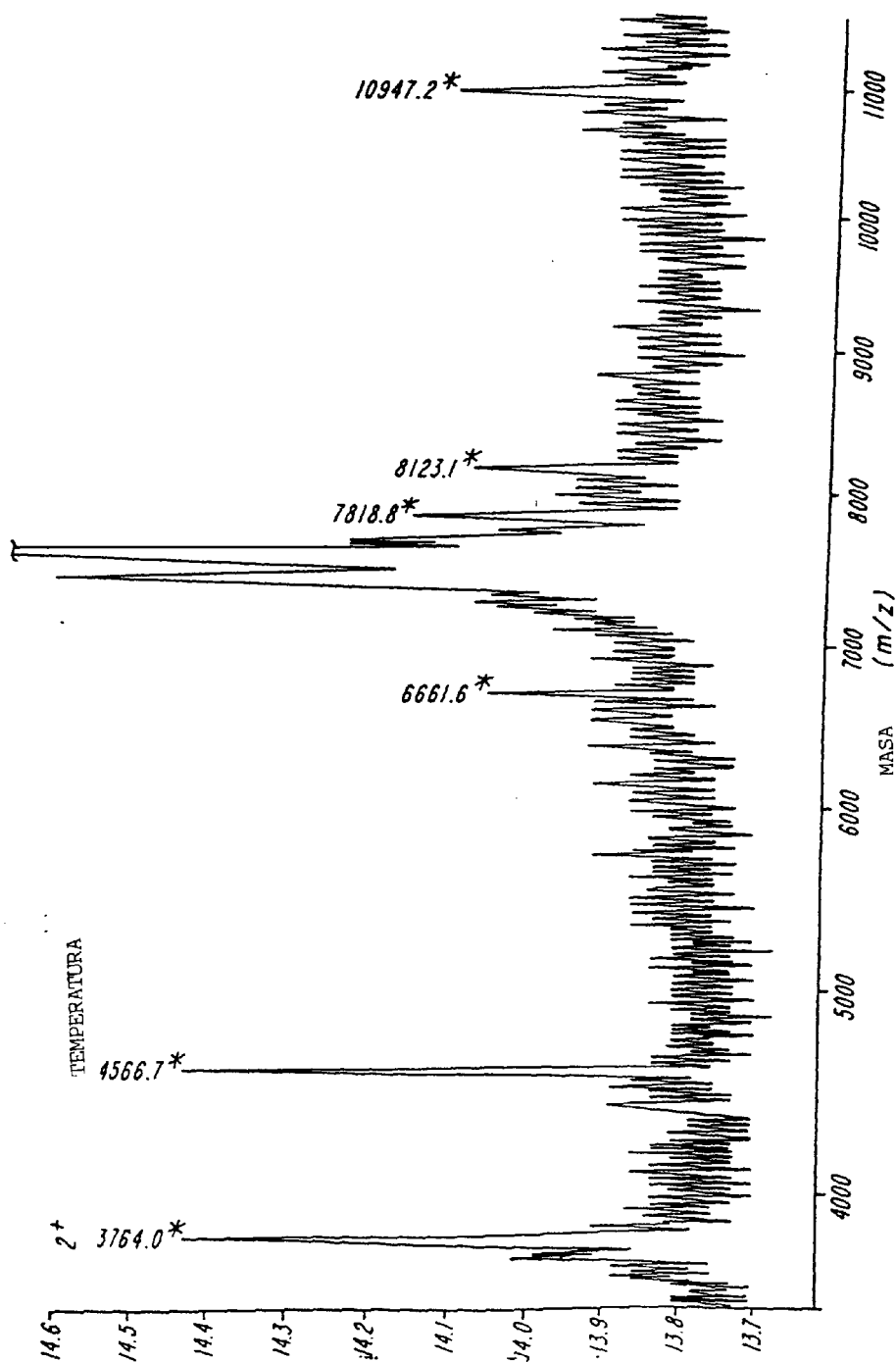


FIG. 47D

FIGURA 48

