

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 113**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07730387 .3**  
96 Fecha de presentación: **13.03.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2006393**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.12.2008**

54 Título: **Método de análisis de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:  
**14.03.2006 ES 200600703**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.09.2012**

73 Titular/es:  
**Oryzon Genomics, S.A.**  
**Sant Ferran, 74**  
**08940 Cornellá de Llobregat, ES**

72 Inventor/es:  
**MAES, Tamara y**  
**AIBAR DURAN, Elena**

74 Agente/Representante:  
**Zea Checa, Bernabé**

ES 2 387 113 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Método de análisis de ácidos nucleicos.

5 **OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención se enmarca en el campo de la biología molecular. En particular, la presente invención tiene por objeto un método de análisis de ácidos nucleicos que puede ser utilizado para determinar la presencia de variaciones en el genoma de un organismo, tanto a nivel de alteraciones en la secuencia como de número de copias de un gen.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Actualmente, una de las técnicas utilizadas para analizar cambios en el número de copias de un gen en un genoma es el método conocido como hibridación genómica comparativa (CGH, comparative genomic hybridization), que permite detectar grandes cambios cromosómicos que tienen lugar en las células incluyendo la pérdida, duplicación y transubicación de ADN de una célula a otra.

Con el desarrollo de las micromatrices de ADN (también denominadas chips o microarrays de ADN), éstas han sido rápidamente integradas en los estudios de mapeo genómico, con lo que se obtienen unos mejores niveles de resolución y sensibilidad en el análisis comparativo de ADN genómico y una mayor capacidad de reproducción que permiten la detección fiable de alteraciones a nivel individual en los genes.

Gracias a su versatilidad, la tecnología de micromatrices de ADN presenta aplicaciones en los campos de la transcriptómica, la genética y la epigenética. En este sentido, se han desarrollado distintos protocolos para el marcaje de las muestras de ARN y ADN para poder llevar a cabo análisis masivos en paralelo.

Teóricamente, deberían observarse diferencias en la distribución de las intensidades de señal cuando se lleva a cabo una hibridación con micromatrices de ADN según si la muestra hibridada es ARN o ADN. En una célula, los genes se expresan de forma diferencial por lo que las distintas especies de ARN que se encuentran en una muestra de ARN total pueden presentar diferencias en los niveles de expresión de hasta 4 órdenes de magnitud. En consecuencia, las señales de hibridación de muestras de ARN o aRNA marcadas cubren un rango de intensidades de señal similar (es decir, de unos 4 órdenes de magnitud) para las sondas que se encuentran en la superficie de la micromatriz.

Por contra, aparte del ADN repetitivo o de fragmentos de ADN duplicados o ausentes en muestras individuales, la prevalencia de los diferentes fragmentos de ADN en una muestra de ADN genómico es idéntica, por lo que se esperaría que la variación de la intensidad de la señal entre las distintas sondas de la superficie de la micromatriz fuese sustancialmente menor y que estuviera limitada a pequeñas variaciones en la eficiencia de marcaje de los distintos fragmentos de ADN o a variaciones en la eficiencia de hibridación entre los diferentes fragmentos marcados y las sondas en la superficie de la micromatriz.

Sin embargo, el análisis de la distribución de señales que se obtienen a partir de los distintos protocolos publicados de hibridación de genoma completo o de subgenoma revela que la distribución de las intensidades de señal para las sondas de la superficie de la micromatriz se asemeja a la que se obtiene en los análisis de expresión génica, incluso cuando se tiene un cuidado absoluto en el procedimiento de selección de sondas.

Los protocolos de marcaje que se han utilizado para estudios del genoma incluyen:

50 - fragmentación del genoma utilizando DNasa I y marcaje en los extremos con transferasa terminal usando UTP marcado (Borevitz et al., 2003. Large-scale identification of single-feature polymorphisms in complex genomes. *Genome Research* 13:513-523; Winzeler et al., 1998. Direct allelic variation scanning of the yeast genome. *Science* 281:1194-97).

55 - marcaje al azar con cebadores (opcionalmente tras digestión con un enzima de restricción para generar fragmentos más pequeños) utilizando dNTPs marcados (Pollack et al., 1999. Genome-wide analysis of ADN copy-number changes using cDNA microarrays. *Nature Genetics* 23: 41-46).

60 - amplificación subgenómica mediante digestión con uno o varios enzimas de restricción, ligación de un adaptador y amplificación utilizando cebadores basados en el adaptador, seguido del marcaje en los extremos con transferasa terminal usando UTP marcado (Maitra et al., 2005. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature Genetics* 37(10): 1099-1103).

- amplificación subgenómica mediante digestión con uno o varias enzimas de restricción, ligación de un adaptador y amplificación utilizando cebadores marcados en un extremo basados en el adaptador.

5 Todos estos protocolos generan señales distribuidas sobre 3-4 órdenes de magnitud, es decir, en el rango de detección total de los escáneres utilizados actualmente. Hasta el momento se desconocen los motivos por los cuales se produce esta distribución en las intensidades de señal, aunque esta variación no se puede explicar completamente por el método de marcaje, por diferencias en las características termodinámicas de las sondas sobre la superficie, o por variaciones en el proceso de escaneado y, por lo tanto, deben ser causadas por desviaciones producidas en el método de marcaje.

10 WO0028081 describe un procedimiento para la detección de polimorfismos en el que se usa al menos un enzima de restricción para generar fragmentos de restricción a partir de ADN genómico. Posteriormente, se ligan segmentos adaptadores a los extremos de los fragmentos de restricción y los fragmentos se amplifican usando amplificación dirigida por cebador ("primer-directed amplification") en la que los cebadores para la amplificación se encuentran marcados. Los fragmentos resultantes se hibridan a un bioarray para la identificación posterior de variantes potenciales, esto último revelando los polimorfismos / SNPs potenciales presentes en la muestra.

20 WO03016483 describe la introducción de etiquetas durante la transcripción del ARN sin describir, sin embargo, el efecto beneficioso y las ventajas concretas encontradas en la invención subyacente en el contexto del análisis de variaciones genómicas.

Por este motivo, se han hecho algunos intentos para mejorar el método de marcaje encaminados a disminuir la amplitud del rango de intensidades de señal (Lieu et al., 2005. Development of a DNA-labeling system for array based comparative genomic hybridization. J. Biom. Tech. 16:104-111).

25 La distribución de las intensidades de señal en un rango amplio tiene varias consecuencias en la práctica:

30 - dado que la relación señal/ruido de fondo empeora en el rango más bajo de señal, una fracción de las señales pierde calidad para el análisis. La intensidad de señal en el extremo inferior del espectro puede mejorarse añadiendo (hasta un cierto límite) más ADN marcado, pero esto hace que las señales más altas se muevan hacia la saturación y se pierda la capacidad cuantitativa para estos puntos.

35 - para algunas aplicaciones, incluyendo el mapeo de ADN, es deseable poder llevar a cabo análisis masivos de muestras de ADN, de forma que en lugar de realizar el análisis de una única muestra en comparación con un control, el análisis se realiza sobre una mezcla de varias muestras de tal manera que el nivel de hibridación en la mezcla refleja, en comparación con una muestra referencia positiva y con una muestra referencia negativa, la frecuencia de la presencia de una señal en la muestra que contiene la mezcla. Típicamente, sería deseable poder detectar una señal que reflejase una dilución de cien veces de la señal de la muestra referencia positiva. Si, por ejemplo, las señales detectables se encuentran en el rango entre 60 y 60000, la señal de referencia positiva debería alcanzar un valor de al menos 6000, y la muestra referencia negativa debería tener un valor residual claramente por debajo de 60. Para estas aplicaciones, todas las intensidades de señal deberían estar comprendidas entre 100 veces la señal mínima claramente detectable y las señales detectables más altas dentro del rango lineal del escáner. Utilizando los protocolos actuales de marcaje de ADN, este criterio elimina la mayoría de las sondas, porque hay relativamente pocas sondas con una intensidad mayor que 100 veces el ruido de fondo.

45 - para otras aplicaciones, incluyendo el análisis de las variaciones en el número de copias de un gen (como por ejemplo la CGH), es deseable obtener en el centro del espectro la señal correspondiente al número de copias más frecuentemente observado para permitir la identificación de duplicaciones o deleciones con la máxima fiabilidad.

50 Sin embargo, con los protocolos actuales la mayoría de puntos aparecen a intensidades de señal bajas, lo que dificulta la interpretación de los cambios observados en las intensidades de señal. Esto puede observarse al analizar los datos publicados en la literatura como, por ejemplo, el trabajo publicado por Barrett y colaboradores (Barrett MT et al. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 21;101(51):17765-70).

55 Este grupo de investigación extrajo ADN genómico de muestras humanas usando Trizol (Invitrogen, USA) como reactivo de extracción además de purificaciones por fenol-cloroformo. 10 ng de este ADN fue amplificado por PCR usando polimerasa  $\phi$ 29. Después este ADN amplificado fue digerido con dos enzimas de restricción, AluI y RsaI, con un tiempo de incubación de 2 horas a 37°C. El marcaje de las muestras se llevó a cabo con 6  $\mu$ g de ADN digerido y purificado con el kit "Bioprime labelling kit" (Invitrogen, USA) añadiendo un nucleótido marcado con los fluoróforos Cy3 o Cy5, siguiendo los pasos recomendados por dicha casa comercial.

60 Antes de la hibridación, las muestras marcadas fueron desnaturalizadas a 100°C durante 1,5 minutos e incubadas a 37°C durante 30 minutos. Las muestras se hibridaron usando recomendaciones de Agilent Technologies e incubando la muestra referencia y la muestra problema sobre la micromatriz a una temperatura de 65°C toda la

noche. Las micromatrices fueron después lavadas según el protocolo de Agilent y escaneadas usando un escáner Agilent 2565AA DNA microarray scanner.

La representación gráfica de los datos correspondientes al Dataset 14 de esta publicación se muestran en las figuras 5A y 5B y el análisis de los datos realizado según se describe posteriormente se recogen en la Tabla 1. Para poder estimar la dispersión experimental técnica de la plataforma (es decir, la dispersión de los niveles de señal de un punto repetido, no la dispersión del conjunto total de datos obtenidos de las diferentes sondas), se han tomado como controles los oligonucleótidos repetidos varias veces en la micromatriz usada en este documento. En particular, las sondas usadas como controles son: ITGB3BP, EXO1, FLJ22116, IF2, CPS1, ST3GALVI, FLJ20432, HPS3, ARHH, SPP1, DKFZp762K2015, CENPE, CCNA2, ESM1, NLN, KIAA0372, LOX, RAD50, RAB6KIFL, FLJ20364, FLJ20624, SERPINE1, FLJ11785, FLJ11785, LOXL2, WRN, RAD54B, CML66, HAS2, MGC5254, MLANA, COL13A1, AD24, LMO2, CD69, LOC51290, FLJ21908, MGC5585, KNTC1, TNFRSF11B, MGC5302, BAZ1A, AND-1, HIF1A, IFI27, FANCA, BRCA1, PMAIP1, HMCS, STCH, SERPIND1 y NSBP1. Todas estas sondas están repetidas 10 veces.

Tabla 1

	Canal Verde	Canal Rojo
Porcentaje relativo de dispersión de las señales de las sondas	174 %	173 %
Porcentaje relativo de dispersión de las señales de los controles	33 %	34 %
Relación dispersión sondas/dispersión controles	5,27	5,09

Como puede observarse a partir de los datos de la Tabla 1, las señales de las sondas presentaban una dispersión de más de 5 veces la dispersión mostrada por los controles, ilustrando que hay una dispersión real no debida a la ejecución técnica del experimento. Además, gráficamente se observa que las señales correspondientes a las sondas se distribuyen a lo largo de la diagonal del gráfico (Figura 5A, gráfica de dispersión de las señales obtenido en el canal verde y el canal rojo) con una mayor frecuencia a intensidades de señal bajas (Figura 5B, histograma que refleja la distribución de las señales). Estos resultados indican que la particular combinación del protocolo de marcaje y la hibridación con la colección de sondas sobre la superficie utilizada en esta publicación introduce una variabilidad no deseable que puede afectar la fiabilidad de parte de los resultados usados.

En la presente invención se describe un método para el análisis de ADN genómico que comprende un fraccionamiento del ADN, la ligación de adaptadores y una etapa de transcripción in vitro de las muestras utilizando ARN polimerasa. En esta etapa se generan un conjunto de fragmentos de ARN equivalentes a los fragmentos de ADN a analizar, siendo estos fragmentos de ARN los que se hibriden con los oligonucleótidos de la micromatriz de ADN para llevar a cabo el análisis. En esta etapa puede llevarse a cabo optativamente el marcaje de las muestras. El método de la presente invención permite reducir significativamente la variabilidad en las intensidades de señal de las muestras analizadas.

#### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención tiene por objeto un método de análisis de ácidos nucleicos que comprende las etapas:

- a) fragmentación de una muestra de ADN genómico,
- b) ligación, en los extremos de los fragmentos de ADN obtenidos, de adaptadores específicos compatibles con los extremos generados donde al menos uno de los adaptadores ligados contiene una secuencia promotora funcional,
- c) amplificación de los fragmentos obtenidos utilizando cebadores específicos basados en los adaptadores,
- d) transcripción in vitro de los fragmentos de ADN amplificados con una ARN polimerasa capaz de iniciar la transcripción a partir de la secuencia promotora contenida en los adaptadores utilizando una mezcla de nucleótidos (rNTPs),
- e) hibridación con los oligonucleótidos de la micromatriz de ADN y detección de los fragmentos hibridados, y
- f) comparación cuantitativa de las señales de diferentes muestras analizadas.

En la figura 1 se muestra un esquema de un ejemplo de las etapas que conforman el método de la invención. La fragmentación de una muestra de ADN genómico puede llevarse a cabo por métodos químicos, como por ejemplo tratamiento con ácido clorhídrico, hidróxido sódico, hidracina, etc.; métodos físicos, incluyendo tratamiento con radiación ionizante, sonicación, etc. o métodos enzimáticos, como por ejemplo digestión con endonucleasas,

tales como enzimas de restricción. En una realización de la invención, la fragmentación se realiza mediante digestión con al menos un enzima de restricción. En otra realización de la invención, la fragmentación se realiza mediante digestión con dos enzimas de restricción.

5 El método de la presente invención puede utilizarse para analizar cualquier muestra de ADN genómico aislada a partir de cualquier organismo en el que se desee estudiar la presencia de variaciones en el genoma. Dicho método puede aplicarse, entre otros, para el análisis a gran escala de polimorfismos de característica única (SFP, single-feature polymorphisms), hibridación genómica comparativa (CGH) que permite determinar la delección de un gen o un  
10 fragmento del mismo o la presencia de dos o más copias de un gen o fragmentos del mismo, mapeo genético a base de análisis de individuos o por "bulk segregant analysis", identificación de mutaciones puntuales de un solo nucleótido (SNP, single nucleotide polymorphisms), localización de trasposones, ChIP-on-chip ("Chromatin immunoprecipitation on chip"), etc.

15 El término micromatriz o micromatriz de ADN se refiere a una colección de múltiples oligonucleótidos inmovilizados sobre un sustrato sólido, donde cada oligonucleótido está inmovilizado en una posición conocida de forma que la hibridación con cada uno de los múltiples oligonucleótidos se puede detectar por separado. El sustrato puede ser compacto o poroso, plano o no plano, unitario o distribuido. Las micromatrices de ADN sobre las que se lleva a cabo la hibridación y detección en el método de la presente invención pueden ser elaboradas con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo o con oligonucleótidos sintetizados in situ mediante fotolitografía o por  
20 cualquier otro mecanismo.

El término sonda se refiere a los oligonucleótidos inmovilizados sobre el sustrato sólido con los que tiene lugar la hibridación de los ácidos nucleicos a analizar.

25 En una realización de la invención, la detección de los fragmentos hibridados se lleva a cabo a partir de la cuantificación directa de la cantidad de muestra hibridada sobre las sondas de ADN contenidas en la micromatriz de ADN. Dicha cuantificación directa se puede llevar a cabo mediante técnicas que incluyen, pero no se limitan a, microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía de efecto tunel (STM) o microscopía electrónica de barrido (SEM); métodos electroquímicos, como medida de impedancia, voltaje o amperaje; métodos ópticos, como  
30 microscopía confocal y no confocal, microscopía de infrarrojos, detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia o transmitancia y, en general, cualquier técnica de análisis de superficies.

35 En otra realización de la invención, la detección de los fragmentos hibridados se lleva a cabo mediante la detección de un marcaje incorporado en los fragmentos a analizar. En particular, el marcaje tiene lugar durante la etapa de transcripción in vitro mediante la incorporación de análogos de nucleótidos que contienen marcajes detectables directamente, tales como fluoróforos, análogos de nucleótidos que incorporan marcajes que pueden ser visualizados indirectamente en una reacción posterior, tales como biotina o haptenos, o cualquier otro tipo de marcaje de ácidos nucleicos directo o indirecto conocido para un experto en la materia. En particular, el marcaje puede realizarse  
40 utilizando Cy3-UTP, Cy5-UTP o fluoresceína-UTP para el marcaje directo o biotina-UTP para el marcaje indirecto.

El término secuencia promotora funcional se refiere a una secuencia de nucleótidos que puede ser reconocida por una ARN polimerasa y a partir de la cual se puede iniciar la transcripción. En general, cada ARN polimerasa reconoce una secuencia específica, por lo que la secuencia promotora funcional comprendida en los adaptadores se elige de acuerdo con la ARN polimerasa que se utilice. Ejemplos de ARN polimerasas incluyen, pero no se limitan a,  
45 T7 ARN polimerasa, T3 ARN polimerasa y SP6 ARN polimerasa.

También se describe un kit que comprende los reactivos, enzimas y aditivos apropiados para llevar a cabo el método de análisis de ácidos nucleicos.  
50

Asimismo, se describe un kit que comprende los reactivos, enzimas, aditivos y micromatrices de ADN con las sondas apropiados para llevar a cabo el método de análisis de ácidos nucleicos.

55 La presente invención se basa en la mejora de los métodos de análisis de ácidos nucleicos mediante el uso de micromatrices de ADN para el estudio de variaciones en el genoma de un organismo que se emplean en la actualidad. Se observó que cuando a la preparación de ADN se acoplaba una etapa de transcripción in vitro de los fragmentos de ADN amplificados por PCR utilizando una ARN polimerasa, la señal de hibridación con las sondas contenidas en la micromatriz de ADN era más intensa y más homogénea que cuando se hibridaban directamente los fragmentos de ADN obtenidos o marcados por otros medios. Dado que otros métodos de marcaje supuestamente  
60 aleatorios producen un sesgo muy notable en la eficiencia de marcaje y/o hibridación de los diferentes fragmentos marcados, este resultado era inesperado, y de hecho los motivos por los que la presente invención reduce o elimina este sesgo son de momento desconocidos.

Para determinar la mejora del método de la presente invención en relación con otros métodos comúnmente utilizados en la actualidad, se tomó como parámetro de referencia la dispersión de las intensidades de señal que presentan las muestras analizadas respecto a la dispersión de las intensidades de señal de los controles de hibridación.

Por ejemplo, para cada canal de lectura del escáner (correspondiente a un marcaje determinado) se calculó el porcentaje relativo de dispersión de las intensidades de señal como la relación entre la desviación estándar del conjunto de valores y la media de dichos valores. En los ejemplos de la presente invención se muestran los datos correspondientes al marcaje con Cy3 (canal verde) y al marcaje con Cy5 (canal rojo). Este cálculo se realizó tanto para las sondas como para los controles incluidos en el experimento, lo que permitió calcular también la relación entre el porcentaje relativo de dispersión de las señales de las sondas respecto al porcentaje relativo de dispersión de las señales de los controles. De esta forma se obtiene un valor que refleja el grado de dispersión de las sondas respecto a la dispersión de los controles, ya que ésta es indicativa de la variabilidad intrínseca de la hibridación. Por otra parte, también se consideró como valor de referencia el promedio de la relación entre la intensidad de señal de cada punto respecto a la intensidad de su propio ruido de fondo. En todos estos cálculos se puede esperar que cualquier aproximación de normalización afectará a todos los valores de forma similar, dejando la relación más o menos invariable.

Para llevar a cabo el análisis comparativo de las intensidades de señal de dos muestras, se suele representar los valores de las intensidades obtenidos a partir de la hibridación con cada sonda contenida en la micromatriz en una gráfica de dispersión en base logarítmica reflejando los valores de la primera muestra en el eje X y los valores correspondientes de la segunda muestra en el eje Y. La diagonal de la gráfica viene representada por aquellos puntos en los que una sonda determinada presenta un mismo valor para ambas muestras. Cuando se comparan dos muestras idénticas, idealmente, los puntos deberían estar situados sobre la diagonal. Sin embargo, experimentalmente se observa que se produce una cierta dispersión de los puntos con respecto a la diagonal (es decir, una dispersión perpendicular a la diagonal), o por tanto una dispersión de la relación de los valores de intensidad de dos muestras idénticas. Dicha dispersión es indicativa del grado de reproducibilidad de los datos de una muestra para cada sonda y tiene asociada una determinada desviación estándar, calculada en base a la relación de señales de las dos muestras para las diferentes sondas sobre la superficie.

Por otra parte, en la gráfica de dispersión descrita anteriormente, las señales de hibridación para cada una de las sondas se distribuyen a lo largo de la diagonal (o paralelo a la diagonal), siendo dicha distribución intrínseca de la intensidad de las señales en una muestra. Esta dispersión refleja la variación en la eficiencia de la detección de los diferentes fragmentos en una muestra, que viene dada por la combinación de la variación en la eficiencia del protocolo de preparación de los diferentes fragmentos de ácidos nucleicos para hibridación (incluyendo, en su caso, marcaje) y de la variación en la eficiencia de la hibridación de los diferentes fragmentos de ácidos nucleicos sobre la superficie. Esta distribución a lo largo de todo el rango de intensidades de señal tiene asociada una desviación estándar relativa, definida por la relación de la desviación estándar de las intensidades de las sondas de una muestra dividida por el promedio de las intensidades de todas las sondas para esta muestra. La desviación estándar relativa de las intensidades se puede calcular para el conjunto de todas las sondas de la muestra, o para un conjunto de sondas repetidas que funcionan como controles. La relación entre la desviación estándar de las intensidades de la muestra dividida por la relación de la desviación estándar de las intensidades de los controles reflejará por tanto la contribución de la variación en la eficiencia del protocolo de preparación de los diferentes fragmentos de ácidos nucleicos para hibridación (incluyendo, en su caso, marcaje) y de la variación en la eficiencia de la hibridación de los diferentes fragmentos de ácidos nucleicos sobre la superficie, a la dispersión total de la intensidad de las señales de una muestra.

La presente invención describe un protocolo de preparación de fragmentos de ácidos nucleicos que reduce la dispersión de la intensidad de los señales de una muestra obtenidos mediante su hibridación con micromatrices de ADN.

En una realización de la invención, la hibridación con micromatrices de ADN y la detección cumple el requisito de que, cuando en el ácido nucleico original todos los fragmentos analizados estaban presentes en el mismo número de copias, la relación entre la dispersión relativa de las intensidades de señal de las sondas de la muestra respecto a la dispersión relativa de las intensidades de señal de los controles es menor que 4, preferentemente menor que 3, más preferentemente menor que 2, aún más preferentemente menor que 1,5.

Una de las formas de controlar la intensidad de las señales de hibridación a lo largo de la diagonal es variando la cantidad de muestra hibridada, de manera que a mayor cantidad de muestra hibridada, mayor señal. De esta forma se pueden ajustar las señales máxima y mínima para que estén incluidas dentro del rango de detección del escáner. No obstante, la variación de la cantidad de muestra aplicada no afecta el perfil de la distribución de las señales: incrementando la cantidad de la muestra para subir la intensidad de señales poco intensas o por debajo del umbral de detección definido por el nivel de ruido del análisis, tendrá por consecuencia que señales intensas entrarán en la zona de saturación. La aplicación del método de análisis de la presente invención resulta en una homogenización

de las intensidades de señal de las sondas de una muestra, pero también en un aumento de la intensidad del señal promedio, y mejora por tanto la relación señal ruido de los análisis.

En el método de la presente invención la muestra que se hibrida con la micromatriz de ADN está constituida por ARN, lo que comporta algunas ventajas en relación a otros métodos. Por un lado, la interacción ARN-ADN es más fuerte que la interacción ADN-ADN, pudiendo ser esto una razón para la observación del aumento de la intensidad de la señal promedio. Por otro lado, la cadena simple de ARN no encuentra competencia por parte de moléculas complementarias presentes en solución para la hibridación sobre las sondas de la superficie de la micromatriz, con lo que se obtiene un mayor grado de hibridación con las sondas contenidas en la superficie de la micromatriz de ADN.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un nuevo método de análisis de ácidos nucleicos para la identificación de variaciones en genomas complejos con unas mejores sensibilidad, relación señal/ruido de fondo y reproducibilidad que los protocolos utilizados actualmente.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 presenta un esquema detallado de un ejemplo de las etapas que comprende el método de la invención cuando se utilizan dos enzimas de restricción para la digestión de la muestra de ADN.

La figura 2 muestra la representación gráfica, a escala logarítmica, de los resultados obtenidos tras el análisis de ADN genómico de levadura con el método según se describe en el ejemplo 1, es decir, con el marcaje de las muestras durante la etapa de amplificación por PCR y sin llevar a cabo la etapa de transcripción in vitro. Se observa que los valores de intensidad de señal presentan una distribución a lo largo de la diagonal del gráfico.

La figura 3 muestra la representación gráfica, a escala logarítmica, de los resultados obtenidos tras el análisis de ADN genómico de levadura con el método de la invención incluyendo una etapa de transcripción in vitro, según se describe en el ejemplo 2. Se observa que los valores de intensidad de señal muestran un menor rango de distribución cuando se lleva a cabo una etapa de marcaje de acuerdo con el método de la presente invención.

La figura 4A muestra la representación gráfica, a escala logarítmica, de los resultados obtenidos tras el análisis de ADN genómico de arroz con el método de la invención, según se describe en el ejemplo 3. También se observa que los valores de intensidad de señal muestran un menor rango de distribución cuando se aplica el método de la presente invención. La figura 4B muestra el histograma correspondiente a la frecuencia de las intensidades de señal obtenidas en el ejemplo 3 para el canal verde, correspondiente al marcaje con Cy3. Se observa que las muestras presentan una distribución normal.

La figura 5A muestra la representación gráfica, a escala logarítmica, de los datos correspondientes al DataSet14 del trabajo de Barrett y colaboradores descrito anteriormente. Se observa que los valores de intensidad de señal presentan una distribución a lo largo de la diagonal del gráfico. La figura 5B muestra el histograma correspondiente a la frecuencia de las intensidades de señal para estos mismos datos para el canal verde, correspondiente al marcaje con Cy3. Se observa que se obtiene una mayor importante dispersión de la intensidad de las señales y una mayor frecuencia a intensidades de señal bajas.

#### EJEMPLOS

A continuación se describen algunos ejemplos no limitativos del método de la presente invención.

Ejemplo 1: análisis de ADN genómico de levadura con marcaje mediante amplificación con cebadores marcados con los fluoróforos Cy3 y Cy5 sin etapa de transcripción in vitro.

##### Preparación del ADN

Se extrajo el ADN genómico a partir de una especie de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*. Se precipitaron las células del cultivo de la levadura mediante centrifugación, se resuspendieron en 600 µl de solución de extracción de ADN (100 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA pH 8), se añadieron 40 µl de SDS 20%, se mezcló bien y se incubó 10 minutos a 65° C, se añadieron 200 µl de acetato de potasio frío y se incubó 15 minutos en hielo. Después se centrifugó a 4°C a 16000 rpm durante 15 minutos en microcentrifuga y se añadieron 600 µl de isopropanol a 400 µl de sobrenadante. El ADN se precipitó mediante centrifugación a 16000 rpm durante 15 min, el precipitado se lavó con 200 µl de etanol 70% y se dejó secar. Se disolvió el precipitado en 100 µl de TE.

Purificación del ADN

Se añadieron 2 µl de RNasa 10 mg/ml a la muestra, se incubó durante 15 minutos en el baño a 37°C. Se añadieron 100 µl de solución CTAB (2% peso/volumen CTAB= bromuro de hexadeciltrimetil amonio; 200 mM Tris; 50 mM EDTA pH 7.5, 2M NaCl), y después de una incubación de 15 minutos a 65°C, se añadieron 200 µl de CHCl<sub>3</sub>:alcohol isoamílico 24:1. Se centrifugó durante 5 minutos en la microcentrífuga a 15000 rpm y se precipitaron 200 µl del sobrenadante con 180 µl de isopropanol. Se centrifugó en la microcentrífuga a 15000 rpm durante 10 minutos, el precipitado se lavó con 100 µl de etanol al 70% y se dejó secar al aire. El precipitado se disolvió finalmente en 50 µl de agua.

Digestión de ADN y ligación de adaptadores

Se digirió el ADN genómico total (2 µg) con SacI (Fermentas, Lituania) y MseI (New England Biolabs, USA) en un tiempo de incubación de 3 horas a 37°C. A los fragmentos de ADN generados tras la digestión, se ligaron el adaptador SacI compatible con el extremo cohesivo del enzima SacI y el adaptador MseI compatible con el extremo cohesivo MseI mediante la T4 ADN ligasa (Fermentas, Lituania) en el tampón T4 ligasa buffer (Fermentas, Lituania) en un tiempo de incubación de 4 horas a temperatura ambiente.

Amplificación de ADN

Se amplificaron los fragmentos SacI/MseI mediante PCR usando dos cebadores específicos basados en la secuencia de los adaptadores, a una concentración 200 nM cada uno, en una reacción con tampón 1x Taq, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 nM de dNTP, 1 U de Taq polimerasa (Fermentas, Lituania) usando el siguiente programa de ciclos: 2 min a 72°C; 2 min a 94°C; 34 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 56°C, 90s a 72°C y 10 min a 72°C. En este caso, uno de los dos cebadores, el específico para el adaptador SacI, estaba marcado. De esta manera la incorporación de marcaje se realizó a medida que tenía lugar la amplificación de ADN en la PCR. Se llevó a cabo la PCR por duplicado en paralelo de forma que en un caso el cebador contenía una molécula de fluorocromo Cy3 en el extremo 5' mientras que en el otro contenía el fluorocromo Cy5.

Hibridación sobre micromatriz.

Se combinaron 0.75 µg de ADN de la muestra marcada con Cy3 y 0.75 µg de ADN de la muestra marcada con Cy5 y se desnaturalizaron a 98°C durante 5 minutos antes de ser hibridadas. A esta mezcla de ADN se le añadió 100 µl de solución de hibridación 2x (Agilent, USA) y se hibridó sobre la micromatriz siguiendo las recomendaciones de la casa comercial Agilent Technologies, USA. Esta hibridación consistió en una incubación a 60°C durante toda una noche en un horno de hibridación y en lavados posteriores con soluciones 6 x SSC, 0.005% Triton (Agilent, USA) a temperatura ambiente, y 0,1 x SSC, 0.005% Triton (Agilent, USA) a 4°C con el fin de eliminar el exceso de transcritos no hibridados con los oligonucleótidos de la micromatriz. A continuación la micromatriz fue secada mediante una centrifugación a 2000 rpm durante 7 minutos y, finalmente, las señales de intensidad de cada oligonucleótido en la micromatriz fueron detectadas con el escáner Axon 4000B.

Los datos obtenidos a partir de la lectura de las intensidades de señal para cada uno de los fluoróforos se representaron gráficamente tal como se muestra en la figura 2. Se observa una distribución de las intensidades de señal a lo largo de la diagonal del gráfico, de forma similar a lo que se obtendría en un experimento de análisis de expresión diferencial, lo que indica que existe una variabilidad en el marcaje de las muestras.

Por otra parte, estos datos se procesaron para llevar a cabo un análisis cuantitativo. Se calculó el porcentaje relativo de dispersión de las señales, tanto para las sondas como para los controles incluidos en el experimento, como la relación entre la desviación estándar para cada grupo de valores y la media de dichos valores. También se calculó la relación entre el porcentaje relativo de dispersión de las señales de las sondas respecto al porcentaje relativo de dispersión de las señales de los controles. Este valor refleja el grado de dispersión de las sondas respecto a la dispersión de los controles. Asimismo, se calculó el promedio de la relación entre la intensidad de señal de cada punto respecto a la intensidad de su propio ruido de fondo. Los resultados se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2

	Canal Verde	Canal Rojo
Porcentaje relativo de dispersión de las señales de las sondas	120 %	122 %
Porcentaje relativo de dispersión de las señales de los controles	26 %	26 %
Relación dispersión sondas/dispersión controles	4,61	4,69
Promedio intensidad de señal respecto al ruido de fondo	77	70

Los resultados muestran que debido a la variabilidad en el marcaje de las muestras, las señales de las sondas muestran una dispersión de hasta casi 5 veces con relación a la dispersión que presentan los controles incluidos en el experimento.

- 5 Ejemplo 2: análisis de ADN genómico de levadura con marcaje mediante una etapa de transcripción in vitro.

#### Preparación del ADN

10 Se extrajo el ADN genómico a partir de una especie de levadura, *Saccharomyces cerevisiae*. Se precipitaron las células del cultivo de la levadura mediante centrifugación, se resuspendieron en 600 µl de solución de extracción de ADN (100 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA pH 8), se añadieron 40 µl de SDS 20%, se mezcló bien y se incubó 10 minutos a 65° C, se añadieron 200 µl de acetato de potasio frío y se incubó 15 minutos en hielo. Después se centrifugó a 4°C a 16000 rpm durante 15 minutos en microcentrifuga y se añadieron 600 µl de isopropanol a 400 µl de sobrenadante. El ADN se precipitó mediante centrifugación a 16000 rpm durante 15 min, el precipitado se lavó con 200 µl de etanol 70% y se dejó secar. Se disolvió el precipitado en 100 µl de TE.

#### Purificación del ADN

20 Se añadieron 2 µl de RNasa 10 mg/ml a la muestra, se incubó durante 15 minutos en el baño a 37°C. Se añadieron 100 µl de solución CTAB (2% peso/volumen CTAB= bromuro de hexadeciltrimetil amonio; 200 mM Tris; 50 mM EDTA pH 7.5, 2M NaCl), y después de una incubación de 15 minutos a 65°C, se añadieron 200 µl de CHCl<sub>3</sub>:alcohol isoamílico 24:1. Se centrifugó durante 5 minutos en la microcentrifuga a 15000 rpm y se precipitaron 200 µl del sobrenadante con 180 µl de isopropanol. Se centrifugó en la microcentrifuga a 15000 rpm durante 10 minutos, el precipitado se lavó con 100 µl de etanol al 70% y se dejó secar al aire. El precipitado se disolvió finalmente en 50 µl de agua.

#### Digestión de ADN y ligación de adaptadores

30 Se digirió el ADN genómico total (2 µg) con *SacI* (Fermentas, Lituania) y *MseI* (New England Biolabs, USA) en un tiempo de incubación de 3 horas a 37°C. A los fragmentos de ADN generados tras la digestión, se ligaron el adaptador *SacI* compatible con el extremo cohesivo del enzima *SacI* y el adaptador *MseI* compatible con el extremo cohesivo *MseI* mediante la T4 ADN ligasa (Fermentas, Lituania) en el tampón T4 ligasa buffer (Fermentas, Lituania) en un tiempo de incubación de 4 horas a temperatura ambiente.

#### 35 Amplificación de ADN

Se amplificaron los fragmentos *SacI*/*MseI* mediante PCR usando dos cebadores específicos basados en la secuencia de los adaptadores, a una concentración 200 nM cada uno, en una reacción con tampón 1 x Taq, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 nM de dNTP, 1 U de Taq polimerasa (Fermentas, Lituania), usando el siguiente programa de ciclos: 2 min a 72°C; 2 min a 94°C; 34 ciclos de 30s a 94° C, 30s a 56°C, 90s a 72°C y 10 min a 72°C.

#### Transcripción in vitro

45 Se utilizaron 2,5 µg de ADN amplificado por PCR para llevar a cabo la transcripción in vitro a ARN a partir de una secuencia promotora contenida en el adaptador *SacI* mediante la adición de 40 U de T7 ARN polimerasa (Ambion, USA) y 7,5 mM de rNTPs, e incubando las muestras a 37°C toda la noche. Esta reacción se llevó a cabo por duplicado en paralelo con Cy3-dUTP o bien Cy5-dUTP (Perkin-Elmer, USA) como nucleótidos marcados. Tras la transcripción, se eliminó el ADN mediante tratamiento con 2 U de DNasa I (Ambion, USA) a 37°C durante 30 minutos. Los productos marcados fueron purificados usando columnas MEGAclear™ (Ambion, USA).

#### 50 Hibridación sobre micromatriz

Se combinaron 0,75 µg de ARN de muestra marcada con Cy3 y 0.75 µg de ARN de muestra marcada con Cy5 para ser hibridadas sobre los oligonucleótidos de la micromatriz. A esta mezcla de ARN se le añadió 100 µl de solución de hibridación 2 x (Agilent, USA) y se cargó en el chip tal y como recomienda la casa comercial Agilent Technologies. La hibridación tuvo lugar a 60°C durante toda una noche en un horno de hibridación: Después se lavó la micromatriz con soluciones 6 x SSC, 0.005% Triton (Agilent, USA) a temperatura ambiente, y 0,1 x SSC, 0,005 % Triton (Agilent, USA) a 4°C para eliminar el exceso de transcritos no hibridados. Acto seguido el chip fue secado mediante una centrifugación a 2000 rpm durante 7 minutos y finalmente, las señales de intensidad de cada oligonucleótido en la micromatriz fueron detectadas con el escáner Axon 4000B.

Los datos obtenidos a partir de la lectura de las intensidades de señal para cada uno de los fluoróforos se representaron gráficamente tal como se muestra en la figura 3. Se observa que las intensidades de señal se

agrupan en la parte superior de la diagonal del gráfico, lo que indica que el marcaje es más homogéneo que el que se observaba en el ejemplo 1, donde las señales se distribuían a lo largo de la diagonal.

5 Por otra parte, los datos se procesaron para llevar a cabo un análisis cuantitativo tal como se describe en el ejemplo 1. Los resultados se recogen en la Tabla 3.

Tabla 3

	Canal Verde	Canal Rojo
Porcentaje relativo de dispersión de las señales de las sondas	27 %	22 %
Porcentaje relativo de dispersión de las señales de los controles	23 %	36 %
Relación dispersión sondas/dispersión controles	1,17	0,61
Promedio intensidad de señal respecto al ruido de fondo	698	671

10 Estos resultados indican que cuando se lleva a cabo una etapa de marcaje mediante transcripción in vitro según el método de la presente invención, las señales correspondientes a las sondas presentan una dispersión similar a la que presentan los controles del mismo experimento, a diferencia de lo que ocurre cuando no se realiza esta etapa, tal como se ha descrito en el experimento 1. Esta mejora en la dispersión de las señales permite que se puedan detectar más fácilmente aquellas muestras que puedan presentar alguna alteración a nivel genómico. Además, también se obtiene una mejor relación señal/ruido de fondo.

Ejemplo 3: análisis de ADN genómico de arroz con marcaje mediante una etapa de transcripción in vitro.

#### Preparación de ADN

20 Se extrajo el ADN genómico a partir del arroz, *Oryza sativa* sp. japonica Nipponbare. Se fragmentó el tejido de hoja de la planta congelado en nitrógeno líquido en un homogenizador Mixer Mill (Retsch GmbH, Alemania). El lisado resultante de la homogenización se resuspendió en 600 µl de solución de extracción de ADN (100 mM Tris-HCl; 50 mM EDTA pH 8), se añadieron 40 µl de SDS 20%, se mezcló bien y se incubó 10 minutos a 65°C, se añadieron 200 µl de acetato de potasio frío, y se volvió a incubar 15 minutos en hielo. Después se centrifugó a 4°C a 16000 rpm durante 15 minutos en microcentrifuga, se añadieron 600 µl de isopropanol a 400 µl de sobrenadante. El ADN se precipitó mediante centrifugación a 16000 rpm durante 15 minutos, el precipitado se lavó con 200 µl de etanol al 70% y se dejó secar. Se disolvió el precipitado en 100 µl de TE.

#### 30 Purificación del ADN

35 Se añadieron 2 µl de RNasa 10 mg/ml a la muestra y se incubó durante 15 minutos en el baño a 37°C. Se añadieron 100 µl de solución CTAB (2% peso/volumen CTAB= bromuro de hexadeciltrimetil amonio; 200 mM Tris; 50 mM EDTA pH 7.5, 2M NaCl), y después de una incubación de 15 minutos a 65°C se añadieron 200 µl de CHCl<sub>3</sub>:alcohol isoamílico 24:1. Se centrifugó 5 minutos en la microcentrifuga a 15000 rpm y se precipitaron 200 µl del sobrenadante con 180 µl de isopropanol. Se centrifugó en la microcentrifuga a 15000 rpm durante 10 minutos, el precipitado se lavó con 100 µl de etanol al 70% y se dejó secar al aire. El precipitado se disolvió finalmente en 50 µl de agua.

#### 40 Digestión de ADN y ligación de adaptadores

45 Se digirió el ADN genómico total (2 µg) con SacI (Fermentas, Lituania) y MseI (New England Biolabs, USA) en un tiempo de incubación de 3 horas a 37°C. A los fragmentos de ADN generados tras la digestión, se ligaron mediante la T4 ADN ligasa (Fermentas, Lituania) en el tampón T4 ligasa buffer (Fermentas, Lituania) en un tiempo de incubación de 4 horas a temperatura ambiente, el adaptador SacI compatible con el extremo cohesivo del enzima SacI y el adaptador MseI compatible con el extremo cohesivo MseI.

#### Amplificación de ADN

50 Se amplificaron los fragmentos SacI/MseI mediante PCR usando dos cebadores específicos basados en la secuencia de los adaptadores, a una concentración 200 nM cada uno, en una reacción con tampón 1 x Taq, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 nM de dNTP, 1 U de Taq polimerasa (Fermentas, Lituania), usando el siguiente programa de ciclos: 2 min a 72°C; 2 min a 94°C; 34 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 56°C, 90s a 72°C y 10 min a 72°C.

Transcripción in vitro

Se utilizaron 2,5 µg de ADN amplificado por PCR para llevar a cabo la transcripción in vitro a ARN a partir de una secuencia promotora contenida en el adaptador Sacl mediante la adición de 40 U de T7 ARN polimerasa (Ambion, USA) y 7,5 mM de rNTPs, e incubando las muestras a 37°C toda la noche. Esta reacción se llevó a cabo por duplicado en paralelo con Cy3-dUTP o bien Cy5-dUTP (Perkin-Elmer, USA) como nucleótidos marcados. Tras la transcripción, se eliminó el ADN mediante tratamiento con 2 U de DNasa I (Ambion, USA) a 37°C durante 30 minutos. Los productos marcados fueron purificados usando columnas MEGAclean™ (Ambion, USA).

Hibridación sobre micromatriz

Se combinaron 0,75 µg de ARN de muestra marcada con Cy3 y 0.75 µg de ARN de muestra marcada con Cy5 para ser hibridadas sobre los oligonucleótidos de la micromatriz. A esta mezcla de ARN se le añadió 100 µl de solución de hibridación 2 x (Agilent, USA) y se cargó en el chip tal y como recomienda la casa comercial Agilent Technologies. La hibridación tuvo lugar a 60°C durante toda una noche en un horno de hibridación: Después se lavó la micromatriz con soluciones 6 x SSC, 0.005% Triton (Agilent, USA) a temperatura ambiente, y 0,1 x SSC, 0,005 % Triton (Agilent, USA) a 4°C para eliminar el exceso de transcritos no hibridados. Acto seguido el chip fue secado mediante una centrifugación a 2000 rpm durante 7 minutos y finalmente, las señales de intensidad de cada oligonucleótido en la micromatriz fueron detectadas con el escáner Axon 4000B.

Los datos obtenidos a partir de la lectura de las intensidades de señal para cada uno de los fluoróforos se representaron gráficamente tal como se muestra en la figura 4A. Tal como se observaba en el ejemplo 2, las señales también se agrupaban en la parte superior de la diagonal del gráfico, indicando la poca dispersión de las mismas. Por otra parte, la figura 4B muestra el histograma de la distribución de las intensidades de señal del canal verde (correspondiente al marcaje con Cy3) en el que puede observarse una distribución normal, con una mayoría de puntos que se encuentran en una posición central del rango de intensidades (alrededor de 18000-19000 unidades de intensidad) y el resto que se encuentran simétricamente repartidos por arriba y por debajo de esta posición central.

En este caso, los datos también se procesaron para llevar a cabo un análisis cuantitativo tal como se describe en el ejemplo 1. Los resultados se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4

	Canal Verde	Canal Rojo
Porcentaje relativo de dispersión de las señales de las sondas	15 %	13 %
Porcentaje relativo de dispersión de las señales de los controles	15 %	18 %
Relación dispersión sondas/dispersión controles	1,00	0,72
Promedio intensidad de señal respecto al ruido de fondo	550	352

En este caso se utilizaron como controles internos los oligonucleótidos ORY\_C1\_X80, ORY\_C2\_X70, ORY\_C3\_Z80 y ORY\_C4\_Z70 repetidos 223 veces sobre la superficie de la micromatriz.

Estos resultados confirman que cuando se analiza un genoma como el del arroz, mucho más complejo que el de la levadura analizado en el ejemplo 2, se obtienen mejores resultados aplicando el método de la presente invención que cuando se lleva a cabo un método de marcaje que no incluya una etapa de marcaje mediante transcripción in vitro.

**REIVINDICACIONES**

1. Método de análisis de ácidos nucleicos para el estudio de variaciones en el genoma, que comprende las etapas:
- 5 a) fragmentación de una muestra de ADN genómico,
- b) ligación, en los extremos de los fragmentos de ADN obtenidos, de adaptadores específicos compatibles con los extremos generados donde al menos uno de los adaptadores ligados contiene una secuencia promotora funcional,
- 10 c) amplificación de los fragmentos obtenidos utilizando cebadores específicos basados en los adaptadores,
- d) transcripción in vitro de los fragmentos de ADN amplificados con una ARN polimerasa capaz de iniciar la transcripción a partir de la secuencia promotora contenida en los adaptadores utilizando una mezcla de nucleótidos (rNTPs),
- 15 e) hibridación con los oligonucleótidos de la micromatriz de ADN y detección de los fragmentos hibridados mediante la detección de un marcaje incorporado durante la etapa d) en los fragmentos a analizar mediante la incorporación de análogos de nucleótidos que contienen marcajes detectables directamente, análogos de nucleótidos que incorporan marcajes que pueden ser visualizados indirectamente en una reacción posterior, o cualquier otro tipo de marcaje de ácidos nucleicos directo o indirecto, y
- 20 f) comparación cuantitativa de las señales de diferentes muestras analizadas.
2. Método según la reivindicación 1, en el cual la muestra de ADN analizada es una muestra de ADN genómico aislada a partir de cualquier organismo en el que se desee estudiar la presencia de variaciones en el genoma.
- 25 3. Método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el cual la fragmentación de una muestra de ADN genómico se lleva a cabo por métodos químicos, métodos físicos o métodos enzimáticos.
- 30 4. Método según la reivindicación 3, en el cual la fragmentación de una muestra de ADN genómico se realiza mediante digestión con al menos un enzima de restricción, preferentemente mediante digestión con dos enzimas de restricción.
- 35 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual las micromatrices de ADN sobre las que se lleva a cabo la hibridación y detección están constituidas por una colección de múltiples oligonucleótidos inmovilizados sobre un sustrato sólido, donde cada oligonucleótido está inmovilizado en una posición conocida de forma que la hibridación con cada uno de los múltiples oligonucleótidos se puede detectar por separado, donde el sustrato puede ser compacto o poroso, plano o no plano, unitario o distribuido, y donde las micromatrices de ADN pueden ser elaboradas con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo o con oligonucleótidos sintetizados in situ
- 40 mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo.
6. Método de análisis de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual dichos análogos de nucleótidos contienen fluóforos como marcajes detectables directamente, o biotina o haptenos como marcajes que pueden ser visualizados indirectamente en una reacción posterior.
- 45 7. Método según la reivindicación 6, donde dicho análogo de nucleótido que contiene el marcaje es Cy3-UTP, Cy5-UTP o fluoresceína-UTP para el marcaje directo o biotina-UTP para el marcaje indirecto.
- 50 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual dicha detección de los fragmentos hibridados se lleva a cabo a partir de la cuantificación directa de la cantidad de muestra hibridada sobre las sondas de ADN contenidas en la micromatriz de ADN, donde dicha cuantificación directa se puede llevar a cabo mediante técnicas que incluyen, pero no se limitan a, microscopía de fuerza atómica (AFM), microscopía de efecto tunel (STM) o microscopía electrónica de barrido (SEM); métodos electroquímicos, como medida de impedancia, voltaje o amperaje, o métodos ópticos, como microscopía confocal y no confocal, microscopía de infrarrojos, detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia o transmitancia.
- 55 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el cual dicha ARN polimerasa que se utiliza en la etapa de transcripción in vitro se elige del grupo que incluye, pero no se limita a, T7 ARN polimerasa, T3 ARN polimerasa y SP6 ARN polimerasa.
- 60 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual se cumple el requisito de que la relación entre la dispersión relativa de las intensidades de señal de las sondas de la muestra respecto a la dispersión relativa de

las intensidades de señal de los controles es menor que 4, preferentemente menor que 3, más preferentemente menor que 2, aún más preferentemente menor que 1,5.

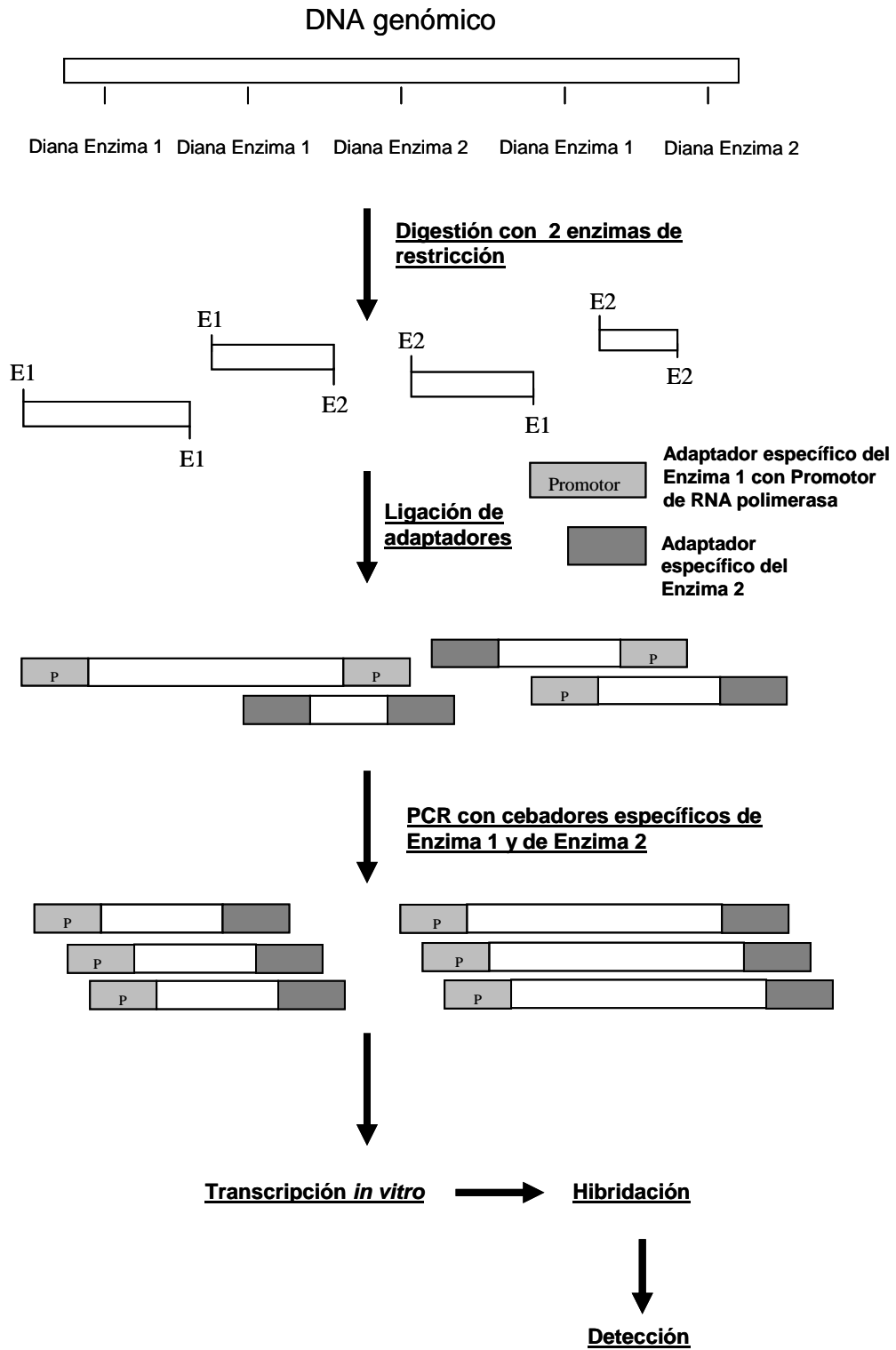
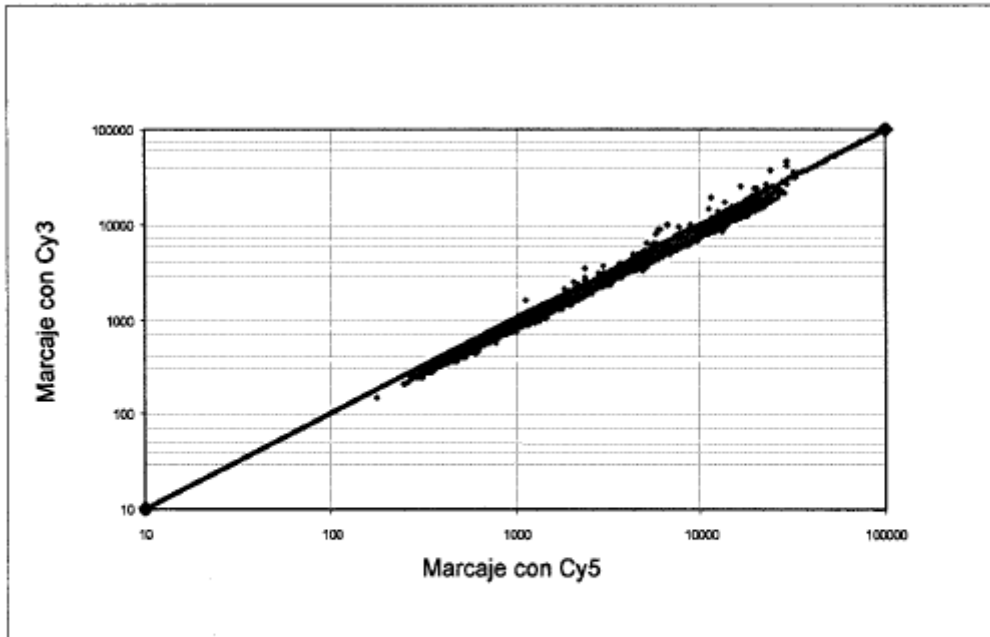
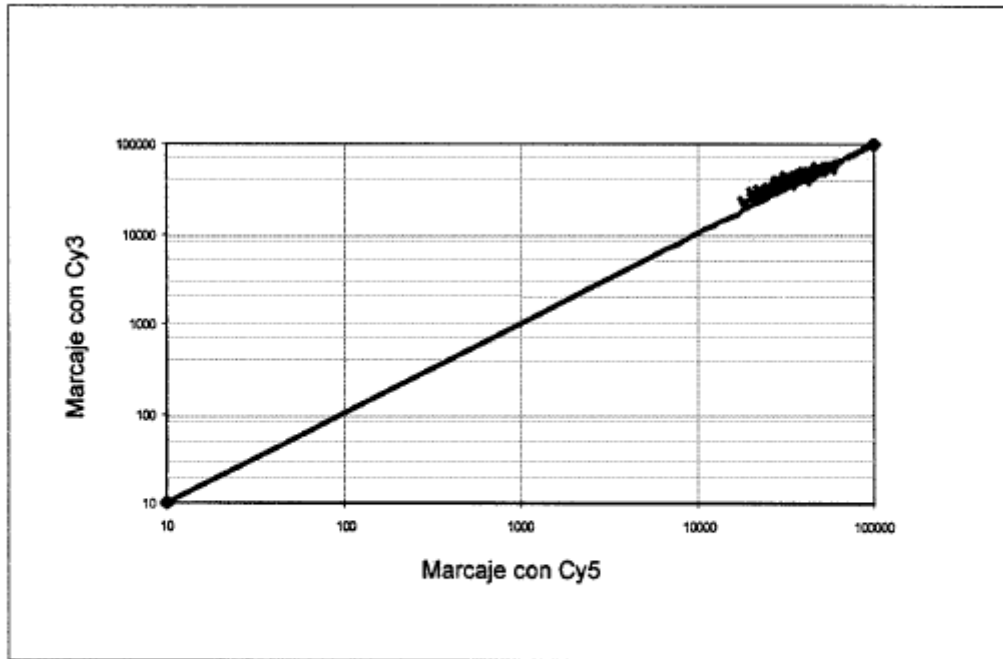


Fig. 1

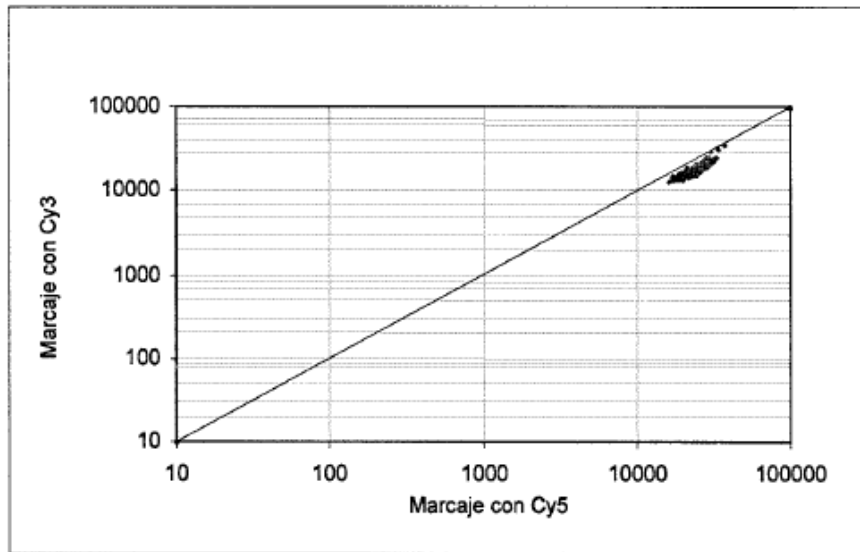


**Fig. 2**

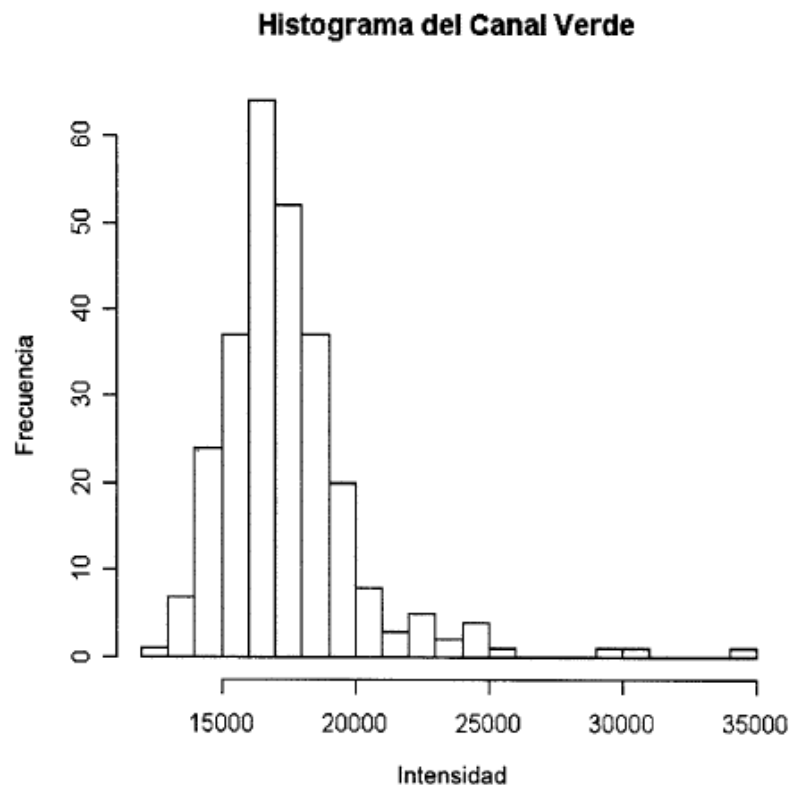


**Fig. 3**

**A**

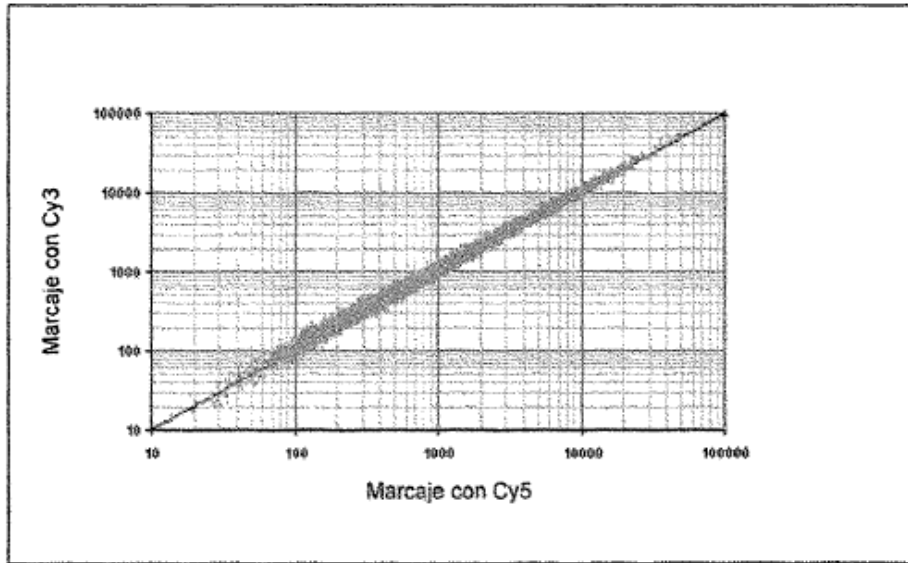


**B**



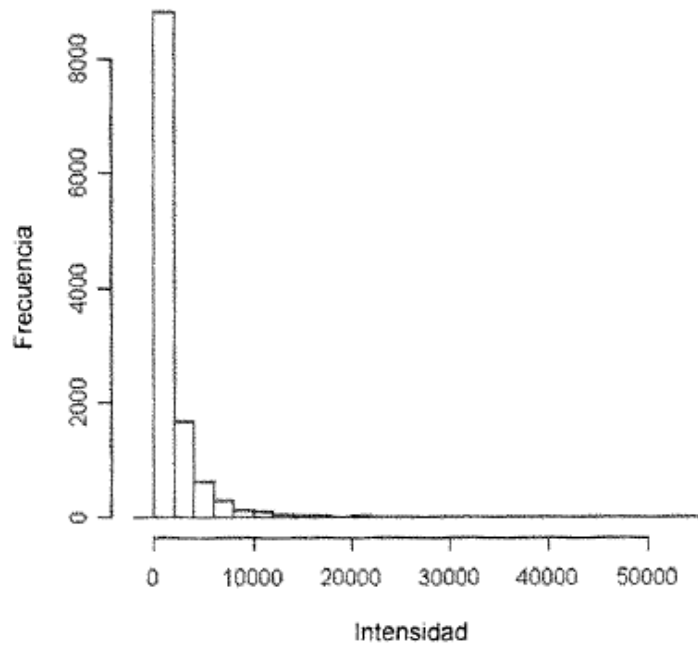
**Fig. 4**

**A**



**B**

**Histograma del Canal Verde**



**Fig. 5**

## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

5

## Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 0028081 A [0010]
- WO 03016483 A [0011]

10

## Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **Borevitz et al.** Large-scale identification of single-feature polymorphisms in complex genomes. *Genome Research*, 2003, vol. 13, 513-523 [0008]
- **Winzeler et al.** Direct allelic variation scanning of the yeast genome. *Science*, 1998, vol. 281, 1194-97 [0008]
- **Pollack et al.** Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nature Genetics*, 1999, vol. 23, 41-46 [0008]
- **Maitra et al.** Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature Genetics*, 2005, vol. 37 (10), 1099-1103 [0008]
- **Lieu et al.** Development of a DNA-labeling system for array based comparative genomic hybridization. *J. Biom. Tech.*, 2005, vol. 16, 104-111 [0012]
- **Barrett MT et al.** Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 21 December 2004, vol. 101 (51), 17765-70 [0014]