

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 331**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/686** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.02.2019 PCT/GB2019/050512**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2019 WO19162699**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.02.2019 E 19708648 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3759253**

54 Título: **Métodos para detectar polinucleótidos objetivo**

30 Prioridad:  
**26.02.2018 GB 201803019**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.10.2024**

73 Titular/es:  
**NUNABIO LIMITED (100.0%)  
Times Central, 32 Gallowgate  
Newcastle upon Tyne NE1 4BF, GB**

72 Inventor/es:  
**PIKE, ANDREW;  
TUIE, EIMER;  
HEDLEY, JOSEPH;  
WHITFIELD, COLETTE;  
LUNN, SAMANTHA;  
LITTLE, RACHEL;  
BAHRA, MANTEJ;  
IJIRO, KUNIHARU y  
MITOMO, HIDEYUKI**

74 Agente/Representante:  
**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

ES 2 981 331 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

Métodos para detectar polinucleótidos objetivo

- 5 La presente invención proporciona un método de termociclado para aumentar el número de repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud en un polinucleótido lineal.

Antecedentes

- 10 Los métodos para determinar la presencia de una secuencia de un polinucleótido objetivo en una muestra de prueba se usan de forma rutinaria en la investigación básica, así como también tienen una utilidad significativa en el diagnóstico y la terapéutica. También pueden usarse bibliotecas de polinucleótidos de secuencia definida como identificadores (códigos de barras de ADN) en aplicaciones de seguridad.

- 15 La presencia o ausencia de secuencias de polinucleótidos objetivo (por ejemplo, ADN o ARN) en una muestra de prueba puede determinarse fácilmente mediante el uso de varios métodos conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de dichos métodos incluyen hibridación *in situ*, análisis por micromatrices, PCR y secuenciación de próxima generación. Dichos métodos han demostrado ser útiles, por ejemplo, para identificar o monitorear biomarcadores de enfermedades u objetivos para la terapia.

- 20 La hibridación *in situ* (ISH) se basa en el emparejamiento complementario de sondas de ADN o ARN marcadas con secuencias de polinucleótidos normales o anómalas en cromosomas, células o secciones de tejido intactas. En comparación con otras técnicas de biología molecular aplicables a la patología anatómica, la ISH disfruta de una mejor conexión con los histopatólogos debido a su similitud con la inmunohistoquímica. Tiene la ventaja única sobre otras técnicas de biología molecular, basadas en gran medida en la hibridación de sondas con polinucleótidos extraídos de muestras de tejido homogeneizadas, de permitir la localización y visualización de secuencias de polinucleótidos objetivo dentro de células o estructuras celulares morfológicamente identificables.

- 25 Las matrices de polinucleótidos, o más simplemente, las matrices de ADN, son un grupo de tecnologías en las que secuencias de ADN específicas se depositan o sintetizan en una matriz 2-D (o a veces 3-D) sobre una superficie de manera que el ADN se une covalentemente o no covalentemente a la superficie. En el uso típico, se usa una matriz de ADN para sondear una solución de una mezcla de polinucleótidos marcados y la unión (por hibridación) de estos "objetivos" a las "sondas" en la matriz se usa para medir las concentraciones relativas de las especies de polinucleótidos en solución. Al generalizar a un número muy grande de puntos de ADN, puede usarse una matriz para cuantificar un número arbitrariamente grande de secuencias de polinucleótidos diferentes en solución. Una estrategia de marcaje alternativa es marcar la especie hibridada una vez formada. Dos ventajas de esta técnica son que la sonda objetivo no requiere marcaje y que no se genera ninguna señal en ausencia del objetivo. Una desventaja es que por sonda unida a la superficie sólo hay un evento de hibridación y, por tanto, un evento de señalización lo que limita en general la sensibilidad de la técnica.

- 30 El método más común de análisis del ADN o ARN de un estado patológico es el uso de ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una muestra biológica contendrá ADN, pero generalmente en niveles de concentración tan bajos que es difícil de detectar. La PCR se usa para amplificar el ADN o una región más específica del ADN que alberga la secuencia de interés. Los productos de la PCR se someten a análisis mediante varios métodos diferentes, que pueden incluir electroforesis para separar los fragmentos a través de un gel de agarosa, basado en el tamaño, donde las bandas de los fragmentos se visualizan mediante tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta. Alternativamente, la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR en tiempo real), también conocida como reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), monitorea la amplificación de una molécula de ADN objetivo durante la PCR, es decir, en tiempo real, y no al final, como en la PCR convencional.

- 35 La secuenciación de Sanger, también conocida como método de terminación de la cadena, es una técnica de secuenciación de ADN basada en la incorporación selectiva de didesoxinucleótidos terminadores de cadena (ddNTP) no naturales por la ADN polimerasa durante la replicación *in vitro* del ADN. La NGS es una secuenciación de Sanger pero llevada a cabo en paralelo para varias muestras simultáneamente.

- 40 ISH, PCR y NGS son técnicas poderosas para dilucidar la función del ADN y el ARN y, como tales, son excelentes herramientas de diagnóstico. Sin embargo, estas técnicas requieren una preparación detallada de las muestras, procesos de varias etapas e instrumentación especializada. Por el contrario, las micromatrices ofrecen un enfoque más simplificado para la identificación de ADN/ARN indicativo de estados patológicos y, como tales, son excelentes herramientas de diagnóstico "en el punto de atención" para dar resultados rápidos e informar sobre la decisión de terapia para el paciente. Sin embargo, las micromatrices tienen típicamente niveles limitados de sensibilidad, ya que típicamente sólo hay un evento de hibridación por sonda unida a la superficie, lo que da como resultado un evento de señalización por reacción de hibridación.

- 45 Whitfield C.J y otros, 2015, describe un método enzimático para la síntesis de secuencias largas de ADN con varias unidades repetidas, en donde el método está en solución. Hemat y McEntee, 1994, describen un método similar

basado en PCR para sintetizar multímeros de oligonucleótidos de alto peso molecular. Dicho método se realiza en solución. Adessi C y otros, 2000, describe un método de amplificación del ADN en fase sólida. Existe la necesidad de métodos mejorados para determinar la presencia de secuencias de polinucleótidos objetivo en una muestra de prueba.

5 Breve resumen de la descripción

Los inventores han desarrollado un nuevo método para la extensión enzimática de una secuencia de un polinucleótido inmovilizado que comprende una repetición en tándem. El método puede usarse para generar sustratos sólidos tales como micromatrices con una o más secuencias de polinucleótidos inmovilizados, en donde cada secuencia de un polinucleótido inmovilizado comprende una pluralidad de repeticiones en tándem. Ventajosamente, estos sustratos sólidos pueden usarse para detectar la presencia de una secuencia de un polinucleótido objetivo que es complementaria a la secuencia repetida con un mayor nivel de sensibilidad que otros sustratos conocidos en la técnica, ya que cada polinucleótido inmovilizado (también descrito en la presente descripción como un "polinucleótido sonda" unido a la superficie) proporciona varios sitios de unión para la secuencia objetivo.

La invención elimina un problema fundamental encontrado en los sistemas de detección basados en hibridación del ADN de la relación ruido/señal, ya que la señal depende de la cobertura de la superficie, lo que ya no es un factor limitante en esta invención. En otras palabras, supera los problemas de sensibilidad de la técnica anterior ya que mejora la detección de la señal sobre el ruido de fondo. Ventajosamente, esto puede aumentar la precisión de la detección y/o puede permitir el uso de detectores menos sensibles (por ejemplo, más baratos) en el método de detección debido a una adquisición de datos potenciada.

La invención tiene una amplia aplicación, y puede encontrar utilidad en varias tecnologías diferentes de detección de polinucleótidos objetivo. Por ejemplo, la invención puede usarse en el contexto de la detección de errores de emparejamiento de una sola base, detección de SNP, tecnología de secuenciación de genes y diagnóstico médico (por ejemplo, diagnóstico rápido de cánceres colorrectales tales como el síndrome de Lynch mediante el uso de una sonda de ADN para secuencias con repeticiones de BAT25). También puede usarse en el contexto del diagnóstico molecular, por ejemplo, detección de biomarcadores, respuesta a la terapia, estratificación de enfermedades y aplicaciones en puntos de atención.

La presente invención se define mediante las reivindicaciones anexas.

A través de toda la descripción y reivindicaciones de esta descripción, las palabras "comprender" y "contiene" y las variaciones de las palabras significa "que incluyen pero sin limitarse a", y no se pretende excluir (y no se excluyen) otras porciones, aditivos componentes, enteros o etapas.

A través de toda la descripción y las reivindicaciones de esta descripción, el singular abarca el plural, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, se entiende que la descripción contempla la pluralidad, así como también los singulares, a menos que el contexto lo requiera de cualquier otra manera.

Los rasgos, enteros, características, compuestos, porciones químicas o grupos descritos en conjunto con un aspecto particular, modalidad o ejemplo de la invención se entiende que son aplicables a cualquier otro aspecto, modalidad o ejemplo descrito en la presente descripción a menos que sea incompatible con éste.

Además, como se usa en la presente, los términos singulares "un", "uno/una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera. A menos que se indique de cualquier otra manera, los polinucleótidos se escriben de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxi, respectivamente.

Diversos aspectos de la invención se describen con más detalle más abajo.

Breve descripción de las figuras

Las modalidades de la invención se describen con más detalle de aquí en adelante con referencia a las figuras acompañantes, en las cuales:

La Figura 1 proporciona una descripción general esquemática que ilustra las etapas de funcionalización de la superficie involucradas para producir ADN de varias secuencias repetidas mediante una reacción basada en PCR confinada en la superficie. i) inmovilización del enlazador bifuncional, ii) unión de la oligosemilla modificada con amino en 5', iii) hibridación del complemento de la oligosemilla, iv) extensión basada en PCR del ADNbc inmovilizado para producir cepillos de ADN largo. Para aplicaciones de detección, la superficie del ADNext debe desnaturalizarse para proporcionar un ADN largo monocatenario repetitivo con varias secuencias objetivo.

La Figura 2 muestra: A) una oblea de silicio funcionalizada con oligosemilla cortada para ajustarla a un tubo eppendorf de PCR estándar; y B) un esquema del mecanismo de extensión enzimática de la oligosemilla inmovilizada en la superficie.

5 La Figura 3 proporciona una imagen de fluorescencia de la superficie con Picogreen aplicado a) ADNbc y b) ADNext. c) El gráfico de barras resalta la diferencia en la intensidad de fluorescencia entre las dos superficies. d) La imagen de fluorescencia de una superficie de ADN con patrón en la que el ADNbc extendido está confinado a las islas circulares. Los datos anteriores se refieren a la formación de una secuencia [GATC]<sub>n</sub> en una superficie de vidrio/enlazador siloxano/amida en a), b) y c) y una secuencia de [G:C]<sub>n</sub> con patrón creado por fotolitografía en una superficie vidrio/enlazador siloxano/estreptavidina-biotina.

10 La Figura 4 proporciona A) una imagen de AFM del ADNmc retirado de la superficie de vidrio mediante deshibridación del [GATC] extendido a 90 °C en agua. La muestra de ADN se peinó sobre un sustrato de mica recién escindida y se tomaron imágenes en modo de golpeo; y B) un perfil de altura de una única hebra de ADN que confirma las dimensiones esperadas para el ADNbc.

15 La Figura 5 muestra el cambio en la forma del gen provocado por la eliminación del aminoácido fenilalanina durante la mutación de CFTR<sup>14</sup>.

20 La Figura 6 muestra la extensión por ciclos de calor-enfriamiento con Tgo-Pol Z3 exo- y [GCATCTTTTCG (SEQ ID NO: 1)]<sub>2</sub>/[CGTAGAAAGC (SEQ ID NO:2)]<sub>2</sub> durante 20 ciclos; A) un gel de agarosa: producto de extensión del carril 1 después de 20 ciclos; B) un gráfico UV-Vis; y C) análisis mediante Image J del producto de extensión, que muestra la intensidad de la banda como porcentaje de la intensidad más alta en comparación con la escalera, L = escalera de ADN.

25 La Figura 7 muestra A) un gráfico de barras de la intensidad de fluorescencia que resalta la diferencia entre una superficie modificada con oligómeros cortos en comparación con un ADNext largo para la secuencia CFTR; y B) imágenes de fluorescencia de cada una de las diferentes superficies.

30 La Figura 8 muestra la extensión por ciclos de calor-enfriamiento con Tgo-Pol Z3 exo- y [GAAAAAAAAAAC (SEQ ID NO: 3)]<sub>2</sub>/[CTTTTTTTTTTG (SEQ ID NO: 4)]<sub>2</sub> durante 20 ciclos; A) un gel de agarosa: producto de extensión del carril 1 después de 20 ciclos; B) un gráfico UV-Vis; C) análisis mediante Image J del producto de extensión, que muestra la intensidad de la banda como porcentaje de la intensidad más alta en comparación con la escalera, L = escalera de ADN; y D) resultados de la secuenciación de Sanger de la secuencia de ADN.

35 La Figura 9 muestra una imagen de AFM de ADN extendido en solución y la altura y longitud promedio de las hebras de ADN que confirman las dimensiones esperadas para el ADNbc.

40 La Figura 10 muestra A) un gráfico de barras de la intensidad de fluorescencia que destaca la diferencia entre una superficie modificada con oligosemillas cortas en comparación con ADNext largo para la secuencia BAT25; y B) imágenes de fluorescencia de cada una de las diferentes superficies.

45 La Figura 11 muestra una imagen de AFM de ADNext monocatenario largo deshibridado de la superficie para la secuencia BAT25 y la altura y longitud promedio de una única hebra de ADN que confirma las dimensiones esperadas para el ADNmc.

50 La Figura 12 muestra A) una comparación de la longitud en gel de agarosa para 1) GATC, 2) CFTR y 3) BAT25; y B) una comparación de las intensidades de fluorescencia para las superficies modificadas con cada secuencia que resalta la diferencia entre la oligosemilla corta y el ADNext.

La Figura 13 muestra una comparación de la intensidad de fluorescencia de superficies teñidas con DAPI y con PG.

55 La Figura 14 muestra A) la intensidad de fluorescencia de ADNext y PG en tampón TE y H<sub>2</sub>O; B) la imagen de fluorescencia del ADNext en solución de PG/TE; y C) la imagen de fluorescencia del ADNext en solución PG/H<sub>2</sub>O.

La Figura 15 muestra la intensidad de fluorescencia para diversos tiempos de unión de PG.

60 La Figura 16 muestra la intensidad de fluorescencia del ADNext cultivado en superficies de dióxido de silicio.

La Figura 17 muestra el cambio en el ángulo de contacto cuando se extiende la secuencia BAT25 sobre una superficie de vidrio. Para la secuencia BAT25, ver la Tabla 3.

65 La Figura 18 muestra el cambio en la fluorescencia de la superficie de BAT25 extendida con objetivos con diferentes números de errores de emparejamiento, lo que demuestra la sensibilidad del método para detectar una pequeña

cantidad de errores de emparejamiento en una secuencia VNTR. Para ver secuencias con errores de emparejamiento que se rehibridarán con la sonda de BAT25, ver la Tabla 5.

#### Descripción detallada

5 Los inventores han identificado un método para extender de manera enzimática secuencias repetidas de oligonucleótidos (oligosemillas) que se inmovilizan en una superficie. Los inventores han demostrado sorprendentemente que una oligosemilla inmovilizada puede extenderse mediante el uso de PCR con un ciclo típico de calor-enfriamiento, cuando la oligosemilla se inmoviliza en un soporte sólido. El método da como resultado cepillos de ADN largo directamente inmovilizados sobre una superficie mediante una molécula enlazadora (ver la Figura 1 para obtener una descripción general). La subsecuente desnaturalización a ADN<sub>mc</sub> y la rehibridación con el ADN complementario objetivo da como resultado una mayor intensidad de fluorescencia en comparación con el ADN<sub>bc</sub> corto en la superficie. La extensión aumenta el número de sitios de unión al objetivo por molécula de sonda, lo que aumenta por tanto la detección del objetivo.

15 Los inventores han demostrado que el método es extremadamente versátil, ya que la superficie, el enlazador y la secuencia de ADN pueden modificarse para el uso deseado. Como se demuestra en la sección de ejemplos en la presente descripción, el método se ha usado con éxito para extender tres oligosemillas diferentes, con el empleo de dos enlazadores diferentes, y dos sustratos de soporte sólido diferentes. Los datos presentados en la presente descripción demuestran claramente el aumento de la señal de fluorescencia en la muestra de ADN<sub>bc</sub> extendido en comparación con las hebras de ADN<sub>bc</sub> más cortas. Además, ilustra claramente que la metodología descrita es adecuada para la integración en dispositivos tanto ópticos (vidrio) como electrónicos (silicio).

#### Métodos de termociclado

25 Los inventores han identificado ahora un método en donde puede generarse un polinucleótido lineal inmovilizado que comprende repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene hasta 60 nucleótidos de longitud mediante el uso de métodos de termociclado. Este descubrimiento ha proporcionado nuevos métodos para generar sondas de polinucleótidos inmovilizados que tienen varios sitios de unión para una secuencia de un polinucleótido objetivo y, por tanto, tiene un gran potencial para mejorar la sensibilidad de dichos métodos, por ejemplo, en un formato de matriz.

"Método de termociclado" se refiere a un método con un número de ciclos repetidos, en donde cada ciclo incluye un cambio de temperatura desde una primera temperatura a una segunda (o más) temperatura. Ejemplos bien conocidos de métodos de termociclado incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

35 Como se usa en la presente, "secuencia de ácido nucleico", "oligonucleótido", "polinucleótido", "molécula de ácido nucleico" y variaciones de estos se usan indistintamente para referirse a una pluralidad de nucleótidos en una secuencia regular o irregular. Los polinucleótidos son típicamente monocatenarios o bicatenarios (dúplex), pero pueden adoptar estructuras de orden superior que contienen tres (triple) o cuatro (cuádruple/motivo-i) hebras, o pueden contener una mezcla de estas configuraciones en diferentes loci bajo condiciones adecuadas. Los polinucleótidos pueden ser cortos o largos. Estos tienen al menos dos nucleótidos adyacentes.

45 La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, sintético o recombinante, y puede ser bicatenaria o monocatenaria (que representa la hebra sentido o antisentido). El término "secuencia de nucleótidos" incluye ADN genómico, ADN<sub>c</sub>, ADN sintético, y ARN (por ejemplo, ARN<sub>m</sub>) y análogos del ADN o ARN generados, por ejemplo, mediante el uso de análogos de nucleótidos. En otras palabras, también se abarcan bases de ADN o ARN modificadas. Por lo tanto, el polinucleótido puede incluir una o una pluralidad de bases de ADN o ARN modificadas. Los polinucleótidos que portan varias modificaciones en sitios específicos tienen aplicaciones en biología sintética, fabricación de nanomateriales, bioanalítica y aplicaciones de secuenciación. Por ejemplo, el ADN puede modificarse químicamente en cualquiera o en todas sus tres partes componentes: el enlace fosfato, el anillo de azúcar o la nucleobase. Puede obtenerse comercialmente una variedad de nucleótidos modificados como desoxinucleótido trifosfatos (dNTP) o como derivados de fosforamidita. Estos y otros nucleótidos modificados pueden sintetizarse e insertarse en ADN o ARN ya sea enzimáticamente como dNTP o a través de la síntesis automatizada de ADN como fosforamiditas.

55 Los residuos de nucleótidos se derivan generalmente de bases purínicas naturales, específicamente, adenina (A), guanina (G), hipoxantina (I) y xantina (X), y bases pirimidínicas, específicamente, citosina (C), timina (T) y uracilo (U). Pueden usarse análogos de nucleótidos en una o más de las posiciones dentro de la secuencia del polinucleótido, modificándose dichos análogos de nucleótidos, por ejemplo, en la porción de base y/o la porción de azúcar y/o el enlace fosfato. Puede usarse cualquier análogo de nucleótido siempre y cuando no impida que el polinucleótido se hibride y que sea aceptado por la polimerasa como plantilla y como sustrato.

65 Las secuencias de ácidos nucleicos presentadas en la presente descripción se escriben convencionalmente de 5' a 3' (de izquierda a derecha). Un "polinucleótido lineal" se refiere a un polinucleótido que no está ramificado ni circularizado (es decir, el extremo 3' no está circularizado con el extremo 5').

En un ejemplo, el polinucleótido es ADN. En otro ejemplo, el polinucleótido es ARN. El ADN o ARN puede comprender bases naturales o modificadas, lo que incluye una combinación de estas. Se conocen en la técnica varias bases modificadas y, por lo tanto, un experto en la técnica puede identificar fácilmente bases modificadas adecuadas.

5 Se proporciona un método de termociclado que aumenta el número de repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud en un polinucleótido lineal.

Al inicio del método de termociclado, el polinucleótido cebador lineal comprende al menos dos copias de una secuencia unitaria. La secuencia unitaria tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud. El polipéptido lineal puede comprender dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, etc., de la misma secuencia unitaria (es decir, el polipéptido lineal puede comprender varias repeticiones de la misma secuencia unitaria). Puede comprender al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95 o al menos 100 copias de la secuencia unitaria. Las secuencias unitarias repetidas pueden estar en tándem (es decir, pueden denominarse "repeticiones en tándem"). Las repeticiones en tándem se producen en secuencias de polinucleótidos cuando se repite un patrón de nucleótidos (en este caso una secuencia unitaria) y las repeticiones están directamente adyacentes entre sí. Por medio de un ejemplo, si la secuencia unitaria es ATTCG, un polinucleótido que comprende dos repeticiones en tándem de la secuencia unitaria comprendería la secuencia ATTCGATTCG (SEQ ID NO: 5), un polinucleótido que comprende tres repeticiones en tándem de la secuencia unitaria comprendería la secuencia ATTCGATTCGATTCG (SEQ ID NO: 6), un polinucleótido que comprende cuatro repeticiones en tándem de la secuencia unitaria comprendería la secuencia ATTCGATTCGATTCGATTCG (SEQ ID NO: 7), etc. El número de repeticiones en tándem también puede denominarse como el "número de copias" de la secuencia unitaria.

25 La secuencia unitaria puede tener cualquier permutación de bases. Ejemplos no limitantes de secuencias unitarias comunes que pueden repetirse en tándem en el polinucleótido lineal incluyen: (AT)<sub>n</sub>, (GC)<sub>n</sub>, (GGC)<sub>n</sub>, (CAG)<sub>n</sub>, (GCAT)<sub>n</sub>, (GATC)<sub>n</sub>, (AAAAG)<sub>n</sub>, (AAAAAAAAG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 8), (ACTGATCAGC)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 9), donde (xxxx) se refiere a la secuencia unitaria, y n se refiere al número de repeticiones en tándem (es decir, n = el número de copias de la secuencia unitaria).

30 La secuencia unitaria tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud. La secuencia unitaria puede por lo tanto comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 o al menos 59 nucleótidos (el límite superior para cada caso 60 nucleótidos).

35 En un ejemplo, la secuencia unitaria es una secuencia microsatélite que tiene de 2 a 9 nucleótidos. Alternativamente, la secuencia unitaria puede ser una secuencia minisatélite que tiene de 10 a 60 nucleótidos.

40 El método aumenta el número de repeticiones en tándem de la secuencia unitaria en el polinucleótido. En otras palabras, si el polinucleótido de partida (es decir, el polinucleótido cebador inmovilizado inicial) tuviera dos secuencias unitarias (de ATTCG) en tándem (es decir, ATTCGATTCG (SEQ ID NO: 5)), el método aumentaría esto a al menos tres en tándem (es decir, ATTCGATTCGATTCG (SEQ ID NO:6)). De manera similar, si el polinucleótido de partida tuviera tres repeticiones en tándem de la secuencia unitaria (es decir, ATTCGATTCGATTCG (SEQ ID NO:6)), el método aumentaría esto a al menos cuatro repeticiones en tándem (es decir, ATTCGATTCGATTCGATTCG (SEQ ID NO:7)), etc.

45 Las repeticiones en tándem se producen naturalmente en el ADN genómico. Se denominan "minisatélites" las repeticiones de una secuencia unitaria que tienen 10-60 nucleótidos de longitud; y "microsatélites", o "repeticiones cortas en tándem (STR)", las repeticiones de una secuencia unitaria que tienen 2-9 nucleótidos de longitud. El número de repeticiones en tándem se denomina número de copias. Una repetición en tándem de número variable (VNTR) es una repetición en tándem que varía en el número de copias entre los individuos. El análisis de VNTR en la toma de huellas dactilares de ADN es invaluable en la investigación forense moderna y en la comparación de identidades, así como también en la tipificación de especies de patógenos, hongos y plantas. Las anomalías en las repeticiones de trinucleótidos están asociadas con enfermedades genéticas, lo que incluye la enfermedad de Huntington (CAG), la ataxia de Friedreich (GAA), la distrofia miotónica (CTG) y el síndrome X frágil (CGG).

El método comprende la etapa de:

60 i) proporcionar un sustrato sólido con una superficie, la superficie tiene inmovilizada sobre ella una pluralidad de distintos polinucleótidos cebadores monocatenarios que comprenden al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud.

"Sustrato sólido" se refiere a un material o grupo de materiales que tienen una superficie o superficies rígidas o semirrígidas. En muchos aspectos, al menos una superficie del sustrato sólido será sustancialmente plana (o lisa). En otros aspectos, puede ser conveniente separar físicamente regiones que tienen diferentes polinucleótidos inmovilizados sobre ellas, por ejemplo, mediante el uso de pocillos, regiones elevadas, zanjas grabadas o una

combinación de estos. De acuerdo con otros aspectos, el sustrato sólido puede tomar la forma de una perla, resina, gel, microesfera u otra configuración geométrica. Por lo tanto, el sustrato puede incluir un sustrato semisólido (por ejemplo, un gel u otra matriz), y/o un sustrato poroso (por ejemplo, una membrana de nailon u otra membrana).

5 La superficie del sustrato sólido sobre la cual se inmoviliza un polinucleótido cebador monocatenario puede estar compuesta de cualquier material adecuado, tal como, pero sin limitarse a, vidrio, vidrio recubierto de poliacrilamida, epoxi, cerámica, sílice fundida, silicio, cuarzo, diversos plásticos, metales tales como oro o plata (por ejemplo, metales decapados plantilla tales como oro o plata), nailon, matriz de gel, grafeno u óxido de grafeno. También se contemplan combinaciones o compuestos de estos materiales.

10 La superficie del sustrato sólido tiene inmovilizado sobre ella un polinucleótido cebador monocatenario que comprende al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud. "Polinucleótido cebador" se refiere a la función del polinucleótido en el método de termociclado como un cebador para la reacción en cadena de la polimerasa. El "polinucleótido cebador" es monocatenario para que pueda hibridarse con una secuencia de polinucleótidos al menos parcialmente complementaria, y por tanto iniciar la extensión de la secuencia del polinucleótido cebador inmovilizado para aumentar el número de repeticiones en tándem en la secuencia inmovilizada.

15 El polinucleótido cebador monocatenario se inmoviliza sobre la superficie del sustrato sólido mediante el uso de cualquier medio de inmovilización adecuado. Puede usarse un enlazador (o cualquier otro medio) para inmovilizar el polinucleótido en la superficie. También pueden usarse químicas de superficie adecuadas para inmovilizar el polinucleótido en la superficie (por ejemplo, químicas de superficie que sean compatibles con la impresión por chorro de tinta o con técnicas de aplicación de muestras).

20 En un ejemplo, el polinucleótido lineal se inmoviliza en la superficie mediante un enlace covalente o no covalente. El polinucleótido lineal puede inmovilizarse de forma no covalente en una región de la superficie modificada químicamente.

25 Las combinaciones adecuadas de enlazador/superficie (o química de superficie) se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, el polinucleótido lineal puede comprender uno o más análogos de nucleótidos modificados con grupos funcionales que pueden usarse para la inmovilización del polinucleótido en la superficie del sustrato sólido, donde los grupos funcionales pueden unirse al nucleótido mediante enlazadores flexibles o rígidos. Los grupos funcionales ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, aminas que reaccionan covalentemente con marcadores modificados con éster de succinimidilo, azidas que reaccionan covalentemente con marcadores modificados con alquino, alquinos que reaccionan covalentemente con marcadores modificados con azida, digoxigenina que forma una fuerte interacción no covalente con anticuerpos anti-digoxigenina, o biotina que forma una fuerte interacción no covalente con avidina o estreptavidina que se ha marcado con un grupo indicador tal como un colorante fluorescente de forma no covalente a través de un marcador conjugado con biotina o de forma covalente en la proteína. Los ejemplos específicos incluyen, pero sin restringirse a, 5-(3-aminoalil)-uracilo, 5-aminoalilcitosina, 5-aminoaliluracilo, 7-deaza-7-propargilaminoadenina, 7-deaza-7-propargilaminoguanina, 5-propargilaminocitosina, 5-propargilaminouracilo, 8-[(6-amino)hexil-biotin]-aminoadenosina,  $\gamma$ -[N-(biotin-6-amino-hexanoil)]-7-propargilamino-7-desazaadenina,  $\gamma$ -[N-(biotin-6-amino-hexanoil)]-5-aminoaliluracilo,  $\gamma$ -[N-(biotin-6-amino-hexanoil-6-amino-hexanoil)]-5-(3-aminoalil)-uracilo, digoxigenin-X-5-aminoalil-uracilo, 5-(3-azidopropil)-uracilo, 5-azido-PEG4-uracilo, 5-azido-PEG4-citosina, 5-(octa-1,7-dinil)-uracilo, 5-(octa-1,7-dinil)-citosina (5-C8-alquino-C), 5-dibencilciclooctil-PEG4-uracilo, 5-dibencilciclooctil-PEG4-citosina, 5-trans-cicloocteno-PEG4-uracilo, o cualquier combinación de estos. Los enlazadores adecuados incluyen una molécula enlazadora de silano, un complejo biotina-estreptavidina, un enlazador tiol-Au, enlaces covalentes Si-C con silicio, enlaces covalentes Si-O con silicio, enlaces covalentes Si-N con silicio, un enlazador de nanopartículas o un enlace covalente dinámico.

30 El grupo funcional/enlazador está unido típicamente al extremo 5' del polinucleótido lineal monocatenario (o al menos está unido al polinucleótido lineal de manera que permite la inmovilización del extremo 5' del polinucleótido lineal a la superficie del sólido sustrato).

35 Las repeticiones en tándem están ubicadas típicamente en el extremo terminal 3' del polinucleótido cebador monocatenario inmovilizado. En algunos ejemplos, las repeticiones en tándem pueden constituir los últimos nucleótidos del polinucleótido lineal (en una dirección 5' a 3').

El método comprende además la etapa de:

40 i) poner en contacto los polinucleótidos cebadores inmovilizados con un polinucleótido plantilla monocatenario que comprende al menos dos repeticiones en tándem que son complementarias a la secuencia unitaria de los polinucleótidos cebadores en condiciones de hibridación que permitan la formación de un dúplex con errores de emparejamiento entre una secuencia unitaria y su complemento de manera que se genera un saliente 5' del polinucleótido plantilla, en donde el saliente 5' comprende al menos una repetición en tándem que es complementaria a la secuencia unitaria del polinucleótido cebador.

Esta etapa también se denomina en la presente descripción "etapa de alineamiento", "etapa de hibridación" o variaciones de estos.

5 En este contexto, el "polinucleótido plantilla monocatenario que comprende al menos dos repeticiones en tándem que son complementarias a la secuencia unitaria del polinucleótido cebador" también puede describirse como un "polinucleótido plantilla" (o "plantilla").

10 El polinucleótido plantilla comprende al menos dos repeticiones en tándem que son complementarias a la secuencia unitaria del polinucleótido cebador. El término "complementaria" se usa en su contexto normal en la técnica. Como ejemplo, si la secuencia unitaria del polinucleótido cebador es 5' ATCG 3', entonces la repetición en tándem del polinucleótido plantilla será 5' CGAT 3' (es decir, el polinucleótido plantilla comprenderá al menos dos repeticiones en tándem, por lo tanto comprenderá la secuencia 5' CGATCGAT 3'). En otras palabras, en este ejemplo, las repeticiones en tándem en la plantilla y el cebador son 100 % complementarias.

15 En el contexto de polinucleótidos plantilla con más de dos repeticiones en tándem, la invención abarca secuencias de polinucleótidos plantilla en donde al menos las dos repeticiones en tándem en el extremo 3' son 100 % complementarias (y las repeticiones en tándem adicionales son 100 % o menos del 100 % complementarias a las repeticiones en tándem correspondientes en el polinucleótido cebador). En otras palabras, siempre y cuando el extremo 3' de la hebra cebadora inmovilizada tenga al menos dos repeticiones que sean complementarias a la hebra  
20 plantilla, entonces el resto de la hebra plantilla no tiene que ser 100 % complementaria.

25 El polinucleótido cebador inmovilizado se pone en contacto con el polinucleótido correspondientes en condiciones de hibridación que permiten la formación de un dúplex con errores de emparejamiento entre una secuencia unitaria y su complemento. En este contexto, "poner en contacto" se refiere al contacto directo entre el polinucleótido cebador y el polinucleótido plantilla, por ejemplo, en un tampón y contenedor apropiados para las subsecuentes etapas de termociclado del método. Los tampones y contenedores adecuados se conocen bien e incluyen, por ejemplo, tampones para PCR y tubos Eppendorf para PCR.

30 Tras el contacto del polinucleótido cebador con el polinucleótido plantilla en condiciones de hibridación apropiadas, las secuencias complementarias (es decir, la o las secuencias unitarias del polinucleótido cebador y las repeticiones en tándem complementarias del polinucleótido plantilla) se hibridarán para formar un dúplex. Como cada uno del polinucleótido cebador y el polinucleótido plantilla tienen al menos dos repeticiones en tándem, en donde las repeticiones del cebador y la plantilla son complementarias entre sí, la hibridación entre los polinucleótidos plantilla y cebador dará como resultado, en un porcentaje de reacciones, un alineamiento deslizado, en donde el dúplex de polinucleótidos resultante no tiene un alineamiento de todas las secuencias complementarias (ver la Figura 2). En otras palabras, se produce la formación de un dúplex con errores de emparejamiento (en donde "con errores de emparejamiento" se refiere a un alineamiento incompleto entre todas las secuencias complementarias de la secuencia unitaria y las repeticiones en tándem en el polinucleótido cebador y el polinucleótido plantilla, respectivamente). Como se muestra en la Figura 2, puede generarse un saliente 5' del polinucleótido plantilla, en donde el saliente 5' comprende al menos una repetición en tándem que es complementaria a la secuencia unitaria del polinucleótido cebador. Esta puede servir entonces como plantilla en el método de termociclado para extender el polinucleótido cebador inmovilizado, y por tanto aumentar el número de repeticiones en tándem en el polinucleótido lineal inmovilizado.

45 Como se usa en la presente, "condiciones de hibridación" se refiere a los reactivos y las condiciones de reacción (por ejemplo, temperatura, tiempo, etc.) que se usan. Describe las condiciones para la hibridación y el lavado. Típicamente, las condiciones de hibridación pueden ser rigurosas o moderadas. Las condiciones de hibridación usadas en el contexto de los métodos descritos en la presente descripción permiten la formación de un dúplex con errores de emparejamiento y, por lo tanto, pueden ser moderadas o rigurosas. Preferentemente, la hibridación entre la secuencia unitaria del polinucleótido inmovilizado y la secuencia complementaria del oligonucleótido plantilla formará un dúplex estable a 65 °C y menos. Se prefiere que pueda formarse un dúplex con errores de emparejamiento a temperaturas de hasta 65 °C, por ejemplo, entre 55 °C y 65 °C, opcionalmente durante un período de tiempo de entre 1 y 30 segundos.

55 Los expertos en la técnica conocen las condiciones moderadas y rigurosas y pueden encontrarse en las referencias disponibles (por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1-6.3.6). En esa referencia se describen métodos acuosos y no acuosos y puede usarse cualquiera de estos. Un ejemplo preferido de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6× a aproximadamente 45 °C, seguida de uno o más lavados en SSC 0,2×, SDS al 0,1 % (p/v) a 50 °C. Otro ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en SSC 6× a aproximadamente 45 °C, seguida de uno o más lavados en SSC 0,2×, SDS al 0,1 % (p/v) a 55 °C. Un ejemplo adicional de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en SSC 6× a aproximadamente 45 °C, seguida de uno o más lavados en SSC 0,2×, SDS al 0,1 % (p/v) a 60 °C. Preferentemente, las condiciones de hibridación rigurosas son hibridación en SSC 6× a aproximadamente 45 °C, seguida de uno o más lavados en SSC 0,2×, SDS al 0,1 % (p/v) a 65 °C. Las condiciones de rigurosidad particularmente preferidas (y las condiciones que deben usarse si el profesional no está seguro acerca de qué  
65 condiciones deben aplicarse para determinar si una molécula está dentro de una limitación de hibridación de la

invención) son fosfato de sodio 0,5 molar, SDS al 7 % (p/v) a 65 °C, seguido de uno o más lavados a SSC 0,2x, SDS al 1 % (p/v) a 65 °C.

El método comprende además:

- 5 iii) poner en contacto los dúplex con errores de emparejamiento con una polimerasa 5' a 3' termoestable y nucleótidos en condiciones de extensión que permitan la extensión del polinucleótido en una dirección 5' a 3'.

Esta etapa también se denomina en la presente descripción "etapa de extensión" o variaciones de esta.

10 El término "poner en contacto" se define anteriormente y se aplica igualmente en este contexto. Por lo tanto, se refiere al contacto directo entre el dúplex con errores de emparejamiento y la polimerasa 5' a 3' termoestable (y nucleótidos), por ejemplo, en un tampón y contenedor apropiados para las subsecuentes etapas de termociclado del método. Los tampones y contenedores adecuados se conocen bien e incluyen, por ejemplo, tampones para PCR y tubos Eppendorf para PCR.

15 Se dispone de varias polimerasas 5' a 3' termoestables bien conocidas y pueden usarse en los métodos descritos en la presente descripción. Se prefiere que una polimerasa sea termoestable y altamente estable, de manera que su actividad se conserve sustancialmente durante la incubación prolongada necesaria para la reacción de extensión. La polimerasa tiene preferentemente una alta capacidad de procesamiento. Se prefiere que una polimerasa no presente actividad nucleasa no específica. Una polimerasa tiene preferentemente buena fidelidad pero también puede aceptar una variedad de análogos de nucleótidos como plantillas y como sustratos.

20 Por lo tanto, una polimerasa de alta fidelidad con actividad de corrección de errores eficiente no es adecuada. Preferentemente, una polimerasa carece de actividad exonucleasa 3'→5' [3'→5' exo(-)], poseyendo de esta manera una menor fidelidad debido a la ausencia de la función de corrección de errores. Un experto en la técnica puede determinar si una polimerasa en particular posee las propiedades requeridas definidas anteriormente. Las polimerasas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, Tgo-Pol Z3 exo(-) [Jozwiakowski y otros, 2011 ChemBiochem 12: 35-37], Deep Vent exo(-) (New England Biolabs), Vent exo(-) (New England Biolabs), Pfu exo(-) (Agilent Technologies) y polimerasa Taq (muchos proveedores). En un ejemplo, la polimerasa de elección es la variante de enzima polimerasa de la familia B de *Thermococcus gorgonarius* (Tgo-Pol), Z3.

Los nucleótidos apropiados para las reacciones de termociclado se conocen bien en la técnica.

35 El contacto entre el dúplex con errores de emparejamiento, la polimerasa y los nucleótidos se realiza en condiciones de extensión que permiten la extensión del polinucleótido en una dirección 5' a 3'. Como se usa en la presente, "condiciones de extensión" se refiere a los reactivos y las condiciones de reacción (por ejemplo, temperatura, tiempo, etc.) que se usan. Describe las condiciones para la extensión del polinucleótido cebador. Las condiciones de extensión apropiadas se conocen bien en la técnica. Preferentemente, la extensión se realiza a una temperatura de entre aproximadamente 65 °C y 75 °C, opcionalmente durante un período de tiempo de entre 30 y 120 segundos. Las condiciones apropiadas pueden encontrarse, por ejemplo, en Whitfield CJ, Turley AT, Tuite EM, Connolly BA, Pike AR. *Enzymatic Method for the Synthesis of Long DNA Sequences with Multiple Repeat Units*. *Angewandte Chemie International Edition* 2015, 54(31), 8971-8974.

45 Las etapas i) a iii) del método pueden repetirse al menos una vez. Para repetir las etapas, el dúplex extendido generado en la etapa iii) se desnaturaliza para generar un polinucleótido inmovilizado extendido monocatenario. El polinucleótido monocatenario puede actuar entonces como el polinucleótido cebador en ciclos repetidos de las etapas i) a iii). El número de ciclos repetidos puede variarse para obtener polinucleótidos de diferentes longitudes. Las temperaturas, la duración de cada etapa y el número de ciclos controlan la longitud promedio del polinucleótido.

50 Por lo tanto, el dúplex extendido generado en la etapa iii) puede someterse a condiciones de desnaturalización que permitan la disociación del dúplex en polinucleótidos monocatenarios. Esto también se denomina en la presente descripción "etapa de fusión". Las condiciones de desnaturalización apropiadas se conocen bien en la técnica e incluyen someter el dúplex extendido a una temperatura de aproximadamente 75-100 °C, preferentemente, aproximadamente 90 a 98 °C, opcionalmente durante aproximadamente 15 a 30 segundos.

55 Por lo tanto, el método puede incluir además las etapas de:

- iv) desnaturalizar el dúplex de iii) en condiciones de desnaturalización para generar un polinucleótido inmovilizado monocatenario; y  
60 v) repetir las etapas ii) a iii) al menos una vez para aumentar el número de repeticiones en tándem en el polinucleótido inmovilizado.

El método descrito hasta ahora proporciona, como material de partida, un sustrato sólido con una superficie que tiene inmovilizados sobre ella polinucleótidos cebadores lineales monocatenarios que comprenden al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud. Este material de partida puede derivarse de un sustrato sólido con una superficie que tiene inmovilizados sobre ella polinucleótidos cebadores

lineales bicatenarios que comprenden al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud, en donde los polinucleótidos cebadores lineales bicatenarios se desnaturalizan para generar el material de partida de los polinucleótidos cebadores lineales monocatenarios inmovilizados para los métodos.

5 Las condiciones de desnaturalización adecuadas se describen en otra parte en la presente descripción.

10 Por lo tanto, el sustrato sólido con una superficie que tiene inmovilizado sobre ella un polinucleótido cebador lineal monocatenario que comprende al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud, puede proporcionarse mediante las etapas de:

- 15 a) inmovilizar un polinucleótido cebador lineal bicatenario que comprende al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud en la superficie del sustrato sólido; y  
b) desnaturalizar el polinucleótido cebador lineal bicatenario para proporcionar el polinucleótido cebador lineal monocatenario.

Un polinucleótido cebador lineal bicatenario que comprende al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud también se denomina en la presente descripción "oligosemilla".

20 El polinucleótido cebador inmovilizado de la etapa i) comprende al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria. Como se indicó anteriormente, el polinucleótido puede tener al menos dos... hasta al menos 100 repeticiones en tándem de la secuencia unitaria. En un ejemplo, el polinucleótido cebador inmovilizado comprende al menos 2, al menos 5, al menos 10 o al menos 15 repeticiones en tándem de la secuencia unitaria.

25 Sustratos sólidos

Se describe además un sustrato sólido con una superficie donde la superficie tiene al menos un polinucleótido sonda lineal inmovilizado sobre ella (en donde el al menos un polinucleótido sonda lineal comprende al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud).

30 El sustrato sólido puede generarse mediante el método de termociclado descrito anteriormente, en donde el polinucleótido cebador lineal inmovilizado inicial se extiende para aumentar su número de repeticiones en tándem de la secuencia unitaria, en donde el polinucleótido lineal extendido se corresponde (se denomina en la presente descripción) al polinucleótido sonda lineal que está inmovilizado sobre el sustrato sólido. Alternativamente, el sustrato sólido puede obtenerse al generar el polinucleótido sonda lineal (por ejemplo, en solución) y subsecuentemente inmovilizar el polinucleótido sonda lineal en la superficie del sustrato sólido.

35 Las definiciones proporcionadas con respecto a un polinucleótido cebador lineal se aplican igualmente a un polinucleótido sonda lineal, a menos que el contexto lo indique específicamente de cualquier otra manera. Igualmente, las definiciones proporcionadas con respecto a un sustrato sólido (o una superficie de este) también se aplican a los métodos descritos en la presente descripción (que requieren la presencia de un sustrato sólido), a menos que el contexto lo indique específicamente de cualquier otra manera.

45 El polinucleótido sonda lineal puede comprender dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, etc., de la misma secuencia unitaria (es decir, el polinucleótido lineal puede comprender varias repeticiones de la misma secuencia unitaria). Puede ser al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100 copias, al menos 110 copias, al menos 120 copias, al menos 140 copias, al menos 150 copias, al menos 160 copias, al menos 170 copias, al menos 180 copias, al menos 190 copias, al menos 200 copias o al menos 250 copias, etc. de la secuencia unitaria.

La superficie de un sustrato sólido puede comprender:

- 55 i) una pluralidad de regiones discretas separadas que tienen un polinucleótido sonda (o cebador) lineal inmovilizado sobre ellas; y  
ii) áreas interregionales entre las regiones discretas separadas, en donde las áreas interregionales están sustancialmente libres de polinucleótidos sonda (o cebadores) lineales.

60 El polinucleótido lineal (sonda o cebador) puede inmovilizarse sobre la superficie del sustrato en una región que se denomina en la presente descripción "región discreta separada". Esta terminología se usa para referirse a una región de la superficie que es distinta de otras regiones de la superficie separadas espacialmente que puede tener un polinucleótido diferente (o una copia del mismo polinucleótido) inmovilizado sobre ella. Por lo tanto, la superficie puede tener una pluralidad de regiones discretas separadas, cada una de las cuales está separada espacialmente de manera que cada región separada puede estar ópticamente separada (es decir, es ópticamente resoluble) de las "regiones discretas separadas" vecinas (de manera que cualquier señal óptica generada de una región es ópticamente

distinguible, o discernible, de su región vecina). Las regiones discretas separadas están espacialmente separadas al proveer áreas interregionales entre las regiones discretas separadas, donde las áreas interregionales están sustancialmente libres de polinucleótidos sonda lineales. Estas "áreas interregionales" son típicamente inertes en el sentido de que los polinucleótidos lineales descritos en la presente descripción (u otras estructuras macromoleculares) no se unen a dichas regiones. En algunos ejemplos, dichas áreas interregionales pueden tratarse con agentes bloqueantes, por ejemplo, otros polímeros, óxidos, "sitios químicamente no reactivos/incompatibles" y similares.

La distinción entre una "región discreta separada" y un "área interregional" puede determinarse por las químicas de superficie en estas áreas (en donde la química de superficie en una región discreta separada permite la inmovilización de un polinucleótido lineal adecuado, mientras que la química de superficie de un área interregional no). Alternativamente, la química de superficie puede ser la misma tanto para las regiones discretas separadas como para las áreas interregionales, de manera que la distinción entre ellas se determina al colocar (inmovilizar) el polinucleótido lineal sobre la superficie en ciertas regiones (para generar una región discreta separada), en donde las regiones sin el polinucleótido lineal colocado (inmovilizado) se convierten en "áreas interregionales".

Cada región discreta separada puede tener una posición definida en la superficie del sustrato sólido. La separación requerida entre cada región discreta separada dependerá de los métodos y aparatos usados para resolver o medir ópticamente cualquier señal (directa o indirecta) generada a partir del polinucleótido inmovilizado. Puede tener un tamaño que permita la inmovilización de sólo un polinucleótido lineal descrito en la presente descripción. Alternativamente, pueden inmovilizarse una pluralidad (por ejemplo, al menos 2, al menos 5, al menos 10, al menos 20) de polinucleótidos sonda (o cebadores) lineales idénticos dentro de una única región discreta separada.

Los métodos para determinar la separación espacial adecuada de dichas regiones, y determinar el tamaño de dichas regiones, se conocen bien en la técnica.

Las regiones discretas separadas pueden disponerse en la superficie prácticamente en cualquier patrón en el que las regiones tengan ubicaciones definidas, es decir, en cualquier matriz regular, lo que hace que las funciones de recopilación de señales y análisis de datos sean más eficientes. Dichos patrones incluyen, pero no se limitan a, círculos concéntricos de regiones, patrones espirales, patrones rectilíneos, patrones hexagonales y similares. Preferentemente, las regiones están dispuestas en un patrón rectilíneo o hexagonal.

Las regiones discretas separadas que tienen los polinucleótidos sonda lineales inmovilizados sobre ellas pueden, por lo tanto, formar una matriz, por ejemplo, una micromatriz.

La superficie del sustrato sólido comprende una pluralidad de regiones discretas separadas, en donde cada región discreta separada contiene un polinucleótido sonda lineal distinto. En otras palabras, puede haber al menos dos polinucleótidos sonda lineales distintos (inmovilizados en diferentes regiones discretas separadas) sobre la superficie del sustrato sólido.

Como se usa en la presente, una "pluralidad" se refiere a más de uno, es decir, dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más, diez o más, once o más, doce o más, trece o más, catorce o más, quince o más, etc. Abarca al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95 o al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 1000, etc.

El número de repeticiones en tándem (y el tamaño y secuencia de una "secuencia unitaria") en un polinucleótido lineal (tal como un polinucleótido sonda lineal; o un polinucleótido cebador lineal) se ha analizado detalladamente en otra parte en la presente descripción. Como también se describe en otra parte en la presente descripción, los polinucleótidos lineales descritos en la presente descripción pueden ser ADN monocatenario o bicatenario. Alternativamente, pueden ser ARN o ADNc.

La secuencia unitaria de un polinucleótido lineal descrito en la presente descripción (ya sea un polinucleótido cebador o sonda) puede comprender cualquier secuencia que se desee, por ejemplo, cualquier secuencia de nucleótidos relevante para el diagnóstico.

Los ejemplos relevantes, no limitantes, incluyen secuencias que son diagnósticas de enfermedades, por ejemplo, inestabilidades de microsatélites (MSI) tales como BAT25, y mutaciones de una o varias bases, como se produce, por ejemplo, en el gen CFTR en la fibrosis quística. En consecuencia, las secuencias unitarias relevantes pueden ser 5' GCATCTTTTCG 3' (SEQ ID NO: 1) (derivada del gen CFTR en la fibrosis quística; generada a partir de una mutación por desplazamiento de marco de tres bases del gen CFTR), 5' AGA TAC ATT GAC CTT '3 (SEQ ID NO: 10) (derivada de la enzima hepática CYP450, CYP29C \*2/\*3 que afecta el metabolismo de la warfarina; representa una mutación de base única), o 5' GAG GAC CGT GTT CAA '3 (SEQ ID NO: 11), o muchas otras (lo que incluye secuencias que son el complemento de las secuencias citadas anteriormente). Un experto en la técnica puede identificar fácilmente secuencias de interés, en donde el gen (mutación) de interés (o su complemento) está incluido dentro de la secuencia. Pueden encontrarse ejemplos de secuencias apropiadas para el análisis genético con warfarina en Johnson J, Caudle

K, Gong L, Whirl-Carrillo M, Stein C, Scott S, y otros, Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update. Clin Pharmacol Ther. 1ro de Septiembre de 2017;102(3):397-404; Stubbins MJ, Harries LW, Smith G, Tarbit MH, Wolf CR. Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. Pharmacogenetics. 1996;6(5):429-39; Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ, Trager WF, Korzekwa KR. Impaired (S)-warfarin metabolism catalysed by the R144C allelic variant of CYP2C9. Pharmacogenetics. Febrero de 1994;4(1):39-42; Steward DJ, Haining RL, Henne KR, Davis G, Rushmore TH, Trager WF, y otros, Genetic association between sensitivity to warfarin and expression of CYP2C9\*3. Vol. 7, Pharmacogenetics. 1997. p. 361-7; y Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. Pharmacogenetics. Abril de 2002;12(3):251-63.

Métodos para determinar la presencia de una secuencia objetivo lineal en una muestra de prueba

Los sustratos sólidos descritos en la presente descripción pueden usarse para determinar si una secuencia objetivo lineal de interés está presente (o no) dentro de una muestra de prueba. El sustrato sólido tiene una superficie que tiene uno o varios polinucleótidos sonda lineales inmovilizados sobre ella. El polinucleótido sonda lineal comprende al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria. Cada secuencia unitaria puede actuar como una sonda (en otras palabras, como un sitio de unión) para una secuencia objetivo lineal complementaria de interés cuando al menos una porción de cada secuencia unitaria comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia objetivo lineal de interés. Por lo tanto, los sustratos sólidos descritos en la presente descripción proporcionan una tecnología de detección con sensibilidad mejorada para detectar secuencias de polinucleótidos objetivo en una muestra de prueba, ya que cada polinucleótido sonda inmovilizado comprende varios sitios de unión al objetivo.

Descrito en la presente descripción, pero no forma parte de la invención reivindicada, se proporciona un método para determinar la presencia de una secuencia de un polinucleótido objetivo lineal en una muestra de prueba, que comprende las etapas de:

- i) proporcionar un sustrato sólido como se describe en otra parte en la presente descripción, en donde la secuencia unitaria del polinucleótido sonda lineal inmovilizado comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de una secuencia de un polinucleótido objetivo lineal de interés;
- ii) poner en contacto una muestra de prueba con el polinucleótido sonda lineal inmovilizado en condiciones que permitan la formación de un dúplex entre la secuencia del polinucleótido objetivo lineal y la porción complementaria de la secuencia unitaria del polinucleótido sonda lineal inmovilizado; y
- iii) detectar la formación del dúplex, en donde la formación del dúplex indica que la secuencia del polinucleótido objetivo está presente dentro de la muestra de prueba.

El polinucleótido objetivo lineal puede ser cualquier secuencia de un polinucleótido de interés. La secuencia del polinucleótido objetivo lineal debe ser capaz de hibridarse con la porción complementaria de la secuencia unitaria del polinucleótido sonda lineal, por lo tanto debe inmovilizarse un polinucleótido sonda lineal apropiado sobre el sustrato sólido. Por ejemplo, si el polinucleótido objetivo lineal tiene la secuencia 5' ATCGAA 3', entonces la secuencia unitaria del polinucleótido sonda lineal debería comprender la secuencia 5' TTCGAT 3'. Las secuencias unitarias apropiadas para el polinucleótido objetivo lineal son fácilmente identificables por un experto en la técnica.

Por lo tanto, la secuencia unitaria del polinucleótido sonda lineal inmovilizado comprende una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de una secuencia del polinucleótido objetivo lineal de interés. En este ejemplo, la secuencia unitaria también puede incluir otros ácidos nucleicos (adicionales) que no son complementarios a la secuencia del polinucleótido objetivo lineal de interés. En este ejemplo, los ácidos nucleicos adicionales en la secuencia unitaria pueden actuar como un "separador" entre los sitios de unión al objetivo en el polinucleótido sonda lineal inmovilizado.

En otro ejemplo, la secuencia unitaria consiste en una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de una secuencia del polinucleótido objetivo lineal de interés (es decir, la secuencia unitaria no incluye "ácidos nucleicos adicionales", por el contrario al ejemplo anterior).

El polinucleótido objetivo lineal puede ser parte de una molécula de polinucleótido más larga en la muestra de prueba. Como se usa en la presente, "polinucleótido objetivo lineal" por lo tanto no limita la longitud total (o secuencia) del polinucleótido que forma un dúplex con el polinucleótido sonda lineal inmovilizado, sino que sólo se refiere a la secuencia que es capaz de hibridarse con la secuencia correspondiente en la secuencia unitaria del polinucleótido sonda lineal inmovilizado (y por tanto la secuencia en la muestra de prueba que es de interés y/o que es informativa (por ejemplo, de diagnóstico/pronóstico)). Por lo tanto, esta puede ser parte de una secuencia más larga en la muestra de prueba.

Una muestra de prueba puede ser cualquier muestra apropiada que pueda contener el polinucleótido objetivo lineal de interés. Una "muestra de prueba" significa generalmente una cantidad de material de una fuente biológica, ambiental, médica o de paciente en la que se busca la detección o medición de un polinucleótido objetivo lineal de interés. Por un lado, pretende incluir un espécimen o cultivo (por ejemplo, cultivos microbiológicos). Por otro lado,

pretende incluir muestras tanto biológicas como ambientales. Una muestra puede incluir un espécimen de origen sintético. Las muestras biológicas pueden ser fluidos, sólidos (por ejemplo, heces) o tejidos animales, lo que incluye humanos, así como también productos e ingredientes de alimentos y piensos líquidos y sólidos, tales como productos lácteos, verduras, carne y subproductos cárnicos, y desechos. Las muestras biológicas pueden incluir materiales tomados de un paciente, lo que incluye, pero sin limitarse a, cultivos, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, semen, aspirados con aguja y similares. Pueden obtenerse muestras biológicas de todas las diversas familias de animales domésticos, así como también de animales salvajes o de vida silvestre, lo que incluye, pero sin limitarse a, animales tales como ungulados, osos, peces, roedores, etc. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia superficial, suelo, agua y muestras industriales, así como también muestras obtenidas de instrumentos, aparatos, equipos, utensilios y artículos desechables y no desechables de procesamiento de alimentos y lácteos. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de los tipos de muestras aplicables a la presente invención.

Se conocen varios métodos estándar para detectar la formación del dúplex. Estos incluyen el uso de un intercalador fluorescente tal como Picogreen, DAPI o sybergreen, ADN etiquetado con fluoresceína, fluoresceína, ADN etiquetado con redox, ferroceno, nanopartículas o ADN etiquetado magnéticamente. Dichos métodos estándar se analizan, por ejemplo, en Comparison of DNA detection methods using nanoparticles and silver enhancement; B. Foutier ; L. Moreno-Hagelsieb ; D. Flandre ; J. Remacle Volumen 152, Número 1, IEE Proceedings - Nanobiotechnology; Febrero de 2005, pág. 3 - 12; y DNA Biosensors- A review de Kavita V, J Bioengineer & Biomedical Sci 2017, 7:2; o Mikkelsen, S. R. (1996), Electrochemical biosensors for DNA sequence detection. Electroanalysis, 8: 15-19.

La detección de la formación del dúplex indica que la secuencia del polinucleótido objetivo está presente dentro de la muestra de prueba.

Métodos para determinar la presencia de una molécula de unión a nucleótidos objetivo en una muestra de prueba

Los sustratos sólidos descritos en la presente descripción también pueden usarse para determinar si una molécula de unión a nucleótidos objetivo de interés está presente (o no) dentro de una muestra de prueba. El sustrato sólido tiene una superficie que tiene uno o varios polinucleótidos sonda lineales inmovilizados sobre ella. El polinucleótido sonda lineal comprende al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria. Cada secuencia unitaria puede actuar como una sonda (en otras palabras, como un sitio de unión) para una molécula de unión a nucleótidos objetivo de interés cuando al menos una porción de cada secuencia unitaria comprende una secuencia de ácido nucleico que actúa como una secuencia de unión para la molécula de unión a nucleótidos objetivo de interés. La molécula de unión a nucleótidos objetivo de interés puede ser cualquier molécula (por ejemplo, una proteína) que se une a una secuencia de nucleótidos específica (que puede estar representada por una secuencia unitaria como se describe en la presente descripción). Por lo tanto, los sustratos sólidos descritos en la presente descripción proporcionan una tecnología de detección con sensibilidad mejorada para detectar moléculas de unión a nucleótidos objetivo de interés en una muestra de prueba, ya que cada polinucleótido sonda inmovilizado comprende varios sitios de unión al objetivo.

Por lo tanto, se describe un método para determinar la presencia de una molécula de unión a nucleótidos en una muestra de prueba, que comprende las etapas de:

- i) proporcionar un sustrato sólido como se describe en otra parte en la presente descripción, en donde la secuencia unitaria del polinucleótido sonda lineal inmovilizado comprende una secuencia de ácido nucleico que es un sitio de unión para una molécula de unión a nucleótidos de interés;
- ii) poner en contacto una muestra de prueba con el polinucleótido sonda lineal inmovilizado en condiciones que permitan la unión entre la molécula de unión a nucleótidos y la porción de la secuencia unitaria del polinucleótido sonda lineal inmovilizado que actúa como su sitio de unión; y
- iii) detectar la unión entre el polinucleótido sonda lineal inmovilizado y la molécula de unión a nucleótidos, en donde la unión indica que la molécula de unión a nucleótidos está presente dentro de la muestra de prueba.

La molécula de unión a nucleótidos puede ser cualquier molécula de interés que sea capaz de unirse a la porción apropiada de la secuencia unitaria del polinucleótido sonda lineal. Los ejemplos no limitantes incluyen factores de transcripción, proteínas de reparación del ADN o histonas. Debe inmovilizarse un polinucleótido sonda lineal apropiado sobre el sustrato sólido. Por ejemplo, si la molécula de unión a nucleótidos se une a la secuencia 5' ATCGAA 3', entonces la secuencia unitaria del polinucleótido sonda lineal debería comprender la secuencia 5' ATCGAA 3'. Las secuencias unitarias apropiadas son fácilmente identificables por un experto en la técnica.

Una muestra de prueba puede ser cualquier muestra apropiada que pueda contener la molécula de unión a nucleótidos de interés. Una "muestra de prueba" significa generalmente una cantidad de material de una fuente biológica, ambiental, médica o de paciente en la que se busca la detección o medición de una molécula de unión a nucleótidos de interés. Por un lado, pretende incluir un espécimen o cultivo (por ejemplo, cultivos microbiológicos). Por otro lado, pretende incluir muestras tanto biológicas como ambientales. Una muestra puede incluir un espécimen de origen sintético. Las muestras biológicas pueden ser fluidos, sólidos (por ejemplo, heces) o tejidos animales, lo que incluye humanos, así como también productos e ingredientes de alimentos y piensos líquidos y sólidos, tales como productos lácteos, verduras, carne y subproductos cárnicos, y desechos. Las muestras biológicas pueden incluir materiales

tomados de un paciente, lo que incluye, pero sin limitarse a, cultivos, sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, leche, linfa, esputo, semen, aspirados con aguja y similares. Pueden obtenerse muestras biológicas de todas las diversas familias de animales domésticos, así como también de animales salvajes o de vida silvestre, lo que incluye, pero sin limitarse a, animales tales como ungulados, osos, peces, roedores, etc. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia superficial, suelo, agua y muestras industriales, así como también muestras obtenidas de instrumentos, aparatos, equipos, utensilios y artículos desechables y no desechables de procesamiento de alimentos y lácteos. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitantes de los tipos de muestras aplicables a la presente invención.

Cualquiera de los métodos estándar conocidos en la técnica para detectar la unión entre una molécula de unión a nucleótidos y un polinucleótido sonda lineal pueden usarse en el contexto de la invención [por ejemplo, Crystal structure of  $\Delta$ -[Ru(bpy)<sub>2</sub>dppz]<sup>2+</sup> bound to mismatched DNA reveals side-by-side metalloinsertion and intercalation Nature Chemistry, 2012 Volumen 4, Núm. 8, 615 - 620; Hang Song, Jens T. Kaiser y Jacqueline K. Barton; o Label-free detection of DNA-binding proteins based on microfluidic solid-state molecular beacon sensor.

Anal Chem. 2011, 83(9), 3528-32. Wang J, Onoshima D, Aki M, Okamoto Y, Kaji N, Tokeshi M, Baba Y.; o Annu Rev Anal Chem, 2011, 4(1), 105-128. Metal Ion Sensors Based on DNazymes and Related DNA Molecules; Xiao-Bing Zhang, Rong-Mei Kong, y Yi Lu.

La comparación de secuencias y la determinación del por ciento de identidad o complementariedad entre dos secuencias puede lograrse mediante el uso de un algoritmo matemático. En una modalidad preferida, el por ciento de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina mediante el uso del programa GAP en el paquete de programas informáticos GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), mediante el uso de una matriz NWSgapdna.CMP y un peso del espacio de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso de la longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Un conjunto particularmente preferido de parámetros (y el que debe usarse si el practicante tiene dudas sobre qué parámetros deben aplicarse para determinar si una molécula está dentro de una identidad de secuencia o limitación de homología de la invención) son una matriz de puntuación BLOSUM 62 con una penalización por espacio de 12, una penalización por extensión de espacio de 4, y una penalización por espacio por desplazamiento de marco de 5.

Alternativamente, el por ciento de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse mediante el uso del algoritmo de Meyers y otros, (1989) CABIOS 4:11-17) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), mediante el uso de una tabla de residuos ponderados PAM120, una penalización por longitud del espacio de 12 y una penalización por espacio de 4.

Las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas descritas en la presente descripción pueden usarse como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas pueden realizarse mediante el uso de los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y otros (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410). Las búsquedas de nucleótidos en BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener las secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína en BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener las secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener las alineamientos con espacios para propósitos de comparación, puede usarse gapped BLAST como se describe en Altschul y otros, (1997, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402). Cuando se usan los programas BLAST y gapped BLAST, pueden usarse los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Ver <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

Aspectos de la invención se demuestran mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

## Ejemplos

### 1. Inmovilización covalente de ADNmc sobre una superficie de vidrio sólida mediante un enlazador APEGDMES

Inicialmente se limpió un portaobjetos de vidrio para microscopio con acetona, IPA y agua nanopura, seguido de un tratamiento con plasma de O<sub>2</sub> para eliminar cualquier contaminante orgánico residual y activar la superficie con grupos OH<sup>δ</sup>. A continuación, las superficies se modificaron con un enlazador de siloxano terminado en aldehído protegido con acetal, APEGDMES (SEQ ID NO: 12), (acetaldipolietilenglicoldimetiletioxisilano) mediante calentamiento en tolueno a 80 °C durante la noche. La modificación con APEGDMES proporciona una superficie de aldehído terminal protegida con acetal, que se eliminó simplemente en una solución acuosa de ácido acético al 10 % para presentar la funcionalidad aldehído en el extremo terminal superior del enlazador. La oligosemilla modificada con amino, 5'-NH<sub>2</sub>-[GATC]<sub>5</sub>-3', se acopló covalentemente a la superficie de aldehído mediante el uso de cianoborohidruro de sodio para facilitar la reacción de aminación reductora entre el enlazador aldehído y la funcionalidad amino en la hebra de ADN. Después, la superficie funcionalizada con oligosemilla se lavó en agua nanopura durante 30 min y tampón PBS 0,5 x para eliminar las hebras de ADN fisisorbidas. Por lo tanto, el ADNmc corto quedó unido covalentemente a la superficie.

## 2. Generación de una oligosemilla inmovilizada y extensión por PCR de esta

El ADNmc corto unido covalentemente generado en el Ejemplo 1 se hibridó a continuación con su hebra complementaria 5'-[CTAG]<sub>5</sub>-3' para formar el dúplex oligosemilla de 20 bases de partida necesario para la reacción de extensión enzimática basada en PCR. La superficie del ADNbc se enjuagó posteriormente con agua nanopura y tampón PBS 0,5x. A continuación, se realizaron ciclos de extensión por calor-enfriamiento basados en PCR en la cadena de ADN mediante el uso de la variante de enzima polimerasa de la familia B de *Thermococcus gorgonarius* (Tgo-Pol), Z3, como se informó anteriormente (Pike y otros, Angew 2015). El procedimiento se realizó como para el método de calor-enfriamiento basado en solución informado; sin embargo, aquí las virutas de silicio modificadas con oligosemillas se cortaron a 0,5 cm<sup>2</sup> para ajustarlas a un tubo eppendorf de PCR estándar para el termociclado mediante el uso de un bloque de calor-enfriamiento (ver la Figura 2A). El volumen total de reactivos, enzima Z3, dNTP y tampón fue 180 µl, suficiente para garantizar que la superficie del silicio estuviera sumergida en todo momento. Inicialmente, el ADNbc corto se deshibridó por calentamiento a 95 °C antes de enfriarlo hasta 55 °C para la rehibridación. Sin embargo, no siempre se formarán dúplex perfectamente emparejados debido a la repetición de la secuencia CATG/GTAC y este error de emparejamiento se aprovecha para extender el ADN desde fuera de la superficie. Tras la rehibridación, la hebra complementaria puede desplazarse por una, dos o tres unidades (suponiendo que un dúplex de 8 bases y 2 unidades repetidas sea el mínimo necesario para formar una doble hebra estable), lo que produce salientes 5' adecuados para la extensión por la ADN polimerasa. A continuación, la extensión del ADN tiene lugar a 72 °C, donde la enzima añade el NTP coincidente a la secuencia unida a la superficie, lo que aumenta por tanto la longitud del dúplex de ADN en el número de unidades repetidas deslizadas. El aumento en la longitud del ADN inmovilizado se produce en la dirección z alejándose de la superficie, y mantiene la densidad de empaquetamiento superficial de las oligosemillas más cortas. El método de calor-enfriamiento se repite durante un máximo de 20 ciclos para lograr cepillos de ADN de aproximadamente 700 bases de longitud (Figura 2).

## 3. Visualización de las secuencias de polinucleótidos extendidas

La visualización del mayor número de bases de ADN empaquetadas dentro de la misma superficie se demostró mediante la adición del colorante fluorescente Picogreen (PG) que se intercala en el ADNbc. PG exhibe un aumento de >1000 veces en la fluorescencia cuando se une al ADNbc. Después de la incubación en una dilución de 200 veces de la solución madre durante 30 min, la superficie tratada enzimáticamente mostró un aumento de la intensidad de fluorescencia después de 20 ciclos de calor-enfriamiento en comparación con las hebras de oligosemillas de partida no tratadas en la superficie, como se muestra en la Figura 3 a) y b).

El cambio en la fluorescencia, aunque se nota a simple vista (Figura 3a y 3b), es más claro a partir de un análisis de densidad integrado mediante el uso de un software de procesamiento de imágenes en las dos superficies marcadas con Picogreen (ver la Figura 3c). La reacción de extensión aumenta drásticamente el número de sitios de unión a Picogreen por punto de unión a la superficie, lo que aumenta por tanto la intensidad de fluorescencia. Hubo una clara distinción entre la oligosemilla corta y la superficie del ADNNext atribuida al mayor número de sitios de unión a PG por molécula sonda.

El aumento en la intensidad de fluorescencia fue un excelente indicador de que el ADN se había extendido fuera de la superficie. Para confirmar aún más el aumento en la longitud del ADN, se deshibridó el ADNNext en la superficie y la hebra complementaria larga, que no estaba unida covalentemente a la superficie, se eliminó de la superficie y se recolectó. La superficie del ADNNext se sumergió dos veces en agua nanopura calentada a 95 °C para la deshibridación. Se utilizó AFM para visualizar el ADN largo al tomar 5 µl de muestra y colocarlos sobre mica recién escindida mediante peinado molecular que se conoce que extiende la hebra de ADN flexible.<sup>10</sup> La imagen de AFM para el ADNmc puede verse en la Figura 4a. Muchas de las hebras de ADNmc se agregaron sobre la superficie, lo cual es típico del ADNmc,<sup>11</sup> sin embargo, algunas hebras individuales son visibles con una altura promedio de 0,5 nm (ver la Figura 4b), comparable a las dimensiones informadas anteriormente para el ADNmc.<sup>12</sup> El análisis de la longitud promedio de las hebras de ADNmc arrojó un intervalo de 160-300 pb, lo que confirma la extensión exitosa de la oligosemilla fuera de la superficie. La longitud de las hebras obtenidas de la superficie fue más corta que la observada en el gel de agarosa de la extensión basada en solución. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, esto podría deberse a que el impedimento estérico de la superficie restringe el movimiento completo de la enzima, lo que conduce por tanto a una velocidad de reacción reducida.

## 4. Detección de la secuencia del gen CFTR

Los cepillos de ADN largo con secuencias repetidas podrían distinguir entre errores de emparejamiento de una sola base en enfermedades, lo que es ideal para la biodetección de ADN. Muchas enfermedades son el resultado de mutaciones en el gen que provocan diferencias en la secuencia del ADN.<sup>14</sup> Una plataforma para diferenciar secuencias específicas permite la detección temprana de enfermedades o la determinación del tipo de defecto.

Un ejemplo no limitante de una enfermedad en la que este tipo de dispositivo sería especialmente beneficioso, es el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística conocido como el gen CFTR. El gen CFTR codifica una proteína y esta actúa como un canal para controlar el transporte de iones de cloruro dentro y fuera de las células para gestionar el contenido de agua para la producción de moco. La proteína es necesaria además para la regulación del sodio en los pulmones y el páncreas. La mutación por desplazamiento de marco más común observada en el CFTR es una deleción de 3 bases de las bases CTT, conocida como delta F508, que da como resultado un cambio

en la codificación del gen mediante la eliminación del aminoácido fenilalanina (ver la Figura 5). La delección del aminoácido da como resultado una distorsión completa de la forma del gen, lo que provoca la ruptura del canal iónico. Sin un canal iónico funcional, las células que recubren el páncreas, los pulmones y otros órganos generan una mucosidad espesa que da como resultado la obstrucción de las vías respiratorias y las glándulas. Detectar tempranamente este cambio permitiría un tratamiento inmediato, que reduce los efectos de la enfermedad para mejorar la calidad de vida.

Por lo tanto, se eligió la secuencia de ADN para la mutación delta F508 del CFTR como la siguiente secuencia para probar con el método de extensión fuera de la superficie.

La secuencia CFTR se extendió inicialmente en solución como se describe en la presente descripción para garantizar que esta secuencia específica pueda extenderse mediante el uso de este método. El dúplex se preparó a partir de la sonda modificada con amino y las secuencias de ADN objetivo descritas en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de ADN modificadas con amino usadas para la extensión de CFTR.

Nombre	Secuencia (X = amino-c6)
CFTR-sonda	5' - X - GCATCTTTTCGGCATCTTTTCG - 3' (SEQ ID NO: 13)
CFTR-objetivo	5' - CGAAAGATGCCGAAAGATGC - 3' (SEQ ID NO: 14)

Los productos de ADN se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 6a) y la longitud modal de 300 pb se determinó mediante el uso de un software de análisis de imágenes. La longitud de esta secuencia de ADN fue menor que la de la secuencia GATC y también mostró una concentración más baja. Sin embargo, se estaba extendiendo hasta una longitud que proporciona 30 secuencias repetidas por hebra de sonda, por lo tanto aún se llevó a cabo la extensión fuera de la superficie.

Habiendo establecido que es posible la extensión de una oligosemilla inmovilizada sobre una superficie y que la secuencia extendida exhibe una señal de fluorescencia aumentada, se preparó un portaobjetos de vidrio con una oligosemilla de secuencia, 5' GCAT**CTTTTCG** 3' (SEQ ID NO: 1), el gen CFTR que después de la mutación da como resultado un desplazamiento del marco de lectura con error de emparejamiento de tres bases (negritas), 5' GCAT**TCGAGC** 3' (SEQ ID NO: 15). Claramente, sería importante desde el punto de vista diagnóstico si este cambio en la secuencia de bases pudiera analizarse rápidamente para ayudar en la detección temprana de la fibrosis quística.

La secuencia de oligosemilla de CFTR se inmovilizó sobre una superficie de vidrio y se sometió a las condiciones de reacción para la extensión enzimática durante 20 ciclos. Después de añadir PG a las superficies, se obtuvieron imágenes de fluorescencia para observar el aumento en la intensidad de fluorescencia para la muestra de ADNext (ver la Figura 7). El ADNext mostró una mayor intensidad de fluorescencia en comparación con las oligosemillas cortas; sin embargo, la diferencia no fue tan considerable como para la secuencia GATC. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, esto podría ser una consecuencia del hecho de que la secuencia CFTR en solución no se extendió tan bien como la secuencia GATC, por lo tanto, había menos bases de ADN a las que se podía unir el PG, lo que podría haber dado como resultado una menor intensidad de fluorescencia en comparación con la superficie GATC.

Se determinó el ángulo de contacto de cada una de las superficies, ADNmc, ADNbc y ADNext, para examinar la hidrofobicidad de las diferentes modificaciones de la superficie (ver la Tabla 2). El ángulo de contacto para el ADNbc fue 32,33°. Después de la extensión desde la superficie, el ángulo de contacto aumentó dramáticamente hasta 73,11°. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, el gran aumento de la hidrofobicidad puede atribuirse a la naturaleza hidrófoba de las bases de ADN. En la conformación dúplex de oligómeros cortos, las bases están protegidas de cualquier molécula de agua, sin embargo, con el ADN largo, la estructura es menos rígida y, por lo tanto, más bases podrían estar en contacto con la gota de agua, lo que da como resultado una monocapa terminal hidrófoba y un aumento del ángulo de contacto.<sup>15</sup>

Tabla 2. Ángulos de contacto de una gota de agua en la superficie de ADNmc, ADNbc y ADNext para la secuencia CFTR.

Superficie	Ángulo de contacto /°
ADNmc	37,10
ADNbc	32,33
ADNext	73,11

El enfoque descrito aquí es capaz de potenciar la respuesta de fluorescencia al proporcionar una matriz alargada y densamente empaquetada del gen objetivo y es prometedor para la detección temprana de errores de emparejamiento de una sola base y de pequeñas cantidades de bases.

##### 5. Inmovilización covalente y extensión de ADNmc sobre una superficie de silicio

Una superficie de silicio, oblea de Si<111> de tipo n de 25 mm<sup>2</sup> se limpió y modificó como para el portaobjetos de vidrio descrito anteriormente. Otra secuencia de oligosemilla de importancia desde el punto de vista diagnóstico que

consiste de una serie larga de diez bases T, 5'-[GTTTTTTTTTTC]<sub>2-3</sub>' (SEQ ID NO: 16) se inmovilizó mediante una química de siloxano similar y después se extendió enzimáticamente para producir varias repeticiones. Esta vez, la secuencia objetivo es importante debido a la incorporación errónea de una sola base que se produce cuando la secuencia de las T se alarga o se reduce durante errores en la transcripción. Este es un ejemplo de un potencial objetivo de MSI, involucrada en la aparición de cánceres colorrectales [ver, por ejemplo, Arq Bras Cir Dig. Oct-Dic de 2012;25(4):240-4. Microsatellite instability--MSI markers (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250) in rectal cancer. Losso GM1, Moraes Rda S, Gentili AC, Messias-Reason IT].

Los datos de fluorescencia de esta superficie extendida mostraron la misma respuesta amplificada a la superficie de vidrio.

#### 6. Inmovilización covalente y extensión de la secuencia [G<sub>10</sub>:C<sub>10</sub>] desde una superficie de vidrio

Se creó un patrón en un sustrato de vidrio mediante el uso de una interfaz de sustrato de biotina/estreptavidina de modo que el ADNmc objetivo está confinado a pequeñas islas en la superficie del sustrato. [ver, por ejemplo, Nakamura S, Mitomo H, Aizawa M, Tani T, Matsuo Y, Niikura K, Pike AR, Naya N, Shishido A, Ijro K. DNA Brush-Directed Vertical Alignment of Extensive Gold Nanorod Arrays with Controlled Density. ACS Omega, 2017, 2 (5), 2208-2213]. Esto demuestra que la capacidad de procesamiento de la enzima Z3 no se ve obstaculizada por el tipo de sustrato o el enfoque de funcionalización más complejo que involucra una proteína, la estreptavidina, dentro de la capa enlazadora. Después de la hibridación y extensión realizadas como se describió anteriormente, se aplicó entonces colorante verde SYBR a la superficie. La imagen de fluorescencia en la Figura 3d muestra que las áreas de ADN exhiben fluorescencia, mientras que los carriles desnudos intermedios no responden. Esta es una demostración directa del potencial de multiplexación del enfoque en el que cada punto de ADN es una secuencia diferente. Para confirmar que el ADN aumentó en longitud mientras estaba unido a la superficie, el ADNbc final en la superficie se deshibridó al calentar la superficie a 95 °C en agua (1 ml x 2). Por lo tanto, esta hebra complementaria que no está unida a la superficie se retira de la superficie en los dos lavados con calentamiento. Se usó AFM para confirmar la presencia de ADNmc largo al tomar una muestra de 5 µl de los lavados combinados y aplicarla sobre mica recién escindida mediante peinado molecular en un intento de extender la molécula flexible. Las hebras de ADNmc parecen estar agregándose, lo cual es típico del ADNmc en una superficie de mica, sin embargo, se observan algunas hebras individuales con una altura promedio de 0,5 nm, similar a las dimensiones anteriores informadas para el ADNmc. Se realizó un análisis de longitud en las hebras individuales que dio un intervalo de 160-300 pb, lo que confirma una extensión exitosa fuera de la superficie. La extensión de [GATC]<sub>5</sub>/[CTAG]<sub>5</sub> en solución da como resultado una longitud promedio de 750 pb observada mediante electroforesis en gel de agarosa y AFM.

Curiosamente, las mediciones del ángulo de contacto mostraron un aumento de 25,6° para la superficie inicial de ADNbc oligosemilla a 74,8° para la superficie de ADNbc extendido enzimáticamente.

#### 7. Extensión de la secuencia Bat25

Las inestabilidades de microsatélites, MSI, son marcadores de inestabilidad genética encontrados en la mayoría de los tumores de pacientes con cáncer colorrectal hereditario y en varios cánceres colorrectales esporádicos.<sup>16</sup> Las MSI son secuencias repetidas de mononucleótidos no codificantes que muestran diferencias en la longitud de los alelos en las células tumorales en comparación con los alelos de ADN normales del mismo paciente, ya sea debido a deleciones o inserciones. Uno de los marcadores de repeticiones de mononucleótidos más usados comúnmente para la identificación de MSI es la secuencia BAT25, una unidad de repetición de poliT. La secuencia BAT25 puede usarse sin comparación con el ADN normal e involucra deleciones de bases significativas en prácticamente todos los tumores que muestran MSI.<sup>16</sup> Comprender el tipo de MSI permite identificar el tipo de tumor y puede anticipar la respuesta quimioterapéutica del paciente. Existe una necesidad de un método rápido, sensible y reproducible para la identificación de la MSI que permita un diagnóstico y tratamiento rápidos.

Los métodos actuales para el reconocimiento de las MSI involucran el uso de un panel especialmente diseñado, el panel Bethesda, en el que se detectan 5 marcadores de microsatélites; los marcadores de repetición de mononucleótidos, BAT25 y BAT26, y los marcadores de repetición de dinucleótidos, D2S123, D5S346 y D17S250. Si 2-5 de los marcadores están mutados, se considera que el paciente tiene elevadas inestabilidades de microsatélites, MSI-H. Sin embargo, existen discrepancias en la especificidad y sensibilidad coherentes del panel, lo que limita la confiabilidad de la prueba.<sup>17</sup>

Por lo tanto, la identificación de la MSI mediante el método de extensión descrito en la presente descripción disminuiría el tiempo de diagnóstico y aumentaría la sensibilidad. La detección simultánea de varios marcadores de MSI a partir de una muestra de ADN podría lograrse si se usan en una matriz. Se usó la secuencia de repeticiones de mononucleótidos BAT25 para probar la eficiencia de este método para la detección de inestabilidades de microsatélites. La sonda y las hebras objetivo usadas para formar la oligosemilla BAT25 se muestran en la Tabla 3. La extensión del dúplex modificado con amino se probó en solución antes de intentar la extensión fuera de la superficie.

Tabla 3. Secuencias de ADN modificadas con amino usadas para la extensión de BAT25

Nombre	Secuencia (X = amino-c6)
BAT25-sonda	5' - X - GAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAC - 3' (SEQ ID NO: 17)
BAT25-objetivo	5' - GTTTTTTTTTTCGTTTTTTTTTTC - 3' (SEQ ID NO: 18)

Los productos de la extensión de BAT25 se analizaron mediante electroforesis en gel (ver la Figura 8a) y poseían una longitud modal de 2000 pb. GATC-biotech llevó a cabo la secuenciación de Sanger del ADN en un producto de extensión de 5 ciclos para la secuencia BAT25 (ver la Figura 8d). Los resultados de la secuenciación confirmaron la incorporación precisa de cada base mediante la ADN polimerasa. La secuenciación del ADN no fue posible para las secuencias GATC y CFTR, sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, esto se debe posiblemente a los desafíos asociados con las secuencias de ADN ricas en GC. Tanto la secuencia GATC como la CFTR contienen un 50 % de contenido de GC.

La longitud del ADN para la secuencia BAT25 fue más larga en comparación con las secuencias GATC y CFTR con una concentración más alta de 618 ng/μl, lo que indica una extensión mejorada. La longitud en pb varió de aproximadamente 750 pb a 3000 pb, lo que también se confirmó mediante análisis por AFM de los productos de extensión de ADNbc (Figura 9). Se calculó que la altura promedio del ADNbc era 0,87 nm y la longitud del ADN variaba de 130 a 1500, coherente con el análisis en gel. La secuencia BAT25 se extendió fuera de la superficie después de la unión de la oligosemilla modificada con amino. La adición de PG reveló un aumento de la fluorescencia para el ADNext en comparación con las oligosemillas inmovilizadas cortas (ver la Figura 10).

Se observó el mismo aumento en la medición del ángulo de contacto para la secuencia de ADNext de BAT25 que para la secuencia CFTR.

Tabla 4. Ángulos de contacto de una gota de agua en la superficie de ADNmc, ADNbc y ADNext para la secuencia BAT25.

Muestra	Ángulo de contacto /°
ADNmc	29,64
ADNbc	25,58
ADNext	74,84

Las cadenas de ADN bicatenario extendido (ADNbcext) se deshidraron como se describe en 8.5 más abajo y se peinaron sobre mica recién escindida para el análisis por AFM (ver la Figura 11). Debido a la susceptibilidad del ADN monocatenario rico en AT a plegarse y apilarse,<sup>18,19</sup> una gran cantidad de hebras parecían agregadas, sin embargo, varias hebras estaban alargadas y disponibles para el análisis de altura y longitud. La altura promedio de las hebras individuales fue 0,5 nm con una longitud promedio de 70 nm correspondiente a 200 pb.

La intensidad de fluorescencia potenciada para la secuencia BAT25 fue mayor que la observada en las secuencias GATC y CFTR. Una comparación de la electroforesis en gel y la intensidad de fluorescencia para las secuencias GATC, CFTR y BAT25 (ver la Figura 12) confirmó la extensión más larga tanto en solución como fuera de la superficie.

La extensión de la secuencia BAT25 mostró el mayor aumento en la intensidad de fluorescencia en comparación con las otras secuencias estudiadas y tiene importancia médica, por lo que las secuencias BAT25 se usaron para investigaciones adicionales sobre las aplicaciones de detección del dispositivo.

Tabla 5. Secuencias con errores de emparejamiento que se rehibridarán con la sonda BAT25 (para la Figura 18)

Error de emparejamiento de sola base	5'-GTTTTTTTTTTC-3' (SEQ ID NO: 16)
Error de emparejamiento de dos bases	5'-GTTTTTTTTTC-3' (SEQ ID NO: 25)
Error de emparejamiento de tres bases	5'-GTTTTTTTTTC-3' (SEQ ID NO: 26)

## 8. Optimización de parámetros

A pesar de la marcada diferencia en la intensidad de fluorescencia del ADNext en comparación con la oligosemilla corta, se llevaron a cabo varios parámetros para mejorar la sensibilidad y la confiabilidad.

PG se establece como un intercalador de ADNbc independientemente de los pares de bases. Otros colorantes fluorescentes potenciales que son específicos de secuencia podrían potenciar aún más el cambio de intensidad de fluorescencia para las muestras de ADNext. La secuencia BAT25 es rica en AT, por lo tanto se analizó la idoneidad de la tinción fluorescente DAPI. DAPI es una tinción popular debido al aumento de 20 veces en la fluorescencia al unirse a regiones AT en ADNbc.<sup>20</sup> Se colocó solución DAPI en la superficie durante 20 min y se obtuvieron imágenes fluorescentes con excitación a 360 nm y se observó la diferencia en la intensidad de fluorescencia (Figura 13). La intensidad de fluorescencia (FI) para la muestra de ADNext fue menor que para la de ADNbc corta. La diferencia entre ADNbc y ADNext mediante el uso de PG se observó coherentemente en mayor grado, por lo tanto se continuó el uso de PG.

PG se usa tradicionalmente en un tampón Tris-EDTA, TE,<sup>21</sup> sin embargo, al colocar la solución de PG-TE en la superficie, se observaron varios puntos de sal que no se veían si el PG se depositaba en H<sub>2</sub>O nanopura (ver la Figura 14b). La FI para PG en H<sub>2</sub>O también fue significativamente mayor que cuando PG estaba en TE, por lo tanto, para estudios futuros, PG se disolvió en H<sub>2</sub>O.

Muchos artículos indican que el tiempo de unión del PG es casi instantáneo tras la interacción con el ADN,<sup>21</sup> sin embargo, con el ADN ubicado en la superficie, la intercalación de PG en el ADN podría tardar más. Se colocó PG sobre superficies de ADNext durante tiempos variables y se compararon las intensidades de fluorescencia (ver la Figura 15). Después de un aumento consecutivo en la FI con incrementos de tiempo de 5 min, la FI disminuyó después de 20 min. Por lo tanto, para investigaciones subsecuentes, el PG se colocó en la superficie durante 20 min antes del lavado.

Todas las extensiones desde la superficie se llevaron a cabo inicialmente en portaobjetos de vidrio tallados para microscopio. Para ver si se observa el mismo fenómeno en una superficie diferente, el protocolo de extensión se realizó en una oblea de silicio. El método de extensión se llevó a cabo sobre obleas de silicio, tipo p (100) cortadas a 0,5 cm<sup>2</sup> y se aplicó PG a la superficie para obtener imágenes de fluorescencia (ver la Figura 16). Se observó un aumento en la fluorescencia desde el ADNbc corto hasta el ADNext; sin embargo, la diferencia fue menor que la observada en una superficie de vidrio. Sin embargo, todavía hubo una clara mejora para el ADNext, lo que destaca la versatilidad del método de extensión. No sólo la secuencia sino también la superficie pueden adaptarse a la aplicación deseada.

## 9. Análisis de los resultados

Los métodos descritos en la presente descripción permiten la síntesis de varias secuencias sonda de ADN en una superficie para potenciar la detección del objetivo. La invención aprovecha el método de síntesis enzimática del ADN (patente núm. GB17000531.5), que permite la síntesis rápida de ADN con unidades repetidas en solución. Las unidades repetidas pueden adaptarse para que coincidan con regiones de unión de moléculas de interés, tales como fragmentos de ADN indicativos de un estado patológico. Después de la desnaturalización (desenrollado del ADN bicatenario), cada hebra simple de ADN tiene varios sitios de unión en el eje vertical y, por lo tanto, maximiza las oportunidades de unión por hebra sonda unida a la superficie. La unión con fragmentos objetivo complementarios da como resultado una mayor intensidad de fluorescencia en comparación con el ADNbc corto en la superficie. La extensión aumenta el número de sitios de unión al objetivo por molécula sonda, lo que aumenta por tanto la detección del objetivo y la sensibilidad diagnóstica.

Los inventores han demostrado que la invención tiene una sensibilidad excelente, lo que aborda por tanto uno de los desafíos clave en el diagnóstico molecular, es decir, la detección de señales sobre el ruido de fondo. Debido a la generación de una señal potenciada, la sensibilidad de la invención tiene rutas que pueden aprovecharse en la detección de números bajos de moléculas de ADN objetivo, que a su vez no necesitan el uso extendido de tecnologías de preparación de muestras costosas y que consumen mucho tiempo, tal como la PCR. Alternativamente, el beneficio económico real de esta invención puede residir en la adquisición potenciada de datos. Esto, a su vez, significa que se requieren detectores menos sensibles y menos procesamiento de las señales, lo que promueve una mayor portabilidad de los dispositivos de diagnóstico. Un dispositivo de punto de atención, que incorpore esta tecnología, podría fabricarse de forma económica mediante el uso de partes, software y elementos de diseño más baratos, lo que en última instancia reduciría el desembolso financiero general. Los dispositivos de puntos de atención se beneficiarían de una tecnología habilitadora como la que se presenta aquí para que su fabricación se vuelva económica y apropiada para su realización portátil.

## Materiales y métodos experimentales

### Reactivos químicos

Todos los reactivos químicos se adquirieron de Sigma Aldrich y se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional. Los portaobjetos de vidrio se adquirieron de Henso Labware Manufacturing Co., Ltd (Hangzhou, China). APEGDMES se adquirió de NewChem Technologies Limited. El ADN se adquirió de Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemania). La Tgo-Pol Z3 exo- se preparó y purificó internamente. (Jozwiakowski, S. K. y Connolly, B. A. A modified family-B archaeal DNA polymerase with reverse transcriptase activity. *ChemBioChem* 12, 35-37 (2011). Evans, S. J. y otros, Improving dideoxynucleotide-triphosphate utilisation by the hyperthermophilic DNA polymerase from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res* 28, 1059-1066 (2000)).

### Hibridación de plantilla de cebador

Se prepararon dúplex de cebador para la extensión: Se añadió tampón de hibridación de ADN (Hepes 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM y EDTA 1 mM) a los oligómeros y se calentó a 95 °C durante 10 min. Las soluciones de dúplex se enfriaron lentamente hasta temperatura ambiente y se almacenaron a -20 °C.

ADN polimerasa

Para la extensión se utilizó la ADN polimerasa Tgo-Pol Z3 exo-. La enzima pertenece a la variante de baja fidelidad de polimerasa de la familia B de Archaeal con la actividad exonucleasa 3'→5' eliminada y alteraciones en el dominio de los dedos.

5 Extensión del ADN en solución

Se mezclaron dúplex de ADN 0,5 μM, ADN polimerasa Tgo-Pol Z3 exo- 200 nM, tampón de reacción de ADN polimerasa (Tris-HCl 200 mM (pH 8,8, 25 °C), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM, KCl 100 mM, Triton X-100 al 1 %, Albúmina Sérica Bovina (BSA) 1 mg/ml y MgSO<sub>4</sub> 20 mM), y desoxinucleotidotrifosfatos (dNTP) 0,5 mM (dCTP, dATP, dTTP y dGTP). Los termociclos de calor-enfriamiento se realizaron en un ciclador térmico Applied Bioscience Veritt de 96 pocillos para los siguientes ciclos:

Número de ciclos (20) x 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 min a 72 °C. La solución se enfrió hasta 4 °C después de la reacción. El producto de extensión del ADN se purificó mediante el uso del kit de purificación por PCR QIAquick (25) (QIAGEN, Manchester, Reino Unido) siguiendo el protocolo del fabricante.

15 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de extensión del ADN se analizaron mediante electroforesis en gel en tampón TBE (Tris, Ácido bórico y Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O). Se añadió agarosa al 1 % (Melford, Ipswich, Reino Unido) a tampón TBE al 1 % y se calentó hasta su completa disolución. La mezcla de gel se enfrió hasta 50 °C y se vertió en un casete de gel para que endureciera. Las escaleras de ADN, de 1 kb y 1 kb+, (Thermo Scientific) se proporcionaron con un colorante de carga (Ficoll-400 al 2,5 %, EDTA 11 mM, Tris-HCl 3,3 mM (pH 8,0, 25 °C), SDS al 0,017 % y azul de bromofenol al 0,015 %). Se añadieron 2 μl de colorante de carga de gel a las muestras de ADN (20 ng/μl) y se cargaron en los pocillos con gel. Los geles se procesaron a 100 V, 100 mA, 10 W durante aproximadamente 1 h. El gel se tiñó posteriormente con una solución de 5 μg/ml de bromuro de etidio y se visualizó mediante el uso de un transiluminador UV.

UV

La espectroscopia UV-Vis se realizó mediante el uso de un Nanodrop. El espectrómetro se blanqueó mediante el uso de H<sub>2</sub>O nanopura.

Pretratamiento de la superficie

Se cortaron portaobjetos de vidrio u obleas de Si<111> de tipo n en virutas de 0,5 cm<sup>2</sup>. Las virutas se limpiaron con acetona, IPA y NP-H<sub>2</sub>O y se sonicaron en acetona, IPA y NP-H<sub>2</sub>O durante 15 min secuencialmente y se secaron con N<sub>2</sub>. Las virutas se colocaron en un tratamiento con plasma de O<sub>2</sub> durante 15 min.

Unión de ADN oligosemilla mediante el enlazador APEGDMES

Las virutas previamente limpiadas se sumergieron en una solución de APEGDMES/tolueno (233 μM, 3 ml) precalentada a 65 °C durante 16 h. Las virutas se lavaron con tolueno, etanol y NP-H<sub>2</sub>O 3 veces secuencialmente antes de colocarlas en un horno de vacío a 120 °C durante 40 min. Se vertió gota a gota una solución de sonda de ADN etiquetada con amino (40 μl, 100 μM) en una solución de ácido acético al 10 % sobre las virutas durante 1 h en un ambiente húmedo. Se depositó NaCNBH<sub>3</sub> (40 μl, 16 μM) en solución de MeOH al 50 % encima de la solución de sonda durante 2 h adicionales en un ambiente húmedo. Las virutas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (0,5 x) y exceso de agua para eliminar cualquier exceso de moléculas de ADN. Las virutas se secaron con una corriente de nitrógeno.

Hibridación del ADN

Se vertió gota a gota una solución objetivo de ADN complementario (40 μl, 200 nM) en tampón PBS (0,5 x) sobre las virutas de silicio durante 15 min en un ambiente húmedo. Las virutas se lavaron con tampón PBS (0,5 x) durante 30 min y NP-H<sub>2</sub>O durante 30 min y después se secaron bajo una corriente de nitrógeno.

55 Extensión del ADN fuera de la superficie

Las virutas se colocaron en un Eppendorf junto con la solución requerida para los ciclos de calor-enfriamiento: ADN polimerasa 200 nM, tampón de reacción de ADN polimerasa (Tris-HCl 200 mM (pH 8,8, 25 °C), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM, KCl 100 mM, Triton X-100 al 1 %, Albúmina Sérica Bovina (BSA) a 1 mg/ml y MgSO<sub>4</sub> 20 mM), y desoxinucleotidotrifosfatos (dNTP) 0,5 mM (dCTP, dATP, dTTP y dGTP). Los termociclos de calor-enfriamiento se realizaron en un ciclador térmico Applied Bioscience Veritt de 96 pocillos para los siguientes ciclos: Número de ciclos (20) x 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 55 °C y 2 min a 72 °C.

La solución se enfrió hasta 4 °C después de la reacción. Las virutas se retiraron de la solución y se lavaron en NP-H<sub>2</sub>O durante 30 min y se secaron bajo una corriente de nitrógeno.

## Unión de ADN oligosemilla mediante el enlazador biotina-estreptavidina-biotina

Las superficies de vidrio se limpiaron mediante el uso de una solución piraña seguido de lavado con H<sub>2</sub>O y secado. Se añadió una solución de 2-carbometoxietiltriclorosilano en tolueno seco con una humedad < 25 %. Después de 1 h, el vidrio se lavó con acetona, etanol y después H<sub>2</sub>O, a continuación se rellenó con HCl y se dejó durante la noche. El vidrio se lavó minuciosamente con H<sub>2</sub>O y se cubrió con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida 50 mM y amina-PEG<sub>2</sub>-biotina 1 mM en Hepes 10 mM. Después de 1 hora, se lavó el vidrio seguido de pipeteo de 50 µl de estreptavidina 0,1 mg/ml en Tris 10 mM, pH 7,9 sobre la superficie. Después de 1 hora, se lavó el vidrio seguido de creación de un patrón mediante el uso de una fotomáscara UV e irradiación UV. A continuación, se lavó la superficie con Tris 10 mM, pH 7,9 y se añadieron 50 µl de C<sub>15</sub>-biotina 1 µM en Tris 10 mM, pH 7,9 y NaCl 200 mM al mismo punto. Después de 1 hora, la superficie se lavó con Tris-HCl 10 mM y se añadieron 50 µl de G<sub>15</sub> 1 µM, Tris-HCl 10 mM, pH 7,9 y NaCl 200 mM. Después de 1 hora, se lavó la superficie de vidrio y se rellenó con solución de polimerización; dCTP y dGTP 0,5 mM, Tgo-Pol Z3 exo- 200 nM, NaCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM en Tris HCl 15 mM, pH 7,6 y se inactivó mediante la eliminación de la solución de reacción y lavado con Tris 10 mM, pH 7,9 y NaCl 200 mM. La superficie se tiñó mediante el uso de SYBR Green.

## Obtención de imágenes por microscopio de fluorescencia

Las muestras se colocaron en una plataforma de obtención de imágenes AxioShop 2 plus (Zeiss, Alemania), configurada para filtro 44, con un lente objetivo Plan-NEOFLUAR 10 x/ 0,3 (Zeiss). La muestra se excitó a 490 nm con una lámpara de mercurio ebq100 (LEJ, Alemania) y se tomaron imágenes mediante el uso de una AxioCam HRm (Zeiss).

## AFM

La capa superior de la superficie de la mica se escindió mediante el uso de cinta adhesiva. Se colocaron 5 µl de muestra de ADN (ya sea 2 ng/µl o 4 ng/µl) sobre la superficie de mica mantenida en un ángulo de 25° para permitir que el ADN fluyera a través de la superficie de la mica. Después de 5 min, se dejó caer 5 µl de H<sub>2</sub>O nanopura sobre la muestra de ADN, nuevamente en un ángulo de 25°. Se pasó una suave corriente de N<sub>2</sub> sobre la superficie y después se secó aún más bajo un flujo laminar durante 1 h. Las imágenes de AFM se obtuvieron mediante el uso de un Dimension V con un controlador de nanoscopio (Veeco Instruments Inc., Metrology Group, Santa Bárbara, CA) sobre una mesa de aislamiento (Veeco Inc., Metrology Group) para reducir la interferencia. Para la obtención de datos se usó el software NanoScope Analysis 1.8.

## Angulo de contacto

Las mediciones del ángulo de contacto se realizaron en un KSV Cam 101 (KSV Instruments Ltd., Finlandia) mediante el uso del software CAM 2008 incorporado. Se dejó caer una gota de 1 µl de NP-H<sub>2</sub>O sobre la superficie. El software se usó para estimar el ángulo de la gota de agua en la superficie. Se obtuvieron 10 mediciones para cada muestra. Se descartaron las mediciones recolectadas en las que había más de 2° de diferencia en el ángulo izquierdo y derecho de la gota. Además, se descartaron las mediciones que estaban a más de 2 desviaciones estándar del valor promedio.

Se llama la atención del lector sobre todos los artículos y documentos presentados simultáneamente o con anterioridad a esta descripción en relación con esta solicitud y que están abiertos a la inspección pública con esta descripción, y el contenido de todos esos artículos y documentos se incorpora en la presente descripción como referencia.

Todas las características descritas en esta descripción (lo que incluye cualquier reivindicación, resumen y figuras adjuntas) y/o todas las etapas de cualquier método o proceso así descrito, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto las combinaciones donde al menos algunas de esas características y/o etapas son mutuamente excluyentes.

Cada característica descrita en esta descripción (lo que incluye cualquier reivindicación, resumen y figuras adjuntas) puede ser reemplazada por características alternativas que tengan el mismo propósito, equivalente o similar, a menos que se indique expresamente de cualquier otra manera. Así, a menos que se declare expresamente lo contrario, cada característica descrita es solamente un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

La invención no se restringe a los detalles de ninguna modalidad anterior. La invención se extiende a cualquier nueva característica o cualquier nueva combinación de las características descritas en esta descripción (lo que incluye cualquier reivindicación, resumen y figuras adjuntas) o a cualquier nueva característica o cualquier nueva combinación, de las etapas de cualquier método o proceso así revelado.

## Referencias

- 1 Gong, P. y Levicky, R. DNA surface hybridization regimes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 5301-5306 (2008).
- 2 Metzker, M. L. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics* 11, 31 (2009).

- 3 Valignat, M.-P., Theodoly, O., Crocker, J. C., Russel, W. B. y Chaikin, P. M. Reversible self-assembly and directed assembly of DNA-linked micrometer-sized colloids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4225-4229 (2005).
- 5 4 Bracha, D., Karzbrun, E., Shemer, G., Pincus, P. A. y Bar-Ziv, R. H. Entropy-driven collective interactions in DNA brushes on a biochip. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 4534-4538 (2013).
- 5 Wang, C. y otros, DNA microarray fabricated on poly(acrylic acid) brushes-coated porous silicon by in situ rolling circle amplification. *Analyst* 137, 4539-4545 (2012).
- 6 Jozwiakowski, S. K. y Connolly, B. A. A Modified Family-B Archaeal DNA Polymerase with Reverse Transcriptase Activity. *ChemBioChem* 12, 35-37 (2011).
- 10 7 Whitfield, C. J., Turley, A. T., Tuite, E. M., Connolly, B. A. y Pike, A. R. Enzymatic Method for the Synthesis of Long DNA Sequences with Multiple Repeat Units. *Angewandte Chemie International Edition* 54, 8971-8974, doi:10.1002/anie.201502971 (2015).
- 8 Terpilowski, K. y Rymuszka, D. Surface properties of glass plates activated by air, oxygen, nitrogen and argon plasma. *Glass Physics and Chemistry* 42, 535-541 (2016).
- 15 9 Dragan, A. I. y otros, Characterization of PicoGreen Interaction with dsDNA and the Origin of Its Fluorescence Enhancement upon Binding. *Biophysical Journal* 99, 3010-3019 (2010).
- 10 Li, J. y otros, A convenient method of aligning large DNA molecules on bare mica surfaces for atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research* 26, 4785-4786 (1998).
- 20 11 Hansma, H. G., Sinsheimer, R. L., Li, M.-Q. y Hansma, P. K. Atomic force microscopy of single- and double-stranded DNA. *Nucleic Acids Research* 20, 3585-3590 (1992).
- 12 Hansma, H. G., Revenko, I., Kim, K. y Laney, D. E. Atomic Force Microscopy of Long and Short Double-Stranded, Single-Stranded and Triple-Stranded Nucleic Acids. *Nucleic Acids Research* 24, 713-720 (1996).
- 13 Mattheyses, A. L., Simon, S. M. y Rappoport, J. Z. Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. *Journal of Cell Science* 123, 3621-3628 (2010).
- 25 14 R. A. Bartoszewski y otros, A Synonymous Single Nucleotide Polymorphism in  $\Delta F508$  CFTR alters the Secondary Structure of the mRNA and the Expression of the Mutant Protein. *J. Bio. Chem* 285, 28741-28748 (2010).
- 15 Costa, D., Miguel, M. G. y Lindman, B. Responsive Polymer Gels: Double-Stranded versus Single-Stranded DNA. *The Journal of Physical Chemistry B* 111, 10886-10896 (2007).
- 30 16 Zhou, X.-P. y otros, Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes, Chromosomes and Cancer* 21, 101-107 (1998).
- 17 Umar, A. y otros, Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 261-268 (2004).
- 35 18 Luzzati, V., Mathis, A., Masson, F. y Witz, J. Structure transitions observed in DNA and poly A in solution as a function of temperature and pH. *Journal of Molecular Biology* 10, 28-41 (1964).
- 19 Mills, J. B., Vacano, E. y Hagerman, P. J. Flexibility of single-stranded DNA: use of gapped duplex helices to determine the persistence lengths of Poly(dT) and Poly(dA)<sup>11</sup> Edited by B. Honig. *Journal of Molecular Biology* 285, 245-257 (1999).
- 40 20 Kapuscinski, J. DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe. *Biotechnic & Histochemistry* 70, 220-233 (1995).
- 21 Singer, V. L., Jones, L. J., Yue, S. T. y Haugland, R. P. Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation. *Analytical Biochemistry* 249, 228-238 (1997).
- 45 22 Dodge, A., Turcatti, G., Lawrence, I., de Rooij, N. F. y Verpoorte, E. A Microfluidic Platform Using Molecular Beacon-Based Temperature Calibration for Thermal Dehybridization of Surface-Bound DNA. *Analytical Chemistry* 76, 1778-1787 (2004).
- 23 Lockett, M. R. y Smith, L. M. Fabrication and Characterization of DNA Arrays Prepared on Carbon-on-Metal Substrates. *Analytical Chemistry* 81, 6429-6437 (2009).
- 50 24 Eda, G., Fanchini, G. y Chhowalla, M. Large-area ultrathin films of reduced graphene oxide as a transparent and flexible electronic material. *Nature Nanotechnology* 3, 270 (2008).
- 25 Le, L. T., Ervin, M. H., Qiu, H., Fuchs, B. E. y Lee, W. Y. Graphene supercapacitor electrodes fabricated by inkjet printing and thermal reduction of graphene oxide. *Electrochemistry Communications* 13, 355-358 (2011).
- 26 He, Q. y otros, Centimeter-Long and Large-Scale Micropatterns of Reduced Graphene Oxide Films: Fabrication and Sensing Applications. *ACS Nano* 4, 3201-3208 (2010).
- 55 27 Mohanty, N. y Berry, V. Graphene-Based Single-Bacterium Resolution Biodevice and DNA Transistor: Interfacing Graphene Derivatives with Nanoscale and Microscale Biocomponents. *Nano Letters* 8, 4469-4476 (2008).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de termociclado para producir una micromatriz de secuencias de ADN, que comprenden cada una repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud en un polinucleótido lineal, el método comprende las etapas de:
  - 10 i) proporcionar un sustrato sólido con una superficie, la superficie tiene inmovilizada sobre ella una pluralidad de polinucleótidos cebadores monocatenarios distintos que comprenden cada uno al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud,
  - 15 ii) poner en contacto los polinucleótidos cebadores inmovilizados con polinucleótidos plantilla monocatenarios que comprenden al menos dos repeticiones en tándem que son complementarias a la secuencia unitaria de los polinucleótidos cebadores en condiciones de hibridación que permitan la formación de dúplex con errores de emparejamiento entre una secuencia unitaria y su complemento, de manera que se genera un saliente 5' del polinucleótido plantilla, en donde el saliente 5' comprende al menos una repetición en tándem que es complementaria a la secuencia unitaria del polinucleótido cebador;
  - 20 iii) poner en contacto los dúplex con errores de emparejamiento con una polimerasa 5' a 3' termoestable y nucleótidos en condiciones de extensión que permitan la extensión del polinucleótido en una dirección 5' a 3';
  - iv) desnaturalizar el dúplex de iii) en condiciones de desnaturalización para generar al menos dos polinucleótidos inmovilizados monocatenarios diferentes; y
  - v) repetir las etapas ii) a iii) para aumentar el número de repeticiones en tándem en los polinucleótidos inmovilizados.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en donde el sustrato sólido con una superficie que tiene inmovilizada sobre ella una pluralidad de polinucleótidos cebadores lineales monocatenarios diferentes que comprenden cada uno al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud, se proporciona al: inmovilizar al menos dos polinucleótidos cebadores lineales bicatenarios diferentes que comprenden cada uno al menos dos repeticiones en tándem de una secuencia unitaria que tiene de 1 a 60 nucleótidos de longitud en la superficie del sustrato sólido; y desnaturalizar los polinucleótidos cebadores lineales bicatenarios para proporcionar los polinucleótidos cebadores lineales monocatenarios.
- 30 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el polinucleótido cebador inmovilizado comprende al menos 2, al menos 5, al menos 10 o al menos 15 repeticiones en tándem de la secuencia unitaria, opcionalmente en donde la secuencia unitaria es una secuencia microsátélite que tiene de 2 a 9 nucleótidos o una secuencia minisátélite que tiene de 10 a 60 nucleótidos.
- 35 4. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde los polinucleótidos lineales se inmovilizan en la superficie mediante enlaces covalentes o no covalentes, opcionalmente en donde los polinucleótidos lineales se inmovilizan de forma no covalente en una región químicamente modificada de la superficie.
- 40 5. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde los polinucleótidos se inmovilizan en la superficie mediante un enlazador.
- 45 6. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde el polinucleótido lineal es ADN monocatenario o bicatenario.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, en donde la superficie comprende vidrio, sílice, oro, grafeno u óxido de grafeno, epoxi, plástico, metal, matriz de gel, metales decapados plantilla o compuestos de estos.
- 50 8. El método de la reivindicación 7, en donde el enlazador comprende una molécula enlazadora de silano, un complejo biotina-estreptavidina, un enlazador tiol-Au, enlaces covalentes Si-C con silicio, enlaces covalentes Si-O con silicio, enlaces covalentes Si-N con silicio, un enlazador de nanopartículas o un enlace covalente dinámico.

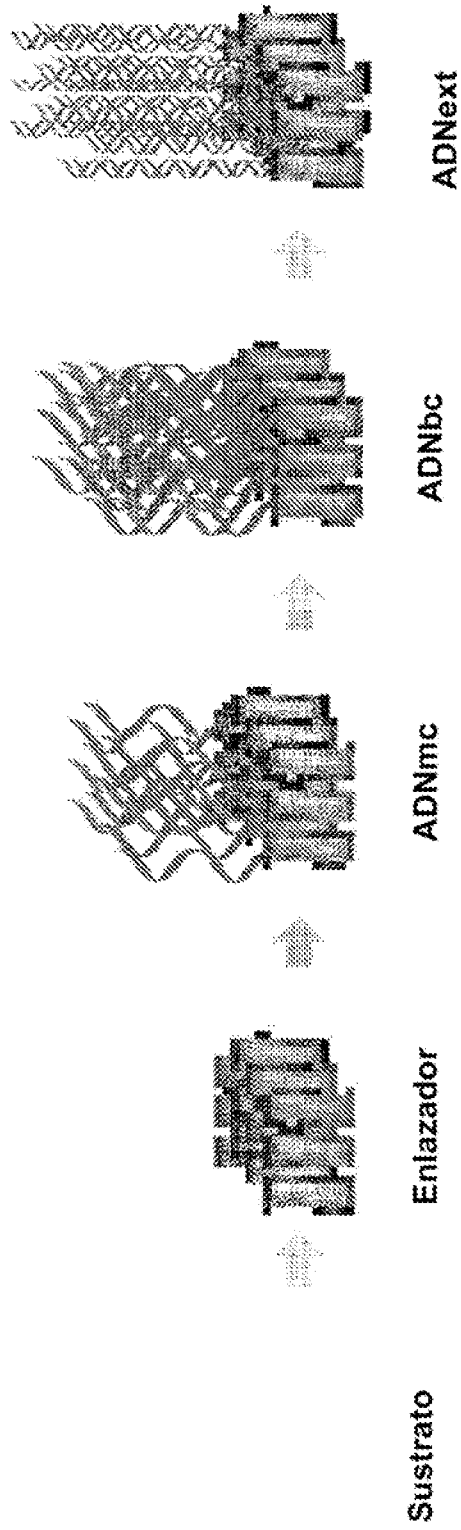


FIGURA 1

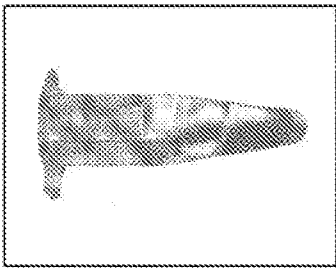


FIGURA 2A

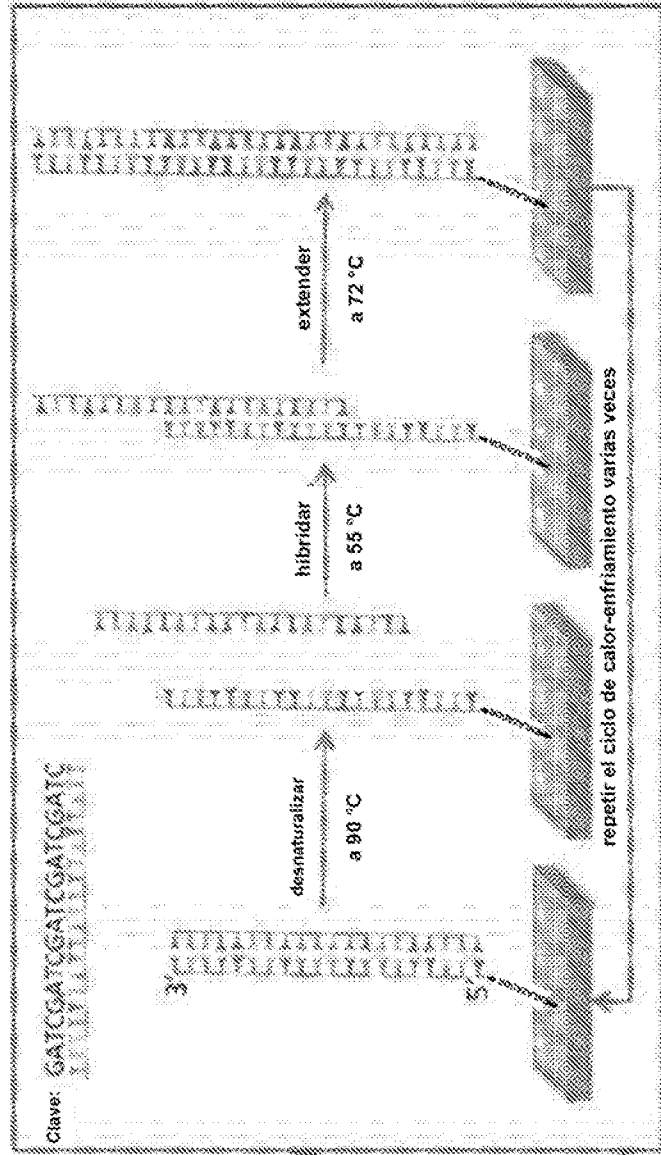


FIGURA 2B

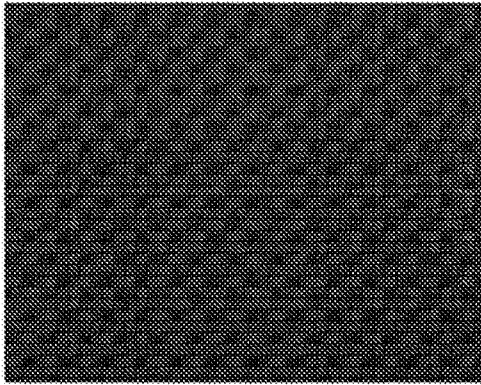


FIGURA 3A

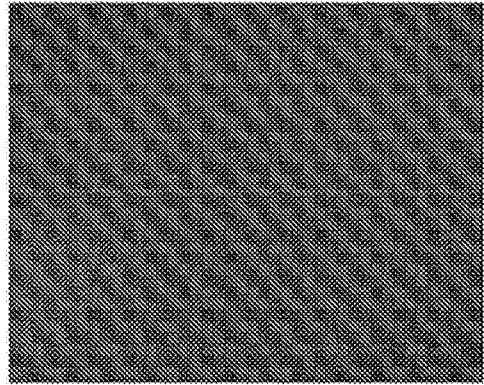


FIGURA 3B

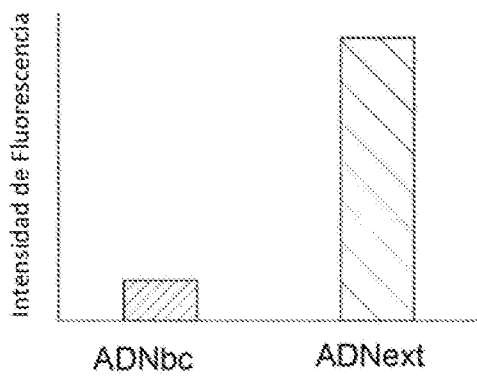


FIGURA 3C

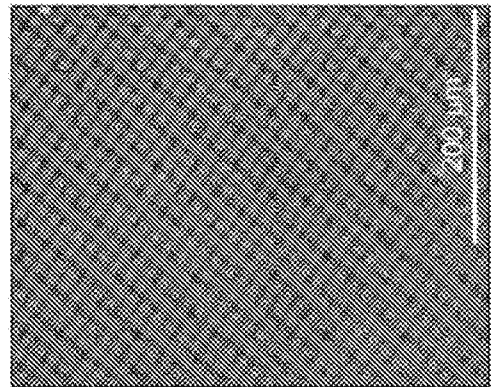


FIGURA 3D

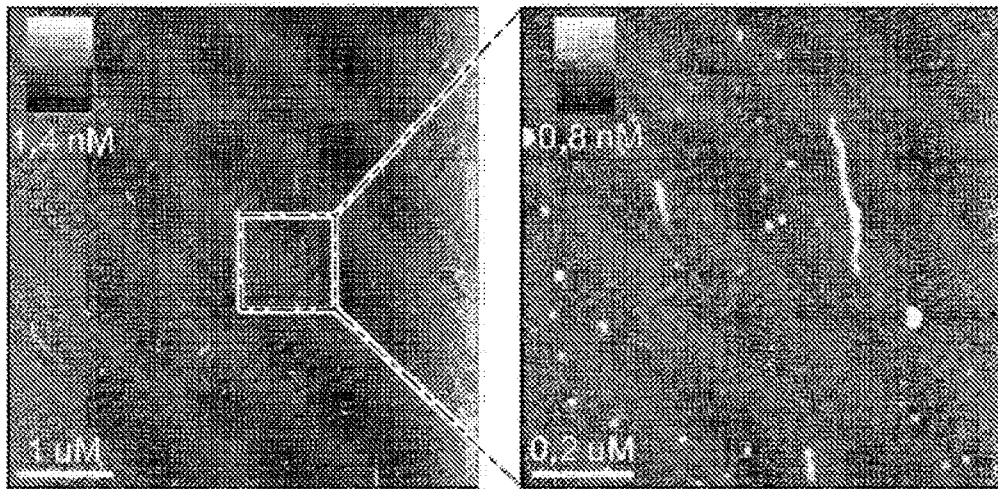


FIGURA 4A

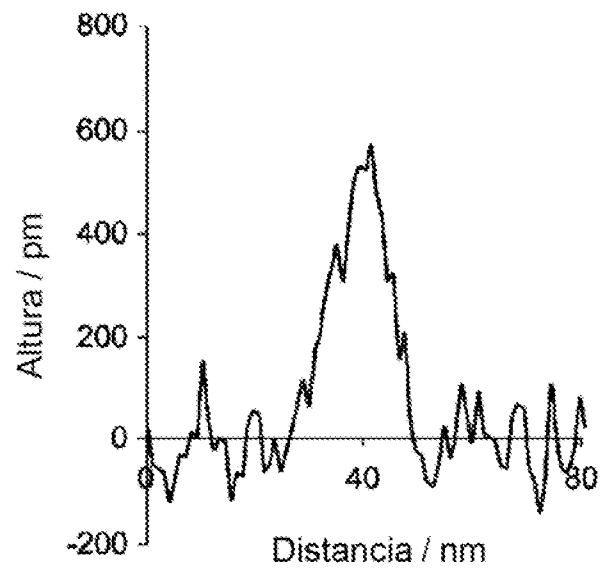


FIGURA 4B

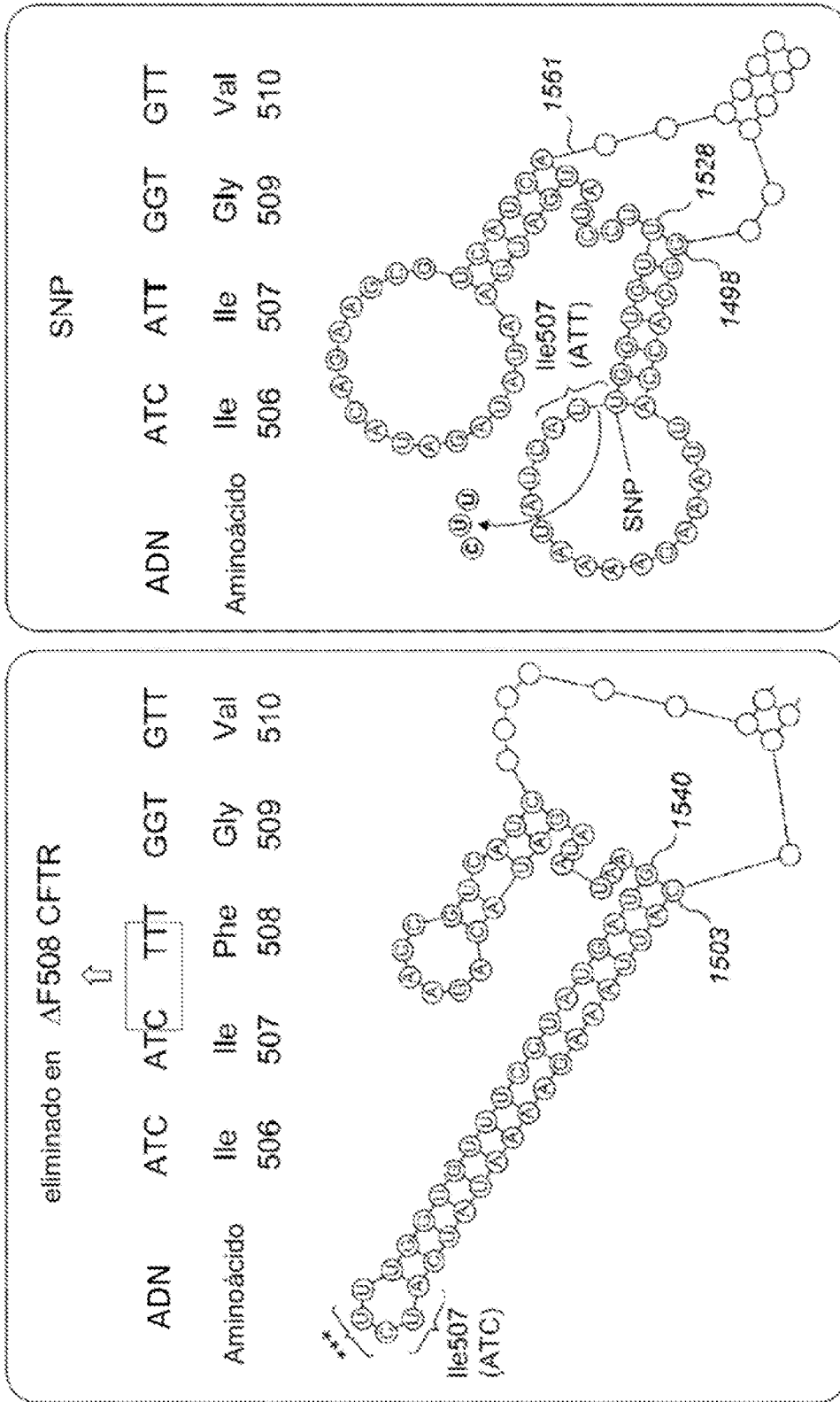


FIGURA 5

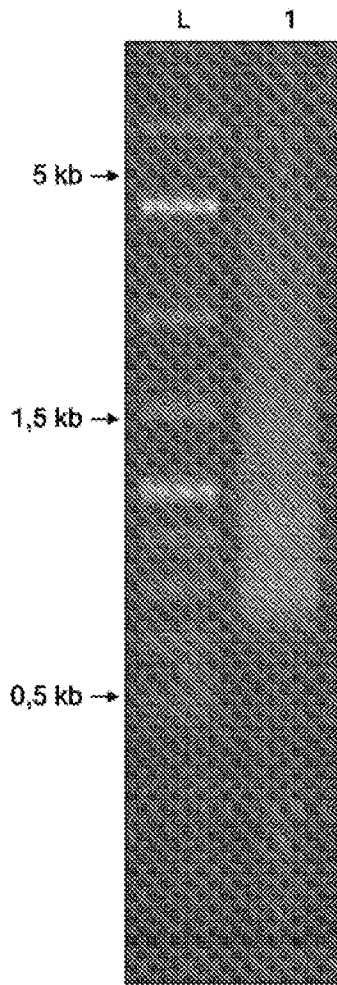


FIGURA 6A

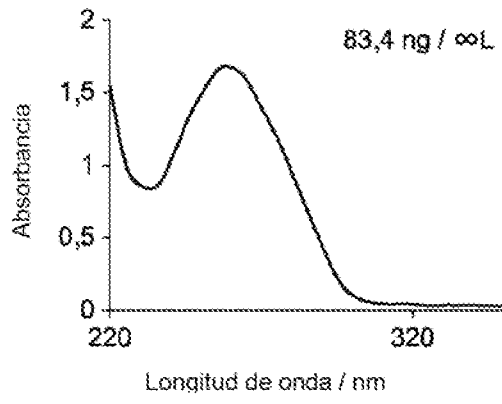


FIGURA 6B

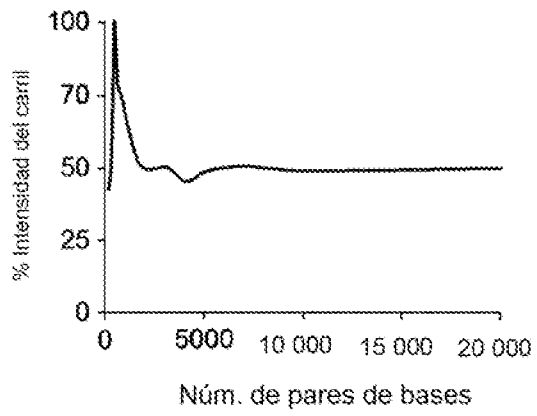


FIGURA 6C

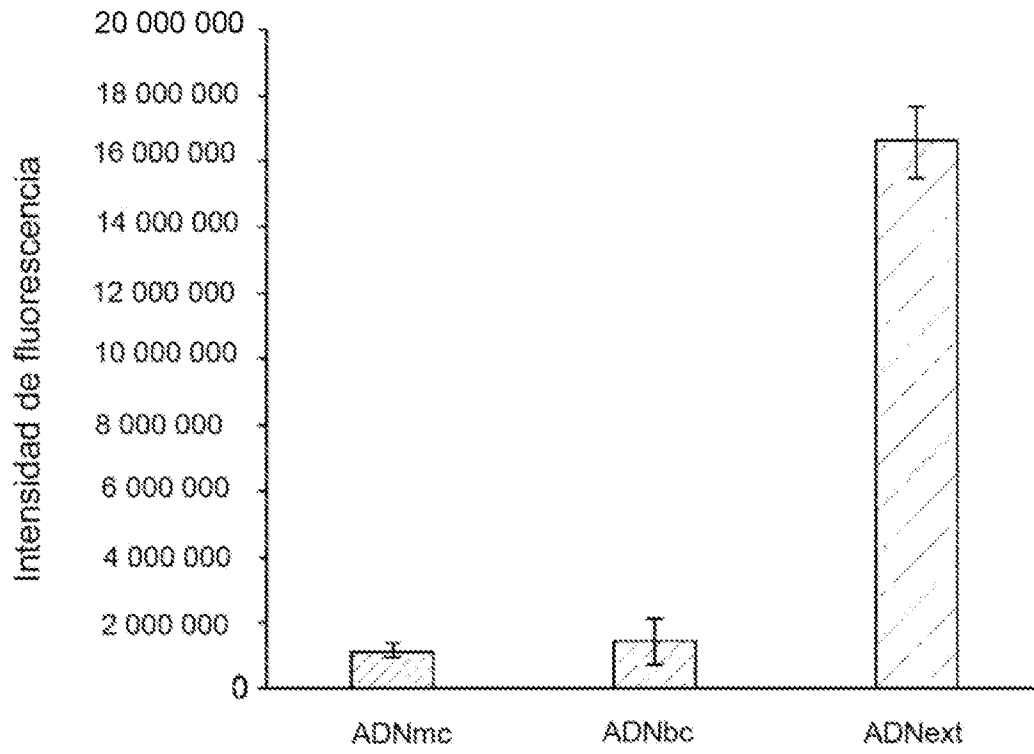


FIGURA 7A

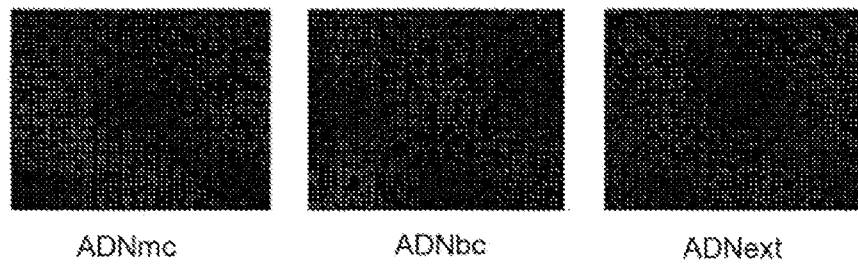


FIGURA 7B

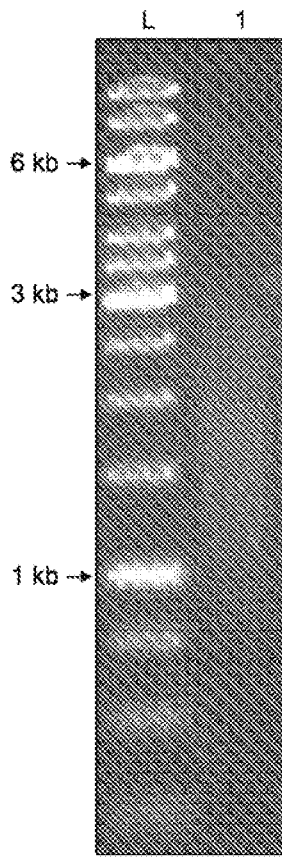


FIGURA 8A

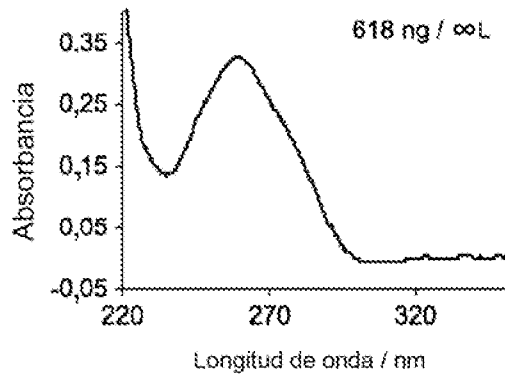


FIGURA 8B

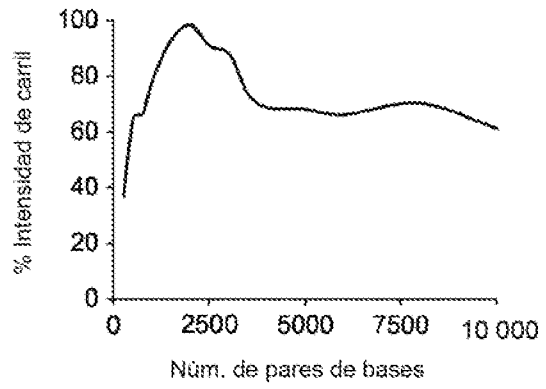


FIGURA 8C

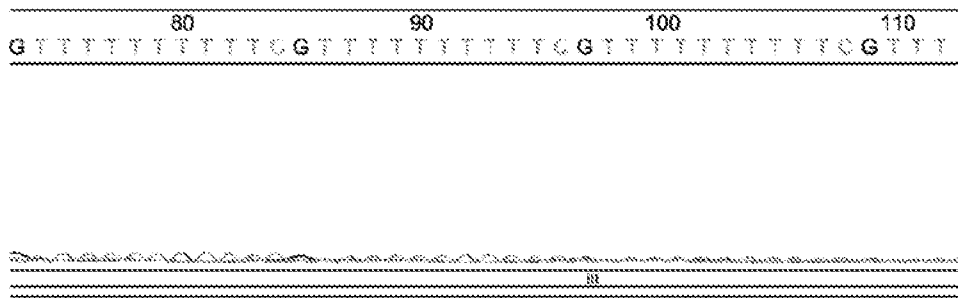
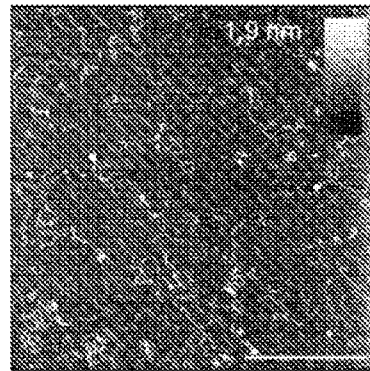


FIGURA 8D



Peso promedio: 0,872 nm  $\pm$  -0,27  
Longitud promedio: 222 nm  $\pm$  -109  
Intervalo de longitud: 130 - 1500 bp

FIGURA 9

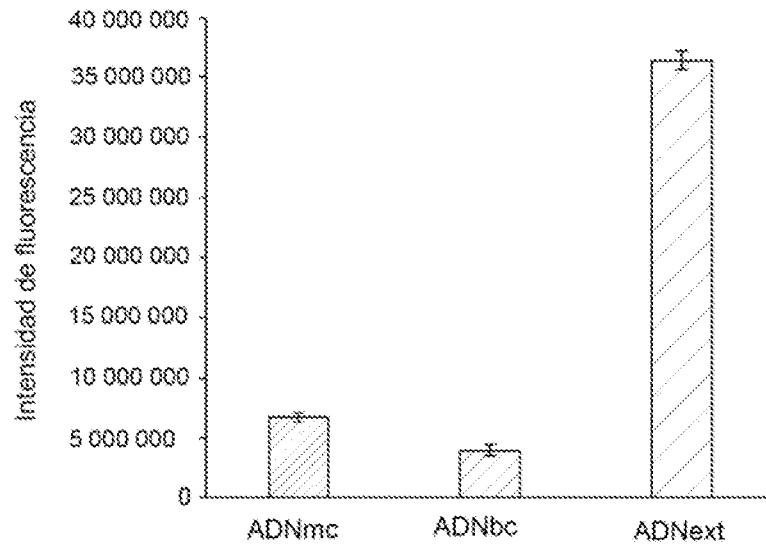


FIGURA 10A

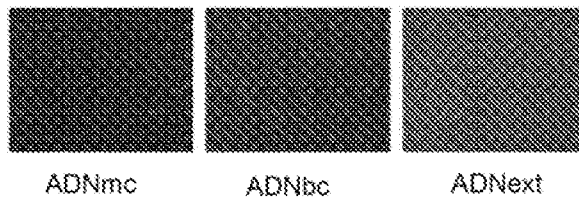


FIGURA 10B

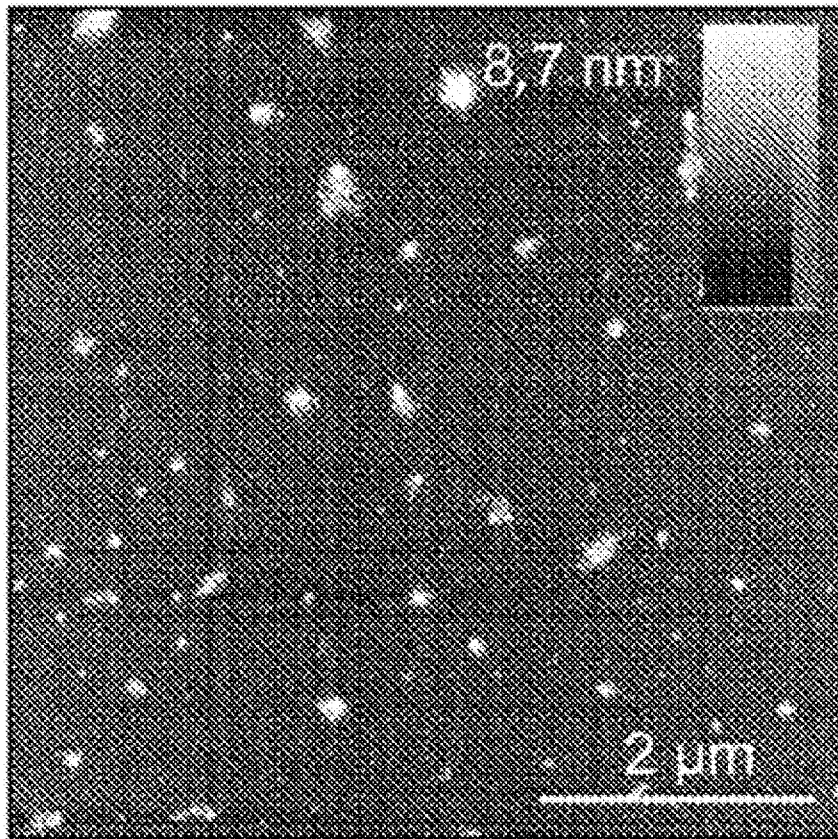


FIGURA 11

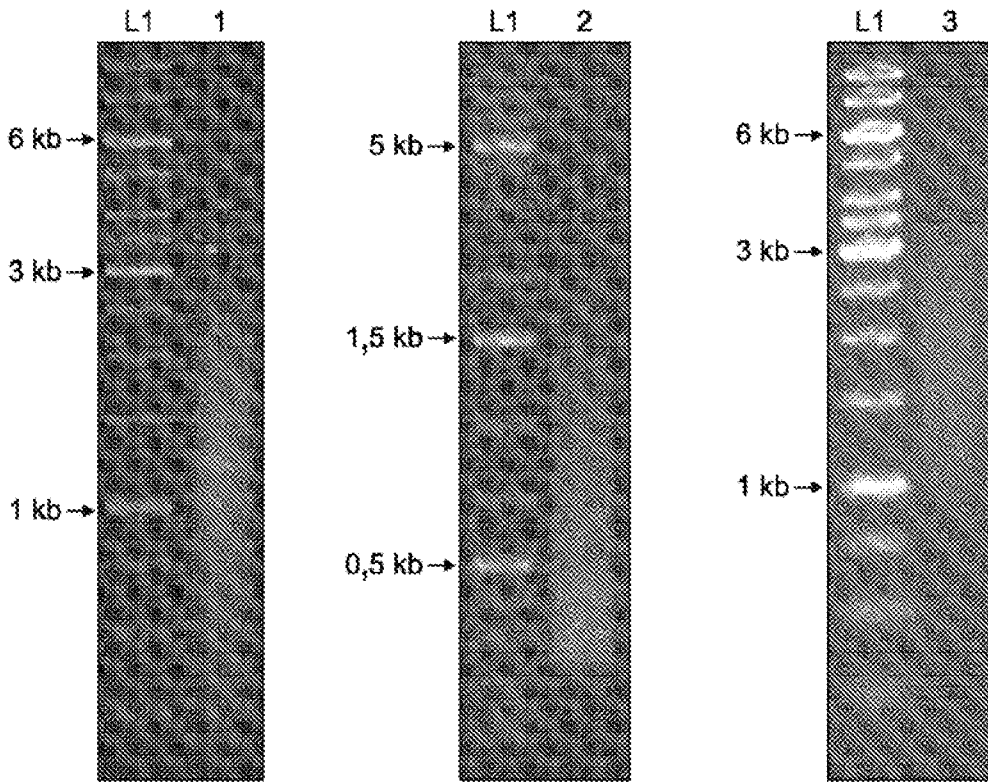


FIGURA 12A

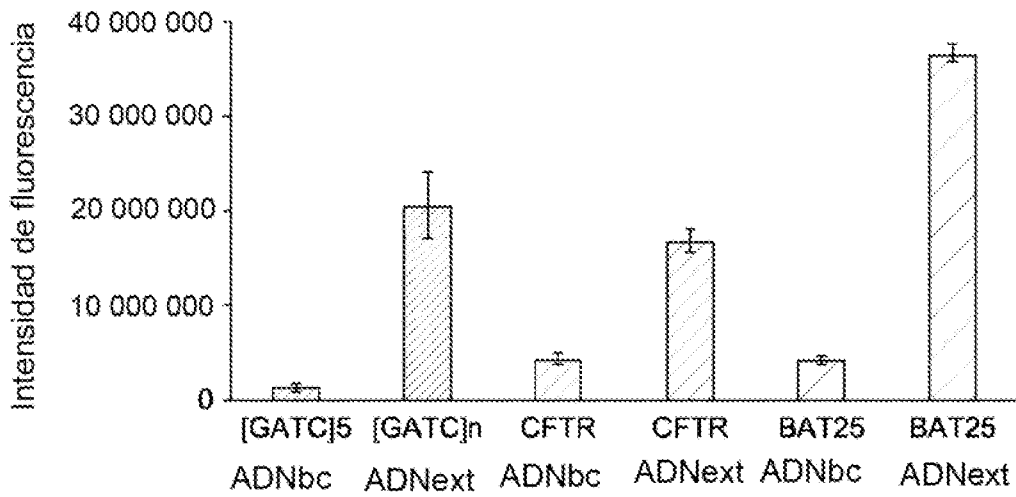


FIGURA 12B

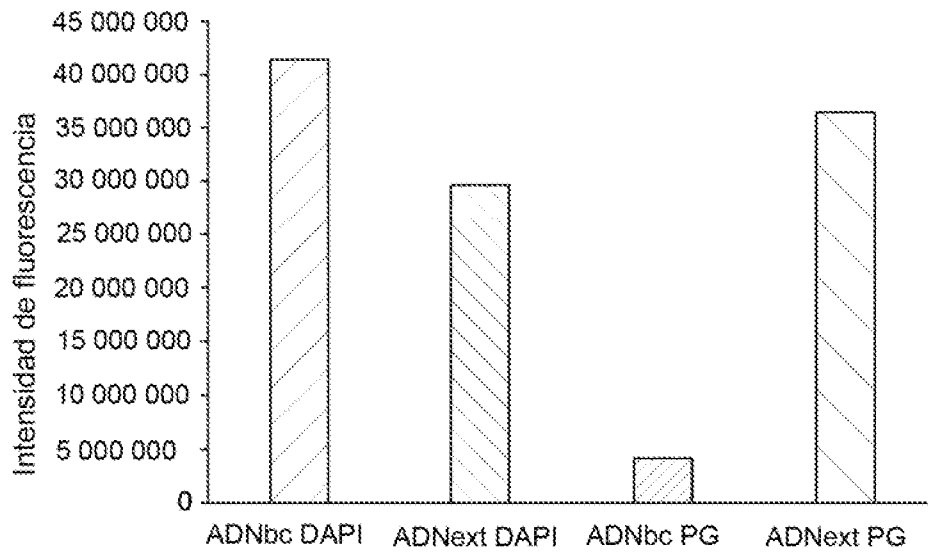


FIGURA 13

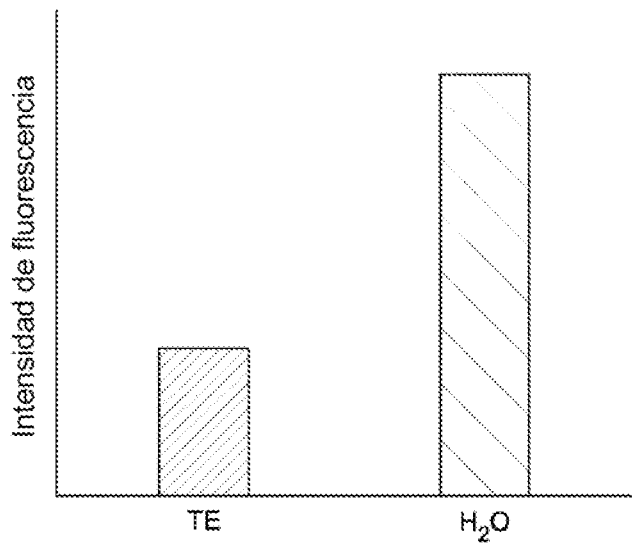


FIGURA 14A

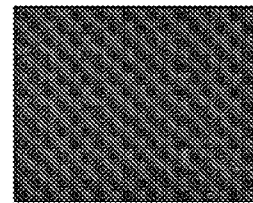


FIGURA 14B

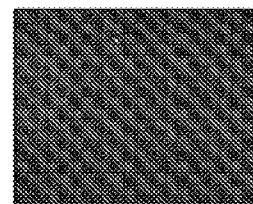


FIGURA 14C

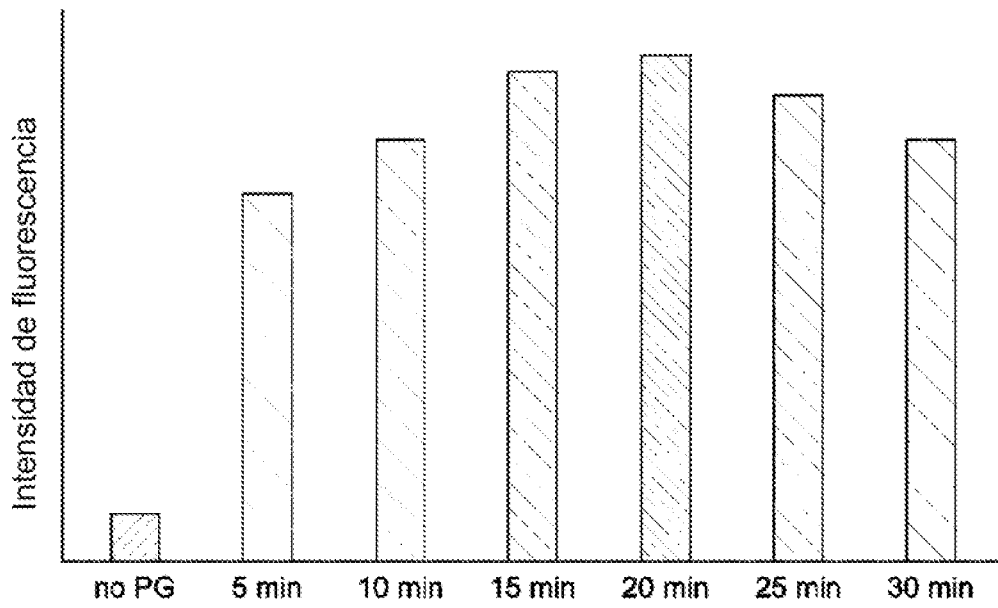


FIGURA 15

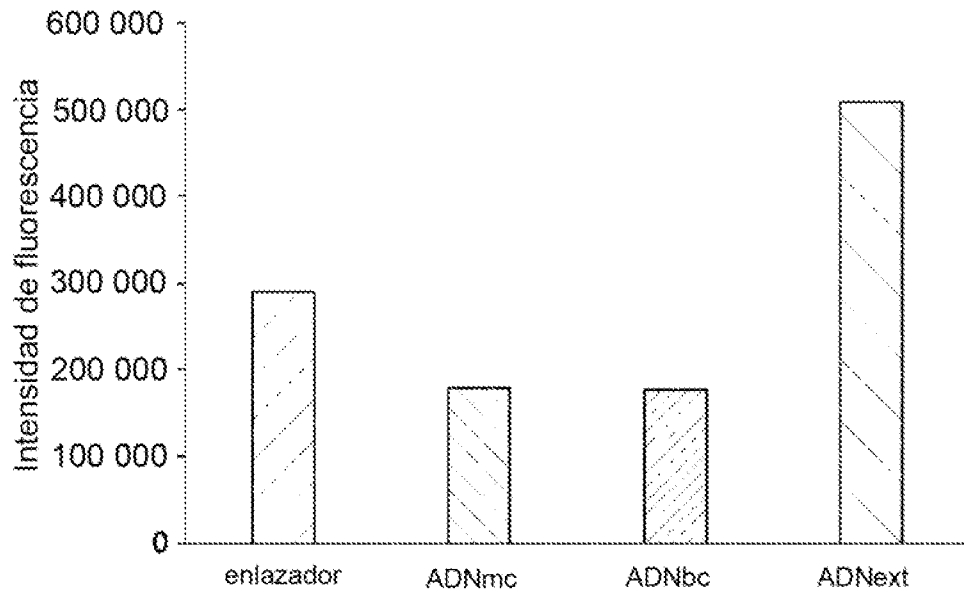


FIGURA 16

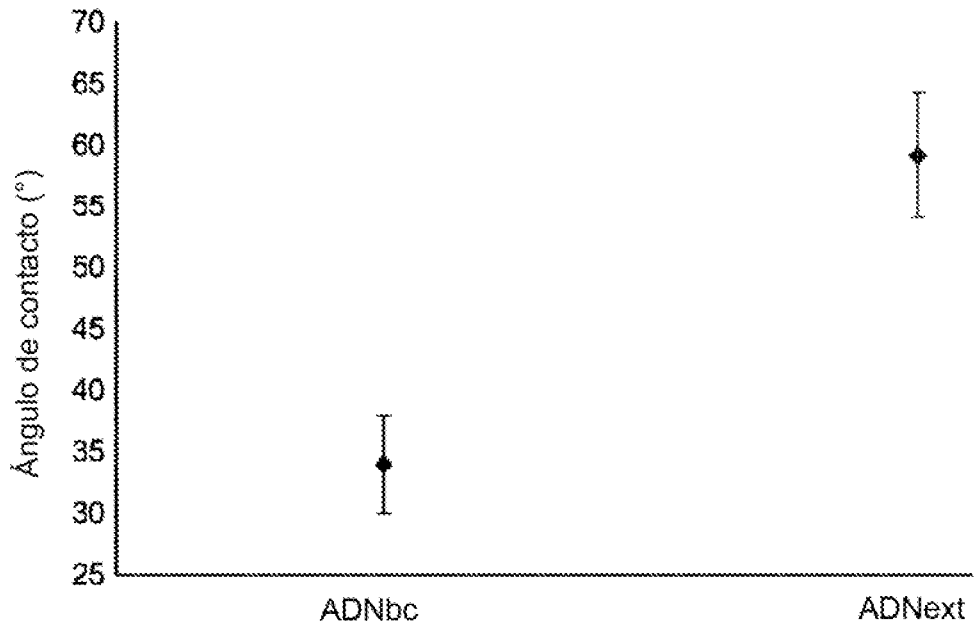


FIGURA 17

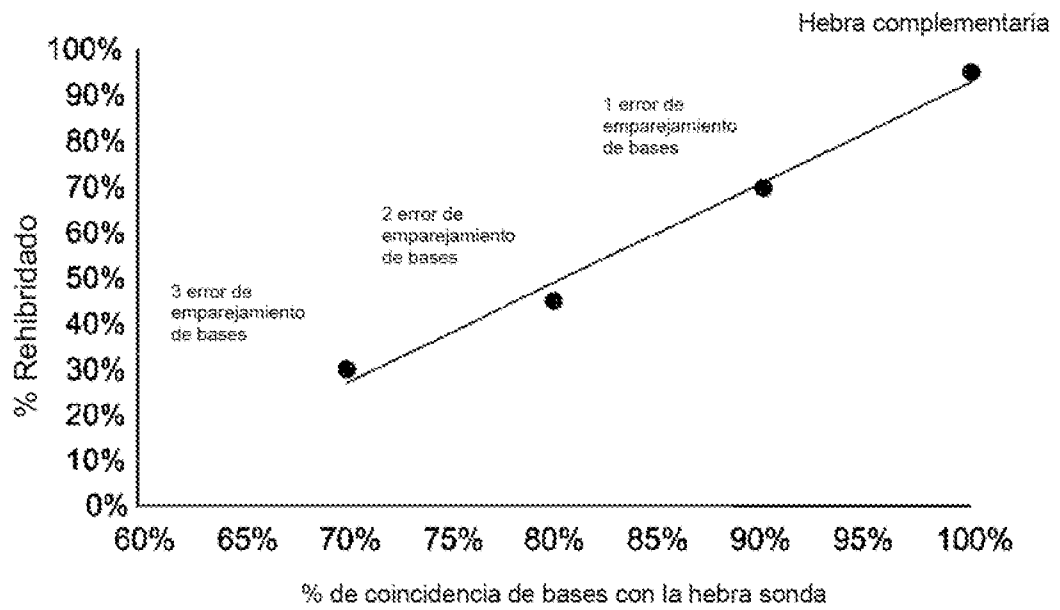


FIGURA 18