

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 954 301**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.12.2017** **PCT/CN2017/118563**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2018** **WO18188377**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2017** **E 17905728 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3611272**

54 Título: **Reactivo de detección, kit de detección y método de detección para la metilación del gen ITGA4**

30 Prioridad:

12.04.2017 CN 201710236243

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2023

73 Titular/es:

CREATIVE BIOSCIENCES (GUANGZHOU) CO., LTD. (100.0%)
6th Floor, Building A2, 11 Kaiyuan Avenue,
Science City, Guangzhou High-Tech Industrial
Development Zone
Guangzhou, Guangdong 510530, CN

72 Inventor/es:

LIU, XIANGLIN y
ZOU, HONGZHI

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 954 301 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

Reactivo de detección, kit de detección y método de detección para la metilación del gen ITGA4

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un reactivo de detección, un kit de detección y un método de detección para la metilación del gen ITGA4.

10 **Antecedentes**

La prueba inmunoquímica fecal para el ADN (FIT-DNA) fue incluida en los métodos de detección del cáncer colorrectal en 2016 por el Grupo de Trabajo de Servicios Preventivos de los Estados Unidos. Uno de los principios de esta prueba es detectar niveles de metilación de genes específicos en células exfoliadas en las heces. La base de esta prueba es la selección de marcadores de metilación del ADN con muy alta sensibilidad y especificidad frente al cáncer de intestino. La detección de la metilación del gen ITGA4 tiene una alta sensibilidad y especificidad de detección del cáncer intestinal en muestras de tejido y heces.

La sensibilidad de detección de ITGA4 metilado para tumores adenoides en muestras de heces es del 69% (9/13) y la especificidad es del 79% (22/28). Otra investigación muestra que al detectar ITGA4 metilado en muestras de heces, cuando la especificidad es del 100% (31/31), las tasas de detección de cáncer colorrectal y tumor adenoides colorrectal son del 36,7% (11/30) y del 16% (4/25), respectivamente. Estos resultados sugieren que todavía hay un gran margen de mejora en la sensibilidad y especificidad de la detección de ITGA4.

El factor clave que influye en la sensibilidad y especificidad de detección de los marcadores son las secuencias de los cebadores. Ausch et al. Clinical Chemistry 2009 divulgan la detección de ITGA4 metilado para predecir si hay neoplasias de colon presentes en un paciente.

30 **Sumario**

Con este fin, el problema técnico que debe resolver la presente invención es proporcionar un kit de detección y un método de detección para la metilación del gen ITGA4. Tanto los kits cuantitativos como cualitativos proporcionados por la presente invención pueden lograr una detección de especificidad y sensibilidad para la metilación del gen ITGA4.

La presente invención proporciona:
un kit de detección cualitativa para la metilación del gen ITGA4, que toma heces, tejido o células como muestra para ser detectado y comprende un reactivo de captura del gen ITGA4 y un reactivo de detección cualitativa de la metilación del gen ITGA4.

El reactivo de captura del gen ITGA4 comprende un complejo de sonda de perlas magnéticas que comprende una secuencia de la sonda mostrada como la SEQ ID NO: 1.

El reactivo de detección cualitativa de metilación del gen ITGA4 comprende un cebador de detección, y una secuencia de nucleótidos del cebador de detección se muestra como la SEQ ID NO: 2-3.

La presente invención proporciona además un kit de detección cuantitativa para la metilación del gen ITGA4, que toma heces, tejido o células como muestra para detectar y comprende un reactivo de captura del gen ITGA4 y un reactivo de detección cuantitativa de la metilación del gen ITGA4.

El reactivo de captura del gen ITGA4 comprende un complejo de sonda de perlas magnéticas que comprende una secuencia de la sonda mostrada como la SEQ ID NO: 1.

En un ejemplo de la presente invención, el reactivo de detección cuantitativa de metilación del gen ITGA4 comprende un cebador de detección y una sonda de detección, en donde una secuencia de nucleótidos del cebador de detección se muestra como la SEQ ID NO: 4-5; y una secuencia de nucleótidos de la sonda de detección se muestra como la SEQ ID NO: 6.

La presente invención proporciona además un kit de detección para la metilación del gen ITGA4, que toma heces, tejido o células como muestra para detectar y comprende un reactivo de captura del gen ITGA4, un reactivo de detección cualitativa de la metilación del gen ITGA4 y un reactivo de detección cuantitativa de la metilación del gen ITGA4.

El reactivo de captura del gen ITGA4 comprende un complejo de sonda de perlas magnéticas; en el complejo de sonda de perlas magnéticas, una secuencia de nucleótidos de la sonda se muestra como la SEQ ID NO: 1;

el reactivo de detección cualitativa de metilación del gen ITGA4 comprende un cebador de detección; una secuencia de nucleótidos del cebador de detección se muestra como la SEQ ID NO: 2-3; y el reactivo de detección cuantitativa de metilación del gen ITGA4 comprende un cebador de detección y una sonda de detección; una secuencia de nucleótidos del cebador de detección se muestra como la SEQ ID NO: 4-5, y una secuencia de nucleótidos de la sonda de detección se muestra como la SEQ ID NO: 6.

Los genes ITGA4 se capturan en especímenes de heces usando una secuencia de captura de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 1, y el nivel de metilación de ITGA4 se detecta en 240 muestras de especímenes (80 casos de cáncer intestinal, 77 casos de tumor adenoide mayor o igual a 1 cm, y 83 casos de normalidad). Los resultados muestran que cuando la especificidad es del 95,2%, la sensibilidad del ITGA4 metilado al cáncer intestinal y al tumor adenoide es del 83,8% y del 41,6%, respectivamente.

El nivel de metilación de ITGA4 se detecta en 105 pares de tejido canceroso intestinal emparejado, 109 casos de tejido tumoral adenoide mayor o igual a 1 cm y 41 casos de tejido epitelial intestinal normal mediante el uso del cebador y la sonda de la prueba qMSP. Cuando la especificidad es del 97,6%, las tasas de detección de cáncer colorrectal y tumor adenoide son del 96,2% y del 71,6%, respectivamente.

El nivel de metilación de los genes ITGA4 se detecta en seis líneas celulares de cáncer colorrectal, que incluyen Widr, SW480, HCT15, HT29, Caco2 y DLD1, usando el cebador de la prueba MSP. El resultado muestra que ITGA4 está metilado en las seis células de cáncer colorrectal.

Preferiblemente, la muestra a detectar por el kit proporcionado por la presente invención son heces y/o tejido; en algunos ejemplos concretos, la muestra a detectar son heces.

La presente invención proporciona además un método de detección cualitativa para la metilación del gen ITGA4, que comprende: tomar una muestra para detectarla como plantilla, capturar genes ITGA4 mediante un reactivo de captura y luego modificar con bisulfito, amplificar con un reactivo de detección cualitativo y determinar si los genes ITGA4 están metilados o no de acuerdo con un producto de amplificación;

en donde la muestra a detectar son heces, tejido o células; el reactivo de captura comprende un complejo de sonda de perlas magnéticas; en el complejo de sonda de perlas magnéticas, una secuencia de nucleótidos de la sonda se muestra como la SEQ ID NO: 1; el reactivo de detección cualitativo comprende un cebador de detección; una secuencia de nucleótidos del cebador de detección se muestra como la SEQ ID NO: 2-3.

Específicamente, el método de detección cualitativa comprende los pasos de tomar la muestra a detectar como plantilla, capturar los genes ITGA4 mediante una secuencia de captura del gen ITGA4 de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 1, luego tratar y modificar mediante bisulfito, luego amplificación llevada a cabo con un cebador de detección cualitativa de metilación del gen ITGA4 de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 2-3, y determinar si los genes ITGA4 están metilados o no de acuerdo con el producto de amplificación; y la muestra a detectar son heces, tejido o células.

Preferiblemente, la muestra a detectar son heces, cáncer colorrectal, tumor adenoide colorrectal, tejido epitelial intestinal normal o líneas celulares. Preferiblemente, la muestra a detectar son heces.

En un método de captura de perlas magnéticas, las perlas magnéticas se toman como un portador de adsorción en fase sólida y un sistema de reactivos y un procedimiento de extracción especialmente diseñados ("Detección y extracción de ADN metilado libre en orina mediante la aplicación del método de perlas magnéticas", Journal of China Medical University, 2015, (10)).

En la presente invención, la secuencia se muestra como SEQ ID NO. 1. Los genes ITGA4 en las heces pueden extraerse y enriquecerse mediante captura de perlas magnéticas.

Las heces pueden tratarse opcionalmente: mezclando uniformemente las heces en una solución tampón, centrifugando, tomando un sobrenadante en otro tubo de ensayo, añadiendo perlas magnéticas con secuencias de captura de oligonucleótidos complementarias específicas al sobrenadante, después de incubar e hibridar, adsorbiendo las perlas magnéticas en un lado de la pared de un tubo usando un imán y, después de lavar repetidamente, eluyendo el ADN del gen objetivo usando la solución tampón. Los genes objetivo pueden capturarse mediante el método y el proceso de enriquecimiento dura aproximadamente 2 horas.

El ADN capturado se trata y modifica con bisulfito para su posterior detección por PCR cuantitativa por fluorescencia.

Sistema de amplificación: agua libre de nucleasas 10,5 µl, solución de reacción enzimática 2X 12,5 µl, cebador directo y cebador inverso (concentración de 5 µM) 0,5 µl cada uno, y ADN a detectar 1 µl, con un total de 25 µl.

5 Procedimiento de amplificación: 95° C 5 min, (95° C 30 s, 64° C 30 s y 72° C 30 s) x 34 ciclos, 72° C 5 min y 37° C 30 s.

De acuerdo con el resultado de la amplificación, si se produce una banda de amplificación, los genes están metilados.

10 La presente invención proporciona además un método de detección cuantitativa para la metilación del gen ITGA4, que comprende:

15 tomar una muestra para detectarla como plantilla, capturar genes ITGA4 mediante un reactivo de captura, luego modificar con bisulfito, realizar una detección cuantitativa con un reactivo de detección cuantitativa y determinar el nivel de metilación de los genes ITGA4 de acuerdo con un resultado cuantitativo;
 en donde la muestra a detectar es heces, tejido o células;
 el reactivo de captura comprende un complejo de sonda de perlas magnéticas; en el complejo de sonda de perlas magnéticas, una secuencia de nucleótidos de la sonda se muestra como SEQ ID NO: 1;
 20 el reactivo de detección cuantitativa comprende un cebador de detección y una sonda de detección; una secuencia de nucleótidos del cebador de detección se muestra como la SEQ ID NO: 4-5, y una secuencia de nucleótidos de la sonda de detección se muestra como la SEQ ID NO: 6.

25 Específicamente, el método de detección cuantitativa comprende los pasos de tomar la muestra a detectar como plantilla, capturar los genes ITGA4 mediante una secuencia de captura del gen ITGA4 de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 1, luego tratar y modificar mediante bisulfito, luego la detección cuantitativa se lleva a cabo con un cebador de detección cuantitativa de metilación del gen ITGA4 de la secuencia de nucleótidos mostrada como la SEQ ID NO: 4-5 y una sonda de detección cuantitativa de metilación del gen ITGA4 de la secuencia de nucleótidos mostrada como la SEQ ID NO: 6, y el nivel de metilación de los genes ITGA4 se determina de acuerdo
 30 con el resultado cuantitativo; y la muestra a detectar es heces, tejido o células.

Preferiblemente, la muestra a detectar son heces, cáncer colorrectal, tumor adenoide colorrectal, tejido epitelial intestinal normal o líneas celulares. Preferiblemente, la muestra a detectar son heces.

35 En un método de captura de perlas magnéticas, las perlas magnéticas se toman como un portador de adsorción en fase sólida y un sistema de reactivos y un procedimiento de extracción especialmente diseñados ("Detection and Extraction of Free Methylated DNA in Urine by Applying Magnetic Bead Method", Journal of China Medical University 2015, (10).

40 En la presente invención, la secuencia se muestra como la SEQ ID NO. 1. Los genes ITGA4 en las heces se pueden extraer y enriquecer mediante captura de perlas magnéticas.

45 Las heces pueden tratarse opcionalmente: mezclando uniformemente las heces en una solución tampón, centrifugando, tomando un sobrenadante en otro tubo de ensayo, añadiendo perlas magnéticas con secuencias de captura de oligonucleótidos complementarias específicas al sobrenadante, después de incubar e hibridar, adsorbiendo las perlas magnéticas en un lado de la pared de un tubo usando un imán y, después de lavar repetidamente, eluyendo el ADN del gen objetivo usando la solución tampón. Los genes objetivo pueden capturarse mediante el método y el proceso de enriquecimiento dura aproximadamente 2 horas.

50 El ADN capturado se trata y modifica con bisulfito para su posterior detección por PCR cuantitativa por fluorescencia.

55 El sistema de reacción de amplificación: agua libre de nucleasas 8,2 µl, solución tampón de reacción enzimática 5X 5 µl, MgCl₂ (25 mM) 5 µl, dNTP (10 mM) 1 µl, enzima de reacción 0,5 µl, un cebador directo (100 µM) 0,125 µl, un cebador inverso (100 µM) 0,125 µl, una sonda (100 µM) 0,05 µl y ADN a detectar 5 µl, con un total de 25 µl.

El procedimiento: 95° C 4 min, (95° C 20 s, 56° C 30 s y 72° C 30 s) x 45 ciclos y 37° C 30 s.

60 De acuerdo con el resultado cuantitativo, el nivel relativo de metilación de los genes ITGA4 se obtiene mediante cálculo tomando un gen ACTB como gen de referencia.

65 El cebador y la sonda proporcionados por la presente invención coinciden, entonces la detección puede llevarse a cabo en una muestra de heces y, por lo tanto, la detección es simple, conveniente y rápida. En la presente invención, la detección también puede llevarse a cabo en muestras de tejido. Además, en el proceso de detección de

las muestras, también se mejoran la especificidad y la sensibilidad de la detección. El experimento demuestra que para la muestra de heces, cuando la especificidad es del 95,2%, la sensibilidad del ITGA4 metilado al cáncer intestinal y al tumor adenoide es del 83,8% y 41,6%, respectivamente; y para el tejido canceroso intestinal, cuando la especificidad es del 97,6% (40/41), las tasas de detección de cáncer colorrectal y tumor adenoide son del 96,2% (101/105) y del 71,6% (78/109), respectivamente.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un diagrama de puntos de los niveles de metilación de los genes ITGA4 en cáncer, tumor adenoide y un grupo normal, en donde **** indica que P es inferior a 0,0001; La Fig. 2 muestra un gráfico ROC, en donde la AUC (cáncer frente a normal) es igual a 0,953 (95% CI: 0,920-0,985); y la AUC (tumor adenoideo frente a normal) es igual a 0,735 (95% CI: 0,657-0,814); La Fig. 3 muestra una curva de amplificación de un S1-S6 diluido en gradiente y una curva estándar construida a partir del mismo, en la que NTC representa un control sin plantilla, WT representa ADN de tipo salvaje como control, y cada muestra está provista de tres orificios complejos; La Fig. 4 muestra la curva estándar con una linealidad R^2 igual a 0,995 y una eficiencia de amplificación igual al 97,96%; y La Fig. 5 muestra curvas de amplificación para diferentes cebadores y sondas.

Descripción detallada

La presente invención proporciona un reactivo de detección, un kit de detección y un método de detección para la metilación del gen ITGA4, que un experto en la técnica puede lograr consultando el contenido de la presente y mejorando adecuadamente los parámetros del proceso. Cabe señalar específicamente que todos los sustitutos y modificaciones similares evidentes para un experto en la técnica se consideran incluidos en la presente invención. Los métodos y aplicaciones de la presente invención se han descrito a través de ejemplos preferidos, y será evidente para un experto en la técnica que la tecnología de la presente invención puede ponerse en práctica y aplicarse con modificación o alteración y combinación apropiada de los métodos y aplicaciones de la presente.

Los materiales de prueba, reactivos e instrumentos usados en la presente invención son todos productos comerciales comunes y pueden adquirirse en el mercado.

La presente invención se ilustra mejor mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1 Detección cualitativa

Se seleccionaron seis líneas celulares de cáncer colorrectal, incluyendo Widr, SW480, HCT15, HT29, Caco2 y DLD1, y además se usaron células sanas CCD-18CO como control. Se usó la prueba MSP para detectar si los genes ITGA4 estaban metilados en estas células; y cada línea celular se detectó repetidamente 10 veces.

El método comprende los siguientes pasos:

1. Los sedimentos celulares se recogieron y se transfirieron a un nuevo tubo de centrifuga de 15 ml que previamente contenía 3 ml de lisado celular.

Se añadieron 100 μ l de perlas magnéticas de captura al tubo de centrifuga, en donde las perlas magnéticas de captura contienen secuencias de captura (5'-TGCTTCTCCGGGTACGGGCCGCTGGG TGGGGTC-3') de la secuencia mostrada como la secuencia de captura SEQ ID NO: 1. La mezcla se sometió a incubación en un caldero con baño de agua a 92° C durante 10 min y en un agitador a temperatura ambiente a 100 rpm durante 1 h, y luego se colocaron en un soporte magnético durante 5 min después de una breve centrifugación, con el sobrenadante eliminado.

Se añadieron 500 μ l de una solución de lavado al tubo de centrifuga de 15 ml, se hizo oscilar y se agitó para permitir que las perlas magnéticas en una pared del tubo quedaran completamente suspendidas y se transfirieron a un nuevo tubo de centrifuga de 2 ml después de una breve centrifugación. La mezcla se sometió a incubación en una incubadora de baño seco a temperatura ambiente a 900 rpm durante 1 min y luego se colocó en el soporte magnético durante 1 min, eliminando el sobrenadante. El proceso se repitió 4 veces.

Se añadieron 55 μ l de un eluyente, se centrifugaron brevemente, se incubaron en la incubadora del baño seco a 92° C y a 900 rpm durante 10 minutos, se centrifugaron brevemente, se colocaron en el soporte magnético y se transfirieron a un nuevo tubo EP en 3 minutos.

2. La transformación con bisulfito se llevó a cabo con el kit de metilación de ADN EZ (ZYMO RESEARCH).

3. Amplificación: cebadores que incluyen:

Secuencia del cebador en sentido ascendente: 5'-TCGGAGAAGTAGCGGAGTATTC-3' (SEQ ID NO: 2)

Secuencia del cebador en sentido descendente: 5'-AAATCGACCCACCGCGAACG-3' (SEQ ID NO: 3)

Sistema: 25 µl (sistema 1x: agua libre de nucleasas 10,5 µl, Mezcla maestra incolora GoTaq Hot Start 12,5 µl, cebador directo y cebador inverso (concentración 5 µM) 0,5 µl cada uno, y ADN a detectar 1 µl)
Procedimiento: 95° C 5 min, (95° C 30 s, 64° C 30 s y 72° C 30 s) x 34 ciclos, 72° C 5 min y 37° C 30 s.

5 4. Observación del resultado de la amplificación.

De acuerdo con el resultado de la amplificación, se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa en un producto de PCR y, si aparecen bandas, se produce metilación.

10 Resultados: la metilación de ITGA4 se detectó en las seis células cancerosas intestinales, con una precisión de detección de 10 repeticiones de hasta el 100%, mientras que la metilación no se detectó en las células sanas.

Ejemplo 2 Detección cuantitativa

15 1. Heces como muestra

Se seleccionaron 240 muestras de heces, incluyendo 80 casos de cáncer intestinal, 77 casos de tumor adenoide mayor o igual a 1 cm y 83 casos normales, con base en enteroscopia y se realizó una detección cuantitativa del nivel de metilación de los genes ITGA4.

20 Proceso de prueba: se capturaron genes ITGA4 usando una secuencia de captura (SEQ ID NO: 1) en las muestras de heces; y las condiciones y el proceso de captura fueron los mismos que en el Ejemplo 1), y la detección cuantitativa del nivel de metilación de los genes ITGA4 en las muestras se llevó a cabo mediante la prueba qMSP usando ACTB como gen de referencia.

25 Cebadores y sondas de detección cuantitativa:

Secuencia del cebador en sentido ascendente: 5'-ACGCGAGTTTTGCGTAGTC-3' (SEQ ID NO: 4)

Secuencia del cebador en sentido descendente: 5'-TCCGAATACGAACCGCTAA-3' (SEQ ID NO: 5)

30 Secuencia de la sonda de detección: 5'-ACGGAGTTCGGTTTTGCGTTTTC-3' (SEQ ID NO: 6)

Sistema: 25 µl (sistema 1x: agua libre de nucleasas 8,2 µl, 5x tampón GoTaq Flexi incoloro 5 µl, MgCl₂ (25 mM) 5 µl, dNTP (10 mM) 1 µl, polimerasa GoTaq Hot Start 0,5 µl, cebador directo (100 µM) 0,125 µl, cebador inverso (100 µM) 0,125 µl, sonda (100 µM) 0,05 µl y ADN 5 µl)

35 Procedimiento: 95° C 4 min, (95° C 20 s, 56° C 30 s y 72° C 30 s) x 45 ciclos y 37° C 30 s.

En 240 muestras de heces (80 casos de cáncer intestinal, 77 casos de tumor adenoide mayor o igual a 1 cm y 83 casos normales), se detectó el nivel de metilación de ITGA4 y el resultado mostró que cuando la especificidad es del 95,2%, las sensibilidades del ITGA4 metilado al cáncer intestinal y al tumor adenoide fueron del 83,8% y 41,6%, respectivamente (Figura 1-2).

40 2. Tejido como muestra

Se seleccionaron muestras de cáncer colorrectal, tumor adenoide colorrectal y tejido epitelial intestinal normal extirpadas quirúrgicamente o endoscópicamente, y se llevó a cabo la detección cuantitativa del nivel de metilación de los genes ITGA4. Las muestras incluyeron: 105 pares de cáncer intestinal y tejido paracanceroso emparejado, 109 casos. de tejido tumoral adenoide mayor o igual a 1 cm, y 41 casos de tejido epitelial intestinal normal.

Se extrajo el ADN de cada tejido, se trató y se modificó con bisulfito, y luego se llevó a cabo la detección cuantitativa del nivel de metilación de los genes ITGA4 en las muestras mediante la prueba qMSP.

Se representó una curva ROC (Fig. 2) de acuerdo con el resultado cuantitativo, y el resultado mostró: cuando la especificidad era del 97,6% (40/41), las tasas de detección de cáncer colorrectal y tumor adenoide fueron del 96,2% (101/105) y del 71,6% (78/109).), respectivamente. Las áreas bajo la curva son, respectivamente, las siguientes: 0,958 (CI 95%: 0,909-1) y 0,832 (CI 95%: 0,761-0,902), (P de ambos es menor de 0,001).

Ejemplo 3 Límite de detección

La transformación con bisulfito se llevó a cabo usando ADN metilado CpGenomeUniversal (adquirido de Millipore) para obtener 20 ng/µl de ADN plantilla, y se obtuvieron S1, S2, S3, S4, S5 y S6 mediante diluciones en gradiente de 5 veces, con concentraciones de 20 ng/µl, 4 ng/µl, 0,8 ng/µl, 0,16 ng/µl, 0,032 ng/µl y 0,0064 ng/µl, respectivamente.

La qPCR se llevó a cabo con una cantidad de plantilla de carga de 5 µl (el método y el cebador son los mismos que en el Ejemplo 2). Puede verse que las cantidades reales de adición de ADN de S1-S6 son 100 ng, 20 ng, 4 ng, 0,8 ng, 0,16 ng y 0,032 ng, respectivamente. El resultado de qPCR mostró que la cantidad de ADN detectable

por la sonda del cebador genético osciló entre 0,032 ng y 100 ng (Fig. 3).

Ejemplo comparativo 1

5 La transformación con bisulfito se llevó a cabo usando ADN metilado CpGenomeUniversal (adquirido de Millipore); y se usó ACTB como gen de referencia, y luego se usaron diferentes cebadores y sondas para la detección cuantitativa para investigar el efecto de amplificación de cada conjunto de sondas y cebadores.

Los cebadores y sondas usados se muestran en la Tabla 1:

10

Tabla 1 Cebadores y sondas

Nombre	Tipo	Secuencia	Número de serie	Valor Ct
Conjunto 1	Cebador en sentido ascendente	ACGCGAGTTTTCGCTAGTC	SEQ ID NO: 4	31,5
	Cebador en sentido descendente	TCCGAATACGAACCGCTAA	SEQ ID NO: 5	
	Sonda	ACGGAGTTCGGTTTTGCGTTTTTC	SEQ ID NO: 6	
Conjunto 2	Cebador en sentido ascendente	GTTTTCGTATTACGTTCCGGG	SEQ ID NO: 7	31,7
	Cebador en sentido descendente	TCGAACCGACCTAAAATACC	SEQ ID NO: 8	
	Sonda	AATCGGGAGTGGGGTCGGGCGA	SEQ ID NO: 9	
Conjunto 3	Cebador en sentido ascendente	TATCGAGAGCGTATGGTTTG	SEQ ID NO: 10	31,6
	Cebador en sentido descendente	CCACGTTATAAAAACGACCG	SEQ ID NO: 11	
	Sonda	AGGGTCGTCGTTCCGGGAGACGGT	SEQ ID NO: 12	
Conjunto 4	Cebador en sentido ascendente	AGAGTTATTTCCCGTTTTGC	SEQ ID NO: 13	31,7
	Cebador en sentido descendente	ATCCCGAACGTAATACGAAA	SEQ ID NO: 14	
	Sonda	TGGGAGGTTCCGGTTAGGACGCGA	SEQ ID NO: 15	
Conjunto 5	Cebador en sentido ascendente	TGCGTTTTCGTATTACGTTC	SEQ ID NO: 16	33,3
	Cebador en sentido descendente	CCAACCGAAAACTTCGAATA	SEQ ID NO: 17	
	Sonda	GCGGTTCGTATTCCGGAGAAGTAGCGCC	SEQ ID NO: 18	
Conjunto 6	Cebador en sentido ascendente	GCGGTTCGTATTCCGGAGAAG	SEQ ID NO: 19	35,8
	Cebador en sentido descendente	TCTACCGCCAACCGAAAACT	SEQ ID NO: 20	
	Sonda	AGCGCGAGTATTC	SEQ ID NO: 21	
Conjunto 7	Cebador en sentido ascendente	TGCGGAGGCGTAGGGTC	SEQ ID NO: 22	32,8
	Cebador en sentido descendente	CAACCGAAATCCCCAACG	SEQ ID NO: 23	
	Sonda	CCTACAACCGCGCGTAAACAAAAACG	SEQ ID NO: 24	

Los resultados de amplificación de cada conjunto de sondas y cebadores se muestran en la Fig. 5, y el resultado de la amplificación del Conjunto 1 se refería a los resultados del límite de detección del Ejemplo 3 (la plantilla de detección de S3 en el límite de detección era la misma que la plantilla de detección en este ejemplo comparativo). Como puede verse en los datos de la tabla, en el proceso de amplificación específico dirigido al gen objetivo, el resultado de amplificación Ct del Conjunto 1 fue mínimo, lo que mostró el mejor efecto de amplificación y fue superior a las sondas de otros conjuntos.

55

REIVINDICACIONES

1. Un kit de detección cuantitativa para determinar la metilación del gen ITGA4 en por lo menos una muestra seleccionada de un grupo que consiste en heces, tejido o células que comprende:
5 un reactivo de captura del gen ITGA4 que comprende:
 un complejo de sonda de perlas magnéticas que comprende:
 una primera sonda de secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1; y
 un reactivo de detección cuantitativa de metilación del gen ITGA4 que comprende:
10 un cebador de secuencias de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4-5, y
 una segunda sonda de secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6.
2. Un kit de detección para determinar la metilación del gen ITGA4 en por lo menos una muestra seleccionada de un grupo que consiste en heces, tejido o células, que comprende:
15 un reactivo de captura del gen ITGA4 que comprende:
 un complejo de sonda de perlas magnéticas que comprende:
 una primera secuencia de nucleótidos de una sonda como se muestra en la SEQ ID NO: 1;
20 un reactivo de detección cualitativa de metilación del gen ITGA4 que comprende:
 un primer cebador de secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 2-3; y
 un reactivo de detección cuantitativa de metilación del gen ITGA4 que comprende:
25 un segundo cebador de secuencias de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4-5; y
 una segunda sonda de secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6.
3. Un método para detectar la metilación del gen ITGA4 en por lo menos una muestra seleccionada de un grupo que consiste en heces, tejido o células, que comprende:
30 extraer ADN de dicha muestra usando un reactivo de captura del gen ITGA4 que comprende un complejo de sonda de perlas magnéticas que comprende una primera sonda de secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1;
 tratar el ADN con bisulfito;
 amplificar el ADN usando un cebador de secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4-5;
35 y
 detectar la presencia de dicha metilación del gen ITGA4 en dicho ADN usando una segunda sonda de secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 6.

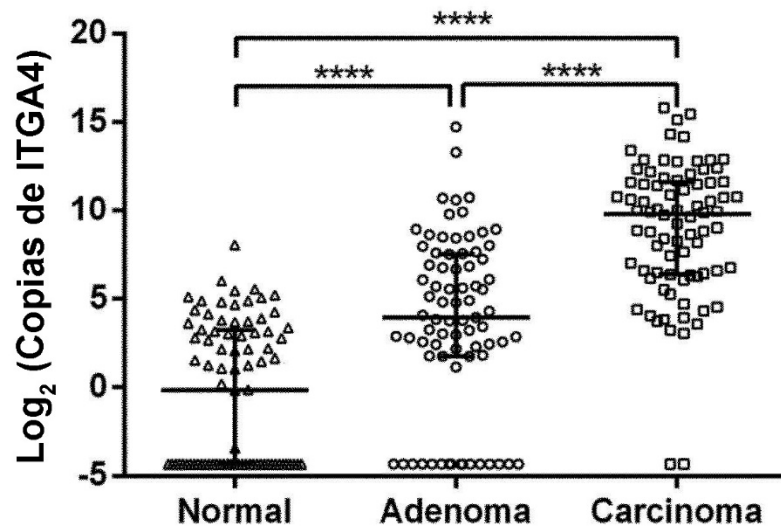


Fig. 1

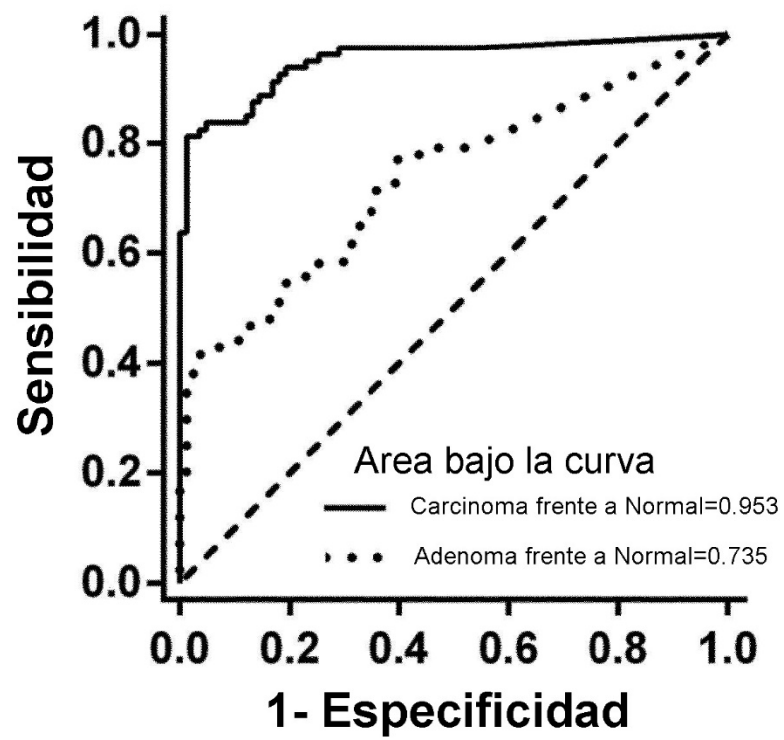
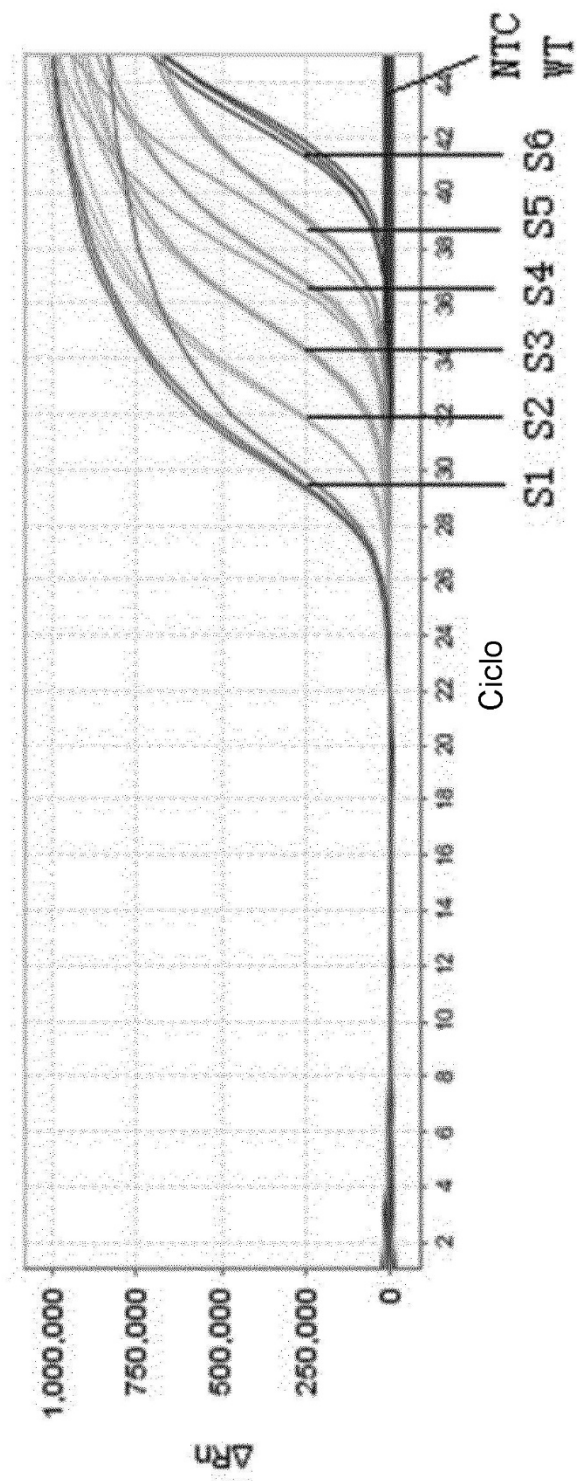


Fig. 2

Fig. 3



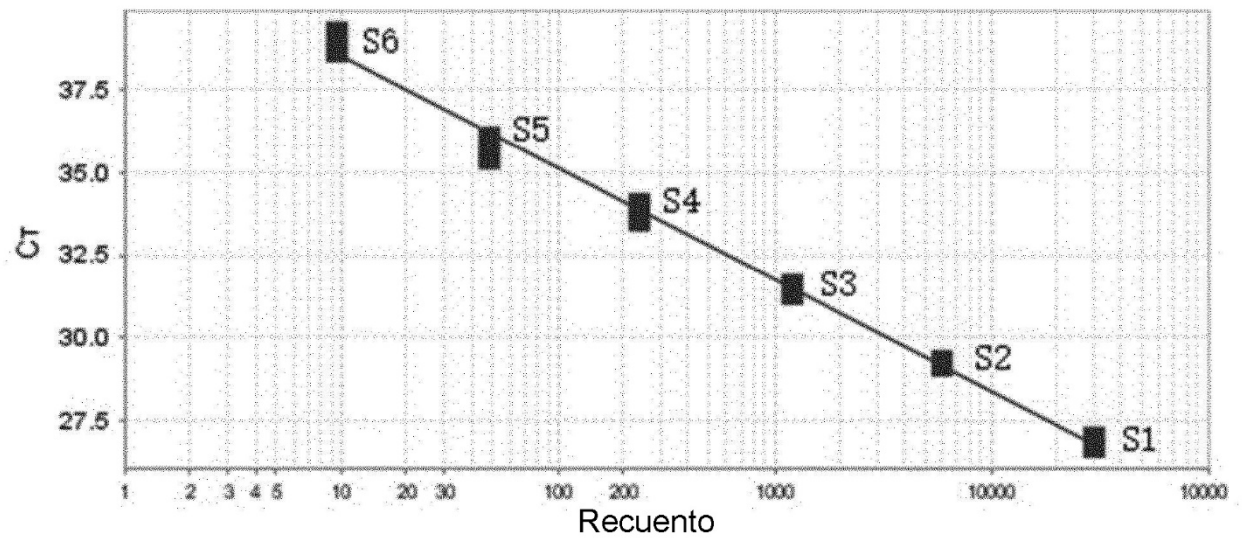


Fig. 4

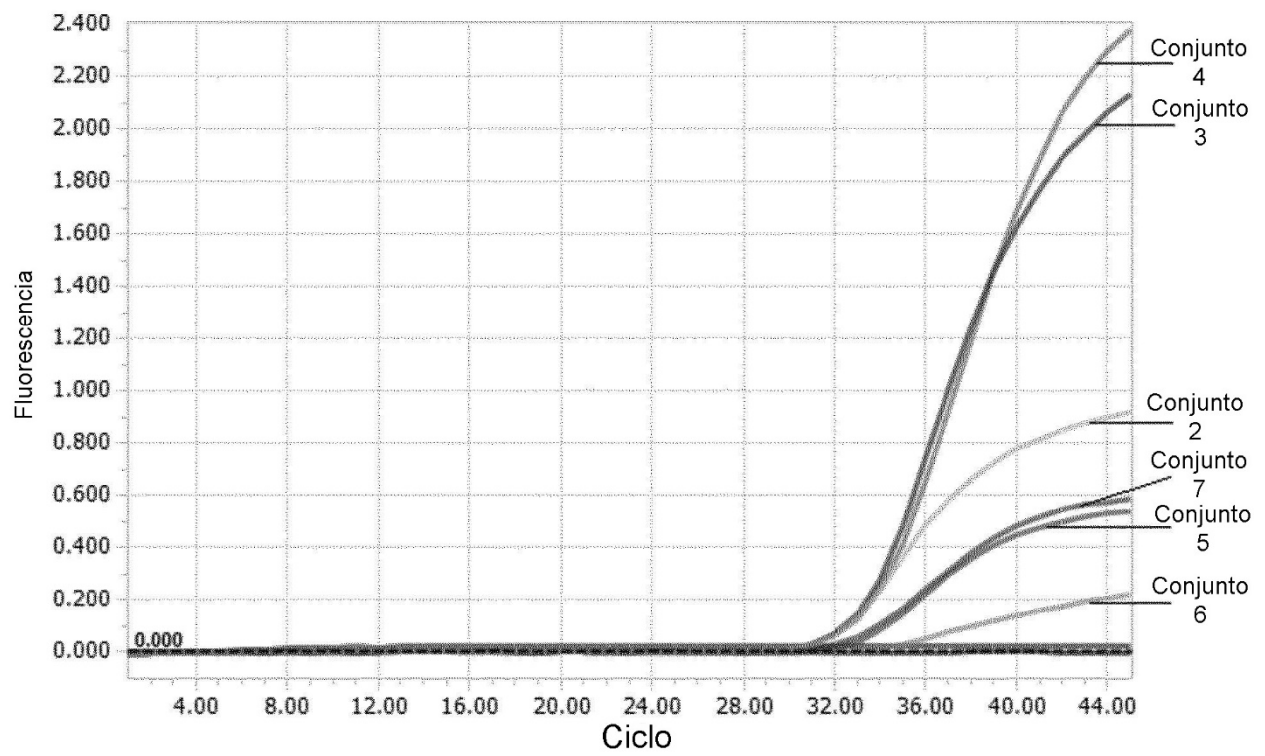


Fig. 5