

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 070**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.1999 E 99965030 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **26.09.2001 EP 1135530**

54 Título: **Amplificación múltiplex de locus de repeticiones cortas en tándem**

30 Prioridad:

25.11.1998 US 199542

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

16.01.2013

73 Titular/es:

**PROMEGA CORPORATION (100.0%)
2800 WORDS HOLLOW ROAD
MADISON, WI 53711-5399, US**

72 Inventor/es:

**SCHUMM, JAMES W. y
SPRECHER, CYNTHIA J.**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 394 070 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

Amplificación múltiple de locus de repeticiones cortas en tándem

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere de forma general a la detección de marcadores genéticos en un sistema genómico.

- 5 La presente invención se refiere más específicamente a la amplificación simultánea de varios locus genéticos polimórficos bien definidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa para determinar, en una reacción, los alelos de cada locus contenidos dentro del sistema múltiple.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La tipificación por ADN se utiliza habitualmente para identificar la ascendencia de niños humanos y para confirmar el linaje de caballos, perros, otros animales y cultivos agrícolas. La tipificación por ADN también se emplea habitualmente para identificar el origen de la sangre, de la saliva, del semen y de otros tejidos hallados en la escena de un crimen u otros sitios que requieren la identificación de restos humanos. La tipificación por ADN también se emplea en el entorno clínico para determinar el éxito o el fracaso del trasplante de la médula ósea y la presencia de determinados tejidos cancerosos. La tipificación por ADN implica el análisis de alelos de ADN genómico con
- 15 características de interés, que se suelen denominar «marcadores». La mayor parte de los métodos de tipificación en uso hoy en día están diseñados específicamente para detectar y analizar diferencias de longitud y/o de secuencia de una o más regiones de los marcadores de ADN que se sabe que aparecen en al menos dos formas diferentes en una población. Tal variación de longitud y/o de secuencia se denomina «polimorfismo». Cualquier región (a saber, «locus») de ADN en la que se produce tal variación se denomina un «locus polimórfico». Los métodos y materiales
- 20 de la presente invención están diseñados para su uso en la detección de varios locus de ADN, algunos de los cuales, o todos, son locus polimórficos.

- Se llevan buscado desde hace tiempo marcadores genéticos que sean suficientemente polimórficos respecto a la longitud o a la secuencia para usarlos en aplicaciones de identidad, tales como las pruebas de paternidad y la
- 25 identificación de muestras de tejido recogidas para análisis forense. El descubrimiento y el desarrollo de tales marcadores y los métodos para analizar tales marcadores han pasado por varias fases de desarrollo durante los últimos años.

- Los primeros marcadores de variantes del ADN identificados eran simples sustituciones de base, a saber, polimorfismos simples de las secuencias, que se detectaban la mayor parte de las veces mediante ensayos de hibridación por transferencia de tipo Southern. Para los ejemplos de referencias que describen la identificación de
- 30 tales marcadores, diseñados para ser utilizados en el análisis del ADN digerido con endonucleasas de restricción mediante sondas radioactivas, véase: Southern, E. M. (1975) *J. Mol. Biol.* 98 (3): 503-507; Schumm et al. (1988) *American Journal of Human Genetics* 42: 143-159; y Wyman, A. y White, R. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 6754-6758.

- La siguiente generación de marcadores eran variantes de tamaño, a saber, polimorfismos de longitud, específicamente marcadores por el «número variable de repeticiones en tándem» (VNTR, por su nombre en inglés)
- 35 (Nakamura Y., et al. (1987) *Science* 235: 1616-1622; y patente de los EE.UU. n.º 4 963 663 de White et al (1990); patente de los EE.UU. n.º 5 411 859 continuación de la 4 963 663 expedida a White et al (1995)) y marcadores basados en «minisatélites» (Jeffreys et al., (1985a), *Nature* 314: 67-73; Jeffreys et al. (1985b) *Nature* 316: 76-79; patente de los EE.UU. n.º 5 175 082 para una invención de Jeffreys). Las VNTR y los marcadores basados en
- 40 minisatélites contienen regiones de secuencias casi idénticas repetidas en tándem. El núcleo de la secuencia repetida tiene de 10 a 70 bases de longitud, con lo que se denominan repeticiones «minisatélite» si el núcleo de la secuencia repetida es pequeño y VNTR si las repeticiones son largas. Los diferentes individuos de una población humana contienen un número diferente de repeticiones. Los marcadores basados en VNTR son por lo general mucho más polimórficos que los polimorfismos por sustitución de base, y a veces muestran hasta cuarenta o más
- 45 alelos en un solo locus genético. Sin embargo, para detectar y analizar la mayoría de estos marcadores todavía siguen siendo necesarios el proceso tedioso de la digestión con enzimas de restricción y el posterior análisis por hibridación de tipo Southern.

- El siguiente avance implicó el encuentro de la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su nombre en inglés) (patente de los EE.UU. n.º 4 683 202 de Mullis, K. B.) con el análisis de los locus de las VNTR
- 50 (Kasai, K et al., (1990) *Journal Forensic Science* 35(5): 1196-1200). Se descubrieron locus de VNTR amplificables, que se podían detectar sin necesidad de transferencia Southern. Los productos amplificados se separan en geles de agarosa o de poliacrilamida y se detectan mediante la incorporación de radioactividad durante la amplificación o mediante la tinción posterior con plata o con bromuro de etidio. Sin embargo, la PCR se puede utilizar solamente para amplificar segmentos de ADN relativamente pequeños de manera fiable, a saber, sólo se amplifican de forma
- 55 fiable los segmentos de ADN de menos de 3000 bases de longitud (Ponce, M y Micol, L. (1992) *NAR* 20(3): 623; Decorte R et al., (1990) *DNA Cell Biol.* 9(6): 461-469). Por consiguiente, se han desarrollado muy pocas VNTR amplificables.

En los últimos años, el descubrimiento y el desarrollo de las repeticiones cortas en tándem (STR, por su nombre en inglés) polimórficas como marcadores genéticos ha estimulado el progreso del desarrollo de mapas de ligamiento, la identificación y la caracterización de genes de enfermedades, y la simplificación y la precisión de la tipificación por ADN. Específicamente, con el descubrimiento y el desarrollo de marcadores polimórficos que contienen repeticiones dinucleotídicas (Litt y Luty (1989) *Am J. Hum. Genet.* 3(4): 599-605; Tautz, D (1989) *NAR* 17: 6463-6471; Weber y May (1989) *Am. J. Hum. Genet.* 44: 388-396; patente alemana n.º DE 38 34 636 C2, inventor Tautz, D; patente de los EE.UU. n.º 5 582 979 registrada por Weber, L.), STR con unidades de repetición de tres a cuatro nucleótidos (Edwards, A., et al., (1991) *Am. J. Hum. Genet.* 49: 746-756; Hammond, H. A., et al., (1994), *Am. J. Hum. Genet.* 55: 175-189; Fregeau, C. J. y Fourney, R. M. (1993) *BioTechniques* 15 (1): 100-119; Schumm, J. W. et al., (1994) en *The Fourth International Symposium on Human Identification 1993*, págs. 177-187 (pub. de Promega Corp., 1994); y patente de los EE.UU. n.º 5 364 759 de Caskey et al.; patente alemana n.º DE 38 34 636 C2 de Tautz, D.) y las STR con unidades de repetición de cinco a siete bases (véase, p. ej., Edwards et al., (1991) *Nucleic Acids Res.* 19: 4791; Chen et al., (1993) *Genomics* 15(3): 621-5; Harada et al., (1994) *Am. J. Hum. Genet.* 55: 175-189; Comings et al., (1995), *Genomics* 29(2): 390-6; y el Grupo de Desarrollo de Marcadores de Utah (1995) *Am. J. Genet.* 57: 619-628; y Jurka y Pethiyagoda (1995) *J. Mol. Evol.* 40: 120-126)), se han solucionado muchas de las deficiencias de los métodos anteriores. Los marcadores basados en STR son por lo general más cortos que los marcadores basados en VNTR, lo que los convierte en mejores sustratos para la amplificación que la mayoría de los marcadores basados en VNTR.

Los locus de las STR se parecen a los locus de las VNTR amplificables en que los alelos amplificados en cada locus se pueden diferenciar basándose en la variación de la longitud. En términos generales, los locus de las STR son menos polimórficos en cada locus individual que los locus de las VNTR. Por lo tanto, es deseable amplificar y detectar varios sistemas de STR en una sola reacción de amplificación y separación que proporcionen información de varios locus a la vez. Los sistemas que contienen varios locus se llaman sistemas múltiplex y se ha descrito que muchos de estos sistemas contienen hasta 11 locus de STR diferentes. Véase, p. ej., *Proceedings: American Academic of Forensic Sciences* (9-14 de febrero de 1998), Schumm, James W et al., pág. 53, B88; *Id.*, Gibson, Sandra D. et al., pág. 53, B89; *Id.*, Lazaruk, Katherine et al., pág. 51, B83; Sparkes, R et al., *Int. J. Legal Med.* (1996) 109: 186-194; *AmpF!STR Profiler™ PCR Amplification Kit User's Manual* (1997) pub. de Perkin-Elmer Corp., i-viii y 1-1 a 1-10; *AmpF!STR Profiler Plus™ PCR Amplification Kit User's Manual* (1997), pub. de Perkin-Elmer Corp., i-viii y 1-1 a 1-10; *AmpF!STR COfiler™ PCR Amplification Kit User Bulletin* (1998), pub. de Perkin-Elmer Corp., i-iii y 1-1 a 1-10; *9th International Symposium on Human Identification* (7-10 de octubre de 1998), pub. de Promega Corp., Staub, Rick W et al., resumen del póster 15; *Id.*, Willard, Jeanne M. et al., resumen del póster 73; e *Id.*, Walsh, P. Sean et al., resumen del ponente de 8:50-9:20 horas, jueves, 8 de octubre de 1998.

Se pueden diseñar protocolos de amplificación con locus de STR en los que se sintetizan productos pequeños, generalmente de 60 a 500 pares de bases (pb) de longitud, y a menudo se obtienen alelos de cada locus dentro de un margen de menos de 100 pb. Esto permite el análisis electroforético simultáneo de varios sistemas en la misma electroforesis en gel o capilar mediante el diseño cuidadoso de cebadores de PCR de tal forma que todos los productos de amplificación posibles de un sistema individual no se solapen con el margen de alelos de otros sistemas. El diseño de estos sistemas está limitado, en parte, por la dificultad de separar varios locus en un único gel o capilar. Esto ocurre porque en los geles o en los capilares, es decir, en los medios utilizados con frecuencia para la separación de los fragmentos de ADN por los expertos en la técnica, los fragmentos de diferentes tamaños se comprimen espacialmente, en especial los fragmentos más largos.

La patente internacional WO 97/39138 se refiere a ensayos de caracterización por ADN para determinar los alelos presentes en cada locus basados en la coamplificación de un conjunto de entre tres y ocho locus de STR y la evaluación de los alelos amplificados en la mezcla.

La Oficina Federal de Investigación de los Estados Unidos («FBI», por su nombre en inglés) ha establecido y mantiene un Sistema de Índice de ADN Combinado («CODIS», por su nombre en inglés), una base de datos de información de tipificación por ADN. Los organismos que hacen cumplir la ley de forma local, estatal y nacional utilizan el sistema CODIS para emparejar las pruebas forenses de ADN recogidas en la escena de un crimen con la información de los ADN de la base de datos. El CODIS y otros sistemas de bases de datos nacionales han demostrado ser una herramienta eficaz para tales organismos cuando la utilizan para solucionar los delitos con violencia (véase, p. ej., Niezgoda, Stephen, en la *Cambridge Healthtech Institute's Second Annual Conference on DNA Forensics: Science, Evidence and Future Prospects* (17-18 de noviembre de 1998), págs. 1-21; Niezgoda, Stephen en *Proceedings from the Eight International Symposium on Human Identification 1997*, pub. de Promega Corporation (1998), págs. 48-49; Frazier, Rachel R. E. et al., *Id.* págs. 56-60; Niezgoda, S. J., *Profiles in DNA* 1 (3): 12-13; Werrett, D. J y Sparkes, R. en *Speaker Abstracts: 9th International Symposium on Human Identification* (7-10 de octubre de 1998), págs. 5-6). Hasta hace poco, sólo se consideraban un componente central de la base de datos los datos de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción («RFLP», por su nombre en inglés) obtenidos al analizar determinados locus de VNTR. El FBI ha identificado recientemente 13 locus de STR polimórficos a incluir en la base de datos CODIS.

Los 13 locus de STR del CODIS son HUMCSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539,

D18S51, D21S11, HUMFIBRA, HUMTH01, HUMTPOX y HUMvWFA31 (Budowie, Bruce y Moretti, Tamyra en *Speaker Abstracts: 9th International Symposium on Human Identification* (7-10 de octubre de 1998), págs. 7-8). Los datos de los marcadores basados en VNTR y en STR se mantienen actualmente en la base de datos CODIS (véase, p. ej., Niezgodna, Stephen en *Second Annual Conference on DNA Forensics, supra*). Hasta la presente invención, el número de locus que se podían coamplificar en una única reacción para luego analizarlos era muy pequeño. Específicamente, no se ha desarrollado ningún material ni método para el uso en la amplificación múltiple de 13 o más locus de STR, mucho menos los 13 locus polimórficos de STR identificados para usar en la base de datos CODIS.

El material y los métodos del presente procedimiento están diseñados para ser usados en el análisis múltiple de determinados locus polimórficos de ADN de distintos tipos, entre los que se incluyen ADN monocatenario y bicatenario de muy diferentes fuentes. La presente invención representa una mejora significativa sobre la tecnología existente y aporta un incremento del poder de discriminación, precisión y capacidad de procesamiento para la caracterización por ADN para los análisis de ligamiento, la justicia penal, las pruebas de paternidad y otras aplicaciones de identificación forense, médica y genética.

15 COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención da a conocer los métodos para identificar simultáneamente los alelos presentes en un conjunto de locus de una o más muestras de ADN, que comprende:

obtener al menos una muestra de ADN a analizar;

seleccionar un conjunto de locus de la muestra de ADN, que comprende los locus de repeticiones cortas en tándem D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, HUMCSF1PO, HUMFIBRA, HUMTH01, HUMTPOX y HUMvWFA31;

coamplificar los locus del conjunto mediante una reacción en cadena de la polimerasa, en la que el producto de la reacción es una mezcla de alelos amplificados a partir de cada uno de los locus coamplificados que hay en el conjunto; y

evaluar los alelos amplificados en la mezcla para determinar los alelos presentes en cada uno de los locus analizados del conjunto dentro de la muestra de ADN.

La presente invención se puede usar específicamente en el campo del análisis forense, determinación de la paternidad, vigilancia del trasplante de la médula ósea, mapeo de ligamiento y detección de enfermedades genéticas y neoplasias malignas. Al permitir 13 marcadores, los métodos de la presente invención incrementan significativamente la certeza con la que se puede emparejar el ADN preparado de diferentes muestras del mismo individuo. La necesidad de emparejar o diferenciar con exactitud entre muestras que contienen cantidades muy pequeñas de ADN es particularmente acuciente en las aplicaciones forenses, en donde muchas condenas (y absoluciones) dan un giro con el análisis de tipificación por ADN.

Los científicos, en particular los científicos forenses, han valorado desde hace tiempo la necesidad de analizar varios locus polimórficos del ADN para estar seguros de que la coincidencia entre dos muestras de ADN es estadísticamente significativa (Presley, L. A. et al., en *The Third International Symposium on Human Identification 1992*, págs 245-269 (pub. de Promega Corp., 1993); Bever, R. A. et al., en *The Second International Symposium on Human Identification 1991*, págs. 103-128 (pub. de Promega Corp., 1992)). Sin embargo, hasta la llegada de esta invención no se podían analizar simultáneamente 13 o más locus de STR en una única reacción. Para resaltar la importancia de tal capacidad de multiplexación, será de ayuda el conocimiento de parte de las matemáticas que están detrás de los análisis de tipificación.

A título ilustrativo, supongamos que cada locus de STR tiene una frecuencia de genotipo (a saber, patrón de dos alelos) de 1 por cada 10. En otras palabras, supongamos que la probabilidad de que dos individuos elegidos al azar tengan la misma STR es de 1/10. Sin embargo, si analizamos dos tipos diferentes de locus de STR, la posibilidad de que coincidan al azar con ambos sistemas es de 1/100. Si se analizan tres locus de STR, la probabilidad de coincidencia al azar con cada uno de los tres sistemas es de 1/1000, y así sucesivamente. Por consiguiente, es fácil ver que el incremento del número de locus de STR analizados reduce la probabilidad de coincidencia al azar entre la población general, por lo que se incrementa la posibilidad de poder identificar con exactitud la presencia de un sospechoso en la escena de un crimen al comparar el tipo del individuo con el de las pruebas de la escena del crimen. Un razonamiento parecido se puede utilizar para concluir que el método de esta invención también incrementaría la probabilidad de identificación exacta de un presunto padre en un caso de paternidad, de coincidencia correcta del tejido de la médula ósea, de desarrollo de resultados significativos en los estudios de mapas de ligamiento, y de detección de enfermedades genéticas y neoplasias malignas.

Otras ventajas de la invención resultarán obvias a partir de la siguiente descripción detallada de la invención y de los dibujos ilustrativos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

En la figura 1A hay un gráfico del resultado de la detección tricolor de fluorescencia de los productos de la amplificación simultánea de los locus D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, HUMCSF1PO, HUMFIBRA, HUMTH01, HUMTPOX y HUMvWFA31 de una muestra de ADN genómico humano, tal y como se detecta con el analizador genético ABI PRISM[®] 310 del ejemplo 1.

En la figura 1B hay un gráfico del resultado de la detección tricolor de fluorescencia de una muestra de control procesada del mismo modo que la figura 1A, sin ningún ADN genómico en la reacción de amplificación.

En la figura 2A hay un gráfico del resultado de la detección tricolor de fluorescencia de los productos de la amplificación simultánea de los locus D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, HUMCSF1PO, HUMFIBRA, HUMTH01, HUMTPOX, HUMvWFA31, G475, S159 y amelogenina de una muestra de ADN genómico humano, tal y como se detecta con el analizador genético ABI PRISM[®] 310 del ejemplo 2

En la figura 2B hay un gráfico del resultado de la detección tricolor de fluorescencia de una muestra de control procesada de la misma manera que en la figura 2A, sin ADN genómico de sustrato en la reacción de amplificación.

En la figura 3A hay un gráfico del resultado de la detección tricolor de fluorescencia de los productos de la amplificación simultánea de los locus D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, HUMCSF1PO, HUMFIBRA, HUMTH01, HUMTPOX, HUMvWFA31, G475, S159 y amelogenina de una muestra de ADN genómico humano, tal y como se detecta con el secuenciador de ADN ABI PRISM[®] 377 del ejemplo 3.

En la figura 3B hay un gráfico del resultado de la detección tricolor de fluorescencia de una muestra de control procesada de la misma manera que en la figura 3A, sin ADN genómico de sustrato en la reacción de amplificación.

En las figuras 4A y 4B hay imágenes de impresión láser de los resultados de la detección de la fluorescencia de los productos de la amplificación simultánea de los locus D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, HUMCSF1PO, HUMFIBRA, HUMTH01, HUMTPOX, HUMvWFA31, G475, S159 y amelogenina tal y como se detecta con el canal de fluoresceína (figura 4A) y con el canal de carboxitetrametilrodamina (figura 4B) de un escáner de fluorescencia FMBIO[®] II de Hitachi, tal y como se describe en el ejemplo 4.

En las figuras 5A y 5B hay imágenes de impresión láser de los resultados de la detección de la fluorescencia de los productos de la amplificación simultánea de los locus D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, HUMCSF1PO, HUMFIBRA, HUMTH01, HUMTPOX, HUMvWFA31, G475, S159 y amelogenina tal y como se detecta con el canal de fluoresceína (figura 5A) y con el canal de carboxitetrametilrodamina (figura 5B) de un escáner de fluorescencia FMBIO[®] II de Hitachi, tal y como se describe en el ejemplo 5.

En las figuras 6A y 6B hay imágenes de impresión láser de los resultados de la detección de la fluorescencia de los productos de la amplificación simultánea de los locus D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, HUMCSF1PO, HUMFIBRA, HUMTH01, HUMTPOX, HUMvWFA31, C221, S159 y amelogenina tal y como se detecta con el canal de fluoresceína (figura 6A) y con el canal de carboxitetrametilrodamina (figura 6B) de un escáner de fluorescencia FMBIO[®] II de Hitachi, tal y como se describe en el ejemplo 6.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A. Definiciones

Las siguientes definiciones pretenden ayudar a proporcionar un conocimiento claro y sólido del alcance y los detalles de la siguiente terminología, tal y como se utilizan para describir y definir la presente invención:

«Escalera alélica»: marcador estándar de tamaños que consiste en los alelos amplificados a partir del locus.

«Alelo»: una variación genética asociada a un segmento de ADN, esto es, una de las dos o más formas alternativas de una secuencia de ADN que ocupan el mismo locus.

«Nomenclatura bioquímica»: en esta memoria se utiliza la nomenclatura bioquímica estándar, en donde las bases de los nucleótidos se denominan adenina (A), timina (T), guanina (G) y citosina (C). Los nucleótidos correspondientes son, por ejemplo, 5'-trifosfato de desoxiguanosina (dGTP).

«Polimorfismo del ADN»: la condición en la que dos o más secuencias nucleotídicas diferentes de una secuencia de ADN coexisten en la misma población de cruzamiento.

«Locus» o «locus genético»: una posición concreta en un cromosoma. Los alelos de un locus están localizados en el mismo sitio de los cromosomas homólogos.

«Cebador específico de locus»: un cebador que se hibrida específicamente a una porción del locus declarado o a su

cadena complementaria, al menos a un alelo del locus, y no se hibrida de forma eficaz con otras secuencias de ADN en las condiciones utilizadas en el método de amplificación.

5 «Repetición pentanucleotídica en tándem»: una subclase de polimorfismo de STR definida más adelante. A menos que se indique otra cosa, la terminología «repetición pentanucleotídica en tándem» abarca las STR perfectas en las que la unidad de repetición es una secuencia de cinco bases y las STR imperfectas en las que al menos una unidad de repetición es una repetición de cinco bases.

10 «Reacción en cadena de la polimerasa» o «PCR»: una técnica en la que los ciclos de desnaturalización, hibridación del cebador y extensión con la ADN polimerasa se utilizan para amplificar unas 10^6 veces o más el número de copias de una secuencia de ADN deseada. El proceso de la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar ácidos nucleicos se trata en las patentes de los EE.UU. con n.º 4 683 195 y 4 683 202, que se incorporan en la presente memoria por referencia para una descripción del procedimiento.

«Polimorfismo del locus de repeticiones cortas en tándem»: los locus de STR, que se definen más adelante, en los que el número de elementos de secuencia repetitiva (y la longitud neta de la secuencia) de una región concreta del ADN genómico varía de un alelo a otro y de un individuo a otro.

15 «Contenido informativo del polimorfismo» o «PIC» (por su nombre en inglés): una medida de la cantidad de un polimorfismo presente en un locus (Botstein et al., 1980). Los valores del PIC varían de 0 a 1,0, donde los valores más altos indican un mayor grado de polimorfismo. Esta medida suele mostrar valores más pequeños que las otras mediciones que se utilizan habitualmente, esto es, heterocigosidad. Para los marcadores que son muy informativos (la heterocigosidad supera el 70% aproximadamente), la diferencia entre heterocigosidad y PIC es muy ligera.

20 «Cebador»: un oligonucleótido o fragmento de ADN monocatenario que se hibrida a una cadena de ADN de un locus de tal manera que el extremo 3' del cebador actuaría como sitio de polimerización cuando se usa una enzima ADN polimerasa.

25 «Pareja de cebadores»: dos cebadores, que incluyen el cebador 1 que se hibrida a una única cadena en un extremo de la secuencia del ADN a amplificar y el cebador 2 que se hibrida al otro extremo de la cadena complementaria de la secuencia de ADN a amplificar.

«Sitio del cebador»: el área del ADN diana al que se hibrida el cebador.

30 «Locus de repeticiones cortas en tándem» o «locus de STR»: regiones del ADN genómico que contienen elementos de secuencia repetitiva corta de 3 a 7 pares de bases de longitud. La terminología STR también abarca una región de ADN genómico en la que se repite en tándem más de una secuencia de 3 a 7 bases o con bases intercaladas, con tal de que al menos una de las secuencias esté repetida al menos dos veces en tándem. Cada secuencia repetida al menos una vez dentro de la STR se denomina en la presente memoria una «unidad de repetición».

35 Las secuencias de los locus de STR se pueden dividir en dos categorías generales: perfectas e imperfectas. La terminología STR «perfecta», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una región de ADN bicatenario que contiene una única unidad de repetición de 3 a 7 bases repetida en tándem al menos dos veces, por ejemplo $(AAAAT)_2$. La terminología STR «imperfecta», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una región de ADN que contiene al menos dos repeticiones en tándem de una unidad de repetición perfecta y al menos una repetición de una unidad de repetición imperfecta, en la que la unidad de repetición imperfecta consiste en una secuencia de ADN que podría ser resultado de una, dos, tres o cuatro inserciones, deleciones o sustituciones de bases en la secuencia de la unidad de repetición perfecta, por ejemplo $(AAAAT)_{12}(AAAAAT)_5AAT(AAATT)_4$. Cada secuencia de STR imperfecta contiene al menos una secuencia de STR perfecta. Específicamente, cada secuencia de STR, bien sea perfecta o imperfecta, incluye al menos una secuencia de unidad de repetición que aparece al menos dos veces en tándem, una secuencia de unidad de repetición que se puede representar por la fórmula (I):

$$(A_wG_xT_yC_z)_n \quad (I)$$

45 en la que A, G, T y C representan los nucleótidos que pueden estar en cualquier orden; w, x, y y z representan el número de cada nucleótido en la secuencia y oscila desde 0 a 7, y la suma de $w + x + y + z$ oscila entre 3 y 7; y n representa el número de veces que la secuencia se repite en tándem, y es de al menos 2.

El conjunto de locus analizados de acuerdo con la presente invención incluye los 13 locus de CODIS, esto es, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, HUMCSF1PO, HUMFIBRA, HUMTH01, HUMTPOX y HUMWFA31.

50 Al menos uno de los locus seleccionados para la coamplificación en la presente reacción múltiple es preferentemente un locus de STR con una unidad de repetición de 5 a 7 bases o pares de bases de longitud, más preferentemente un locus de STR con una repetición pentanucleotídica. Tal y como se demuestra en la solicitud de patente de los EE.UU. con número de serie 09/018 584, que se incorpora por referencia en la presente memoria, los locus con tales repeticiones de longitud intermedia se pueden amplificar con una incidencia mínima de artefactos,

por ejemplo, debidos a resbalones en las repeticiones. Tres de estos locus con repeticiones pentanucleotídicas, G475, C221 y S159, se incluyen en los conjuntos de locus identificados inmediatamente antes. La terminología «G475», «C221» y «S159», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a los nombres asignados a los locus de repeticiones pentanucleotídicas que se han identificado, como se describe en la solicitud de patente de los EE.UU. con número de serie 09/018 584, que se incorporó por referencia más arriba. Cada nombre se corresponde con un clon a partir del cual se identificó cada locus pentanucleotídico. La secuencia del clon G475, que se describe en ella como SEQ ID n.º 34, se identifica en la presente memoria como SEQ ID n.º 108. La secuencia del clon C221, que se describe en ella como SEQ ID n.º 2, se identifica en la presente memoria como SEQ ID n.º 109. La secuencia del clon S159, que se describe en ella como SEQ ID n.º 26, se identifica en la presente memoria como SEQ ID n.º 110. Cada cebador y las parejas de cebadores identificados para uso en la amplificación de G475, C221 y S159 en ella se pueden usar también para amplificar los mismos locus en los conjuntos de al menos 13 locus coamplificados y analizados de acuerdo con la presente invención.

Preferentemente, el conjunto de locus seleccionados para la coamplificación y el análisis de acuerdo con la invención comprende adicionalmente al menos un locus adicional a los al menos 13 locus de STR. El locus adicional incluye preferentemente un polimorfismo de secuencia u otra peculiaridad que identifica una característica particular que separa el ADN de un individuo del ADN de otros individuos en la población. El locus adicional más preferentemente es un locus que identifica el sexo de la fuente de la muestra de ADN analizada. Cuando la muestra de ADN es un ADN genómico humano, se selecciona preferentemente un locus identificador del sexo, tal como el locus de la amelogenina, para la coamplificación y el análisis de acuerdo con el presente método. El locus de la amelogenina está identificado en GenBank como HUMAMELY (cuando se utiliza para identificar un locus en el cromosoma Y contenido en el ADN del macho) o como HUMAMELX (cuando se utiliza para identificar un locus en el cromosoma X del ADN del macho o de la hembra). Cuando el locus de la amelogenina se coamplifica en la misma reacción de amplificación múltiplex como el conjunto de al menos 13 locus de repeticiones cortas en tándem, la secuencia de al menos uno de los cebadores utilizados para amplificar este locus particular en la reacción de amplificación múltiplex tiene preferentemente una secuencia seleccionada entre SEQ ID n.º 86, SEQ ID n.º 105 y SEQ ID n.º 87.

D. Selección de cebadores

Una vez que se ha identificado un conjunto de locus para la coamplificación en una sola reacción múltiplex, se pueden determinar los cebadores adecuados para coamplificar cada locus del conjunto. Se debe tener cuidado al seleccionar la secuencia de los cebadores utilizados en la reacción múltiplex. La selección inadecuada de cebadores puede producir varios efectos indeseables tales como la ausencia de amplificación, la amplificación en varios sitios, la formación de dímeros de cebadores, la interacción indeseable de secuencias de cebadores de locus diferentes, la producción de alelos a partir de un locus que se solapa con los alelos de otro, o la necesidad de condiciones o protocolos de amplificación para los diferentes locus que son incompatibles en una múltiplex. Los cebadores utilizados en el presente método o incluidos en los kits presentes en la invención se seleccionan preferentemente de acuerdo con el proceso de selección que viene a continuación.

Los cebadores se desarrollan y se seleccionan preferentemente para usarlos en los sistemas múltiplex de la invención mediante un proceso reiterativo en el que se seleccionan secuencias de cebadores, se mezclan los cebadores para la coamplificación de los locus seleccionados, se coamplifican los locus, y luego se separan y se detectan los productos amplificados. Inicialmente, este proceso produce a menudo los alelos amplificados de una forma descompensada (p. ej., el rendimiento del producto de algunos locus es mayor que el de otros) y también puede generar productos de amplificación que no representan a los propios alelos. Estos fragmentos de más pueden ser resultado de una serie de causas que se describen más arriba.

Para eliminar tales fragmentos de más de los sistemas múltiplex, los cebadores individuales del conjunto total se utilizan con cebadores para los mismos u otros locus con el objeto de identificar qué cebadores contribuyen a la amplificación de los fragmentos de más. Una vez que se identifican dos cebadores que generan uno o más de los fragmentos, se modifican y se vuelven a analizar uno o ambos contribuidores, tanto la pareja sola como incluida en el sistema múltiplex (o un subconjunto del sistema múltiplex). Este proceso se repite hasta que la evaluación de los productos produce alelos amplificados sin fragmentos de más, o con una cantidad aceptable de ellos, en el sistema múltiplex.

Cuando sea necesario se pueden eliminar los fragmentos de más marcando el cebador opuesto de una pareja de cebadores. Este cambio revela los productos del cebador opuesto en la etapa de detección. El nuevo cebador marcado podría amplificar los alelos verdaderos con mayor fidelidad que el cebador marcado inicialmente, con lo que generaría los alelos verdaderos en una mayor proporción en el producto de amplificación total.

La determinación de la concentración de cebadores se puede realizar tanto antes como después de la selección de la secuencia de los cebadores finales, pero se realiza preferentemente después de la selección. Por lo general, el incremento de la concentración de cebadores para cualquier locus concreto incrementa la cantidad de producto generado para ese locus. Sin embargo, esto también es un proceso reiterativo porque el incremento del rendimiento

de un locus puede hacer disminuir el de otro u otros locus más. Además, los cebadores pueden interactuar directamente y alterar el rendimiento del otro locus. El incremento lineal de la concentración de los cebadores no produce necesariamente el incremento lineal del rendimiento del producto para el locus correspondiente.

5 El equilibrio entre los locus también está afectado por una serie de parámetros del protocolo de amplificación, tal como la cantidad de molde utilizado, el número de ciclos de amplificación, la temperatura de alineamiento del protocolo de termociclación, y la inclusión o exclusión de una etapa de extensión adicional al final del proceso cíclico. No se suele conseguir el equilibrio absolutamente parejo para los los alelos y locus.

10 El proceso del desarrollo del sistema múltiplex también puede ser un proceso reiterativo en otro sentido descrito más arriba. Es decir, es posible, primero, desarrollar un sistema múltiplex para un número pequeño de locus, este sistema está libre o casi libre de fragmentos de más procedentes de la amplificación. Los cebadores de este sistema se pueden combinar con cebadores de uno o más locus adicionales. Esta combinación de cebadores expandida puede o no puede producir fragmentos adicionales a partir de la amplificación. A su vez, se pueden introducir y evaluar nuevos cebadores.

15 Uno o más de los procesos de selección reiterativos descritos más arriba se repiten hasta que se identifica un conjunto completo de cebadores que se puede utilizar para coamplificar al menos los 13 locus seleccionados para la coamplificación como se describe más arriba. Se entiende que pueden desarrollarse muchos conjuntos diferentes de cebadores para amplificar un determinado conjunto de locus.

20 La síntesis de los cebadores utilizados en el presente método se puede llevar a cabo con cualquier procedimiento estándar para la síntesis de oligonucleótidos conocido por los expertos en la técnica. Preferentemente, al menos a un cebador de cada locus se le une covalentemente una marcación colorante, como se describe en el apartado F que viene a continuación.

25 La tabla 1 que viene a continuación proporciona una lista de secuencias de cebadores que se ha determinado que son adecuados para su uso en la amplificación de los correspondientes polimorfismos de locus de STR recogidos en ella. Al menos un cebador recogido en la tabla 1 se utiliza preferentemente para amplificar al menos uno de los locus seleccionados para la coamplificación y el análisis, como se describe más arriba. Se entiende que se podrían identificar otros cebadores que sean adecuados para la amplificación simultánea de los locus recogidos a continuación.

TABLA 1

Locus	Cebador de SEQ ID n.º
D7S820	1, 2, 80 y 81
D13S317	3, 4, 82 y 83
D5S818	5, 6, 84 y 85
D3S1539	7, 8 y 49
D17S1298	9 y 10
D20S481	11, 12, 52 y 53
D9S930	13, 14, 55 y 61
D10S1239	15, 16 y 54
D14S118	17 y 18
D14S562	19 y 20
D14S548	21 y 22
D16S490	23 y 24
D16S753	25 y 26
D17S1299	27 y 28
D16S539	29, 30, 58, 79 y 97
D22S683	31 y 32
HUMCSF1PO	33, 34, 77, 78 y 98
HUMTPOX	35, 36, 72 y 73
HUMTH01	37, 38, 66, 67 y 103

HUMvWFA31	39, 40, 59, 60 y 76
HUMF13A01	41 y 42
HUMFESFPS	43 y 44
HUMBFXIII	45 y 46
HUMLIPOL	47 y 48
D19S253	50 y 51
D4S2368	56 y 57
D18S51	62, 63, 101 y 102
D21S11	64 y 65
D3S1538	68, 69 y 106
HUMFIBRA	70, 71 y 107
D8S1179	74, 75 y 104
G475	88, 89 y 94
S159	90, 91, 92, 93, 95 y 96
C221	99 y 100

E. Preparación de muestras de ADN

Se pueden preparar muestras de ADN genómico para utilizarlas en el método de esta invención mediante cualquier método de preparación de ADN que es compatible con la amplificación de ADN. Muchos de tales métodos los conocen los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, la purificación de ADN mediante extracción con fenol (Sambrook, J. et al (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York., págs. 9.14-9.19), y la purificación parcial mediante la precipitación con sales (Miller, S et al. (1988) *Nucl. Acids. Res.* 16: 1215) o Chelex (Walsh et al., (1991) *BioTechniques* 10: 506-513, Comey et al., (1994) *Forensic Sci.* 39: 1254) y la liberación de material sin purificar mediante sangre sin tratar (Burckhardt, J. (1994) *PCR Methods and applications* 3: 239-243, McCabe, Edward R. B., (1991) *PCR Methods and applications* 1: 99-106, Nordvåg, Bjørn-Yngvar (1992) *BioTechniques* 12:4 págs. 490-492).

Cuando al menos una muestra de ADN a analizar mediante el método de esta invención es ADN genómico humano, el ADN se prepara preferentemente de tejido, se selecciona entre el grupo que consiste en sangre, semen, células vaginales, cabello, saliva, orina, hueso, muestras orales, líquido amniótico que contiene células de la placenta o células fetales, velloidad coriónica y mezclas de cualquiera de los tejidos que se acaban de enumerar.

Opcionalmente, la concentración del ADN se puede medir antes de usarlo en el método de la presente invención, mediante cualquier método estándar de cuantificación de ADN conocido por los expertos en la técnica. En tales casos, la concentración del ADN se determina preferentemente mediante la medición espectrofotométrica como se describe en Sambrook, J. et al., (1989), *supra*, apéndice E.5, o por fluorometría mediante una técnica de medición tal como la descrita por Brunk C. F. et al. (1979), *Anal. Biochem.* 92: 497-500. La concentración del ADN se mide más preferentemente al comparar la cantidad de hibridación de los patrones de ADN con una sonda específica de humano tal como la descrita por Wayne, J. S et al., (1991) «Sensitive and specific quantification of human genomic deoxyribonucleic acid (DNA) in forensic science specimens: casework examples», *J. Forensic Sci.*, 36: 1198-1203. El uso de demasiado ADN de plantilla en las reacciones de amplificación produce artefactos que aparecen como bandas de más que no representan alelos verdaderos.

F. Amplificación del ADN

Una vez que se prepara una muestra de ADN genómico, los locus deseados se coamplifican en la etapa de amplificación múltiple con el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki, R. K. et al., (1985) *Science* 230: 1350-1354). La muestra de ADN se somete a la amplificación por PCR con parejas de cebadores específicos para cada locus del conjunto. Se hace referencia al listado de secuencias del final de esta especificación para los detalles de la secuencia de los cebadores utilizados en los ejemplos que vienen a continuación, y algunas de dichas secuencias son realizaciones alternativas de esta invención.

Preferentemente, al menos un cebador de cada locus se une covalentemente a un colorante marcador, más preferentemente un colorante marcador por fluorescencia. Los cebadores y colorantes unidos a éste se seleccionan preferentemente para la reacción de amplificación múltiple, de tal forma que los alelos amplificados con los cebadores para cada locus marcados con un color no se solapan con los alelos de los otros locus en el conjunto

coamplificado con los cebadores marcados con el mismo color, cuando los alelos se separan, preferentemente, mediante electroforesis en gel o capilar.

En una realización particularmente preferente del método de la presente invención, al menos un cebador de cada locus coamplificado en la reacción múltiplex está marcado con una marcación fluorescente antes de su uso en la reacción. En el mercado se pueden adquirir los marcadores fluorescentes adecuados para la unión a cebadores para uso en la presente invención. Véanse, p. ej., los marcadores de fluoresceína y de carboxitetrametilrodamina y sus derivados químicos de PE Biosystems y Molecular Probes. Más preferentemente, se utilizan al menos tres marcaciones diferentes para marcar los diferentes cebadores utilizados en la reacción de amplificación múltiplex. Cuando se incluye un marcador de tamaños para evaluar la reacción múltiplex, los cebadores utilizados para preparar el marcador de tamaños se marcan preferentemente con una marcación diferente de la que tienen los cebadores utilizados para amplificar los locus de interés en la reacción.

Los detalles del protocolo de amplificación más preferente para cada una de las combinaciones más preferentes de locus para uso en el método de esta invención se ofrecen en los ejemplos que vienen a continuación. También se hace referencia a los ejemplos para los detalles adicionales del procedimiento específico relacionado con cada múltiplex. Las secuencias de los cebadores específicos de locus utilizados en los ejemplos incluyen una serie de nucleótidos que, en las condiciones utilizadas durante la hibridación, son suficientes para hibridarse con un alelo de locus a amplificar y para quedar esencialmente libres de la amplificación de los alelos de otros locus. Se hace referencia a la patente de los EE.UU. n.º 5 192 659 de Simons, cuyas enseñanzas se incorporan en la presente memoria por referencia para una descripción más detallada de los cebadores específicos de locus.

20 G. Separación y detección de los fragmentos de ADN

Una vez que se ha producido un conjunto de alelos amplificados en la etapa de amplificación múltiplex del presente método, se evalúan los alelos amplificados. La etapa de evaluación de este método se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los numerosos y diferentes medios existentes, describiéndose más adelante los más preferentes.

Se utiliza la electroforesis para separar los productos de la reacción de amplificación múltiplex, más preferentemente la electroforesis capilar (véase, p. ej., Buel, Eric et al. (1998) *Journal of Forensic Sciences*; 43: (1) págs. 164-170) o la electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (véase, p. ej., Sambrook, J. et al. (1989) en *Molecular Cloning — A Laboratory manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, págs. 13.45-13.57). Los procedimientos y condiciones de la electroforesis y de la preparación del gel que resultan adecuados para el uso en la etapa de evaluación de método de esta invención se ilustran en los ejemplos que vienen a continuación. La separación de los fragmentos de ADN en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y en la electroforesis capilar se produce principalmente por los tamaños de los fragmentos.

Una vez que se separan los alelos amplificados, entonces se pueden visualizar y analizar los alelos y cualquier otro ADN en la electroforesis en gel o capilar (p. ej., marcadores de tamaño del ADN o una escalera de alelos). La visualización del ADN en el gel se puede llevar a cabo utilizando cualquiera de una serie de métodos de la técnica anterior, entre ellos la tinción con plata o indicadores tales como radioisótopos, fluorescencia quimioluminiscencia y enzimas en combinación con sustratos detectables. Sin embargo, la fluorescencia es el método preferente para la detección de múltiplex que contienen 13 o más locus (véase, p. ej., Schumm, J. W. et al, en *Proceedings from the Eight International Symposium on Human Identification*, (publ. en 1998 por Promega Corporation), págs. 78-84; Buel, Eric et al. (1998), *supra*), en donde los cebadores para cada locus de la reacción de multiplexado van seguidos por la detección de los productos marcados que emplea un detector fluorimétrico. Las referencias citadas más arriba, que describen los métodos de la técnica anterior para la visualización de los alelos, se incorporan por referencia en la presente memoria.

Los alelos presentes en la muestra de ADN se determinan preferentemente mediante la comparación con un patrón de tamaños tal como un marcador de masas moleculares de ADN o una escalera alélica específica de locus para determinar los alelos presentes en cada locus dentro de la muestra. El marcador de tamaños más preferente para evaluar una amplificación múltiplex que contiene dos o más locus de STR polimórficos consiste en una combinación de escaleras alélicas para cada uno de los locus que se evalúan. Véase, p. ej., Puers, Christoph et al., (1993) *Am. J. Hum. Genet.* 53: 953-958, Puers, Christoph et al. (1994) *Genomics* 23: 260-264. Véase también las patentes de los EE.UU. n.º 5 599 666, n.º 5 674 686 y n.º 5 783 406 para las descripciones de escaleras alélicas adecuadas para el uso en la detección de locus de STR, y los métodos de la construcción de las escaleras descritos en ellas.

Después de construir escaleras alélicas para cada locus, éstas se pueden mezclar y cargar para la electroforesis en gel al mismo tiempo que se cargan las muestras amplificadas. Cada escalera alélica se migra a la vez que los alelos en la muestra del locus correspondiente.

Los productos de las reacciones múltiplex de la presente invención se pueden evaluar con un patrón interno para el carril, un tipo especializado de marcador de tamaños configurado para migrar en el mismo carril de un gel de poliacrilamida o en el mismo capilar. El patrón interno para el carril consiste preferentemente en una serie de fragmentos de longitud conocida. El patrón interno para el carril más preferente está marcado con un colorante

fluorescente que se puede distinguir de otros colorantes en la reacción de amplificación.

Después de la construcción del patrón interno para el carril, este patrón también se puede mezclar con una muestra amplificada o escaleras alélicas y se puede cargar en la electroforesis para la comparación de la migración en diferentes carriles de la electroforesis en gel o de diferentes capilares en la electroforesis capilar. La variación de la migración del patrón interno para el carril indica la variación del funcionamiento del medio de separación. La cuantificación de esta diferencia y la correlación con escaleras alélicas permite la corrección de la determinación del tamaño de los alelos en las muestras desconocidas.

H. Técnica de detección preferente: detección de la fluorescencia

En una de las realizaciones más preferentes del método de esta invención se utiliza la detección de fluorescencia para evaluar los alelos amplificados en la mezcla producida por la reacción de amplificación múltiplex. Más adelante hay un resumen breve de la puesta en práctica preferente de este método de detección.

Con la llegada de las técnicas de imagen fluorescente automáticas se puede conseguir una detección y un análisis más rápidos de los productos de amplificación múltiplex. Para el análisis de la fluorescencia, en la amplificación de cada locus se puede incluir un cebador marcado con fluorescencia. Los cebadores marcados con fluorescencia preferentemente adecuados para el uso en la presente invención incluyen los cebadores marcados con fluoresceína (FL-), marcados con carboxitrametilrodamina (TMR-) y marcados con 5,6-carboxirrodamina 6G (R6G-), tal y como se ilustra en los ejemplos que vienen a continuación. La separación de los fragmentos amplificados producidos mediante tales cebadores marcados se consigue preferentemente mediante electroforesis en gel plano o mediante electroforesis capilar. Los fragmentos separados resultantes se pueden analizar con equipos de detección de fluorescencia tales como el analizador genético ABI PRISM[®] 310, un secuenciador de ADN ABI PRISM[®] 377 (Applied Biosystems Division, Perlin Elmer, Foster City, CA), o un escáner de fluorescencia Hitachi FMBIO[®] II (Hitachi Software Engineering America, Ltd. South San Francisco, CA).

En resumen, el método de esta invención se pone en práctica lo más preferentemente con una etapa de detección que consiste en la detección de la fluorescencia. En este método preferente de detección, uno o ambos cebadores de cada pareja de cebadores utilizados en la reacción de amplificación múltiplex tiene una marcación fluorescente unida a él y, como resultado, los alelos amplificados producidos a partir de la reacción de amplificación están marcados con fluorescencia. En esta realización más preferente de la invención, los alelos amplificados se separan posteriormente mediante electroforesis capilar, y los alelos separados se visualizan y se analizan con un analizador de imágenes fluorescentes.

Se prefiere la detección de la fluorescencia en lugar de los métodos radioactivos de marcación y detección porque no requiere el uso ningún material radiactivo, ni presenta ninguno de los problemas administrativos y de seguridad que acompañan al uso de tal material.

También se prefiere la detección de la fluorescencia por empleo de cebadores marcados en lugar de los otros métodos no radioactivos de detección, tales como la tinción con plata, porque los métodos fluorescentes de detección revelan por lo general menos artefactos de amplificación que la tinción con plata. El menor número de artefactos se debe, en parte, al hecho de que en la detección de fluorescencia sólo se detectan las hebras de ADN amplificadas que llevan marcación, mientras que en el método de detección por tinción con plata se tiñen y se detectan ambas hebras de cada alelo amplificado del ADN sintetizado en la reacción de amplificación múltiplex.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar las ventajas de la presente invención y para ayudar al experto en la técnica a realizar y utilizar los mismos. Los ejemplos pretenden ser ilustrativos y no pretenden, de ninguna manera por lo demás, limitar el alcance de las reivindicaciones ni la protección garantizada por la patente.

Las muestras de ADN genómico humano ensayadas en los ejemplos que vienen a continuación se prepararon de células de cultivo de tejidos o de sangre, mediante un procedimiento estándar descrito por Miller y Dykes en (Miller, S. et al (1988) *Nucl. Acids. Res.*, 16: 1215). Los métodos de aislamiento y cuantificación descritos en ella los suelen conocer los expertos en la técnica y se prefieren, pero no se requieren, para la aplicación de la invención.

Cada ejemplo que viene a continuación es un ejemplo del uso del método de esta invención para determinar simultáneamente los alelos presentes en al menos trece locus de una o más muestras de ADN genómico humano. Cada conjunto de locus coamplificados más adelante incluye los 13 locus de repeticiones cortas en tándem identificados para el uso en el sistema CODIS (a saber, D3S1358, HUMTHO1, D21S11, D18S51, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539 y HUMCSF1PO). Algunos conjuntos de locus coamplificados más adelante también incluyen uno o más locus de repeticiones cortas en tándem adicionales, tal como locus con repeticiones pentanucleotídicas (p. ej., G475, S159 o C221) y un locus sin STR, la amelogenina.

La tabla 2 resume el conjunto de locus que se coamplificó en la reacción de amplificación múltiplex descrita en cada

ejemplo que viene a continuación. La tabla también indica la pareja de cebadores que se utilizó para amplificar cada locus en cada reacción múltiplex. Un cebador de cada pareja de cebadores recogidos en la tabla 2 se marcó con fluorescencia antes de utilizarse en la reacción de amplificación múltiplex. En algunos casos se utilizó una marcación diferente para marcar los cebadores de los diferentes locus, de tal forma que los alelos sintetizados con los diferentes cebadores se pudieran diferenciar de otros cuando se detectaban con un dispositivo de detección de fluorescencia activado por láser.

Se utilizaron tres marcaciones fluorescentes diferentes en los ejemplos que siguen, que en la tabla 2 que viene a continuación se describen como «FL» para indicar la marcación con fluoresceína, «TMR» para indicar la marcación con carboxitetrametilrodamina y «R6G» para indicar la marcación con 5,6-carboxirrodamina 6G. En la tabla 2 también se indica el cebador de cada pareja de cebadores que se utilizó en la reacción de amplificación múltiplex que se marcó en cada ejemplo (p. ej., «FL-69» significa que el cebador con la SEQ ID n.º 69 se marcó en su extremo 5' con fluoresceína antes de utilizarlo en la reacción de amplificación múltiplex). Sin embargo, en el texto de cada uno de los ejemplos, la abreviatura de la marcación se coloca inmediatamente antes de la SEQ ID n.º del cebador marcado que se usa en la reacción de amplificación descrita en éste (p. ej., «FL-SEQ ID n.º 2» en vez de «FL-2»).

TABLA 2

Ejemplo	Locus amplificados	Pareja de cebadores: SEQ ID n.º utilizada	Marcación(es) fluorescente(s) utilizada(s)
1	D3S1358	68, 69	FL-69
	HUMTHO1	66, 67	FL-66
	D21S11	64, 65	FL-65
	D18S51	62, 63	FL-62
	HUMWFA31	76, 40	TMR-40
	D8S1179	74, 75	TMR-75
	HUMTPOX	72, 73	TMR-73
	HUMFIBRA	70, 71	TMR-70
	D5S818	84, 85	R6G-85
	D13S317	82, 83	R6G-83
	D7S820	80, 81	R6G-80
	D16S539	29, 79	R6G-79
HUMCSF1PO	77, 78	R6G-78	
2,3	D3S1358	68, 69	FL-69
	HUMTHO1	66, 67	FL-66
	D21S11	64, 65	FL-65
	D18S51	62, 63	FL-62
	G475	88, 89	FL-88
	Amelogenina	86, 87	TMR-86
	HUMWFA31	76, 40	TMR-40
	D8S1179	74, 75	TMR-75
	HUMTPOX	72, 73	TMR-73
	HUMFIBRA	70, 71	TMR-70

ES 2 394 070 T3

Ejemplo	Locus amplificados	Pareja de cebadores: SEQ ID n.º utilizada	Marcación(es) fluorescente(s) utilizada(s)
	D5S818	84, 85	R6G-85
	D13S317	82, 83	R6G-83
	D7S820	80, 81	R6G-80
	D16S539	29, 79	R6G-79
	HUMCSF1PO	77, 78	R6G-78
	S159	90, 91	R6G-91
4	D3S1358	68, 69	FL-69
	HUMTHO1	66, 67	FL-66
	D21S11	64, 65	FL-65
	D18S51	62, 63	FL-62
	G475	88, 89	FL-88
	Amelogenina	86, 87	TMR-86
	HUMWFA31	76, 40	TMR-40
	D8S1179	74, 75	TMR-75
	HUMTPOX	72, 73	TMR-73
	HUMFIBRA	70, 71	TMR-70
	D5S818	84, 85	FL-85
	D13S317	82, 83	FL-83
	D7S820	80, 81	FL-80
	D16S539	29, 79	FL-79
	HUMCSF1PO	77, 78	FL-78
	S159	90, 91	FL-91
5	D3S1358	68, 69	FL-69
	HUMTHO1	66, 67	FL-66
	D21S11	64, 65	FL-65
	D18S51	62, 63	FL-62
	G475	88, 94	FL-94
	Amelogenina	86, 87	TMR-86
	HUMWFA31	76, 40	TMR-40
	D8S1179	74, 75	TMR-75
	HUMTPOX	72, 73	TMR-73
	HUMFIBRA	70, 71	TMR-70

ES 2 394 070 T3

Ejemplo	Locus amplificados	Pareja de cebadores: SEQ ID n.º utilizada	Marcación(es) fluorescente(s) utilizada(s)
	D5S818	84, 85	FL-85
	D13S317	82, 83	FL-83
	D7S820	80, 81	FL-80
	D16S539	29, 79	FL-79
	HUMCSF1PO	77, 78	FL-78
	S159	95, 96	FL-96
6	D3S1358	69, 106	FL-69
	HUMTHO1	38, 103	FL-38
	D21S11	64, 65	FL-65
	D18S51	101, 102	FL-101
	S159	92, 93	FL-93
	Amelogenina	105, 87	TMR-105
	HUMvWFA31	76, 40	TMR-40
	D8S1179	104, 75	TMR-104
	HUMTPOX	72, 73	TMR-72
	HUMFIBRA	70, 107	TMR-70
	D5S818	84, 85	FL-85
	D13S317	3, 4	FL-4
	D7S820	80, 81	FL-80
	D16S539	29, 97	FL-29
	HUMCSF1PO	77, 98	FL-98
	C221	99, 100	FL-99

EJEMPLO 1

5 Detección de la fluorescencia de la amplificación múltiple de los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539 y HUMCSF1PO tal y como se detectó con el analizador genético ABI PRISM® 310

10 En este ejemplo se amplificó una plantilla de ADN simultáneamente en cada uno de los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539 y HUMCSF1PO en un solo tubo de reacción. La amplificación mediante PCR se realizó en 25 µl de tampón Gold ST®R a 1x (KCl a 50 mM, Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3 a 25 °C), Triton X-100 al 0,1%, MgCl₂ a 1,5 mM, SAB a 160 µg/ml y 200 µM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP) con 1 ng de plantilla, y 3,25 U de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Se empleó un GeneAmp® PCR System 9600 (Perkin Elmer, Foster City, CA) con el siguiente protocolo de amplificación: 96 °C durante 12 min, luego 10 ciclos de 94 °C durante 30 s, rampa durante 68 s hasta 58 °C, mantener durante 30 s, rampa durante 50 s hasta 70 °C, mantener durante 45 s, seguido por 20 ciclos de 90 °C durante 30 s, rampa durante 60 s hasta 58 °C, mantener durante 30 s, rampa durante 50 s hasta 70 °C, mantener durante 45 s, seguido por 1 ciclo de 60 °C durante 30 min.

Se utilizaron en combinación 26 cebadores de amplificación, que incluyeron 0,12 µM de cada uno de los cebadores de D3S1358 1 [SEQ ID n.º 68] y 2 [FL-SEQ ID n.º 69], 0,08 µM de cada uno de los cebadores de HUMTH01 1 [FL-

SEQ ID n.º 66] y 2 [SEQ ID n.º 67], 0,3 µM de cada uno de los cebadores de D21S11 1 [SEQ ID n.º 64] y 2 [FL-SEQ ID n.º 65], 0,2 µM de cada uno de los cebadores de D18S51 1 [FL-SEQ ID n.º 62] y 2 [SEQ ID n.º 63], 1,1 µM de cada uno de los cebadores de HUMvWFA31 1 [SEQ ID n.º 76] y 2 [TMR-SEQ ID n.º 40], 1,8 µM de cada uno de los cebadores de D8S1179 1 [SEQ ID n.º 74] y 2 [TMR-SEQ ID n.º 75], 0,6 µM de cada uno de los cebadores de HUMTPOX 1 [SEQ ID n.º 72] y 2 [TMR-SEQ ID n.º 73], 2,4 µM de cada uno de los cebadores de HUMFIBRA 1 [TMR-SEQ ID n.º 70] y 2 [SEQ ID n.º 71], 0,2 µM de cada uno de los cebadores de D5S818 1 [SEQ ID n.º 84] y 2 [R6G-SEQ ID n.º 85], 0,1 µM de cada uno de los cebadores de D13S317 1 [SEQ ID n.º 82] y 2 [R6G-SEQ ID n.º 83], 0,2 µM de cada uno de los cebadores de D7S820 1 [R6G-SEQ ID n.º 80] y 2 [SEQ ID n.º 81], 0,15 µM de cada uno de los cebadores de D16S539 1 [SEQ ID n.º 29] y 2 [R6G-SEQ ID n.º 79], 0,2 µM de cada uno de los cebadores de HUMCSF1PO 1 [SEQ ID n.º 77] y 2 [R6G-SEQ ID n.º 78].

Los productos amplificados se separaron con un analizador genético ABI PRISM® 310. Las muestras de ADN se mezclaron con 24 µl de una solución de carga (formamida desionizada) y 1,0 µl de un patrón de tamaños interno para el carril, se desnaturalizó a 95 °C durante 3 minutos y se enfrió en hielo antes de la inyección. La separación se llevó a cabo con el Performance Optimized Polymer 4 (POP-4) (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA) en un capilar de 47 cm x 50 µm. Se utilizó el módulo de funcionamiento GS STR POP4 (1d) (1 ml) A del fabricante GeneScan®. Las condiciones para la electroforesis fueron una inyección de 5 s, los kV de la inyección fueron 15,0, los kV de funcionamiento fueron 15,0, la temperatura de funcionamiento fue de 60 °C, el tiempo de funcionamiento fue de 28 min y se utilizó el filtro virtual A.

La figura 1A es una impresión de los resultados al escanear los fragmentos amplificados de cada locus que se separaron y se detectaron con el analizador genético ABI PRISM® 310, como se describe más arriba. En la figura 1A se muestran los productos de la amplificación de una muestra de ADN coamplificada simultáneamente para los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539 y HUMCSF1PO. Los picos mostrados en el panel A están marcados con fluoresceína, los picos mostrados en el panel B están marcados con carboxitetrametilrodamina y los picos mostrados en el panel C están marcados con 5,6-carboxirrodamina 6G.

La figura 1B es una impresión de los resultados al escanear una muestra preparada del mismo modo que la muestra escaneada en la figura 1A, excepto que no se utilizó ninguna plantilla de ADN en la reacción de amplificación. Los picos en esta figura son productos de ruido de fondo debidos a los procedimientos de purificación y conjugación de colorante, y a causas sin definir.

30

EJEMPLO 2

Detección de la fluorescencia de la amplificación múltiple de los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y S159 tal y como se detectó con el analizador genético ABI PRISM® 310.

En este ejemplo se amplificó simultáneamente en una plantilla de ADN cada uno de los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y S159 en un solo tubo de reacción. La amplificación por PCR se realizó en 25 µl de tampón Gold ST® a 1 x (KCl a 50 mM, Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3 a 25 °C), Triton X-100 al 0,1%, MgCl₂ a 1,5 mM, SAB a 160 µg/ml y 200 µM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP) con 1 ng de plantilla, y 4 U de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold™. Se empleó un GeneAmp® PCR System 9600 (Perkin Elmer, Foster City, CA) con el protocolo de amplificación siguiente; 96 °C durante 12 min, luego 10 ciclos de 94 °C durante 30 s, rampa durante 68 s hasta 58 °C, mantener durante 30 s, rampa durante 50 s hasta 70 °C, mantener durante 45 s, seguido por 20 ciclos a 90 °C durante 30 s, rampa durante 60 s hasta 58 °C, mantener durante 30 s, rampa durante 50 s hasta 70 °C, mantener durante 45 s, seguido por 1 ciclo de 60 °C durante 30 min.

Se utilizaron en combinación 32 cebadores de amplificación, que incluyeron 0,12 µM de cada uno de los cebadores de D3S1358 1 [SEQ ID n.º 68] y 2 [FL-SEQ ID n.º 69], 0,08 µM de cada uno de los cebadores de HUMTH01 1 [FL-SEQ ID n.º 66] y 2 [SEQ ID n.º 67], 0,3 µM de cada uno de los cebadores de D21S11 1 [SEQ ID n.º 64] y 2 [FL-SEQ ID n.º 65], 0,2 µM de cada uno de los cebadores de D18S51 1 [FL-SEQ ID n.º 62] y 2 [SEQ ID n.º 63], 0,24 µM de cada uno de los cebadores de G475 1 [FL-SEQ ID n.º 88] y 2 [SEQ ID n.º 89], 0,6 µM de cada uno de los cebadores de amelogenina 1 [TMR-SEQ ID n.º 86] y 2 [SEQ ID n.º 87], 1,1 µM de cada uno de los cebadores de HUMvWFA31 1 [SEQ ID n.º 76] y 2 [TMR-SEQ ID n.º 40], 1,8 µM de cada uno de los cebadores de D8S1179 1 [SEQ ID n.º 74] y 2 [TMR-SEQ ID n.º 75], 0,6 µM de cada uno de los cebadores de HUMTPOX 1 [SEQ ID n.º 72] y 2 [TMR-SEQ ID n.º 73], 2,4 µM de cada uno de los cebadores de HUMFIBRA 1 [TMR-SEQ ID n.º 70] y 2 [SEQ ID n.º 71], 0,2 µM de cada uno de los cebadores de D5S818 1 [SEQ ID n.º 84] y 2 [R6G-SEQ ID n.º 85], 0,1 µM de cada uno de los cebadores de D13S317 1 [SEQ ID n.º 82] y 2 [R6G-SEQ ID n.º 83], 0,2 µM de cada uno de los cebadores de D7S820 1 [R6G-SEQ ID n.º 80] y 2 [SEQ ID n.º 81], 0,15 µM de cada uno de los cebadores de D16S539 1 [SEQ ID n.º 29] y 2 [R6G-SEQ ID n.º 79], 0,2 µM de cada uno de los cebadores de HUMCSF1PO 1 [SEQ ID n.º 77] y 2 [R6G-SEQ ID n.º 78], 0,1 µM de cada uno de los cebadores de S159 1 [SEQ ID n.º 90] y 2 [R6G-SEQ ID n.º 91].

Los productos amplificados se separaron con un analizador genético ABI PRISM® 310. Las muestras de ADN se

mezclaron con 24 µl de una solución de carga (formamida desionizada) y 1,0 µl de un patrón de tamaños interno para el carril, se desnaturalizó a 95 °C durante 3 minutos y se enfrió en hielo antes de la inyección. La separación se llevó a cabo con el Performance Optimized Polymer 4 (POP-4) (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA) en un capilar de 47 cm x 50 µm. Se utilizó el módulo de funcionamiento GS STR POP4 (Id) (1 ml) A del fabricante GeneScan®. Las condiciones para la electroforesis fueron una inyección de 5 s, los kV de la inyección fueron 15,0, los kV de funcionamiento fueron 15,0, la temperatura de funcionamiento fue de 60 °C, el tiempo de funcionamiento fue de 28 min y se utilizó el filtro virtual A.

La figura 2A es una impresión de los resultados al escanear los fragmentos amplificados de cada locus que se separaron y se detectaron con el analizador genético ABI PRISM® 310, como se describe más arriba. En la figura 2A se muestran los productos de la amplificación de una muestra de ADN coamplificada simultáneamente para los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y S159. Los picos mostrados en el panel A están marcados con fluoresceína, los picos mostrados en el panel B están marcados con carboxitetrametilrodamina y los picos mostrados en el panel C están marcados con 5,6-carboxirrodamina 6G.

La figura 2B es una impresión de los resultados al escanear una muestra preparada del mismo modo que la muestra escaneada en la figura 2A, excepto que no se utilizó ninguna plantilla de ADN en la reacción de amplificación. Los picos en esta figura son productos de ruido de fondo debidos a los procedimientos de purificación y conjugación de colorante, y a causas sin definir.

EJEMPLO 3

Detección de la fluorescencia de la amplificación múltiple de los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y S159 tal y como se detectó con el secuenciador de ADN ABI PRISM® 377.

En este ejemplo, la plantilla de ADN se amplificó como en el ejemplo 2. Los productos amplificados se separaron con un secuenciador de ADN ABI PRISM® 377. Esto se realizó en un gel de 0,2 mm de grosor y urea a 7 M con acrilamida Long Ranger™ (FMC BioProducts, Rockland, ME) al 5%. Las muestras de ADN se mezclaron con 1,5 µl de una solución de carga (formamida al 88,25%, EDTA a 4,1 mM, azul de dextrano a 15 mg/ml) y 0,5 µl de un patrón de tamaños interno para el carril, se desnaturalizó a 95 °C durante 2 minutos y se enfrió en hielo antes de la carga. La electroforesis se llevó a cabo con los módulos para premigración (PR GS 36A-2400) y para migración (GS 36A-2400) del fabricante GeneScan®. El tiempo de funcionamiento fue de 3 horas y se utilizó el filtro virtual A.

La figura 3A es una impresión de los resultados al escanear los fragmentos amplificados de cada locus que se separaron y se detectaron con el secuenciador de ADN ABI PRISM® 377, como se describe más arriba. En la figura 3A se muestran los productos de la amplificación de una muestra de ADN coamplificada simultáneamente para los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y S159. Los picos mostrados en el panel A están marcados con fluoresceína, los picos mostrados en el panel B están marcados con carboxitetrametilrodamina y los picos mostrados en el panel C están marcados con 5,6-carboxirrodamina 6G.

La figura 3B es una impresión de los resultados al escanear una muestra preparada del mismo modo que la muestra escaneada en la figura 3A, excepto que no se utilizó ninguna plantilla de ADN en la reacción de amplificación. Los picos en esta figura son productos de ruido de fondo debidos a los procedimientos de purificación y conjugación de colorante, y a causas sin definir.

EJEMPLO 4

Detección de la fluorescencia de la amplificación múltiple de los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y S159 tal y como se detectó mediante el escáner de fluorescencia FMBIO® II de Hitachi

En este ejemplo se amplificaron simultáneamente dos muestras de ADN en cada una de las tres combinaciones diferentes de locus seleccionadas entre los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y S159. La amplificación de cada combinación de locus incluyó 5 ng de plantilla en un único tubo de reacción que contenía 25 µl de tampón Gold ST*R a 1x (KCl a 50 mM, Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3 a 25 °C), Triton X-100 al 0,1%, MgCl₂ a 1,5 mM, SAB a 160 µg/ml y 200 µM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

Se empleó un GeneAmp® PCR System 9600 (Perkin Elmer, Foster City, CA) con el protocolo de amplificación siguiente: 96 °C durante 12 min, luego 10 ciclos de 94 °C durante 30 s, rampa durante 68 s hasta 58 °C, mantener durante 30 s, rampa durante 50 s hasta 70 °C, mantener durante 45 s, seguido por 22 ciclos de 90 °C durante 30 s, rampa durante 60 s hasta 58 °C, mantener durante 30 s, rampa durante 50 s hasta 70 °C, mantener durante 45 s, seguido por 1 ciclo de 60 °C durante 30 min.

Se utilizaron 32 cebadores de amplificación a las siguientes concentraciones, que incluyeron 0,225 μM de cada uno de los cebadores de D3S1358 1 [SEQ ID n.º 68] y 2 [FL-SEQ ID n.º 69], 0,2 μM de cada uno de los cebadores de HUMTH01 1 [FL-SEQ ID n.º 66] y 2 [SEQ ID n.º 67], 1,0 μM de cada uno de los cebadores de D21S11 1 [SEQ ID n.º 64] y 2 [FL-SEQ ID n.º 65], 1,0 μM de cada uno de los cebadores de D18S51 1 [FL-SEQ ID n.º 62] y 2 [SEQ ID n.º 63], 2,8 μM de cada uno de los cebadores de G475 1 [FL-SEQ ID n.º 88] y 2 [SEQ ID n.º 89], 0,2 μM de cada uno de los cebadores de amelogenina 1 [TMR-SEQ ID n.º 86] y 2 [SEQ ID n.º 87], 0,3 μM de cada uno de los cebadores de HUMvWFA31 1 [SEQ ID n.º 76] y 2 [TMR-SEQ ID n.º 40], 1,5 μM de cada uno de los cebadores de D8S1179 1 [SEQ ID n.º 74] y 2 [TMR-SEQ ID n.º 75], 0,2 μM de cada uno de los cebadores de HUMTPOX 1 [SEQ ID n.º 72] y 2 [TMR-SEQ ID n.º 73], 2,0 μM de cada uno de los cebadores de HUMFIBRA 1 [TMR-SEQ ID n.º 70] y 2 [SEQ ID n.º 71], 0,55 μM de cada uno de los cebadores de D5S818 1 [SEQ ID n.º 84] y 2 [FL-SEQ ID n.º 85], 1,1 μM de cada uno de los cebadores de D13S317 1 [SEQ ID n.º 82] y 2 [FL-SEQ ID n.º 83], 1,7 μM de cada uno de los cebadores de D7S820 1 [FL-SEQ ID n.º 80] y 2 [SEQ ID n.º 81], 3,3 μM de cada uno de los cebadores de D16S539 1 [SEQ ID n.º 29] y 2 [FL-SEQ ID n.º 79], 0,5 μM de cada uno de los cebadores de HUMCSF1PO 1 [SEQ ID n.º 77] y 2 [FL-SEQ ID n.º 78], 2,0 μM de cada uno de los cebadores de S159 1 [SEQ ID n.º 90] y 2 [FL-SEQ ID n.º 91].

En la primera combinación de locus se amplificó cada plantilla con 2,5 U de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold™ y con los cebadores para cada locus a las concentraciones descritas más arriba para los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX y HUMFIBRA. En la segunda combinación de locus, los 32 cebadores anteriores, a las concentraciones descritas, y 4 U de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold™ se utilizaron para amplificar plantillas de ADN en los 16 locus, D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y S159 en un solo tubo de reacción. En la tercera combinación se amplificó cada plantilla utilizando 1,5 U de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold™ y los cebadores de cada locus se utilizaron a las concentraciones descritas más arriba para los locus D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y S159.

Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 4% de 0,4 mm de grosor (proporción de 19:1 de acrilamida por bisacrilamida) que contenía urea a 7 M (Sambrook et al., (1989)) y que se entrecruzó químicamente a 2 placas de vidrio (Kobayashi, Y, (1988), *BRL Focus* 10: 73-74). Las muestras de ADN se mezclaron con 3,5 μl de una solución de carga (NaOH a 10 mM, formamida al 95%, azul de bromofenol al 0,05%) y 0,5 μl de un patrón de tamaños interno para el carril, se desnaturalizaron a 95 °C durante 2 min, y se enfriaron en hielo antes de cargarlas. Los productos separados se visualizaron mediante la detección de las señales fluorescentes con el escáner de fluorescencia Hitachi FMIBO® II (Hitachi Software Engineering America, Ltd. South San Francisco, CA). Se utilizaron filtros de paso de banda de 505 nm y 585 nm, respectivamente, para detectar los locus marcados con fluoresceína y los locus marcados con carboxitetrametilrodamina, respectivamente. Se utilizó un filtro de paso de banda de 650 nm para detectar el patrón interno para el carril (no se muestran los datos de los patrones de tamaño).

Se hace referencia en las figuras 4A y 4B, que muestran los fragmentos resultantes de cada reacción de amplificación. La figura 4A muestra los resultados del escaneo a 505 nm (canal de fluoresceína) y la figura 4B muestra los resultados del escaneo a 585 nm (canal de carboxitetrametilrodamina) de los mismos carriles del gel de poliacrilamida. Para cada plantilla de ADN, el carril 1 muestra los resultados de la muestra de ADN que se ha coamplificado simultáneamente para los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX y HUMFIBRA. El carril 2 muestra los resultados de la muestra de ADN coamplificada simultáneamente para los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, HUMCSF1PO y S159. El carril 3 muestra los resultados de la muestra de ADN coamplificada simultáneamente para los locus D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, HUMCSF1PO y S159.

45

EJEMPLO 5

Detección de la fluorescencia de la amplificación múltiple de los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y S159 tal y como se detectó con el escáner de fluorescencia Hitachi FMIBO® II.

En este ejemplo, dos plantillas de ADN se amplificaron simultáneamente con cada una de las dos combinaciones de locus diferentes seleccionadas entre los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y S159. La amplificación de cada combinación de locus incluyó 5 ng de una plantilla en un solo tubo de reacción que contenía 25 μl de tampón Gold ST*^R a 1X (KCl a 50 mM, Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3 a 25 °C), Triton X-100 al 0,1%, MgCl₂ a 1,5 mM, SAB a 160 $\mu\text{g/ml}$ y 200 μM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

Se empleó un GeneAmp® PCR System 9600 (Perkin Elmer, Foster City, CA) con el siguiente protocolo de amplificación: 96 °C durante 12 min, luego 10 ciclos de 94 °C durante 30 s, rampa durante 68 s hasta 58 °C, mantener durante 30 s, rampa durante 50 s hasta 70 °C, mantener durante 45 s, seguido por 22 ciclos de 90 °C durante 30 s, rampa durante 60 s hasta 58 °C, mantener durante 30 s, rampa durante 50 s hasta 70 °C, mantener

durante 45 s, seguido por 1 ciclo de 60 °C durante 30 min.

Se utilizaron 32 cebadores de amplificación en las concentraciones siguientes, que incluían 0,225 µM de cada uno de los cebadores de D3S1358 1 [SEQ ID n.º 68] y 2 [FL-SEQ ID n.º 69], 0,2 µM de cada uno de los cebadores de HUMTH01 1 [FL-SEQ ID n.º 66] y 2 [SEQ ID n.º 67], 1,0 µM de cada uno de los cebadores de D21S11 1 [SEQ ID n.º 64] y 2 [FL-SEQ ID n.º 65], 1,0 µM de cada uno de los cebadores de D18S51 1 [FL-SEQ ID n.º 62] y 2 [SEQ ID n.º 63], 2,8 µM de cada uno de los cebadores de G475 1 [SEQ ID n.º 88] y 2 [FL-SEQ ID n.º 94], 0,2 µM de cada uno de los cebadores de amelogenina 1 [TMR-SEQ ID n.º 86] y 2 [SEQ ID n.º 87], 0,3 µM de cada uno de los cebadores de HUMvWFA31 1 [SEQ ID n.º 76] y 2 [TMR-SEQ ID N.º 40], 1,5 µM de cada uno de los cebadores de D8S1179 1 [SEQ ID n.º 74] y 2 [TMR-SEQ ID n.º 75], 0,2 µM de cada uno de los cebadores de HUMTPOX 1 [SEQ ID n.º 72] y 2 [TMR-SEQ ID n.º 73], 2,0 µM de cada uno de los cebadores de HUMFIBRA 1 [TMR-SEQ ID n.º 70] y 2 [SEQ ID n.º 71], 0,55 µM de cada uno de los cebadores de D5S818 1 [SEQ ID n.º 84] y 2 [FL-SEQ ID n.º 85], 1,1 µM de cada uno de los cebadores de D13S317 1 [SEQ ID n.º 82] y 2 [FL-SEQ ID n.º 83], 1,7 µM de cada uno de los cebadores de D7S820 1 [FL-SEQ ID n.º 80] y 2 [SEQ ID n.º 81], 3,3 µM de cada uno de los cebadores de D16S539 1 [SEQ ID n.º 29] y 2 [FL-SEQ ID n.º 79], 0,5 µM de cada uno de los cebadores de HUMCSF1PO 1 [SEQ ID n.º 77] y 2 [FL-SEQ ID n.º 78], 2,0 µM de cada uno de los cebadores de S159 1 [SEQ ID n.º 95] y 2 [FL-SEQ ID n.º 96].

En la primera combinación de locus se amplificó cada plantilla con 2,5 U de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold™ y con los cebadores para cada locus a las concentraciones descritas más arriba para los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX y HUMFIBRA. En la segunda combinación de locus, los 32 cebadores anteriores, a las concentraciones descritas, y 4 U de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold™, se utilizaron para amplificar en las plantillas de ADN los 16 locus, D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y S159 en un solo tubo de reacción.

La separación y la visualización de los productos amplificados fueron como se describe en el ejemplo 4.

Se hace referencia en las figuras 5A y 5B, que muestran los fragmentos resultantes de cada reacción de amplificación. La figura 5A muestra los resultados del escaneo a 505 nm (canal de fluoresceína) y la figura 5B muestra los resultados del escaneo a 585 nm (canal de carboxitetrametildodamina) de los mismos carriles del gel de poliacrilamida. Para cada plantilla de ADN, el carril 1 muestra los resultados de la muestra de ADN que se ha coamplificado simultáneamente para los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX y HUMFIBRA, y el carril 2 muestra los resultados de la muestra de ADN coamplificada simultáneamente para los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, HUMCSF1PO y S159.

EJEMPLO 6

Detección de la fluorescencia de la amplificación múltiple de los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, S159, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y C221 tal y como se detectó con el escáner de fluorescencia Hitachi FMBIO® II.

En este ejemplo, dos plantillas de ADN se amplificaron simultáneamente en cada una de las tres combinaciones de locus diferentes seleccionadas entre los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, S159, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y C221. La amplificación de cada combinación de locus incluyó 10 ng de plantilla en un solo tubo de reacción que contenía 25 µl de tampón Gold ST® a 1X (KCl a 50 mM, Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3 a 25 °C), Triton X-100 al 0,1%, MgCl₂ a 1,5 mM, SAB a 160 µg/ml y 200 µM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP).

Se empleó un GeneAmp® PCR System 9600 (Perkin Elmer, Foster City, CA) con el siguiente protocolo de amplificación: 96 °C durante 12 min, luego 10 ciclos de 94 °C durante 30 s, rampa durante 68 s hasta 60 °C, mantener durante 30 s, rampa durante 50 s hasta 70 °C, mantener durante 45 s, seguido por 20 ciclos de 90 °C durante 30 s, rampa durante 60 s hasta 60 °C, mantener durante 30 s, rampa durante 50 s hasta 70 °C, mantener durante 45 s, seguido por 1 ciclo de 60 °C durante 30 min.

Se utilizaron 32 cebadores de amplificación en las concentraciones siguientes, que incluían 0,75 µM de cada uno de los cebadores de D3S1358 1 [SEQ ID n.º 106] y 2 [FL-SEQ ID n.º 69], 0,3 µM de cada uno de los cebadores de HUMTH01 1 [FL-SEQ ID n.º 38] y 2 [SEQ ID n.º 103], 2,0 µM de cada uno de los cebadores de D21S11 1 [SEQ ID n.º 64] y 2 [FL-SEQ ID n.º 65], 0,3 µM de cada uno de los cebadores de D18S51 1 [FL-SEQ ID n.º 101] y 2 [SEQ ID n.º 102], 2,0 µM de cada uno de los cebadores de S159 1 [SEQ ID n.º 92] y 2 [FL-SEQ ID n.º 93], 0,15 µM de cada uno de los cebadores de amelogenina 1 [TMR-SEQ ID n.º 105] y 2 [SEQ ID n.º 87], 1,0 µM de cada uno de los cebadores de HUMvWFA31 1 [SEQ ID n.º 76] y 2 [TMR-SEQ ID n.º 40], 1,25 µM de cada uno de los cebadores de D8S1179 1 [TMR-SEQ ID n.º 104] y 2 [SEQ ID n.º 75], 0,75 µM de cada uno de los cebadores de HUMTPOX 1 [TMR-SEQ ID n.º 72] y 2 [SEQ ID n.º 73], 1,5 µM de cada uno de los cebadores de HUMFIBRA 1 [TMR-SEQ ID n.º 70] y 2 [SEQ ID n.º 107], 0,55 µM de cada uno de los cebadores de D5S818 1 [SEQ ID n.º 84] y 2 [FL-SEQ ID n.º 85], 1,1 µM de cada uno de los cebadores de D13S317 1 [SEQ ID n.º 3] y 2 [FL-SEQ ID n.º 4], 1,7 µM de cada uno

de los cebadores de D7S820 1 [FL-SEQ ID n.º 80] y 2 [SEQ ID n.º 81], 3,3 µM de cada uno de los cebadores de D16S539 1 [FL-SEQ ID n.º 29] y 2 [SEQ ID n.º 97], 0,25 µM de cada uno de los cebadores de HUMCSF1PO 1 [SEQ ID n.º 77] y 2 [FL-SEQ ID n.º 98], 1,0 µM de cada uno de los cebadores de C221 1 [FL-SEQ ID n.º 99] y 2 [SEQ ID n.º 100].

- 5 En la primera combinación de locus se amplificó cada plantilla con 2,5 U de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold™ y con los cebadores para cada locus a las concentraciones descritas más arriba para los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, S159, amelogenina, HUMvWFA31, D81179, HUMTPOX y HUMFIBRA. En la segunda combinación de locus, los 32 cebadores anteriores, a las concentraciones descritas, y 4 U de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold™ se utilizaron para amplificar en plantillas de ADN los 16 locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, S159, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y C221 en un solo tubo de reacción. En la tercera combinación se amplificó cada plantilla con 1,5 U de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold™ y los cebadores de cada locus se utilizaron a las concentraciones descritas más arriba para los locus D5S818, D7S820, D13S317, D16S539, HUMCSF1PO y C221.

- 15 Los productos de la amplificación se separaron y se detectaron como se describe en el ejemplo 4, salvo que cada muestra de los productos de amplificación se diluyó 1:4 en tampón STR a 1X (KCl a 50 mM, Tris-HCl a 10 mM (pH 8,3 a 25 °C), Triton X-100 al 0,1%, MgCl₂ a 1,5 mM y 200 µM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Los productos de amplificación diluidos (2,5 µl) se mezclaron con 2,5 µl de una solución de carga (NaOH a 10 mM, formamida al 95%, azul de bromofenol al 0,05%), sin ningún patrón interno para el carril, se desnaturalizó a 95 °C durante 2 min y se enfrió en hielo antes de cargarlos.

- 20 Se hace referencia en las figuras 6A y 6B, que muestran los fragmentos resultantes de cada reacción de amplificación. La figura 6A muestra los resultados del escaneo a 505 nm (canal de fluoresceína) y la figura 6B muestra los resultados del escaneo a 585 nm (canal de carboxitetrametildammina) de los mismos carriles del gel de poliacrilamida. Para cada plantilla de ADN, el carril 1 muestra los resultados de la muestra de ADN que se ha coamplificado simultáneamente para los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, S159, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX y HUMFIBRA. El carril 2 muestra los resultados de la muestra de ADN coamplificada simultáneamente para los locus D3S1358, HUMTH01, D21S11, D18S51, G475, amelogenina, HUMvWFA31, D8S1179, HUMTPOX, HUMFIBRA, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, HUMCSF1PO y C221. El carril 3 muestra los resultados de la muestra de ADN coamplificada simultáneamente para los locus D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, HUMCSF1PO y C221.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Schumm, James W.
 <110> Sprecher, Cynthia J.
 <120> Amplificación múltiple de locus de repeticiones cortas en tándem
 <130> 8976.112
 <150> US 08/316,544
 <151> 1994-09-30
 <150> US 08/632,575
 <151> 1996-04-15
 <160> 110
 <170> WordPerfect 7.0 (convertido a formato de texto DOS)

<210> 1
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D7S820
 <400> 1
 gaacacttgt catagtttag aacg 24

<210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D7S820
 <400> 2
 ctgaggtatc aaaaactcag agg 23

<210> 3
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D13S317
 <400> 3
 acagaagtct gggatgtgga 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D13S317
 <400> 4
 gcccaaaaag acagacagaa 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D5S818
 <400> 5
 gggtgatttt cctctttggt 20

<210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D5S818

<400> 6 tgattccaat catagccaca	20
<210> 7 <211> 26 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D3S1539 <400> 7 tctctttcca ttactctctc catagc	26
<210> 8 <211> 22 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D3S1539 <400> 8 agtgctgttt tagcttccag ga	22
<210> 9 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D17S1298 <400> 9 gtaggtcttt tggttgccag tatg	24
<210> 10 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D17S1298 <400> 10 tgtcagtaaa cctgtgacct gagt	24
<210> 11 <211> 26 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D20S481 <400>11 aatggtgaga aatgggttat gagtgc	26
<210> 12 <211> 25 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D20S481 <400> 12 tttccggctt tgtgtcataa aacag	25
<210> 13 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D9S930	

<400> 13 tggacaacag agtgagatgc	20
<210> 14 <211> 23 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D9S930 <400> 14 gctatgggaa ttacaagcag gaa	23
<210> 15 <211> 26 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D10S1239 <400> 15 ctttgaaatg gacccttagc taatgt	26
<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D10S1239 <400> 16 caccctgtcc ccagctatct g	21
<210> 17 <211> 19 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D14S118 <400> 17 cagcttgggc aacataggg	19
<210> 18 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D14S118 <400> 18 caaactcctg aggtcaaaca atcc	24
<210> 19 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D14S562 <400> 21 cttggagggt ggggtggcta a	21
<210> 2 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D14S562	

<400> 20
 cgaaattttg ttgccttgct ctgg 24

 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D14S548
 <400> 21
 cctgggcaac agagtgagac t 21

 <210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D14S548
 <400> 22
 acccagcttt aacagtttgt gctt 24

 <210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D16S490
 <400> 23
 gggcggacac agaatgtaaa atc 23

 <210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D16S490
 <400> 24
 aaaccctaat agatgacagg caca 24

 <210> 25
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D16S753
 <400> 25
 gcactccagg ctgaatgaca gaac 24

 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D16S753
 <400> 26
 gcagtgccgc ctatTTTTgt gaat 24

 <210> 27
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D17S1299

<400> 27 accctgatga gatagcactt gagc	24
<210> 28 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D17S1299 <400> 28 cactgtgtgg aggtgtagca gaga	24
<210> 29 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D16S539 <400> 29 gggggtctaa gagcttgtaa aaag	24
<210> 30 <211> 26 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D16S539 <400> 30 tgtgcatctg taagcatgta tctatc	26
<210> 31 <211> 23 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D22S683 <400> 31 cgaaggttgc attgagccaa gat	23
<210> 32 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D22S683 <400> 32 ggtggaaat gcctcatgta gaaa	24
<210> 33 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapien <222> HUMCSF1PO <400> 33 aacctgagtc tgccaaggac tagc	24
<210> 34 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapien <222> HUMCSF1PO	

<400> 34
 ttccacacac cactggccat cttc 24

<210> 35
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMTPOX
 <400> 35
 actggcacag aacaggcact tagg 24

<210> 36
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMTPOX
 <400> 36
 ggaggaactg ggaaccacac aggt 24

<210> 37
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMTHO1
 <400> 37
 attcaaaggg tatctgggct ctgg 24

<210> 38
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMTHO1
 <400> 38
 gtgggctgaa aagctcccga ttat 24

<210> 39
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMvWFA31
 <400> 39
 gaaagcccta gtggatgata agaataatc 29

<210> 40
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMvWFA31
 <400> 40
 ggacagatga taaatacata ggatggatgg 30

<210> 41
 <211> 24
 <212> DN24A
 <213> Homo sapien
 <222> HUMF13A01

<400> 41
 gaggttgac tccagccttt gcaa 24

 <210> 42
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMF13A01
 <400> 42
 ttcctgaatc atcccagagc caca 24

 <210> 43
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMFESFPS
 <400> 43
 gctgttaatt catgtaggga agg 23

 <210> 44
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMFESFPS
 <400> 44
 gtagtcccag ctacttggct actc 24

 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMBFXIII
 <400> 45
 tgaggtggtg tactaccata 20

 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMBFXIII
 <400> 46
 gatcatgccca ttgcactcta 20

 <210> 47
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMLIPOL
 <400> 47
 ctgaccaagg atagtgggat atag 24

 <210> 48
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMLIPOL

<400> 48 ggtaactgag cgagactgtg tct	23
<210> 49 <211> 18 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D3S1539 <400> 49 ccaccctttc agcaccag	18
<210> 50 <211> 20 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D19S253 <400> 50 atagacagac agacggactg	20
<210> 51 <211> 19 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D19S253 <400> 51 gggagtggag attaccct	19
<210> 52 <211> 21 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D20S481 <400> 52 aaagctctct gaagcaggtg t	21
<210> 53 <211> 24 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D20S481 <400> 53 cagattgcac tagaaagaga ggaa	24
<210> 54 <211> 23 <212> ADN <213> Homo sapien <222> D10S1239 <400> 54 caccctgtcc ccagctatct gga	23
<210> 55 <211> 27 <212> ADN <213> Homo sapien	

<222> D9S930
 <400> 55
 agttgaatct tgagtctctc agagtca 27

<210> 56
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D4S2368
 <400> 56
 tgtactcatt ttccccgcaat gatg 24

<210> 57
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D4S2368
 <400> 57
 tcagaaagta ggggtctgggc tctt 24

<210> 58
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D16S539
 <400> 58
 tgtgcatctg taagcatgta tctatcat 28

<210> 59
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMvWFA31
 <400> 59
 gaaagcccta gtggatgata agaataatca gt 32

<210> 60
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMvWFA31
 <400> 60
 ggacagatga taaatacata ggatggatgg ata 33

<210> 61
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D9S930
 <400> 61
 gctatgggaa ttacaagcag gaaac 25

<210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

<222> D18S51
 <400> 62
 ttcttgagcc cagaaggtta 20

<210> 63
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D18S51
 <400> 63
 ctaccagcaa caacacaaat aaac 24

<210> 64
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D21S11
 <400> 64
 atatgtgagt caattcccca ag 22

<210> 65
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D21S11
 <400> 65
 tgtattagtc aatggtctcc agagac 26

<210> 66
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMTH01
 <400> 66
 gtgattccca ttggcctggt c 21

<210> 67
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMTH01
 <400> 67
 attcctgtgg gctgaaaagc tc 22

<210> 68
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D3S1358
 <400> 68
 gcagtccaat ctgggtgac 19

<210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

<222> D3S1358
 <400> 69
 atgaaatcaa cagaggcttg 20

<210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMFIBRA
 <400> 70
 ggctgcaggg cataacatta 20

<210> 71
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMFIBRA
 <400> 71
 tctatgactt tgcgcttcag ga 22

<210> 72
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMTPOX
 <400> 72
 gcacagaaca ggcacttagg 20

<210> 73
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMTPOX
 <400> 73
 cgctcaaacg tgagggtg 18

<210> 74
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D8S1179
 <400> 74
 attgcaactt atatgtattt ttgtatttca tg 32

<210> 75
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D8S1179
 <400> 75
 accaaattgt gttcatgagt atagtttc 28

<210> 76
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

<222> HUMvWFA31
 <400> 76
 gccctagtggtg atgataagaa taatcagtat gtg 33

<210> 77
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMCSF1PO
 <400> 77
 ccggaggtaa aggtgtctta aagt 24

<210> 78
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMCSF1PO
 <400> 78
 atttcctgtg tcagaccctg tt 22

<210> 79
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D16S539
 <400> 79
 gtttgtgtgt gcatctgtaa gcatgtatc 29

<210> 80
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D7S820
 <400> 80
 atgttggtca ggctgactat g 21

<210> 81
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D7S820
 <400> 81
 gattccacat ttatcctcat tgac 24

<210> 82
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D13S317
 <400> 82
 attacagaag tctgggatgt ggagga 26

<210> 83
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

<222> D13S317
 <400> 83
 ggcagcccaa aaagacaga 19

<210> 84
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D5S818
 <400> 84
 ggtgattttc ctctttggta tcc 23

<210> 85
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D5S818
 <400> 85
 agccacagtt tacaacattt gtatct 26

<210> 86
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> Amelogenina
 <400> 86
 ccctgggctc tgtaaagaa 19

<210> 87
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> Amelogenina
 <400> 87
 atcagagctt aaactgggaa gctg 24

<210> 88
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> G475
 <400> 88
 taccaacatg aaagggtacc aata 24

<210> 89
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> G475
 <400> 89
 tgggttatta attgagaaaa ctcctta 27

<210> 90
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

<222> S159
 <400> 90
 gccatgatca caccactaca 20

<210> 91
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> S159
 <400> 91
 ccgattttta attgggttgt cttatt 26

<210> 92
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> S159
 <400> 92
 gccatgatca caccactaca ctc 23

<210> 93
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> S159
 <400> 93
 ccgattttta attgggttgt ctta 24

<210> 94
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> G475
 <400> 94
 tgggttatta attgagaaaa ctccttaca ttt 33

<210> 95
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> S159
 <400> 95
 gcacagtggc taattgtacc tt 22

<210> 96
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> S159
 <400> 96
 tttttaatag gtcatgattt tgtgat 26

<210> 97
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

<222> D16S539
 <400> 97
 gtttgtgtgt gcatctgtaa gcat 24

<210> 98
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMCSF1PO
 <400> 98
 cctgtgtcag accctgttct aagt 24

<210> 99
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> C221
 <400> 99
 aacagggata tgcactggta ataga 25

<210> 100
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> C221
 <400> 100
 tgcataaaac cctgggttggc c 21

<210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D18S51
 <400> 101
 caaacccgac taccagcaac 20

<210> 102
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D18S51
 <400> 102
 gagccatggt catgccactg 20

<210> 103
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMTHO1
 <400> 103
 gtgattccca ttggcctggt cctc 24

<210> 104
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Homo sapien

<222> D8S1179
 <400> 104
 tggcaactta tatgtatTTTT gtatttc 28

<210> 105
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> Amelogenin
 <400> 105
 ccctgggctc tgtaaagaat agtg 24

<210> 106
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> D3S1358
 <400> 106
 actgcagtcc aatctgggt 19

<210> 107
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <222> HUMFIBRA
 <400> 107
 ctatgacttt gcgcttcagg a 21

<210> 108
 <211> 1000
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <220> De una biblioteca de plásmido pGem3Zf (+)
 <222> Clone S159
 <400> 108
 aaaccccgctc tctactaaaa atacaaaagt tagttgagca tgggtggcacg 50
 ggccctgtaat cccacctata atcccaccta ctccgggagge tgaggcagga 100
 gaatcgcttg aaccaggat ggggcgattg cagtgagccg agatcgtgcc 150
 actgcactcc agcctgggtg acagagcgag actccatctc aaaaaaaaaa 200
 aaaaaaaaaa gaatcatagg ccaggcacag tggctaattg taccttggga 250
 ggctgagacg ggaggatcga gaccatcctg ggcacatag tgagacccca 300
 tctctacaaa aaaaaaaaaa aatTTTTTTT aaatagccag gcatgggtgag 350
 gctgaagtag gatcacttga gcctggaagg tcgaagctga agtgagccat 400
 gatcacacca ctacactcca gcctaggtga cagagcaaga caccatctca 450
 agaaagaaaa aaaagaaaga aaagaaaaga aaagaaaaga aaagaaaaga 500
 aaagaaaaga aaaaacgaag gggaaaaaaaaa gagaatcata aacataaatg 550
 taaaatttct caaaaaaatc gttatgacca taggttaggc aaatatttct 600
 tagatatcac aaaatcatga cctattaaaa aataataata aagtaagttt 650
 catcaaaact taaaagttct actcttcaaa agatacctta taaagaaagt 700
 aaaaagacac gccacaggct aagagaaagt acttctaate acatatctaa 750
 aaaaggactt gtgtccagat taaagaattc ttacacatca ataagacaac 800
 ccaattaaana atcggcaaaa gatttgaaga gatatttaac caaagaaaac 850
 atataaatgt gtccgggagc gatggtaate ccagcacttt gagaggccga 900
 ggcaggcgga tcacttgagg tcaggagttt aggaccagtc tggccaacat 950
 ggtgaaaccc tgtctctaate aaaaatacaa aaattagctg ggtgtggtg 1000

<210> 109
 <211> 411
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <220> De una biblioteca de plásmido pGem3Zf (+)
 <222> Clone C221
 <400> 109
 gatcacttgc catccctgcc acacagtttc ctccctctgga aactgggggt 50
 gatgaccctt gccctaccca cttgtcatgg cattggggac atgaacacac 100
 tttgcacctg tcaggcaagg cttaaacagg gatatgcact ggtaatagaa 150
 aagagggact aagttttggt ttgttttgtt ttgttttgtt ttgttttgtt 200
 ttgttttgtt ttgttttgtt ttgttttctt gaagaagtcc ctagaagcgc 250
 tcagtgttgg aatgctctct tgtagcagtg gcggtctgctg ctggttccgg 300
 gtcagatgcc ggaattgggg gtgcgcttgg gtgcagctgc atttcatctg 350
 gtccctgggcc tcggctctgg cttggagagg tgcagctcac agccacttca 400
 tggctgggat c 411

<210> 110
 <211> 335
 <212> ADN
 <213> Homo sapien
 <220> De una biblioteca de plásmido pGem3Zf (+)
 <222> Clone G475
 <400> 110
 gatcacgcca ttgcactcca gcctggggcga ctgagcaaga ctcagtctca 50
 aagaaaagaa aagaaaagaa aagaaaagaa aagaaaagaa aagaaaagaa 100
 aagaaaagaa aattgtaagg agttttctca attaataacc caaataagag 150
 aattctttcc atgtatcaat catgatacta agcactttac acacatgtat 200
 gttatgtaat cattatatca tgcattgcaag gtaattgagta ttattttcct 250
 cattttataa aagaggaaac tgatgtttga ggctactttg ctttaagaccg 300
 cagaactagc aaaggaaaag agaagtgaat gtatc 335

REIVINDICACIONES

1. Método para identificar simultáneamente los alelos presentes en un conjunto de locus de una o más muestras de ADN, que comprende:

(a) proporcionar una muestra de ADN a analizar,

5 (b) seleccionar un conjunto de locus de la muestra de ADN, que comprende los locus de repeticiones cortas en tándem D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, HUMCSF1PO, HUMFIBRA, HUMTH01, HUMTPOX y HUMvWFA31;

(c) coamplificar los locus en el conjunto en una reacción de amplificación múltiplex, en la que el producto de la reacción es una mezcla de alelos amplificados de cada uno de los locus coamplificados en el conjunto; y

10 (d) evaluar los alelos amplificados en la mezcla para determinar los alelos presentes en cada uno de los locus analizados en el conjunto dentro de la muestra de ADN;

en el que la reacción de amplificación múltiplex es una reacción en cadena de la polimerasa.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la reacción de amplificación múltiplex se realiza utilizando al menos un cebador para al menos un locus del conjunto de al menos trece locus seleccionados en la etapa (b), en el
15 que el cebador tiene una secuencia seleccionada entre uno de los grupos de las secuencias de cebadores que consiste en:

SEQ ID n.º 62, SEQ ID n.º 63, SEQ ID n.º 101 y SEQ ID n.º 102, cuando uno de los locus del conjunto es D18S51;

SEQ ID n.º 64 y SEQ ID n.º 65 para el locus D21S11;

SEQ ID n.º 37, SEQ ID n.º 38, SEQ ID n.º 66, SEQ ID n.º 67 y SEQ ID n.º 103, para el locus HUMTH01;

20 SEQ ID n.º 68, SEQ ID n.º 69 y SEQ ID n.º 106, para el locus D3S1358;

SEQ ID n.º 70, SEQ ID n.º 71 y SEQ ID n.º 107, para el locus HUMFIBRA;

SEQ ID n.º 35, SEQ ID n.º 36, SEQ ID n.º 72 y SEQ ID n.º 73, para el locus HUMTPOX;

SEQ ID n.º 74, SEQ ID n.º 75 y SEQ ID n.º 104, para el locus D8S1179;

SEQ ID n.º 39, SEQ ID n.º 40, SEQ ID n.º 59, SEQ ID n.º 60 y SEQ ID n.º 76, para el locus HUMvWFA31;

25 SEQ ID n.º 33, SEQ ID n.º 34, SEQ ID n.º 77, SEQ ID n.º 78 y SEQ ID n.º 98, para el locus HUMCSF1PO;

SEQ ID n.º 29, SEQ ID n.º 30, SEQ ID n.º 58, SEQ ID n.º 79 y SEQ ID n.º 97, para el locus D16S539;

SEQ ID n.º 1, SEQ ID n.º 2, SEQ ID n.º 80 y SEQ ID n.º 81, para el locus D7S820;

SEQ ID n.º 3, SEQ ID n.º 4, SEQ ID n.º 82 y SEQ ID n.º 83, para el locus D13S317; y

SEQ ID n.º 5, SEQ ID n.º 6, SEQ ID n.º 84 y SEQ ID n.º 85, para el locus D5S818.

30 3. Método según la reivindicación 1, en el que el conjunto de locus seleccionados en la etapa (a) del método comprende adicionalmente al menos un locus adicional seleccionado entre el grupo de locus que consiste en: G475, S159, C221 y Amelogenina.

4. Método según la reivindicación 3, en el que la reacción de amplificación múltiplex se realiza utilizando al menos un cebador oligonucleotídico que tiene una secuencia seleccionada entre al menos uno de los grupos de
35 secuencias que consisten en:

SEQ ID n.º 88, SEQ ID n.º 89 y SEQ ID n.º 94, cuando uno de los locus del conjunto es G475;

SEQ ID n.º 90, SEQ ID n.º 91, SEQ ID n.º 92, SEQ ID n.º 93, SEQ ID n.º 95 y SEQ ID n.º 96, cuando uno de los locus del conjunto es S159;

SEQ ID n.º 99 y SEQ ID n.º 100, cuando uno de los locus del conjunto es C221; y

40 SEQ ID n.º 86, SEQ ID n.º 87 y SEQ ID n.º 105, cuando uno de los locus del conjunto es el locus de la Amelogenina.

5. Método según la reivindicación 1, en el que los alelos amplificados se evalúan comparando los alelos amplificados con un patrón de tamaños, en el que el patrón de tamaños se selecciona entre el grupo de patrones de

tamaños que consiste en un marcador de ADN y una escalera alélica específica de locus.

6. Método según reivindicación 1, en el que la muestra de ADN a analizar se ha preparado a partir de tejido humano, en el que el tejido humano se selecciona entre el grupo de tejido humano que consiste en sangre, semen, células vaginales, cabello, saliva, orina, hueso, muestra oral, líquido amniótico que contiene células de la placenta o
- 5 células fetales, y mezclas de cualquiera de los tejidos que se acaban de enumerar.

FIG. 1A

Amplificación con plantilla de ADN

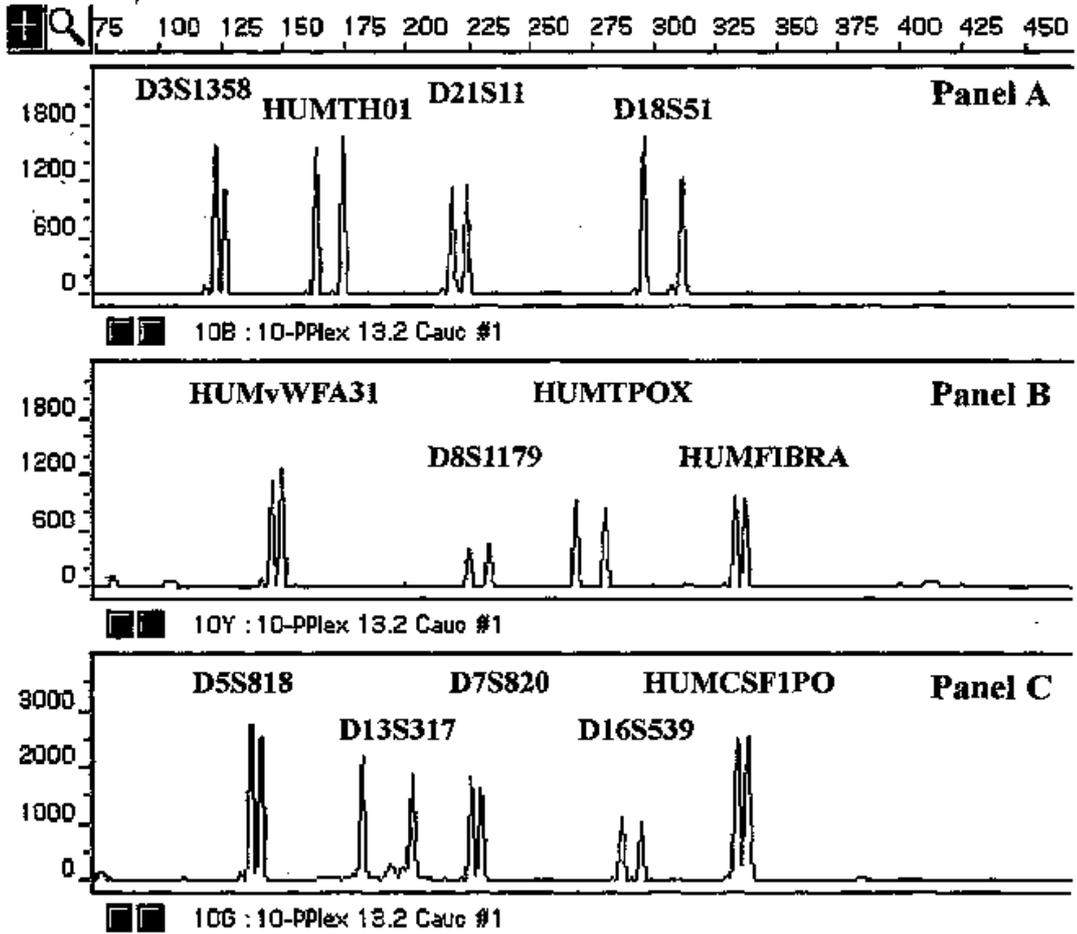


FIG. 1B

Amplificación sin plantilla de ADN

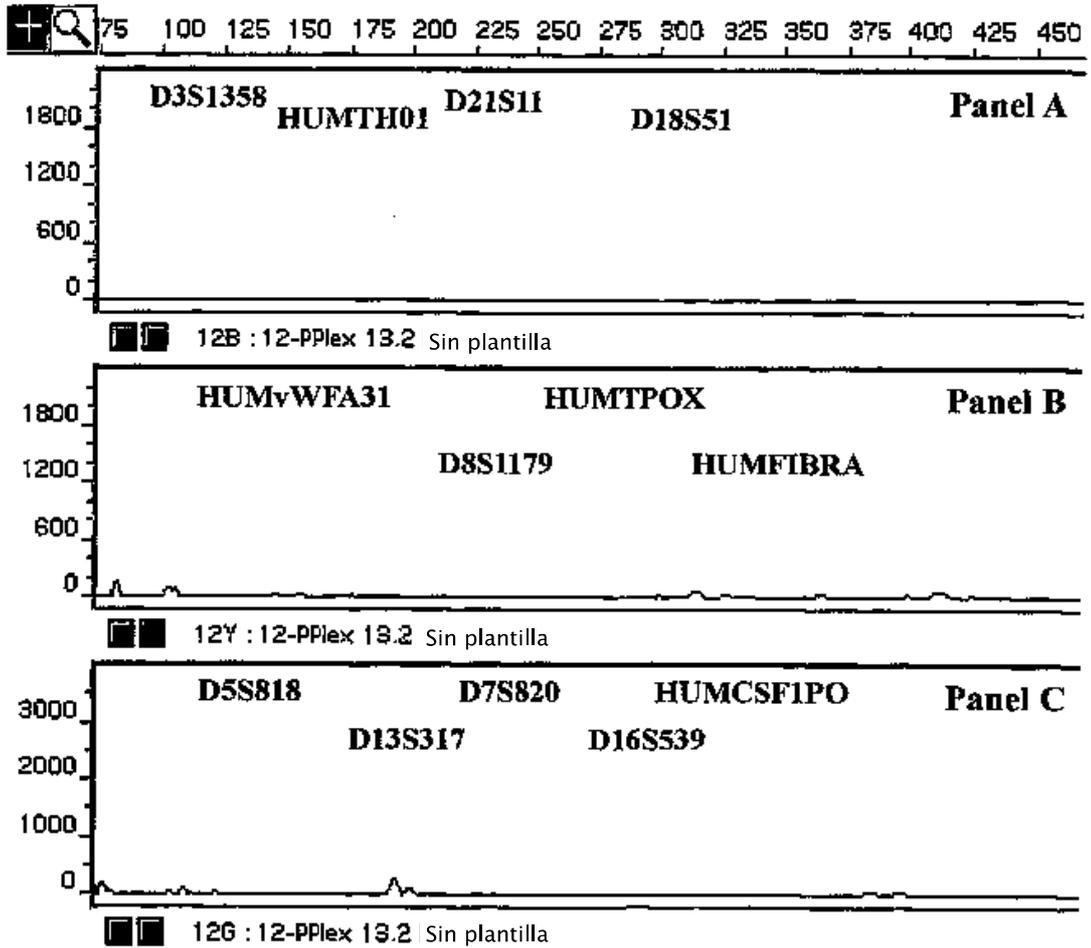


FIG. 2A

Amplificación con plantilla de ADN

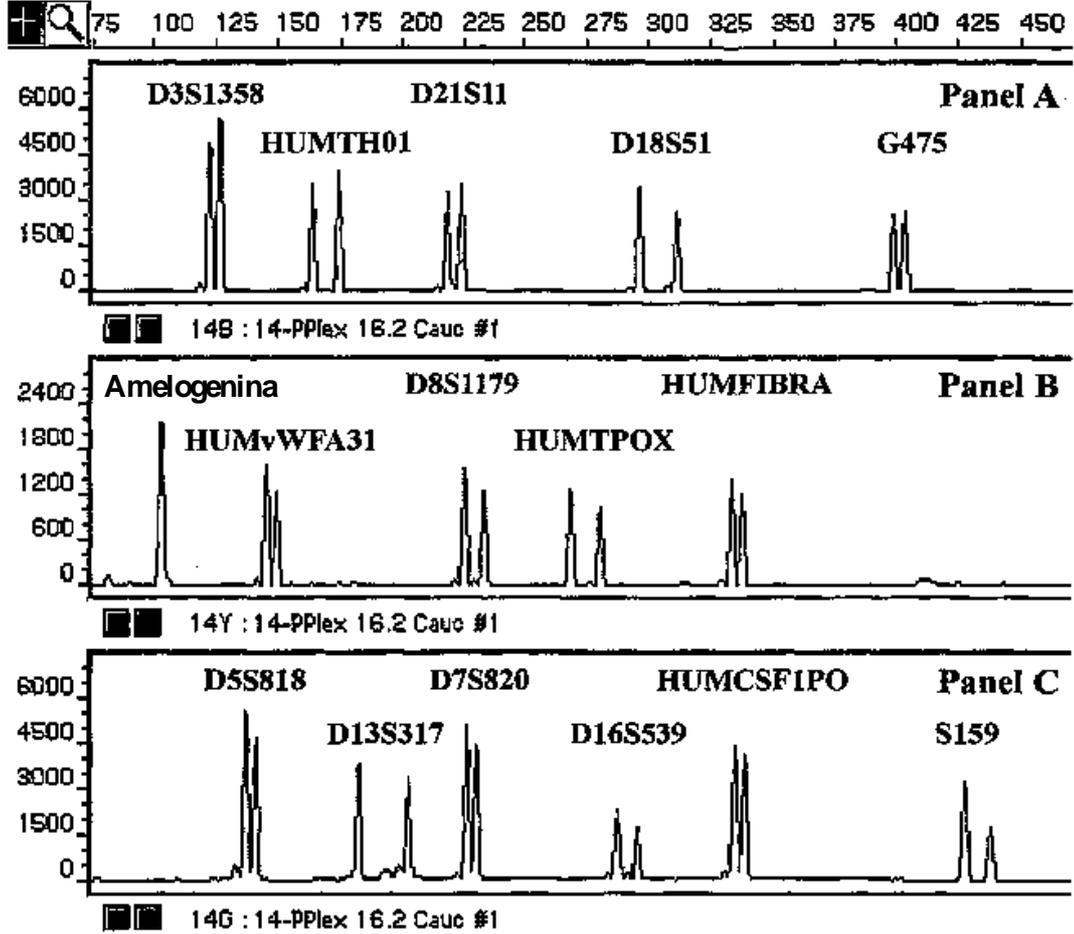


FIG. 2B

Amplificación sin plantilla de ADN

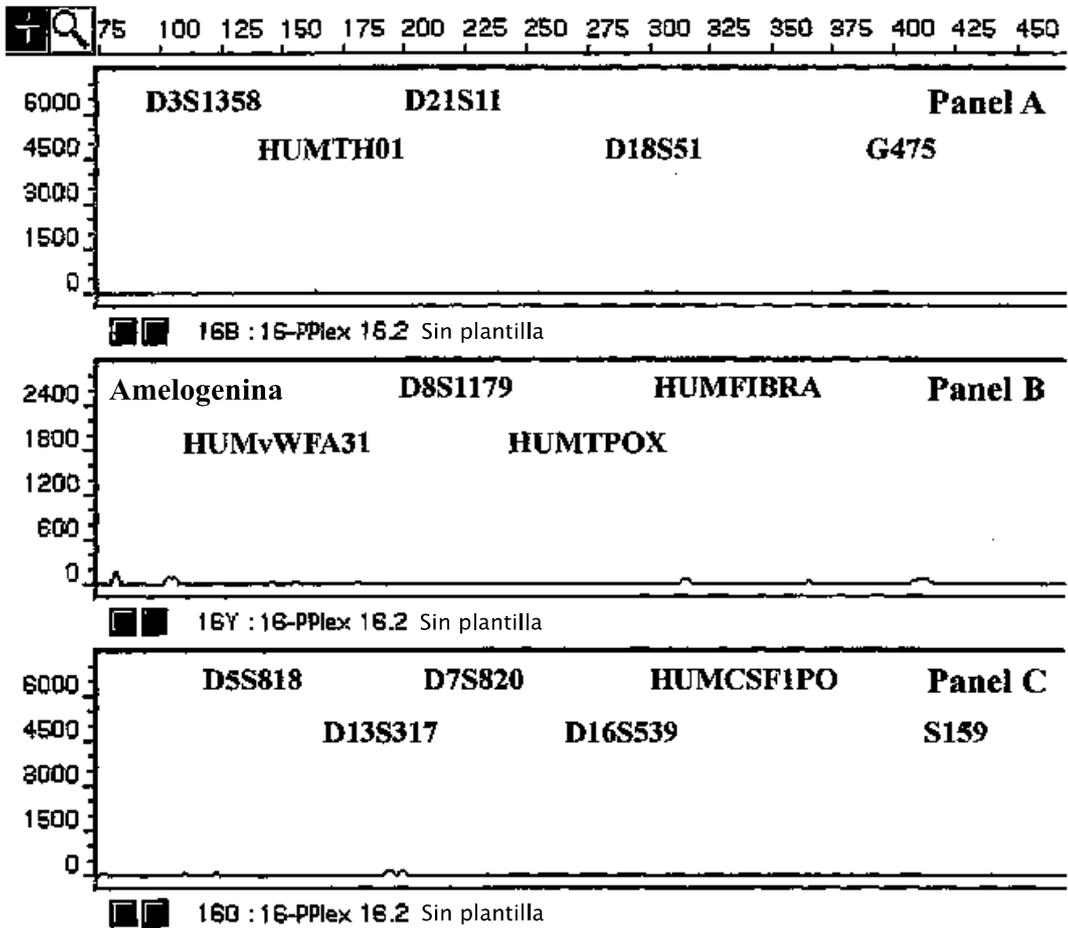


FIG. 3A

Amplificación con plantilla de ADN

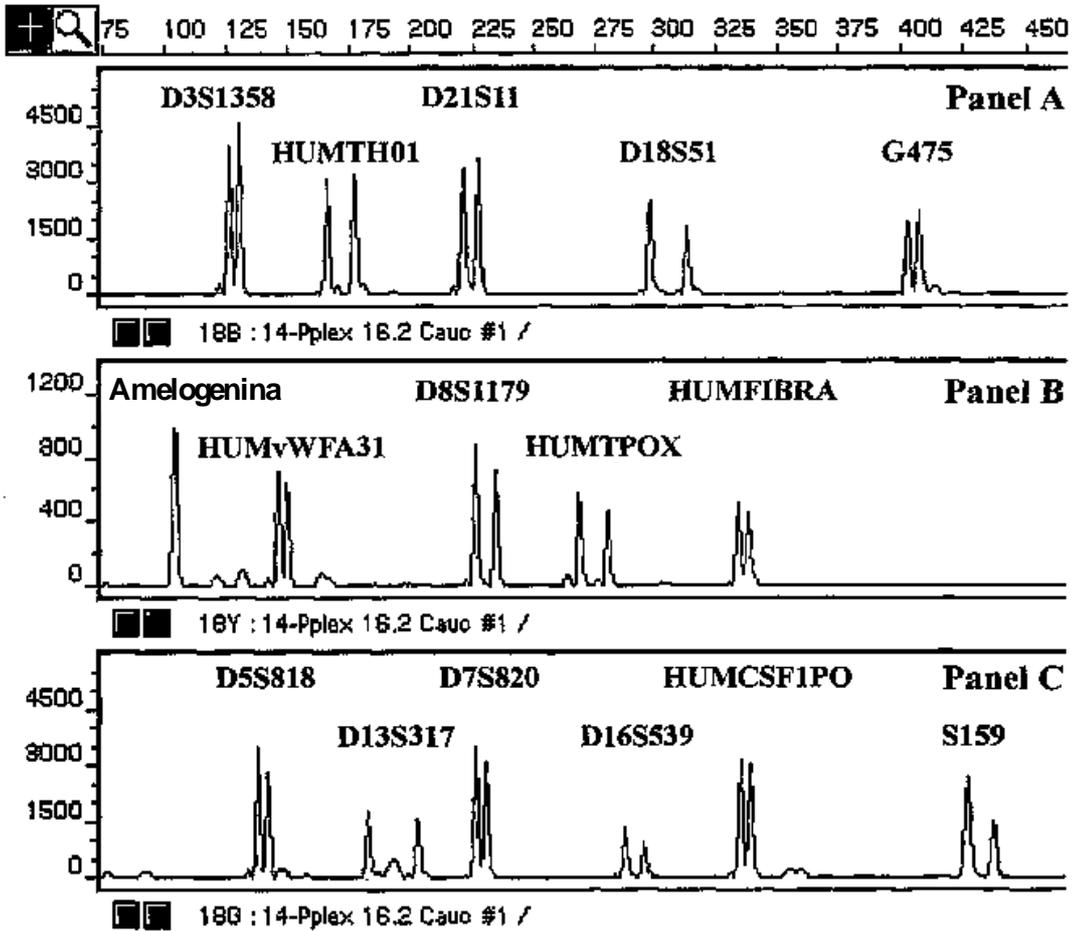


FIG. 3B

Amplificación sin plantilla de ADN

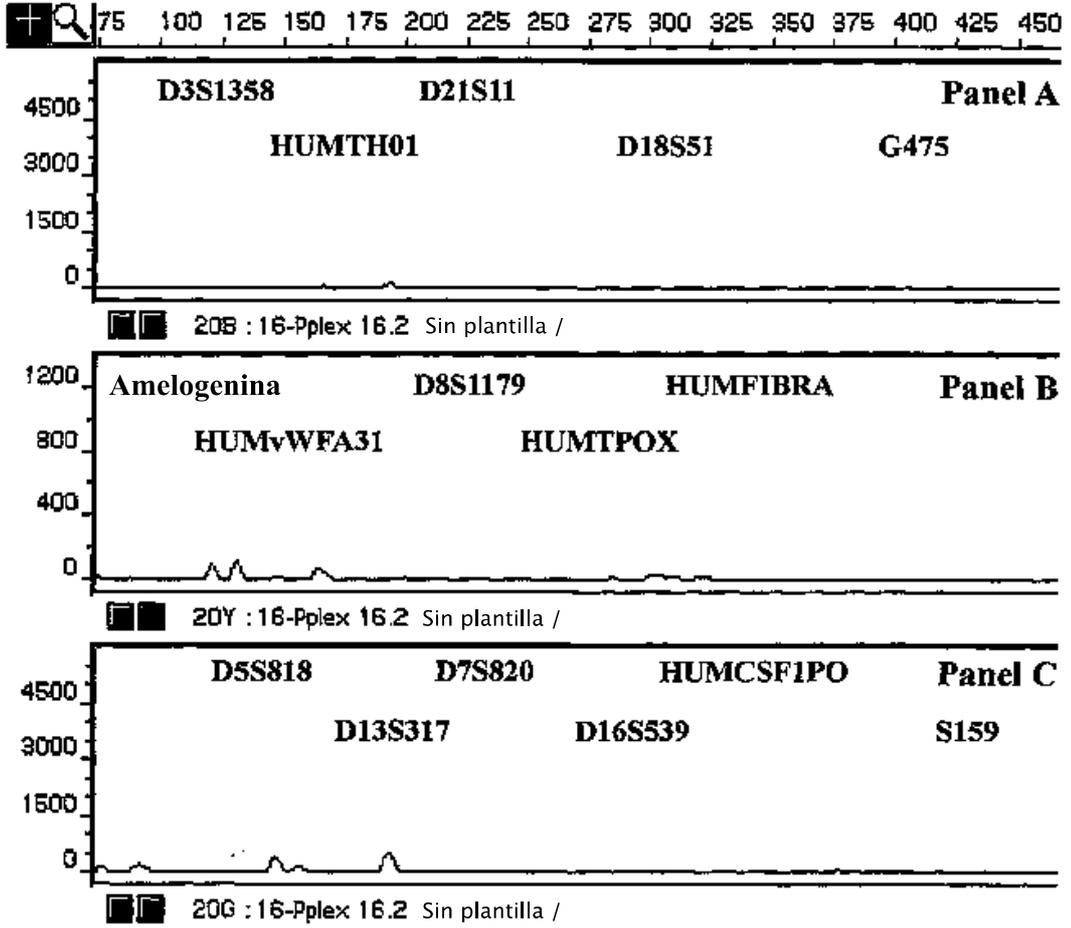


FIG 4A

Escaneo a 505 nm: canal de la fluoresceína

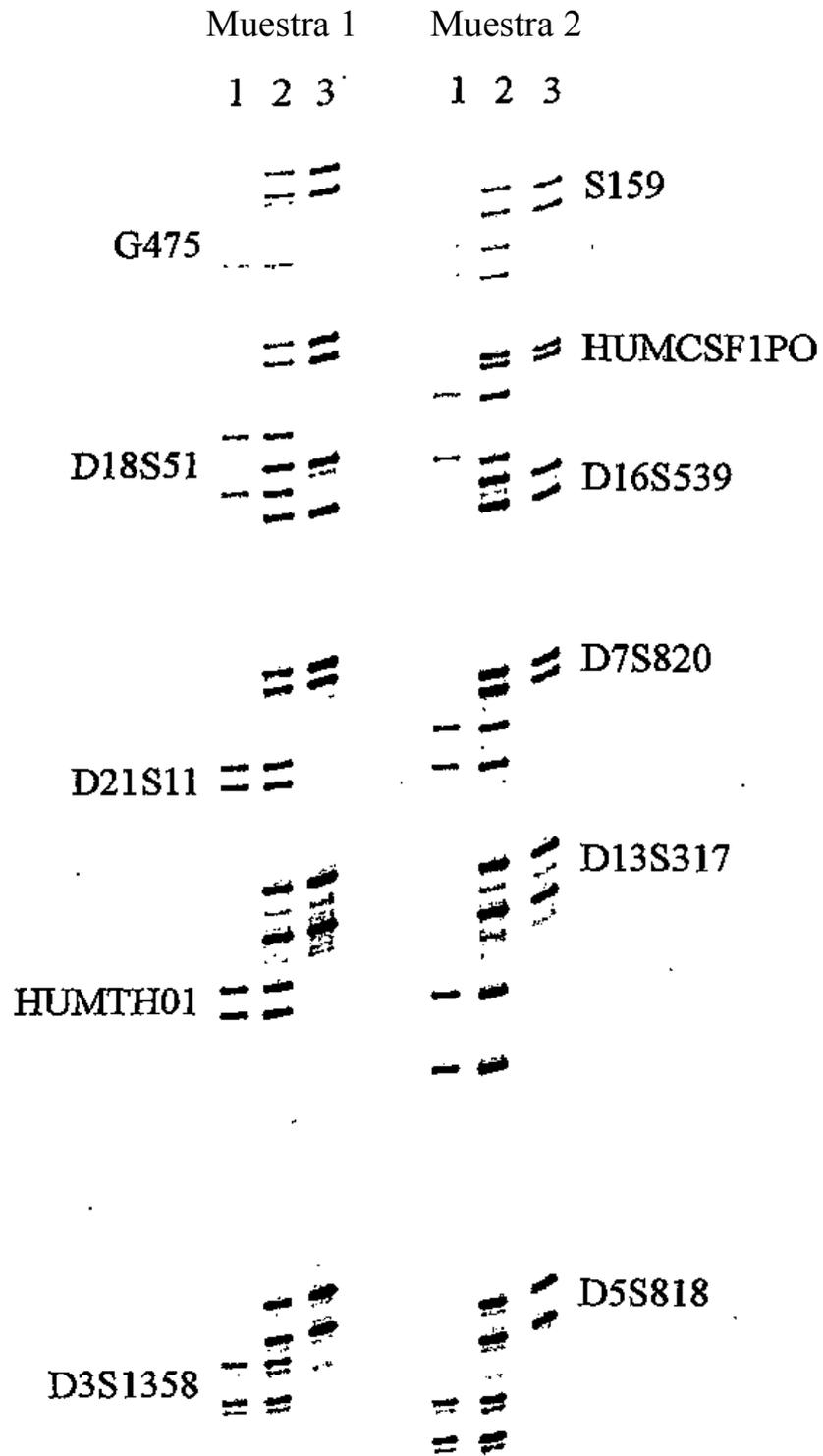


FIG 4B

Escaneo a 585 nm: canal de la tetrametilrodamina

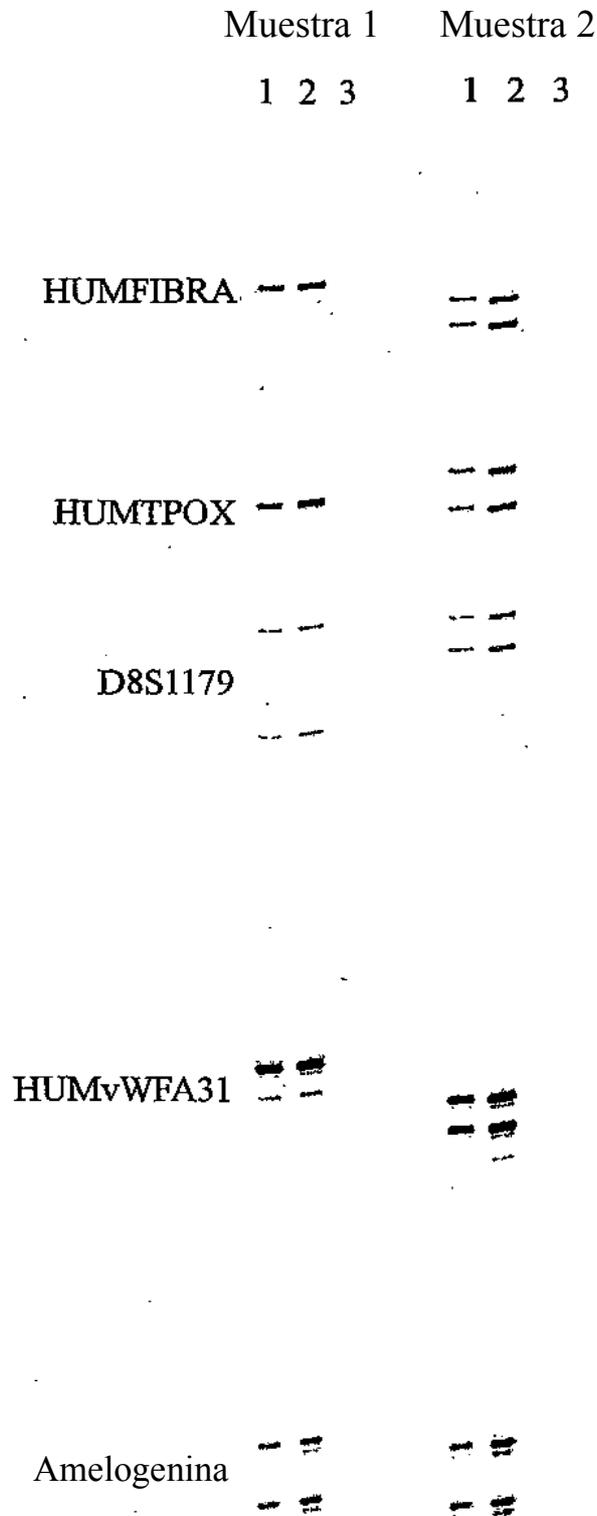


FIG 5A

Escaneo a 505 nm: canal de la fluoresceína

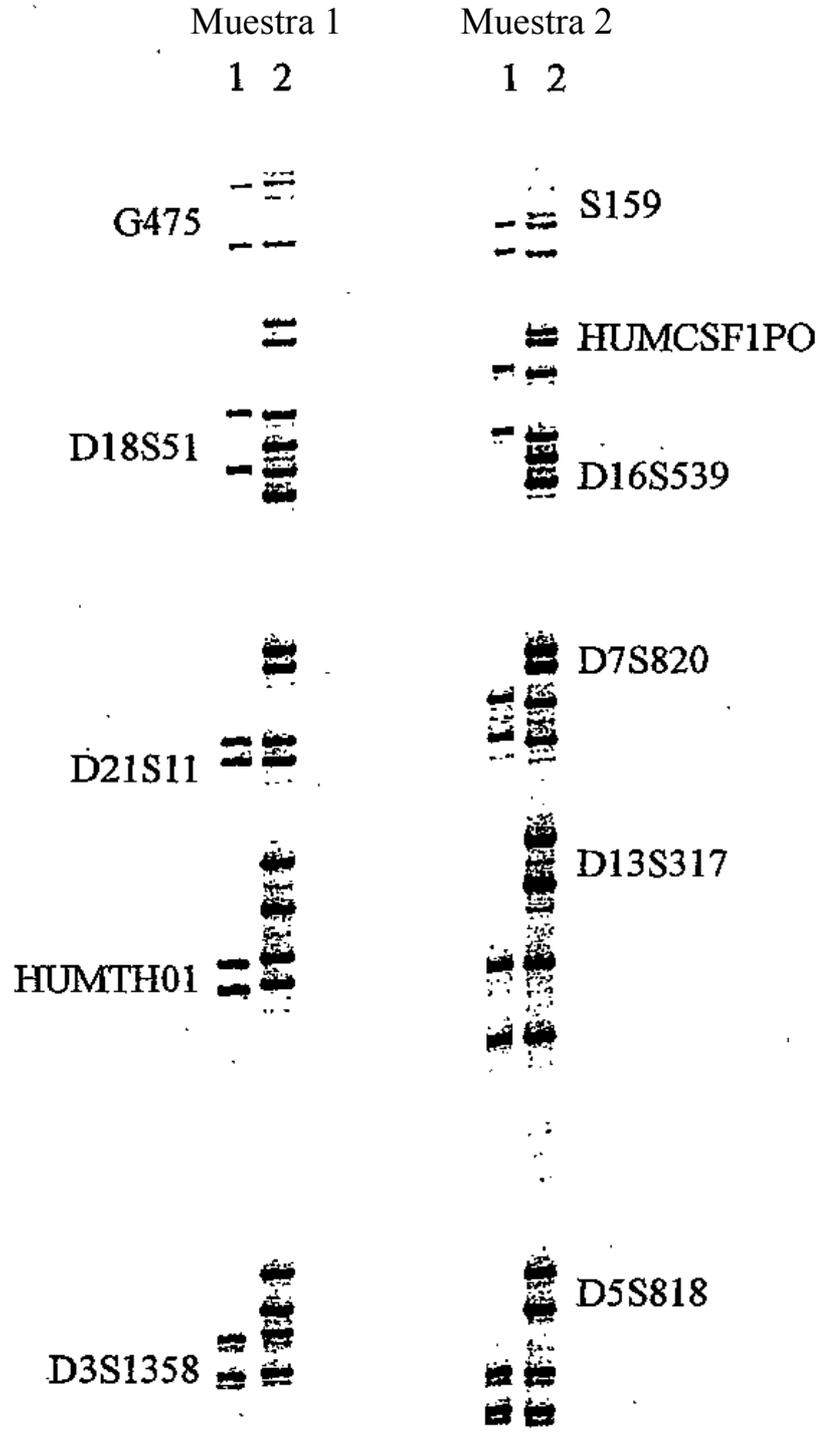


FIG 5B

Escaneo a 585 nm: canal de la tetrametilrodamina

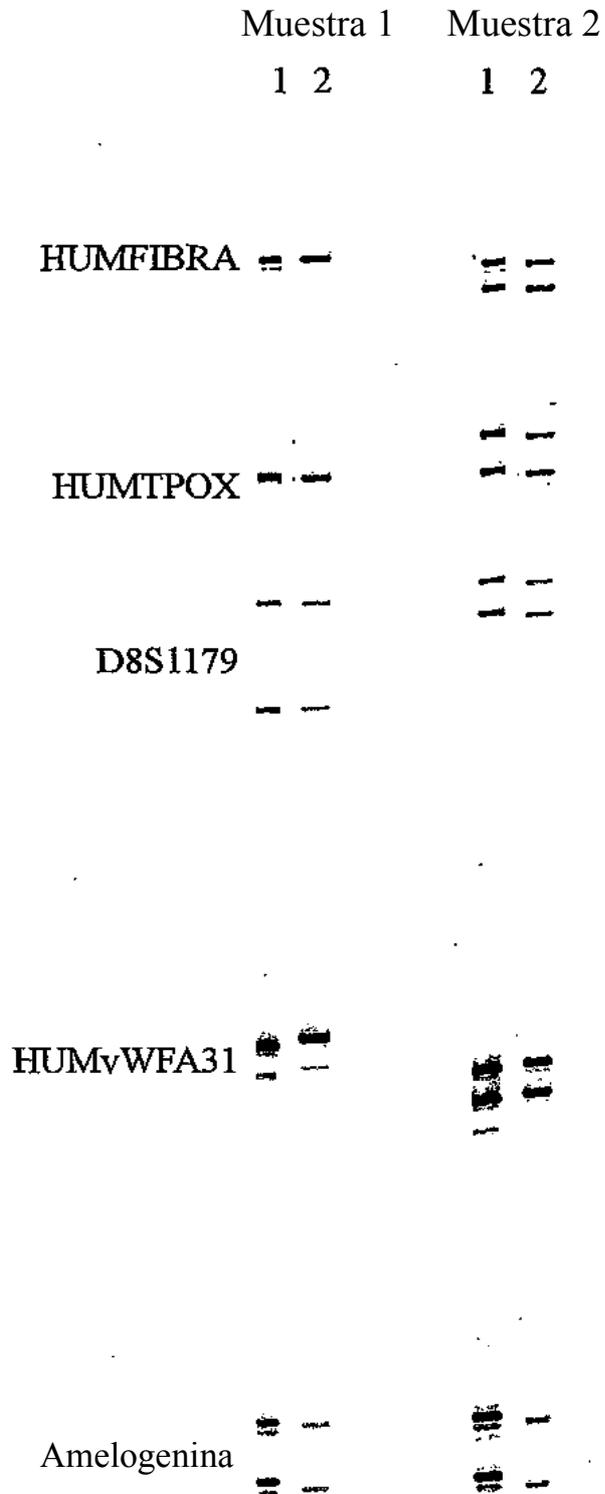


FIG 6A

Escaneo a 505 nm: canal de la fluoresceína

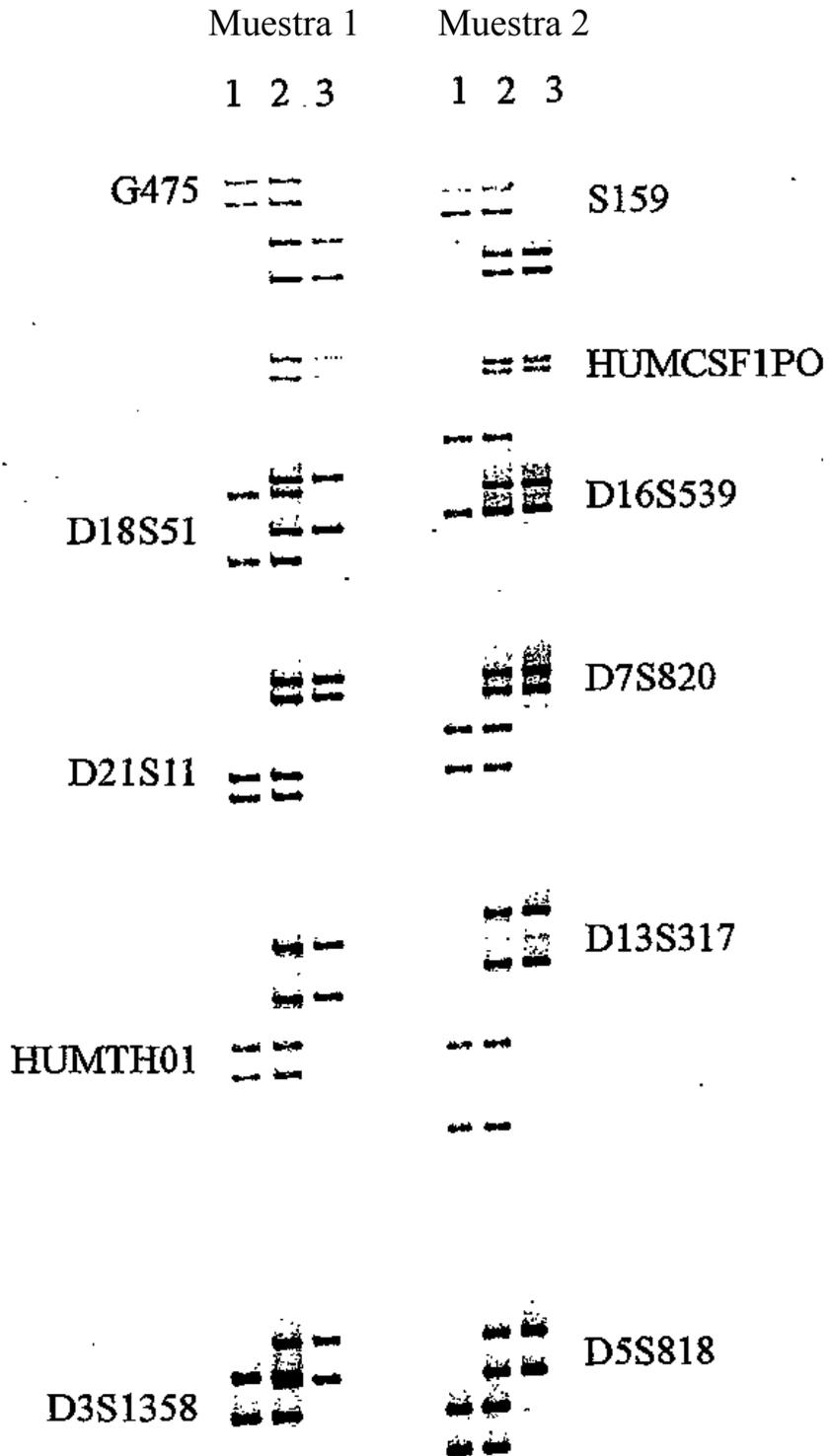


FIG 6B

Escaneo a 585 nm: canal de la tetrametilrodamina

