

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 881**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2004 E 04701132 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **05.10.2005 EP 1581661**

54 Título: **Procedimiento basado en la AFLP para la integración de mapas físicos y genéticos**

30 Prioridad:

10.01.2003 EP 03075090

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

06.02.2013

73 Titular/es:

**KEYGENE N.V. (100.0%)
AGRO BUSINESS PARK 90
6708 PW WAGENINGEN, NL**

72 Inventor/es:

JESSE, TACO, PETER

74 Agente/Representante:

MORGADES MANONELLES, Juan Antonio

ES 2 394 881 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

Procedimiento basado en la AFLP para la integración de mapas físicos y genéticos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, más en particular al campo de la cartografía genómica y más en particular al campo de relacionar marcadores físicos y genéticos y al campo de la integración de mapas físicos y genéticos. La presente invención se refiere a un procedimiento para la integración de mapas físicos y genéticos, más en particular a la construcción de mapas genéticos y físicos integrados de alto rendimiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los mapas genéticos y físicos integrados resultan muy valiosos para el aislamiento de genes basado en mapas, el análisis comparativo del genoma y como fuentes de clones con la secuencia preparada para proyectos de secuenciación del genoma. El efecto de la disponibilidad de un mapa integrado de marcadores físicos y genéticos de una especie para la investigación del genoma es enorme. Los mapas integrados permiten una cartografía genérica precisa y rápida y cartografiar todos los locus de microsatélites y otras aplicaciones tales como la manipulación genética basada en el marcador SNA. Se han desarrollado diversos procedimientos para realizar mapas físicos de genomas de complejidad diversa. Uno de los enfoques mejor caracterizados utiliza enzimas de restricción para generar grandes cantidades de fragmentos de ADN de subclones genómicos (Brenner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (1989), 86, 8902-8906; Gregory *et al.*, *Genome Res.* (1997), 7, 1162-1168; Marra *et al.*, *Genome Res.* (1997), 7, 1072-1084). Dichas huellas genéticas se comparan para identificar clones relacionados y montar clones superpuestos en contigios. Sin embargo, la utilidad de la obtención de huellas genéticas para ordenar un genoma complejo es limitada debido a la variación en la migración del ADN de gel a gel, la presencia de secuencias de ADN repetitivo, una distribución inusual de sitios de restricción y representación sesgada de clones. Además, la obtención de huellas genéticas por sí misma, a menos que se combine con otros procedimientos, no relaciona los clones genómicos directamente con los mapas genéticos. Por lo tanto, la mayoría de mapas físicos de alta calidad de genomas complejos se han construido utilizando una combinación entre la obtención de huellas genéticas y procedimientos basados en la PCR o basados en la hibridación.

Se conoce la amplificación de fragmentos de restricción selectiva o AFLP, por ejemplo a partir de la solicitud de patente europea 0 534 858 y la patente US n.º 6.045.994, a nombre del presente solicitante, y de un artículo de investigación de Vos *et al.* *Nucleic Acids Research* (1995), 23, 4407-4414. En general, la AFLP comprende las etapas de:

- (a) digerir un ácido nucleico, en particular un ADN o un ADNc, con una o más endonucleasas de restricción específicas, para fragmentar dicho ADN en una serie correspondiente de fragmentos de restricción;
- (b) ligar los fragmentos de restricción obtenidos de este modo con por lo menos un adaptador sintético de oligonucleótidos de doble cadena, uno de cuyos extremos es compatible con uno o ambos de los extremos de los fragmentos de restricción, para de este modo producir fragmentos de restricción etiquetados del ADN inicial;
- (c) poner en contacto dicho fragmentos de restricción etiquetados en condiciones de hibridación con por lo menos un cebador de oligonucleótidos;
- (d) amplificar dichos fragmentos de restricción etiquetados hibridados con dichos cebadores mediante PCR o una técnica similar para provocar una elongación adicional de los cebadores hibridados a lo largo de los fragmentos de restricción del ADN inicial con el que dichos cebadores se hibridan; e
- (e) identificar o recuperar el fragmento de ADN amplificado o alargado obtenido de este modo.

A continuación se pueden analizar y visualizar los fragmentos de ADN amplificados obtenidos de este modo, por ejemplo, mediante electroforesis en gel. Ello proporciona una huella genética que presenta bandas específicas correspondientes a los fragmentos de restricción que se han enlazado con el adaptador, los ha reconocido el cebador y, de este modo, se han amplificado durante la etapa de amplificación. La huella genética obtenida de este modo proporciona información sobre la restricción específica, los datos de sitio del ADN inicial y, de este modo, la composición genética del organismo del que se ha obtenido dicho ADN.

La AFLP puede utilizarse para identificar dicho ADN; para analizar la presencia de datos de sitios de restricción específicos, polimorfismos de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y/o marcadores genéticos específicos (denominados "marcadores AFLP"), que pueden indicar la presencia de ciertos genes o rasgos genéticos; o para propósitos similares, por ejemplo, comparar los resultados obtenidos con muestras de ADN de origen conocido o datos de restricción, o datos al respecto. La AFLP es sobre todo adecuada para caracterizar marcadores genéticos mediante uno o más fragmentos de la AFLP visualizados de este modo.

Los cebadores utilizados en la AFLP son de tal modo que reconocen el adaptador y puede servir de punto de partida para la reacción en cadena de la polimerasa. Con este objetivo, los cebadores deben presentar una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con (por lo menos una parte de) la secuencia de nucleótidos del adaptador adyacente al extremo 3' del fragmento de restricción a amplificar. Los cebadores pueden comprender asimismo una

o más bases adicionales (denominadas "bases selectivas") en el extremo 3' de su secuencia, para hibridarse con cualquier base(s) complementaria(s) en el extremo 3' del fragmento de restricción ligado al adaptador. Dispuesto entre la parte del cebador que se hibrida con el adaptador y las bases selectivas que se hibridan con el fragmento de restricción, el cebador puede comprender una sección que se puede hibridar con los restos del sitio de la restricción. De este modo, en general cebador AFLP presenta la estructura siguiente: el sitio de restricción de la parte complementaria del adaptador continúa siendo bases selectivas complementarias. El sitio de restricción de la parte complementaria del adaptador que continúa complementaria se representa generalmente como la 'secuencia constante' del cebador AFLP y las bases selectivas como la 'secuencia variable'.

Ya que, de todos los fragmentos de restricción ligados al adaptador presentes en la mezcla, únicamente se amplificarán posteriormente aquellos fragmentos que comprendan bases complementarias a las bases selectivas, la utilización de dichos cebadores "selectivos" reducirá la cantidad total de bandas en la huella genética final, por lo que de este modo la huella genética resulta más clara y más específica. Asimismo, la utilización de distintos cebadores selectivos (es decir, distintas secuencias variables) se obtendrán generalmente huellas genéticas distintas, que se pueden utilizar asimismo como herramienta destinada a la identificación o el análisis.

Los nucleótidos selectivos son complementarios a los nucleótidos de los fragmentos de restricción ligados al adaptador que se encuentran adyacentes a la secuencia constante del cebador.

Los cebadores que comprenden nucleótidos selectivos se denominan cebadores +N, representando N el número de nucleótidos selectivos presentes en el extremo 3' del cebador. N se selecciona preferentemente de entre A, C, T o G.

N se puede seleccionar asimismo de entre diversos nucleótidos alternativos, es decir, compuestos que pueden imitar el comportamiento de los nucleótidos ACTG pero que presentan además otras características tales como la capacidad de una hibridación mejorada en comparación con los nucleótidos ACTG o la capacidad de modificar la estabilidad de los bicatenarios resultantes de la hibridación. Los ejemplos de los mismos comprenden ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), inosina, etc. Cuando se realiza la amplificación con más de un cebador, tal como con una PCR utilizando dos cebadores, uno o ambos cebadores pueden presentar nucleótidos selectivos. El número de nucleótidos selectivos puede variar, dependiendo de la especie o de otros detalles que los expertos en la materia pueden determinar. En general, el número de nucleótidos selectivos no superior 10, pero por lo menos 5, preferentemente 4, más preferentemente 3, más preferido 2 y especialmente preferido es 1 nucleótido selectivo.

De este modo un cebador +1 comprende un nucleótido selectivo, un cebador +2 comprende 2 nucleótidos selectivos, etc. Un cebador sin nucleótidos selectivos (es decir, un cebador convencional) se puede representar como un cebador +0 (sin nucleótidos selectivos añadidos). Cuando se añade un nucleótido selectivo específico, ello es representado mediante el concepto +A o +C, etc.

Al amplificar un conjunto de fragmentos de restricción ligados al adaptador con un cebador selectivo, se obtiene un subconjunto de fragmentos de restricción ligados al adaptador, siempre que la base complementaria se encuentre presente en la posición apropiada del fragmento de restricción. Al utilizar un cebador +1, por ejemplo, la complejidad (y el número de fragmentos visualizadas) de la mezcla amplificada se reduce por un factor de 4 en comparación con una amplificación con un cebador no selectivo (un cebador +0). Se pueden alcanzar unas reducciones superiores utilizando cebadores con una pluralidad de nucleótidos selectivos, es decir, se obtiene una reducción de 16 veces de la razón múltiple original con 2 nucleótidos selectivos, etc.

Debido a que la AFLP proporciona la amplificación de ambas hebras de ADN inicial bicatenario, la AFLP permite ventajosamente la amplificación exponencial del fragmento, es decir, según la serie 2, 4, 8, 16, etc. Además, la AFLP no requiere conocimiento previo alguno de la secuencia de ADN a analizar, ni la identificación previa de sondas adecuadas o la construcción de una genoteca del ADN inicial.

Para una descripción más detallada de la AFLP, sus ventajas, sus formas de realización, así como las técnicas, enzimas, adaptadores, cebadores y compuestos y herramientas adicionales que se utilizan en la misma, se hace referencia al documento EP-0 534 858 y a Vos *et al. Nucleic Acids Research* (1995), 23, 4407-4414. Asimismo, en la descripción siguiente, se utilizarán las definiciones proporcionadas en el párrafo 5.1 del documento EP-0 534 858, excepto cuando se indique lo contrario.

Anteriormente ya se ha reconocido el potencial de la AFLP como tecnología para la integración de mapas físicos y genéticos. Klein *et al.* en *Genome Research*, (2000), 10, 798-807 han descrito la utilización de la AFLP en la integración de mapas físicos y genéticos de *Sorghum*. El procedimiento de Klein *et al.* comprende generar las huellas genéticas de la AFLP utilizando cebadores selectivos +3/+3 de todos los clones BAC individuales de una genoteca. El procedimiento comprende además generar mezclas de clones. Las mezclas se analizan asimismo mediante la obtención de huellas genéticas por AFLP aunque con distintos enzimas de restricción y de algún otro modo otras circunstancias en comparación con la generación de huellas genéticas de la AFLP de todos los BAC individuales. La utilización de combinaciones distintas de enzimas dificulta el procedimiento. El procedimiento de

Klein *et al.*, aunque factible, es complejo y laborioso y adolece de diversas desventajas adicionales. Una de las mismas es que el procedimiento no es apto para disponer marcadores no polimórficos en el mapa integrado.

Constituye un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento mejorado para la integración de mapas físicos y genéticos. Constituye un objetivo adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento basado en la AFLP. Constituye otro objetivo adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento de alto rendimiento para la integración de mapas físicos y genéticos que produzca mapas de mayor calidad determinándose por las mayores densidades de marcadores o como resultado de la generación de cóntigos más fiables.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a procedimientos para la integración de marcadores físicos y genéticos y a la integración de mapas físicos y genéticos. La presente invención supera a muchos de los problemas encontrados anteriormente en la técnica y proporciona mejoras y ventajas importantes que se pondrán claramente de manifiesto mediante la presente descripción, las reivindicaciones y los ejemplos. El procedimiento se basa en la AFLP y más en particular se basa en la utilización de combinaciones de cebadores selectivos en la AFLP. El procedimiento tiene como resultado la integración de mapas genéticos y físicos y la vinculación de marcadores físicos y genéticos. La presente invención se refiere además a la utilización de cebadores de AFLP en los procedimientos de la presente invención y a un conjunto de cebadores de AFLP definidos estructuralmente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la integración de mapas físicos y genéticos asociando un fragmento de restricción, preferentemente un fragmento de AFLP con un marcador genético, proporcionando una genoteca de clones que comprenden insertos (de la parte) del genoma de interés, agrupando los clones en mezclas y obteniendo las huellas genéticas de las mezclas utilizando pares de cebadores de AFLP de mayor selectividad, obteniendo individualmente huellas genéticas de los clones de una genoteca utilizando pares de cebadores de AFLP pares de baja selectividad. Se identifican las mezclas que comprenden un fragmento que corresponde al fragmento asociado al marcador genético y los clones individuales que comprenden el fragmento que corresponde al fragmento asociado al marcador genético se identifican y se vinculan. A partir de los datos de la huella genética de los clones individuales que contienen el fragmento asociado al marcador genético se genera un cóntigo. El cóntigo se vincula con el marcador genético en el mapa genético y el proceso se repite para todos los marcadores genéticos, proporcionando de este modo un mapa integrado físico y genético.

El concepto 'pares cebadores de selectividad superior / inferior' tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al número de nucleótidos selectivos de los cebadores de la AFLP utilizados para obtener huellas genéticas. De este modo, un par cebador a +0/+0 presenta una selectividad inferior a la de un par cebador +0/+1 o un par cebador +1/+0. De un modo similar, un par cebador +3/+4 presenta una selectividad superior a la de un par cebador +2/+2, etc.

En un aspecto la presente invención se refiere a un procedimiento para vincular un mapa genético y físico del genoma que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar por lo menos dos marcadores genéticos individuales para el genoma o parte del mismo, preferentemente en forma de mapa genético;
- (b) caracterizar cada uno de los marcadores genéticos mediante por lo menos un fragmento de la AFLP identificado mediante la obtención de huellas genéticas de AFLP;
- (c) proporcionar una genoteca de clones que comprende fragmentos de genoma o parte del mismo, preferentemente una genoteca de cromosomas artificiales tales como un BAC o un YAC;
- (d) generar una pluralidad de mezclas, conteniendo cada mezcla una pluralidad de clones individuales de la genoteca;
- (e) generar una huella genética AFLP para cada una de las mezclas;
- (f) identificar en la pluralidad de mezclas, la(s) mezcla(s) en las que se encuentra presente un fragmento de AFLP identificado en (b) en la huella genética de la mezcla;
- (g) generar una huella genética de AFLP para cada uno de los clones individuales de la(s) mezcla(s) identificada(s) en (f), e identificar el clon que comprende el fragmento de AFLP identificado en (b) en su huella genética de AFLP;
- (h) generar un cóntigo que comprenda los clones individuales identificados en la etapa (g) basado en los datos de la obtención de huellas genéticas;
- (i) repetir las etapas (f) a (h) para por lo menos un segundo fragmento de AFLP identificado en (b) de tal modo que el segundo fragmento de AFLP o los fragmentos adicionales de AFLP caracterizan un segundo marcador genético o unos marcadores genéticos adicionales; y
- (j) vincular por lo menos dos de los cóntigos obtenidos en (h), obteniendo de este modo una mapa físico y genético integrado del genoma o parte del mismo, que comprende por lo menos dos marcadores genéticos;

en el que los pares cebadores de AFLP utilizados en las etapas (b) y (e) presentan una selectividad superior y los pares cebadores de AFLP pares en la etapa (g) presentan una selectividad inferior, comprendiendo cada cebador de

AFLP una secuencia constante y una secuencia variable en el extremo 3' de su secuencia, comprendiendo dicha secuencia constante una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con por lo menos una parte del adaptador adyacente al extremo 3' del fragmento de restricción para amplificarse y comprende además una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con los restos del sitio de restricción, comprendiendo dicha secuencia variable nucleótidos selectivos, siendo dichos nucleótidos selectivos complementarios a los nucleótidos del extremo 3' de los fragmentos de restricción ligados al adaptador que se encuentran adyacentes a la secuencia constante, en el que los cebadores de AFLP de selectividad superior comprenden por lo menos un nucleótido selectivo más que los cebadores de AFLP de selectividad inferior, y en el que los cebadores de AFLP utilizados para caracterizar el marcador genético en la etapa (g) difieren de los cebadores de AFLP utilizados para obtener huellas genéticas de las mezclas en las etapas (b) y (e) únicamente en el número de nucleótidos selectivos.

Preferentemente, los cebadores de AFLP directa e inversa utilizados en las etapas (b) y (e) comprenden K y L nucleótidos selectivos respectivamente en el extremo 3' del cebador, comprendiendo los cebadores de AFLP directa e inversa utilizados en la etapa (d) M y N nucleótidos selectivos respectivamente en el extremo 3' del cebador, siendo K, L, M, N números enteros comprendidos entre 0 y 10, y siendo $K + L \geq M + N$.

El procedimiento de la presente invención es flexible. La flexibilidad en este sentido se refiere al material inicial. El procedimiento de la presente invención puede partir de genomas enteros de cualquier especie, pero se puede aplicar asimismo a únicamente una parte del genoma o de una región seleccionada del genoma o un cromosoma o parte del mismo.

El procedimiento se inicia utilizando marcadores genéticos individuales. Se prefiere que dichos marcadores se hayan integrado en un mapa genético, pero ello no constituye un requisito previo. El procedimiento de la presente invención resulta igualmente idóneo para vincular marcadores físicos con marcadores genéticos, tras lo que los marcadores físicos se alinean para formar un mapa físico y al mismo tiempo proporcionan un mapa genético. El mapa genético puede comprender únicamente un marcador genético único pero preferentemente el mapa comprende dos o más marcadores genéticos. Cada uno de los marcadores genéticos se caracteriza por un fragmento de AFLP o por una combinación de fragmentos de AFLP. La segunda etapa comprende proporcionar de una genoteca de cromosomas artificiales. La genoteca puede ser una genoteca de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) o basarse en cromosomas artificiales de levadura (YAC). Son posibles asimismo genotecas basadas en cósmidos, PAC, TAC o MAC. Se prefiere una genoteca de BAC. La genoteca es preferentemente de una calidad elevada y preferentemente es una genoteca genómica con un tamaño de inserción elevado. Ello significa que el BAC individual comprende una gran inserción del ADN genómico que se está investigando. El tamaño del inserto grande preferido depende de la especie. A lo largo de esta solicitud se hace referencia a los BAC como ejemplos de cromosomas artificiales. Sin embargo, se ha de indicar que la presente invención no se limita a los mismos y que se pueden utilizar otros cromosomas artificiales sin apartarse de los principios de la presente invención.

Preferentemente las genotecas comprenden por lo menos cinco equivalentes genómicos, más preferentemente por lo menos 7, más preferentemente por lo menos 8. Se prefiere particularmente por lo menos 10. Cuanto mayor sea el número de equivalentes genómicos de la genoteca, más fiables son el cóntigo resultante y los mapas integrados.

Los clones individuales de la genoteca se agrupan para formar mezclas que comprendan una pluralidad de cromosomas o clones artificiales. La agrupación puede ser la combinación simple de un cierto número de clones individuales en una muestra (por ejemplo, 100 clones en 10 mezclas de 10 clones), pero se pueden utilizar asimismo estrategias de agrupación más elaboradas. La distribución de los clones en las mezclas se realiza preferentemente de tal modo que cada clon se encuentra presente en por lo menos dos o más de las mezclas. Las mezclas se generan basándose en estrategias de agrupación muy conocidas en la técnica. Los expertos en la materia pueden seleccionar la estrategia de agrupación óptima basándose en factores tales como el tamaño del genoma, etc. La estrategia de agrupación resultante dependerá de las circunstancias y los ejemplos de las mismas son la agrupación en placa, la agrupación N-dimensional tal como la agrupación 3D, la agrupación 6D o la agrupación compleja.

Se obtienen las huellas genéticas de cada una de las mezclas utilizando la AFLP y preferentemente con pares de cebadores que presenten una selectividad elevada para generar de este modo huellas genéticas que contengan un número limitado de bandas o fragmentos. Preferentemente los pares cebadores utilizados en la obtención de huellas genéticas de las mezclas son los mismos pares cebadores que se utilizan para identificar el fragmento de AFLP característico de los marcadores genéticos en la etapa (b). Los pares cebadores con una selectividad elevada contienen nucleótidos más selectivos que el cebador con una selectividad baja y son, por ejemplo, pares cebadores +3/+3 o pares cebadores +2/+3.

Las huellas genéticas de las mezclas se examinan posteriormente con respecto a la presencia o ausencia de los fragmentos de interés que están asociados al (a los) marcador(es) genético(s). A partir de una(s) mezcla(s) en la(s) que está presente el fragmento pretendido, se obtiene la huella genética de cada uno de los clones individuales de la(s) mezcla(s) utilizando la AFLP. Se obtienen preferentemente las huellas genéticas de los clones individuales con pares cebadores que presentan una selectividad baja para generar de este modo huellas genéticas que contengan un gran número de bandas o fragmentos que posteriormente ayudan a generar cóntigos fiables. En general, en este procedimiento, las huellas genéticas de AFLP de los marcadores genéticos, las mezclas y los clones individuales se

obtienen preferentemente utilizando las mismas combinaciones de enzima(s) y adaptadores. Preferentemente únicamente los cebadores son distintos y preferentemente únicamente las bases selectivas son distintas en cantidad y/o en tipo. Los pares cebadores con una selectividad baja son, por ejemplo, pares cebadores +0/+0 o pares cebadores +1/+0.

Las huellas genéticas de los clones individuales que se han obtenido se someten ahora a una etapa de selección mediante la que se seleccionan aquellos fragmentos que suelen estar relacionados con los marcadores genéticos de interés. Ello se realiza sometiendo los clones individuales que contiene el fragmento pretendido a una etapa de la selección, preferentemente con herramientas informáticas.

En dicha etapa de selección, se comparan los datos de la obtención de huellas genéticas de los clones individuales. Cuando se comparan datos de huellas genéticas obtenidas a partir de clones con insertos superpuestos, las huellas genéticas correspondientes comprenderán una o más bandas/fragmentos que son similares en lo que se refiere al lugar, intensidad, tipo, etc. (véase, por ejemplo, la figura 1, las bandas están marcadas como #, ^ \$). Con los datos de la huella genética obtenidos a partir de clones que no presentan insertos superpuestos, la posibilidad de que una o más bandas exprese dicha similitud es significativamente inferior. Cuando, basándose en los datos de la huellas genéticas es probable que los insertos asociados de los clones sean insertos superpuestos, la alineación informática permite generar un cóntigo. Dicho cóntigo se relaciona a continuación con el marcador genético y el marcador genético se puede posicionar en el mapa genético. Repitiendo dichas etapas para distintos marcadores genéticos se obtiene, en última instancia, el posicionamiento de todos los cóntigos en el mapa genético y la integración del mapa físico y genético.

La ventaja de obtener las huellas genéticas de los clones utilizando cebadores con una selectividad baja es que se amplifican muchos fragmentos. Por consiguiente, se identifica un gran número de marcadores físicos. Normalmente se generan entre 4 y 5 veces más fragmentos que se pueden calificar con una amplificación +0/+ con respecto a una amplificación +2/+3 y permite obtener, por consiguiente, una resolución entre 4 y 5 veces superior de los clones cóntigos. De este modo, se genera un mapa físico de alta resolución. Ello permite ventajosamente generar cóntigos y reducir el número de singuletes que se pueden producir en la generación de cóntigos.

El término 'cóntigo' tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia continua de ADN que se ha ensamblado a partir de fragmentos de ADN clonados superpuestos, siguiendo la definición que proporciona la Enciclopedia de Biología Molecular (1994, Blackwell).

En general, los cebadores de selectividad baja y elevada se caracterizan porque los cebadores de AFLP directa e inversa de selectividad elevada utilizados en la obtención de huellas genéticas de los clones individuales y en la identificación del fragmento de AFLP asociado al marcador genético comprenden K y L nucleótidos selectivos respectivamente en el extremo 3' del cebador, comprendiendo los cebadores de AFLP directa e inversa que se utilizan para obtener las huellas genéticas de los clones individuales de la genoteca M y N nucleótidos selectivos respectivamente en el extremo 3' del cebador, siendo K, L, M, N números enteros comprendidos entre 0 y 10 y siendo $K + L \geq M + N$. De este modo los cebadores de selectividad elevada comprenden por lo menos un nucleótido selectivo más que los cebadores de selectividad baja.

Se realiza la alineación comparando los datos de la banda e las intensidades de la huella genética para identificar los datos superpuestos. Los clones que comprenden datos superpuestos se pueden alinear basándose en los mismos. Al utilizar la AFLP con cebadores de selectividad baja, los marcadores físicos presentes en los clones son abundantes y, por lo tanto, la alineación de los mismos puede realizarse con gran precisión. El cóntigo puede generarse utilizando cualquier medio conocido en la técnica. Los clones se pueden alinear utilizando software muy conocido en la técnica para estos propósitos tal como FPC (Soderlund C., 1. Longden, R. Mott, 1997, FPC: un sistema para la construcción de cóntigos a partir de clones de restricción de los que se ha obtenido la huella genética. *Comput. Applic. Biosci.* 13:523-535). Dicho software se puede utilizar en el procedimiento de la presente invención con unos parámetros de corte comprendidos entre 10^{-5} y 10^{-15} , preferentemente entre 10^{-6} y 10^{-14} , más preferentemente entre 10^{-7} y 10^{-13} , en particular entre 10^{-8} y 10^{-12} , más preferentemente entre 10^{-9} y 10^{-11} y en el caso más preferido de 10^{-10} . El corte es un parámetro que representa el valor límite que representa la probabilidad máxima admisible de oportunidad de coincidencia entre dos clones cualesquiera. La tolerancia es un parámetro que consiste en la medida de la distancia o del ancho de banda máximos en la que dos bandas de dos clones distintos pueden diferir y considerarse todavía la misma banda. En la presente invención, la tolerancia se clasifica entre 0 (idéntico) y 5 (diferencia de 0,5 pares de bases). Preferentemente, la tolerancia es tan baja como resulte posible (es decir, 0), pero en la práctica un valor comprendido entre 3 y 4 (diferencia comprendida entre 0,3 y 0.4 pares de bases) resulta aceptable y se prefiere entre 1 y 2.

Los cóntigos generados se vinculan a continuación con el marcador genético en el mapa genético y se repite todo el proceso para los otros marcadores genéticos del mapa genético, integrando de este modo el mapa genético con el mapa físico.

El procedimiento según la presente invención presenta ciertas ventajas sobre los procedimientos descritos en la técnica. Una de las ventajas es que el mapa integrado resultante presenta una resolución elevada debido a la

obtención de las huellas genéticas de los clones individuales con pares cebadores de selectividad baja. La etapa de amplificación de AFLP con cebadores de selectividad baja tendrá como resultado la amplificación de más fragmentos de restricción ligados al adaptador y, por consiguiente, más marcadores físicos por clon en comparación con los procedimientos similares de obtención de huellas genéticas con cebadores de selectividad elevada. Debido a dicho mayor número de marcadores físicos por clon, la generación posterior de un cóntigo es asimismo de mejor calidad y se pueden alinear correctamente más clones, lo que tiene como resultado una mejor integración del mapa físico y genético.

Otra ventaja es la velocidad de la generación del cóntigo. Con el procedimiento de la presente invención se seleccionan conjuntos relativamente pequeños de clones individuales que están asociados con el fragmento de AFLP del marcador genético a partir del que se genera un cóntigo. Los conjuntos pequeños presentan la ventaja de que la generación de un cóntigo es significativamente más rápida que cuando se utilizan conjuntos más grandes. Tras posicionar los cóntigos en el mapa genético, se obtiene un mapa integrado más fiable, alineando los cóntigos posicionados y verificando las alineaciones con la posición del marcador genético en el mapa genético. Una de las ventajas adicionales es que la distancia genética relativa (generalmente en centimórgans) se convierte ahora en distancias físicas (en pares de bases) y puede proporcionar una corrección o mejora del mapa genético, por ejemplo, invirtiendo el orden de los marcadores genéticos o determinando con mayor precisión la distancia entre los marcadores. Una de las ventajas más destacables es que cada etapa se puede verificar y corregir. Ello significa que en el caso de una ampliación o una detección, por ejemplo en un gel, que no sea de la calidad pretendida, dicha etapa se puede corregir inmediatamente hasta obtener datos de la calidad pretendida.

Una ventaja significativa del procedimiento de la presente invención con respecto a los procedimientos conocidos en la técnica es que el presente procedimiento permite detectar marcadores no polimórficos y su integración posterior en el mapa integrado. Otra ventaja asociada al procedimiento de la presente invención es que la generación de datos de cartografía física y su vinculación con el mapa genético se realizan directamente desde el principio del procedimiento (para cada marcador por separado).

En una forma de realización el procedimiento puede utilizarse asimismo para vincular o integrar un marcador físico y genético. El procedimiento comprende por lo tanto las etapas de:

- (a) caracterizar el marcador genético mediante por lo menos un fragmento de la AFLP identificado mediante la obtención de huellas genéticas de AFLP;
- (b) proporcionar una genoteca de cromosomas artificiales tales como un BAC o un YAC;
- (c) generar una pluralidad de mezclas, conteniendo cada mezcla una pluralidad de cromosomas artificiales de la genoteca;
- (d) generar una huella genética AFLP para cada una de las mezclas;
- (f) seleccionar de entre la pluralidad de mezclas aquellas mezclas individuales en las que se encuentra presente el fragmento de AFLP asociado al marcador genético en la huella genética de la mezcla individual;
- (g) generar una huella genética de AFLP de los cromosomas artificiales individuales de los grupos identificados en (f);
- (h) seleccionar de entre las huellas genéticas de los cromosomas artificiales individuales de la etapa (g) los cromosomas artificiales individuales en los que se encuentra presente el fragmento de AFLP asociado al marcador genético en la huella genética;
- (i) generar un cóntigo de los cromosomas artificiales individuales identificados en la etapa (h);
- (j) vincular el cóntigo obtenido en la etapa (i) al marcador genético en el mapa genético, obteniendo de este modo un vínculo entre el marcador físico y el marcador genético;

en el que los cebadores de AFLP directa e inversa utilizados en las etapas (b) y (f) comprenden K y L nucleótidos selectivos respectivamente en el extremo 3' del cebador, comprendiendo los cebadores de AFLP directa e inversa utilizados en la etapa d M y N nucleótidos selectivos respectivamente en el extremo 3' del cebador, siendo K, L, M, N números enteros comprendidos entre 0 y 10, y siendo $K + L \geq M + N$.

En esta forma de realización, la presente invención se utiliza para la integración simple de un marcador genético con un (grupo de) marcador(es) físico(s). Repitiendo dichas etapas para todos los marcadores genéticos disponibles, puede construirse el mapa integrado completo, pero en esta forma de realización es totalmente opcional.

En una forma de realización, la diferencia en el número de nucleótidos que se utilizan en el conjunto de cebadores con selectividad baja en comparación con el conjunto de cebadores de selectividad elevada, representados asimismo como $(K+L) - (M+N)$, es por lo menos 1, preferentemente por lo menos 2, más preferentemente por lo menos 3, más preferentemente por lo menos 4. En una forma de realización, el número de nucleótidos que se utilizan en el conjunto de cebadores con selectividad baja, representados asimismo como $M+N$, es por lo menos 0, preferentemente por lo menos 1, más preferentemente por lo menos 2, más preferentemente por lo menos 3.

Las mezclas de los clones individuales que se utilizan en el procedimiento de la presente invención contienen preferentemente entre 0,001 y 1 equivalente genómico del genoma total a analizar, preferentemente entre 0,1 y 0,75, más preferentemente entre 0,15 y 0,60, más preferentemente entre 0,20 y 0,50. Se prefiere más entre 0,25 y 0,35, más preferentemente 0,4, más preferentemente 0,3.

En general, una mezcla de clones individuales está limitada en el número de clones que puede contener. En el caso de genomas excepcionalmente grandes, genotecas o insertos muy pequeños, se puede introducir ventajosamente una etapa adicional de agrupación. Por lo tanto, en una forma de realización preferido de la presente invención, el procedimiento comprende un etapa adicional de agrupación. La etapa adicional de agrupación tiene como resultado unas mezclas en las que se pueden obtener la huella genética con cebadores la misma selectividad (elevada) que se utiliza para obtener huellas genéticas de las mezclas de la etapa de agrupación inicial. Es asimismo posible utilizar cebadores de una selectividad intermedia, es decir, cebadores con un número de nucleótidos selectivos (P + Q) comprendido entre K + L y M + N de tal modo que $K + L \geq P + Q \geq M + N$.

En una forma de realización alternativa, es posible evitar el uso de las mezclas de clones en conjunto generando un cóntigo de todos los clones individuales de los que se ha obtenido sus huellas genéticas utilizando cebadores con una selectividad baja. Opcionalmente se realiza una selección previa de los clones individuales en la que los clones comprenden por lo menos el fragmento que se asocia al marcador genético. Más detalladamente, se examinan las huellas individuales obtenidas mediante cebadores de selectividad baja para detectar la presencia del (fragmento) marcador asociado al marcador genético que se ha identificado utilizando los cebadores de selectividad elevada. Esta forma de realización resulta ventajosa, por ejemplo, cuando se investigan los genomas más pequeños o cuando únicamente unos pocos marcadores genéticos están integrados con los marcadores físicos. En dichos casos no se necesita realmente una etapa de agrupación.

En una forma de realización para caracterizar todos los marcadores genéticos disponibles mediante AFLP se puede preferir la utilización de distintos cebadores y/o combinaciones de cebadores para distintos marcadores genéticos. Los cebadores y/o combinaciones de cebadores para obtener las huellas genéticas de las mezclas y los clones individuales pueden, por lo tanto, adaptarse en consecuencia. Resulta incluso posible utilizar distintas combinaciones de enzimas para marcadores genéticos distintos. Los cóntigos asociados de los BAC se pueden alinear basándose en la superposición de los cóntigos de los BAC y la aparición de marcadores físicos idénticos. Ello se representa esquemáticamente en la figura 3.

El procedimiento de la presente invención es en principio apto para la vinculación de uno o más marcadores físicos con un marcador genético y para la vinculación de los marcadores físicos con el mapa genético, que comprende una pluralidad de marcadores genéticos. Se prefiere que los marcadores genéticos estén repartidos uniformemente en el mapa. Se prefiere además que el mapa genético sea un mapa que se considere en la técnica como un mapa genético con una densidad elevada de marcadores. Ello facilita la vinculación de (los cóntigos de) los marcadores físicos con el mapa genético y mejora la calidad y la fiabilidad del mapa físico y genético integrado resultante. Preferentemente el mapa genético presenta una densidad (media) de por lo menos 1 marcador genético por cada 1000 kb, preferentemente por cada 500 kb, más preferentemente por cada 200 kb, más preferentemente por cada 100 kb. Se prefiere en particular un mapa genético con una densidad de por lo menos 1 marcador genético por cada 50 kb.

Cuando todos los marcadores genéticos están vinculados a un cóntigo obtenido a partir de clones individuales de la genoteca, pueden existir espacios incompletos o pueden existir clones que no se han dispuesto en el mapa. Debido a la mayor densidad de los marcadores físicos conseguidos al obtener las huellas genéticas de los clones individuales con cebadores de selectividad baja, la disposición de dichos clones se puede realizar utilizando un software convencional de alineación y utilizando técnicas tales como el desplazamiento sobre el BAC y utilizando secuencias terminales BAC.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a la utilización de cebadores de AFLP para la integración de mapas genéticos y físicos y a la utilización de AFLP y cebadores de AFLP en la vinculación de mapas genómicos genéticos y físicos. Se ha demostrado que la AFLP y los cebadores de AFLP proporcionan una técnica excelente para la integración de los mapas físicos y genéticos.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a la utilización de unos pares primero y segundo de cebadores de AFLP, comprendiendo dichos cebadores de AFLP una secuencia constante y una secuencia variable en el extremo 3' de su secuencia, comprendiendo dicha secuencia constante una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con por lo menos una parte del adaptador adyacente al extremo 3' del fragmento de restricción para amplificarse y comprende además una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con los restos del sitio de restricción, comprendiendo dicha secuencia variable nucleótidos selectivos, siendo dichos nucleótidos selectivos complementarios a los nucleótidos del extremo 3' de los fragmentos de restricción ligados al adaptador que se encuentran adyacentes a la secuencia constante, en un procedimiento para vincular mapas genómicos genéticos y físicos en los que el primer par de cebadores de AFLP es de selectividad superior y el segundo par de cebadores de AFLP es de selectividad inferior, comprendiendo los cebadores de AFLP de selectividad superior por lo menos un nucleótido selectivo más que los cebadores de AFLP de selectividad inferior, y en el que los cebadores de AFLP de selectividad inferior difieren de los cebadores de AFLP de selectividad superior únicamente en el número de nucleótidos selectivos.

Al vincular los c3ntigos f3sicos a los marcadores gen3ticos se puede obtener un primer mapa integrado. Bas3ndose en el mismo resulta posible aumentar la mejora, correcci3n y refinamiento del mapa gen3tico generando de un c3ntigo de los diversos marcadores f3sicos vinculados a un marcador gen3tico.

5 La presente invenci3n permite la construcci3n de mapas gen3ticos y f3sicos integrados de resoluci3n elevada de cualquier genoma sin necesidad de conocer previamente la secuencia. La presente invenci3n facilita adem3s la construcci3n eficiente de mapas f3sicos detallados de regiones, opcionalmente preseleccionadas, de cualquier genoma. La presente invenci3n facilita adem3s el descubrimiento de nuevos marcadores (AFLP) obtenidos de BAC, tanto polim3rficos como no polim3rficos para el mapa gen3tico integrado.

10

DESCRIPCI3N DE LAS FIGURAS

La figura 1 es una representaci3n esquem3tica de la integraci3n de un mapa f3sico y gen3tico. El procedimiento se inicia identificando de marcadores gen3ticos obteniendo huellas gen3ticas mediante AFLP. En este caso se identific3 un marcador gen3tico utilizando *HindIII* y *MseI* como endonucleasas de restricci3n en la obtenci3n de la huella gen3tica mediante AFLP y cebadores con selectividad elevada *Hind*+2 y *Mse*+3 que presentaban AT y CCA como nucle3tidos selectivos en su extremo 3', respectivamente. El fragmento de AFLP identificado asociado al marcador gen3tico presentaba una longitud de 344 pares de bases. Se prepar3 genoteca de BAC que comprend3 clones Z. Los clones individuales se agruparon (la mezcla I contiene los clones de 1, 2 y 3; la II contiene los 3, 5 y Z; y la III contiene los 1, 4 y 5) y se obtuvo la huella gen3tica de las mezclas utilizando AFLP con enzimas y cebadores id3nticos con la misma selectividad utilizada en la identificaci3n del marcador gen3tico (*Hind*+2(AT) y *Mse*+3(CCA)). Ello identifica positivamente aquellas mezclas que contienen el fragmento AT/CCA-344 (mezclas I y III). A partir de cada clon en la mezcla (mezclas I y III) que conten3a el fragmento de inter3s, (1, 2, 3, 4, 5) se gener3 una huella gen3tica de AFLP, utilizando cebadores de selectividad inferior, en este caso +0/+0. Se obtuvo la huella gen3tica de cada uno de los clones individuales y se pudieron identificar bandas con una longitud de 344 pares de bases (en 2, 3, 4, 5). Dichas bandas pueden estar muy relacionadas con el marcador gen3tico de inter3s, ya que comprenden asimismo cualquier fragmento que contenga otros nucle3tidos distintos a la combinaci3n AT/CCA en los extremos correspondientes. A partir las huellas gen3ticas individuales que contienen el fragmento 344, se seleccionan inform3ticamente los clones con mayor probabilidad de vincularse con el fragmento de AFLP de inter3s. Dicha etapa de selecci3n se basa en la comparaci3n de una o m3s bandas de los datos de la huella gen3tica. Cuanto mayor sea la correspondencia de las bandas que se encuentra en las huellas gen3ticas (las bandas se indican como #, ^ \$), mayor ser3 la probabilidad de que dichas huellas gen3ticas puedan formar un c3ntigo y, de este modo, alinear los clones individuales desde la genoteca para formar un c3ntigo. Los clones individuales que contienen un fragmento con una longitud de 344 pares de bases y que se seleccionan pas3ndose en un proceso inform3tico de los datos de las huellas gen3ticas se alinean utilizando FPC para formar un c3ntigo. Dicho c3ntigo puede posicionarse en el mapa gen3tico. Los fragmentos positivos falsos (es decir, que contienen el fragmento CCA/AT-344, pero que no est3n vinculados a los marcadores gen3ticos de inter3s) no formar3n un c3ntigo en las condiciones utilizadas. La repetic3n de dichas etapas para otros marcadores gen3ticos permite formar un mapa f3sico y gen3tico integrado.

40 Figura 2:

A: huellas gen3ticas *HindIII*+2/*MseI*+3 de mezclas de BAC de *Pristionchus pacificus* con los fragmentos de AFLP identificados previamente caracter3sticos de los marcadores gen3ticos que indican las flechas.

B: huellas gen3ticas *HindIII*+0/*MseI*+0 de BAC individuales de mezclas positivas correspondientes en la figura 2A e indicaci3n de las bandas de AFLP caracter3sticas (BAC1 y BAC2).

45 **C:** c3ntigo de BAC correspondiente *HindIII*+0/*MseI*+0 e identificaci3n de los clones BAC1 y BAC2.

Figura 3: representaci3n esquem3tica del procedimiento de integraci3n mapas f3sicos y gen3ticos, mediante el que se obtiene, para distintos marcadores gen3ticos, el v3nculo entre los clones BAC f3sicos y los marcadores gen3ticos correspondientes obteniendo las huellas gen3ticas de las mezclas de BAC y las huellas gen3ticas individuales con distintas combinaciones de enzimas de restricci3n en la obtenci3n de huellas gen3ticas de AFLP para los distintos marcadores gen3ticos. A, B y C son marcadores gen3ticos. RE1 y RE2 son distintas combinaciones de enzimas de restricci3n (por ejemplo *HindIII*/*MseI* y *EcoRI*/*MseI*). 1-8 son clones BAC.

Un marcador gen3tico A se ha vinculado a los clones f3sicos BAC 1 a 4 utilizando la combinaci3n enzim3tica RE1 en la obtenci3n de huellas gen3ticas mediante AFLP de los donadores originales, las mezclas de BAC y los BAC individuales seg3n el procedimiento de la presente invenci3n. El marcador gen3tico O se ha asignado a los clones BC 6, 9 y 10 con la misma combinaci3n enzim3tica RE1. Los marcadores gen3ticos T y C se han asignado de un modo similar a los clones BAC 2, 5, 8 y 1, 6, 7 respectivamente, utilizando la combinaci3n enzim3tica RE2. Bas3ndose en la presencia com3n de los clones BAC 1 y 2 en A y en B y C respectivamente, el marcador de la gen3tica A, identificado con una combinaci3n enzim3tica distinta que los marcadores gen3ticos B y C, pueden posicionarse ahora en el mapa integrado com3n. Bas3ndose en la presencia com3n del clon BAC 6 en O y C respectivamente, el marcador gen3tico T se puede posicionar adyacente al marcador gen3tico C en el mapa integrado, proporcionando de este modo un mapa integrado de los marcadores gen3ticos T, A, C y O que se han identificado utilizando distintas combinaciones enzim3ticas de AFLP.

65

EJEMPLOS

Construcción de genoteca de BAC

5 Se utilizó ADN con un peso molecular elevado del nematodo *Pristionchus pacificus* para construir una genoteca de BAC. El ADN *HindIII* parcialmente digerido de *Pristionchus pacificus* se separó mediante electroforesis en gel con campo pulsátil y se ligó al vector de plndigoBAC-536. Los productos ligados se sometieron a electroporación en células de *E. coli* DH10B electrocompetentes y se determinó el tamaño medio del inserto mediante electroforesis de inversión de campo en gel. La genoteca de BAC de *Pristionchus pacificus* contiene 13.500 clones con un tamaño medio de inserto > 125 kb. Se estima que la cobertura estimada del genoma de la genoteca es de por lo menos 7 x, asumiendo un tamaño total del genoma de *Pristionchus pacificus* de 200 Mb.

Agrupación de la genoteca de BAC

15 La agrupación de la genoteca de BAC se realizó agrupando placas individuales de 96 pocillos. Se inoculó cada placa de 96 pocillos en una placa de agar TY estándar con selección de cloranfenicol (12,5 mg/litro) y se incubaron durante la noche a 37 grados centígrados. Por la mañana, se volvieron a suspender las 96 colonias en 1 ml de medio líquido de TY y se recogieron en placas de agar. Se realizó un procedimiento miniprep estándar y se utilizó el ADN mezclado de BAC para la preparación de la plantilla de AFLP.

Preparación del ADN de BAC individuales y de mezclas de BAC

25 Se preparó ADN de BAC individuales según los procedimientos estándar (Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* («Clonación molecular: Manual de laboratorio»), Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989). Un cultivo de 1,5 ml durante la noche en medio TY y selección de cloranfenicol (12,5 mg/litro) generó suficiente ADN para la preparación de la plantilla de AFLP.

Análisis mediante AFLP de BAC individuales y de mezclas de BAC

30 Se prepararon plantillas de AFLP de ADN de BAC individuales, las mezclas de BAC y los dos donadores originales que se utilizaron en la población de la cartografía genética según los procedimientos estándar (Vos *et al. Nucleic Acids Research* (1995), 23, 4407-4414) utilizando *HindIII* y *MseI* como combinación enzimática.

35 Para la amplificación +0/+0 de los fragmentos de BAC individuales, no resultó necesaria una etapa de amplificación previa. La etapa de amplificación +0/+0 se realizó directamente sobre la plantilla diluida 1:10 del ADN de los BAC individuales. Se detectaron y se midieron los fragmentos +0/+0 amplificados en una plataforma de electroforesis capilar MegaBACE 1000.

40 Las reacciones de AFLP en las mezclas de BAC vinieron precedidas por amplificaciones previas +1/+1 con un nucleótido selectivo en cada cebador. Las reacciones de AFLP se realizaron con combinaciones de cebadores que presentaban 2 nucleótidos selectivos en el cebador *HindIII* y 3 nucleótidos selectivos en el cebador *MseI*.

45 Se detectaron y midieron los fragmentos amplificados de AFLP +2/+3 en la misma plataforma de electroforesis capilar MegaBACE 1000 como huellas genéticas +0/+0.

Cebadores del adaptador AFLP (5'-3')

Se utilizaron los siguientes cebadores para generar las huellas genéticas de los clones BAC

50	91M35:	cebador directo del adaptador <i>HindIII</i> (5'-3')	: CTCGTAGACTGCGTACC
	91M37:	cebador inverso del adaptador <i>HindIII</i> (5'-3')	: AGCTGGTACGCAGTCTAC
	92A18:	cebador directo del adaptador <i>MseI</i> (5'-3')	: GACGATGAGTCCTGAG
	92A19:	cebador directo del adaptador <i>MseI</i> (5'-3')	: TACTCAGGACTCAT

Secuencias del cebador no selectivo (5'-3')

55	93Q34:	cebador <i>HindIII</i> +0 (5'-3')	: GACTGCGTACCAGCTT
	93E40:	cebador <i>MseI</i> +0 (5'-3')	: GATGAGTCCTGAGTAA

Secuencias del cebador selectivo AFLP (5'-3')

60 Se etiquetaron los cebadores *HindIII* + 2 con FAM, JOE o NED para su detección en la plataforma MegaBACE.

Cebadores *HindIII* +2 (5'-3'):

Secuencia constante: GACTGCGTACCAGCTT

65 Nucleótidos selectivos:

AA	CA	GA	TA
AC	CC	GC	TC
AG	CG	GG	TG
AT	CT	GT	TT

Cebadores *MseI* +3 (5'-3'):

- 5 Secuencia constante: GATGAGTCCTGAGTAA
Nucleótidos selectivos:

AAA	TAA	CAA	GAA	AGA	TGA	CGA	GGA
AAC	TAC	CAC	GAC	AGC	TGC	CGC	GGC
AAT	TAT	CAT	GAT	AGT	TGT	CGT	GGT
AAG	TAG	CAG	GAG	AGG	TGG	CGG	GGG
ACA	TCA	CCA	GCA	ATA	TTA	CTA	GTA
ACC	TCC	CCC	GCC	ATC	TTC	CTC	GTC
ACT	TCT	CCT	GCT	ATT	TTT	CTT	GTT
ACG	TCG	CCG	GCG	ATG	TTG	CTG	GTG

Análisis con software

- 10 Se analizaron todas las trazas de MegaBACE mediante software de desarrollo interno y los conjuntos de datos resultantes de las huellas genéticas individuales *HindIII* +0 / *MseI* +0 se procesaron mediante el software de FPC (Soderlund *et al.*, véase anteriormente). Las huellas genéticas de AFPL de *HindIII* +2 / *MseI* +3 AFPL de los ADN de BAC agrupados y los donadores originales de la población de la cartografía genética se analizaron asimismo
15 mediante el software interno. El vínculo del fragmento *HindIII* +2 / *MseI* +3 fragmento con el fragmento *HindIII* +0 / *MseI* +0 en la huella genética del BAC individual correspondiente se realizó por medios informáticos buscando fragmentos de una longitud comparable dentro de un cierto margen de error. Los cóntigos se generaron con un parámetro de corte establecido en diversos valores entre 10^7 y 10^{14} y se analizaron los cóntigos resultantes. Se fijó
20 la tolerancia entre 2 y 4 (es decir, entre 0,2 y 0,4 pares de bases).

Resultados y conclusiones

- 25 Los marcadores genéticos se han vinculado a los cóntigos de BAC de un modo muy eficiente y se ha combinado una pluralidad de marcadores genéticos en un mapa físico y genético integrado. El concepto se puede aplicar a especies diferentes con distintos tamaños de genoma con éxito y sin conocimiento previo de la secuencia genómica específica. El procedimiento proporciona la integración efectiva de mapas físicos y genéticos y tendrá un impacto importante en el ámbito genómico.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 La presente lista de referencias citadas por el solicitante se presenta únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque la recopilación de las referencias se ha realizado muy cuidadosamente, no se pueden descartar errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- 10
- EP 0534858 A [0003] [0014]
 - US 6045994 A [0003]

Documentos que no corresponden a patentes citados en la descripción

- 15
- **Brenner et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1989, vol. 86, 8902-8906 [0002]
 - **Gregory et al.** *Genome Res.*, 1997, vol. 7, 1162-1168 [0002]
 - **Marra et al.** *Genome Res.*, 1997, vol. 7, 1072-1084 [0002]
 - **Vos et al.** *Nucleic Acids Research*, 1995, vol. 23, 4407-4414 [0003] [0014] [0053]
 - **Klein et al.** *Genome Research*, 2000, vol. 10, 798-807 [0015]
 - The Encyclopedia of Molecular Biology. Blackwell, 1994 [0029]
 - **Soderlund C. ; 1. Longden ; R. Mott.** FPC: a system for building contigs from restriction fingerprinted clones. *Comput. Applic. Biosci.*, 1997, vol. 13, 523-535 [0031]
 - **Sambrook, J. ; Fritsch, E.F. ; Maniatis, T.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, vol. 1, 2, 3 [0052]

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para proporcionar un mapa genético y físico integrado de un genoma o parte del mismo, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 (a) proporcionar por lo menos dos marcadores genéticos individuales para el genoma o parte del mismo, preferentemente en forma de mapa genético;
- (b) caracterizar cada uno de los marcadores genéticos mediante por lo menos un fragmento de la AFLP identificado mediante la obtención de huellas genéticas de AFLP;
- 10 (c) proporcionar una genoteca de clones que comprende fragmentos de genoma o parte del mismo, preferentemente una genoteca de cromosomas artificiales tales como un BAC o un YAC;
- (d) generar una pluralidad de mezclas, conteniendo cada mezcla una pluralidad de clones individuales de la genoteca;
- (e) generar una huella genética AFLP para cada una de las mezclas;
- 15 (f) identificar en la pluralidad de mezclas, la(s) mezcla(s) en las que se encuentra presente un fragmento de AFLP identificado en (b) en la huella genética de la mezcla;
- (g) generar una huella genética de AFLP para cada uno de los clones individuales de la(s) mezcla(s) identificada(s) en (f), e identificar el clon que comprende el fragmento de AFLP identificado en (b) en su huella genética de AFLP;
- 20 (h) generar un cóntigo que comprenda los clones individuales identificados en la etapa (g) basado en los datos de la obtención de huellas genéticas;
- (i) repetir las etapas (f) a (h) para por lo menos un segundo fragmento de AFLP identificado en (b) de tal modo que el segundo fragmento de AFLP o los fragmentos adicionales de AFLP caracterizan un segundo marcador genético o unos marcadores genéticos adicionales; y
- 25 (j) vincular por lo menos dos de los cóntigos obtenidos en (h), obteniendo de este modo una mapa físico y genético integrado del genoma o parte del mismo, que comprende por lo menos dos marcadores genéticos;
- en el que los pares cebadores de AFLP utilizados en las etapas (b) y (e) presentan una selectividad superior y los pares cebadores de AFLP pares en la etapa (g) presentan una selectividad inferior, comprendiendo cada cebador de AFLP una secuencia constante y una secuencia variable en el extremo 3' de su secuencia, comprendiendo dicha
- 30 secuencia constante una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con por lo menos una parte del adaptador adyacente al extremo 3' del fragmento de restricción para amplificarse y comprende además una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con los restos del sitio de restricción, comprendiendo dicha secuencia variable nucleótidos selectivos, siendo dichos nucleótidos selectivos complementarios a los nucleótidos del extremo 3' de los fragmentos de restricción ligados al adaptador que se encuentran adyacentes a la secuencia constante, en el que
- 35 los cebadores de AFLP de selectividad superior comprenden por lo menos un nucleótido selectivo más que los cebadores de AFLP de selectividad inferior, y en el que los cebadores de AFLP utilizados para caracterizar el marcador genético en la etapa (g) difieren de los cebadores de AFLP utilizados para obtener huellas genéticas de las mezclas en las etapas (b) y (e) únicamente en el número de nucleótidos selectivos.
- 40 2. Procedimiento según de reivindicación 1, en el que las etapas (a) a (g) se repiten para marcadores genéticos adicionales del genoma o parte del mismo y en el que los cóntigos obtenidos en (g) se alinean para obtener de este modo un mapa físico y genético integrado.
- 45 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la diferencia en el número total de nucleótidos selectivos que se utilizan en los cebadores de AFLP con selectividad inferior en comparación con los cebadores de AFLP con selectividad superior es por lo menos 2, más preferentemente por lo menos 3, más preferentemente por lo menos 4.
- 50 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el número combinado de nucleótidos selectivos utilizados en los cebadores de AFLP con selectividad baja, es por lo menos 0, preferentemente por lo menos 1, más preferentemente por lo menos 2, más preferentemente por lo menos 3.
- 55 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que cada mezcla contiene como máximo 0,6 equivalentes genómicos del genoma total a analizar, preferentemente 0,5, más preferentemente 0,4, más preferentemente 0,3.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además una etapa adicional de agrupación.
- 60 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se proporcionan los marcadores genéticos con una densidad de por lo menos un marcador genético por cada 100 kb.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en los cóntigos se alinean mediante un programa informático apto para realizar alineaciones.
- 65

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la genoteca de cromosomas artificiales contiene por lo menos 5 equivalentes genómicos.

5 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la genoteca de cromosomas artificiales contiene por lo menos 7 equivalentes genómicos.

10 11. Utilización de unos pares primero y segundo de cebadores de AFLP, comprendiendo dichos cebadores de AFLP una secuencia constante y una secuencia variable en el extremo 3' de su secuencia, comprendiendo dicha
15 secuencia constante una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con por lo menos una parte del adaptador adyacente al extremo 3' del fragmento de restricción para amplificarse y comprende además una secuencia de nucleótidos que se puede hibridar con los restos del sitio de restricción, comprendiendo dicha secuencia variable nucleótidos selectivos, siendo dichos nucleótidos selectivos complementarios a los nucleótidos del extremo 3' de los fragmentos de restricción ligados al adaptador que se encuentran adyacentes a la secuencia constante, en un procedimiento para vincular mapas genómicos genéticos y físicos en los que el primer par de cebadores de AFLP es de selectividad superior y el segundo par de cebadores de AFLP es de selectividad inferior, comprendiendo los cebadores de AFLP de selectividad superior por lo menos un nucleótido selectivo más que los cebadores de AFLP de selectividad inferior, y en el que los cebadores de AFLP de selectividad inferior difieren de los cebadores de AFLP de selectividad superior únicamente en el número de nucleótidos selectivos.

Fig 1

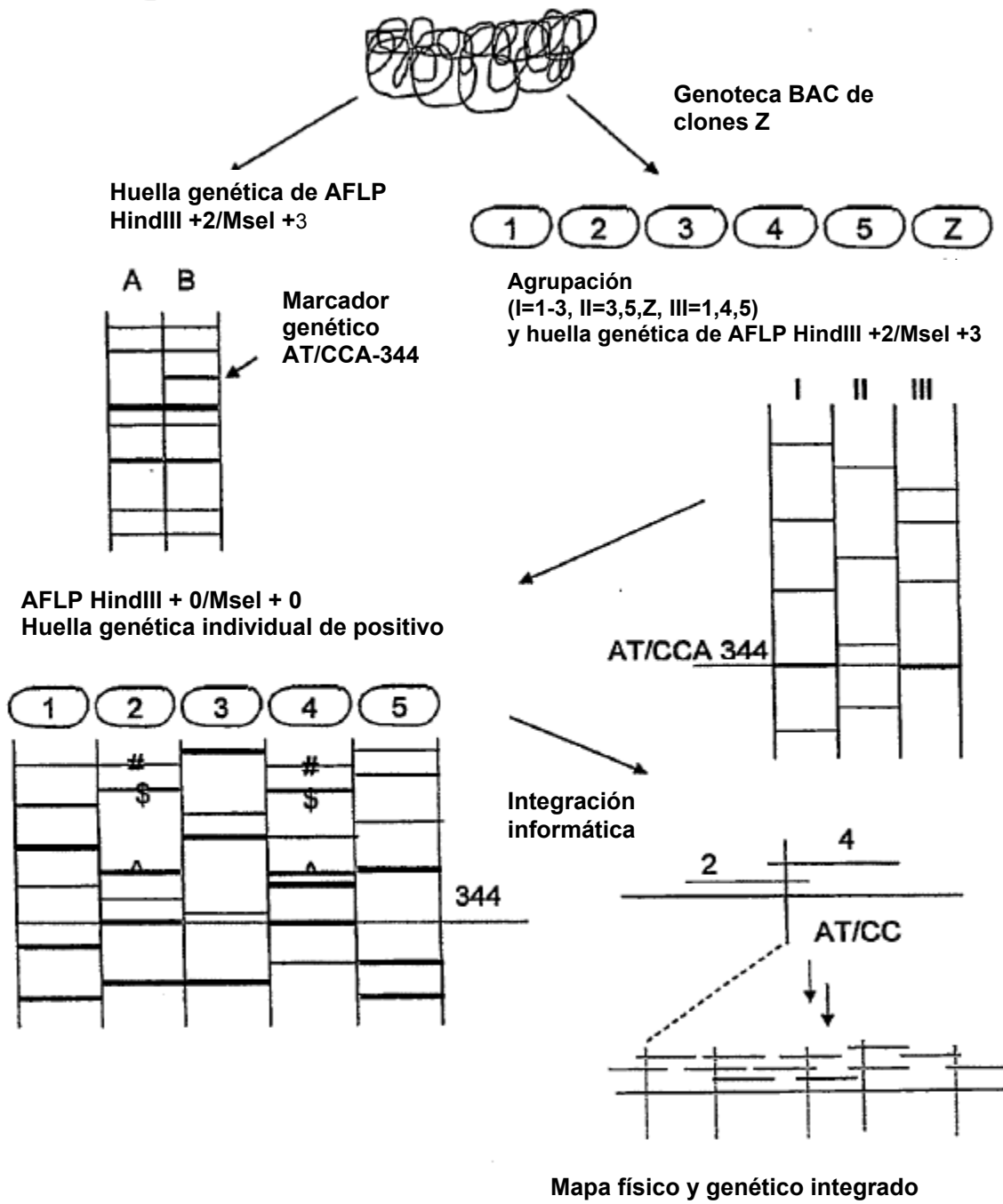


Fig 2

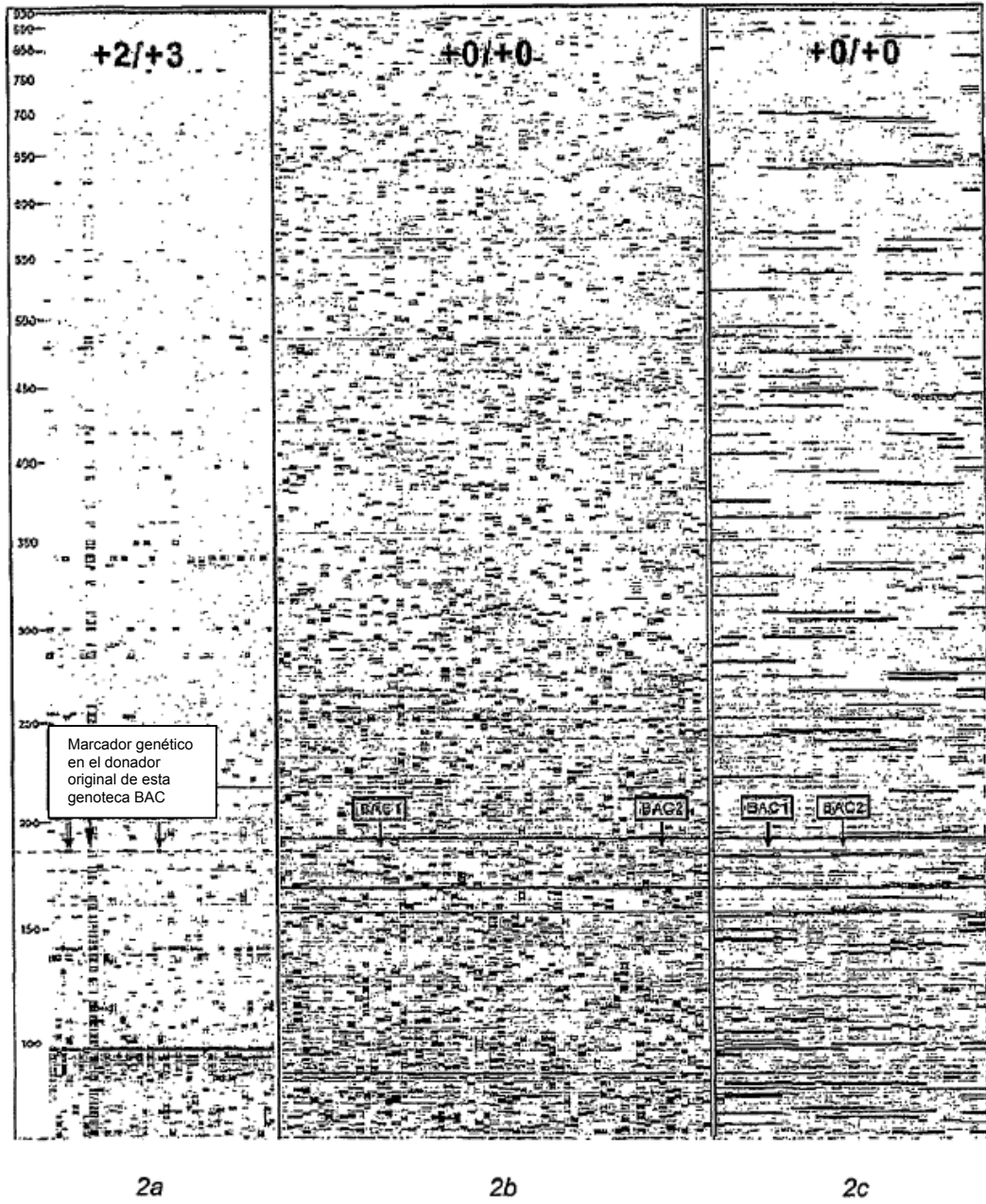


Fig 3

