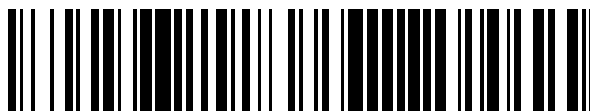


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 466 347**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2009** **E 09772874 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.04.2014** **EP 2294223**

54 Título: **Sonda para su utilización en el diagnóstico de porfiria y para la cuantificación alélica de genes relativos a la porfiria mediante reacciones de ligación y amplificación**

30 Prioridad:

30.06.2008 IT MI20081205

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

10.06.2014

73 Titular/es:

**FONDAZIONE IRCCS "CA' GRANDA - OSPEDALE
MAGGIORE POLICLINICO" (100.0%)
Via Francesco Sforza, 28
20122 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**DI PIERRO, ELENA;
CAPPELLINI, MARIA DOMENICA;
BESANA, VALERIA y
BRANCALEONI, VALENTINA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 466 347 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

Sonda para su utilización en el diagnóstico de porfiria y para la cuantificación alélica de genes relativos a la porfiria mediante reacciones de ligación y amplificación

5 La presente invención se refiere a sondas y a la utilización de dichas sondas en un método de diagnóstico y a un kit de diagnóstico para detectar la presencia de Porphiria, en particular para detectar la cantidad alélica de genes relativos a la Porphiria.

10 El término Porphiria incluye un grupo de siete enfermedades debidas a anomalías genéticas, a menudo relacionadas con un fenotipo clínico grave, que se derivan de defectos hereditarios que implican al menos una de las enzimas de la vía biosintética del hemo, un elemento reactivo de hemoproteínas celulares tales como, por ejemplo, hemoglobina, citocromos, peroxidase, etc. Las secuencias de los siete genes responsables de la Porphiria en el homo sapiens están disponibles en el banco de datos NCBI con los siguientes números de identificación (GeneID):

- aminolevulinato delta dehidratasa (ALAD) – 210;

- hidroximetilbilano sintasa (HMBS) – 3145;

- uroporfirinógeno sintasa (UROS) – 7390;

15 - uroporfirinógeno decarboxilasa (UROD) - 7389;

- coproporfirinógeno oxidasa (CPOX) – 1371;

- protoporfirinógeno oxidasa (PPOX) – 5498; y

- ferroquelatasa (FECH) – 2235.

20 Se sabe que dichos siete genes son responsables en el Homo sapiens de siete formas diferentes de Porphiria, que, en función de los síntomas clínicos, pueden ser clasificadas como agudas o crónicas.

25 La Porphiria aguda se manifiesta a través de varios síntomas que ocurren de manera aguda esporádicamente, inducidos por factores exógenos tales como infecciones intercurrentes, dietas de bajas calorías, ingestión de productos alcohólicos y fármacos con acción porfirinogénica (barbitúricos, sulfonamidas, anestésicos y anticonceptivos por vía oral), o por factores endógenos tales como, por ejemplo, estrés físico o químico y fluctuaciones de hormonas esteroideas gonadales (estrógenas y progesteronas) durante los periodos premenstruales y de embarazo. Los ataques tienen inicio principalmente con síntomas neurológicos que pueden manifestarse tanto en el sistema nervioso central como en el vegetativo-periférico.

30 La Porphiria crónica, por el contrario, está caracterizada por fotosensibilidad cutánea relacionada con la acumulación de precursores fotorreactivos principalmente en la epidermis, donde vienen excitados con facilidad por la luz dando lugar a radicales libres de oxígeno con consiguiente daño del tejido y una fuerte respuesta inflamatoria. Generalmente la fotosensibilidad está restringida a las superficies expuestas directamente a la luz solar (dorso de las manos, cuello, piernas y tobillos en las mujeres), especialmente si son sometidas a repetidos traumatismos o si están caracterizadas por una aumentada fragilidad de la piel. Sin embargo, a menudo los signos externos de daño cutáneo pueden no existir o pueden limitarse principalmente a edemas, eritemas y/o urticarias.

35 La tabla que sigue muestra la relación entre gen, tipo de Porphiria y síntomas clínicos:

Gen defectuoso	Porfiria	Síntomas clínicos
HMBS	Porfiria aguda intermitente (PAI)	Porfiria aguda
PPOX	Porfiria diversificada (PV)	Porfiria aguda
CPOX	Coproporfiria hereditaria (CPH)	Porfiria aguda
ALAD	Porfiria de deficiencia ALAD (PDA)	Porfiria aguda
UROD	Porfiria cutánea tardía (PCT)	Porfiria crónica
FECH	Protoporfiria eritropoiética (PPE)	Porfiria crónica
UROS	Porfiria eritropoiética congénita (PEC)	Porfiria crónica

Asimismo, se sabe que mutaciones especiales de los siete genes antes mencionados pueden implicar genes adyacentes o regiones intergénicas flanqueantes. Por lo tanto, han sido seleccionadas las correspondientes siete regiones cromosómicas incluyendo el gen implicado y los genes flanqueantes. En un primer momento, dichas

regiones han sido seleccionadas de modo que las mismas incluyeran al menos un gen antes y un gen después del gen implicado, para luego extenderlas en base a la densidad génica del locus. En el ámbito de la presente invención, dichas regiones cromosómicas, listadas abajo, vienen incorporadas en la definición del mismo gen:

gen ALAD: NC_000009:115174000-115213000 (complemento inverso)

5 gen HMBS: NC_000011:118442000-118494000

gen UROS: NC_000010:127443000-127533000 (complemento inverso)

gen UROD: NC_000001:45225000-45320000

gen CPOX: NC_000003: 99733000-99863000 (complemento inverso)

gen PPOX: NC_000001:159334500-159451000

10 gen FECH: NC_000018:53290000-53442000 (complemento inverso).

La preponderancia de Porfiria no puede ser establecida de manera definitiva; sobre todo porque a menudo falta el diagnóstico. En general, se cree que esas enfermedades tienen baja frecuencia, con preponderancia de las distintas formas variables de una raza a otra y también de una zona geográfica a otra. En Europa hay aproximadamente 75.000 pacientes que padecen Porfiria aguda, pero es posible encontrar una gran preponderancia en algunas zonas geográficas. Dos ejemplos son Escocia, donde un paciente cada 50.000 padece de una forma de Porfiria, con preponderancia de PAI (Porfiria aguda intermitente, en inglés Intermittent Acute Porphyria IAP) y PCT (Porfiria cutánea tardía, en inglés Porphyria Cutanea Tarda), y Sudáfrica, donde la forma preponderante es la PV (Porfiria Variegada, en inglés Variegate Porphyria), con una incidencia de uno cada 1.000 personas entre la población blanca.

20 En nuestros días, el diagnóstico de la Porfiria no es sencillo debido a la analogía del cuadro clínico con otras enfermedades de origen diferente. Asimismo, las enfermedades relacionadas con la Porfiria son clasificadas como raras y la falta de instrumentos de diagnóstico fáciles de usar a menudo es motivo de errores de diagnóstico.

En efecto, actualmente el diagnóstico se basa principalmente en la identificación de una elevada concentración de productos intermedios de la vía biosintética (porfirinas libres) en eritrocitos, plasma, orinas y heces, que no es siempre posible en todas las estructuras clínicas y que no es totalmente fiable debido a las fluctuaciones fisiológicas que sufren esos metabolitos.

Por otro lado, la determinación de la actividad enzimática eritrocitaria de las enzimas individuales puede ser llevada a cabo únicamente con algunas de ellas. Donde fuera posible, tal determinación no es totalmente fiable debido a la superposición entre el intervalo de valores normales y valores patológicos.

30 Actualmente la identificación de anomalías genéticas fundamento de las diferentes formas de Porfiria utiliza un protocolo de diagnóstico, compuesto por una reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (en inglés, PCR = Polymerase Chain Reaction) y una secuenciación automática, que principalmente describe mutaciones puntiformes o pequeñas supresiones – inserciones en las regiones codificantes y en las zonas de unión de los genes implicados. Esos tipos de defectos genéticos confirman el diagnóstico sólo en el 80% de los pacientes con síntomas clínicos y bioquímicos que pueden ser relacionados con la Porfiria. El restante 20%, que por lo tanto no viene diagnosticado, recientes evidencias sugieren, como causa de la Porfiria, la presencia de reorganizaciones cromosómicas (supresiones y duplicaciones). Dichos defectos no pueden ser identificados con el protocolo estándar de análisis.

Actualmente, la identificación de esas mutaciones particulares viene llevada a cabo a través de dos aproximaciones, las cuales son caras y demandan mucho tiempo.

40 La primera aproximación es el estudio sobre la “segregación familiar de polimorfismos conocidos”. Dicha aproximación requiere, obligatoriamente, los padres biológicos del paciente y, en caso de defecto de identificación, la presencia de polimorfismos con una frecuencia significativa en la población. Además, dicha aproximación no es bastante decisiva puesto que la presencia de dichos polimorfismos podría no ser suficiente para demostrar la carencia de segregación mendeliana, que es absolutamente necesaria para el diagnóstico de supresiones génicas. De todos modos, con dicha aproximación no es posible identificar las duplicaciones.

La segunda aproximación es la denominada “dosis génica”, un método de cuantificación relativa de amplicones correspondientes al gen implicado. Dicha aproximación utiliza varios pares de cebadores con un elevado riesgo de formación de dímeros. Asimismo, la diferente eficacia de asociación (annealing) de los distintos pares de cebadores perjudica la reacción de amplificación, puesto que las dianas más cortas son favorecidas termodinámicamente y su competición reduce la fiabilidad del ensayo de cuantificación relativa. Finalmente, no todas las regiones implicadas pueden ser amplificadas siempre al mismo tiempo, por ende podría ser necesario llevar a cabo más de una reacción de amplificación. Las condiciones de RCP de los fragmentos individuales pueden ser efectivamente diferentes y la cantidad de amplicones en la RCP Múltiplex, de todos modos, es reducida.

Whatley et al., 2007 ("Gene dosage analysis identifies large deletions of the FECH gene in 10% of families with erythropoietic protoporphyria", en castellano "El análisis por dosis génica identifica grandes supresiones del gen de FECH en el 10% de las familias con protoporfiria eritropoiética" Journal of Investigative Dermatology, vol. 127, n. 12, páginas 2.790-2.794) da a conocer cebadores oligonucleótidos adecuados para un análisis cuantitativo de la RCP de dosis génica del gen FECH, asociados a Protoporfiria eritropoiética.

Estudios similares de alteraciones genéticas en el gen de FECH que usan oligonucleótidos se hallan en Di Pierro et al., 2007 ("Co-existence of two functional mutations on the same allele of the human ferrochelatase gene in erythropoietic protoporphyria", en castellano "Coexistencia de dos mutaciones funcionales en el mismo alelo de gen humano de ferroquelatasa en proporfiria eritropoiética" Clinical Genetics, vol. 71, n. 1, páginas 84-88) o Aurizi et al., 2007 ("Heterogeneity of mutations in the ferrochelatase gene in Italian patients with erithropoietic protoporphyria", en castellano "Heterogeneidad de mutaciones en el gen de ferroquelatasa en pacientes italianos con protoporfiria eritropoiética" Molecular Genetics and Metabolism, vol. 90, n.4, páginas 402-407).

Sorprendentemente la parte Solicitante ha hallado que los problemas mencionados con anterioridad concernientes al diagnóstico de Porfiria pueden ser solucionados utilizando pares específicos de sondas en reacciones de ligación, en presencia de al menos una enzima ligasa y subsiguiente amplificación RCP dependiente de la ligación.

Las reacciones de amplificación RCP dependiente de la ligación son conocidas en el sector como MLPA (del inglés Multiplex Ligation dependent Probe Amplification, en castellano amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación), en particular cuando se realizan varias reacciones. Cada uno de los pares de sondas incluye una diferente secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia antisentido humana (secuencia hibridizante) y, en los terminales de dicha secuencia una secuencia fija nucleotídica no humana (etiqueta o tag). La amplificación a través de la reacción RCP sucede únicamente si el par de sondas reconoce la secuencia diana de tipo nativo (type-wild) y las dos sondas vienen dispuestas una adyacente a la otra de modo de ser enlazadas. La presencia de la ligasa permite que el enlace de las sondas pueda crear una secuencia única a ser amplificada mediante RCP usando cebadores en acoplamiento con secuencias de tags.

En función de la estructura de las sondas originales y del resultado de la amplificación de las reacciones RCP, un técnico experto está en condiciones de entender de que manera una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo un gen, puede presentar diferentes resultados con respecto a la secuencia de tipo nativo.

El resultado de la reacción RCP permite una cuantificación relativa de los genes implicados en la Porfiria, con una elevada sensibilidad y reproducibilidad.

La presente invención viene dada a conocer a través de la descripción detallada que sigue y más adelante gracias a las figuras anexas.

La figura 1 muestra esquemáticamente pares específicos de sondas según la presente invención (sonda L y sonda R, en la cual el terminal 5' es fosforilato) y cómo esos se hibridizan a la secuencia de ADN específica (ADN diana) (1); su ligación en presencia del ADN diana (2); productos amplificados que se derivan de la reacción RCP (3), y cómo la electroforesis capilar permite obtener resultados con relevancia diagnóstica (4) (para mayor información, ver el Ejemplo 1). Como puede observarse, los tags presentes en las sondas, denominados tag F y tag R, siguen estando en los productos amplificados que se derivan de la amplificación de la sonda enlazada.

La figura 2 presenta un ejemplo de picos obtenidos por electroforesis capilar de los productos de amplificación de la reacción RCP (productos amplificados) sobre ADN de una muestra de conformidad con el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Nótese que hay 27 picos y 3 de los 27 picos representan sondas de control interno utilizadas para normalizar los resultados de otros picos. Esos picos vienen denominados con el nombre de gen al cual le corresponden las sondas de control interno.

La figura 3 muestra los resultados del método de diagnóstico para detectar el estado del gen FECH, esquemáticamente y después de la normalización con tres controles internos, de varios pacientes (ver el Ejemplo 1). CTRL 1, 2 y 3 representan algunos sujetos sanos sobre los cuales han sido calibrados los demás (control externo). Nótese que los pacientes 55 y 400 no exhiben anomalías con respecto a los testigos (controles), mientras que los pacientes 399, 744 y 909 presentan anomalías en el gen FECH.

La figura 4 muestra los resultados del método de diagnóstico para detectar el estado del gen HMBS, esquemáticamente y después de la normalización con tres controles internos de varios pacientes (ver el Ejemplo 2). CTRL 1, 2 y 3 representan algunos sujetos sanos sobre los cuales han sido calibrados los demás resultados (control externo). Los pacientes 543 y 827 no presentan anomalías con respecto a los testigos (controles), mientras que los pacientes 496, 526 y 642 presentan anomalías en el gen HMBS.

Un primer objetivo de la presente invención, por lo tanto, es el de una asociación de sondas que comprende un grupo de sondas que tienen en un terminal de la secuencia un tag y en el otro terminal una secuencia que hibridiza a por lo menos una parte de la secuencia del gen FECH, dichas secuencias hibridizantes siendo SEQ ID NOs 1-24 y un grupo de sondas que tiene en un terminal de la secuencia un tag y en el otro terminal una secuencia que hibridiza

a por lo menos una parte de la secuencia del gen FECH, dichas secuencias hibridizantes siendo SEQ ID NOs 142-165.

Un segundo objetivo de la presente invención es el de un método para determinar la presencia de Protoporfiria eritropoiética en una muestra de tejido biológico que incluye las siguientes etapas operativas:

5 (i) extracción de ácido nucleico de una muestra;

(ii) introducción de la asociación de sondas dentro del ácido nucleico extraído según la etapa operativa (i), y reacción en presencia de al menos una enzima ligasa en al menos una reacción de ligación;

(iii) ejecución de al menos una reacción de amplificación en las sondas obtenidas a partir de la etapa operativa (ii), y

10 (iv) determinación de la presencia y de la cantidad de secuencias nucleotídicas que se derivan de la ligación y la amplificación.

Un tercer objetivo de la presente invención es el de un kit para diagnosticar Protoporfiria eritropoiética que incluye por lo menos un compartimiento que contiene en su interior los reactivos para llevar a cabo al menos una ligación y al menos una reacción RCP, y por lo menos un compartimiento que contiene la asociación de las sondas.

El ácido nucleico extraído en la etapa operativa (i) preferentemente es ADN.

15 Un técnico experto puede seleccionar un método adecuado entre los métodos conocidos en el sector para extraer ácido nucleico de la muestra. Preferentemente, es posible utilizar un kit disponible en el comercio, tal como, por ejemplo, Puregene de Qiagen.

En el método según el presente descubrimiento, la muestra utilizada en la etapa operativa (i) puede ser tomada de cualquier tipo de tejido biológico humano. Preferentemente, el tejido biológico humano es sangre periférica.

20 Cada uno de los pares de sondas mencionados en la etapa operativa (ii) tiene una secuencia hibridizante especialmente para una secuencia nucleotídica diana y un tag F o un tag R en los terminales de dicha sonda (en los terminales 5' o 3', respectivamente; ver la figura 1).

Dichas secuencias hibridizantes vienen elegidas de manera que los pares de sondas se ubiquen adyacentes entre sí en una parte de las secuencias de los siete genes de la vía biosintética del hemo de modo de ser enlazados mediante una ligasa, como puede verse en la figura 1.

25 Los pares pueden ser diseñados por un técnico experto seleccionando un método apropiado entre los métodos conocidos en el sector para diseñar secuencias nucleotídicas específicas. Preferentemente, la sonda del par en la posición 3' es fosforilata. Aún más preferiblemente, las sondas según el presente descubrimiento presentan las siguientes propiedades:

30 - la temperatura de fusión de la secuencia hibridizante es mayor o igual que 67,5°C, y

- el contenido de pares GC (par de bases guanina-citosina) de la secuencia hibridizante es del 30 al 63%, y

- deltaG (termodinámica del plegado) de toda la sonda es mayor o igual que cero a una temperatura de 60°C con una concentración de Na⁺ de 0,35 M, y

- al menos una C o G adyacente al tag (5' y 3' respectivamente), y

35 - máx. 4 bases G y/o C adyacentes al tag.

Preferentemente, las secuencias hibridizantes vienen elegidas entre las secuencias que comprenden SEQ ID NOs 1-282.

40 En el ámbito de la presente invención, las secuencias vienen diseñadas de conformidad con las Normas Internacionales WIPO ST.25 y su descripción ha sido desarrollada con el software Patent-In 3.5. La descripción de las secuencias mencionadas en la presente invención está adjuntada al presente documento.

Preferentemente, las sondas son ADN.

Un técnico experto puede elegir apropiadamente entre reactivos, métodos, protocolos y tags conocidos en el sector para realizar e inferir datos a partir de una reacción de amplificación conocida en el sector como MLPA y como se ha expuesto arriba.

45 Preferentemente, las sondas de conformidad con el descubrimiento pueden ser subdivididas en dos grupos:

Sondas L, donde la sonda tiene un tag en el terminal 5' de la secuencia nucleotídica y en el otro terminal una secuencia nucleotídica hibridizante según se ha descrito con anterioridad y como se puede apreciar en la figura 1. Preferentemente, la secuencia hibridizante de la sonda L posee un máximo de dos nucleótidos GC en el terminal 3'. Aún más preferentemente, la secuencia hibridizante viene elegida entre la SEQ ID NOs de 1 a 141.

5 Preferentemente, las sondas L se componen de una secuencia seleccionada entre las SEQ ID NOs de 1 a 141 y un tag F en el terminal 5' de dicha secuencia. Preferentemente, el tag F para sondas L es SEQ ID NO 283.

Sondas R, donde la sonda tiene un tag R en el terminal 3' de la secuencia nucleotídica y en el otro terminal una secuencia nucleotídica hibridizante según se ha descrito con anterioridad, fosforilata en el terminal 5' y en la posición 3' con respecto a la sonda L y de modo de ser enlazada a una ligasa, como puede apreciarse en la figura 1.

10 Preferentemente, la secuencia hibridizante en la posición 3' con respecto a la sonda L de modo de ser enlazadas mediante una ligasa viene elegida entre SEQ ID NOs de 142 a 282. Preferentemente, las sondas R se componen de una secuencia seleccionada entre SEQ ID NOs de 142 a 282 y un tag R en el terminal 3' de dicha secuencia. Preferentemente, el tag para sondas R es SEQ ID NO 284.

Preferentemente, las secuencias de las sondas L y R se componen de SEQ ID NOs 1-282 y tags SEQ ID NOs 283-284 como se ha indicado arriba, porque de este modo es posible minimizar la longitud total de las sondas L y R, respectivamente. Una longitud minimizada de las sondas permite su síntesis química, en lugar de usar métodos más caros, sin menoscabar la idoneidad de dichas sondas en el método según la presente invención.

En la etapa operativa (ii) del método según este descubrimiento hay al menos un par de sondas específicas. Dicho al menos un par específico es un par de al menos una sonda L y al menos una sonda R como se ha dicho con anterioridad. Preferentemente, la sonda L presenta la secuencia hibridizante SEQ ID NO n en el terminal 3' de la secuencia nucleotídica, donde n es un número entero comprendido entre 1 y 141, y la sonda R presenta la secuencia hibridizante SEQ ID NO m en el terminal 5' de la secuencia nucleotídica, donde m es igual a n+141.

En la etapa operativa (iii), para llevar a cabo la por lo menos una amplificación, un técnico experto puede elegir apropiadamente entre todos los protocolos y los métodos conocidos en el sector. Preferentemente, al menos una amplificación es al menos una reacción RCP, más preferentemente de conformidad con un protocolo MLPA. Preferiblemente, en la por lo menos una reacción RCP, los cebadores F y R vienen introducidos en acoplamiento con todos los tags F y R, respectivamente, presentes en las sondas agregadas en la etapa operativa (ii). En particular, el cebador F es el cebador directo (es decir, correspondiente al tag F), mientras que el cebador R es el cebador inverso (por lo tanto complementario al tag R).

La etapa operativa (iv) comprende la determinación de la presencia y la cantidad relativa de ácido nucleico resultante de la ligación y amplificación obtenidas en las etapas operativas (ii) y (iii). La presencia puede ser determinada con métodos conocidos en el sector para dividir secuencias de ácido nucleico en función de su longitud, tal como, por ejemplo, mediante un protocolo de electroforesis capilar. Un técnico experto, conociendo la longitud del par de sondas iniciales y su posición hibridizante en el ADN, está en condiciones de calcular la longitud del producto amplificado resultante. Dicho técnico experto, luego, puede controlar si el producto amplificado resulta ser de esa longitud o no. La reducción o el aumento del producto amplificado resultante indica que se tiene una anomalía en el ácido nucleico extraído en la etapa operativa (i) en la posición en la cual se hibridiza una de las sondas responsable de dicho producto amplificado en ambos alelos.

En una ejecución preferente del método según la presente invención según se ha descrito arriba, el cebador F o el cebador R viene marcado adecuadamente en un terminal. Preferentemente, el cebador marcado es el cebador F marcado en el terminal 5'. El cebador marcado sigue siendo adecuado para el método según la presente invención y permite, en la etapa operativa (iv), reconocer la secuencia por medio del marcador. El marcador puede ser seleccionado apropiadamente entre marcadores conocidos en el sector, tales como por ejemplo átomos radiactivos, fluorocromos o anticuerpos adicionalmente marcados, también en función del método de determinación empleado en la etapa operativa (iv), de la presencia y de la cantidad de secuencias de ácidos nucleicos que se derivan de la ligación y de la amplificación. En una ejecución preferente, el marcador enlazado al cebador es un fluorocromo, tal como, por ejemplo, FAM (6-carboxifluoroscina) o HEX. En dicha ejecución, la presencia y la cantidad de los productos amplificados resultantes de la etapa operativa (iii) pueden ser medidas a través de electroforesis capilar con un secuenciador disponible en el mercado, tal como, por ejemplo, Abi Prism 310. Los picos resultantes se refieren a la presencia y a la cantidad de los productos amplificados resultantes.

Los ejemplos 1 y 2 describen en detalles ejecuciones ejemplificadoras y, por ende, para nada restrictivas del método según la presente invención.

La cantidad del producto amplificado resultante puede ser la misma, aproximadamente la mitad o aproximadamente el doble con respecto a los demás productos amplificados resultantes de la misma reacción y/o con respecto a un producto amplificado resultante del uso de las mismas sondas en el ADN de tipo nativo (control externo). Si la cantidad del producto amplificado es aproximadamente la mitad, entonces debe suponerse que hay una anomalía en una copia del gen, en particular una anomalía en uno de los alelos y no en el otro. Si la cantidad de producto amplificado es aproximadamente el doble, entonces debe suponerse que hay una anomalía de genotipo

caracterizada por una mutación por duplicación de ambas copias del gen o por una mutación por triplicación de una sola copia del gen.

En una ejecución preferente del método según la presente invención, en la etapa operativa (ii) se introduce al menos un par de sondas para control interno, preferentemente junto con dicho al menos un par de sondas. Los pares de sondas para control interno vienen preparados de manera similar al par de sondas L y R de conformidad con la presente invención según se ha descrito con anterioridad, la única diferencia siendo la que dichos pares para control interno tienen secuencias hibridizantes para porciones de genes que se conocen como no implicadas en enfermedades genéticas humanas. Preferentemente, las secuencias hibridizantes en las sondas para control interno vienen seleccionadas entre los pares SEQ ID NOs 285-286, 287-288 y 289-290. La utilización de dichas sondas para control interno es ventajosa puesto que permite determinar si la reacción RCP ocurrió correctamente y/o permite normalizar la cantidad de un producto amplificado, que representa la cantidad de diploides (2n). El par SEQ ID NOs 285-286 corresponde a una parte del gen ILKAP, que codifica para una fosfatasa conocida por tener una función en la regulación de las señales intra y/o intercelulares. El par SEQ ID NOs 287-288 corresponde a una parte del gen DACH, que codifica para una proteína conocida por jugar un determinado papel en el desarrollo de varios organismos. El par SEQ ID NOs 289-290 corresponde a una parte del gen DEFB129, que codifica para una proteína conocida por jugar un papel determinado en el sistema inmunitario. Es aún más ventajoso usar los tres pares de control puesto que los tres productos amplificados son de diferentes longitudes y permiten normalizar productos amplificados de diferentes longitudes. Los productos amplificados resultantes de pares de sondas que contienen las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs 285-286, 287-288 y 289-290 tienen una longitud de 132 nucleótidos, 118 nucleótidos y 80 nucleótidos, respectivamente.

En una ejecución preferente del método según el presente descubrimiento, dicha al menos una reacción de ligación y amplificación de las etapas operativas (ii) y (iii) viene seleccionada entre siete posibles reacciones, donde en cada reacción al menos un par específico de sondas reacciona con uno de los siete genes de la vía biosintética del hemo responsable de la Porfiria.

Preferentemente, los pares específicos de sondas en cada una de las siete posibles reacciones pueden ser seleccionados a partir de los siguientes grupos para las reacciones de ligación-RCP:

- reacción de ligación-RCP 1 = par de sondas en las cuales una sonda tiene la secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 1 y 24, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEQ ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen FECH.

- reacción de ligación-RCP 2 = par de sondas en las cuales una sonda tiene una secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 25 y 47, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEQ ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen HMBS.

- reacción de ligación-RCP 3 = par de sondas en las cuales una sonda tiene una secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 48 y 71, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEQ ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen PPOX.

- reacción de ligación-RCP 4 = par de sondas en las cuales una sonda tiene una secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 72 y 87, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEQ ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen CPOX.

- reacción de ligación-RCP 5 = par de sondas en las cuales una sonda tiene una secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 88 y 105, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEQ ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen UROD.

- reacción de ligación-RCP 6 = par de sondas en las cuales una sonda tiene una secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 106 y 125, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEQ ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen UROS.

- reacción de ligación-RCP 7 = par de sondas en las cuales una sonda tiene una secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 126 y 141, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEQ ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen ALAD.

Por consiguiente, la elección de cuáles reacciones, y en cuál secuencia, se tienen que realizar para obtener un diagnóstico preciso se basa substancialmente en los resultados dados por las pruebas bioquímicas y/o en el estudio clínico llevados a cabo con anterioridad sobre el paciente.

5 En una ejecución aún más preferente, las siete posibles reacciones de ligación-RCP, como se ha listado arriba, incluyen asociaciones de sondas que comprenden todas las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs 1-282 divididas en siete asociaciones separadas para las siete reacciones de ligación-RCP siguiendo la precedente distribución. Por lo tanto,

10 la asociación para la reacción de ligación-RCP 1 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 1 a 24 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 142 a 165,

la asociación para la reacción de ligación-RCP 2 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 25 a 47 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 166 a 188,

15 la asociación para la reacción de ligación-RCP 3 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 48 a 71 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 189 a 212,

la asociación para la reacción de ligación-RCP 4 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 72 a 87 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 213 a 228,

20 la asociación para la reacción de ligación-RCP 5 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 88 a 105 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 229 a 246,

25 la asociación para la reacción de ligación-RCP 6 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 106 a 125 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 247 a 266, y

la asociación para la reacción de ligación-RCP 7 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 126 a 141 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEQ ID NOs de 267 a 282.

30 Más preferentemente, las secuencias nucleotídicas de las sondas se componen de una secuencia de ácido nucleico elegida entre secuencias SEQ ID NOs 1-282 como se acaba de describir, y un tag SEQ ID NOs 283 o 284 si las sondas son L o R, respectivamente.

35 La ventaja de usar dichas asociaciones de sondas es que cada secuencia resultante de la amplificación varía en longitud total de 80-132 nucleótidos y difiere en longitud con respecto a otras secuencias de la misma asociación (es decir, para la misma reacción RCP) de al menos 2 nucleótidos. Ventajosamente, esto permite usar hasta 27 pares de sondas con el mismo marcador en una única reacción de ligación-RCP y estar en condiciones de discriminar entre los resultados de los 27 pares de sondas (que corresponden a un área específica de un gen).

A partir de los resultados obtenidos en la etapa operativa (iv) un técnico experto puede inferir, con una precisión de 80-132 nucleótidos, la ubicación de una anomalía o una diferencia alélica en uno o varios de los siete genes implicados en la etiología de la Porfiria.

40 En el caso que se deban efectuar varias reacciones de ligación-RCP, las mismas pueden ser llevadas a cabo en probetas separadas, simultánea o secuencialmente.

45 Para reducir las reacciones de ligación-RCP, antes de comenzar con el método descrito con anterioridad conviene determinar si el paciente padece de anomalías génicas por Porfiria aguda o crónica haciendo uso de los métodos conocidos en el sector. Si el paciente exhibe anomalías génicas por Porfiria aguda, entonces se utilizan las asociaciones para las reacciones de ligación-RCP 2, 3, 4 y 7; mientras que si el paciente exhibe anomalías génicas por Porfiria crónica, entonces se utilizan las asociaciones para las reacciones de ligación-RCP 1, 5 y 6. En base al análisis de las manifestaciones clínicas y bioquímicas del tipo de Porfiria que el paciente padece, en algunos casos el método puede ser restringido a la utilización de únicamente una asociación, relacionada con el tipo de enfermedad de Porfiria a diagnosticar.

50 En otra ejecución del método según la presente invención, se utilizan dos o más asociaciones de sondas para las reacciones de ligación-RCP, seleccionadas de 1 a 7 como se ha descrito arriba, en una única reacción de ligación-RCP usando diferentes tags F y R en las sondas pertenecientes a las dos o más asociaciones de sondas. Los diferentes tags empleados son específicos para una de las dos o más asociaciones y diferentes marcadores vienen enlazados al grupo de cebadores presentes en la reacción RCP de la etapa operativa (iii). Utilizando marcadores

específicos asociados a cebadores en acoplamiento a los diferentes tags F y R, el mismo puede ser discriminado entre las diferentes asociaciones, o sondas, obteniendo de esta manera más resultados de una sola reacción de ligación-RCP en las etapas operativas (ii) y (iii).

5 Otro objetivo del presente descubrimiento incluye sondas que tienen un tag en un terminal de las secuencias y en el otro terminal una secuencia que se hibridiza a por lo menos parte de las secuencias de los siete genes de la vía biosintética del hemo implicada en la etiología de la Porfiria. Preferentemente, las sondas están provistas de las propiedades en sus secuencias como se ha mencionado arriba. Preferiblemente, la secuencia hibridizante viene elegida entre SEQ ID NOs 1-282. Aún más preferiblemente, la secuencia de tags viene elegida entre SEQ ID NOs 283 y 284.

10 Otro objetivo del presente descubrimiento incluye asociaciones de sondas que tienen secuencias nucleotídicas según se ha dado a conocer con anterioridad.

Para las ejecuciones preferentes, ver las reivindicaciones anexas.

15 Otro objetivo del presente descubrimiento es un kit de diagnóstico que comprende al menos un compartimiento que contiene en su interior los reactivos para efectuar la por lo menos una ligación de la etapa operativa (ii) y la por lo menos una amplificación de la etapa operativa (iii), y al menos un compartimiento que contiene en su interior las sondas a usar para al menos una de las siete asociaciones para las reacciones de ligación-RCP 1-7, como ya se ha descrito con anterioridad. Preferiblemente hay siete compartimientos que contienen las sondas, cada uno de ellos incluyendo una de las siete asociaciones para reacciones de ligación-RCP 1-7, como se ha descrito con anterioridad. Preferiblemente, el kit de diagnóstico comprende al menos un par de sondas para control interno, preferentemente sondas que incluyen SEQ ID NOs 285-290, como se ha descrito con anterioridad.

Ejemplo 1 – Diagnóstico de la presencia de anomalías relacionadas con la Porfiria en el gen FECH

Se llevó a cabo un análisis sobre 30 sujetos, de los cuales 15 sanos y 15 con síntomas clínicos que pueden ser relacionados con la Porfiria. De cada persona se ha tomado una muestra de 7 ml de sangre periférico en EDTA. La muestra fue centrifugada a 3.000 RPM por 10 minutos a 4°C. Después de quitar el plasma se ha agregado una solución fisiológica, después de lo cual se han mezclado todos los componentes. Posteriormente se ha centrifugado a 3.000 RPM por un lapso de tiempo de 10 minutos a 4°C y después de extraer la solución fisiológica, se ha tomado 150 µl de placa leucocitaria (linfocitos). Se ha extraído ADN con el kit Puregene – Gentra (QUIAGEN) agregando a la muestra 450 µl de RBC Lysis Solution 1 y agitando por 10 minutos a temperatura ambiente (RT). Luego fue centrifugado a 14.000 RPM por un lapso de tiempo de 1 minuto a temperatura ambiente, se quitó el sobrenadante y volvió a suspender la pílora. Se agregaron 450 µl de Cell Lysis Solution 2 y se volvió a suspender la pílora. Se agregaron 150 µl de Protein Precipitation Solution 3 y se movió en remolino por un lapso de tiempo de 20 segundos. Después de la centrifugación a 14.000 RPM por 3 minutos a temperatura ambiente se recuperó el sobrenadante. Se agregó isopropanol al 100% v/v. Se centrifugó a 14.000 RPM por un lapso de tiempo de 1 minuto y después de quitar el sobrenadante, se agregaron 300 µl de etanol al 70%. Se centrifugó a 14.000 RPM por un lapso de tiempo de 1 minuto a temperatura ambiente y después de quitar el sobrenadante y secar la pílora con Speed Vacuum por un lapso de tiempo de 2 minutos, se volvió a suspender la pílora en 100 µl de TE (Tris-HCl 10Mm y EDTA 1mM). Luego, se diluyó el ADN a una concentración final de 20 ng/µl en TE.

Las secuencias de las sondas y de los cebadores fueron obtenidas mediante síntesis química.

40 Se preparó la mezcla de pares de sondas para el gen FECH uniendo 2,4 µl de cada sonda (sondas L: SEQ ID NO 283 + SEQ ID NOs 1-24 y sondas R: SEQ ID NOs 142-165 + SEQ ID NO 284) con una concentración de 1 pmol/µl. (FECH Probe Mix). También fueron agregados a la mezcla los 3 pares de sondas de los genes de control (sondas L: SEQ ID NO 283 + SEQ ID NOs 285, 287, 289 y sondas R: SEQ ID NOs 286, 288, 290 + SEQ ID NO 284) en un volumen total final de 600 µl de TE.

45 Los cebadores F (SEQ ID NO 283 marcada con fluorocromo FAM en el terminal 5') y R (SEQ ID NO 291) fueron diluidos a una concentración de 20 pmol/µl en TE y se ha preparado una alícuota concentrada de 10 mM de dNTPs.

Para el experimento se utilizó el kit MLPA reagents 100 reactions (MRC-Holland-RESNOVA) excepto para SALSA PCR primer mix.

50 Se desnaturalizaron 100 ng de ADN a 98°C por 5 minutos; se agregaron 2 µl de una mezcla que comprende 1,5 µl de FECH probe mix y 1,5 µl de SALSA MLPA buffer a 25°C. El todo fue encubado por un lapso de tiempo de 1 minuto a 95°C y por al menos 16 horas a 60°C (hibridación). Se preparó una mezcla con 3 µl de buffer A, 3 µl de buffer B de ligación, 25 µl de agua estéril y 1 µl de ligasa y se agregó al ADN a 54°C. Luego fue encubado a 54°C por un lapso de tiempo de 15 minutos, a 98°C por un lapso de 5 minutos y fue almacenado a 4°C (ligación). Fueron alicuotadas en probetas estériles 15 µl de mezcla 1 de RCP, con 13 µl de agua y 2 µl de SALSA PCR buffer. Se agregaron 5 µl de producto ligado y con las probetas a 60°C se agregaron 5 µl de mezcla de 2 de RCP, con 2,75 µl de agua, 1 µl de Salsa Enzyme dilution buffer, 0,5 µl de dNTPs, 0,25 µl de SEQ ID NO 283 y 0,25 µl de SED ID NO

291 y 0,25 µl de SALSA Polymerase. Luego se dio inicio al protocolo RCP de 35 ciclos: 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 60°C; 60 segundos a 72°C con incubación final de 20 minutos a 72°C.

5 Se agregaron 0,75 µl de producto amplificado a 13,5 µl de formamida desionizada, 0,75µl de agua y 0,5 µl de (500Rox) tamaño estándar, y los fragmentos fueron analizados con un secuenciador Abi Prism 310 usando el capilar de 47 cm y el polímero POP-6. Se establecieron los siguientes parámetros de ejecución: tiempo de inyección 30 segundos, tensión de inyección 3,0 kV, temperatura de ejercicio 60°C y tiempo de ejecución 30 minutos. Los picos resultantes del análisis de los fragmentos, antes de su normalización, se exhiben en la figura II e indican el resultado obtenido.

10 Por cada muestra se seleccionaron los picos correspondientes a los 27 pares de sondas ligadas y amplificadas (24 picos que representan sondas para el gen FECH y 3 para controles internos) y se exportaron a un fichero Excel los valores de sus alturas. Después de ordenar los valores de altura de los picos correspondientes al gen implicado de conformidad con su posición en el cromosoma, dicho valor fue dividido por la suma de los valores de altura de los picos de control (normalización).

15 Por cada muestra los valores de los picos normalizaos fueron divididos por el valor medio obtenido a partir de los valores de altura de los correspondientes valores normalizados en sujetos normales (calibración). Para visualizar los resultados se creó un gráfico para cada muestra. Los picos de 0,8 a 1,2 se hallan en copia doble en el genoma, mientras que si son de aproximadamente 0,4 – 0,5 son de copia simple, de aproximadamente 1,5 – 1,6 son de copia triple. En la figura III se muestran algunos ejemplos; donde los gráficos CRTL 1-3 representan los resultados obtenidos a partir de sujetos normales y necesarios para la calibración.

20 Los resultados ponen de manifiesto que de los 15 pacientes analizados 11 son normales por lo que se refiere al gen FECH, mientras que 4 de ellos presentan anomalías en el gen FECH y regiones circunstantes. Como puede verse en la figura 3, los pacientes 399, 844 y 909 presentan 3 supresiones diferentes en el gen FECH.

Dicho resultado fue confirmado con otras técnicas moleculares, tales como, por ejemplo, RCP larga (Long-PCR) y secuenciación de los puntos de rotura de supresión.

25 Ejemplo 3 – Diagnóstico de la presencia de anomalías relacionadas con la Porfiria en el gen HMBS

30 Se siguió el mismo protocolo que en el Ejemplo 1 usando 2,4 µl de cada sonda (sondas L: SEQ ID NO 283 + SEQ ID NOs 25-47 y sondas R: SEQ ID NOs 166-188 + SEQ ID NO 284) con una concentración de 1 pmol/µl (HMBS Probe Mix). Se agregó también la sonda HMBS con los 3 pares de sondas de control interno (sondas L: SEQ ID NO 283 + SEQ ID NOs 285, 287, 289 y sondas R: SEQ ID NOs 286, 288, 290 + SEQ ID NO 284) en un volumen total final de 600 µl de TE. Se llevó a cabo un análisis sobre muestras tomadas de 30 sujetos, de los cuales 16 sanos y 14 con síntomas clínicos que pueden ser relacionados con la Porfiria. Tres pacientes (los pacientes 496, 526 y 642) presentaban una anomalía en el gen HMBS. La figura 4 exhibe algunos ejemplos de los resultados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FONDAZIONE IRCCS "OSPEDALE MAGGIORE POLICLINO: MANGIAGALLI E REGINA ELENA"
UNIVERSITA DEGLI STUDI DI MILANO

5 <120> Sondas para su utilización en el diagnóstico de porfiria y para la cuantificación alélica de genes relativos a la porfiria mediante reacciones de ligación y amplificación

<130> 21.O0107.12.WO.10

<160> 291

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 <211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda de detección

15 <400> 1

ctgaagacac acggttagta aaaggcagaa cc32

<210> 2

<211> 46

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Sonda de detección

<400> 2

caaatagaaga gtgaatcccg ggaaaagaaa gaggtgagtc ctgacc46

25 <210> 3

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Sonda de detección

<400> 3

cttttaaaaa atgcaggctc caggt25

<210> 4

<211> 44

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda de detección
 <400> 4
 ctggaacga ttctaacgt ggattctgaa taggtatcac atcc44
 <210> 5
 5 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 10 <400> 5
 ccagtcctga gcccctagt gtaat25
 <210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 6
 cctccaagaa atgcacttgc caggctgg28
 20 <210> 7
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <400> 7
 cgggtcatat ttataagta ctttgaagt aatcctcatc tcc43
 <210> 8
 <211> 26
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 8
 35 ccatggaggt ggaagtcagg tgcagc26
 <210> 9

<211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Sonda de detección
 <400> 9
 cttgactaaa gctttcactt cacattctgg aatagagg38
 <210> 10
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 10
 15 caccctggaa gaaaataaga agtgtgacaa atcaac36
 <210> 11
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 11
 ctggcaccat tcatcgccaa acg23
 <210> 12
 25 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 30 <400> 12
 cattgaacag ctgctctgag ggtacgtaag ctaggccagt g41
 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <400> 13
 ctgaaaggg ctattgcttt cacacag27
 <210> 14
 5 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 10 <400> 14
 cctttacgag tctgttttt atttcacca taateaaaat gcat44
 <210> 15
 <211> 30
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 15
 ctttatcctc ctttctgtt actcactcag30
 20 <210> 16
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <400> 16
 ctcaggaggt aagcgccact gtccaaaag tcatg35
 <210> 17
 <211> 38
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 17
 35 ctcaaacaga cgaatctatc aaagggcttt gtgagagg38
 <210> 18

<211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Sonda de detección
 <400> 18
 cattgttctc taaggatatct acagtgttac aatcg35
 <210> 19
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 19
 15 ctgtgttcca agcagctgac cctgagc27
 <210> 20
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 20
 ctttgataa tgataaaggt ctcttgtgg ccgggtcgaa tticagg47
 <210> 21
 25 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 30 <400> 21
 caaatgttta atcagatctg ggggtgtata ctcttccta acgcaatctg ag52
 <210> 22
 <211> 42
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <400> 22
 cactattgtc tccatcgcaa cgggagatat agagacaggt aa42
 <210> 23
 5 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 10 <400> 23
 gacataaaat ggcataacaa aatatacctt gggtttcata agacaagtc49
 <210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 24
 cgttgagggt cagtgaacac cagg24
 20 <210> 25
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <400> 25
 gccacacctg ctctggatc cgctgcttc aagttccttt gc42
 <210> 26
 <211> 40
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 26
 35 ctgtgcaaca agttcatagc ctatagcacc gtctttgagg40
 <210> 27

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Sonda de detección
 <400> 27
 ctggctgaca tgcccagggc tccactctca tct33
 <210> 28
 <211> 26
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 28
 15 caccacaca cagcctactt tccaag26
 <210> 29
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 29
 ctgaggaggg cagaaggtac tgaggaaggt taaagg36
 <210> 30
 25 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 30 <400> 30
 caggaagaaa acagcccaaa gatgag26
 <210> 31
 <211> 39
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <400> 31
 cagcttgctc gcatacagac ggacagtggtg gtggcaaca39
 <210> 32
 5 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 10 <400> 32
 ctctctctc agttgctatg tccaccacag g31
 <210> 33
 <211> 34
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>.
 <223> Sonda de detección
 <400> 33
 ctgtccgga gattggagag aaaagcctgt ttac34
 20 <210> 34
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <400> 34
 ccatctctat agagtggacc tgggtgttca ctcttgaag g41
 <210> 35
 <211> 38
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 35
 35 gggaaaaccc tcatgatgct gttgtcttc acccaaaa38
 <210> 36

<211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Sonda de detección
 <400> 36
 gtaactctc tctgggcagt gtggtgg27
 <210> 37
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 37
 15 ccgacactgt ggtccttagc aac23
 <210> 38
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 38
 cagatcctgc accctgagga atg23
 <210> 39
 25 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 30 <400> 39
 catcttgat ctggtgggtg tgctgcacga tcccgaga38
 <210> 40
 <211> 28
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <400> 40
 ggctgcagtg tgccagtagc cgtgcata28
 <210> 41
 5 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <223> Sonda de detección
 <400> 41
 10 ctggaggagt ctggagtcta gacggctcag atagcatac39
 <210> 42
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 42
 catgaagatg gccctgagga tgaccacag ttggtagg38
 <210> 43
 20 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 25 <400> 43
 caatgatcaa gggactcaga catcatagaa30
 <210> 44
 <211> 52
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 44
 ctctaccagg ttgaagacaa tgatggaagc agaaatgact agtgactggc ca52
 35 <210> 45
 <211> 43

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 5 <400> 45
 cctctctaag gcaacctatg ttctgccccg ctgcacccgc cta43
 <210> 46
 <211> 53
 <212> ADN
 10 <213> .Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 46
 ctcttcgcct tcaagtcttt ccgggagaaac tggcagcggg cttgggtgcg agc53
 15 <210> 47
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Sonda de detección
 <400> 47
 cttttctatt tatatgtgtg gcttaggacc ctccgtgaac agatgatag49
 <210> 48
 <211> 50
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 48
 30 cctattggta tggcacccctc cgcccaaaac ctttactct catccacact50
 <210> 49
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<400> 49
ccttgcctg aagctgctgt gtcagtgtct caatgatctt ctgtatctag50
<210> 50
<211> 39
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 50
10 ccacaggctc ccccttctcg ctagtattcc agaccagag39
<210> 51
<211> 48
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Sonda de detección
<400> 51
ctgaggcatt tgacttcatt gcacgggacc ctgcagagac gctacacc48
<210> 52
20 <211> 46
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
25 <400> 52
caggtagcga atgctttcca gaatccctgc tcagcagctg caatcc46
<210> 53
<211> 44
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 53
ctctgggtca acacatcata gccacatgtc cctactaaat attt44
35 <210> 54
<211> 25

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 5 <400> 54
 cgtgttgtgt ctgagatccc ggtgc25
 <210> 55
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 55
 cacctgttaa tatccagccc cga23
 15 <210> 56
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Sonda de detección
 <400> 56
 ctaacatcaa ggagctgttt atggagccgc ctccccgtg39
 <210> 57
 <211> 24
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 57
 30 ctaaggtgag tgctccactt gtgc24
 <210> 58
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<400> 58
 ctagtggaga gcagtgagcg tctgggaggc t31
 <210> 59
 <211> 30
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 59
 10 ctgcatgccc tacccactgg cctcaggtaa30
 <210> 60
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 60
 caaagagcct gatgagactg tgc23
 <210> 61
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 25 <400> 61
 cgctccttag tcctagtctc accct25
 <210> 62
 <211> 23
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 62
 ctttgcttcc tctgcagggc gga23
 35 <210> 63
 <211> 30

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 5 <400> 63
 ctctcaaag ttctcatgct ctcaggtatc30
 <210> 64
 <211> 34
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 64
 ctgagtgcca tcaactgcagt gtctgtagct gtgg34
 15 <210> 65
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Sonda de detección
 <400> 65
 ctccagggat ttggacattt ggt23
 <210> 66
 <211> 36
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 66
 30 cagctgctac acaattagga ctgaaggaga tgccga36
 <210> 67
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<400> 67
cctctcctct cttctcagaa ctgcattc28
<210> 68
<211> 37
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 68
10 ctgttaatga ctgtatagag agtgggccc aggcagc37
<210> 69
<211> 42
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Sonda de detección
<400> 69
ctgagggtac ttagacatc acgagggtga gaatagtaa at42
<210> 70
20 <211> 50
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
25 <400> 70
ccacattgtt gtatccgtac ctgtgtggaa ggagtagatg gggagctcag50
<210> 71
<211> 31
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 71
ctgaggggac tgagttagct gcctgagaaa a31
35 <210> 72
<211> 34

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 5 <400> 72
 gaataccttt aaagttcac cacatgtgat gtag34
 <210> 73
 <211> 43
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 73
 cagcactgat ctaagatatt caagacctt aggtgaatac aag43
 15 <210> 74
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Sonda de detección
 <400> 74
 gtagcgtatc tcagctaaaa cccttattac ttcattgaat taac44
 <210> 75
 <211> 40
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 75
 30 gaaaagcgcc ttgtgtcta actgttaaag accttaatg40
 <210> 76
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<400> 76
ccaacttttc tgggaccgg tgg23
<210> 77
<211> 44
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 77
10 gtgtgttttc gaaaaggctg gggtagcat ttctgtgtt catg44
<210> 78
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Sonda de detección
<400> 78
cattttgtgc tatgggcgtg agctctgtta tccacc36
<210> 79
20 <211> 31
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
25 <400> 79
caagcagtgg tggttgggtg gtggatgtga c31
<210> 80
<211> 41
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 80
gtacagagct gtgccagggc tgtagttcct tcttacattc c41
35 <210> 81
<211> 30

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 5 <400> 81
 cacaaagttt ggcctcttca ctccaggatc30
 <210> 82
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 82
 catccaaggg actgggtgcg ttgatgcag29
 15 <210> 83
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Sonda de detección
 <400> 83
 ccactgtgtt tcatgtctca ctttatgatt g31
 <210> 84
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 84
 30 caataccttg tctcacagtt taggtgcctc30
 <210> 85
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<400> 85
 ccaaataccta cctgttttag accaatccag g31
 <210> 86
 <211> 23
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 86
 10 ctacacttcc acagctccac cag23
 <210> 87
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 87
 ctcttctctc tcctggcaaa atcttct27
 <210> 88
 20 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 25 <400> 88
 gagggaggaa cggtaaactg gggcaggggt gtgcatagct ctag44
 <210> 89
 <211> 37
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 89
 cgagtaagtc cctcactctc atgccatacc ttagtc37
 35 <210> 90
 <211> 37

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 5 <400> 90
 ctgtcctgcc cagagcctac ttacttgaca atggtgc37
 <210> 91
 <211> 44
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 91
 cagattcagg ttaaattgtg gattgagctc gcagttacag acag44
 15 <210> 92
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Sonda de detección
 <400> 92
 gaaacagact acactcccg tgggtgcatg cgccag36
 <210> 93
 <211> 28
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 93
 30 caggactttt tcagcacgtg tcgctctc28
 <210> 94
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<400> 94
ctgccaccta gcaacctgtc tctg25
<210> 95
<211> 25
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 95
10 ggatccagaa gtggtagcct ctgag25
<210> 96
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Sonda de detección
<400> 96
ccatctftct atccttctct agtggaccct30
<210> 97
20 <211> 29
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
25 <400> 97
gcattgcagc tgtttgagtc ccatgcagg29
<210> 98
<211> 23
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 98
cggtaaagcca tggaagggtg agg23
35 <210> 99
<211> 27

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 5 <400> 99
 gctggctttg ctccagggg gtgtgtg27
 <210> 100
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 100
 ggaggagatc ggcagttgg tgaag25
 15 <210> 101
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Sonda de detección
 <400> 101
 gaattgttcg gagtctcaa gtgtctcta tag33
 <210> 102
 <211> 35
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 102
 30 gttgggcagg cagacgggtg atgctggagc ttaag35
 <210> 103
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<400> 103
gcaaattctt attgagggt gctgtatcac aactgagtat acatg45
<210> 104
<211> 42
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 104
10 gcacacccat aaagcccctg gaaaataaag caacccatat tc42
<210> 105
<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Sonda de detección
<400> 105
gtctggtcag cctctccac tagatttcaa gtattcagtt cag43
<210> 106
20 <211> 40
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
25 <400> 106
cttattatga cagagcaatt ccaacagtca tgaaggttc40
<210> 107
<211> 38
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 107
caaattgctt ttcacatgtg ccacatggag ctgaagag38
35 <210> 108
<211> 38

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 5 <400> 108
 cttccacaaa tgtcttacta atcagaaggt aaaagtag38
 <210> 109
 <211> 38
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 109
 cacactccca atatggttct gttgaattaa gagatctg38
 15 <210> 110
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Sonda de detección
 <400> 110
 cttacagtca cgtccagctt gc22
 <210> 111
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 111
 30 cagtaaaagg gtgactgttg ttattgctga30
 <210> 112
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<400> 112
ctgccaggca ataatgaagg ttcttttact gaag34
<210> 113
<211> 51
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 113
10 ccaatccaga actatattct ttcatttcag gaattaggat tatatggact t51
<210> 114
<211> 47
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Sonda de detección
<400> 114
ctttctcatc ctgaagatta cgggggactc attttacca gccccag47
<210> 115
20 <211> 37
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
25 <400> 115
cagtctggga aaggctctcg aaagaaaaat ggaatgc37
<210> 116
<211> 26
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 116
ccagtgcagta aaattggcct ggatac26
35 <210> 117
<211> 25

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 5 <400> 117
 ggattaggac ccagttctct tggtc25
 <210> 118
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 118
 ctcagcactg cctcttctat ttccctgtg29
 15 <210> 119
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Sonda de detección
 <400> 119
 gtaaagtctt tctgctttt gattgtgccc ag32
 <210> 120
 <211>.34
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 120
 30 ctctggcctc acatacagtc tcaagcacat tcag34
 <210> 121
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<400> 121
catcatgtga gcattcattg acacagg27
<210> 122
<211> 23
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 122
10 ctctgtggaa gccagcttaa acc23
<210> 123
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Sonda de detección
<400> 123
gggacagccc tgcaagggtc cccaacaccg caatagtaag gatc44
<210> 124
20 <211> 41
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
25 <400> 124
cagctgggtac tggctttatg aaaatcgaaa caataggaca c41
<210> 125
<211> 51
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 125
gaaaaccgga ttttcagtag ctgaagaaaa tatggcactg taagttaaaa c51
35 <210> 126
<211> 42

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 5 <400> 126
 ctcagtgcata acaactttgc aatgaaagga aagcggaga cg42
 <210> 127
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 127
 ctaggctggg caaaggaatg ctgt24
 15 <210> 128
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Sonda de detección
 <400> 128
 ggagttaaca caccagggtt ctagt25
 <210> 129
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 129
 30 tccaacctca tctaccccat ctttg25
 <210> 130
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<400> 130
 ctccacag ctaccaatcc atatccacc cccgctcttg cag43
 <210> 131
 <211> 41
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 131
 10 gcctacgctg tgtcttgatc ttggcgctcc ccagcagagt t41
 <210> 132
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 132
 cgaggagtcc ccagctattg aggcaatcca tctgttgag39
 <210> 133
 20 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 25 <400> 133
 gctccccaaa acccagtcac ctg23
 <210> 134
 <211> 38
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 134
 caaggcaggt gagtgaacca ccagcagggg tgggcacc38
 35 <210> 135
 <211> 40

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 5 <400> 135
 gatgtcaggt ggtagccccg tcggacatga tggatggacg40
 <210> 136
 <211> 36
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 136
 cataggtatc ggtgatgagc tacagtgcc aatttg36
 15 <210> 137
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> Sonda de detección
 <400> 137
 caccctgatg actctgcttt gcagg25
 <210> 138
 <211> 28
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <400> 138
 30 gacatgctca tggatgaagcc gggaatgc28
 <210> 139
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<400> 139
catttcagcc tgtctccctg tctgcttccc tgcagcaccc tgac44
<210> 140
<211> 47
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
<400> 140
10 gcaactttct gcatctctcc caacacaggt gctgacatca tcatcac47
<210> 141
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Sonda de detección
<400> 141
ctgacccaca aggcttgaa agag24
<210> 142
20 <211> 34
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Sonda de detección
25 <220>
<221> base modificada
<222> (1)..(1)
<223> Fosforilación en 5'
<400> 142
30 caggtttgta ttccgaagcc ctggttctt ccac34
<210> 143
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial
35 <220>
<223> Sonda de detección

<220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 5 <400> 143
 ttgccatcgt gaacgttggt aaagttagaa ctctggcaac40
 <210> 144
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 144
 ggccatgagc tgagttgtga c21
 <210> 145
 20 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 145
 30 gagacgtgtg cttataccct cgatttgcc agcgttgcac40
 <210> 146
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 5 <400> 146
 ctggatggtt ttgtttaat acggatggcc agc33
 <210> 147
 <211> 36
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 147
 ccttcacttt tcctaagtct ctgcagtgag ttccac36
 <210> 148
 20 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 148
 30 tatgtgatag aaaagtgcca ttatagattt caatacttgt gtatctc47
 <210> 149
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 149
 tgcagcggcc gtcaccacag aaac24
 <210> 150
 <211> 40
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 150
 ggtgtcagac tggggcttac taatgcgcta ttcacatgc40
 20 <210> 151
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 151
 cgttgtattt tattttatat aggaagccga aaactg36
 <210> 152
 <211> 29
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 152
 ccgaaccccc aagattcaag agcagtacc29
 <210> 153
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 153
 agtgatgtgt ttgggctca ctctggc27
 20 <210> 154
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 154
 tatccacagt acagctgctc caccacagg29
 <210> 155
 <211> 32
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 155
 ctactaagtgtgtctctgtatatttcaggcagc32
 <210> 156
 <211> 30
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 156
 tgctttgcagatcatattctaaaggaactg30
 20 <210> 157
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 157
 gaaaggctggagtactgcaa cccctac27
 <210> 158
 <211> 32
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 158
 gggaggaaga atatacctctt ggtccgata gc32
 <210> 159
 <211> 39
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 159
 ttttagtaga acataccaga gagtaatcct ctgagaaac39
 20 <210> 160
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 160
 tgtccgctct gtgtcaatcc tgtctgc27
 <210> 161
 <211> 33
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 161
 gccagccaaa acaaacatgc aagggaatg cag33
 <210> 162
 <211> 42
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 162
 gttttctgg aatttggtc tgactttggt ttggacagt cc42
 20 <210> 163
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 163
 cttttctcaa agatggggct gctcctctg agtccaagct tggcaaggcc50
 <210> 164
 <211> 39
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 164
 ttcttgcaa agtgaacca gccagaccca tgcattgcc39
 <210> 165
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 165
 cgggacttct tctgggaatt gtgc24
 20 <210> 166
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 166
 ctccctcctg gcatcactgt ctgcgactca gg32
 <210> 167
 <211> 48
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 167
 atgtagtga tggcttgct gagggggct ccctgtacgt gctgacgc48
 <210> 168
 <211> 27
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 168
 aatgtcacag ccctcagaac taaagcg27
 20 <210> 169
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 169
 cggagccatg tctggaacg gcaatg26
 <210> 170
 <211> 42
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 170
 gaccagcctt ggagtatttc cccactctga gactcagctg gc42
 <210> 171
 <211> 28
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 171
 agtgattcgc gtgggtaccc gcaagagc28
 20 <210> 172
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 172
 ttgaaagcct cgtaccctgg cctgc25
 <210> 173
 <211> 31
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 173
 ggacaagatt cttgatactg cactctctaa g31
 <210> 174
 <211> 32
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 174
 caaggagctt gaacatgccc tggagaagaa tg32
 20 <210> 175
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 175
 acctgcccac tgtgcttcct cctggcttca c31
 <210> 176
 <211> 38
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 176
 ttgttgga agaccctaga aaccctgcca gagaagag38
 <210> 177
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 177
 gaaccagctc cctgcgaaga g21
 20 <210> 178
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 178
 tctccacagc ggggaaacct caacacc27
 <210> 179
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 179
 catgtatgct gtgggccagg tac23
 <210> 180
 <211> 32
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 180
 ctctgcttcg ctgcatcgct gaaagggcct tc32
 20 <210> 181
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 181
 cagctatgaa ggatgggcaa gtaagtgg28
 <210> 182
 <211> 29
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 182
 aagagacat gcaggctacc atccatgctc29
 <210> 183
 <211> 42
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 183
 catcactgct cgtaacattc cacgagggcc ccagttggct gc42
 20 <210> 184
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>.
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 184
 gagtccaacg agctgatatc gaatggag28
 <210> 185
 <211> 38
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 185
 gcctctaggc cgtaattcc tgctaggata ttgatggc38
 <210> 186
 <211> 43
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 186
 tctactgttt ccgcccggat ctgttcgct gaacaacccat tac43
 20 <210> 187
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 187
 gctgaacgag caggcctgca gaaacggggt gagttggac39
 <210> 188
 <211> 35
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 188
 agggcatctc tcccaggtga cccttcttt ctgtc35
 <210> 189
 <211> 44
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 189
 ctcgaaaaac aaaagcctaa gcagattct caggcaattt atcc44
 20 <210> 190
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 190
 aggacaagt acagggatta tataaggaat tcaggactcc40
 <210> 191
 <211> 37
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5"
 <400> 191
 tgggtaccct gcttcggtt agccactcct cacctgc37
 <210> 192
 <211> 38
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 192
 tgtctgaacc actgggtggg aaacttttgg aagaatac38
 20 <210> 193
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 193
 ccaccgtact gaaagggcag ggaaagaacc gatgagac38
 <210> 194
 <211> 48
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 194
 tttaacaagt cagtggtagt accagtttag agtaaagcag atctgttc48
 <210> 195
 <211> 39
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 195
 tgaagactaa cgccggaccc cgagatcgtg agtgtggg39
 20 <210> 196
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 196
 gtgggatcca agctaccatt tgc23
 <210> 197
 <211> 35
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 197
 gactggcctt aaggtgcct atctattctc cctac35
 <210> 198
 <211> 28
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 198
 cagagggagc ttcattaat gctcttc28
 20 <210> 199
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 199
 ggattcgctc cggtcgaggc cctaattgtg c31
 <210> 200
 <211> 30
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 200
 caccagcacc tccgctcctt ttactgtgcc30
 <210> 201
 <211> 43
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 201
 acagttttgc ccagcgccgc cttggacctg aggtgacact tgc43
 20 <210> 202
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 202
 taaggtggcg tctctagcca tggacagtct c31
 <210> 203
 <211> 27
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 203
 cccacagcc agactcagca ctcattc27
 <210> 204
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 204
 tctaaggac agcagtctgg aggc24
 20 <210> 205
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 205
 tgaatctgca gtaccaagga gcccatctgc ctgtcc36
 <210> 206
 <211> 25
 <212> ADN
 35 <213> Artificial'
 <220>

<223> Sonda de detección -
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 206
 gccatcttca gaagatccag gagtc25
 <210> 207
 <211> 42
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 207
 gccactgctt ggtccatcta cacaaggtaa gttgggataa ac42
 20 <210> 208
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 208
 cccagtatac actaggtcac tggcaaaaac30
 <210> 209
 <211> 31
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 209
 agtcagtgtc ctgggcacag aacctaacag c31
 <210> 210
 <211> 46
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 210
 gtcggtccct gatctcgcc aaatagggca ctgagacttc ggaagc46
 20 <210> 211
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 211
 gatcacctga atcccctcag cttctgagc30
 <210> 212
 <211> 41
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 212
 gagggtaggg aacaggttaag gaggcacaa gaggaagaa c41
 <210> 213
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 213
 gttcttgata aggattcttt attaggctca agtctc36
 20 <210> 214
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 214
 cacctacttt caatgggtat gattattagg ttgtc35
 <210> 215
 <211> 36
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 215
 cttttaacca gcctcccttt ttctaagcct ttagtg36
 <210> 216
 <211> 44
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 216
 gatgtttgat aatgccaaag atgatgggtga ctaacagctg ttg44
 20 <210> 217
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 30 <400> 217
 gagaggaagg aaggttaagga ggc23
 <210> 218
 <211> 32
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>

<223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada.
 <222> (1)..(1)
 5 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 218
 gaaatcttc agaggaagct gcaaaacaaa tg32
 <210> 219
 <211> 32
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 15 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 219
 ccaagaatcc tcatgctcct actatccatt tc32
 20 <210> 220
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Sonda de detección <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 220
 30 ctactcctcaa cataactgaa tcaagaagac g31
 <210> 221
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 5 <400> 221
 ccttgtagaa aagcactgtg atgactcatt c31
 <210> 222
 <211> 36
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 222
 cagaattgaa agtatcttga tgtctttacc tctaac36
 <210> 223
 20 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 223
 30 gcagaatggc tgtgcagggg ttggag27
 <210> 224
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 5 <400> 224
 ggagattctg aagtggaac tgtctacaat tcc33
 <210> 225
 <211> 28
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 225
 cagcccctaa ccattatttg cattcaag28
 <210> 226
 20 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 226
 30 gatattatgt atggcgacct ggtggttac29
 <210> 227
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 5 <400> 227
 gcattacact ttgaaaccta aatggaggc29
 <210> 228
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 228
 gcatgaatga aggtggagag agc23
 <210> 229
 20 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 229
 30 gaacaggttt aaggtctagg cttagagtt ggggaaaggg40
 <210> 230
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 5 <400> 230
 caggggcttt tcatattgt cagagggtt g31
 <210> 231
 <211> 35
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 231
 ccttctcat agtaagccgt acccagtgtt ggcac35
 <210> 232
 20 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 232
 30 ctgacatgg aagcgaatgg gttggg26
 <210> 233
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<220>
 <221> base modificada
 <222> (l)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 5 <400> 233
 gcaggccgtt acttaccagg taagagtc28
 <210> 234
 <211> 26
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 234
 ctgaggcctg ctgtgaactg actctg26
 <210> 235
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 235
 30 ttctctacag ccactgcgtc gcttc25
 <210> 236
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 5 <400> 236
 ctaggctatg tgtccaagc catcacc27
 <210> 237
 <211> 26
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 237
 gatgacatac atggttgagg gtggtg26
 <210> 238
 20 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 25 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 238
 30 gcatcttggc ccacagctct tcaacaagtt tgc33
 <210> 239
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> Sonda de detección

<220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 5 <400> 239
 ccttgaggtt gaggtggggg tgt23
 <210> 240
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 240
 gggaagacgg tgacattgca g21
 <210> 241
 <211> 33
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 241
 cagatgctgg atgactttgg accacatcgc tac33
 30 <210> 242
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 242
 5 gtgtcaagag aaggggcagg gtctatttta aag33
 <210> 243
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 243
 gtctatctat gctcaccttt ggcag25
 <210> 244
 <211> 29
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 244
 caaatggctt aggcttcaca taaatatcc29
 30 <210> 245
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 245
 5 ttaacatctc tccttgatg tgtgtgaag ccttaatg38
 <210> 246
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 246
 ctatgtcaag tgagctaggt ataatgcatg aagcc35
 <210> 247
 <211> 38
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 247
 ctggaaatca ctagagtg atcttgattg aattagtc38
 30 <210> 248
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 248
 5 gctgcctga cttgttgaa gacatttta catccc36
 <210> 249
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 249
 cactccac atggcttatt ggtctgtgt gc32
 <210> 250
 <211> 26
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 250
 ttagttctgc agtgttcaca ggagcc26
 30 <210> 251
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 251
 5 ggtcccatct tgctttttc ttcc24
 <210> 252
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 252
 taccagaac accatgacat agaagg26
 <210> 253
 <211> 32
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 253
 gatgcgaagg aagatgactg tggccaggat cc32
 30 <210> 254
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 254
 5 gaagccactt tgatccctgt ttatcggtt gagttttgt c41
 <210> 255
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 255
 agcagtggaa gcagcagagt tatgtttgga gcaaaac37
 <210> 256
 <211> 51
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 256
 caagtcagt tatgtggttg gaaatgctac tgcttctta ggtaaggagt c51
 30 <210> 257
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 257
 5 agaaggagaa acctgtggaa atgcag26
 <210> 258
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 258
 ctgggacttt ttaggagtg ctctg25
 <210> 259
 <211> 31
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 259
 gaaacctcaa aagagaaatc ctgccaaaag c31
 30 <210> 260
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 260
 5 ggattgcat ggaaagcata actgtgtatc30
 <210> 261
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 261
 gagttatctg gtgacaatat cgatcaaatt aagg34
 <210> 262
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 262
 agtgaaaggc tcctgtgaaa aagctgc27
 30 <210> 263
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 263
 5 ctagccctgt gagagcttcc tgtgc25
 <210> 264
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 264
 ctaacagctg tctgggggtgg catccgtgga cttcac36
 <210> 265
 <211> 31
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 265
 gctatgggga ccctatcaa atcctcactg g31
 30 <210> 266
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 266
 5 ccaatgggaa aagccttagt tgaac25
 <210> 267
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 267
 ctgaatgcca gtgatgtgct ctcagccatg gaag34
 <210> 268
 <211> 32
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 268
 gaagtgaac ctgggctgta accgcctccg ag32
 30 <210> 269
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 269
 5 ccttttgctc gctgtgtggc t21
 <210> 270
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 270
 tcacgtgagt ctccaagaat ggg23
 <210> 271
 <211> 35
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 271
 ggatgttct gatgacatac agcctatcac cagcc35
 30 <210> 272
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 272
 5 cccaaggtga agaatcaaag gaagggctaa g31
 <210> 273
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 273
 gaagaccttc cccaacctcc tgggtg25
 <210> 274
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 274
 tcctgaaggg ctctgagtg aaaacgg27
 30 <210> 275
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 275
 5 tctgggtcag gaggtggcag agtg24
 <210> 276
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 276
 cgtggaagcc atcaaagagg ccctgatg28
 <210> 277
 <211> 30
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 277
 cttcctgttt ctatggccct ttccggtgag30
 30 <210> 278
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400>278
 5 gatgcagcta agtcaagccc agcttttg29
 <210> 279
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 279
 cctacctgga catcgtgcgg gaggtaaagg30
 <210> 280
 <211> 42
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 25 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 280
 ctcctctcg ccgtgtacca cgtctctgga gagtttgcca tg42
 30 <210> 281
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Sonda de detección
 <220>

<221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 281
 5 ctactacaca ccgcagctgc tgc23
 <210> 282
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 282
 gtgattgtta ggttgcgag aggtggtctt atccag36
 <210> 283
 <211> 18
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Tag para Oligo L
 <400> 283
 25 ggccgcggga attcgatt18
 <210> 284
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Tag para Oligo R
 <400> 284
 cactagtga ttcgcggc18
 <210> 285
 35 <211> 21
 <212> ADN

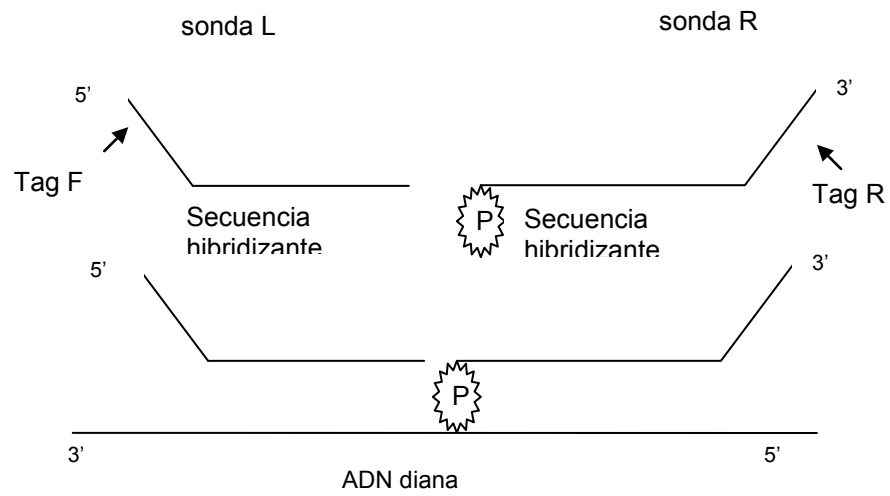
<213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección como control interno
 <400> 285
 5 gccacatca gcactatgac c21
 <210> 286
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Sonda de detección como control interno
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 286
 ccaggacaga tcacatacac tgc23
 <210> 287
 <211> 46
 20 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección como control interno
 <400> 287
 25 catttaagac cctgagacta tctgttgaag ctgcctgttt tagcgt46
 <210> 288
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Sonda de detección como control interno
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 35 <223> Fosforilación en 5'
 <400> 288

ctgttctgct tgttcacgcc gtttcgtctc aaactc36
 <210> 289
 <211> 50
 <212> ADN
 5 <213> Artificial
 <220>
 <223> Sonda de detección como control interno
 <400> 289
 ctggctggaa gctgttttaa ggaactcttc atcagtatgc ttgaaagtgt50
 10 <210> 290
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Sonda de detección como control interno
 <220>
 <221> base modificada
 <222> (1)..(1)
 <223> Fosforilación en 5'
 20 <400> 290
 ccaaaaggca tctcttcacg gtttctcta cactgattac atctcc46
 <210> 291
 <211> 18
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador R para la SEQ ID NO. 284
 <400> 291
 gccgcgaatt cactagt18
 30

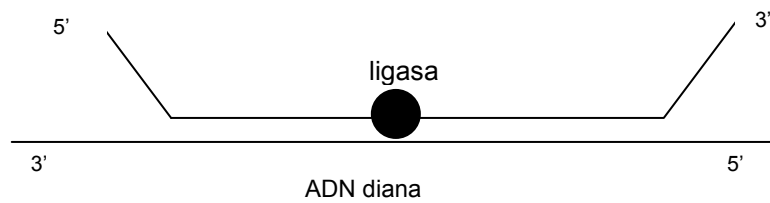
REIVINDICACIONES

- 1.-Asociación de sondas que comprende un grupo de sondas que tienen en un terminal de la secuencia un tag y en el otro terminal una secuencia que se hibridiza a por lo menos una parte de la secuencia del gen FECH, dichas secuencias hibridizantes siendo SEQ ID NOs 1-24 y un grupo de sondas que tienen en un terminal de la secuencia un tag y en el otro terminal una secuencia que se hibridiza a por lo menos una parte de la secuencia del gen FECH, dichas secuencias hibridizantes siendo SEQ ID NOs 142-165.
- 2.- Asociación de sondas según la reivindicación 1, donde el tag es SEQ ID NO 283 o SEQ ID NO 284.
- 3.- Asociación de sondas según la reivindicación 1 o 2, donde el tag está presente en el terminal 5' y la secuencia hibridizante en el terminal 3'.
- 4.- Asociación de sondas según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, donde el tag está presente en el terminal 5' de SEQ ID NOs 1-24.
- 5.- Asociación según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, donde el tag en el terminal 5' de SEQ ID NOs 1-24 es la SEQ ID NO 283.
- 6.- Asociación de sondas según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, donde el tag está presente en el terminal 3' y la secuencia hibridizante está presente en el terminal 5'.
- 7.- Asociación de sondas según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, donde el tag está presente en el terminal 3' de SEQ ID NOs 142-165.
- 8.- Asociación de sondas según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, donde el tag en el terminal 3' de SEQ ID NOs 142-165 es SEQ ID NO 284.
- 9.- Método para determinar la presencia de Protoporfiria eritropoiética en una muestra de tejido biológico que incluye las siguientes etapas operativas:
 - (i) extracción de ácido nucleico de una muestra;
 - (ii) introducción de la asociación de sondas según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8 dentro del ácido nucleico extraído según la etapa operativa (i), y reacción en presencia de al menos una enzima ligasa en al menos una reacción de ligación;
 - (iii) ejecución de al menos una reacción de amplificación en las sondas obtenidas a partir de la etapa operativa (ii), y
 - (iv) determinación de la presencia y de la cantidad de secuencias nucleotídicas resultantes de la ligación y la amplificación.
- 10.- Método según la reivindicación 8, donde un par de sondas para el control interno viene introducido en la etapa operativa (ii), dicho par de sondas preferentemente teniendo secuencias hibridizantes: SEQ ID NOs 285-286 y/o 287-288 y/o 289-290, y el mismo tag de la asociación de sondas presente en la etapa operativa (ii).
- 11.- Método según la reivindicación 10, donde la información dada por el par de sondas que tienen secuencias hibridizantes SEQ ID NOs 285-286 y/o 287-288 y/o 289-290 viene utilizada para normalizar los datos determinados de conformidad con la etapa operativa (iv).
- 12.- Uso de la asociación de sondas según una cualquiera de las precedentes reivindicaciones de 1 a 8 en una reacción de ligación y una reacción RCP para diagnosticar la presencia de anomalías porfíricas.
- 13.- Uso según la reivindicación 12 para diagnosticar anomalías del gen FECH.
- 14.- Kit para diagnosticar Protoporfiria eritropoiética que incluye al menos un compartimiento que contiene en su interior los reactivos para efectuar por lo menos una ligación y por lo menos una reacción RCP, y por lo menos un compartimiento que contiene en su interior la asociación de las sondas según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8.

1) Hibridación



2) Ligación



3) RCP



4) Separación por electroforesis capilar

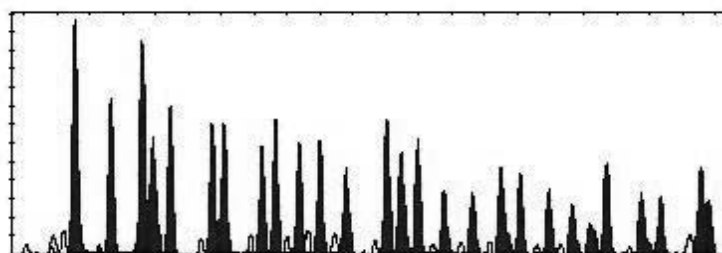


FIG. 1

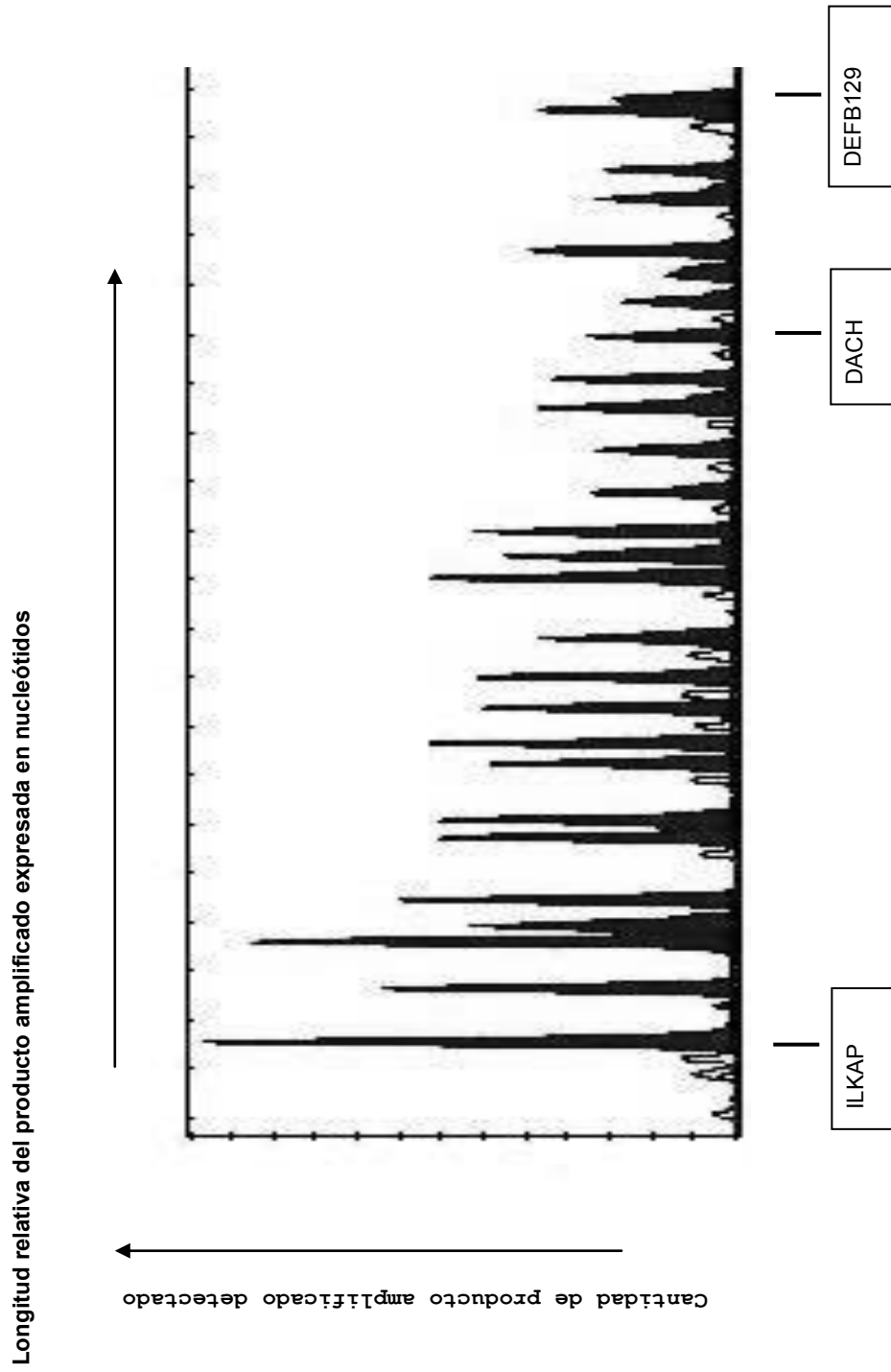


FIG. 2

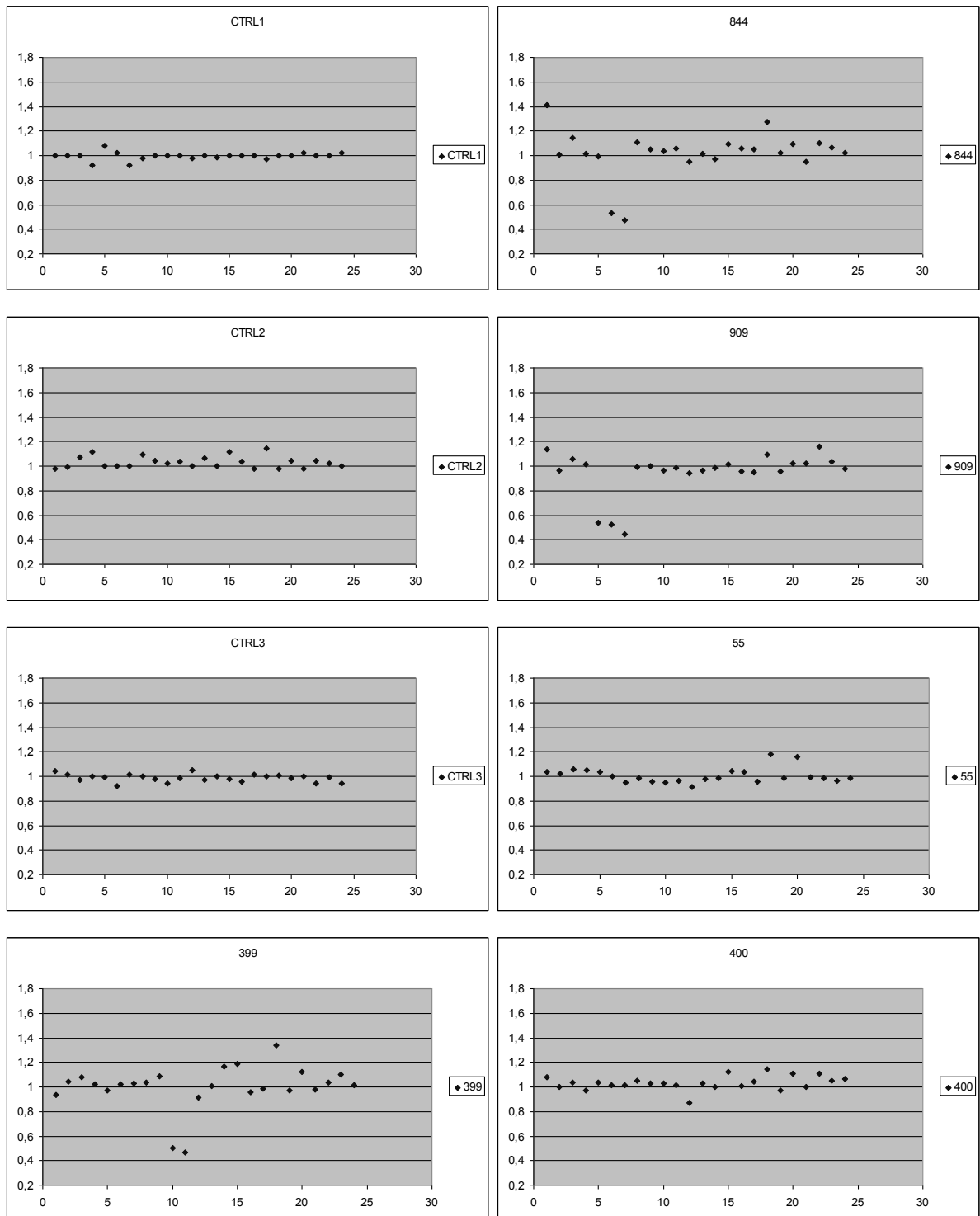


FIG. 3

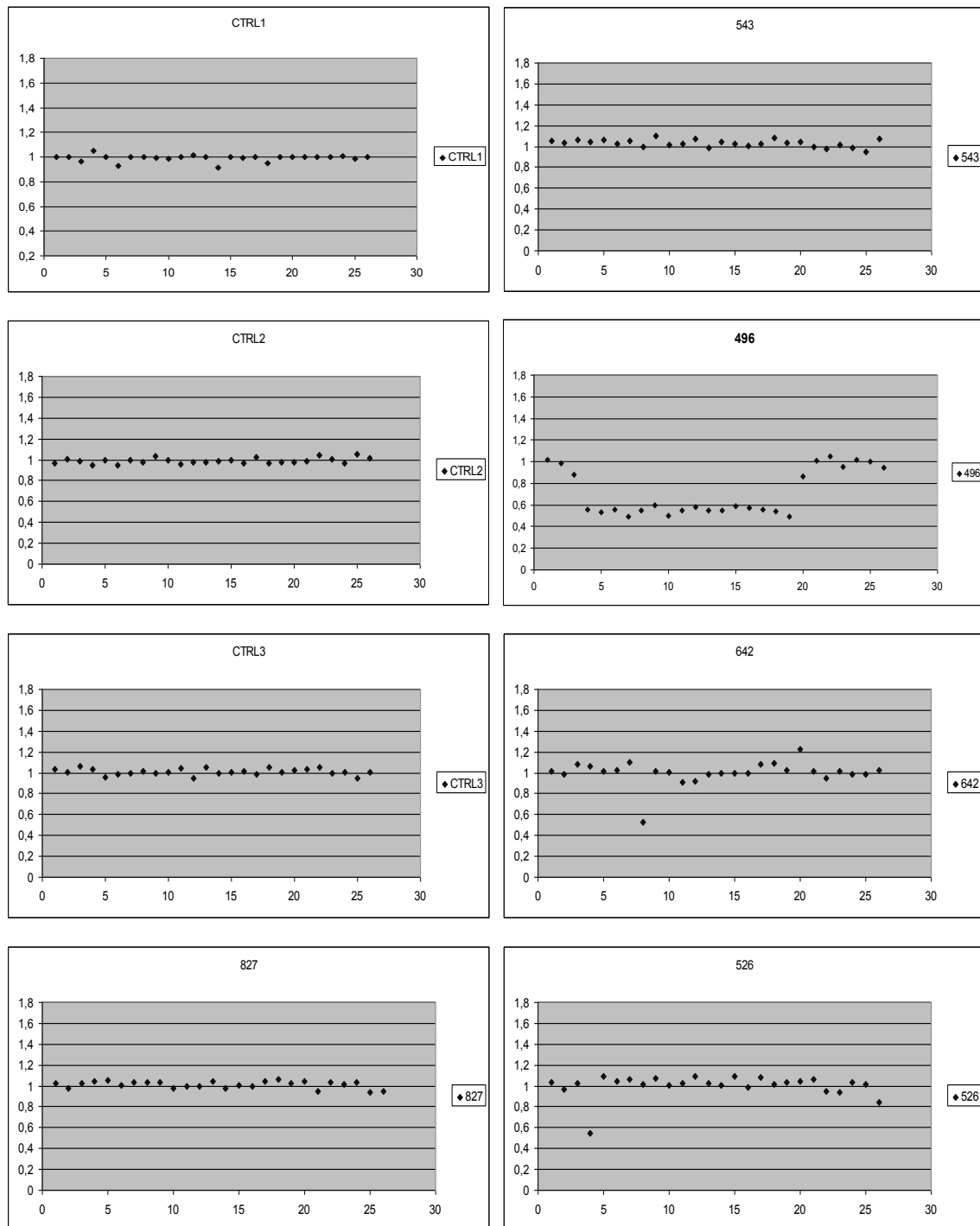


FIG. 4