

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 461**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2006** **E 06815137 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014** **EP 1926835**

54 Título: **Determinación de la abundancia de mensajes y el número de copias de alelos usando TIV con constructos cebador-promotor-selector monocatenarios**

30 Prioridad:

21.09.2005 US 719063 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2015

73 Titular/es:

**BIOARRAY SOLUTIONS LTD. (100.0%)
35 TECHNOLOGY DRIVE, SUITE 100
WARREN, NJ 07059, US**

72 Inventor/es:

**SEUL, MICHAEL y
KORZHEVA, NATALIYA**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 533 461 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

Determinación de la abundancia de mensajes y el número de copias de alelos usando TIV con constructos cebador-promotor-selector monocatenarios

Antecedentes

La amplificación lineal de ARNm o ADN genómico usando transcripción *in vitro*, o TIV, es un método bien conocido de la biología molecular (véase Krieg & Melton, 1984, Melton, 1984). Debido a que TIV, para cada diana, produce un número de productos de ARN que es proporcional al número original de copias de esa diana, permite la determinación de la abundancia relativa de mensajes (patentes estadounidenses n.ºs 5.545.522; 5.716.785; y 5.891.636; Van Gelder *et al*, 1990) y por tanto se ha aplicado ampliamente en el contexto del análisis de la expresión génica (patente estadounidense n.º 5.514.545). TIV también es un elemento central en determinados métodos isotérmicos de amplificación exponencial de dianas que pueden detectar ARN o ARNm patógeno a bajos niveles (patente estadounidense n.º 5.399.491; patente europea n.º 0 368 906 B2; Guatelli *et al*, 1990).

Según la técnica anterior, tal como se da a conocer en las patentes estadounidenses n.ºs 6.291.170 y 5.514.545, así como en las solicitudes de patente estadounidense 2005/0130194 y 2005/0123943, la secuencia convencional de la etapa es la siguiente: se realiza la síntesis de ADNc, de la manera más frecuente usando un cebador complementario al extremo 3' de poliA de ARN que incluye una secuencia de promotor de T7 (hebra que no es molde) en su extremo 5'; alternatively, pueden colocarse cebadores específicos de secuencia o de gen en posiciones distintas del extremo 5'. Tras la digestión con ARNasaH del molde de ARN o desnaturalización por calor de híbrido de ARN-ADN, se realiza la síntesis de ADN de segunda hebra (Goubler, U., 1983), para producir ADNbc de longitud completa o parcial (dependiendo de la colocación de los cebadores), que incorpora una secuencia de promotor de T7 bicatenaria (y regiones adyacentes). En realizaciones prácticas del método, debe añadirse ADN polimerasa o RT a la reacción para catalizar eficazmente la síntesis de segunda hebra (véase la patente estadounidense n.º 5.545.522, que describe el uso de ADN polimerasa de *E. coli*; Kwoh *et al*, 1989). Se sintetiza ARN antisentido (ARNa) a partir de la segunda hebra de ADN mediante transcripción *in vitro*, y se detectan los productos de ARNa, por ejemplo mediante hibridación para capturar sondas de oligonucleótidos, incluyendo variantes tales como balizas moleculares (Vet, J.A.M., 2002; véase también la solicitud de patente con n.º de serie 11/218838 de BioArray Solutions; presentada el 2/9/2005, a continuación) o el ensayo de protección de hibridación (véase la patente estadounidense n.º 6.004.745; Arnold *et al*.) o elongación de sondas. Todos estos métodos de la técnica requieren la síntesis de ADNc bicatenario a partir de las dianas de ARNm originales, y la etapa intermedia de degradación de ARN. Las etapas complejas y que requieren mucho tiempo de estos métodos los han restringido efectivamente a la investigación en laboratorio. En un entorno clínico, el uso de tales protocolos complejos requeriría una formación especial, y a menudo certificación, de personal técnico en laboratorios cualificados para llevar a cabo tal análisis complejo ("esotérico").

Detección y análisis de secuencia de ácidos nucleicos – también puede aplicarse TIV al análisis de ADN, incluyendo análisis de mutaciones o polimorfismos. Generalmente, estas aplicaciones requieren una amplificación exponencial de material genético, es decir, ADN genómico, de la manera más común mediante la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (Syvanen, A.C., 2005, véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.683.202; Mullis) o amplificación de genoma completo, en una multiplicidad de variantes (véase, por ejemplo patentes del USCD sobre la amplificación de genoma completo mediada por ligamiento, patente estadounidense n.º 5,686,243). TIV ofrece un método de selección de hebra tras amplificación por PCR (véase, por ejemplo, la solicitud de BioArray Solutions presentada el 2/9/2005; n.º de serie 11/218838; presentada (TIV)) que, entre otros, tiene la ventaja de permitir la combinación de esa etapa con la detección multiplexada posterior de hebras de ARN producidas en la reacción de TIV.

Será útil simplificar y acelerar el diseño de reacciones de detección y amplificación multiplexada fiables, y sustituir los procedimientos complejos para el análisis de la expresión génica (patente estadounidense n.º 5.514.545) y otras tareas de análisis de ácidos nucleicos mediante protocolos más sencillos, más robustos adecuados para el entorno clínico. Especialmente en ese contexto, también será útil desarrollar protocolos integrados, es decir, protocolos que combinan múltiples etapas de análisis, preferiblemente de manera que permita la realización de formatos de ensayo homogéneos. Será especialmente útil, para reducir el tiempo requerido para completar el ensayo, y particularmente el tiempo "invertido", para combinar la amplificación y el análisis, mediante la detección de múltiples productos de amplificación. Además, la combinación de etapas, preferiblemente de manera compatible con la realización de formatos de ensayo homogéneos, facilitará la miniaturización, lo que reducirá a su vez el consumo de reactivos así como el riesgo de contaminación, tanto de muestras como de instalaciones de laboratorio.

Una reacción de TIV, y en particular, una reacción de TIV que usa un molde monocatenario (en vez de un molde bicatenario), tal como se describe en el presente documento, ofrece muchas de estas ventajas.

De hecho, la capacidad de la ARN polimerasa de T7 para utilizar la hebra molde del promotor en forma monocatenaria y catalizar la transcripción a partir de un molde monocatenario (mmc) que produce una copia de la hebra de ADN original de interés, se ha descrito en la bibliografía (Kukarin, A. *et al*, 2003; Korencic D. *et al*, 2002;

Temiaikov D. *et al.* 2002). Sin embargo, en implementaciones prácticas de TIV (convencionales), esta reacción se ha considerado un efecto secundario adverso de la transcripción *in vitro*.

La reacción de mmc-TIV, hasta la fecha, no se ha aplicado completamente al desarrollo y la realización de protocolos analíticos complejos, principalmente debido a determinadas características generalmente no deseadas. En primer lugar, su moderado rendimiento, en comparación con el formato de TIV regular que usa moldes de ADN bicatenario (bc), limita la sensibilidad de protocolos de ensayo realizados en configuraciones convencionales que requieren un número sustancial de moléculas diana; y su escaso rendimiento en tampones incluso de fuerza iónica moderada generalmente hace que sea incompatible con otras reacciones enzimáticas posteriores y anteriores empleadas en protocolos de ensayo existentes. Sin embargo, abordando estos puntos tal como se describe a continuación, puede optimizarse la mmc-TIV para hacer que sea adecuada para numerosas aplicaciones de análisis de ácidos nucleicos, de manera que permite la integración de amplificación y detección simultánea y análisis de múltiples productos.

Bibliografía de antecedentes

Puede hacerse referencia a lo siguiente como antecedentes para ayudar a comprender determinados términos y expresiones a continuación. Se hace referencia a esta bibliografía a veces en el texto a continuación mediante el autor, número u otra designación.

- Seo, M.Y., Rha, S. Y., Yang S.H., Kim, S.C., Lee, G.Y., Park, C.H., Chung, H.C. *et al.* 2004. The pattern of gene copy number changes in bilateral breast cancer surveyed by cDNA microarray-based comparative genomic hybridization. *Int. J. of Mol Med* 13: 17-24
- Sellers, W. R. 2005. *Nature*, número del 7 de julio
- Hirsch F.R. *et al.* 2005. *J Natl Cancer Inst* 97:621-623,643-655.
- Ogino S, Wilson RB., 2004. pinal muscular atrophy: molecular genetics and diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* enero de 2004; 4(1):15-29.
- Dutta S, Nandagopal K, Gangopadhyay PK, Mukhopadhyay K., 2005. Molecular aspects of down syndrome. *Indian Pediatr.* abril de 2005; 42(4):339-44.
- Gubler, U., y Hoffman, B. (1983) *Gene* 25, 263-269
- Vet, Jacqueline A.M., Van der Rijt J. M., y Blom Henk J. 2002. Molecu beacons: colorful analysis of nucleic acids. *Expert Rev. Mol. Diagn* 2(1)
- Kukarin A., Rong M, McAllister WT. 2003. Exposure of T7 RNA polymerase to the isolated binding region of the promoter allows transcription from a single-stranded template. *J Biol Chem.* 278(4):2419-24
- Korencic D, Soll D, Ambrogelly A. 2002. A one-step method for in-vitro production of tRNA transcripts. *Nucleic Acids Res.* 30(20):e105
- Temiaikov D, Anikin M, McAllister WT. 2002. Characterization of T7 RNA polymerase transcription complexes assembled on nucleic acid scaffolds *J Biol Chem.* 277(49):47035-43).
- Patente estadounidense n.º 5.514.545. 1996. Eberwine, J. "Methods for characterizing single cells based on RNA amplification for diagnostic and therapeutics."
- Maniatis T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual* (CSHL)
- Patente europea n.º 0 368 906 B2 (Gingueras *et al*; que comenta la amplificación exponencial, isotérmica ("3SR"))
- Patente estadounidense n.º 5.399.491 (Kacian *et al*; que comenta la amplificación exponencial, isotérmica) T Kievits *et al.*, *J Virological Meth* 35 (Número 3), dic. de 1991, págs. 273 286; documento EP 273086 (que comenta NASBA)
- Krieg & Melton. 1984. Functional messenger RNAs are produced by SP6 *in vitro* transcription of cloned cDNAs, *Nucleic Acids Res* 12, 7057 - 707 (que comenta el uso de secuencias de promotor de SP6, T4, T7)
- Melton, D.A., *et al.* 1984. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter, *Nucleic Acids Res.* 12, 7035-7056.

- Solicitud de patente estadounidense US2003/0082584 A1: "Enzymatic ligation-based identification of transcript expression", Shi L., *et al.*
- 5 • Patente estadounidense n.º 5.686.243
- Syvanen AC. 2005 Toward genome-wide SNP genotyping. Nat Genet. junio de 2005; 37 Supl: S5-10.
- Patente estadounidense n.º 5.759.820 (Dynal AS) Homes E., *et al.* "Process for Producing cDNA"
- 10 • Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 sequences of nucleic acid by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 15 de junio de 2002; 30(12):e57.
- 15 • Guatelli *et al.*, "Isothermal, *in vitro* amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral amplification", Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87, 1874 - 1878 (1990)
- Kwoh *et al.*, "Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format", Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86, 1173 - 1177 (feb. de 1989) (que comenta amplificación mediada por transcripción usando ciclos térmicos)
- 20 • Patentes estadounidenses n.ºs 5.716.785; 5.891.636, y patente estadounidense n.º 5.545.522 (Van Gelder *et al.*); Van Gelder *et al.*, 1990 "Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA", PNAS 87, 1663-1667S);
- 25 • Solicitud de patente estadounidense (BioArray Solutions): "Multianalyte Molecular Analysis Using Application-Specific Random Particle Arrays" presentada el 23/8/2002, n.º de serie 10/204.799 (que comenta la detección de alineamientos codificados aleatoriamente, READ™);
- 30 • Solicitud de patente estadounidense (BioArray Solutions, denominado a veces a continuación en el presente documento "eMAP"): "Multiplexed Analysis of Polymorphic Loci by Concurrent Interrogation and Enzyme-Mediated Detection" presentada el 15/10/2002; n.º de serie 10/271.602;
- Solicitud de patente estadounidense (BioArray Solutions, denominado a veces a continuación en el presente documento "Multiplexed Expression Profiling"): "Optimization of Gene Expression Analysis using Immobilized Capture Probes," presentada el 26 de octubre de 2004, n.º de serie 10/974.036, (incluyendo un comentario en la misma relativo al análisis de la expresión génica diferencial sustractivo; en la divulgación en la presente solicitud, se producen hebras sentido y antisentido mediante la incorporación de secuencias de promotor de ARN pol);
- 35 • Solicitud de patente estadounidense (BioArray Solutions): "Multianalyte Molecular Analysis Using Application Specific Random Particle Arrays" presentada el 28 de diciembre de 2001; n.º de serie 10/032.657 ("Libraries of Encoded Magnetic Particles")
- 40 • Solicitud de patente estadounidense (BioArray Solutions): "Nucleic acid Amplification with Integrated Multiplex Detection" presentada el 2/9/2005; n.º de serie 11/218838; véanse también las solicitudes provisionales a las que se hace referencia en la misma: "Transcription Amplification System with Integrated Multiplex Detection; Functional Integration of Capture, Amplification and Multiplex Detection" presentada el 2/9/2004; n.º de serie 60/606666; "IVT-RT eMAP Assays; y Synthesis, Packaging and Screening of Random Encoded cDNA Libraries using IVT" presentada el 2/9/2004; n.º de serie 60/606666
- 45 • Solicitud de patente estadounidense (BioArray Solutions): "Multianalyte Molecular Analysis Using Application-Specific Random Particle Arrays" presentada el 23/8/2002; n.º de serie 10/204.799 (que comenta la detección de alineamientos codificados al azar, READ™);
- 50 • Solicitud de patente estadounidense (BioArray Solutions): "Multianalyte Molecular Analysis Using Application Specific Random Particle Arrays" presentada el 28 de diciembre de 2001; n.º de serie 10/032.657
- 55 • Solicitud de patente estadounidense (BioArray Solutions): "Arrays of Microparticles and Methods of Preparation Thereof," presentada el 9/7/02; n.º de serie 10/192.352
- 60 • Solicitud de patente estadounidense (BioArray Solutions denominado a veces a continuación en el presente documento "PARSETM"): "System and Method for Programmable Illumination Pattern Generation," presentada el 24/1/2001, n.º de serie 09/768.414
- 65

- Patente estadounidense n.º 6.251.691 (BioArray Solutions, denominado a veces a continuación en el presente documento "LEAPS"): "Light Controlled Electrokinetic Assembly of Particles Near Surfaces": véase especialmente la figura 8;
- Patente estadounidense n.º 6.291.170
- Patente estadounidense n.º 5.686.243
- Solicitudes de patente estadounidense 2005/0130194 y 2005/0123943
- Patentes estadounidenses n.ºs 5.283.174, 5.639.599 Arnold
- Patente estadounidense n.º 6.291.170
- Patente estadounidense n.º 6.004.745
- Patente estadounidense n.º 4.683.202
- Patente estadounidense n.º 6.797.524 BAS
- Solicitud de patente estadounidense 10/973700
- Solicitud de patente estadounidense 10/348123
- Solicitud de patente provisional estadounidense 60/628464

Sumario de la invención

Se dan a conocer el constructo cebador-promotor-selector monocatenario y los métodos mediados por transcripción *in vitro*, que usan la determinación de la abundancia de mensajes y el número de copias de alelos con constructo cebador-promotor-selector monocatenario mencionado anteriormente (un formato también denominado en el presente documento, por comodidad, TIV con molde monocatenario (mmc-TIV)) para: análisis multiplexado de la expresión génica; recuento de alelos multiplexado; análisis de polimorfismos en el número de copias del gen; y discriminación alélica para la identificación de mutaciones y polimorfismos. El constructo cebador-promotor-selector monocatenario consiste en tres partes funcionales independientes unidas de manera que se oriente la TIV para la amplificación de la secuencia de selector únicamente, en el sentido opuesto a cualquier posible extensión de cebador en 3'.

Generalmente, todos los métodos de la amplificación de la diana comienzan con la hibridación específica de diana de la parte de cebador del contrato seguida por elongación, transcripción inversa o ligamiento del cebador con otro oligonucleótido. El constructo comprende generalmente una subsecuencia de cebado específico de diana de secuencia, una subsecuencia de promotor de T7 (o T3 o SP6 u otro adecuado) (hebra molde) y una subsecuencia de selector que está provisionalmente asociada de manera única con una subsecuencia de cebado particular. En la reacción de mmc-TIV, la secuencia de promotor de T7 (u otro) está orientada para dirigir la transcripción en el sentido opuesto al de la transcripción inversa (RT) (o más generalmente elongación, en el caso de un molde de ADN; véase la figura 1). Como resultado, mmc-TIV tal como se da a conocer en el presente documento y en contraposición a formatos convencionales de TIV, amplifica una secuencia que no es parte y que está diseñada para no ser ninguna parte de la diana original. El molde de ARN para mmc-TIV puede ser un ARN mensajero (ARNm) o ARN genómico viral, o más generalmente, un producto de ARN producido por una reacción de TIV previa. Los métodos de la invención también son útiles para el análisis de ADNg, por ejemplo tras desnaturalización (para producir diana monocatenaria) y/o fragmentación (Maniatis T., 1982). El rendimiento y la eficacia de la reacción de mmc-TIV puede mejorarse usando un selector como molde de ADN monocatenario pero con una subsecuencia de promotor de T7 bicatenaria (bc) (una hebra de este tipo incorporada en el cebador (molde); la otra hibridada con la misma (que no es molde)).

Para producir un molde para mmc-TIV, puede realizarse una reacción de elongación o transcripción inversa (RT) para extender el cebador tras la hibridación con hebras diana de interés. Para facilitar la posterior separación del producto de extensión del cebador no usado, puede realizarse esta reacción con dNTP modificados, por ejemplo, dNTP modificados con biotina u otros haptenos, de modo que, tras completarse, por ejemplo, la reacción de RT, pueden capturarse productos de ADNc que contienen los dNTP modificados en una fase sólida. La etapa de separación también puede realizarse usando purificación en columna, obviando la necesidad de dNTP modificados.

En una realización, mmc-TIV puede utilizar un heterodúplex de ARN-ADN como molde en el que el ADNc producido mediante transcripción inversa usando el constructo cebador-promotor-selector permanece hibridado con el ARNm

original intacto. En una variante, la reacción de mmc-TIV puede realizarse con el heterodúplex de ARN-ADN unido a una matriz de fase sólida.

La reacción de mmc-TIV produce varios fragmentos de ARN de igual longitud y de secuencia complementaria a la subsecuencia de selector. Preferiblemente, esta subsecuencia de selector (y su secuencia complementaria) está diseñada para ser distinta a cualquier otra secuencia presente, o que se espera que esté presente, en la reacción. Puede servir como secuencia de captura única para posteriores reacciones en fase sólida, preferiblemente realizadas sobre micropartículas codificadas ("perlas") en un formato de detección de alineamientos codificados al azar (READ™) (véase la patente estadounidense n.º 6.797.524). La captura en sondas presentadas en portadores de fase sólida codificados permite la detección óptica de productos de ARN marcados mediante la incorporación de NTP modificados o la detección de productos de elongación formados mediante elongación de sondas catalizada por transcripción inversa, mediada por molde ("eMAP" véanse la solicitud estadounidense con n.º de serie 10/271.602; y la solicitud estadounidense con n.º de serie 11/218838) usando dNTP modificados; figura 1.

Los protocolos dados a conocer en el presente documento (y tal como se representan en las figuras 2, 3 y 4) permiten la simplificación sustancial, y la aceleración de aplicaciones complejas, tal como se describe adicionalmente a continuación. Estos protocolos tienen las siguientes ventajas (cuando se aplican las afirmaciones realizadas para dianas de ARN y RT, cambiando lo que se deba cambiar, a extensión de cebadores y ADN):

- sólo se usa un cebador funcional individual, y la síntesis de segunda hebra de ADN, que requieren en la práctica en una realización la digestión del molde de ARNm y la introducción de un segundo cebador y una ADN polimerasa, no es necesaria y puede eliminarse;

- la etapa de digestión de ARN con ARNasaH, requerida normalmente para permitir la síntesis de segunda hebra, también puede eliminarse; la presencia del heterodúplex de ARNm-ADNc no interfiere en mmc-TIV porque la reacción sólo usa las secuencias de T7 y de selector que no son parte del heterodúplex;

- el cebador específico de diana puede colocarse en cualquier parte a lo largo del ARNm diana de interés, sin afectar a la secuencia o longitud del transcrito, que están determinadas por la secuencia y longitud de la secuencia de selector; los transcritos son cortos para maximizar la eficacia de captura de transcritos en micropartículas codificadas (véase la solicitud con n.º de serie 10/974.036), tal como se describe a continuación; los transcritos tienen secuencias distintas, permitiendo de ese modo la detección y el recuento de diferentes genes, así como de genes dentro de familias de genes que presentan una similitud de secuencia significativa;

- la simplicidad comparativa del protocolo permite la combinación de varias etapas, tal como se describe en el presente documento en mayor detalle, incluyendo la captura, amplificación y detección multiplexada de dianas simultáneas en formatos de "un solo tubo" y homogéneos, preferiblemente usando el formato READ. La integración facilita a su vez la miniaturización, tal como se describe en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 representa, para los constructos cebador-promotor-selector descritos en el presente documento, los sentidos de RT (o elongación de cebadores) y transcripción *in vitro*, así como la detección de productos generados con o bien detección mediada por hibridación o bien detección mediada por elongación.

La figura 2 representa un método para el análisis multiplexado de la expresión génica usando los constructos y métodos descritos en el presente documento.

La figura 3 representa la detección mediada por elongación de SNP o mutaciones usando los constructos y métodos descritos en el presente documento.

La figura 4 representa la detección mediada por ligamiento de SNP o mutaciones usando los constructos y métodos descritos en el presente documento.

La figura 5 demuestra que, basándose en la señal generada tras la detección, la reacción de mmc-TIV depende de la secuencia y concentración de los constructos descritos en el presente documento.

La figura 6 muestra el transcurso temporal para la reacción de mmc-TIV para diferentes concentraciones iniciales del constructo IL-2R RT/T7/Sel y la parte de NT para el promotor de T7.

La figura 7 muestra la respuesta a la dosis de un ensayo, usando los constructos tal como se describe en el presente documento, para la detección de diferentes concentraciones de ARNm (kanamicina-ARNm).

La figura 8 muestra la eficacia del tratamiento con Exo I seguido por purificación en columna para diferentes concentraciones de constructo.

La figura 9 muestra dispositivos y métodos para captura magnética, purificación directa y purificación con membrana del producto de ensayo del exceso de constructo.

La figura 10 muestra la señal relativa generada tanto a los 100 milisegundos como a los 500 milisegundos de exposición, tras la reacción de TIV con diferentes moldes-constructos descritos en la leyenda de la figura (con y sin una parte de NT para el promotor de T7 añadido y con y sin digestión de ARNm por ARNasaH).

La figura 11 muestra un ensayo realizado usando los constructos descritos en el presente documento para la detección y amplificación de kanamicina-ARNm, incluyendo purificación en columna y eliminación de la etapa de digestión con ARNasaH de ARNm.

La figura 12 muestra los resultados para mmc-TIV en fase sólida con constructos cebador-T7-selector inmovilizados en microperlas recubiertas con estreptavidina seguida por detección mediante RT-eMAP.

La figura 13 representa múltiples tandas para un método de amplificación mediante TIV de alto rendimiento (reacciones acopladas de ligamiento - mmc-TIV) usando los constructos descritos en el presente documento.

La figura 14 muestra algunas secuencias de maíz estrechamente homólogas con sitios polimórficos mostrados en negrita.

La figura 15 Fragmentación de ADN_g con la siguiente extensión del cebador introducido.

La figura 16 muestra un alineamiento de perlas coensambladas en el que la reacción de mmc-TIV usando constructo cebador-T7-selector inmovilizado descrito en el presente documento o ADN_{bc} se lleva a cabo de modo integrado con la detección del ARN que resultó mediante elongación mediada por captura.

La figura 17 muestra los resultados de la reacción de TIV/RT simultánea usando diferentes concentraciones de ADN_{bc} biotinilado inmovilizado sobre un alineamiento de perlas coensambladas.

La figura 18 muestra un protocolo para la detección de ARN viral mediada por ligamiento.

Descripción detallada

Tal como se indicó anteriormente, los constructos cebador-promotor-selector para su uso en los métodos dados a conocer en el presente documento comprenden hasta tres subsecuencias diferentes, cada una de longitud designada, concretamente: la secuencia de cebador específica de gen, la secuencia de hebra molde para promotor de T7 (u otro), diseñada para dirigir la transcripción *in vitro* hacia el extremo 5' del constructo; y una secuencia de "selección" o "selector" única. El método de la invención dirige la TIV para que avance de modo que produzca copias de ARN de la secuencia de selector. Los transcritos de ARN se detectan mediante captura en micropartículas codificadas ("perlas") que presentan sondas que coinciden con secuencias de selector específicas. Secuencias de selector únicas hacen que los productos de la reacción sean únicos y permite la selección de amplicones específicos de un conjunto de dianas de secuencia (originalmente) similar (véase también la sección 2.2, Recuento de alelos). Todos los mensajes se "cuentan", independientemente de si la reacción de RT en la que sirven como moldes produce producto de ADN_c de longitud completa o sólo parcial, reflejando esto último reacciones de RT abortadas. Preferiblemente, para la detección de mensajes específicos dentro de un contexto de mensajes similares, así como para la detección de mutaciones o polimorfismos, se usan pares de constructos específicos de alelo de modo que sólo una secuencia de cebador coincidente en el constructo media en la elongación y formación de los transcritos amplificados. Este enfoque es particularmente útil para la detección y el análisis de un subconjunto designado de ARNm, ARN/ADN genómicos virales, alelos y genes.

1. Transcripción *in vitro* usando constructos cebador-promotor-selector - propiedades generales

El ejemplo I ilustra el rendimiento de mmc-TIV en condiciones de reacción relevantes, usando un constructo que comprende cebador de RT específico de secuencia, el promotor de T7 y una subsecuencia de selector que está asociada de manera única con el cebador de RT. Tal como se muestra, la reacción de mmc-TIV presenta una respuesta a la dosis específica de secuencia, con un límite de detección, en el sistema modelo, de ~1 fmol de cebador/rxn (en este caso, como en otras partes, a menos que se establezca de otro modo, el volumen de la reacción ("rxn") es de 10 µl). La adición de hebra que no es molde aumenta la intensidad de señal ~10 veces a lo largo de un intervalo significativo de concentración de diana, pero no tiene ningún efecto sobre el límite de detección (figura 5). Por tanto, las intensidades de señal obtenidas en el ensayo permiten que se realice la mmc-TIV o bien con, o bien sin, la adición de la hebra que no es molde del promotor de T7, dependiendo de los requisitos de aplicaciones específicas.

En la figura 6, se muestra el transcurso temporal de la reacción de mmc-TIV, ilustrado para ADN_{mc} de IL-2R RT/T7/Sel + NT T7 que produce ARN cortos. La reacción es muy rápida inicialmente, y se completa en gran medida en el plazo de ≤2 horas, aunque se observa una mejora adicional en el rendimiento para bajas concentraciones del

molde (1 fmol/rxn) tras 4 h de incubación.

2. Análisis de ARN

5 2.1 Recuento de ARNm: determinación de la abundancia de mensajes

10 El método de la invención permite la realización de un formato para la obtención rápida de perfiles de expresión génica; es decir, la determinación simultánea de las abundancias respectivas de un conjunto de mensajes designados (normalmente en presencia de otros mensajes). Esto será de particular interés para aplicaciones que implican la monitorización o la obtención de perfiles de patrones de expresión de un conjunto de genes específicos en respuesta a estímulos externos tales como agentes terapéuticos o infecciosos.

El actual protocolo incluye 4 etapas (figura 2):

- 15 1. Síntesis de ADNc (mediante transcripción inversa) usando constructos de RT cebador/T7/selector
2. Retirada de constructos no usados, en un modo, mediante captura de ADNc
3. La amplificación lineal de secuencias de selector correspondientes a ADNc individuales
- 20 4. Detección en chip de productos de ARN mediante transcripción inversa/hibridación

Alternativamente, pueden combinarse las etapas 3 y 4:

- 25 3. Amplificación/detección simultáneas usando un alineamiento “coensamblado” de micropartículas, tal como se describe en mayor detalle a continuación.

30 El ejemplo II demuestra la sensibilidad del ensayo usando el modelo kanamicina-ARNm a lo largo de un intervalo de concentración de diana de desde 1300 fmol/rxn hasta 0,1 fmol/rxn. Esta variante del ensayo emplea purificación en columna (no separación magnética) y por tanto no requeriría dNTP biotinilados (o modificados de otro modo) para la síntesis de ADNc. El ensayo, en este formato, demuestra una respuesta a la dosis con un límite de detección de 0,1 fmol/rxn (figura 7).

35 Retirada de cebador no usado (“limpieza”) – el constructo cebador-promotor-selector no usado debe retirarse cuidadosamente antes de iniciar la mmc-TIV para impedir la formación de transcritos a partir de cebadores no usados solos. Es decir, dependiendo de la cantidad de remanente, la mmc-TIV puede producir una señal independiente de diana cuya intensidad puede limitar la sensibilidad del ensayo.

40 Además, el uso de dNTP biotinilados (o unidos con hapteno de otro modo) para la síntesis de ADNc requiere la retirada de nucleótidos no usados antes de la captura sobre partículas recubiertas con estreptavidina (o hapteno-AC) magnéticas o no magnéticas.

45 La retirada de dNTP también es deseable para mejorar el grado de incorporación de dNTP marcados de manera fluorescente durante una reacción de RT-eMAP en chip posterior (que tienden si no a excluirse en favor de dNTP no marcados) y por tanto para potenciar la intensidad de señal del ensayo.

50 Varios métodos de purificación se proporcionan en el presente documento. En un enfoque convencional, se combina un tratamiento con exonucleasa, para digerir el cebador de RT en exceso, con un tratamiento con fosfatasa alcalina, para retirar los dNTP antes de la reacción de TIV (usando, por ejemplo ExoSap-IT, n.º 78200, USB).

En otro enfoque, pueden retirarse los cebadores y NTP en exceso de la reacción mediante purificación en columna (véase también el ejemplo II). Para garantizar la separación eficaz de cebadores del ADNc o producto de elongación, los cebadores deben ser sustancialmente más cortos que los productos.

55 En el tercer enfoque, la purificación en columna puede combinarse con la digestión con Exo I del constructo. En el ejemplo III, se muestra la eficacia de retirada del cebador no usado usando una combinación de tratamiento con exonucleasa I y purificación en columna. Los resultados sugieren que la concentración óptima de cebador en las versiones actuales de los protocolos de ensayo no debe superar los 100 fmol/rxn. El tratamiento con Exo I mejora la relación señal/ruido (mediante la reducción adicional de la concentración residual de cebador de RT) pero no aumenta la concentración admisible de cebador.

60 Otro método de retirada del constructo en exceso es mediante captura en perlas magnéticas, y separación de las perlas mediante atracción magnética. Este método tiene la ventaja adicional de facilitar la integración de TIV y elongación en un formato “en chip”.

La separación magnética puede realizarse en al menos tres (3) diferentes configuraciones directas, tal como se

muestra en la figura 9, concretamente usando una “punta sobre imán,” un dispositivo de nanoseparación (Pall, véase el catálogo) o una nanorreactor (tal como se representa en la figura 9). Los protocolos de mmc-TIV que invocan separación magnética usan una mezcla de dNTP biotinilados y no modificados para la síntesis de ADNc, seguida por captura del producto biotinilado usando nanopartículas magnéticas recubiertas con estreptavidina. Otra (cuarta) configuración para la limpieza de perlas magnéticas es recoger las perlas mediante centrifugación de 1 ml de tampón de lavado en tubos de 1,5 ml normales, luego colocar los tubos junto a un imán para elevar el sedimento a lo largo de la pared del tubo, luego retirar todo el tampón de lavado del fondo del tubo; y repetir este procedimiento 2-3 veces hasta completar la retirada del cebador.

La unión de ADNc a una matriz en fase sólida, incluyendo perlas y micropartículas, justo tras la síntesis de ADNc en el actual protocolo, permite la separación, purificación y concentración significativa del ADNc en un pequeño volumen, y por tanto tiene el potencial de aumentar la sensibilidad del ensayo.

Las partículas pueden ser de cualquier tipo adecuado (véanse, por ejemplo, las solicitudes estadounidenses con n.º de serie 10/973.700; 10/348.123), incluyendo partículas de captura magnéticas (véase, por ejemplo, la solicitud estadounidense con n.º de serie 10/032.657), que permite que el producto de elongación, unido a la partícula, se concentre cerca o sobre una superficie de sustrato mediante la aplicación de un campo magnético.

El formato de ensayo de la presente invención ofrece las siguientes ventajas, tal como se describe a continuación:

Flexibilidad de diseño – al permitir la colocación de las secuencias de cebado en cualquier parte a lo largo del ARNm, la reacción de mmc-TIV dada a conocer en el presente documento elimina el requisito de colocación del cebador cerca del extremo 5' del ARNm de interés, para limitar el tamaño del producto que va a detectarse mediante detección en chip tal como se describe en la solicitud estadounidense con n.º de serie 10/974.036, o cerca del extremo 3', tal como se requiere por los métodos de expresión génica convencionales, mejorando por tanto la flexibilidad de diseño. Además, mediante la producción de transcritos que difieren en las secuencias independientemente del grado de similitud en las secuencias diana originales, la especificidad del análisis multiplexado se potencia sustancialmente.

Transcritos cortos de secuencia específica - el cebador específico de diana puede colocarse en cualquier parte a lo largo del ARNm diana de interés, sin afectar a la secuencia o longitud del transcrito que están determinadas por la secuencia y longitud de la secuencia de selector; para maximizar la eficacia de captura de transcritos en micropartículas codificadas (véase la solicitud estadounidense con n.º de serie 10/974.036), tal como se describe a continuación, los transcritos son preferiblemente cortos.

La secuencia específica y única de secuencias de selector de mmc-TIV en los constructos, y el uso de diseños de cebador y el ligamiento de constructos (tal como se describe en el presente documento) permite la introducción de disimilitud de secuencia significativa entre mensajes homólogos para permitir la distinción entre la expresión de genes similares. Esto es una característica de diseño que es especialmente beneficiosa para el análisis de genes específicos dentro de familias de genes; por ejemplo, recuento de copias de gen; y la distinción de un conjunto de mensajes de citocinas o mensajes de familias de genes del maíz.

Eliminación de la síntesis de segunda hebra - un aspecto problemático de protocolos actuales para el análisis de la expresión génica es la necesidad de la síntesis de ADN de segunda hebra, que requiere a su vez la digestión (o retirada) del molde de ARN. Aunque la actividad de ADN polimerasa de determinadas transcriptasas inversas puede catalizar la síntesis de ADN, en la práctica, debe añadirse una ADN polimerasa a la reacción tras la digestión del ARNm. Un protocolo ampliamente usado (patente estadounidense n.º 5.545.522; patente estadounidense n.º 5.514.545; Gubler, V., 1983) se basa en cebado al azar, pero requiere la adición de una ligasa, llevando el número requerido de enzimas a tres (antes de la adición de la ARN polimerasa para TIV). Sin embargo, particularmente si se proporciona el conjunto designado de mensajes de interés, los métodos de la presente invención permiten una simplificación sustancial del protocolo.

La unión de la ARN polimerasa y su avance hacia el extremo 5' del constructo se producen con eficacia sustancial incluso en ausencia de una secuencia de promotor bicatenaria. Es decir, tras la síntesis de primera hebra (ADNc) y la retirada del cebador no usado, preferiblemente mediante captura del ADNc en una fase sólida, o mediante purificación en columna, la reacción de TIV produce copias de la secuencia de selector. Preferiblemente, la hebra de T7 que no es molde (NT) puede añadirse como parte del tampón de TIV para potenciar el aumento de amplificación en un factor de ~10, reflejando posiblemente un aumento de la afinidad de unión de la ARN polimerasa cuando se encuentra con la secuencia de promotor bicatenaria.

Eliminación de la digestión con ARNasaH – en el actual protocolo para el análisis de la expresión génica, el molde para mmc-TIV forma parte del constructo de cebador de RT y permanece en forma monocatenaria tras la síntesis de ADNc. El ejemplo IV demuestra el experimento realizado para determinar si podría omitirse la etapa convencional para la digestión con ARNasaH de ARN, requerida por lo demás en una reacción de TIV bicatenaria convencional para permitir la síntesis de ADNc de segunda hebra. Usando un constructo modelo para la reacción de mmc-TIV (figura 10) y el protocolo de ensayo completo (figura 11), los experimentos descritos en el ejemplo IV demuestran

que la presencia del heterodúplex de ARN/ADN adyacente al promotor de T7 no interfiere en la hibridación de la hebra NT con la hebra de promotor molde y no tiene ningún efecto sobre la síntesis de ARN, lo que sugiere que la digestión con ARNasaH puede eliminarse del protocolo, y proporciona una simplificación del ensayo sustancial adicional.

TIV en fase sólida - La TIV en fase sólida permite la implementación de etapas de "limpieza" magnética, tal como se describe en el presente documento, tras transcripción inversa (o más generalmente elongación de cebadores) para retirar cebador no usado. Además, la captura magnética usando, por ejemplo, trampas magnéticas de diseño adecuado (véanse, por ejemplo, tres tipos de inductores micromecanizados, concretamente, de tipo espiral, Ahn *et al*, J. Micromech. Microeng. 3, 1-9, (1993), de tipo solenoide, Ahn *et al*, IEEE Transactions Comp., Packag. Manufact. Technol 17, 463-469 (1994) y de tipo meandro toroidal, Ahn *et al*, IEEE Trans. Indus. Elec 45, 866-875 (1998)) permiten el confinamiento de los transcritos en una disolución de volumen mínimo. Antes de la captura de ADNc biotinilado (y con el mismo, el ARN diana hibridado) en partículas magnéticas recubiertas con estreptavidina, se retiran preferiblemente los dNTP biotinilados no incorporados (por ejemplo mediante tratamiento con fosfatasa alcalina o mediante purificación en columna) para potenciar la eficacia de captura que se ve alterada si no por la competencia de los dNTP biotinilados.

El ejemplo V proporciona una comparación de la eficacia de reacciones de mmc-TIV realizadas en disolución y realizadas sobre la fase sólida, usando un compuesto modelo de cebador de RT de ADNmc biotinilado. Se observa que la mmc-TIV en fase sólida, en las condiciones seleccionadas, tiene un rendimiento de aproximadamente la mitad que el de la reacción en disolución (figura 12). Sin embargo, la intensidad de señal producida por la reacción en fase sólida, obtenida a una concentración de 10 fmol/ul del compuesto modelo, muestra que la reacción es suficientemente eficaz para usarse como parte de un protocolo de ensayo integrado.

Amplificación por TIV de dos etapas - otro aspecto de la invención es la aplicación de mmc-TIV en múltiples tandas de amplificación con etapas intermedias de ligamiento, saltándose por tanto la síntesis de ADNc convencional (véase la patente estadounidense n.º 5.514.545) (figura 13). Este método puede aplicarse a la detección de ARNm con síntesis de segunda hebra y ADNc previa, así como al análisis de ADN genómico. Inicialmente, en este método, se usa PCR para amplificar la secuencia de interés con la introducción de la región de promotor de T7 en un extremo y, opcional, la secuencia de sel en el otro extremo del producto de PCR.

Tras eso, el ARN se produce mediante una reacción de TIV convencional con el aumento en el intervalo de 10^2 a 10^3 , mientras que puede usarse TIV convencional como método de selección de hebra de amplicón con respecto a qué cebador particular contiene la secuencia de promotor de T7 (tal como se describe en la solicitud en tramitación de titularidad compartida presente con n.º de serie 11/218838). El ARN resultante puede usarse a continuación como molde para la hibridación de oligonucleótidos de promotor y oligonucleótidos de selector (tal como se muestra en la figura 4, primera versión) seguida por ligamiento. El constructo promotor-selector resultante, amplificado por medio de mmc-TIV, produce un aumento adicional en el intervalo de 10^2 a 10^3 . Por tanto, el ARN original puede amplificarse en 10^5 - 10^6 y detectarse por medio de una secuencia de selector correspondiente.

Análisis del perfil de expresión "muestra-control" diferencial. Los métodos convencionales para análisis de expresión se basan siempre en la comparación de la muestra de interés de "célula/tejido enfermo/alterado o de caso" con una muestra "control o normal" de referencia, o en diferencias en plantas transgénicas frente a normales. Esta invención también cubre la determinación de la expresión génica relativa usando las ventajas de mmc-TIV. Los métodos convencionales para el análisis de la expresión génica relativa se basan en la determinación de intensidades de razones de diferente señales, obtenidas tras la etapa de ensayo, tanto para muestras de "caso" como "control" (patente estadounidense n.º 6.110.426).

La misma estrategia puede aplicarse a la monitorización de la expresión génica relativa. Puede lograrse una tinción bicolor diferencial mediante la incorporación de diferentes NTP fluorescentes en productos de ARN de "caso" y ARN "control" durante reacciones de mmc-TIV independientes, seguida por la detección bicolor de los productos mediante captura por hibridación (figura 1). Alternativamente, diferentes secuencias de "selector" pueden diseñarse para productos de ARN de "caso" y "control" para reacciones de mmc-TIV independientes usando detección monocolor.

Otra posibilidad para determinar el perfil de expresión génica relativa es usar un método de detección sustractiva monocolor (patente estadounidense n.º WO2005042763, BAS). Para ello, las secuencias de selector para "caso" y "control" han de diseñarse como complemento inverso y pueden formar un dúplex bicatenario. En la etapa de ensayo de la detección de productos de ARN (concretamente, ARN y ARNa), dos reacciones independientes para muestras de caso y normales se mezclan entre sí en condiciones que permiten la formación de dúplex de ARN-ARN. El exceso de producto de ARN o ARNa puede capturarse en sondas de captura sentido y antisentido apropiadas sobre perlas en un alineamiento individual coensamblado, y la detección del producto puede realizarse o bien mediante RT-eMAP o bien mediante hibridación, como en la figura 1, mostrando por tanto sub o sobreexpresión de un gen o conjunto de genes particular en muestra de "caso".

2.2 Recuento de alelos

La transcripción inversa específica de alelo o el ligamiento específico de alelo pueden combinarse con mmc-TIV para el recuento de alelos multiplexado, por ejemplo, para determinar selectivamente el patrón de expresión de genes designados en presencia de genes similares y para la detección de polimorfismos alélicos (Syvanen A.C., 2005).

2.2.1 Análisis mediado por transcripción inversa

La transcripción inversa específica de alelo se combina con TIV en un protocolo de ensayo que comprende las siguientes cuatro etapas (figura 3):

1. Hibridación de cebador de transcripción inversa específica de alelo, con T7/selector y síntesis de ADNc mediante transcripción inversa; (en caso de análisis de ADN: extensión de cebadores usando ADN polimerasa);
2. Retirada de cebador no usado (usando uno de los métodos disponibles descritos en el presente documento);
3. Transcripción de la secuencia de selector; y
4. Detección en chip del ARN resultante mediante transcripción inversa o hibridación.

Los principios del método se asemejan a los ilustrados en el ejemplo II, excepto en que ahora, el extremo 3' del cebador específico de diana está diseñado para alelos específicos de manera que se produce extensión de cebadores sólo si el cebador y la diana coinciden en (y están cerca de) el extremo 3' de la secuencia de cebador. En una realización preferida, un par de cebadores que difieren en la composición en el extremo 3' pueden usarse para discriminar entre dos alelos.

2.2.2 Análisis mediado por ligamiento

El ligamiento específico de alelo usando un molde de ARN (patente estadounidense n.º 5.686.243, solicitud de patente estadounidense n.º 2003/0082584 A1) se combina con TIV para garantizar la amplificación lineal específica de alelo en un protocolo que comprende las siguientes cuatro etapas (figura 4):

1. Hibridación de dos sondas de oligonucleótido, una el "promotor", la otra el "selector", con el molde de ARNm, inmediatamente adyacente al sitio de interés variable designado;
2. Ligamiento de las sondas para producir un constructo promotor-selector intacto;
3. Transcripción de la secuencia de selector;
4. Detección en chip del ARN resultante mediante transcripción inversa o hibridación.

Oligonucleótidos de "promotor" y "selector" - Para cada diana de interés, se diseñan los dos oligonucleótidos para coincidir con el molde en ambos lados del sitio de interés. El ligamiento (mediante ADN ligasa de T4 o ADN ligasa de Taq, New England Biolabs) de los oligonucleótidos de promotor y selector produce un constructo promotor-selector intacto. El constructo intacto se produce sólo si o bien la secuencia de oligonucleótido de promotor, en su extremo 5', o bien la secuencia de oligonucleótido de selector, en su extremo 3', coincide con la secuencia diana en el sitio de interés. El constructo promotor-selector sirve como molde para la reacción de mmc-TIV, que produce copias de ARN de selector, que entonces se detecta. Es decir, alelos de diana distintos del alelo de interés, no mediarán en la formación de un constructo promotor-selector de TIV intacto y por tanto no se contarán. Por tanto, el método permite el recuento de secuencias de ARNm específicas en presencia de otras secuencias de ARNm que difieren de las de interés en tan sólo un nucleótido individual, como en el caso de determinadas familias de genes en híbridos de maíz demostrados en el ejemplo VI (véase la figura 14) y más generalmente en el caso de otras familias de genes. A la inversa, si todos los alelos van a contarse, pueden proporcionarse múltiples oligonucleótidos de cebadores degenerados para coincidir con alelos normales o variantes en el sitio designado.

Generalmente, en este formato, el molde de ARN debe retirarse o digerirse (mediante métodos convencionales) antes de iniciar la mmc-TIV. Como con el recuento de ARNm, la eficacia de la reacción se mejora mediante la adición de la hebra que no es molde del promotor (preferiblemente como parte del tampón de la reacción de TIV). Una ventaja importante de este método es que elimina la necesidad de una etapa de purificación: el cebador no usado no se conectará a la subsecuencia de selector y por tanto no se detectará.

Otra alternativa es usar ligamiento en vez de transcripción inversa para introducir un resto de captura tal como biotina en una hebra molde de mmc-TIV mediante la unión de un constructo cebador-promotor-selector con un segundo oligonucleótido de "captura" que contiene el resto de captura en su extremo 3' (tal como se muestra en la figura 4; segunda versión). Como con el recuento de ARNm, este formato requerirá la retirada del cebador no usado.

El constructo biotinilado resultante puede usarse con el fin de concentración tras el ligamiento en pequeño volumen

o para la colocación del constructo en un alineamiento coensamblado junto con perlas de detección.

3. Análisis de ADN

Los métodos de la invención se adaptan fácilmente para el análisis de ADNg o amplicones producidos mediante PCR. En la realización preferida, un constructo cebador-promotor-selector se dirige contra una subsecuencia de ADN de interés. Entonces, en condiciones (por ejemplo desnaturalización de ADNbc diana mediante calentamiento) que permiten la hibridación del constructo con ADN monocatenario, el constructo se extiende en una reacción catalizada por ADN polimerasa cuando coincide en o está cerca del extremo 3' (figura 3).

Como alternativa, para introducir la secuencia de T7 en ADNg (o amplicones de ADN), la diana bicatenaria se degrada en primer lugar químicamente (Maniatis T., 1982) dejando extremos 3' cohesivos para una posible hibridación del constructo específico de diana. Entonces, por medio de versiones de desplazamiento de hebra de una ADN polimerasa, se extiende el cebador, introduciendo por tanto la secuencia de T7 (figura 15). Tras la retirada del cebador no usado específico de diana, se usa el producto elongado para amplificación mediante mmc-TIV de la subsecuencia de selector, seguida por detección tal como se muestra en la figura 3.

3.1 Análisis de polimorfismo en el número de copias del gen

Se sabe que la presencia de múltiples copias de cromosomas y genes está asociada con varios trastornos, por ejemplo: síndrome de Down (Dutta S., 2005) y atrofia muscular espinal (AME) (Ogino S., 2004) así como con varios tipos de cáncer: cáncer de mama (Seo, M. Y., *et al*, 2004), cáncer de piel (Sellers, W. R. 2005) y otros. El número de copias del gen puede predecir la respuesta del paciente al tratamiento con un fármaco particular, por ejemplo, tratamiento de cáncer de pulmón con gefitinib (Hirsch F.R. 2005). Por tanto, son deseables formatos de análisis rápidos y cómodos para aplicaciones clínicas de rutina.

Cuando sólo un gen individual o un pequeño número de alelos es de interés, tal como es de manera frecuente el caso en la práctica, los métodos de la invención se usan preferiblemente en combinación con detección de producto de ARN en disolución. Para ello, una variedad de métodos convencionales están disponibles, incluyendo el uso del formato de protección de hibridación (véase, por ejemplo, Arnold *et al.* en las patentes estadounidenses n.ºs 5.283.174 y 5.639.599) o el uso de un formato de transferencia de energía por fluorescencia usando balizas moleculares (Vet *et al.*, 2002) o sondas en "configuraciones en bucle cuya transformación tras la hibridación de transcritos produce un cambio en la fluorescencia (véase la solicitud de patente estadounidense con n.º de serie 11/218838; presentada el 2/9/2005).

En una realización preferida, se añaden alícuotas que contienen cantidades crecientes de una muestra de referencia (con número de copias conocido) a una cantidad preseleccionada de la muestra clínica de interés, y la ordenada en el origen de la representación gráfica resultante de la intensidad frente a la cantidad de muestra de referencia con el eje de intensidad indica el número de copias del gen en la muestra clínica.

La sensibilidad de detección aumenta cuando balizas moleculares o sondas "en bucle" (véase también la solicitud estadounidense con n.º de serie presentada el 16/11/2004; n.º de serie 60/628464 relativa a "sondas en bucle") se presentan en portadores de fase sólida tales como micropartículas; micropartículas magnéticas pueden proporcionar ventajas adicionales. Cuando se combinan con estos métodos de detección, los métodos de la invención también permiten la monitorización en tiempo real de la reacción de amplificación.

3.2 Discriminación alélica

Pueden analizarse sitios variables en una secuencia de ADN que representan mutaciones o polimorfismos usando los métodos de análisis específicos de alelo descritos en el presente documento, usando cebadores específicos de alelo para extensión catalizada por ADN polimerasa. De manera similar, los métodos de análisis mediado por ligamiento descritos anteriormente para análisis de ARN se adaptan fácilmente para el análisis de ADN, usando ADN monocatenario como molde para el ligamiento. La principal diferencia de la discriminación de SNP y alelos mediada por ligamiento (Schouten JP., 2002) es la aplicación de la reacción de TIV en vez de PCR para amplificar constructos tras el ligamiento. Como con el análisis de ARN, el método mediado por ligamiento tiene la ventaja significativa de eliminar la necesidad de la retirada de sondas de oligonucleótido y cebadores, facilitando por tanto la realización de formatos de ensayo homogéneos. Esto será especialmente deseable cuando se aplican los métodos de la invención al examen de patógenos, incluyendo la detección e identificación de patógenos virales, especialmente cuando se combinan con la concentración de ARN viral con posterior amplificación y detección, tal como se describe en mayor detalle a continuación.

4 Integración de etapas del protocolo

4.1 TIV con detección simultánea de productos: alineamiento de perlas coensambladas

También se describen en el presente documento métodos para combinar la amplificación lineal de ADNg, ADNc o

ARN para generar productos de ARN y la detección simultánea de estos productos usando un formato paralelo de detección, preferiblemente detección de alineamientos codificados al azar (READ™).

Pueden detectarse transcritos de ARN de a-sel cortos producidos mediante mmc-TIV a medida que están produciéndose, por ejemplo mediante transcripción inversa en fase sólida para elongar las sondas de captura o mediante captura en balizas moleculares (citado anteriormente) o sondas en configuraciones "en bucle", cuya transformación tras la hibridación de transcritos produce un cambio en la fluorescencia (Vet, J.A.M., 2002). Para potenciar la eficacia de captura en las condiciones de baja fuerza iónica que permiten una TIV eficaz, pueden usarse ventajosamente sondas de captura de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (véase la solicitud con n.º de serie 10/227.012).

Tal como se indicó anteriormente, la integración de mmc-TIV con posterior detección multiplexada eliminará las etapas adicionales en el protocolo de ensayo, potenciando de ese modo la velocidad, reduciendo el consumo de reactivos y reduciendo el potencial de contaminación de las muestras y el error que surge de la manipulación de las muestras. La combinación de análisis y detección directamente en chip, preferiblemente en un compartimento cerrado, será particularmente deseable. Para ello, esta invención da a conocer formatos de amplificación mediante TIV en chip y detección del ARN resultante simultáneas por medio de transcripción inversa

En una realización, un alineamiento al azar de perlas codificadas se coensambla para contener perlas que presentan sondas de captura molde así como sondas de análisis de producto. Tal como se ilustra en la figura 16, un alineamiento coensamblado de este tipo puede incluir perlas recubiertas con neutravidina (o perlas magnéticas) para capturar ADNc biotinilado (o perlas que presentan otros restos de captura, por ejemplo anticuerpos, dirigidos contra haptenos correspondientes incorporados en la hebra diana de ADNc), y perlas codificadas que presentan sondas de oligonucleótido con secuencias de selector para permitir la detección de hebras de ARN específicas producidas en la reacción de mmc-TIV para permitir la detección (por ejemplo, tras elongación con nucleótidos marcados).

Una de las posibles implementaciones para la amplificación y detección en chip simultáneas se describe en el ejemplo VII. Tal como se muestra en la figura 17, la reacción simultánea muestra una respuesta a la dosis, con un límite de detección de 1 fmol/ul de un ADNc biotinilado modelo aplicado al chip. Tal como se demostró previamente, la TIV en fase sólida puede realizarse también usando moldes monocatenarios. Estos resultados demuestran la viabilidad de combinar mmc-TIV con elongación de sondas mediada por RT para la detección, en un formato que permite que se miniaturice la reacción y se configure en compartimentos sellados. Este formato de coensamblaje permite que se realice mmc-TIV con análisis del producto simultáneo (tras la captura del ADNc u otros moldes de TIV o mmc-TIV tales como el par de sondas de oligonucleótidos ligadas) en un volumen de reacción total de menos de 1 microlitro, y más preferiblemente de menos de 50 nanolitros (usando, por ejemplo, una configuración tal como la mostrada en la solicitud estadounidense con n.º de serie 11/218838, presentada el 2/9/2005)

4.2 Captura, amplificación y detección multiplexada de ARN

La simplicidad comparativa del protocolo permite la integración de etapas adicionales, especialmente la captura de ARNm en partículas magnéticas según protocolos convencionales (patente estadounidense n.º 5.759.820), con mmc-TIV y detección multiplexada. Tal como se ilustra en la figura 18 para el análisis de ARN mediado por ligamiento (en este caso en particular, la detección de ARN genómico viral, véase también anteriormente), se permite que se hibriden dos constituyentes del constructo promotor-selector con subsecuencias coincidentes de las hebras de ARNm (o ARN viral) capturado, y, tras ligamiento, se realizan la amplificación y detección simultáneas sobre perlas codificadas de manera análoga al formato de alineamiento coensamblado descrito anteriormente, sin la necesidad de retirada del promotor no usado. De hecho, el ligamiento, la mmc-TIV y la elongación de sondas mediada por RT puede realizarse en el mismo tampón.

El uso de partículas magnéticas para la captura de diana en disolución, seguida por coensamblaje de un alineamiento de micropartículas codificadas, o la deposición mediada por campo magnético de las partículas de captura magnéticas sobre un alineamiento de perlas codificadas ya ensamblado para el análisis del producto, permitirá la concentración de las hebras de ARN originales en un pequeño volumen, en el que los productos de la posterior amplificación mediante mmc-TIV permanecen confinados.

Los métodos y dispositivos de la invención se describen e ilustran adicionalmente en los siguientes ejemplos.

Ejemplo I. Caracterización de la reacción de mmc-TIV: respuesta a la dosis y transcurso temporal.

Se usaron dos constructos diferentes, de 64 y 62 nt de longitud, y que comprenden respectivamente secuencias de cebado de RT para ARNm de IL-2R e IL-4I, así como la hebra molde de promotor de T7, y una secuencia de sel única, como molde para mc-TIV, con o sin la adición de la hebra que no es molde del promotor de T7. Para dilucidar la posible sensibilidad de este enfoque, se variaron las concentraciones de estos cebadores en el intervalo de 100 - 0,1 fmol/10 µl de rxn. Se usó el ARN obtenido (mediante el kit de T7 MEGAscript™, Ambion, n.º de cat. 1354) durante 2 h de incubación a 37°C para la transcripción inversa en chip, seguida por la detección de la señal resultante sobre perlas codificadas que se funcionalizaron con secuencias de captura que coinciden con los

selectores de IL-2R e IL-4I (figura 5). El transcurso temporal para la reacción de TIV para ADNmc de IL-2R se ha realizado de la misma manera (figura 6) con tiempos de incubación de 2, 4, 6 y 18 horas a 37°C.

Ejemplo II: Sensibilidad del ensayo usando purificación en columna: kanamicina-ARNm

La primera etapa en el ensayo es la síntesis de ADNc. Se diseñó el constructo - cebador de RT que consiste en secuencias de RT/T7/Sel, de 64 nt de longitud, para generar ADNc de ~500 nt de longitud. Los reactivos usados fueron los siguientes:

Kanamicina-ARNm, un control positivo (Promega, n.º de cat. C1381)

Sistema de síntesis de primera hebra Superscript™ III (Invitrogen, n.º de cat. 18080-051)

Kit de T7 MEGAshortscript™ (Ambion, n.º de cat. 1354)

dCTP marcado con Cy3 (Amersham, n.º de cat. PA53021)

BeadChip™ de BAS (BioArray Solutions, Ltd)

Kit de purificación de PCR (Qiagen, n.º 28104)

Se llevaron a cabo todas las reacciones en un termociclador.

Para abordar la respuesta a la dosis, se prepararon las siguientes diluciones de ARNm usando agua DEPC tratada con RNase Out (14 µl de RNase out 40 U/µl + 266 µl de agua DEPC): 1300, 100, 10, 1 a 0,1 fmol/µl.

Se realizó la síntesis de ADNc mediante ensamblaje de la mezcla 1: 1 µl de constructo RT/T7/Sel 0,1 µM, 1 µl de ARN (diferentes concentraciones), 2 µl de tampón FS 5x, 6 µl de agua DI tratada con DEPC. Se incubaron los tubos a 65°C durante 5 minutos seguido por 10 minutos de incubación a 4°C. Durante la incubación, se añadió la siguiente mezcla 2 a cada tubo: 2 µl de tampón FS 5x, 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM, 1 µl de enzima Superscript III (200 U/µl), 4 µl de agua DI tratada con DEPC. Se realizó la reacción de RT a 50°C durante 60 minutos y se desactivó la enzima a 85°C durante 5 minutos seguido por 10 minutos de incubación a 4°C. Se purificaron 10 µl de mezcla de ADNc final en una columna usando un kit de purificación de PCR de Qiagen, según las instrucciones del fabricante.

Se añadió 1 µl de ADNc purificado a 10 µl de mezcla de TIV que contiene 1 µl de cada NTP 75 mM, 1 µl de tampón de reacción 10X de T7, 1 µl de mezcla enzimática de T7, 1 µl de la parte de NT para T7 0,1 µM, 2 µl de agua DI tratada con DEPC, y se incubó durante 2 h a 37°C.

Se detectaron los productos de ARN mediante una etapa de marcaje de transcripción inversa en chip tal como sigue: se mezclaron 10 µl de la reacción de TIV que resultó con 10 µl de mezcla de RT: se pusieron 1 µl de enzima Superscript III (200 U/µl), 2 µl de tampón FS 5x, 1 µl de DTT 0,1 M, 2 µl de dNTP 10 µM (sin dCTP), 1 µl de Cy3-dCTP 25 µM, 3 µl de agua DI tratada con DEPC y 20 µl del producto encima del chip de perlas ensambladas con perlas de detección que contienen sondas para la secuencia de Sel. Se incubó el chip durante 15 min a 50°C, se lavó 3 veces con 20 µl de agua DI tratada con DEPC y se obtuvieron imágenes. En la figura 7, se muestran los resultados.

Ejemplo III: Purificación

Se realizaron experimentos para determinar el intervalo de concentraciones óptimas de constructo RT realizando la reacción con diferentes concentraciones de constructo usando una combinación de purificación en columna y digestión con Exo I. Específicamente, se colocó la mezcla de reacción en una columna (Qiagen, n.º de cat. 28104), o bien con, o bien sin tratamiento con Exo I previo. Tras purificación en columna, se usaron 2 µl de alícuota de eluato directamente en la reacción de mmc-TIV, y se detectaron los productos de ARN por medio de elongación de sondas mediada por RT en chip (figura 8). Se realizó el tratamiento con Exo I en 10 µl de mezcla de reacción que consistía en 1 µl de constructo (diferentes concentraciones), 1 µl de Exo I (New England Biolabs (NEB), n.º de cat. M0293S), 2 µl de tampón FS 5x (véase el ejemplo II) durante 30 min a 37°C seguido por inactivación de Exo I durante 20 min a 80°C. Se usó el tampón FS para reproducir las condiciones reales del tratamiento con Exo I del ensayo, aunque las condiciones de tampón óptimas para digestión se proporcionan mediante tampón Exo I 10x (NEB).

Ejemplo IV: Eliminación de la etapa de digestión con ARNasaH

En primer lugar se examinó la necesidad de la digestión con ARNasaH en un sistema modelo en el que se supuso que la configuración de los oligonucleótidos hibridados con ARN se asemeja a la configuración en el ensayo real. Se obtuvo el constructo como resultado de la hibridación constructo RT/T7/Sel con ARN de IL-2R de 50 nt de longitud,

hibridándose sólo la parte de RT del constructo con ARN. Tras la reacción de mmc-TIV, se detectó el producto en chip mediante transcripción inversa. Se muestran diferentes condiciones en la leyenda de la figura 10. Se realizó la digestión con ARNasaH (1 µl de 2 U/µl, Invitrogen, n.º de cat. 18021-014) a 37°C durante 20 minutos.

- 5 Como segunda etapa, se comprobó el efecto de digestión con ARNasaH o la ausencia del mismo en el ensayo completo (ejemplo II) tras una etapa de purificación en columna. Para ello, se añadieron 2 µl de tampón FS 5x, 2 µl de DTT 0,1 M y 1 µl de ARNasaH a 10 µl de ADNc purificado. En la reacción de control sin digestión con ARNasaH, se añadieron 4 µl del tampón de elución. En la figura 11, se presentan los resultados.

10 Ejemplo V: mmc-TIV en fase sólida

Se realizó esta reacción, incluyendo controles, para una concentración particular del constructo. Se añadió 1 µl de ADNmc de IL-2R RT/T7/Sel biotinilado en el extremo 3' a 100 fmol/µl, a 10 µl de perlas magnéticas (nanopartículas de 0,2 µm, Molecular Probes, n.º de cat. C-21476), se incubó durante 15 min y fue seguido por lavado extenso con TrisHCl 10 mM pH 8. Se ajustó el volumen final a 10 µl siendo la concentración de constructo de 10 fmol/µl de perlas (figura 12, línea 1). Se añadieron los 10 µl de mezcla de TIV (véase el ejemplo II) al constructo inmovilizado y se incubó la mezcla de reacción durante 2h a 37°C. Se detectaron los productos mediante el método de RT-eMAP. La línea 2 representa la misma configuración que carece de la etapa de lavado, y la línea 3 representa el mismo experimento sin perlas magnéticas presentes, es decir reacción de TIV en disolución. En los tres casos, se ajustó la concentración de constructo a 10 fmol/µl.

Ejemplo VI: Discriminación de secuencias de ARNm estrechamente homólogas: cepas endogámicas de maíz

Determinadas aplicaciones exigen la detección de dianas específicas dentro de un conjunto de cientos o miles de dianas que presentan homología de secuencia sustancial con la(s) diana(s) de interés. Estas aplicaciones requieren generalmente un grado de especificidad de secuencia más allá de la proporcionada mediante análisis mediado por hibridación. Se usaron dos diseños descritos anteriormente para detectar miembros estrechamente homólogos de secuencias de ARNm en la familia de genes de zeínas de maíz. En las dos líneas de maíz endogámicas, B73 y BSSS53, determinadas secuencias de ARNm de los genes de zeínas presentan un grado de homología del 95% al 99% a lo largo de la totalidad de los 945 nt de la secuencia. La tarea de detectar estas secuencias y estimar sus niveles de expresión respectivos con métodos actuales es un proceso muy laborioso, que requiere la secuenciación de grandes conjuntos de clones.

Por tanto, las combinaciones de elongación específica de secuencia mediante transcriptasa inversa o el ligamiento en el sitio de polimorfismo, seguido con amplificación mediante mmc-TIV de distintas secuencias de "selector", ayudará a discriminar entre secuencias de ARNm altamente homólogas, a la vez que determinarán simultáneamente las abundancias respectivas de estos mensajes en un formato de análisis altamente paralelo.

La figura 14 ilustra las posiciones de los sitios polimórficos y, por tanto, posibles sitios para el ligamiento o la colocación del extremo 3' del constructo. Para algunos casos complicados de discriminación de secuencias, que implican dos secuencias que tienen una mutación común, pero que sólo una tiene una segunda mutación específica (por ejemplo, los genes 16 y 31 tienen la misma mutación T/G, que los discrimina de todas las demás secuencias en una alineación de múltiples secuencias, pero el gene 31 tiene una mutación C/G única) los métodos descritos anteriormente tienen la ventaja de asignar una secuencia de selector particular a cada sitio polimórfico proximal.

Ejemplo VII: Reacción de amplificación/detección en chip simultánea:

Se aplicó ADN, que contiene el promotor de T7 y una secuencia transcrita de 28 nt (equivalente al extremo 5' de ARNm de Kan), y biotinilado en el extremo 3' de la hebra que no es molde (NT), a diferentes concentraciones a BeadChips, y tras una incubación inicial durante 10 min para permitir la captura, se retiró el ADN libre residual mediante lavado. Entonces se aplicaron 20 µl de mezcla de reactivos para la reacción de TIV/RT simultánea sobre la superficie del chip. La mezcla de reacción contenía: 2 µl de cada NTP 75 mM, 2 µl de tampón de reacción 10X de T7, 2 µl de mezcla enzimática de T7, 2 µl de la parte de NT para el promotor de T7 0,1 µM, 2 µl de mezcla de dNTP 10 µM (sin dCTP), 1 µl de Cy3 dCTP25 µM, 1 µl de enzima Superscript III (200 U/µl), y 2 µl de agua DI tratada con DEPC. Se realizó la reacción en chip en una cámara humidificada e implicaba incubación a 37°C durante 1 h (TIV), seguida por incubación a 50°C durante 15 minutos (elongación de sondas mediada por RT). En la figura 17 y la figura 16, por consiguiente, se muestran los resultados y el esquema de los experimentos.

Lista de secuencias

<110> BioArray Solutions, Ltd.

<120> Determinación de la abundancia de mensajes y el número de copias de alelos usando TIV con constructos cebador-promotor-selector monocatenarios

<130> SST-TIV-PCT

<150> Documento 60/719063

5 <151> 21-09-2005

<160> 18

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

10 <210> 1

<211> 64

15 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador artificial

<400> 1

gcaggatcct ggtatccgct atctccctat agtgagtcgt attaatggg cgtcagaatt 60
gtcc 64

25 <210> 2

<211> 21

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Sonda artificial

<400> 2

gcaggatcct ggtatccgct a 21

40 <210> 3

<211> 62

45 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Cebador artificial

<400> 3

ggagtcacg gatttggtcg ttctccctat agtgagtcgt attaggacga ggacgaggag 60
gt 62

55 <210> 4

<211> 21

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

	<220>	
	<223> Sonda artificial	
5	<400> 4 ggagtcaacg gatttggtcg t	21
	<210> 5	
10	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Promotor artificial	
20	<400> 5 taatacgact cactataggg aga	23
	<210> 6	
25	<211> 64	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador artificial	
35	<400> 6 gcaggatcct ggtatccgct atctccctat agtgagtcgt attactgaat ccggtgagaa tggc	60 64
	<210> 7	
40	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Sonda artificial	
50	<400> 7 gcaggatcct ggtatccgct a	21
	<210> 8	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Promotor artificial	

	<400> 8		
	taataacgact cactataggg aga		23
5	<210> 9		
	<211> 64		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
15	<223> Cebador artificial		
	<400> 9		
	gcaggatcct ggtatccgct atctccctat agtgagtcgt attaatggg cgtcagaatt	60	
	gtcc	64	
20	<210> 10		
	<211> 21		
	<212> ADN		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Sonda artificial		
	<400> 10		
	gcaggatcct ggtatccgct a		21
35	<210> 11		
	<211> 50		
	<212> ARN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> ARN artificial		
	<400> 11		
	cgacaaauuc gacgcccaau gggaaugaag acaccacagc ugauuucuu	50	
50	<210> 12		
	<211> 300		
	<212> ADN		
55	<213> Maíz		
	<400> 12		

ES 2 533 461 T3

ataatatattt gagcattcag aaacacacca agcgaagcac attagcaaca acctaacaac 60
aatggctacc aagatattat ccctccttgc gcttcttgcg ctttttgcg gcgcaacaaa 120
tgcgttcatt attccacaat gctcacttgc tccaagttcc attattacac agttcctccc 180
accagttact tcaatgggct tccaacaccc agctgtgcaa gcctataggc tacaacaagc 240
aattgcggcg agcgtcttac aacaaccaat ttcccagttg caacaacaat ccttggcaca 300

<210> 13

5 <211> 300

<212> ADN

<213> Maíz

10

<400> 13

ataatatattt gagcattcag aaacacacca agcgaagcgc actagcaaca acctaacaac 60
aatggctacc aagatattat ccctccttgc gcttcttgcg ctttttgcg gcgcaacaaa 120
tgcgtccatt attccacaat gctcacttgc tcctagtcc attattccac agttcctccc 180
accagttact tcaatggcct tccaacaccc agctgtgcaa gcctataggc tacaacaagc 240
gattgcggcg agcgtcttac aacaaccaat tgcccaattg caacaacaat ccttggcaca 300

<210> 14

15

<211> 300

<212> ADN

20 <213> Maíz

<400> 14

ataatacttt gagcattcag aaacacacca agcgaagcgc actagcaacg accaaacaac 60
aatggctacc aagatattag ccctccttgc gcttcttgcc ctttttgtga gcgcaacaaa 120
tgcgttcatt attccacaat gctcacttgc tcctagtgcc attattccac agttcctccc 180
accagttact tcaatgggct tccaacactc agctgtgcaa gccaacaggc tacaacaagc 240
gcttgcgcg agcgtcttac aacaaccaat tgcccaattg caacaacaat ctttggcaca 300

25 <210> 15

<211> 300

<212> ADN

30

<213> Maíz

<400> 15

ataatatattt gagcattcag aaacacacca agcgaagcgc actagcaacg accaaacaac 60
aatggctacc aagatattag ccctccttgc gcttcttgcc ctttttgtga gcgcaacaaa 120
tgcgttcatt attccacaat gctcacttgc tcctagtgcc attattccac agttcctccc 180
accagttact tcaatgggct tccaacactc agctgtgcaa gccaacaggc tacaacaagc 240
gcttgcgcg agcgtcttac aacaaccaat tgcccaattg caacaacaat ctttggcaca 300

35

<210> 16

<211> 300

40 <212> ADN

<213> Maíz

<400> 16

ES 2 533 461 T3

```

ataatatttt gagcattcag aaacacacca agcgaagcta cctagcaacg acttaacaac 60
aatggctacc aagatattag ccctccttgc gcttccttgcc ctttttgtga gcgcaacaaa 120
tgcgttcatt attccacaat gctcacttgc tcctagtgcc attataccac agttcctccg 180
accagttact tcaatgggct tcgaacacct agctgtgcaa gcctacaagc tacaacaagc 240
gcttgcgggcg agcgtcttac aacaaccaat taaccaattg caacaacaat ccttggcaca 300

```

<210> 17

5 <211> 277

<212> ADN

<213> Maíz

10

<400> 17

```

ataatatttt gagcattcaa aaacacacca agcgaagctc actagcaacg acctaacaac 60
aatggctacc aagatattag ccctccttgc gcttccttgcc ctttttgtga gcgcaacaaa 120
tgcgttcatt attccacaat gctcacttgc tcctagtgcc attattccac agttcctccc 180
accagttact tcaatgggct tcgaacacct agctgtgcaa gcctacaggc tacaacaagc 240
gcttacggcg agcgtcttac aacaaccaat tgaccaa 277

```

<210> 18

15

<211> 300

<212> ADN

20 <213> Maíz

<400> 18

```

ataatatttt cagcattcaa aaacacacca agcgaagcgc actagcaacg acctaacacc 60
aatggctacc aagatattag ccctccttgc gcttccttgcc ctttttagtga gcgcaacaaa 120
tgcgttcatt attccacagt gctcacttgc tcctagtgcc agtattccac agttcctccc 180
accagttact tcaatgggct tcgaacatcc agccgtgcaa gcctacaggc tacaactagc 240
gcttgcgggcg agcgccttac aacaaccaat tgcccaattg caacaacaat ccttggcaca 300

```

25

REIVINDICACIONES

1. Constructo cebador-promotor-selector monocatenario para detectar la presencia o la cantidad relativa de una subsecuencia diana en una muestra, que comprende tres subsecuencias que incluyen:
una subsecuencia de cebador complementaria a dicha subsecuencia diana, que tiene su extremo 5' adyacente al extremo 3' de una subsecuencia de promotor, pudiendo dicha subsecuencia de promotor dirigir la transcripción de una subsecuencia de selector única, que tiene su extremo 3' adyacente al extremo 5' de la subsecuencia de promotor.
2. Constructo según la reivindicación 1, en el que el promotor no dirige la transcripción de la subsecuencia de cebador.
3. Constructo según la reivindicación 1, en el que el promotor es una subsecuencia de promotor de T7 o T3 o SP6.
4. Kit que comprende una pluralidad de diferentes tipos de constructos cebador-promotor-selector monocatenarios cada uno para detectar la presencia o cantidad relativa de una subsecuencia diana diferente en una muestra, comprendiendo cada uno tres subsecuencias que incluyen:
una subsecuencia de cebador complementaria a dicha subsecuencia diana, que tiene su extremo 5' adyacente al extremo 3' de una subsecuencia de promotor, pudiendo dicha subsecuencia de promotor dirigir la transcripción de una subsecuencia de selector única, que tiene su extremo 3' adyacente al extremo 5' de la subsecuencia de promotor; y
un conjunto de oligonucleótidos, en el que oligonucleótidos con diferentes secuencias se presentan en micropartículas codificadas de diferente manera, y en el que los oligonucleótidos pueden hibridarse al producto de transcripción de la subsecuencia de selector.
5. Kit según la reivindicación 4, en el que los diferentes tipos de constructos difieren en su subsecuencia de cebador y subsecuencias de selector respectivas.
6. Kit según la reivindicación 4, que incluye además NTP marcados que pueden incorporarse en el producto de transcripción.
7. Kit según la reivindicación 6, en el que los NTP se marcan ópticamente.
8. Kit según la reivindicación 4, en el que el promotor es una subsecuencia de promotor de T7 o T3 o SP6 (hebra molde).
9. Kit según la reivindicación 8, que incluye además una subsecuencia de promotor de T7, T3 o SP6 que no es molde que puede formar un dúplex con dicha subsecuencia de promotor de T7, T3 o SP6.
10. Kit según la reivindicación 4, que incluye además un conjunto de micropartículas codificadas de diferente manera adaptadas para unir diferentes tipos de oligonucleótidos a las mismas que son complementarios a los productos de transcripción.
11. Kit según la reivindicación 4, que incluye además un conjunto de ddNTP o dNTP marcados diseñados para la incorporación en un producto de extensión cuando se extiende la subsecuencia de cebador.
12. Kit según la reivindicación 4, que incluye además ddNTP o dNTP marcados con hapteno.
13. Kit según la reivindicación 12, que incluye además partículas magnéticas.
14. Kit según la reivindicación 4, que incluye además un oligonucleótido que puede hibridarse a una subsecuencia en la muestra que está ubicada en el lado 3' de una subsecuencia de selección como diana de cebador o en el cebador.
15. Kit según la reivindicación 14, en el que el oligonucleótido se marca.
16. Kit según la reivindicación 14, en el que el oligonucleótido incluye la subsecuencia de promotor.
17. Método de determinación de la abundancia relativa de subsecuencias designadas en una muestra, que comprende:
(i) asociar de manera única al menos una subsecuencia diana designada representada como cebador a al

menos una secuencia de selector en las que ambas forman parte de un constructo cebador-promotor-selector monocatenario, que comprende tres subsecuencias:

una subsecuencia de cebador complementaria a dicha subsecuencia diana, que tiene su extremo 5' adyacente al extremo 3' de una subsecuencia de promotor, pudiendo dicha subsecuencia de promotor dirigir la transcripción de una subsecuencia de selector única, que tiene su extremo 3' adyacente al extremo 5' de la subsecuencia de promotor;

(ii) amplificar la subsecuencia de selector; y

(iii) detectar la cantidad relativa de producto de amplificación.

18. Método según la reivindicación 17, en el que la subsecuencia de cebador y las subsecuencias diana no se amplifican.

19. Método según la reivindicación 17, en el que la amplificación de la subsecuencia de selector es mediante transcripción *in vitro* (TIV) y el producto de amplificación es un ARN que comprende la secuencia complementaria a la secuencia de selector.

20. Método según la reivindicación 17, en el que la secuencia designada es: ARN incluyendo ARNm y ARN viral, ADN genómico o un producto de PCR.

21. Método según la reivindicación 20, en el que las secuencias diana designadas están presentes en una forma que puede hibridarse con la subsecuencia de cebador.

22. Método según la reivindicación 20, en el que las secuencias diana designadas son los alelos de un gen particular.

23. Método según la reivindicación 20, en el que la etapa de asociar de manera única comprende hibridar las partes de cebador de los constructos cebador-promotor-selector a dichas subsecuencias dianas designadas.

24. Método según la reivindicación 23, que incluye además la etapa de separar los constructos que se han hibridado a dichas subsecuencias designadas de los que no se han hibridado a una subsecuencia designada.

25. Método según la reivindicación 23, que incluye además la etapa de extender las partes de cebador de los constructos cebador-promotor-selector.

26. Método según la reivindicación 25, en el que los constructos que incluyen cebadores extendidos se separan de los que no se han extendido.

27. Método según la reivindicación 24, en el que la separación de los constructos no hibridados y no extendidos y dNTP o ddNTP marcados no usados, u oligonucleótidos, se realiza mediante separaciones en columna de afinidad o exclusión molecular, separación en fase sólida incluyendo separación magnética, tratamientos enzimáticos o combinaciones de cualquiera de estos.

28. Método según la reivindicación 25, en el que la extensión se realiza mediante extensión mediada por molde o ligamiento mediado por molde.

29. Método según la reivindicación 28, en el que la extensión incorpora dNTP, ddNTP marcados u oligonucleótidos marcados.

30. Método según la reivindicación 20, en el que los constructos extendidos se capturan en una fase sólida.

31. Método según la reivindicación 30, en el que la fase sólida es partículas magnéticas.

32. Método según la reivindicación 28, en el que la extensión y el ligamiento son específicos de alelo.

33. Método según la reivindicación 17, en el que la etapa de detectar la cantidad relativa de producto de amplificación es mediante elongación de sondas catalizada por RT presentadas en micropartículas codificadas, y en el que el producto de amplificación sirve como molde para la elongación.

34. Método según la reivindicación 33, en el que la detección se realiza simultáneamente a la amplificación.

35. Método según la reivindicación 34, en el que la amplificación y la detección de la amplificación del producto

simultáneas se producen en un volumen de reacción de 100 nl o menos.

36. Método según la reivindicación 19, en el que la reacción de TIV introduce una firma óptica detectable en el producto de ARN.

37. Método según la reivindicación 17, en el que una parte que no es molde de un promotor de T7 o T3 o SP6 se añade antes de la amplificación.

38. Método según la reivindicación 19, en el que la etapa de detectar la cantidad relativa de producto de amplificación es mediante hibridación del producto de amplificación para capturar sondas presentadas en micropartículas codificadas.

39. Método de determinación de la pérdida de heterocigosidad en una muestra genómica usando un par de constructos cebador-promotor-selector monocatenarios específicos de alelo, que comprenden cada uno tres subsecuencias:

una subsecuencia de cebador única complementaria a una subsecuencia diana, que tiene su extremo 5' adyacente al extremo 3' de una subsecuencia de promotor, pudiendo dicha subsecuencia de promotor dirigir la transcripción de una subsecuencia de selector única, que tiene su extremo 3' adyacente al extremo 5' de la subsecuencia de promotor;

comprendiendo el método:

asociar de manera única una primera secuencia de selector única con el alelo normal del gen de interés y una segunda secuencia de selector única con el alelo variante de ese gen; amplificar las secuencias de selector; y

determinar intensidades de señal que indican la abundancia relativa de los alelos amplificados;

y

determinar si existe una pérdida de heterocigosidad.

40. Método según la reivindicación 17, usado para el análisis de la expresión génica, el recuento de alelos o la determinación del número de copias alélicas.

41. Método de determinación de la cantidad relativa de una subsecuencia designada presente en una muestra de ARNm con el fin del análisis de la expresión génica, que comprende:

a) proporcionar una muestra de ARNm que incluye dicha subsecuencia designada;

b) proporcionar un constructo monocatenario que incluye, desde el extremo 3' hasta el 5', una subsecuencia de cebador complementaria a al menos una parte de dicha subsecuencia designada, una subsecuencia de promotor de la transcripción y una subsecuencia de selector única, y en el que el promotor de la transcripción está orientado de modo que, en las condiciones apropiadas, dirige la transcripción de la subsecuencia de selector;

c) proporcionar condiciones para la hibridación de la subsecuencia de cebador y el ARNm, y para la extensión de la subsecuencia de cebador;

d) retirar los constructos que no se hibridan con ARNm;

e) transcribir la secuencia de selector;

f) determinar la cantidad de ARN generada por la transcripción; y

g) correlacionar dicha cantidad de ARN frente a una cantidad de ARN producida con las mismas etapas de reacción a) a f) pero con una subsecuencia designada diferente y selector diferente, para indicar la cantidad relativa de ARNm que incluye dicha subsecuencia designada y la cantidad relativa de dicha subsecuencia designada en dicha muestra.

42. Método según la reivindicación 41, en el que el ARNm se aísla de una célula o se genera a partir de ADN genómico, a partir de un producto de PCR o a partir de la amplificación.

43. Método según la reivindicación 41, en el que el constructo cebador-promotor-selector para transcripción inversa incluye una subsecuencia de promotor de T7 o T3 o SP6.

44. Método según la reivindicación 41, en el que ni la subsecuencia de selector ni una subsecuencia complementaria inversa de la misma son complementarias a subsecuencias en la muestra de ARNm.
- 5 45. Método según la reivindicación 44, en el que se usan varios constructos para determinar la cantidad de varias subsecuencias designadas en el ARNm y cada constructo tiene una subsecuencia de selector particular asociada con una subsecuencia de cebador particular.
- 10 46. Método según la reivindicación 41, en el que la transcripción genera una subsecuencia de ARN marcada o no marcada complementaria a la subsecuencia de selector.
47. Método según la reivindicación 41, en el que ARN se captura mediante hibridación con oligonucleótidos presentados en micropartículas.
- 15 48. Método según la reivindicación 47, en el que la cantidad de ARN se determina mediante el registro de una señal óptica asociada con oligonucleótidos de ARN marcados capturados.
49. Método según la reivindicación 48, en el que un resto que puede producir una señal óptica se añade al ARN durante la transcripción usando nucleótidos marcados.
- 20 50. Método según la reivindicación 49, en el que el nucleótido marcado contiene un fluoróforo.
51. Método según la reivindicación 50, en el que el nucleótido marcado contiene un hapteno que puede decorarse con un anticuerpo que contiene un fluoróforo.
- 25 52. Método según la reivindicación 47, en el que los oligonucleótidos se presentan en micropartículas codificadas.
53. Método según la reivindicación 51, en el que tras la captura, se extienden los oligonucleótidos y se añaden dNTP o ddNTP marcados o no marcados.
- 30 54. Método según cualquiera de las reivindicaciones 47, 51 ó 52, en el que la cantidad relativa de ARN se determina mediante la correlación de la intensidad de la señal óptica asociada con dichos oligonucleótidos de ARN capturados con la intensidad de la señal óptica asociada con dicha subsecuencia designada diferente.
- 35 55. Método según la reivindicación 41, que incluye además monitorizar subsecuencias designadas adicionales presentes en el mismo ARNm o uno diferente en la muestra tras las mismas etapas a) a g) para cada una de dichas subsecuencias designadas adicionales.
- 40 56. Método según la reivindicación 44, que incluye además, una segunda subsecuencia de promotor de T7 que forma un dúplex con dicha subsecuencia de promotor de T7.
- 45 57. Método según la reivindicación 41, en el que la etapa c) incluye además la etapa de extender el constructo con nucleótidos que incluyen un hapteno asociado, y capturar el constructo extendido en micropartículas que portan un ligando para el hapteno.
58. Método según la reivindicación 57, incluye además la captura de los constructos extendidos tras la purificación de constructos no hibridados o no extendidos.
- 50 59. Método según la reivindicación 57, en el que el hapteno es biotina o un resto antigénico y el ligando es estreptavidina o neutravidina o anticuerpo.
60. Método según la reivindicación 57, en el que las micropartículas están en un alineamiento de perlas que también contiene micropartículas según la reivindicación 47.
- 55 61. Método de determinación de la presencia de sitios polimórficos o de mutación en una muestra de ADN o ARN, que comprende:
- 60 a) proporcionar una muestra de ARN o ADN que incluye dichos sitios polimórficos o de mutación;
- b) proporcionar, para cada uno de dichos sitios de interés, un constructo monocatenario que incluye, desde el extremo 3' hasta el 5': una subsecuencia de cebador complementaria a al menos una parte de una subsecuencia designada y que tiene un nucleótido designado que cuando se hibrida con el ARN o ADN está diseñado para alinearse con un nucleótido complementario en dicho sitio, una subsecuencia de promotor de la transcripción y una subsecuencia de selector única, y en el que el promotor de la
- 65

transcripción está orientado de modo que, en las condiciones apropiadas, dirige la transcripción de la subsecuencia de selector;

c) proporcionar condiciones para la extensión de la subsecuencia de cebador en el sentido de 3' para generar un constructo elongado con nucleótidos complementarios a los de las regiones alineadas del ARN o ADN, siempre que el nucleótido designado en el cebador sea complementario al nucleótido en dicho sitio, y en el que la subsecuencia elongada adquiere un hapteno de afinidad durante el proceso de elongación;

e) separar el constructo elongado del exceso de constructo no usado mediante la unión del hapteno de afinidad a ligandos presentados en la superficie de un soporte sólido;

f) transcribir las secuencias de selector de los constructos elongados unidos a los soportes sólidos, o transcribir las secuencias de selector del constructo elongado o no unido a los soportes sólidos, para generar ARN; y

g) determinar la presencia de ARN generado, que indica que el nucleótido designado en la subsecuencia de cebador es complementario al sitio polimórfico o de mutación de interés.

62. Método según la reivindicación 61, en el que el hapteno de afinidad es biotina o un resto antigénico y el ligando es estreptavidina o neutravidina o un anticuerpo.

63. Método según la reivindicación 61, en el que los soportes sólidos son magnéticos o paramagnéticos, y tras la unión de marcadores a los soportes sólidos, los soportes sólidos se ven atraídos magnéticamente para fijar su ubicación, y luego se retiran los constructos no usados.

64. Método según la reivindicación 61, en el que el soporte sólido está en forma de una columna de afinidad o la separación incluye separación en columna.

65. Método según la reivindicación 61, en el que el ARNm se retira o se mantiene en su lugar tras la extensión del constructo.

66. Método según la reivindicación 65, en el que la retirada es mediante digestión catalizada por ARNasaH.

67. Método según la reivindicación 44, en el que la separación en columna está precedida por tratamiento con exonucleasa 1.

68. Método según la reivindicación 44, en el que el ARN generado se captura mediante hibridación con oligonucleótidos presentados en micropartículas codificadas, en el que micropartículas codificadas de diferente manera presentan diferentes oligonucleótidos.

69. Método según la reivindicación 44, en el que tras la captura los oligonucleótidos se elongan en una reacción que incluye dNTP marcados o ddNTP marcados para producir productos de elongación marcados.

70. Método según la reivindicación 44, en el que ARN se marca mediante la incorporación de NTP marcados.

71. Método según reivindicaciones 69 ó 70, en el que las señales de micropartículas que se sabe que presentan oligonucleótidos específicos identifican la presencia de un polimorfismo o una mutación.

72. Método según la reivindicación 44, en el que, para cada sitio polimórfico/de mutación de interés, se proporciona un par de constructos, en el que un miembro del par, que comprende una primera subsecuencia de selector, tiene, en su extremo 3', un nucleótido tal que el cebador es complementario al alelo normal, y el segundo miembro del par, que comprende una segunda subsecuencia de selector, tiene, en su extremo 3', un nucleótido tal que el cebador es complementario a un alelo variante.

73. Método de determinación de la presencia de sitios polimórficos o de mutación en una muestra de ADN o ARN, que comprende:

a) proporcionar una muestra de ARN o ADN que incluye dichos sitios polimórficos o de mutación;

b) proporcionar, para cada uno de dichos sitios de interés, uno de los siguientes que tiene un nucleótido que, cuando se alinea y se hibrida con el ARN o ADN; es complementario al nucleótido en el sitio de interés y en el que el otro de los siguientes tiene su nucleótido terminal respectivo, en 5' o 3', respectivamente, alineado con un nucleótido que es inmediatamente adyacente al nucleótido en el sitio de interés; un primer oligonucleótido, complementario en su totalidad o en parte a una subsecuencia en el ARN o ADN, que puede marcarse o puede tener un marcador asociado con el mismo; un constructo monocatenario que incluye, desde el extremo 3' hasta el 5': una subsecuencia de cebador complementaria a al menos una

parte de una subsecuencia designada, una subsecuencia de promotor de la transcripción, y una subsecuencia de selector única, y en el que el promotor de la transcripción está orientado de modo que, en las condiciones apropiadas, dirige la transcripción de la subsecuencia de selector;

- 5 c) proporcionar condiciones para el ligamiento del primer oligonucleótido y el constructo para generar un producto ligado;
- d) proporcionar las condiciones para la retirada del constructo en exceso;
- 10 e) transcribir las secuencias de selector del producto ligado unido o no unido a los soportes sólidos para generar ARN o ARN marcado cuando se usan NTP marcados para la síntesis de ARN; y
- f) determinar la presencia de ARN generado, que, si está presente, indica que o bien el nucleótido alineado en el primer oligonucleótido o bien en el constructo, según sea apropiado, es complementario al nucleótido en el sitio de interés.
- 15
74. Método según la reivindicación 73, que incluye además la etapa de extender la primera parte o la primera parte del producto ligado con dNTP marcados, en el que el marcador proporciona un sitio al que puede unirse un ligando; y separar el producto ligado del ARNm mediante la unión del/de los marcador(es) a ligandos presentados en la superficie de un soporte sólido.
- 20
75. Método según la reivindicación 73, en el que la primera parte está marcada o no marcada.
76. Método según la reivindicación 73, usado para detectar la presencia de ARNm de un virus en una muestra, usando un alineamiento de perlas coensambladas con perlas de captura magnéticas que portan oligonucleótidos que se hibridan con ARNm de interés, y perlas de detección codificadas que portan oligonucleótidos para caracterizar el ARN que resulta de la reacción en las etapas a) a e).
- 25
77. Método según las reivindicaciones 61 ó 73, usado para determinar si un sujeto es homocigoto, heterocigoto o normal para un loci de mutación y/o polimórfico en un ensayo multiplexado, determinado los números relativos de, y las razones de ARN normales con respecto a variantes generados en el ensayo.
- 30
78. Métodos según las reivindicaciones 61 ó 73, usados para determinar la pérdida de heterocigosidad en un sujeto.
- 35

Sentidos de RT (o elongación) y transcripción *in vitro* y métodos de detección de productos

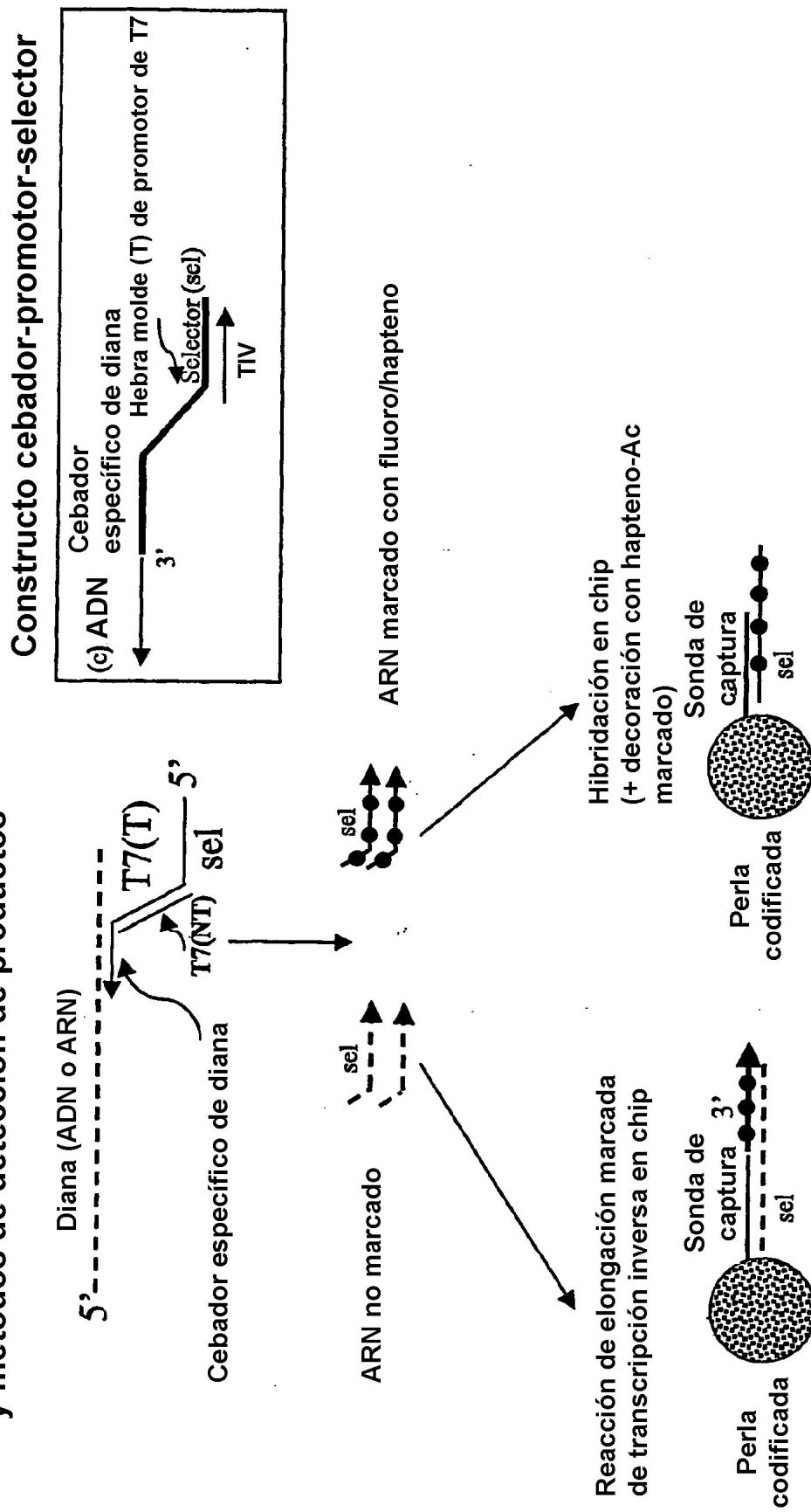


Fig. 1

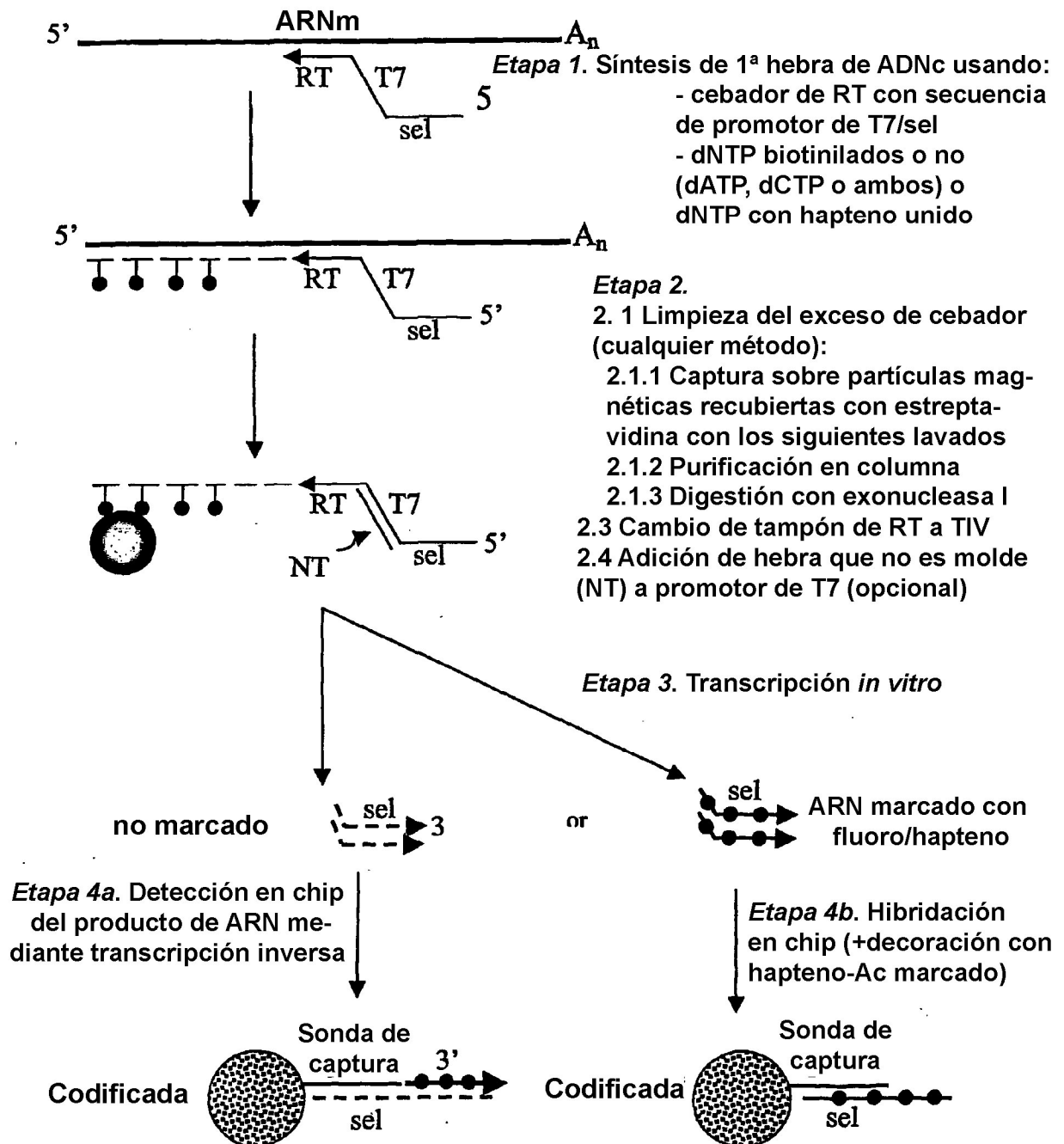


Fig. 2. Método para el análisis multiplexado de la expresión génica.

Método para la detección de SNP/mutaciones mediante elongación específica de alelo

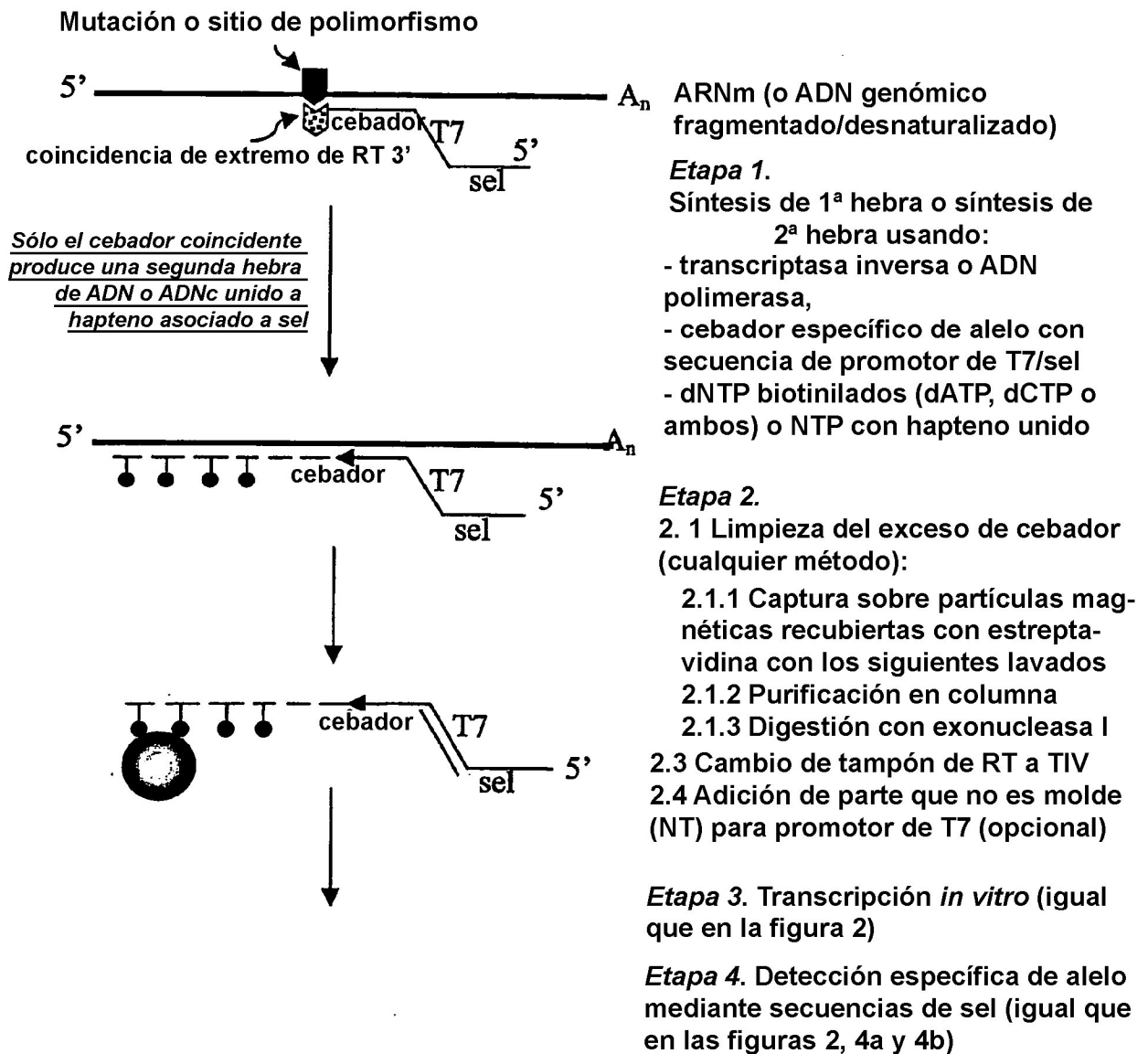


Fig. 3

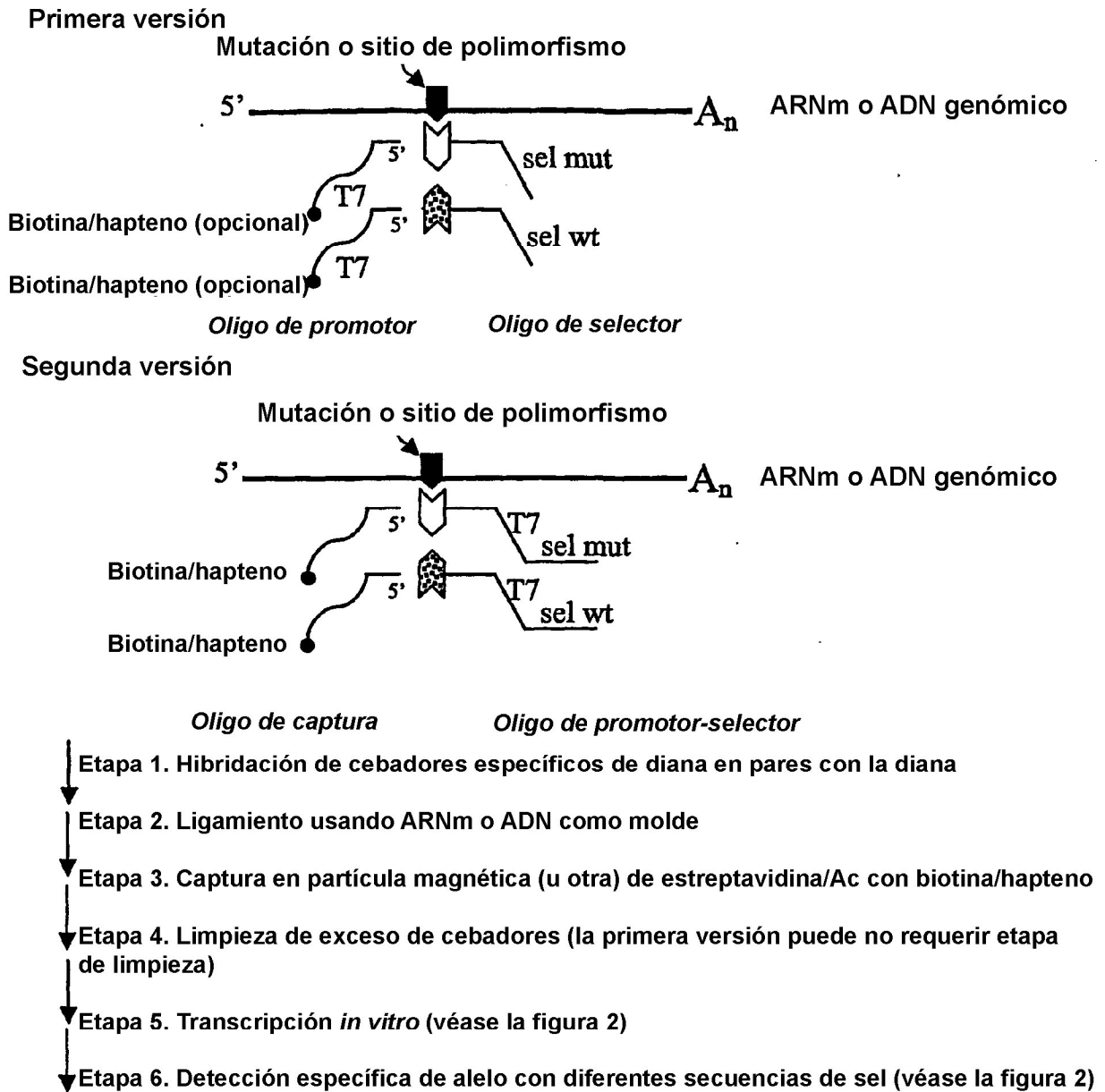
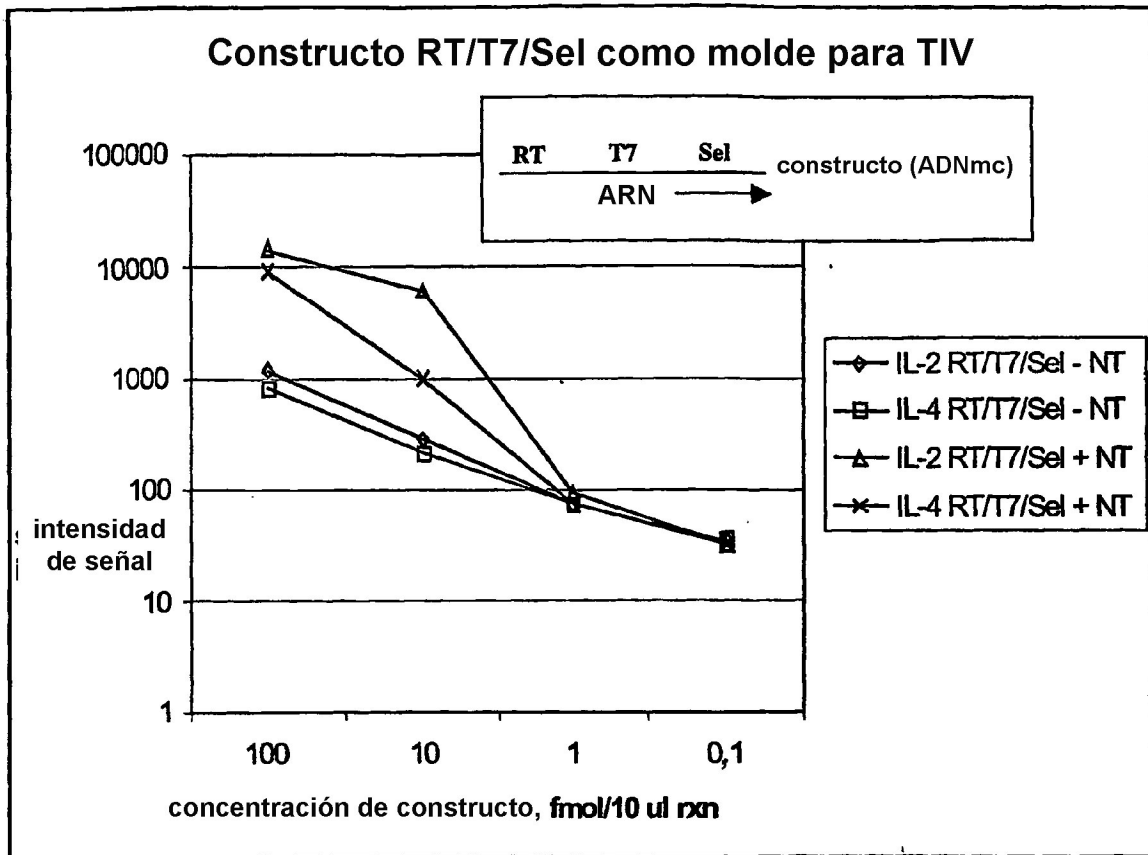


Fig. 4. Métodos para la detección de SNP/mutaciones mediante ligamiento específico de alelo



Secuencias de oligos:

1) Construto IL-2R RT/T7/Sel:

5' GCA GGA TCC TGG TAT CCG CTA TCT CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA TTG
GGC GTC AGA ATT GTCC [64 meros] [SEQ ID NO 1]

Sonda de captura de partículas IL-2R

5'-amina- GCA GGA TCC TGG TAT CCG CTA [21 meros] [SEQ ID NO 2]

2) Construto IL-4I RT/T7/Sel:

5' GGA GTC AAC GGA TTT GGT CGT TCT CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAG
GAC GAG GAC GAG GAG GT [62 meros] [SEQ ID NO 3]

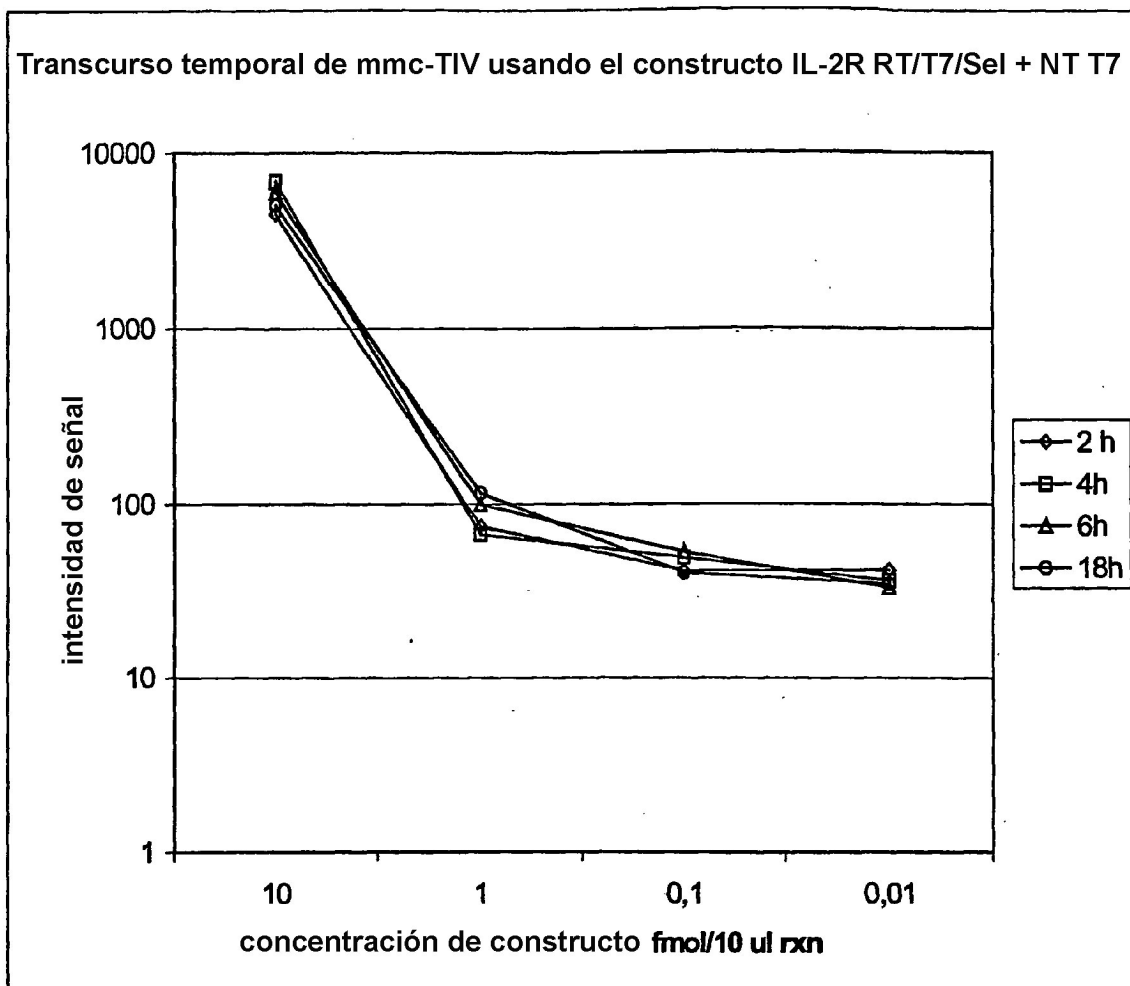
Sonda de captura de partículas IL-4I

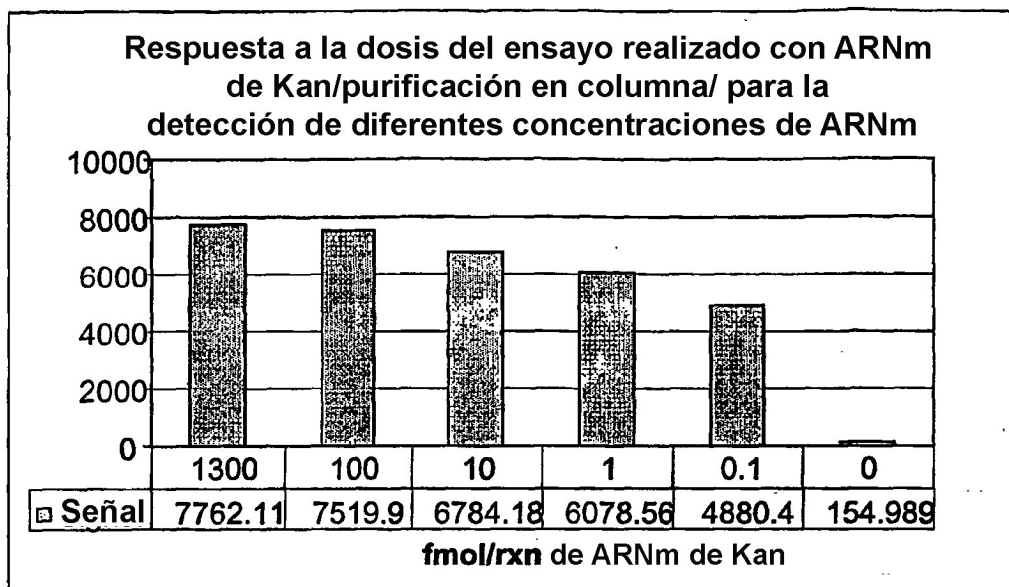
5'-amina- GGA GTC AAC GGA TTT GGT CGT [21 meros] [SEQ ID NO 4]

3) Parte de NT para el promotor de T7:

5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA [23 meros] [SEQ ID NO 5]

Fig. 5. Caracterización de especificidad de secuencia y dependencia con la concentración de la reacción de mmc-TIV.

**Fig. 6**



Secuencias de oligos:

1) **Constructo Kan RT/T7/Sel:**

5' GCA GGA TCC TGG TAT CCG CTA TCT CCC TAT AGT GAG TCG TAT
TACTGAATCCGGTGAGAATGGC [64 meros] [SEQ ID NO 6]

2) **Sonda de captura de partículas**

5'-amina- GCA GGA TCC TGG TAT CCG CTA [21 meros] [SEQ ID NO 7]

3) **Parte de NT para el promotor de T7:**

5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA [23 meros] [SEQ ID NO 8]

Fig. 7

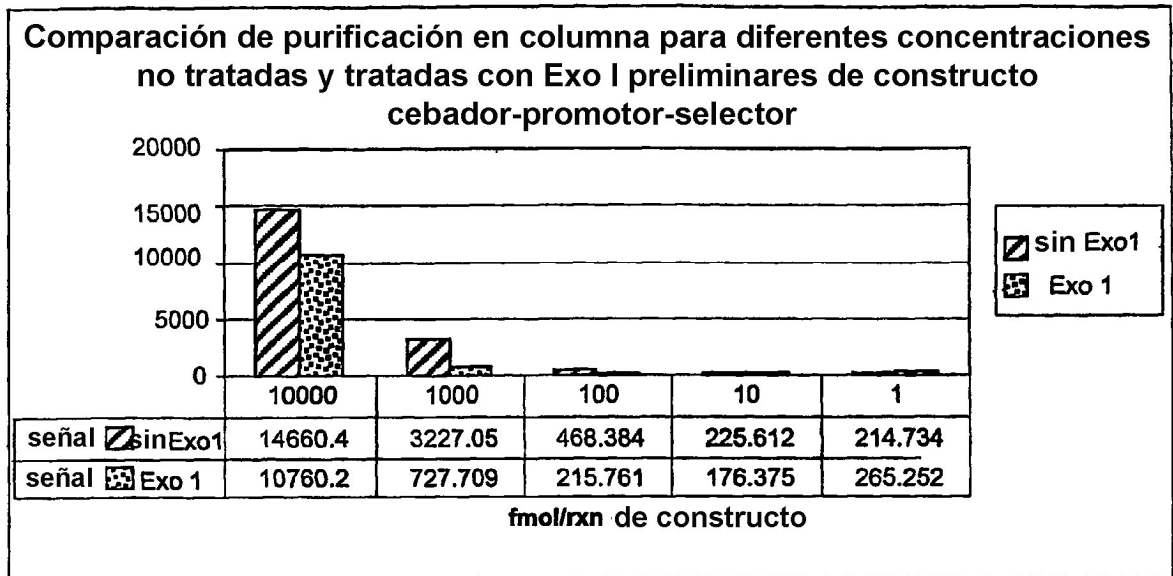


Fig. 8

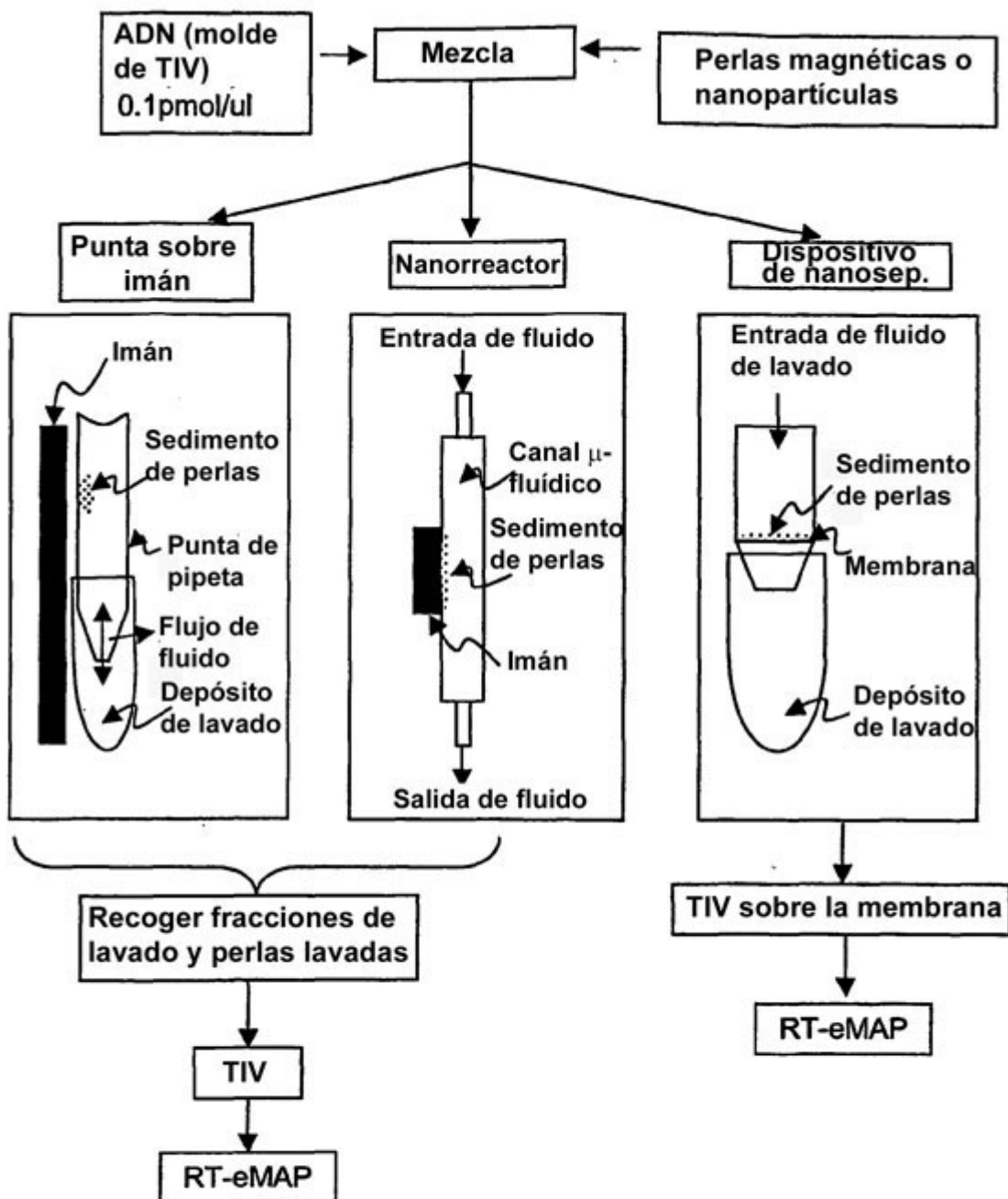
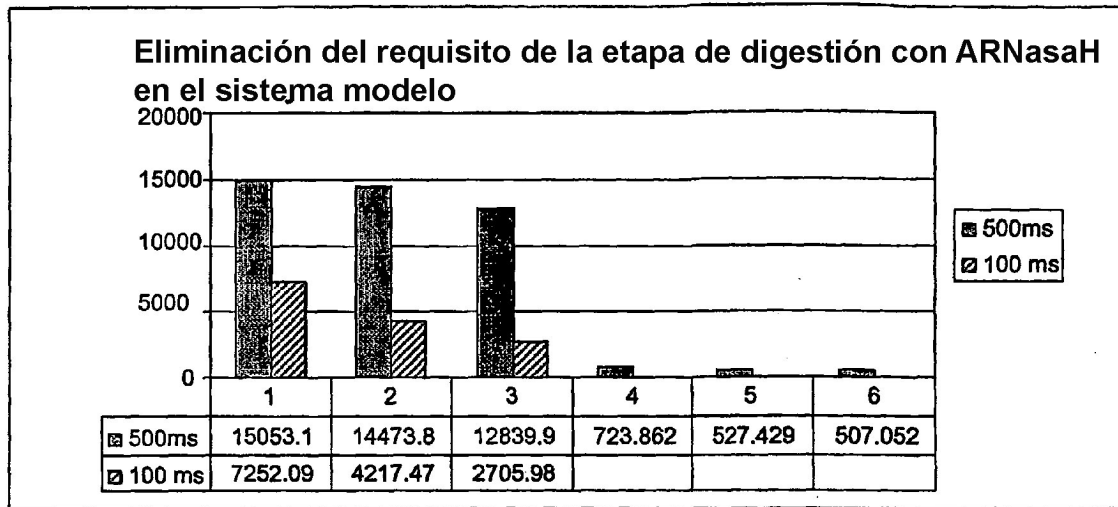


Fig. 9. Configuraciones de limpieza con captura magnética y separación directa.



Eficacia de mmc-TIV usando molde en diferentes configuraciones. 1 y 4: constructo (cebador de RT) sólo; 2 y 5: constructo hibridado con ARN; 3 y 6: constructo hibridado con ARN y digerido con ARNasaH; la parte de NT del promotor de T7 se añadió en las reacciones 1, 2 y 3, y se omitió en las reacciones 4, 5 y 6. Los tiempos de exposición de respectivamente 500 ms y 100 ms se usaron para registrar imágenes de ensayo para los dos conjuntos de datos, tal como se muestra.

Cebador IL-2R RT/T7/Sel:

5' GCA GGA TCC TGG TAT CCG CTA TCT CCC TAT AGT GAG TCG TAT TAA
TTG GGC GTC AGA ATT GTCC [64 meros] [SEQ ID NO 9]

Sonda de captura de partículas IL-2R

5'-amina- GCA GGA TCC TGG TAT CCG CTA [21 meros] [SEQ ID NO 10]

ARN de IL-2

5' CGA CAA UUC UGA CGC CCA AUG GGA AUG AAG ACA CCA CAG CUG AUU
UCU UC [50 meros] [SEQ ID NO 11]

Fig. 10

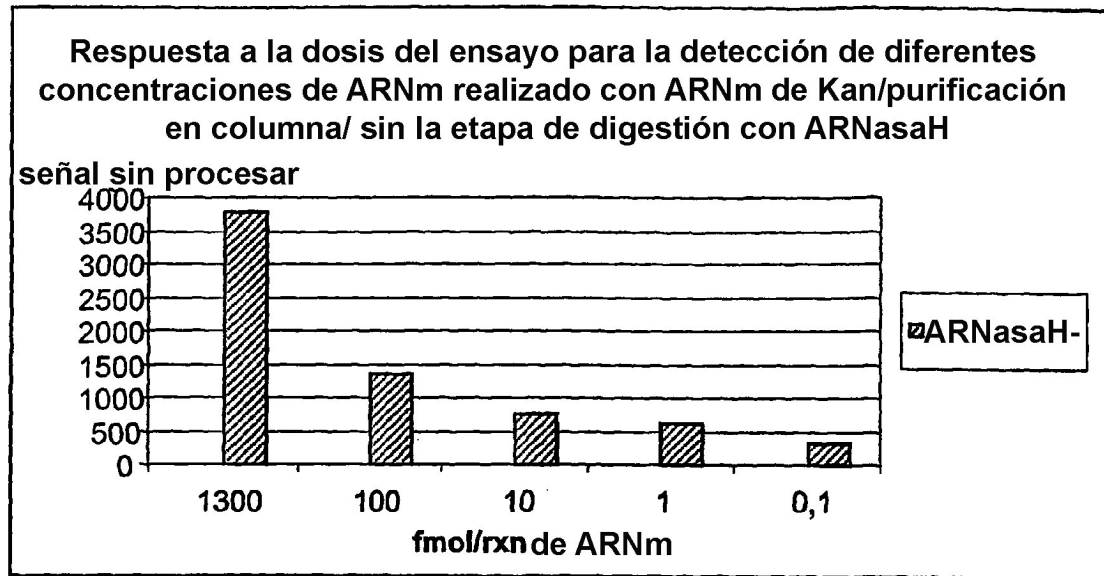


Fig. 11

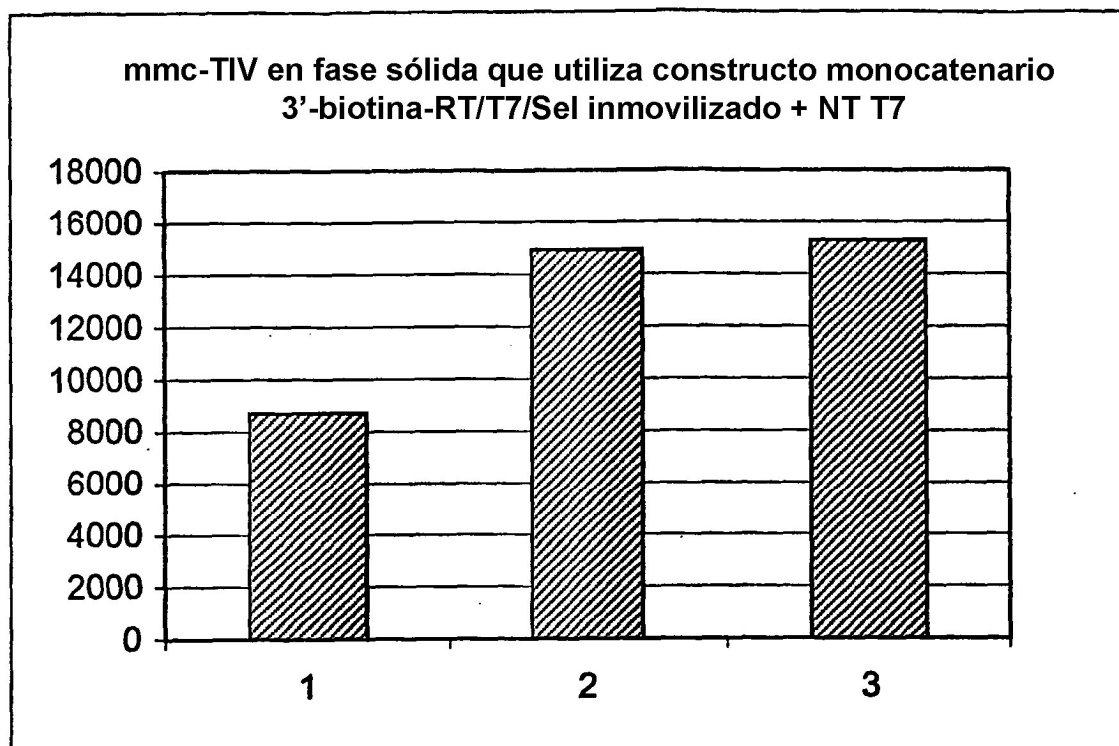


Fig. 12

Múltiples tandas para amplificación mediante TIV de alto rendimiento (ligamiento - mmc-TIV)

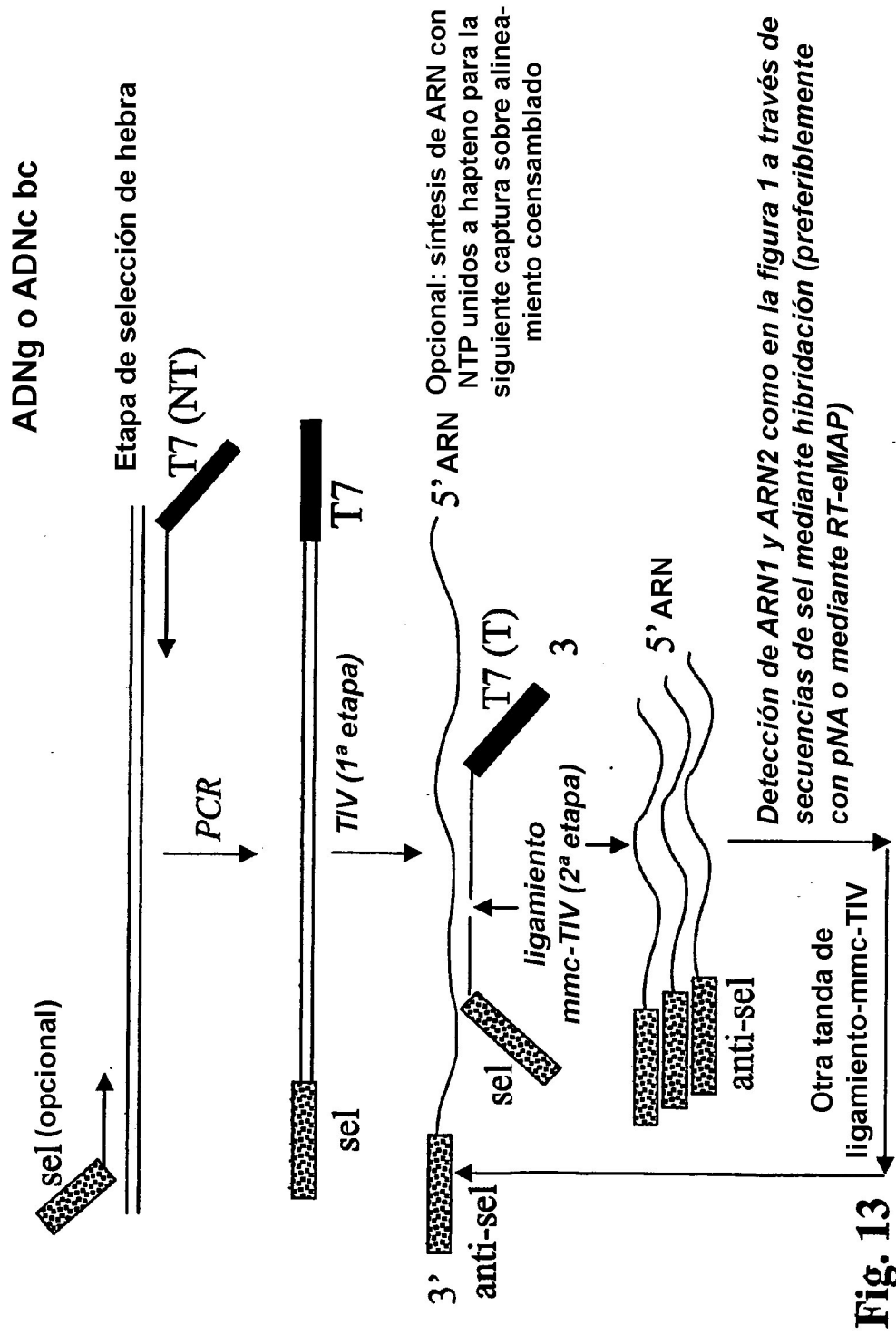


Fig. 13

Fig. 14. Secuencias estrechamente homólogas de la familia de genes de zeínas (asz 22) del maíz

Polimorfismo de nucleótido para 7 genes expresados en la línea endogámica BSSS53

```

05 ATAATATTTTGAGCATTTCAGAAACACACCAAGCGAAGCACATTAGCAACAACCTAACAAAC 60
22 ATAATATTTTGAGCATTTCAGAAACACACCAAGCGAAGCGCACTAGCAACAACCTAACAAAC
16 ATAATACTTTGAGCATTTCAGAAACACACCAAGCGAAGCGCACTAGCAACGACCAAACAAC
31 ATAATATTTTGAGCATTTCAGAAACACACCAAGCGAAGCGCACTAGCAACGACCAAACAAC
12 ATAATATTTTGAGCATTTCAGAAACACACCAAGCGAAGCTACCTAGCAACGACTTAACAAC
32 ATAATATTTTGAGCATTCAAAAAACACCAAGCGAAGCTCACTAGCAACGACCTAACAAAC
24 ATAATATTTTGAGCATTCAAAAAACACCAAGCGAAGCGCACTAGCAACGACCTAACACC
***** ** ***** ***** ***** ** *****
05 AATGGCTACCAAGATATTATCCCTCCTTGCGCTTCTTGCGCTTTTGTGCGAGCGCAACAAA 120
22 AATGGCTACCAAGATATTATCCCTCCTTGCGCTTCTTGCGCTTTTGTGCGAGCGCAACAAA
16 AATGGCTACCAAGATATTAGCCCTCCTTGCGCTTCTTGCGCTTTTGTGAGCGCAACAAA
31 AATGGCTACCAAGATATTAGCCCTCCTTGCGCTTCTTGCGCTTTTGTGAGCGCAACAAA
12 AATGGCTACCAAGATATTAGCCCTCCTTGCGCTTCTTGCGCTTTTGTGAGCGCAACAAA
32 AATGGCTACCAAGATATTAGCCCTCCTTGCGCTTCTTGCGCTTTTGTGAGCGCAACAAA
24 AATGGCTACCAAGATATTAGCCCTCCTTGCGCTTCTTGCGCTTTTGTGAGCGCAACAAA
***** ***** ***** ***** *****
05 TCGGTTCAATTATTCACAATGCTCACTTGCTCCAAGTTCCATTATTACACAGTTCTCTCCC 180
22 TCGGTTCAATTATTCACAATGCTCACTTGCTCCTAGTTCCATTATTCCACAGTTCTCTCCC
16 TCGGTTCAATTATTCACAATGCTCACTTGCTCCTAGTGCCATTATTCCACAGTTCTCTCCC
31 TCGGTTCAATTATTCACAATGCTCACTTGCTCCTAGTGCCATTATTCCACAGTTCTCTCCC
12 TCGGTTCAATTATTCACAATGCTCACTTGCTCCTAGTGCCATTATTCCACAGTTCTCTCCG
32 TCGGTTCAATTATTCACAATGCTCACTTGCTCCTAGTGCCATTATTCCACAGTTCTCTCCC
24 TCGGTTCAATTATTCACAAGTCTCACTTGCTCCTAGTGCCAGTATTCCACAGTTCTCTCCC
***** ***** ***** ***** *****
05 ACCAGTTACTTCAATGGGCTTCGAACACCCAGCTGTGCAAGCCTATAGGCTACAACAAGC 240
22 ACCAGTTACTTCAATGGGCTTCGAACACCCAGCTGTGCAAGCCTATAGGCTACAACAAGC
16 ACCAGTTACTTCAATGGGCTTCGAACACTCAGCTGTGCAAGCCAACAGGCTACAACAAGC
31 ACCAGTTACTTCAATGGGCTTCGAACACTCAGCTGTGCAAGCCAACAGGCTACAACAAGC
12 ACCAGTTACTTCAATGGGCTTCGAACACCTAGCTGTGCAAGCCTACAAGCTACAACAAGC
32 ACCAGTTACTTCAATGGGCTTCGAACACCTAGCTGTGCAAGCCTACAGGCTACAACAAGC
24 ACCAGTTACTTCAATGGGCTTCGAACATCCAGCCGTGCAAGCCTACAGGCTACAACCTAGC
***** ***** ***** ***** *****
05 AATTGCGGCGAGCGTCTTACAACAACCAATTTCCAGTTGCAACAACAATCCTTGGCACA 300 SEQ ID NO 1.
22 GATTGCGGCGAGCGTCTTACAACAACCAATTTGCCAATTGCAACAACAATCCTTGGCACA SEQ ID NO 1.
16 GCTTGC GCGAGCGTCTTACAACAACCAATTTGCCAATTGCAACAACAATCCTTGGCACA SEQ ID NO 1.
31 GCTTGC GCGAGCGTCTTACAACAACCAATTTGCCAATTGCAACAACAATCCTTGGCACA SEQ ID NO 1.
12 GCTTGC GCGAGCGTCTTACAACAACCAATTAACCAATTGCAACAACAATCCTTGGCACA SEQ ID NO 1.
32 GCTTACGCGAGCGTCTTACAACAACCAATTGACCAA----- SEQ ID NO 1.
24 GCTTGC GCGAGCGCCTTACAACAACCAATTTGCCAATTGCAACAACAATCCTTGGCACA SEQ ID NO 1.
** ***** ***** ***** *****

```

**Fragmentación de ADNg con la siguiente
extensión del cebador introducido**

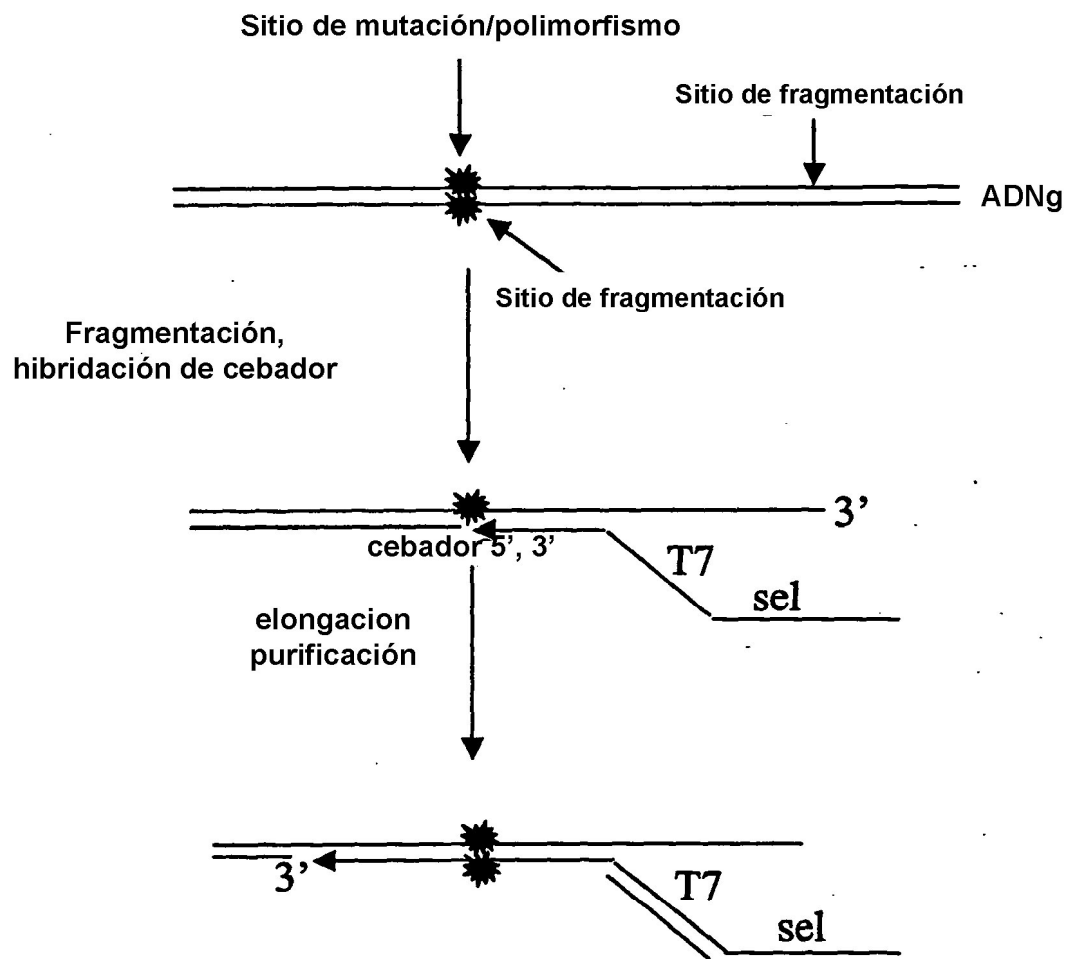


Fig. 15

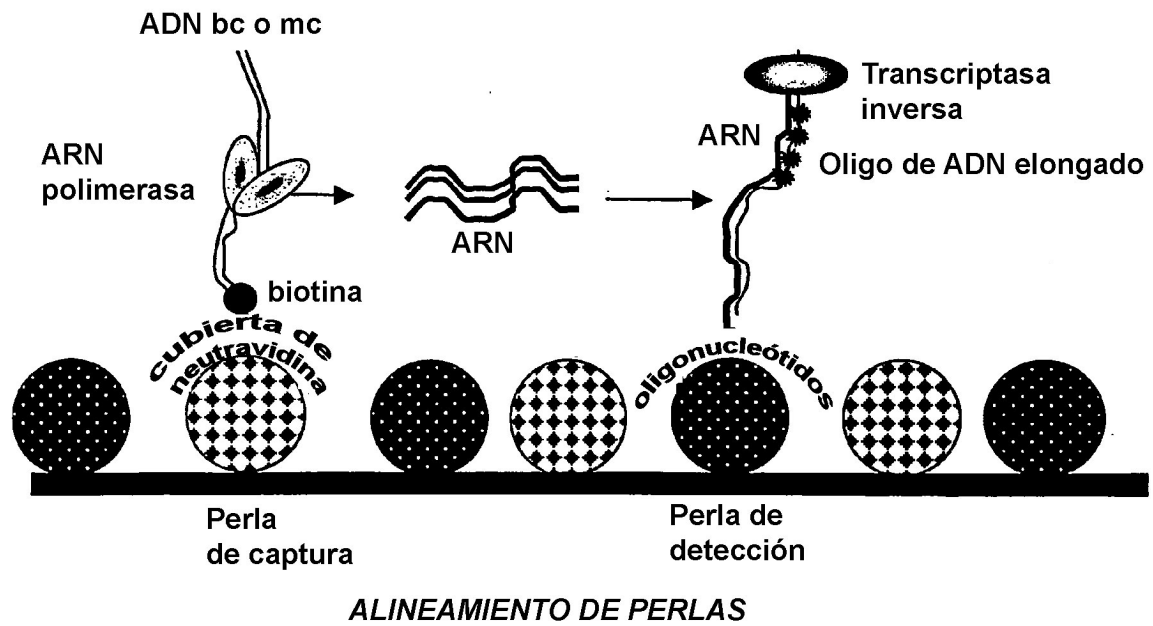
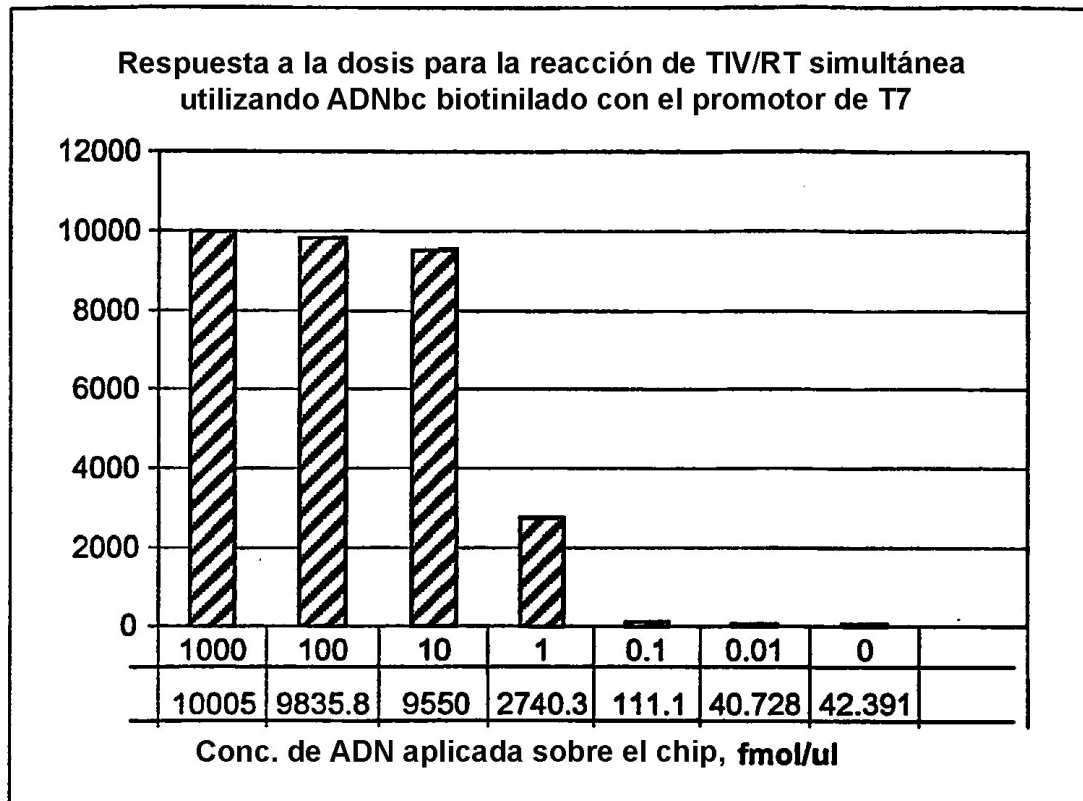


Fig. 16. Alineamiento de perlas coensambladas

**Fig. 17**

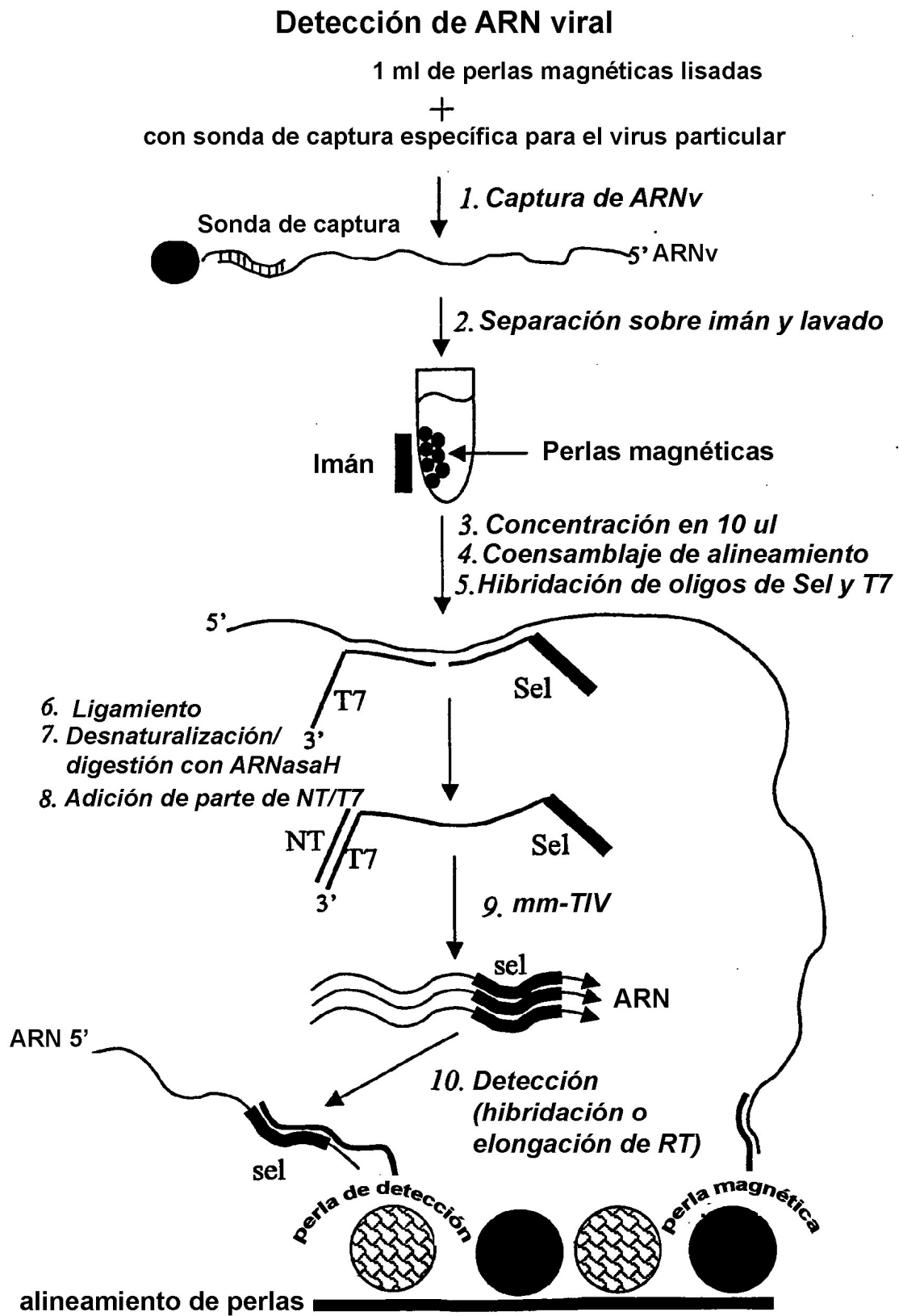


Fig. 18