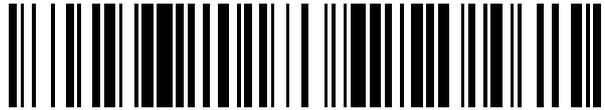


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 784**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2004 E 04774910 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015 EP 1664345**

54 Título: **Procedimientos basados en OLA para la detección de secuencias de ácidos nucleicos objetivo**

30 Prioridad:

02.09.2003 WO PCT/NL03/00613

02.06.2004 EP 04076618

25.06.2004 US 582716 P

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

06.07.2015

73 Titular/es:

KEYGENE N.V. (100.0%)

AGRO BUSINESS PARK 90

6708 PW WAGENINGEN, NL

72 Inventor/es:

HOGERS, RENÉ CORNELIS JOSEPHUS

74 Agente/Representante:

MORGADES MANONELLES, Juan Antonio

ES 2 539 784 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

Procedimientos basados en OLA para la detección de secuencias de ácidos nucleicos objetivo

5 Sector de la invención

La presente invención se refiere al sector de la biología molecular y de la biotecnología. En particular, la invención se refiere al sector de la detección de ácido nucleico, más en particular al diseño y composición de (colecciones) de sondas que pueden ser utilizadas para la detección de los ácidos nucleicos. La invención se refiere también a procedimientos para la detección de ácidos nucleicos que utilizan estas sondas y las composiciones. La invención da a conocer además sondas que son capaces de hibridar a una secuencia diana de interés, cebadores para la amplificación de sondas ligadas, utilización de estas sondas y cebadores en la identificación y/o detección de secuencias de nucleótidos que se refieren a una amplia variedad de trazos genéticos y genes, así como kits de cebadores y/o sondas adecuadas para su utilización en el procedimiento de acuerdo con la invención.

15 Antecedentes de la invención

Existe un interés rápidamente creciente en la detección de secuencias específicas de ácido nucleico. Este interés se ha suscitado no solamente por la secuencia de nucleótido del genoma humano y la presencia en el mismo, así como en los genomas de muchos otros organismos, de una abundante cantidad de polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP), sino también de las tecnologías de marcadores tales como AFLP y el reconocimiento general de la relevancia de la detección de secuencias específicas de ácido nucleico como indicación, por ejemplo, de enfermedades heredables genéticamente. La detección de los diferentes alelos del gen BRCA 1 de cáncer de mama para cribar la susceptibilidad de cáncer de mama es solamente uno de los numerosos ejemplos. El reconocimiento de que la presencia de sustituciones de nucleótidos individuales (y otros tipos de polimorfismos genéticos tales como pequeñas inserciones/delecciones; indelos) en genes proporciona una amplia variedad de información, ha contribuido a este interés incrementado. Se reconoce actualmente de manera general que estas sustituciones de nucleótidos individuales son una de las causas principales de un número significativo de enfermedades monogénicamente y multigénicamente heredadas, por ejemplo, en humanos, o que por otra parte están involucrados en el desarrollo de complejos fenotipos tales como trazos de comportamiento en plantas y especies de animales de granja. De este modo, las sustituciones de nucleótidos individuales están relacionadas también en muchos casos a o como mínimo son indicativas de importantes trazos en humanos, plantas y especies de animales.

El análisis de estas sustituciones de nucleótidos individuales e indelos resultará en una riqueza de información valiosa, que tendrá implicaciones amplias en la medicina y en la agricultura en los términos más amplios posibles. Se prevé, por ejemplo, de manera general, que estos desarrollos resultarán en medicación específica para los pacientes. Para analizar estos polimorfismos genéticos, hay una necesidad creciente de procedimientos adecuados, fiables y rápidos que posibiliten la manipulación de un gran número de muestras, y grandes números de SNP (predominantemente) en una forma de producción elevada, sin comprometer significativamente la calidad de los datos obtenidos. Uno de los procedimientos principales utilizados para el análisis de los ácidos nucleicos de una secuencia conocida se basa en la reasociación de dos sondas a una secuencia diana y, cuando las sondas están hibridadas de forma adyacente a la secuencia diana, efectuar el ligado de las sondas. Este concepto es designado de manera común como Ensayo de Ligado de Oligonucleótidos o Amplificación de Ligado de Oligonucleótidos (OLA).

El principio OLA ha sido descrito, entre otros, en el documento US 4.988.617 (Landegren y otros). Esta publicación da a conocer un procedimiento para determinar la secuencia de ácido nucleico en una región de una secuencia de ácido nucleico conocida que tiene una posible mutación conocida. Para detectar la mutación, se seleccionan oligonucleótidos para reasociar a segmentos inmediatamente adyacentes de la secuencia a determinar. Una de las sondas de oligonucleótidos seleccionada tiene una región extrema, de manera que uno de los nucleótidos de la sección extrema es complementario del nucleótido normal o el nucleótido mutado en la posición correspondiente en la secuencia de ácido nucleico conocida. Se da a conocer una ligasa que conecta de manera covalente las dos sondas cuando se corresponden correctamente en pares de bases y están situadas de manera inmediatamente adyacente entre sí. La presencia, ausencia o cantidad de las sondas enlazadas es una indicación de la presencia, ausencia o cantidad de la secuencia conocida y/o de la mutación.

Abbot y otros, en el documento WO 96/15271 desarrollaron un procedimiento para un proceso de amplificación de ligado múltiple que comprende la hibridación y ligado de sondas adyacentes. Estas sondas están dotadas de un segmento de longitud adicional, cuya secuencia, de acuerdo con Abbot y otros, es poco importante. La introducción deliberada de diferencias de longitud, intenta facilitar la discriminación en base a la longitud del fragmento en técnicas basadas en gel.

Los documentos WO 97/45559, W097/31256, W098/03673, W000/56929, W000/56927, W000/40755 (Barany y otros) describen procedimientos para la detección de diferencias de secuencias de ácido nucleico utilizando combinaciones de reacciones de detección de ligasa (LDR) y reacciones de cadena de polimerasa (PCR). Se dan a conocer procedimientos que comprenden la reasociación de pares de sondas alelo-específicas a una secuencia

diana y subsiguiente ligado con ligasa termoestable. La amplificación de los productos ligados con cebadores etiquetados de forma fluorescente tiene como resultado un producto amplificado etiquetado de forma fluorescente. La detección de los productos se basa en la separación por tamaño o en la movilidad electroforética o en un conjunto direccionable.

Se han dado a conocer otras variantes de técnicas basadas en OLA, entre otros en Nilsson y otros. Human mutation, 2002, 19,410-415; Science 1994, 265: 2085-2088; US 5.876.924; WO 98/04745; WO 98/04746; US6.221.603; WO 03/054511, US5521065, US5962223, EP185494, EP246864, US6027889, EP745140, EP964704, US20030119004, US2003190646, EP1313880.

Publicaciones recientes (Hardenbol y otros, Nat. Biotechnology 2003, 21, 673-678; Baner y otros, Nucleic Acids Research, 2003, 31, e103) han mostrado que el principio OLA puede ser altamente multiplexado, haciendo del mismo una técnica atractiva para genotipado de SNP de alto rendimiento, especialmente en combinación con plataformas de detección basadas en la secuencia, tal como las utilizadas por los autores de este documento. No obstante, en combinación con plataformas de detección basadas en longitud, la elevada capacidad multiplex de la técnica OLA es difícil de explotar, debido a la distribución limitada de tamaños de los productos de amplificación obtenidos a partir de sondas ligadas que pueden ser separadas de forma detectable utilizando instrumentos de secuenciación corrientes (capilares) cuando se utilizan sondas de ligado sintetizadas por medios químicos. La razón de ello es que el límite superior de las técnicas de síntesis de oligonucleótidos de tipo químico disponibles se encuentra aproximadamente en 100 a 150 pares de bases, que es mucho menor que el rango de dimensiones cubierto por la mayor parte de instrumentos de secuenciación (capilares). No obstante, los instrumentos de secuenciación o placas de gel son plataformas potentes de detección debido a su facilidad de utilización, tiempo manual limitado y costes operativos relativamente bajos en comparación con la mayor parte de plataformas de chips comercialmente disponibles (hibridación).

Schouten y otros (Nucleic Acids Research, 2003, 30, e57; y EP130113 y W001/61033) han contrarrestado parcialmente esta limitación de la detección basada en longitud debido a la limitación de longitud de sondas de ligado sintetizadas químicamente preparando las sondas utilizando fago M13 de cadena única. Esto asegura sondas de alta calidad con longitud uniforme, capaces de abarcar toda la ventana de longitud de un instrumento de secuenciación (capilar) o sistema de placa de gel para la detección de sondas de ligado amplificadas. No obstante, el procedimiento de preparación de sondas de Schouten y otros es engorroso, requiere mucho tiempo, es difícil de automatizar y por lo tanto es costoso y no está bien adecuado para aplicaciones que comportan múltiples secuencias diana distintas. Por lo tanto, se requieren todavía otras soluciones para hacer una utilización eficiente de plataformas de detección basadas en el tamaño para la detección de sondas de ligado amplificadas.

Van Eijk y otros (EP 1319178, W003/52140; W003/52141 W003/52142, Nucleic acids research, 2004,32 (4), e47) han facilitado una solución a este problema al amplificar selectivamente subconjuntos de sondas ligadas utilizando cebadores selectivos AFLP tales como los descritos por Vos y otros para la técnica de huella dactilar AFLP (Vos y otros, Nucl. Acids Res., 1995,21, 4407-4414; EP534858, US6045994, W093/06239). Si bien este enfoque permite la selección de subconjuntos específicos de sondas ligadas simétricamente para co-amplificación en la misma reacción con un único primer par, la composición de los subconjuntos amplificables está fijada y determinada por incorporación de los sitios de unión apropiados para los cebadores AFLP en las sondas de ligado cuando se diseñan.

Con una demanda creciente para ensayos múltiple de alto rendimiento (es decir, ensayos capaces de enfocar (detectar) un gran número de secuencias diana en una muestra y que son capaces de tratar muchas muestras en un corto periodo de tiempo), uno de los aspectos menos ventajosos de muchas de las sondas utilizadas en los ensayos actuales de ligado de oligonucleótidos es la tendencia a aumentar las longitudes de las sondas y la longitud de los productos de ligado correspondientes.

Los procedimientos actuales son capaces de proporcionar oligonucleótidos por reacciones de acoplamiento de nucleótidos con un rendimiento de 98,5% por nucleótido. Esto significa que con una longitud creciente, para cada nucleótido de la sonda, el rendimiento de la sonda de longitud completa disminuye y la cantidad de sondas no deseadas aumenta (productos de síntesis incompletos). Como resultado, para proporcionar sondas de suficiente longitud y/o suficiente pureza, se necesitan etapas adicionales para purificar las sondas antes de su utilización en ningún ensayo o se requieren procedimientos alternativos de síntesis.

La longitud creciente de los productos del ligado de sondas presenta también una desventaja, en particular con sistemas de detección basados en la longitud, pero también en el caso de detección basada en masa o detección basada en hibridación debido a la creciente posibilidad de hibridación cruzada.

Los presentes inventores se han planteado el objetivo de investigar los ensayos de ligado de oligonucleótidos y dar a conocer ensayos que puedan proporcionar la misma cantidad de información de la misma calidad, solamente con sondas y/o productos de ligado de longitud más corta y/o más flexible. Uno de nuestros objetivos consiste en modificar el ensayo en el que se utilizan estas sondas e introducir más flexibilidad.

Descripción de la invención

5 En ciertas realizaciones, se dan a conocer procedimientos para determinar la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia diana en una muestra de ácido nucleico. En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende la disposición de una muestra de ácido nucleico, como mínimo, una primera sonda y como mínimo una segunda sonda para cada secuencia diana a detectar en la muestra. En ciertas realizaciones, la primera sonda tiene una primera sección específica diana que es complementaria de una primera parte de la secuencia diana. En ciertas realizaciones, la segunda sonda tiene una segunda sección específica diana que es complementaria de una segunda parte de la secuencia diana. En ciertas realizaciones, la primera y segunda partes de la secuencia diana están dispuestas adyacentes una a otra. En ciertas realizaciones, la segunda sonda comprende una sección de etiqueta que esencialmente es no complementaria de la sección diana. En ciertas realizaciones, la sección de etiqueta comprende una secuencia de unión a cebador.

15 En ciertas realizaciones, la y segunda secciones específicas diana de la primera y segunda sondas se pueden reasociar a la primera y segunda partes de las secuencias diana. En ciertas realizaciones, las primera y segunda secciones específicas diana de las sondas son reasociadas de forma adyacente en la secuencia diana.

20 En ciertas realizaciones, se disponen medios para conectar la primera y segunda secciones específicas diana reasociadas de forma adyacente a la secuencia diana y hacer que la primera y segunda secciones específicas diana se conecten, para producir una sonda conectada correspondiente a una secuencia diana de la muestra. En ciertas realizaciones, se dispone un cebador compuesto de la mezcla que comprende las sondas conectadas, cuyo cebador compuesto comprende una sección que es complementaria, por lo menos de una parte de la primera sección específica diana y que comprende además una segunda sección de unión al cebador.

25 En ciertas realizaciones, el cebador compuesto se puede reasociar, como mínimo, con una parte de la primera sección específica diana. En ciertas realizaciones, el cebador compuesto es alargado. En ciertas realizaciones, se dispone un conjunto de cebadores que comprenden un primer cebador que tiene una secuencia esencialmente idéntica a la primera secuencia de unión al cebador, y un segundo cebador que es complementario de la segunda secuencia de unión al cebador. En ciertas realizaciones, la mezcla resultante es amplificada para producir una muestra amplificada que comprende amplicones que son representaciones de las sondas conectadas. En ciertas realizaciones, la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia diana en una muestra es determinada detectando la presencia, ausencia o cantidad del amplicón correspondiente. La cantidad puede ser determinada comparándola con un estándar.

35 La presente invención da a conocer un procedimiento multiplexado, flexible, de alta producción, para la detección de la presencia, ausencia o cantidad de (a) secuencias diana en una muestra de ácido nucleico. El procedimiento comprende el contacto de la secuencia diana con un conjunto de, como mínimo, de dos sondas, una primera sonda que contiene una sección que es complementaria de una primera parte de la secuencia diana y una segunda sonda que contiene una sección que es complementaria de una segunda parte de la secuencia diana. Cuando las dos sondas son reasociadas o hibridadas de forma adyacente, pueden ser ligadas para producir sondas conectadas correspondientes a una secuencia diana de la muestra. Se dispone un cebador compuesto que comprende una sección que es complementaria, como mínimo, de una parte de la primera sección específica diana y que comprende además un segundo lugar de unión al cebador. El cebador compuesto puede hibridar con la parte de la primera sección específica diana de la primera sonda. Cuando tiene lugar la hibridación, el cebador compuesto se alarga. El cebador compuesto alargado es amplificado utilizando un conjunto de primeros y segundos cebadores complementarios de los correspondientes primer y segundo lugares de unión. La amplificación produce una muestra amplificada que comprende amplicones que son representaciones de las sondas conectadas (o ligadas). La determinación de la presencia de una secuencia diana tiene lugar por detección de la presencia del amplicón correspondiente en la muestra amplificada.

Descripción detallada de la invención

55 En una realización preferente, la invención pertenece a un procedimiento para determinar la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia de nucleótido diana en una muestra de ácido nucleico, cuyo procedimiento comprende las siguientes etapas:

60 a) proporcionar a una primera muestra de ácido nucleico una primera sonda 1 para cada secuencia diana T a detectar en la muestra, de manera que la primera sonda tiene una primera sección específica diana 4 que es complementaria de una primera parte de la secuencia diana 5 y una segunda sonda 2 para cada secuencia diana a detectar en la muestra, de manera que la segunda muestra tiene una segunda sección específica diana 6 que es complementaria de una segunda parte de la secuencia diana 7, de manera que la primera y segunda partes de la secuencia diana están situadas adyacentes entre sí 3, y de manera que la segunda sonda comprende además una sección de etiqueta 8 que es esencialmente no complementaria de la secuencia diana, de manera que la sección de etiqueta comprende una primera sección 10 de unión de cebador;

b) permitir que la primera y segunda secciones específicas diana de la primera y segunda sondas se reasocian con la primera y segunda partes de cada secuencia diana que se encuentra presente en la muestra de manera que la primera y segunda secciones específicas diana de las sondas son reasociadas de forma adyacente en la secuencia diana;

c) disponer medios para conectar la primera y segunda secciones específicas diana reasociadas de forma adyacente a la secuencia diana y permitir que la primera y segunda secciones específicas diana sean conectadas, para producir una sonda conectada 11 correspondiente a una secuencia diana de la muestra;

d) facilitar a la mezcla resultante de la etapa c) un primer cebador compuesto 12 que comprende una sección 15 que es complementaria, por lo menos de una parte de la primera sección específica diana y una segunda sección de unión 14 de cebador;

e) permitir que el cebador compuesto se reasocie, por lo menos con una parte de la primera sección específica diana;

f) alargar el cebador compuesto;

g) facilitar un conjunto de cebadores que comprenden un primer cebador 18 que tiene una secuencia esencialmente idéntica a la primera sección de unión de cebador de la sonda conectada, y un segundo cebador 17 que es esencialmente idéntico a la segunda sección de unión de cebador del cebador compuesto;

h) amplificar la muestra resultante para producir una muestra amplificada que comprende amplicones 19 que son representaciones de las sondas conectadas;

i) determinar la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia diana en la muestra detectando la presencia, ausencia o cantidad del amplicón correspondiente.

Los inventores han proporcionado flexibilidad adicional de la composición de subconjuntos amplificables de sondas ligadas puesto que ello es ventajoso para adaptar la técnica de detección de la secuencia basada en OLA/ligado, entre otros, plataformas de detección basadas en la longitud, y también proporcionar más flexibilidad (o flexibilidad incrementada) con respecto a la combinación de sondas ligadas que co-amplificadas, más allá de la que se consigue utilizando sondas de ligado que contienen nucleótidos selectivos en combinación con cebadores de amplificación selectivos basados en AFLP.

La presente invención proporciona esta solución al facilitar múltiples cebadores con una secuencia común de cola 5' para la ronda inicial de amplificación de sondas ligadas. Cada uno de estos cebadores están direccionados hacia una única secuencia diana, tal como una secuencia específica del lugar (o alelo) en una o varias sondas de ligado. Esta multiplicidad de cebadores de amplificación está prevista conjuntamente con un cebador de amplificación único, preferentemente un exceso molar del mismo, con una secuencia esencialmente similar a la de cola '5 de la multiplicidad de cebadores y, preferentemente, un exceso molar de un cebador inverso común para asegurar una co-amplificación estable en las subsiguientes rondas de amplificación por los dos cebadores, que se encuentran preferentemente presentes en la mayor concentración molar .se describe un concepto que utiliza cebadores inversos comunes en Lin y otros, PNAS, 1996, 93(6), 2582-2587.

Otra ventaja de este enfoque es que la longitud de las sondas del ligado sintetizadas (químicamente) es más corta, lo que permite un mayor rendimiento y calidad de las sondas de ligado y/o mayores niveles de multiplexado en la etapa de ligado, dado el límite superior de longitud impuesto por los procesos de síntesis. La razón de ello es que se puede asignar un número mayor de nucleótidos de complemento de longitud ("stuffers") cuando se pueden omitir una (o ambas) regiones de unión de cebador de la secuencia de ligado.

Consideradas conjuntamente, estas ventajas aseguran la utilización de detección de secuencia basada en ligado multiplexado de forma completamente flexible en plataformas de detección basadas en longitud, manteniendo simultáneamente la ventaja de una reacción de ligado altamente multiplexada igual que en la primera etapa, lo que asegura la exigencia de una baja cantidad de muestras diana de ácido nucléico/biológicas, incluso en el caso de que se requiera la detección de muchas secuencias diferentes o polimorfismos diferentes.

En la etapa a) del procedimiento, se proporciona a la muestra de ácido nucléico, como mínimo, una primera sonda para cada secuencia diana. La primera sonda contiene una primera sección específica diana. La primera sección específica diana es complementaria de una primera parte de la secuencia diana. Se facilita además a la secuencia de ácido nucléico, como mínimo, una segunda sonda para cada secuencia diana a detectar en la muestra. La segunda sonda comprende una sección que es complementaria de una segunda parte de la secuencia diana. Preferentemente, la primera y segunda partes de la secuencia diana están situadas esencialmente adyacentes entre sí. La segunda sonda comprende además una sección de etiqueta que esencialmente no es complementaria de la secuencia diana. La sección de etiqueta comprende una primera sección de unión de cebador.

En la etapa b), la primera y segunda secciones específicas diana de la primera y segunda sondas, se dejan reasociar a las respectivas primera y segunda partes de la secuencia diana. La reasociación (o hibridación) se lleva a cabo en condiciones apropiadas para la reasociación, tal como se ha indicado como ejemplo en otros lugares de este documento. Preferentemente, la primera y segunda secciones específicas diana de las sondas son alineadas de forma adyacente en la secuencia diana. En ciertas realizaciones específicas, la primera y segunda secciones

específicas diana de las sondas no son reasociadas adyacentes en la secuencia diana tal como se ha indicado como ejemplo en el ligado de intersticio ("gap-ligation").

En la etapa c), se disponen medios para conectar (o ligar) la primera y segunda secciones específicas diana de las sondas cuando son reasociadas de forma adyacente. Los medios pueden ser medios de ligado químico o medios de ligado enzimáticos. Son ejemplos de dichos medios enzimáticos, enzimas tales como ligasa, tal como se indica a título de ejemplo más adelante. La primera y segunda secciones específicas diana de las sondas, se pueden conectar. La conexión de la primera y segunda secciones específicas diana de las sondas, tiene como resultado una sonda conectada que corresponde a una secuencia diana de la muestra. La sonda conectada puede ser descrita como "1^{ra} sección específica diana - 2^{nda} sección específica diana - sección de etiqueta".

En la etapa d), se facilita un cebador compuesto. El cebador compuesto comprende una sección que es complementaria, como mínimo, de una parte de la primera sección específica de diana. La sección puede ser complementaria de la totalidad de la primera sección específica diana o solamente de una parte de la misma, tal como 50, 60, 70, 80 o 90% de la primera sección específica diana completa (redondeada a número más próximo de nucleótidos completos). La sección es preferentemente suficientemente grande para hibridar selectivamente la parte correspondiente de la primera sección específica diana de la primera sonda y no de otros nucleótidos de la muestra a efectos de permitir el alargamiento específico de la sonda compuesta a lo largo de la sonda conectada. El cebador compuesto comprende además una segunda sección de unión de cebador.

En la etapa e), el cebador compuesto se puede reasociar, como mínimo, a una parte de la primera sección específica diana de la primera sonda. El cebador compuesto se deja reasociar en condiciones restrictivas adecuadas para la reasociación tal como se describen en otros lugares de esta descripción. Preferentemente, el cebador compuesto se reasocia selectivamente a la primera sonda y no a otros oligonucleótidos de la muestra, incluyendo otras secuencias diana. En ciertas realizaciones, se eliminan secuencias diana (enzimáticamente) para conseguir este efecto. Preferentemente, el dúplex de la sonda conectada y la secuencia diana son desnaturalizados antes de la reasociación del cebador compuesto.

En la etapa f), el cebador compuesto es alargado, preferentemente en presencia de enzimas tales como polimerasas y preferentemente en presencia de dNTP. El cebador compuesto es alargado utilizando la sonda conectada como plantilla. El resultado es un cebador compuesto alargado. El cebador compuesto alargado es una representación del producto de ligado (sonda conectada) y, con ello, de la secuencia diana de la muestra. El cebador compuesto alargado puede ser descrito (esquemáticamente) como "2^{ndo} lugar de unión de cebador - 1^{era} sección específica diana - 2^{nda} sección específica diana - sección etiqueta". En ciertas realizaciones, el cebador compuesto alargado puede ser descrito como "2^{ndo} lugar de unión de cebador - (2^{ndo} identificador opcional) - 1^{ra} sección específica diana - 2^{nda} sección específica diana - ("1^{er} identificador opcional) - 1^{er} lugar de unión de cebador".

En la etapa g), se facilita un conjunto de cebadores. El conjunto comprende un primer cebador que es esencialmente idéntico a la primera sección de unión de cebador de la segunda sonda y un segundo cebador capaz de reasociarse a la primera sección de unión de cebador. El primer cebador es esencialmente idéntico a la primera sección de unión de cebador. El primer cebador es capaz de reasociarse al complemento de la primera sección de unión de cebador, de manera que la amplificación puede ser iniciada desde el complemento de la primera sección de unión. Ambos cebadores son capaces de amplificación de iniciación. Los cebadores, así como los cebadores selectivos, se describen en otros lugares de esta descripción.

En ciertas realizaciones, el cebador compuesto y los cebadores son facilitados a la mezcla obtenida después de la etapa c) simultáneamente, es decir, al mismo tiempo y/o en una etapa. En estas realizaciones preferentes, los cebadores se añaden preferentemente a la mezcla obtenida después de la etapa c), antes del alargamiento del cebador compuesto, es decir, la etapa g) es llevada a cabo preferentemente antes de la etapa f) y/o las etapas d) y g) pueden ser preferentemente combinadas en una etapa única que es llevada a cabo antes de las etapas e) y f). En ciertas realizaciones, el alargamiento del cebador compuesto y la amplificación del cebador compuesto alargado se combinan en una primera etapa. En ciertas realizaciones, la proporción molar del primero, segundo o primero y segundo cebador con respecto al cebador compuesto está comprendida entre 1 y 100.000. En ciertas realizaciones, la proporción molar está comprendida entre 2 y 10.000. En ciertas realizaciones, la proporción molar está comprendida entre 5 y 1000. En ciertas realizaciones, la proporción molar está comprendida entre 10 y 100.

En ciertas realizaciones, la proporción molar de la sonda compuesta con respecto a la primera o segunda sondas está comprendida entre 1 y 1000, preferentemente entre 5 y 500, más preferentemente entre 10 y 100, y más preferentemente entre 25 y 50.

En la etapa h), es amplificada la mezcla resultante de la etapa g). Preferentemente, el dúplex del cebador compuesto alargado y la sonda conectada es desnaturalizada antes de la iniciación de la amplificación. La amplificación comprende una amplia gama de técnicas para amplificar secuencias de ácidos nucleicos, de forma lineal o exponencialmente. Las técnicas de amplificación a título de ejemplo comprenden, sin que ello sea limitativo, PCR o cualquier otro procedimiento que utilice una etapa de extensión del cebador, y transcripción o cualquier otro procedimiento de generar, como mínimo, un producto de transcripción de ARN. Otros ejemplos no limitativos de

amplificación son la reacción de detección de ligasa (LDR), y la reacción de cadena de ligasa (LCR). Los procedimientos de amplificación pueden comprender ciclado térmico o se pueden llevar a cabo de forma isotérmica. La mezcla resultante es la muestra amplificada. La muestra amplificada comprende amplicones que son el resultado de la amplificación del cebador compuesto alargado. Los amplicones son, con intermedio del cebador alargado, representaciones de la sonda conectada y consecuencia de la secuencia diana a detectar.

En la etapa i), se detecta la presencia o ausencia de la secuencia diana determinando la presencia o ausencia del amplicón correspondiente. La detección es posible, en principio, en un amplio número de plataformas de detección, incluyendo las que se basan en la longitud (o movilidad), masa o secuencia (basada en hibridación). La detección se basa en la identificación de la presencia, ausencia o cantidad de un amplicón específico o una parte de un amplicón (i) en una dirección específica en un soporte direccionable (es decir, localización en un micro-conjunto); (ii) ocupar una longitud específica o dirección de movilidad, o (iii) ocupar una dirección de masa específica. En ciertas realizaciones, la detección se puede basar en la detección de la presencia, ausencia o cantidad de una etiqueta en el amplicón.

Los diferentes aspectos de la presente invención se explican de manera más detallada a continuación.

Sondas

Las secciones de las sondas de oligonucleótido que son complementarias de la secuencia diana se designan de manera que, para cada secuencia diana de una muestra se dispone una primera y una segunda sonda, de manera que cada una de las sondas contiene una sección que es complementaria de una parte de la secuencia diana y las partes complementarias correspondientes de la secuencia diana son localizadas esencialmente adyacente entre sí. En ciertas realizaciones, la combinación de un par de sondas con uno o varios cebadores compuestos se indica como conjunto de sondas.

En ciertas realizaciones, dentro de un par de sondas de oligonucleótidos, la primera sonda de oligonucleótido tiene una sección en el extremo 5' que es complementaria de una primera parte de una secuencia diana y la segunda sonda de oligonucleótido tiene una sección en su extremo 3' que es complementaria de una segunda parte de la secuencia diana. De este modo, cuando el par de sondas es reasociado a partes complementarias de una secuencia diana, el extremo 5' de la primera sonda de oligonucleótido es esencialmente adyacente al extremo 3' de la segunda sonda de oligonucleótido, de manera que los respectivos extremos de las dos sondas pueden ser ligados para formar un enlace de fosfodiéster o conectándose de forma covalente en cualquier otra forma adecuada. Ver también figura 2.

Por lo tanto, en el procedimiento de la invención preferentemente se utiliza, como mínimo, un par de dos sondas de oligonucleótido. No obstante, en ciertas realizaciones, en particular en las realizaciones de ligado de intersticio ("gap-ligation"), el par de las dos sondas se puede complementar con una tercera u otra sonda de oligonucleótido adicional. Esto se considera todavía un par de sondas. En estos casos, las terceras o sondas de oligonucleótido adicionales comprenden preferentemente, o más preferentemente consisten en una o varias secuencias de nucleótidos complementarias de las secuencias diana a detectar, de manera que cuando tiene lugar una hibridación satisfactoria a la secuencia diana, junto con la primera y segunda sondas de oligonucleótido, se pueden conectar o ligar la primera, segunda, tercera y otras sondas para formar una sonda conectada (ver más adelante).

Preferentemente, se dispone un grupo de conjuntos múltiples de sondas que comprenden primeras y segundas sondas de oligonucleótidos y cebadores compuestos, de manera que cada par es complementario de secuencias diana diferentes en una muestra a efectos de posibilitar la detección de múltiples secuencias diana. Un conjunto de sondas de oligonucleótido para una secuencia diana determinada en una muestra será distinta, como mínimo, en secuencia de nucleótido con respecto a conjuntos de sondas para otras secuencias diana, y será preferentemente también distinta en longitud con respecto a conjuntos de sondas para otras dianas, más preferentemente, un conjunto de sondas para una diana determinada producirá una sonda conectada y/o sonda conectada amplificada (amplicones obtenidos después de amplificación opcional de las sondas conectadas) que difiere en longitud de las sondas conectadas correspondientes a otras dianas en la muestra tal como se describe más adelante. De manera alternativa, sondas conectadas y/o amplicones correspondientes de diferentes dianas pueden tener idéntica longitud si se pueden distinguir de otro modo, por ejemplo, por diferentes etiquetas tal como se describe más adelante. De manera alternativa, sondas conectadas y/o amplicones se pueden distinguir basándose en secuencia o masa en vez de longitud, utilizando procedimientos basados en hibridación con sondas (etiquetadas) o espectrometría de masa, respectivamente.

La sección específica diana en las sondas de la presente invención comprende cada una de ellas (independientemente) desde 15 a 35, preferentemente de 18 a 32, y más preferentemente de 20 a 30 nucleótidos.

En ciertas realizaciones, la sección específica diana contiene, como mínimo, un nucleótido específico de alelo, preferentemente en el extremo 3' de una sección diana adyacente al extremo 5' fosforilado de la primera sonda (figura 4). Esto permite la detección de un SNP específico o un alelo de un lugar. Cuando el nucleótido específico del alelo se encuentra presente en la secuencia diana, las dos sondas formarán un dúplex correspondiente que puede

ser ligado a una sonda conectada. La detección de la sonda conectada o del amplicón correspondiente es la indicación de la presencia de dicho alelo específico de la muestra.

5 En una realización, la muestra puede ser dotada de uno o varios grupos de conjuntos de sondas, preferentemente dos o más, preferentemente tres o más grupos de conjuntos de sondas. Al combinar cada uno de los grupos, como mínimo, con un cebador que es capaz de amplificar selectivamente solamente un grupo entre los otros grupos, se puede obtener un incremento en la producción dado que un ensayo de ligado puede ser utilizado para la detección de grupos distintos de secuencias diana. Un conjunto de sondas puede ser dispuesto en una etapa en la muestra, o cada sonda del conjunto se puede disponer en la muestra individualmente. Para un grupo que comprende múltiples juegos de sondas, cada tipo de sonda (primera, segunda o cebador compuesto) se puede añadir separadamente.

Primera sonda

15 La primera sonda comprende una sección específica diana que es complementaria de una primera parte de la secuencia diana a detectar en la muestra de ácido nucléico. En ciertas realizaciones, la primera sonda contiene una sección de etiqueta que no es complementaria con la secuencia diana. La sección de etiqueta puede ayudar en el aislamiento intermedio o purificación de cualesquiera productos ligados. En ciertas realizaciones, la sección de etiqueta comprende secuencias ricas en GC o secuencias ZIP. En ciertas realizaciones, la sección de etiqueta comprende ligandos de actividad tales como biotina. En ciertas realizaciones, la primera sonda es resistente a la exonucleasa para permitir la eliminación de sondas no ligadas. En ciertas realizaciones, la primera sonda no comprende una secuencia de unión a cebador. En ciertas realizaciones, la primera sonda consiste de una sección específica diana que es complementaria de una primera parte de la secuencia diana a detectar en la muestra de ácido nucléico. En ciertas realizaciones, la primera sonda no es capaz de hibridar a otras secuencias (diana) de la muestra de ácido nucléico.

25 Segunda sonda

La segunda sonda comprende una sección específica diana que es complementaria de parte de la secuencia diana. La segunda sonda comprende además una sección de etiqueta que es esencialmente no complementaria de la sección diana. Preferentemente, la sección de etiqueta no es capaz de hibridar a la secuencia diana. Preferentemente, la sección de etiqueta tampoco es capaz de hibridar las otras secuencias (diana) en la muestra de ácido nucléico.

35 La sección de etiqueta comprende un primer lugar de unión de cebador. En ciertas realizaciones, se sitúa una secuencia identificadora entre el lugar de unión del cebador y la sección específica diana. La presencia de la secuencia identificadora en las sondas conectadas y/o amplicones proporciona la identificación de la secuencia diana en la muestra. En ciertas realizaciones, el identificador proporciona una diferencia de longitud entre diferentes conjuntos de sondas dirigidos a diferentes secuencias diana en una muestra, de manera tal que la presencia de diferentes secuencias diana se basa en detección basada en longitud (o movilidad), tal como técnicas electroforéticas. En ciertas realizaciones, el identificador proporciona una diferencia de secuencia entre diferentes sondas dirigidas a diferentes secuencias diana en una muestra, de manera tal que la presencia de diferentes secuencias diana se basa en una detección basada en secuencia, tal como conjuntos ("arrays"). En ciertas realizaciones, el identificador proporciona una diferencia de masa entre diferentes sondas dirigidas a diferentes secuencias diana en una muestra, de manera tal que la presencia de diferentes secuencias diana se basa en detección basada en masa, tal como Maldi-TOF.

50 En ciertas realizaciones, la sección de etiqueta puede comprender lugares de reconocimiento para endonucleasas de restricción. La presencia de estos lugares de restricción permite reducir adicionalmente las dimensiones de cualquier amplicón y, por lo tanto, permite incrementar adicionalmente la capacidad de producción de las técnicas de detección basadas en masa o técnicas de detección basadas en longitud.

Cebador compuesto

55 El cebador compuesto comprende una primera sección específica diana que es complementaria de, como mínimo, una parte de la sección específica diana de la primera sonda. En ciertas realizaciones, la primera sección específica diana es esencialmente idéntica, como mínimo, a una parte de la secuencia diana. La primera sección específica diana del cebador compuesto contiene, como mínimo, 4 o como mínimo 8, preferentemente como mínimo 10, más preferentemente como mínimo 12 nucleótidos que son complementarios de la sección específica diana de la primera sonda, preferentemente como mínimo de 15, más preferentemente como mínimo de 18, y de modo más preferente como mínimo de 20 nucleótidos.

60 En ciertas realizaciones, el cebador compuesto comprende además una segunda sección de unión de cebador. La segunda sección de unión de cebador es capaz de reasociarse a un segundo cebador en condiciones de restricción apropiadas.

65

En ciertas realizaciones, el cebador compuesto comprende además una segunda secuencia identificadora. En ciertas realizaciones, el segundo identificador es la única secuencia identificadora. En ciertas realizaciones, la combinación del segundo identificador y el primer identificador sirve para identificar solamente la secuencia identificadora. En ciertas realizaciones, la combinación del segundo identificador y el primer identificador proporciona la diferencia de masa molecular, longitud o secuencia que sirve para distinguir un amplicón que corresponde a una secuencia diana de otro amplicón (distinto) que corresponde a (otra) secuencia diana distinta.

En ciertas realizaciones, el cebador compuesto comprende además, una segunda sección específica diana que es complementaria, como mínimo, de una parte de la sección específica diana de la segunda sonda. En ciertas realizaciones, la primera parte específica de la sonda y la segunda parte específica de la sonda están situadas adyacentes. El cebador compuesto es capaz de reasociarse a la primera y segunda sondas ligadas, separando de esta manera el punto de ligado. Al reasociarse a la sonda ligada separando el punto de ligado, se introduce una etapa discriminadora adicional por el hecho de que esto puede ocurrir solamente si las sondas han sido ligadas. Además, una ventaja adicional es que el cebador compuesto alargado y los correspondientes amplicones tienen una longitud más reducida, incrementando de esta manera la flexibilidad y capacidad múltiplex del ensayo. Ver figuras 3A, 3B.

La segunda sección específica de sonda del cebador compuesto comprende como mínimo 4 o como mínimo 8, preferentemente como mínimo 10, más preferentemente como mínimo 12 nucleótidos que son complementarios de la sección específica diana de la primera sonda, en particular como mínimo 15, más preferentemente como mínimo de 18 y de modo más preferente como mínimo de 20 nucleótidos.

En ciertas realizaciones, las primera y segunda secciones específicas de sonda comprenden, como mínimo 8, preferentemente como mínimo 10, más preferentemente como mínimo 20 nucleótidos que son complementarios de la sección específica diana de la primera y segunda sondas combinadas, en particular como mínimo 25, más preferentemente como mínimo de 30 y de modo más preferente como mínimo de 40 nucleótidos.

Sondas semi-circulares

Uno de los aspectos de la invención corresponde a un procedimiento para la detección de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra, comprendiendo la disposición de, como mínimo, un par de una primera y una segunda sonda de oligonucleótidos para cada secuencia de nucleótidos diana a detectar en la muestra, de manera que la primera sonda de oligonucleótidos tiene una sección en su extremo 5' que es complementario de una primera parte de una secuencia diana y la segunda sonda de oligonucleótidos tiene una sección en su extremo 3' que es complementaria de una segunda parte de la secuencia diana, y de manera que la primera sonda de oligonucleótidos comprende además una sección de fijación ("clamp sections") que es capaz de hibridar a una sección de fijación complementaria situada en la segunda sonda de oligonucleótidos de manera que las secciones de fijación son esencialmente no complementarias con respecto a la secuencia diana, permitiendo que las sondas de oligonucleótidos se reasocien a la secuencia diana, proporcionando medios para conectar la primera y segunda sondas de oligonucleótidos y permitir que una primera y una segunda sondas de oligonucleótidos sean conectadas cuando se hibridan a secciones adyacentes de la secuencia diana, para producir una sonda conectada correspondiente a una secuencia diana de la muestra, proporcionando un cebador compuesto que comprende una sección que es complementaria, por lo menos de una parte de la primera sección específica diana de la primera sonda, y opcionalmente, como mínimo, de una parte de la segunda sección específica diana de la segunda sonda, y una segunda sección de unión de cebador, permitiendo que el cebador compuesto se reasocie, como mínimo, a una parte de la primera sección específica diana de la primera sonda y opcionalmente, por lo menos a una parte de la segunda sección específica diana de la segunda sonda, alargando el cebador compuesto, proporcionando un conjunto de cebadores que comprenden un primer cebador que tiene una secuencia esencialmente idéntica a la primera sección de unión de cebador, y un segundo cebador que es complementario de la primera sección de unión de cebador, amplificando la mezcla resultante para producir una muestra amplificada que comprende amplicones que son representaciones de las sondas conectadas, determinando la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia diana en una muestra por detección de la presencia, ausencia o cantidad del amplicón correspondiente.

Uno de los aspectos de la invención se refiere a un conjunto de sondas K que comprende una primera sonda P1 que comprende una primera sección diana T1 y una primera sección de fijación C1, y una segunda sonda P2 que comprende una segunda sección diana T2 y una segunda sección de fijación C2, de manera que la primera y segunda secciones de fijación C1, C2 son capaces de hibridarse entre sí y a un cebador compuesto (ver figura 6).

En una realización, la invención pertenece a un conjunto de sondas de oligonucleótidos K, que comprende:

- una primera sonda de oligonucleótido P1 que comprende una primera sección de fijación C1, que es capaz de hibridar a una segunda sección de fijación C2 de una segunda sonda de oligonucleótidos P2, y una primera sección diana T1 que es capaz de hibridar a una primera sección S1 de una secuencia diana de ADN (D) a detectar;
- una segunda sonda de oligonucleótidos P2 que comprende una segunda sección de fijación C2, que es capaz de hibridar con respecto a la primera sección de fijación C1 de la primera sonda de oligonucleótidos

P1, y una segunda sección diana T2 que es capaz de hibridarse a una segunda sección S2 de una secuencia diana de ADN (D) a detectar

- un tercer cebador compuesto de oligonucleótidos que comprende una sección que es complementaria, como mínimo, a una parte de la primera sección específica diana y una segunda sección de unión de cebador.

Cuando el conjunto de sondas es llevado a establecer contacto, en condiciones de hibridación, con una muestra que comprende una secuencia diana, las dos secciones diana T1 y T2 de las sondas hibridarán a la primera y segunda secciones S1 y S2 de la secuencia de ADN diana.

Las secciones de fijación ("clamp sections") C1 y C2 son diseñadas de manera que en las condiciones bajo las cuales T1 y T2 hibridan a la secuencia diana de ADN, C1 y C2 también hibridan entre sí, formando una fijación ("clamp"). La configuración de las sondas hibridadas se parece a una sonda candado ("padlock") (en términos de características de hibridación específicas de diana) con una fijación. Después del ligado, el cebador compuesto puede reasociarse a la sonda ligada o conectada y alargada a lo largo de la sonda conectada, tal como se ha descrito en otros lugares de esta descripción. La sonda alargada puede ser amplificada, tal como se ha descrito en otros lugares de esta descripción.

Además de las ventajas de la invención que se han mencionado en otros lugares de esta descripción, las sondas de la presente invención tienen características de hibridación ventajosas de las sondas candado (circularizable) en términos de la cinética de hibridación favorable, pero tienen también las características ventajosas de las sondas de hibridación lineal en términos de ausencia de formación de concatámeros durante la etapa de alargamiento o amplificación. Por lo tanto, las sondas de la presente invención combinan las ventajas de los diferentes tipos de sondas. Las sondas de la presente invención tienen una longitud que permanece dentro del ámbito de lo que se puede sintetizar de manera fiable utilizando síntesis química convencional u otras técnicas, lo que constituye una significativa ventaja económica. Otra ventaja es que las sondas de la presente invención pueden ser de mejora calidad (es decir, pureza) obviando de esta manera la purificación adicional de las sondas en comparación con sondas candado (más largas) que se conectan con la ventaja técnica de que dichas sondas son capaces de reducir significativamente la proporción de señal a ruido. De este modo, las sondas de la presente invención combinan las características ventajosas de las sondas circularizables/candado con la síntesis ventajosa y la pureza/calidad de los oligonucleótidos lineales con longitud relativamente reducida.

El procedimiento de la presente invención para la detección de secuencias diana se aprovecha, por lo tanto, de las ventajas de las sondas lineales y de las de candado, evitando simultáneamente la engorrosa síntesis de oligonucleótidos largos (sondas candado) y de la cinética de hibridación poco favorable de un par de sondas lineales no enlazadas en la hibridación a las secciones diana de la secuencia diana a detectar.

El par de sondas de oligonucleótidos son diseñadas de manera que para cada secuencia diana de una muestra, se proporciona un par que comprende una primera sonda P1 y una segunda sonda P2, de manera que cada una de las sondas contiene una sección T1, T2 en uno de sus terminales extremos que es complementaria de una parte de la secuencia diana S1, S2. Preferentemente, las partes complementarias S1, S2 de la secuencia diana están situadas esencialmente adyacentes entre sí. No obstante, en ciertas realizaciones de la invención, los extremos de las partes complementarias S1, S2 de las sondas no están situadas de forma adyacente entre sí en la secuencia diana. Estas realizaciones incluyen, por ejemplo, las realizaciones descritas en otros lugares bajo los términos de ligado de intersticio ("gap-ligation").

Dentro de un par de sondas de oligonucleótidos, tiene una sección T1 en su extremo 5' (fosforilado) que es complementaria a una primera parte S1 de una secuencia diana, y la segunda sonda de oligonucleótidos del par tiene una sección T2 en su extremo 3' (hidroxilado) que es complementaria de una segunda parte S2 de la secuencia diana. De esta manera, cuando el par de sondas es reasociado a partes complementarias S1, S2 de una secuencia diana, el extremo 5' de la primera sonda de oligonucleótidos es preferentemente adyacente de modo esencial al extremo 3' de la segunda sonda de oligonucleótidos, de manera que los respectivos extremos de las dos sondas pueden estar ligados para formar un enlace fosfodiéster u otro enlace covalente en cualquier forma adecuada para proporcionar una "sonda conectada".

Para cada secuencia diana para la que se tiene que determinar la presencia, ausencia o cantidad en una muestra, se diseña un par específico de una primera y una segunda sondas de oligonucleótidos con secciones complementarias con respecto a las partes complementarias de cada secuencia diana, tal como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, en el procedimiento de la invención, para cada secuencia diana presente en una muestra se puede obtener una correspondiente sonda conectada (específica).

Fijación

La sección de fijación ("clamp") está situada preferentemente en el extremo de la sonda en las proximidades del mismo que se encuentra en situación distal con respecto a la sección diana, es decir, cuando la sección diana está situada en el extremo 3', la sección de fijación está situada más hacia el extremo 5' y vice versa. La sección de fijación no está necesariamente situada de la forma más distal en el extremo 5' o en el extremo 3', puede estar

seguida de otras secciones explicadas en otros lugares de esta descripción. Las secciones de fijación de la primera y segunda sondas del par de sondas, son capaces de hibridar entre sí. Las secciones son diseñadas preferentemente de manera que dos secciones complementarias de fijación tienen una mayor afinidad de unión entre sí que la afinidad de unión de la sección diana de la sonda para su parte complementaria en la secuencia de nucleótidos diana. Esto significa en la práctica que las secciones de fijación, cuando están hibridadas entre sí, forman un dúplex más fuerte que el híbrido entre la sección diana y su complemento en la secuencia de nucleótidos diana y/o tiene lugar la hibridación de fijaciones complementarias a temperaturas más elevadas que la hibridación de la sección complementaria diana de las sondas a la diana. En otras palabras, la sección de fijación hibridada se desnatura en condiciones que por lo demás son comparables a temperatura más elevada o condiciones de restricción más elevadas que la temperatura de desnaturación de las secciones complementarias diana en el par de sondas. Esto permite escoger las condiciones durante el procedimiento de la invención, de manera que la fijación hibridada o bloqueada permanece hibridada o cerrada, por lo menos, hasta que las sondas son conectadas para producir una sonda conectada. La fijación bloqueada puede ser abierta por desnaturación de la sonda (conectada) a una determinada temperatura o bajo circunstancias que permiten la desnaturación de la fijación bloqueada.

Un par de sondas que tienen fijaciones bloqueadas, expresa cinética de hibridación y comportamiento similar o idéntico que las sondas circulares o de candado. Las dos sondas de un par pueden ser añadidas separadamente, después de lo cual las secciones de fijación son hibridadas entre sí en la muestra, o de manera alternativa las dos sondas pueden ser bloqueadas antes de ser añadidas a la muestra.

En una realización preferente, la fijación tiene una temperatura de desnaturación (o temperatura de fusión, T_m) que supera la temperatura de desnaturación de las secciones complementarias diana del par de sondas en, como mínimo, 1°C , preferentemente 5°C más preferentemente 10°C en comparación con la T_m más baja de la sección T1 o T2. La temperatura de desnaturación de una secuencia de oligonucleótidos puede ser calculada/estimada a partir de la composición de nucleótidos utilizando la fórmula general para $T_m = (4 \times G + C) + (2 \times A + T)$ o $T_m = (4 \times G/C) + 2 \times A/T - 5^\circ\text{C}$ (Meinkoth y otros. Anal. Biochem. (1984) 138: 267-284). Otras formulas son igualmente aplicables dado que lo esencial está comprendido en la diferencia de temperatura de desnaturación entre las secciones ($T_m[\text{fijación}] - T_m[\text{diana}]$). Esto puede ser conseguido, no solamente variando la longitud de las secciones de fijación, sino también variando el contenido de GC de la fijación, dado que un par de bases GC aumenta T_m aproximadamente en 2°C en comparación con un par de bases AT. Una sección de fijación típica comprende de 10 a 30, preferentemente de 15 a 25 y más preferentemente de 18 a 24 nucleótidos. Cuando el contenido de GC es más bajo, este número de nucleótidos puede aumentar siempre que se obtengan las características deseadas de hibridación. Se pueden utilizar nucleótidos modificados de manera alternativa que aumentan la hibridación entre las dos secciones de fijación. Son ejemplos de ello nucleótidos que tienen características de hibridación mejoradas, tales como los ácidos nucleicos bloqueados ("Locked Nucleic Acids") tales como los que se dan a conocer en los documentos WO 99/14226, WO 00/56748, WO 00/66604 y WO 01/25478, Ácidos Nucleicos de Péptidos o por otras moléculas que estabilizan o incrementan la hibridación de ADN, tal como elementos menores de unión de ranura ("minor groove binders") y otros, tal como los descritos en el documento EP 0 974 672.

El contenido de GC de la fijación puede variar, de manera que el contenido de GC de la sección de fijación varía desde más de 50 a 100%, preferentemente más de 60%, más preferentemente más de 70%, todavía más preferentemente más de 80 % y se encuentra preferentemente en un rango de 90-100%. Por lo tanto, la mayor parte de secciones de fijación contendrán combinaciones A/T en una base más incidental o estructural. Un grupo preferente de secciones de fijación son secuencias ZIP enriquecidas en GC (Iannone y otros (2000), Cytometry 39: páginas 131-140). Preferentemente, la sección de fijación comprende, como mínimo, un nucleótido, y preferentemente, como mínimo, 2, 3, 4, o 5 nucleótidos seleccionados del grupo que consiste en G y C, más que cada uno de T1 y T2.

En una realización preferente, cuando grupos de pares están involucrados, se puede disponer una sección de fijación diferente para cada par de sondas del grupo. La sección de fijación es diseñada de manera que se pueden distinguir entre sí una fijación para un primer par de sondas y fijaciones para un segundo par adicional de sondas, y preferentemente no hibridan de forma cruzada entre sí bajo las condiciones utilizadas en el ensayo de ligado. Cada par de sondas comprende una fijación única, evitando, por lo tanto, hibridación cruzada entre fijaciones de diferentes pares de sondas de una muestra. Con este objetivo, la sección de fijación puede comprender nucleótidos adicionales o las secuencias de oligonucleótidos de la sección de fijación pueden ser únicas dentro del grupo. La utilización de secciones de fijación únicas para cada par de sondas de un grupo posibilita la detección de múltiples secuencias diana en una muestra de manera simultánea. La realización posibilita también la detección de una o varias secuencias diana diferentes en múltiples muestras de manera subsiguiente utilizando la misma recogida de pares de sondas. Esta realización posibilita además que el mismo grupo de pares de sondas puede ser utilizado varias veces sucesivas para la detección de diferentes secuencias diana.

Preferentemente, cuando se utilizan diferentes fijaciones en un grupo de pares de sondas, estas fijaciones tienen una T_m que se encuentra dentro de un rango pequeño, preferentemente entre $60-90^\circ\text{C}$ aproximadamente, más preferentemente entre $65-88^\circ\text{C}$, más preferentemente entre $70-85^\circ\text{C}$. Tal como es sabido, las características de

hibridación de los ácidos nucleicos se ven influenciadas también por las concentraciones de sal. Tal como se utiliza en esta descripción, la comparación de características de hibridación general o temperaturas de desnaturalización, en particular de oligonucleótidos, se considera bajo concentraciones de sal comparables, si no se indica de otro modo.

5 Las fijaciones alternativas que se pueden utilizar en la presente invención son ácidos nucleicos que contienen enlaces fotodegradables. Después del ligado, el enlace fotodegradable puede ser eliminado y la sonda conectada puede ser amplificada y/o detectada.

10 Después del ligado de la primera y segunda sondas, la fijación puede ser opcionalmente desnaturalizada. Un cebador compuesto tal como se ha descrito en otro lugar de esta descripción, puede ser dispuesto y se puede reasociar a la sonda conectada. El alargamiento del cebador compuesto proporcionará un cebador compuesto alargado que puede ser amplificado, tal como se ha descrito en otros lugares de esta descripción. Ver también figura 6. En otras realizaciones, solamente una de las primera y segunda sondas contiene un primer lugar de unión. En 15 ciertas realizaciones, el cebador compuesto contiene un segundo lugar de unión de cebador, esencialmente tal como se ha descrito en algún lugar de esta descripción.

Ligado de segmentación

20 En un aspecto de la presente invención, se puede introducir una etapa adicional de discriminación antes del ligado. En algunas realizaciones, la primera o segunda sonda de oligonucleótidos del par es diseñada de manera tal que una de las dos sondas se extiende más allá del punto previsto de ligado de la sección específica diana. Preferentemente, la sonda se extiende con una secuencia que no es complementaria de la secuencia diana. En el 25 caso de reasociación correcta de secciones específicas diana de las dos sondas a la secuencia diana, se forma una estructura de segmentación en horquilla en la que el extremo 3' de la sección específica diana de la sonda no prolongada, es reasociada con la secuencia diana, mientras que el extremo prologando 5' de la otra sonda, que no es complementaria de la secuencia diana, forma un brazo de cadena única (ver figura 7A). La estructura de segmentación en la horquilla obtenida de este modo es un sustrato para la actividad de 5' nucleasa de ADN polimerasas, a la que se hace referencia en esta descripción como agente segmentante o segmentasa. Una 30 segmentasa preferente es una polimerasa de ADN que tiene actividad 5' nucleasa, pero que carece de actividad sintética o una FEN endonucleasa. Un ejemplo de esta estructura de segmentación en la horquilla y de esta segmentasa, se describen en los documentos EP 601834 y US 5795763 (Third Wave Technologies).

35 En ciertas realizaciones, la segmentasa puede ser una polimerasa de ADN nativa, pero preferentemente la segmentasa es una forma modificada que carece de la actividad sintética de la polimerasa de ADN. Son polimerasas de ADN adecuadas con actividad 5' nucleasa y que se pueden modificar para inactivar su actividad sintética, por ejemplo, de *Thermus thermophilus*, *Thermus aquaticus*, *Escherichia coli*, y *Thermus flavus*, o una forma modificada del producto gen 6 del bacteriófago T7 o FEN endonucleasa. Otras segmentasas adecuadas se mencionan, *entre otros*, en los documentos US6635463, US6562611, US6555357, US6458535, US6348314, US6090606, US 40 6090543, US6001567, US5994069, US5985557, US5843669, US5846717, US5837450, US5614402, W094/29482, W097/27214, W098/23774, W098/42873.

45 Después de la incubación de la estructura de segmentación en horquilla con una segmentasa adecuada, tendrá lugar la segmentación en la sonda ampliada, exactamente entre el primer nucleótido no apareado de la secuencia de ampliación y el primer nucleótido apareado de la sección específica diana de la sonda ampliada. La secuencia de ampliación por lo tanto se elimina, y los dos extremos de las secciones específicas diana de la primera y segunda sondas del par se reasociarán inmediatamente entre sí, en caso de un apareamiento perfecto con la secuencia diana permitiendo, por lo tanto, el ligado de las dos sondas para formar una sonda conectada (ver figura 7A). Este principio es válido para cualquier ensayo convencional OLA y puede ser aplicado al mismo y a los ensayos de la 50 presente invención igualmente, y es una mejora inventiva de la tecnología OLA por mejora adicional de la finalidad de la tecnología OLA. El principio es válido para sondas no circularizables, circularizables y semi-circularizables, así como la combinación de un primer cebador, un segundo cebador y un cebador compuesto, tal como se describen igualmente en esta descripción.

55 En ciertas realizaciones, el procedimiento comprende una etapa en la que se forma una estructura de segmentación que comprende la secuencia de ácido nucleico diana, una primera sonda y una segunda sonda. En ciertas realizaciones, la primera sonda comprende una primera región específica diana que es capaz de reasociarse a una primera sección de la secuencia de ácido nucleico diana para formar un primer dúplex. En ciertas realizaciones, la segunda sonda comprende una segunda región diana específica que es capaz de reasociarse a una segunda 60 sección de la secuencia de ácido nucleico diana para formar un segundo dúplex. En ciertas realizaciones, la primera y segunda secciones de la secuencia de ácido nucleico diana son contiguas, de manera que el primer y segundo dúplex son contiguos. En ciertas realizaciones, la primera o segunda sonda comprende otra región (E, ver figura 7A y 8), una región ampliada, preferentemente un extremo 5' ampliado, que no es capaz de reasociarse a la secuencia de ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la región adicional (ampliada) está situada en el final de la primera o segunda sonda, en la posición del lugar de unión (es decir, el lugar potencial de ligado del ensayo OLA) entre la 65 primera y segunda secciones de la secuencia de ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la región adicional

(ampliada) proporciona una sección no reasociada de la primera o de la segunda sonda, para crear de esta manera una estructura de segmentación (en horquilla). Ciertas realizaciones comprenden la exposición de la estructura de segmentación a un agente de segmentación que segmenta preferentemente la estructura de segmentación en una forma que es independiente de la secuencia de la estructura de segmentación, y que tiene como resultado la segmentación de la estructura de segmentación cuando esta última y el agente de segmentación son incubados en condiciones en las que pueda tener lugar la segmentación. En ciertas realizaciones, la segmentación de la estructura segmentable resulta en la eliminación de la región adicional (ampliada). En ciertas realizaciones, la eliminación de la región adicional (ampliada) por segmentación de la estructura segmentable tiene como resultado la localización adyacente de la primera y segunda sondas.

En otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de un agente de segmentación, preferentemente antes del ligado, en los ensayos OLA. En ciertas realizaciones, el agente de segmentación es utilizado para eliminar una prolongación (es decir, una región adicional o segmentada) de la primera o segunda sonda situada en el punto previsto de ligado, de manera que se pueden ligar la primera y segunda sondas. Las características del agente de segmentación son que tiene lugar la segmentación cuando las dos sondas son reasociadas adyacentes entre sí sobre la secuencia diana y una de las sondas tiene una prolongación en el punto en el que las sondas son reasociadas de manera adyacente. En ciertas realizaciones, la segmentación tiene lugar solamente cuando las dos sondas son reasociadas adyacentes entre sí sobre la secuencia diana y una de las sondas tiene una prolongación en el punto en el que las sondas son reasociadas de forma adyacente. La segmentación de la prolongación proporciona dos sondas que están reasociadas de manera adyacente sobre la secuencia diana y que pueden ser ligadas. Una de las ventajas técnicas de esta etapa de segmentación es que la etapa de segmentación proporciona el 5' fosfato en el extremo de una de las sondas necesarias para ligado. La disposición del 5' fosfato se puede utilizar como una alternativa para síntesis convencional de oligonucleótidos, de manera que la fosforilación en el extremo 5' es una de las etapas finales de la síntesis de oligonucleótidos. Otra ventaja técnica adicional es que la selectividad y la especificidad de la reacción de ligado subsiguiente incrementa de manera significativa debido a la selectividad mejorada del agente de segmentación para segmentar solamente estructuras segmentables, es decir, las estructuras en las que el nucleótido de la prolongación es complementario o capaz de hibridar al nucleótido de la secuencia diana.

En ciertas realizaciones dirigidas a la detección específica del alelo de SNP de secuencias diana, el alelo específico del nucleótido se incorpora en la sonda que contiene la región adicional (ampliada). De este modo, una sonda del par comprende una sección específica diana que se reasocia esencialmente adyacente al SNP a investigar. El otro par comprende una sección específica diana que contiene el nucleótido que es complementario del SNP a investigar y, adyacente a dicho nucleótido, la región adicional (ampliada). Una representación generalizada de esta realización, aplicable a todos los ensayos OLA e igualmente a la presente invención, comporta la utilización de otra región adicional (ampliada) encontrándose en las figuras 7A, 7B y 8. Esta realización permite tanto la etapa de segmentación como la etapa del ligado, de manera que tengan lugar solo en el caso de que ambas secciones diana estén bien apareadas en el punto de ligado/segmentación y esta realización mejora adicionalmente la especificidad.

La introducción de la etapa de segmentación en el ensayo OLA combina la especificidad del ensayo monoplex Invader (Third Wave Technologies) con la capacidad múltiple flexible de los ensayos OLA SNP Wave. Esto permite, por ejemplo, medir frecuencias de SNP en muestras reunidas o complejas u otras formas de medición cuantitativas de secuencias, tales como perfilado de transcripción no rutinaria o medición cuantitativa de niveles de contaminación en patógenos en el suelo, alimentos, aguas, etc.

La utilización de esta etapa adicional en ensayos OLA proporciona ventajas significativas y encuentra su aplicación, por ejemplo, en el sector de análisis cuantitativo de frecuencias de alelos, por ejemplo, en cribados de población en el sector de identificación de mutantes de baja frecuencia en muestras complejas.

Será evidente para el técnico en la materia, basándose en la enseñanza de varias realizaciones que se describen en esta descripción, que se puede llevar a cabo varias combinaciones de realizaciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, en un juego de sondas semi-circulares con secciones de fijación del tipo que se describe, una de las dos sondas se puede ampliar más allá del punto de ligado previsto de su sección específica diana, imitando de esta manera el comportamiento de candado con la etapa de discriminación adicional de la etapa de segmentación, tal como se describe en otros lugares de esta descripción.

Identificadores

En ciertas realizaciones, la segunda sonda de oligonucleótido de la presente invención comprende además una secuencia identificadora. La secuencia identificadora es de longitud, secuencia o masa variable. En ciertas realizaciones, el cebador compuesto contiene también un identificador. La longitud del identificador (o de los identificadores combinados en el segundo cebador y cebador compuesto) varía de 0 a 1000, preferentemente de 0 a 500, más preferentemente de 1 a 100 y de modo más preferente de 1 a 50 nucleótidos. El identificador puede ser una secuencia única, tal como es conocido como secuencia codificada ZIP, tal como se describe por Iannone y otros (2000), Cytometry 39: páginas 131-140. El identificador puede estar situado entre la segunda sección diana y la secuencia de unión del primer cebador. El identificador puede ser utilizado para impartir diferencias de longitud entre

sondas o sondas conectadas, pero también puede ser utilizado para impartir diferencias de masa para secuencias de detección basadas en masa o direccionables (las ZIP y las cZIP para detección basada en hibridación). Preferentemente, para cada secuencia diana de la muestra se facilita la correspondiente sonda relacionada y/o amplicón con una secuencia identificadora única. Tal como se ha indicado anteriormente, la secuencia identificadora puede ser única por proporcionar la sonda relacionada o conectada y/o el amplicón que identifica con una longitud, secuencia y/o masa única.

Lugares de unión del cebador

Para facilitar la amplificación de los cebadores compuestos alargados, se pueden incorporar lugares de unión de cebador en el cebador compuesto y en la segunda sonda. Los lugares de unión de cebador están situados preferentemente en otras partes del cebador compuesto, y la segunda sonda más que en las respectivas secciones diana, preferentemente en la sección de etiqueta, que es esencialmente no complementaria de la secuencia diana. Los lugares de unión del cebador son capaces de unir cebadores para iniciar el alargamiento del cebador o su amplificación. Preferentemente, dentro de un grupo de juegos de sondas, los lugares de unión del cebador son universales, es decir, solamente un grupo predeterminado de lugares de unión de cebador se incorporan en la sonda para posibilitar alargamiento de cebador múltiple o amplificación a partir de un número limitado de cebadores, tal como cebadores que comprenden una o varias bases selectivas en su extremo 3', tal como se conocen por el documento AFLP (EP 0 534 858). Entre grupos de juegos de sondas, los lugares de unión de cebador pueden ser diferentes. En ciertas realizaciones, la T_m de cebadores capaces de unir a los lugares de unión de cebador diferentes puede ser distinto entre grupos de juegos de sondas.

La función del identificador y de los lugares de unión del cebador en una sonda se pueden combinar y se pueden interrelacionar en el sentido de que una parte específica de la sonda puede funcionar como parte de un primer lugar de unión de cebador para alargamiento/amplificación del cebador, y en el mismo momento o en otro momento como parte de un identificador para impartir la diferencia deseada basada en la plataforma de detección, tal como se da a conocer en otros lugares de esta descripción.

Hibridación

Empezando en la etapa (a) del procedimiento, una multiplicidad de diferentes secuencias diana, es decir, como mínimo, dos secuencias diana diferentes, se lleva a establecer contacto con una multiplicidad de pares de sondas de oligonucleótidos específicos en condiciones de hibridación. Los pares de sonda de oligonucleótidos se permiten reasociar a continuación a partes complementarias, preferentemente adyacentes, de las secuencias diana múltiples de la muestra. Son bien conocidos en la técnica los procedimientos y condiciones para la reasociación específica de sondas de oligonucleótidos para secuencias diana complementarias (ver, por ejemplo, Sambrook and Russell (2001) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ra edición), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Usualmente, después de mezclar las sondas de oligonucleótidos y secuencias diana, los ácidos nucleicos son desnaturizados por incubación (generalmente entre 94°C y 96 °C) durante un corto periodo de tiempo (por ejemplo, de 30 segundos a 5 minutos) en un tampón de sal. La muestra que contiene las sondas desnaturizadas y secuencias diana se puede enfriar entonces a una temperatura de hibridación óptima para reasociación específica de las sondas y secuencias diana, que usualmente es de unos 5°C por debajo de la temperatura de fusión del híbrido entre la sección complementaria (sección diana) de la sonda y su secuencia complementaria (en la secuencia diana). A efectos de impedir hibridación no específica o ineficiente de una de las dos sondas de un par, o en una muestra con secuencias diana múltiples, es preferible que, dentro de una muestra, las secciones de las sondas que son complementarias de las secuencias diana sean de temperatura de fusión similares, preferentemente idénticas, entre las diferentes secuencias diana presentes en la muestra. Así pues, las secciones complementarias de la primera y segunda sondas difieren preferentemente menos de 20, 15, 10, 5, o 2°C en su temperatura de fusión. Esto es facilitado por la utilización de secciones complementarias de la primera y segunda sondas con una longitud similar y un contenido G/C similar, difiriendo las secciones complementarias preferentemente menos de 20, 15, 10, 5, o 2 nucleótidos de longitud y su contenido G/C difieren menos de 30, 20, 15, 10, o 5 %. El término complementario, tal como se utiliza en esta descripción, significa que una primera secuencia de nucleótidos es capaz de hibridar específicamente a una segunda secuencia de nucleótidos en condiciones de restricción normales. Una secuencia de nucleótidos que se considera complementaria de otra secuencia de nucleótidos puede contener una cantidad menor, es decir, preferentemente menos de 20, 15, 10, 5 o 2%, de desapareamientos. De manera alternativa, puede ser necesario compensar los desapareamientos, por ejemplo, incorporando los llamados nucleótidos universales, tales como los que se describen, por ejemplo, en el documento EP-A 974 672, incorporado a esta descripción por referencia o con LNA o PNA. Dado que la reasociación de sondas a secuencias diana depende de la concentración, la reasociación es preferentemente llevada a cabo en un pequeño volumen, es decir, menos de 25 µl, preferentemente menos de 10 µl. En estas condiciones de hibridación, la reasociación de sondas a secuencias diana es usualmente rápida y no dura más de 5, 10 o 15 minutos, si bien se puede utilizar un tiempo de reasociación más largo, siempre que la temperatura de hibridación se mantenga para evitar reasociación no específica. Los tiempos de reasociación más largos son más importantes/necesarios para aplicaciones cuantitativas

que se basan en ocupación completa diana por sondas de ligado a efectos de permitir el control o cantidades relativas de secuencias diana entre muestras.

5 En una realización preferente de la invención, se han obtenido excelentes resultados con tiempos de hibridación prolongados tales como una noche de hibridación o más tiempo, tal como 10 ciclos de 1 hora. Los tiempos de hibridación prolongados pueden ser ventajosos en estos ensayos dado que la diferencia de señal debida a diferentes deficiencias de hibridación se reduce y se considera deseable conseguir una hibridación completa y ligado de todas las sondas para las que se encuentra presente la secuencia diana. Se han obtenido excelentes resultados por una etapa combinada de hibridación-ligado utilizando una ligasa termoestable que se describe en esta descripción. En esta realización, se llevó a cabo la hibridación-ligado al dejar hibridar las sondas durante 1 hora en presencia de una ligasa termoestable, seguido de una etapa de desnaturalización. La repetición de estas etapas un mínimo de 2 veces proporcionó resultados satisfactorios. La repetición de estas etapas 10 veces proporcionó resultados excelentes.

15 Para evitar evaporación durante la desnaturalización y reasociación, las paredes y tapas de las cámaras de reacción (es decir, tubos o pocillos de micro-titulación) pueden ser también calentados a la misma temperatura que la mezcla de reacción, lo que se consigue habitualmente por utilización de un equipo comercial de amplificación de ADN. En sondas de oligonucleótidos preferentes, la longitud de la sección complementaria diana es preferentemente, como mínimo, 15, 18 o 20 nucleótidos, y preferentemente no más de 30, 40, o 50 nucleótidos y las sondas tienen preferentemente una temperatura de fusión a partir de la sección diana de, como mínimo, 50°C, 55°C o 60°C.

La hibridación del cebador compuesto después de ligado del par de sondas se puede llevar a cabo en idénticas condiciones, tal como se han dado a conocer para el par de sondas de oligonucleótidos.

25 En ciertas realizaciones, el par de sondas y el cebador compuesto se facilitan simultáneamente a la muestra. En ciertas realizaciones, el cebador compuesto es facilitado a la muestra después de la reasociación del par de sondas, pero antes del ligado de las sondas reasociadas de forma adyacente. En ciertas realizaciones, el cebador compuesto es facilitado después de ligado de las sondas reasociadas de forma adyacente, pero antes de facilitar los cebadores de amplificación a la muestra. En ciertas realizaciones preferentes, el cebador compuesto es añadido simultáneamente con los cebadores de amplificación.

Sondas no hibridadas

35 Las sondas que no son complementarias de una parte de la secuencia diana o que contienen demasiados desapareamientos no se hibridarán a la secuencia diana o lo harán de manera reducida, cuando la muestra es sometida a condiciones de hibridación. De acuerdo con ello, el ligado es menos probable que tenga lugar. El número de productos espurios o ilegítimos de ligado procedentes de estas sondas en general no será, por lo tanto, suficiente y será mucho más reducido que los productos de ligado "bona fide", de manera que son superados durante la subsiguiente amplificación múltiplex. Como consecuencia, no serán detectados o lo serán solamente de forma reducida.

40 Un procedimiento preferente de la invención comprende además una etapa para la eliminación de sondas de oligonucleótidos que no están reasociadas a secuencias diana y/o que no están conectadas/ligadas y/o a las secuencias diana. La eliminación de dichas sondas es llevada a cabo preferentemente antes del alargamiento del cebador compuesto y/o de la amplificación, y preferentemente por digestión con exonucleasas.

45 Por eliminación/supresión de las sondas de oligonucleótidos que no están conectadas/ligadas se puede conseguir una reducción significativa de la amplificación diana (incorrecta) independiente del ligado, resultando en una mayor proporción de señal a ruido. Una solución para eliminar uno o varios de los componentes no conectados/ligados sin eliminar el contenido de información de las sondas conectadas es utilizar exonucleasas para digerir sondas de oligonucleótidos no conectadas/ligadas. Al bloquear el extremo que no está ligado, por ejemplo, el extremo 3' de la sonda de oligonucleótidos en sentido descendente (la primera sonda en ciertas realizaciones no contiene un lugar de unión de cebador), se puede hacer una sonda sustancialmente resistente a digestión, mientras que la otra es sensible. Solamente la presencia de una secuencia de producto de ligado de longitud completa impedirá entonces la digestión de la sonda conectada. Los grupos de bloqueo incluyen la utilización de un grupo tiofosfato y/o utilización de grupos azúcar 2-O-metil ribosa en el armazón. Las exonucleasas incluyen Exo I (3'-5'), Exo III (3'-5'), y Exo IV (ambos 5'-3' y 3'-5'), requiriendo la última bloqueo por ambos lados. Se encuentran ejemplos de dichas sondas en la tabla 2A de los ejemplos.

50 Un procedimiento alternativo para la separación de sondas ligadas de las no ligadas es por salida ("pullout") basada en hibridación (HBP). HBP comprende un proceso en el que una secuencia de nucleótido complementaria como mínimo a una parte de una sonda, por ejemplo, la parte específica de cebador, es unida o inmovilizada a un soporte sólido o en partículas de salida ("pullout") (ver, por ejemplo, patente U.S. 60124092). La mezcla de reacción de ligado (que comprende el producto de ligado, secuencias diana, y sondas no ligadas) es expuesta al soporte de salida. El producto de ligado, en condiciones apropiadas, hibrida con las secuencias unidas al soporte. Los componentes no unidos de la mezcla de reacción de ligados son eliminados purificando los productos de ligado con

respecto a los componentes de la mezcla de reacción de ligado que no contienen secuencias complementarias de la secuencia en el soporte de salida. De manera subsiguiente, se eliminan los productos de ligado purificados del soporte y se combinan, como mínimo, con un primer conjunto para formar una primera mezcla de reacción de amplificación. El experto en la materia apreciará que ciclos adicionales de HBP utilizando diferentes secuencias complementarias en el soporte de salida eliminará la totalidad o sustancialmente la totalidad de las sondas no ligadas, purificando además el producto de ligado.

En ciertas realizaciones, para la separación de las sondas ligadas con respecto a las sondas no ligadas, una de las sondas, preferentemente la primera sonda, es biotinizada. Después de ligado, las primeras sondas restantes y las sondas ligadas son aisladas de la muestra utilizando strept(avidina) o una combinación similar de ligando de afinidad/complejo de unión. Las sondas no ligadas (segundas) permanecen en la muestra. Las sondas aisladas pueden ser sometidas a etapas subsiguientes del procedimiento, entre otras, reasociación del cebador compuesto, alargamiento, reasociación del cebador, amplificación y detección.

15 Ligado

Los respectivos extremos 5' fosforilado y 3' hidroxilado de un par de primera y segunda sondas de oligonucleótidos que están reasociadas esencialmente de forma adyacente a las partes complementarias de una secuencia diana, son conectados en la etapa (c) para formar un enlace covalente por cualesquiera medios adecuados conocidos en la técnica. Los extremos de las sondas pueden estar conectados enzimáticamente en un enlace fosfodiéster por una ligasa, preferentemente una ADN ligasa. Las ADN ligasas son enzimas capaces de catalizar la formación de un enlace fosfodiéster entre (los extremos de) dos cadenas de polinucleótidos unidos en lugares adyacentes sobre una cadena complementaria. Las ADN ligasas requieren usualmente ATP (EC 6.5.1.1) o NAO (EC 6.5.1.2) como un co-factor para sellar pliegues en ADN de doble cadena. Son ADN ligasas adecuadas para utilización en la presente invención T4 ADN ligasa, E. coli ADN ligasa o preferentemente una ligasa termoestable tal como, por ejemplo, Thermus aquaticus (Taq) ligasa, Thermus thermophilus DNA ligasa, o Pyrococcus ADN ligasa. De manera alternativa, se puede utilizar ligado químico o extremos de polinucleótidos modificados de manera adecuada para ligar dos sondas de oligonucleótidos reasociadas en lugares adyacentes en la parte complementaria de una secuencia diana. Se incluyen entre los grupos reactivos a título de ejemplo, sobre extremos de polinucleótidos modificados, sin que ello sea limitativo, fosforotiolato, y siolato o ioduro, ésteres e hidrazida, grupos RC(O)S, haloalquil, RCH₂S y [alfa]-haloacil, tiofosforil y grupos bromoacetamidam y S- pivaloiloilometil-4-tiotimidina.

Los agentes de ligado químico incluyen, sin limitación, agentes de la activación, condensación, y agentes de reducción, tales como carbodiimida, bromuro de cianógeno (BrCN), N-cianoimidazol, imidazol, 1-metilimidazol/carbodiimida/cistamina, ditiotretitol (OTT) y luz ultravioleta. El autoligado, es decir, ligado espontáneo en ausencia de un agente ligante, se encuentra asimismo dentro del ámbito de la invención. Se pueden encontrar protocolos detallados para procedimientos de ligado químico y descripciones de grupos reactivos apropiados, entre otros lugares en Xu y otros, Nucleic Acid Res., 27:875-81 (1999); Gryaznov and Letsinger, Nucleic Acid Res. 21:1403-08 (1993); Gryaznov y otros, Nucleic Acid Res. 22:2366-69 (1994); Kanaya and Yanagawa, Biochemistry 25:7423-30 (1986); Luebke and Dervan, Nucleic Acids Res. 20:3005-09 (1992); Sievers and van Kiedrowski, Nature 369:221-24 (1994); Liu and Taylor, Nucleic Acids Res. 26:3300-04 (1999); Wang and Kool, Nucleic Acids Res. 22:2326-33 (1994); Purmal y otros, Nucleic Acids Res. 20:3713-19 (1992); Ashley and Kushlan, Biochemistry 30:2927-33 (1991); Chu and Orgel, Nucleic Acids Res. 16:3671-91 (1988); Sokolova y otros, FEBS Letters 232:153-55 (1988); Naylor and Gilham, Biochemistry 5:2722-28 (1966); y la Patente U.S N° 5.476.930. Tanto el ligado químico como el ligado enzimático tiene lugar de manera mucho más eficiente sobre complejos de secuencias apareadas sonda-diana en comparación con complejos en los que una o ambas sondas forman un desapareamiento con la secuencia diana, o en las proximidades del lugar de ligado (Wu and Wallace, 1989, Gene 76: 245-254; Xu and Kool, supra). A efectos de incrementar la especificidad del ligado, es decir, las eficiencias de ligado relativas de oligonucleótidos perfectamente apareados en comparación con oligonucleótidos no apareados, el ligado es llevado a cabo preferentemente a temperaturas elevadas. De este modo, en una realización preferente de la invención, se utiliza una ADN ligasa que sigue activa a 50-65°C en tiempos prolongados, pero que es inactivada fácilmente a temperaturas más elevadas, por ejemplo, las utilizadas en la etapa de desnaturalización utilizando una PCR, habitualmente 90-100°C. Una de dichas ADN ligasas es una NAD que requiere ADN ligasa de una bacteria Gram-positiva (cepa MRCH 065) tal como se conoce por el documento as WO 01/61033. Esta ligasa recibe la designación de "Ligasa 65" y se encuentra a disposición comercial de la firma MRC Holanda, Amsterdam.

55 Ligado de intersticio ("Gap-ligation")

En una realización alternativa, por ejemplo dirigida a la identificación de indel, los respectivos extremos de las secciones complementarias de la primera y segunda sonda se pueden reasociar, de manera que queda un intersticio ("gap") de uno o varios nucleótidos. Este intersticio puede ser llenado con un oligonucleótido adecuado (tercero) y ligado. Estos procedimientos son conocidos en la técnica como "ligado de intersticio" y se dan a conocer, entre otros, en los documentos WO 00/77260; US5185243; EP439182; EP320308; W090/01069. Otra posibilidad de llenar este intersticio es por extensión de un extremo de la sonda utilizando una polimerasa y una ligasa en combinación con nucleótidos únicos, opcionalmente pre-seleccionados de A, T, C, o G, o di-, tri- u otros pequeños oligonucleótidos. En el caso de que la secuencia diana es ARN, otra posibilidad adicional de llenar el intersticio es por extensión de un

extremo de la sonda utilizando transcriptasa inversa y una ligasa en combinación con nucleótidos únicos, opcionalmente seleccionados de A, T, C, o G, o di-, tri- u otros pequeños oligonucleótidos.

El ligado de intersticio puede ser aplicable en la detección de múltiples SNP (haplotipado) que están situados muy próximos entre sí. En esta realización, la primera sonda de oligonucleótido es dotada de un primer nucleótido específico de alelo para el primer SNP y la segunda sonda de oligonucleótidos con un segundo nucleótido específico de alelo para el segundo SNP. La tercera sonda abarca el intersticio entre la primera y segunda sondas. Después del ligado de las tres sondas para formar la sonda conectada, el cebador compuesto se deja reasociar con la primera parte derivada de la sonda en las tres sondas conectadas. Al dirigir el cebador compuesto para que cubra el primer nucleótido específico de alelo del primer SNP y prever para cada alelo del primer SNP un diferente cebador compuesto con diferentes identificadores, y al proporcionar segundas sondas diferentes que tienen diferentes identificadores para cada alelo del segundo SNP, se puede determinar la combinación de alelos en ambas posiciones de SNP a la misma vez. La presencia de la combinación de SNP se puede detectar por la presencia de los identificadores presentes en la primera y segunda sonda de oligonucleótidos.

Secuencias diana

En esta definición más amplia, la secuencia diana puede ser cualquier secuencia de nucleótidos de interés. La secuencia diana puede ser cualquier secuencia de la que se desee la determinación/detección, por ejemplo, a causa de que es indicativa, está asociada o es representativa de una determinada enfermedad o formación genética o alteración. La secuencia diana es preferentemente una secuencia de nucleótidos que contiene, representa o está asociada con un polimorfismo. El término polimorfismo en esta descripción se refiere a la aparición de dos o más secuencias alternativas determinadas genéticamente o alelos en una población. Un sitio o marcador polimórfico es el lugar en el que tiene lugar la divergencia de la secuencia. Los marcadores preferentes tienen, como mínimo, dos alelos, teniendo lugar cada uno de ellos a una frecuencia superior a 1%, y más preferentemente a 10% o 20% de la población seleccionada. Un lugar polimórfico puede ser tan pequeño como un par de bases. Los marcadores polimórficos comprenden polimorfismos con longitud de un fragmento de restricción, número variable de repeticiones tándem (VNTR), regiones hipervariables, minisatélites, repeticiones de dinucleótidos, repeticiones de trinucleótidos, repeticiones de tetranucleótidos, repeticiones de secuencia simple y elementos de inserción tales como Alu. La primera forma alélica identificada es designada arbitrariamente como forma de referencia, y otras formas alélicas son designadas como alelos alternativos o variantes. La forma alélica que aparece más frecuentemente en una población seleccionada se indica en algunos casos como forma de tipo natural ("wild type"). Los organismos diploides pueden ser homocigóticos o heterocigóticos para formas alélicas. Un polimorfismo dialélico tiene dos formas. Un polimorfismo trialélico tiene tres formas. Un polimorfismo de nucleótido único tiene lugar en un sitio polimórfico ocupado por un nucleótido único, siendo el lugar de variación entre secuencias alélicas. El sitio está precedido usualmente y seguido por secuencias altamente conservadas del alelo (por ejemplo, secuencias que varían en menos de 1/100 o 1/1000 miembros de las poblaciones). Se presenta usualmente un polimorfismo de nucleótido único debido a la sustitución de un nucleótido por otro en el sitio polimórfico. También pueden aparecer polimorfismos de nucleótido único a partir de una delección de un nucleótido o una inserción de un nucleótido relativo a un alelo de referencia. Otros polimorfismos incluyen (pequeñas) delecciones o inserciones de varios nucleótidos, a los que se hace referencia como indels. Una secuencia diana preferente es una secuencia diana que está asociada con un marcador AFLP®, es decir, un polimorfismo que es detectable con AFLP®.

ADN

En la muestra de ácido nucléico, los ácidos nucléicos que comprenden la diana pueden ser cualesquiera ácidos nucléicos de interés, aunque los ácidos nucléicos de la muestra adoptarán habitualmente la forma de ADN, la información de secuencia de nucleótidos contenida en la muestra puede proceder de cualquier fuente de ácidos nucléicos, incluyendo, por ejemplo, ARN, poliA+ ARN, DNAC, ADN genómico, ADN organular tal como ADN de mitocondrio o cloroplasto, ácidos nucléicos sintéticos, bibliotecas de ADN, bancos de clones o cualquier selección o combinación de los mismos. El ADN de la muestra de ácido nucléico puede ser de doble cadena, cadena única, y ADN de doble cadena desnaturalizado en ADN de cadena única. La desnaturalización de secuencias de doble cadena proporciona dos fragmentos de cadena única, de los que uno o ambos pueden ser analizados por sondas específicas para las cadenas respectivas. Las muestras de ácidos nucléicos preferentes comprenden secuencias diana sobre ADNc, ADN genómico, fragmentos de restricción, fragmentos de restricción ligados por adaptador, fragmentos de restricción ligados por adaptador amplificados, fragmentos de AFLP o fragmentos obtenidos en una pre-amplificación de plantilla AFLP.

Muestras

Es preferible que una muestra contenga dos o más secuencias diana diferentes, es decir, dos o más se refiere a la identidad en vez de la cantidad de secuencias diana en la muestra. En particular, la muestra comprende, como mínimo, dos secuencias diana diferentes, en particular, como mínimo 10, preferente como mínimo 25, más preferentemente como mínimo 50, más en particular como mínimo 100, preferente como mínimo 250, más preferentemente como mínimo 500 y de modo más preferente como mínimo 1000 secuencias diana adicionales. En

la práctica, el número de secuencias diana en una muestra que se pueden analizar es limitada, entre otros factores, por el número de amplicones que se pueden detectar. Por ejemplo, demasiados conjuntos diferentes de primeras y segundas sondas de oligonucleótidos en una muestra pueden perjudicar la fiabilidad de una etapa de amplificación múltiple.

Otra limitación se forma, por ejemplo, por el número de fragmentos en una muestra que pueden ser resueltos por la plataforma de detección utilizada. El número puede estar limitado también por la dimensión del genoma del organismo o la complejidad del transcriptoma de un tipo de célula específico del que se deriva respectivamente la muestra de ADN o de ADNc.

Cebadores

El cebador compuesto alargado es amplificado utilizando un conjunto de cebadores que corresponden a los sitios de unión del cebador. Preferentemente, el conjunto comprende un primer cebador que tiene una secuencia esencialmente idéntica a la primera sección de unión de cebador y un segundo cebador que es complementario de la segunda sección de unión de cebador. En una realización preferente, como mínimo, uno de los cebadores o el mismo conjunto de cebadores es utilizado para la amplificación de dos o más cebadores compuestos alargados diferentes en una muestra, preferentemente para la amplificación de todos los cebadores compuestos alargados en una muestra. Este cebador recibe en algunos casos la designación de cebador universal, dado que estos cebadores son capaces de cebador la amplificación de todos los cebadores compuestos alargados que contienen el correspondiente sitio de unión de cebador universal y como consecuencia de todas las sondas ligadas que contienen el lugar de unión del cebador universal. Los diferentes cebadores utilizados en la amplificación en la etapa (h) son esencialmente preferentes iguales en la eficiencia de reasociación y cebado. De este modo, los cebadores de una muestra difieren preferentemente en menos de 20, 15, 10, 5, o 2°C de temperatura de fusión. Esto se puede conseguir tal como se ha indicado anteriormente para la sección complementaria de las sondas de oligonucleótidos. A diferencia de la secuencia de las secciones complementarias, la secuencia de los cebadores no está determinada por la secuencia diana. Por lo tanto, las secuencias de cebador pueden ser diseñadas convenientemente ensamblando la secuencia a partir de tetrámeros de nucleótidos, en los que cada tetrámero contiene un A, T, C y G o por otras formas que aseguran que el contenido G/C y temperatura de fusión de los cebadores son idénticos o muy similares. La longitud de los cebadores (y correspondientes sitios de unión de cebador en la sección de etiqueta de la segunda sonda y en el cebador compuesto) es preferentemente como mínimo 12, 15 o 17 nucleótidos y preferentemente no más de 25, 30, 40 nucleótidos.

En una realización preferente, como mínimo dos de las segundas sondas de oligonucleótidos que son complementarias, como mínimo, a dos secuencias diana diferentes de una muestra, comprenden una sección de etiqueta que comprende una sección de unión de cebador que es complementaria de una secuencia de cebador único. En una realización preferente, como mínimo, dos de los cebadores compuestos de oligonucleótidos que son complementarios, como mínimo, a dos primeras secciones específicas distintas de dos primeras sondas en una muestra, comprenden una sección de unión de cebador que es complementaria de una primera secuencia de cebador. De este modo, preferentemente, como mínimo, uno de dichos primer y segundo cebador en un primer conjunto es utilizado para la amplificación de cebadores compuestos alargados correspondientes a, como mínimo, dos secuencias diana diferentes de una muestra, más preferentemente para la amplificación de cebadores compuestos alargados correspondientes a todas las secciones diana de una muestra. Preferentemente, solo un primer cebador único es utilizado y en algunas realizaciones, solamente un primer y un segundo cebadores únicos son utilizados para amplificación de todos los cebadores compuestos alargados. Utilizando cebadores comunes para amplificación de múltiples fragmentos diferentes, usualmente es ventajoso para la eficiencia de la etapa de amplificación.

Los cebadores compuestos alargados obtenidos a partir del ligado de las secciones de sonda reasociadas de forma adyacente, y reasociación subsiguiente y alargamiento del cebador compuesto son amplificados en la etapa (h), utilizando un primer conjunto que consiste preferentemente de un conjunto de cebadores para cada uno de los cebadores compuestos alargados de la muestra. El conjunto de cebador comprende cebadores que son complementarios de las primeras secuencias de unión de cebador que se encuentran presente en los cebadores compuestos alargados. Un primer conjunto comprende habitualmente un primer cebador y, como mínimo, un segundo cebador, pero puede consistir solamente de un cebador único que efectúa el cebado en ambas direcciones. Se han obtenido excelentes resultados utilizando cebadores conocidos en la técnica como cebadores AFLP tales como los que se describen, entre otros, en el documento EP534858 y en Vos y otros, Nucleic Acid Research, 1995, vol. 23, 4407-44014.

Cebadores selectivos

En ciertas realizaciones, uno o varios de los cebadores utilizados en la etapa de amplificación de la presente invención es un cebador selectivo. Un cebador selectivo se define en esta descripción como un cebador que, además de su secuencia universal que es complementaria de un primer sitio de unión de cebador de la sonda, contiene una región que comprende los llamados "nucleótidos selectivos". La región que contiene los nucleótidos selectivos está situada en el extremo 3' del cebador universal.

El principio de los nucleótidos selectivos se da a conocer entre otros documentos, en EP534858 en Vos y otros, Nucleic Acid Research, 1995, vol. 23, 4407-44014. Los nucleótidos selectivos son complementarios de los nucleótidos de las sondas (ligadas) que están situados adyacentes a la secuencia del cebador. Los nucleótidos selectivos no forman parte generalmente de la región de las sondas (ligadas) o del cebador compuesto alargado que se ha mostrado como secuencia del cebador. Los cebadores que contienen nucleótidos selectivos se indican como cebadores +N, en los que N significa el número de nucleótidos selectivos presentes en el extremo 3' del cebador. N se selecciona preferentemente entre A, C, T o G.

N puede ser seleccionado también entre varias alternativas de nucleótidos, es decir, compuestos que son capaces de imitar el comportamiento de nucleótidos ACTG, pero que además de ello tienen otras características tales como la capacidad de hibridación mejorada en comparación con los nucleótidos ACTG o la capacidad de modificar la estabilidad del dúplex resultante de la hibridación. Son ejemplos de ellos, los PNA, LNA, inosina, etc. Cuando la amplificación es llevada a cabo con más de un cebador, por ejemplo, con PCR utilizando dos cebadores, un cebador o ambos pueden estar dotados de nucleótidos selectivos. El número de nucleótidos selectivos puede variar dependiendo del tipo o de otras peculiaridades determinables por el técnico de la materia. En general, el número de nucleótidos selectivos no es superior a 10, pero como mínimo 5, preferentemente 4, más preferente 3, más preferentemente 2 y de manera especialmente preferente 1 nucleótido selectivo.

Por lo tanto, el cebador A+1 contiene un nucleótido selectivo; un cebador +2 contiene 2 nucleótidos selectivos, etc. Un cebador sin nucleótidos selectivos (es decir, un cebador convencional) puede ser designado como cebador +0 (sin adición de nucleótidos selectivos). Cuando se añade un nucleótido selectivo específico, este es designado por la designación +A o +C etc.

Mediante amplificación de un conjunto de cebadores compuestos alargados con un cebador selectivo, se obtiene un subconjunto de cebadores compuestos alargados, a condición de que la base complementaria se incorpore en la posición apropiada en el diseño de las sondas que se suponen amplificadas selectivamente utilizando el cebador selectivo. Utilizando un cebador +1, por ejemplo, el factor múltiplex de la mezcla amplificada se reduce en un factor 4 en comparación con la mezcla de sondas ligadas antes de amplificación. Se pueden conseguir reducciones más importantes utilizando cebadores con nucleótidos selectivos múltiples, es decir, reducción de 16 veces de la proporción múltiplex original que se obtiene con 2 nucleótidos selectivos, etc.

Cuando se desarrolla un ensayo que después de ligado, se tiene que amplificar selectivamente, es preferible que la sonda contenga el nucleótido complementario adyacente a la secuencia de unión de cebador. Esto permite la preselección de la sonda ligada a amplificar selectivamente.

La utilización de cebadores selectivos en la presente invención se ha demostrado que es ventajosa cuando se desarrollan ensayos basados en el ligado con elevadas proporciones múltiplex, de los que de manera subsiguiente solamente una parte específica necesita ser analizada, resultando en una reducción de coste adicional de la reacción de ligado por punto de datos. Al diseñar cebadores junto con nucleótidos selectivos adyacentes, las partes específicas de la muestra que no se tienen que amplificar separadamente, se pueden seleccionar de antemano.

Uno de los ejemplos en lo que lo indicado es útil y ventajoso es el caso de análisis de muestras que contienen solamente pequeñas cantidades de ADN y/o para la identificación de diferentes (cepas de) patógenos. Por ejemplo, en un ensayo dirigido a la detección de varias cepas de antrax (*Bacillus anthracis*), para cada una de las cepas se diseña un conjunto de sondas representativas. La detección de la presencia, ausencia o cantidad de este conjunto (o una parte caracterizante del mismo) de cebadores compuestos alargados después de las etapas de hibridación y ligado del procedimiento de la invención pueden servir como identificación de la cepa en cuestión. La amplificación selectiva con cebadores específicamente diseñados (cada cebador selectivo está enlazado a una cepa específica) puede amplificar selectivamente las diferentes cepas permitiendo su identificación. Por ejemplo, la amplificación con un cebador +A amplifica selectivamente las sondas ligadas dirigidas a la cepa X en la que un cebador +G amplifica selectivamente las sondas ligadas dirigidas a la cepa Y. En caso deseado, por ejemplo, en el caso de pequeñas cantidades de muestras de ADN, una primera identificación opcional con un cebador +0 incrementará la cantidad de sondas ligadas, facilitando de esta manera la amplificación selectiva.

Por ejemplo, un cebador universal de 20 nucleótidos pasa a ser un cebador selectivo por la adición de un nucleótido selectivo en su extremo 3', siendo ahora la longitud total del cebador de 21 nucleótidos. De manera alternativa, el cebador universal puede ser acortado en su extremo 5' por el número de nucleótidos selectivos añadidos. Por ejemplo, añadiendo dos nucleótidos selectivos en el extremo 3' de la secuencia de cebador se puede combinar con la ausencia (o eliminación) de dos nucleótidos del extremo 5' del cebador universal, en comparación con el cebador universal original. De este modo, un cebador universal de 20 nucleótidos es sustituido por un cebador selectivo de 20 nucleótidos. Estos cebadores son representados como "cebadores anidados" ("nested primers") en esta solicitud. La utilización de cebadores selectivos basados en cebadores universales tiene la ventaja de que parámetros de unificación tales como astringencia y temperaturas pueden permanecer esencialmente los mismos para amplificación con diferentes cebadores selectivos o pueden variar solamente en una forma reducida. Preferentemente, la amplificación selectiva es llevada a cabo en condiciones de astringencia incrementada en

comparación con amplificación no selectiva. Con astringencia incrementada, se indica que las condiciones para la reasociación del cebador la sonda ligada son tales que solamente apareando perfectamente los cebadores selectivos se extenderán por la polimerasa utilizada en la etapa de amplificación. La amplificación específica de solamente cebadores que se corresponden perfectamente, se puede conseguir en la práctica por la utilización de un llamado perfil de toma de contacto PCR ("touchdown PCR") en el que la temperatura durante la etapa de reasociación del cebador se baja escalonadamente, por ejemplo en 0,5°C para permitir cebadores perfectamente reasociados. Se describen condiciones de astringencia adecuadas, por ejemplo, para amplificación AFLP en los documentos EP 534858 y en Vos y otros, Nucleic Acid Research, 1995, vol. 23, 4407-44014. El técnico en la materia, basándose en lo que se indica en esta descripción, encontrará formas de adaptar las condiciones de astringencia para adecuarse a su necesidad específica, sin salir del espíritu de la invención.

Una de las otras ventajas de la amplificación selectiva de sondas ligadas es que se puede adaptar fácilmente un ensayo con una elevada proporción múltiplex para la detección con procedimientos o sobre plataformas que prefieren una proporción múltiplex más baja.

Uno de los muchos ejemplos de ello es la detección basada en diferencias de longitud tales como electroforesis y electroforesis preferentemente capilar, tal como se lleva a cabo en un MegaBACE o utilizando nanotecnología, tal como "Lab-on-a-Chip".

Amplificación

En la etapa (h) del procedimiento de la invención, los cebadores compuestos alargados son amplificados para producir una muestra amplificada que comprende cebadores compuestos alargados amplificados (detectable) (amplicones) que son representaciones de la secuencia de nucleótidos diana por cualquier procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos adecuado conocido en la técnica. Los procedimientos de amplificación de ácido nucleico utilizan usualmente dos cebadores, los, dNTP, y una (ADN) polimerasa. Un procedimiento preferente para amplificación es PCR. "PCR" o "Reacción de Cadena de Polimerasa" es un procedimiento rápido para amplificación enzimática in vitro de un segmento específico de ADN. El ADN a amplificar es desnaturalizado por calentamiento de la muestra. En presencia de ADN polimerasa y exceso de trifosfatos deoxi-nucleótidos, los oligonucleótidos que hibridan específicamente la secuencia diana ceban nuevas síntesis de ADN. Es preferible, que la polimerasa sea una ADN polimerasa que no expresa actividad de desplazamiento de cadena o, como mínimo, no lo hace de manera significativa. Son ejemplos, Amplitaq y Amplitaq Gold (suministrador Perkin Elmer) y Accuprime (Invitrogen). Una serie de síntesis tienen como resultado nuevas cadenas de determinada longitud, que igual que las cadenas parentales pueden hibridar a los cebadores cuando tiene lugar la desnaturalización y reasociación. El segundo ciclo de desnaturalización, reasociación y síntesis produce dos productos de cadena única, que forman conjuntamente un producto separado de doble cadena, exactamente la longitud entre los extremos del cebador. Este producto individual se acumula exponencialmente con cada serie sucesiva de amplificación. En el curso de unos 20 a 30 ciclos, se pueden conseguir amplificaciones de muchos millones de veces del fragmento individual. Los protocolos de PCR son bien conocidos en esta técnica, y se describen en textos estándar de laboratorio, por ejemplo, Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1995). Las condiciones adecuadas para la aplicación de PCR en el procedimiento de la invención, se describen en EP-A 0 534 858 and Vos y otros (1995; Nucleic Acids Res. 23: 4407- 23:4407- 4407-4407-4414), en los que múltiples fragmentos de ADN entre 70 y 700 nucleótidos y conteniendo idénticas secuencias de unión de cebador son amplificados con eficiencia casi igual utilizando un conjunto cebador.

Otros procedimientos de amplificación múltiplex y/o isotérmica que se pueden aplicar incluyen, por ejemplo, la amplificación de círculo rodante ("rolling circle"), LCR, replicación de secuencia auto-sostenida (3SR), amplificación de ARN mediada por Q-β-replicasa, o amplificación por desplazamiento de cadena (SDA). En algunos casos, esto puede requerir un diseño distinto de las sondas y cebadores compuestos.

Amplicones

El término "amplicón" que se utiliza en esta descripción se refiere al producto de la etapa de amplificación del cebador compuesto alargado. El término "amplicón" utilizando en esta descripción se refiere, por lo tanto, a un cebador compuesto alargado amplificado. Después de la etapa de ligado en la que se conectan dos secciones específicas diana por medio de una ligasa, un cebador compuesto se combina con la sonda conectada o ligada y resulta alargado. El cebador compuesto alargado se combina con uno o varios cebadores y una polimerasa y se amplifica para producir amplicones. La sonda ligada, los cebadores, la polimerasa y/o otros parámetros y variables son tales que la amplificación resulta en representaciones lineales amplificadas de la sonda conectada.

Preferentemente, un amplicón es una representación monómera de la sonda conectada amplificada. Las diferentes realizaciones de la presente invención proporcionarán otros detalles a este respecto.

Detección

Los amplicones de la presente invención se pueden detectar en una plataforma de detección apropiada. La discriminación entre amplicones derivada de diferentes secuencias diana se puede basar en la longitud, secuencia o masa como parámetro primario. La detección de las muestras (etiquetadas) es llevada a cabo por un detector que resulta en detección de datos. El detector es desde luego dependiente del sistema general en el que se lleva a cabo la separación (longitud, masa o secuencia o una combinación de las mismas) pero si, es aplicable, depende también de la etiqueta presente en el cebador, tal como etiqueta fluorescente o radioactiva.

Son ejemplos de plataformas de detección adecuadas plataformas de detección basadas en longitud, plataformas de detección basadas en secuencia y plataformas de detección basadas en masa.

Detección basada en longitud

Uno de los múltiples ejemplos de detección basada en longitud es la detección basada en electroforesis (electroforesis capilar, electroforesis de bloque de gel, electroforesis de gel continua con detector fijo) y preferentemente electroforesis capilar tal como la llevada a cabo en un equipo MegaBACE que se puede conseguir de la firma Amersham Biosciences, o utilizando nanotecnología tal como "Lab-on-a-Chip" u otros dispositivos micro-eluídicos. La diferencia de longitud del amplicón que se detecta se puede conseguir por la utilización de uno o varios identificadores.

Los amplicones de una muestra son analizados preferentemente en un dispositivo electroforético. El dispositivo electroforético separa preferentemente los amplicones diferentes en una muestra amplificada en base a la longitud (movilidad), después de lo cual los amplicones separados pueden ser detectados, tal como se describe en esta descripción. El dispositivo electroforético es preferentemente un dispositivo multicanal en el que las muestras son sometidas a electroforesis en múltiples canales, preferentemente en paralelo. El dispositivo electroforético tiene una localización de aplicación (por canal) para aplicación (carga) de la muestra amplificada a someter a electroforesis, un área de separación sobre la que emigran los fragmentos de la muestra por electroforesis y, asimismo, preferentemente, un dispositivo de detección situado en una localización de detección distal con respecto a la localización de aplicación. El dispositivo de detección comprenderá usualmente un fotomultiplicador para la detección de fluorescencia, fosforescencia, o quimioluminiscencia. De manera alternativa, en el caso de electroforesis de gel, los fragmentos separados pueden ser detectados en el gel, por ejemplo, por auto-radiografía o fluorografía.

Discriminación de longitud

Para discriminar entre secuencias de diferente longitud de la muestra se utiliza preferentemente la diferencia de longitud de los amplicones respectivos correspondientes. Al separar los amplicones basándose en longitud, se puede determinar la presencia de las secuencias diana correspondientes en la muestra. De acuerdo con ello, en una realización preferente de la presente invención, la discriminación entre amplicones deducida de dos secuencias diana distintas de una muestra se basa en la diferencia de longitud entre los respectivos amplicones correspondiente a diferentes secuencias diana en una muestra o en una muestra amplificada.

Preferentemente, la diferencia de longitud es proporcionada por la longitud de la secuencia o secuencias identificadoras de las segundas sondas de oligonucleótidos y/o cebadores compuestos de la invención. Al incluir, como mínimo una de las sondas de oligonucleótidos del par de la invención, pero preferentemente en ambos (segunda sonda y cebador compuesto) del conjunto, un identificador de una longitud predeterminada se puede controlar la longitud de cada cebador compuesto alargado en una muestra amplificada, de manera que se posibilita una discriminación adecuada basada de en diferencias de longitud de los amplicones obtenidos. En una realización preferente de una sonda del par según la invención, el identificador está situado entre la sección de la segunda sonda complementaria a la secuencia diana y la secuencia de unión de cebador. Preferentemente, la longitud total del identificador es facilitada por la combinación de la longitud del identificador en el cebador compuesto y la longitud del identificador en la segunda sonda. De acuerdo con ello, en una realización preferente, tanto el cebador compuesto de oligonucleótidos y la segunda sonda de oligonucleótidos comprende un identificador. La diferenciación de longitud entre amplicones obtenida de secuencias diana en la muestra se escoge preferentemente de manera que los amplicones pueden ser distinguidos basándose en su longitud. Esto se consigue utilizando secuencias identificadoras o combinaciones de secuencias identificadoras de los cebadores compuestos y/o segundas sondas del conjunto de sondas que, (conjuntamente) tienen como resultado diferencias de longitud que se pueden distinguir en dispositivos electroforéticos. De este modo, desde la perspectiva del poder de resolución, las diferencias de longitud entre los diferentes cebadores compuestos alargados amplificados, que pueden estar causadas por sus identificadores, son lo mayor posible. No obstante, por otras varias importantes consideraciones, tal como se indica a continuación, las diferencias de longitud entre los diferentes amplicones es, preferentemente, lo más reducida posible: (1) el límite superior que existe en la práctica con respecto a la longitud de sondas sintetizadas químicamente es, como máximo, de unas 100-150 bases; (2) la menor eficiencia en la amplificación de fragmentos más grandes; (3) las mayores probabilidades de eficiencias de amplificación diferenciales de fragmentos con una gran variación de longitud; y (4) la utilización de múltiples inyecciones de muestras de detección en el dispositivo de detección que funcionan mejor con fragmentos de un estrecho rango de longitud. Preferentemente, las diferencias de longitud entre las secuencias a determinar y facilitar por los identificadores son, como mínimo,

suficientes para permitir la discriminación entre esencialmente todos los amplicones. Por definición, basándose en procedimientos químicos, enzimáticos y biológicos de síntesis de ácido nucleico, la diferencia mínima de tamaño utilizable entre diferentes amplicones en una muestra amplificada es una base, y esta diferencia de dimensión encaja dentro de la potencia de resolución de la mayor parte de dispositivos electroforéticos, especialmente en el rango de dimensiones más bajas. De este modo, basándose en lo anteriormente indicado, es preferible utilizar ensayos múltiplex con productos de amplificación que difieren en longitud por una sola base (par). En una realización preferente, la diferencia de longitud entre diferentes amplicones en una muestra amplificada es, como mínimo, de dos nucleótidos. En una realización especialmente preferente de la invención, los amplicones correspondientes a diferentes secuencias diana de una muestra tienen una diferencia de longitud de dos nucleótidos.

Longitud y etiquetado

La producción puede ser incrementada por utilización de cebadores etiquetados múltiples. Uno de los problemas asociados con la utilización de diferentes etiquetas en una muestra es la interferencia ("cross talks") o interferencia residual. La interferencia o interferencia residual según los términos utilizados en esta descripción, se refieren a la superposición entre los espectros de emisión de diferentes etiquetados (fluorescentes). Por ejemplo, cuando se utilizan tintes fluorescentes, cada uno de los tintes tiene un espectro de emisión (y de absorción) diferente. En caso de dos tintes en una muestra, estos espectros se pueden solapar y pueden provocar alteraciones de la señal, lo cual es contrario a la calidad de los datos obtenidos. Particularmente, cuando dos fragmentos de nucleótidos a detectar en una muestra están etiquetados con una etiqueta diferente y uno de los fragmentos se encuentra presente en una cantidad importante, mientras que el otro se encuentra presente solamente en pequeñas cantidades, la interferencia residual puede provocar que la señal medida del fragmento que se encuentra presente solamente en cantidades pequeñas se derive principalmente de la emisión de otro etiquetado con un espectro de emisión solapado que está contenido de manera abundante en un fragmento con dimensiones idénticas de otra muestra. El efecto recíproco del otro tinte puede tener lugar también, pero en este ejemplo, su efecto es probablemente menor por la abundancia de diferencias entre los amplicones etiquetados con los respectivos tintes.

Chehab y otros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9178-9182 (1989) han intentado discriminar entre alelos al fijar diferentes tintes fluorescentes a alelos competidores en un tubo de reacción único seleccionando combinaciones de etiquetas tales que el máximo de emisión de un tinte coincide esencialmente con la emisión mínima del otro tinte. No obstante, para cierta longitud de onda para la que un tinte expresa una máxima absorción, existe siempre también una cierta absorción remanente de otro tinte presente en la muestra, especialmente cuando la muestra contiene múltiples tintes.

Esta vía para el análisis múltiplex se observó que era limitada en escala por los relativamente pocos tintes que pueden ser resueltos espectralmente. Uno de los problemas principales con la utilización de tintes múltiplex, es que los espectros de emisión de diferentes etiquetas fluorescentes se solapan frecuentemente. Las señales de datos iniciales resultantes tienen que ser corregidas por la contribución de fragmentos de tamaño similar, que son detectados simultáneamente y que son etiquetados con otro tinte fluorescente por un procedimiento llamado corrección de interferencia ("cross-talk correction"). La corrección de interferencia se lleva a cabo corrientemente por medios matemáticos, basados en los espectros de absorción teóricos conocidos para ambos tintes después de la recogida de datos "iniciales" o "en bruto" del dispositivo de detección. La corrección matemática se basa en espectros teóricos e ignora que los espectros de emisión de etiquetas son sensibles y son afectados frecuentemente por la composición de la muestra de detección. Estas sensibilidades pueden afectar al brillo y/o la longitud de onda de la emisión. Esto significa que parámetros tales como pH, temperatura, intensidad de la luz de excitación, interacciones no covalentes, concentración de sal y intensidad iónica influyen fuertemente en el espectro de emisión resultante. En particular, es sabido que la presencia de sales residuales en una muestra afecta la señal de fluorescencia emitida por el tinte y es un factor crítico en caso de detección por electroforesis capilar utilizando inyección electrocinética, porque ello afecta también la eficiencia de la inyección. De este modo, el solape espectral es una fuente potencial de error que tiene un impacto negativo sobre la calidad de los datos en caso de detección múltiplex utilizando diferentes tintes fluorescentes.

La presente invención facilita una solución para este problema, de manera tal que dos (o más) etiquetados con espectros solapados pueden ser utilizados en la misma muestra sin afectar significativamente la calidad de los datos. Por una combinación predeterminada de diferencias de longitud y etiquetados, se obtiene un incremento en el número de secuencias de nucleótidos diana que pueden ser detectados en una muestra, mientras que la calidad de los datos permanece, como mínimo, constante. En una realización preferente de la invención, el solape espectral entre dos secuencias etiquetadas de forma diferente se reduce por la introducción de diferencia de longitud entre las dos secuencias. Esta diferencia de longitud relacionada con el etiquetado se puede proporcionar por la longitud de la secuencia identificadora tal como se describe en esta descripción. El número de diferentes etiquetas que se pueden utilizar en la misma muestra en el presente procedimiento es, como mínimo, de dos, preferentemente como mínimo de tres, y más preferentemente como mínimo de 4. El número máximo de etiquetas está limitado funcionalmente por el mínimo de solape espectral que sigue siendo aceptable, que para la mayor parte de aplicaciones asciende de manera típica a menos de 15 por ciento de la señal real, preferentemente menos de 10 por ciento, más preferentemente menos de 5 por ciento, y de manera más preferente menos de 1 por ciento de la señal real.

A efectos de evitar la influencia potencial de interferencia residual en la calidad de los datos en el caso de que diferentes muestras estén etiquetadas con múltiples tintes fluorescentes con espectros de emisión que se solapan y que fragmentos con idéntica longitud se detectan simultáneamente en la misma pasada, en una realización especialmente preferente se prefiere seleccionar las secuencias identificadoras, de manera que los amplicones difieren como mínimo por dos pares de bases (nucleótidos) dentro del conjunto múltiplex, y difieren en un solo par de bases entre conjuntos múltiplex etiquetados con los diferentes tintes que tienen espectros que se solapan. Al proceder de este modo, la longitud de los fragmentos etiquetados con los respectivos tintes se puede seleccionar de manera que la influencia potencial de la interferencia residual en la calidad de los datos se evita porque se definen combinaciones únicas de dimensiones de fragmentos y tinte de etiquetado.

Una realización especialmente preferente de la invención está dirigida a un procedimiento en el que una muestra que comprende amplicones es derivada de una multiplicidad de secuencias diana. Estos amplicones están etiquetados de manera diferente, definiendo de esta forma grupos de amplicones que llevan la misma etiqueta. Dentro de cada grupo, el identificador proporciona para una diferencia de longitud como mínimo dos, preferentemente dos nucleótidos. Entre dos grupos con etiquetas que tienen solape espectral, el identificador proporciona una diferencia de longitud de un nucleótido, resultando de manera efectiva en un grupo que tiene un número par de nucleótidos y un grupo que tiene un número impar de nucleótidos, tal como se ha descrito anteriormente.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la discriminación y detección mejoradas de secuencias diana en una muestra, comprendiendo el disponer, como mínimo, dos o más grupos de sondas de oligonucleótidos, de manera que los amplicones obtenidos con diferentes grupos de sondas de oligonucleótidos tienen diferentes etiquetas, de forma que sustancialmente, cada amplicón dentro de un grupo tiene la misma etiqueta, de forma que dentro de un grupo de amplicones etiquetados de forma idéntica se dispone una diferencia de longitud entre cada sonda etiquetada de forma idéntica dentro de aquel grupo, de manera que entre el primer y segundo grupos se dispone una diferencia de longitud adicional, de manera que cada amplicón de la muestra amplificada se caracteriza por una combinación de longitud de la secuencia y la etiqueta.

En una realización especialmente preferente del procedimiento de la invención, se disponen para una muestra, como mínimo dos grupos de conjuntos de primera y segunda sondas y cebadores compuestos de oligonucleótidos, de manera que cada grupo de segundas sondas de oligonucleótidos tiene secuencias de etiqueta que presentan, como mínimo, un lugar de unión de cebador específico del grupo. De manera similar, el grupo de cebadores compuestos comprende un lugar de unión de cebador específico de grupo. Los cebadores compuestos alargados de cada grupo son amplificados desde un primer conjunto, de manera que, como mínimo uno, de los primeros y segundos cebadores es complementario del lugar de unión de cebador específico de grupo, y de manera que, como mínimo, uno de los primeros y segundos cebadores de un grupo comprende una etiqueta específica de grupo. En cada grupo, un amplicón correspondiente a una secuencia diana de la muestra difiere de longitud de un amplicón que corresponde a una secuencia diana diferente de la muestra. Las etiquetas específicas de grupo son preferentes, de manera que el dispositivo de detección puede distinguir entre las etiquetas específicas de diferentes grupos. La diferencia de longitud es proporcionada preferentemente por la longitud de la secuencia identificadora. Preferentemente, en esta realización del procedimiento de la invención, una primera parte de los grupos tiene amplicones con un número par de nucleótidos, y una segunda parte de los grupos tiene amplicones que tienen un número impar de nucleótidos. Preferentemente, los grupos de amplicones que tienen un número par de nucleótidos y los grupos de amplicones que tienen un número impar de nucleótidos están etiquetados con etiquetas fluorescentes que presentan un solape mínimo de sus espectros de emisión. De esta forma, los dos grupos de amplicones, teniendo cada grupo un número impar de nucleótidos, son etiquetados con etiquetas que tienen el mínimo solape en sus espectros de emisión. Lo mismo se cumple para los dos grupos de amplicones, teniendo cada grupo un número par de nucleótidos. Dos grupos de amplicones, un grupo que tiene un número impar de nucleótidos y teniendo el otro grupo un número par de nucleótidos son etiquetados con etiquetas que tienen un solape más grande en sus espectros de emisión. Los conceptos relativos utilizados en esta descripción de "solape mínimo en sus espectros de emisión" y "tienen un solape mayor en sus espectros de emisión" se refieren a un grupo de etiquetas de las que se puede hacer una selección de etiquetas para utilizar en la presente invención. Este grupo de etiquetas puede depender de la plataforma de detección utilizada para otros factores, tales como los que se han dado a conocer anteriormente. En una realización especialmente preferente de este procedimiento, se producen un primer y un segundo grupos de amplicones que tienen un número par de nucleótidos y se producen un tercer y un cuarto grupos de amplicones que tienen un número impar de nucleótidos, de manera que el primer y el segundo grupo son etiquetados, respectivamente, con FAM y NED, y el tercer y cuarto grupos son etiquetados con (ET-)ROX y JOE o bien HEX, respectivamente, o viceversa, de manera que el primer y segundo grupos están etiquetados con (ET-)ROX y cualquiera de JOE o HEX, respectivamente, y el tercer y cuarto grupos están etiquetados con FAM y NED, respectivamente. De esta manera, en estas realizaciones, las etiquetas fluorescentes son escogidas, de manera que los grupos de amplicones que co-emigran, que ambos contienen fragmentos con números pares o impares de nucleótidos, tienen etiquetas que presentan el mínimo solape en sus espectros de emisión, evitando de esta manera, en la mayor medida posible, interferencia en la detección de amplicones en diferentes grupos (ver también más adelante).

En una realización preferente, para evitar interferencia es deseable, por lo tanto, combinar una diferencia de longitud con una diferente etiqueta cuando se analiza un conjunto de amplicones de manera tal que la influencia de solape espectral se evita en la calidad de datos por diferencias de longitud entre amplicones etiquetados con los tintes que tienen espectros de emisión solapados.

5 Es preferible que en cada muestra, los amplicones derivados de cada secuencia diana difieran de cualesquier otros amplicones de la muestra en cuanto a longitud, y/o etiqueta o, preferentemente en la combinación de longitud y etiqueta. Para proporcionar una separación adecuada de los amplicones de diferente longitud es preferible que la diferencia de longitud entre dos amplicones diferentes sea, como mínimo, de dos nucleótidos, preferentemente dos.

10 Cuando se detectan polimorfismos es preferible que la diferencia de longitud entre dos o más alelos (SNP) del polimorfismo no sea superior a dos, asegurando de esta manera que la eficiencia de la amplificación es similar entre diferentes alelos o formas del mismo polimorfismo. Esto implica que preferentemente ambos alelos son amplificados con el mismo conjunto de cebadores y, por lo tanto, serán etiquetados con el mismo tinte.

15 En una realización preferente, dirigida por ejemplo a la detección de diferentes alelos de una multiplicidad de lugares, la distribución entre longitudes pares/impares dentro de un grupo se puede designar de la manera siguiente. Se representan dos lugares L1, L2 por los dos alelos A11, A12 para L1 y A21, A22 para L2. Las longitudes de los diferentes alelos (o amplicones que representan estos alelos) es tal que $A11 > A12 > A21 > A22$; $A12 - A11 = 2$; $A22 - A21 = 2$; $A12 - A21 = 3$. Entre los grupos G1 y G2 que llevan etiquetas que pueden tener solape en sus respectivos espectros puede haber una diferencia de longitud de 1 nucleótido. Por lo tanto, $G1(A11) - G2(A11) = 1$, por lo tanto el grupo empieza o bien con una longitud regular o una longitud irregular.

20

Esta distribución tiene algunas ventajas significativas en comparación con la distribución más densamente empaquetada que se da a conocer en esta distribución. Es conocido que debido a diferencias de conformación, diferentes secuencias de longitud idéntica en general difieren en su movilidad electroforética. Cuando existe solamente una diferencia de longitud de 1 nucleótido esto puede provocar solape entre los picos si las secuencias son de una movilidad muy diferente. Por ejemplo, la diferencia de movilidad entre dos alelos de un lugar (A11, A12), será menor que la diferencia de movilidad entre dos alelos de lugares diferentes (A12, A21). Cuando existe una diferencia significativa de movilidad entre A12 y A21, esto puede conducir a una detección poco fiable. Al crear distribuciones de longitud tal como se da a conocer en esta descripción, ello se puede evitar. La menor producción se compensa con la fiabilidad de la detección.

25

30

El problema del solape entre los espectros de diferentes etiquetas se evita entonces de manera adecuada. Esto se muestra esquemáticamente en la tabla A.

35

Tabla A: Esquema de distribución alternativa de etiquetas y longitudes de sondas.

Longitud	Grupo 1-Etiqueta 1	Grupo 2-Etiqueta 2	Grupo 3-Etiqueta 3	Grupo 4-Etiqueta 4
N	G1A11		G3A11	
N+1		G2A11		G4A11
N+2	G1A12		G3A12	
N+3		G2A12		G4A12
N+4				
N+5	G1A21		G3A21	
N+6		G2A21		G4A21
N+7	G1A22		G3A22	
N+8		G2A22		G4A22
N+9				
N+10	G1A31		G3A31	
N+11		G2A31		G4A31
N+12	G1A32		G3A32	
N+13		G2A32		G4A32
N+14				
N+15	G1A41		G3A41	
N+16		G2A41		G4A41
N+17	G1A42		G3A42	
N+18		G2A42		G4A42

5 En una realización de la presente invención se dispone entre los amplicones dentro de un grupo, una diferencia de longitud alternativamente de dos y de tres nucleótidos, es decir 0, 2, 5, 7, 10, 12 etc. El otro grupo tiene entonces una diferencia de longitud de 1, 3, 6, 8, 11, 13 etc. Basándose en la información que se da a conocer de esta descripción, el técnico en la materia puede determinar otras formas de variar diferencias de longitud dentro de un rango.

10 Inyección múltiple

A efectos de conseguir un procedimiento con alta producción de un múltiplex de muestras, se trata una serie de muestras de manera similar para generar de esta forma una multiplicidad de muestras amplificadas que entonces pueden ser analizadas en un dispositivo multicanal que es, como mínimo, capaz de detectar las etiquetas y/o diferencias de longitud. Se han descrito anteriormente dispositivos adecuados.

20 Para incrementar la producción en las plataformas electroforéticas se han desarrollado procedimientos que se describen en esta solicitud y que se designan de forma común como inyección múltiple. Al inyectar múltiples muestras que contienen fragmentos de longitudes individuales, predeterminadas, se pueden incrementar en la misma matriz electroforética y/o en cortas pasadas consecutivas, la producción. Todos los fragmentos detectables tienen preferentemente una longitud dentro de un intervalo específico y solamente un número limitado de fragmentos se pueden detectar en una muestra, por lo tanto, la ventaja de la amplificación selectiva para la reducción de la proporción múltiplex por la selección de un subconjunto de los cebadores compuestos alargados en la etapa de amplificación, resulta en un subconjunto de amplicones.

Los procedimientos de la presente invención pueden ser llevados a cabo sobre dos o más muestras de ácido nucleico, cada una de las cuales contiene dos o más ácidos nucleicos diana distintos, para producir dos o más muestras amplificadas en las que se han analizado la presencia, ausencia o cantidad de amplicones.

El análisis múltiple de las muestras amplificadas siguiendo el procedimiento de la invención comprende la aplicación de, como mínimo, una parte de una muestra amplificadas a un dispositivo electroforético para subsiguiente separación y detección. Preferentemente, esta muestra amplificadas contiene, o por lo menos se sospecha que contiene, amplicones, lo que es una indicación de que una secuencia diana se ha hibridado con las sondas de oligonucleótidos facilitadas y que estas sondas se han reasociado de forma adyacente en la secuencia diana complementaria, de manera que están conectadas, es decir, ligadas. Como consecuencia, una muestra amplificadas es sometida a una etapa de separación durante un periodo de tiempo seleccionado antes de someter una siguiente muestra amplificadas.

En el procedimiento de la invención, se aplican de manera consecutiva (partes de) dos o más muestras amplificadas diferentes al mismo canal del dispositivo electroforético. Dependiendo de las condiciones de la electroforesis, el periodo de tiempo entre dos (o más) muestras amplificadas aplicadas consecutivamente es tal que se detectan en la localización de detección, los amplicones con migración más lenta en una muestra amplificadas, antes de que los amplicones de emigración más rápida de una muestra amplificadas aplicada de manera subsiguiente se detecten en la localización de detección. De este modo, los intervalos de tiempo entre subsiguientes inyecciones múltiples en un canal del dispositivo se escogen, de manera que muestras aplicadas consecutivamente después de la separación no se solapan en un punto de detección.

El procedimiento de acuerdo con la invención permite el análisis con elevada producción de una multiplicidad de muestras, cada una de las cuales comprende una multiplicidad de diferentes secuencias diana, por la inyección consecutiva de muestras amplificadas, comprendiendo amplicones que corresponden a las secuencias diana de las muestras, en un canal de un dispositivo electroforético multicanal, tal como un dispositivo de electroforesis capilar. El procedimiento de acuerdo con la invención permite el análisis de una multiplicidad de secuencias diana en una multiplicidad de muestras en una multiplicidad de canales, incrementando de esta manera significativamente la producción del número de muestras que se pueden analizar dentro de un tiempo determinado en comparación con procedimientos convencionales para el análisis de secuencias de nucleótidos. El procedimiento utiliza muestras que contienen amplicones a detectar que son de un rango de dimensiones discretas, dado que de esta forma el periodo de tiempo entre sucesivas inyecciones se puede reducir de manera significativa en comparación con procedimientos en los que no se utilizan muestras que contengan secuencias a detectar que no se encuentren dentro de un rango de dimensiones discretas.

El periodo de tiempo seleccionado impide que muestras aplicadas consecutivamente después de separación tengan un solape de amplicones en el punto de detección. El periodo de tiempo seleccionado está influido por i) la longitud de los amplicones; ii) la variación de longitud de los amplicones, y iii) el dispositivo de detección y sus condiciones de funcionamiento. La aplicación de muestras y la separación de muestras aplicadas consecutivamente en el mismo canal se puede llevar a cabo de forma repetida en uno o varios canales, preferentemente de forma simultánea para permitir la separación electroforética consecutiva de múltiples muestras en un canal y/o análisis simultáneo de múltiples muestras mediante canales múltiples y/o análisis múltiples de muestras múltiples sobre canales múltiples llevado a cabo consecutivamente.

El periodo de tiempo entre dos muestras amplificadas cargadas consecutivamente se puede determinar experimentalmente antes de llevar a cabo el procedimiento. Este periodo de tiempo es seleccionado de manera que, dado las características de una muestra amplificadas, especialmente la diferencia de longitud entre los amplicones más cortos y más largos en una muestra amplificadas, así como otros factores experimentales tales como concentraciones de gel (matriz) y/o concentraciones tampón, intensidad iónica, etc., los fragmentos de una muestra amplificadas son separados en una medida tal en la localización de detección, que está situada en el extremo opuesto (distal) con respecto a la localización de aplicación en la que se ha aplicado la muestra, que los diferentes amplicones de una muestra pueden ser detectados individualmente. Después de aplicar la última muestra amplificadas, la separación puede ser continuada durante un periodo de tiempo adicional para permitir la separación y detección de los amplicones de la última muestra. La combinación del periodo seleccionado de tiempo entre la aplicación de dos muestras consecutivas y el periodo de tiempo adicional opcional se escoge de manera que en la localización de detección se separan los diferentes amplicones de muestras aplicadas consecutivamente, de manera que pueden ser detectados individualmente, a pesar de la variación limitada de longitud que existe entre los diferentes amplicones con una muestra única. De esta manera, se impiden los modelos de emigración solapada cuando muestras que contienen fragmentos de longitud variable se aplican consecutivamente (se inyectan) en el dispositivo electroforético.

Utilizando el procedimiento según la invención en principio, es posible, y preferente el aplicar, cargar o inyectar muestras de manera continuada. Preferentemente, el dispositivo es capaz de llevar a cabo esta operación automáticamente, por ejemplo, controlado por un ordenador programable. Preferentemente, el dispositivo de canales múltiples es adecuado para esta operación, o por lo menos está equipado para un funcionamiento prolongado sin

mantenimiento, tal como sustitución de tampones, piezas, etc. No obstante, en la práctica este no será generalmente el caso. Cuando se somete una muestra final, se requiere, en general, continuar la separación durante un periodo de tiempo adicional, hasta que el último fragmento de la muestra final ha sido detectado.

5 En una realización preferente de la invención, los identificadores presentes tanto en el cebador compuesto y las segundas sondas de oligonucleótidos del conjunto de sondas se utilizan para proporcionar las diferencias de longitud (por ejemplo, de 0 a 500 nucleótidos, bases o pares de bases) entre los amplicones. La longitud total de los amplicones de la variación de la longitud es controlada principalmente por las técnicas mediante las que se analizan estos fragmentos. En el procedimiento de inyección múltiple de alto rendimiento de la presente invención, es
10 preferible que el rango de longitudes de amplicones en una muestra amplificada tenga un límite inferior de 40, 60, 80, o 100 y un límite superior de 120, 140, 160, o 180 nucleótidos, bases o pares de bases, para plataformas convencionales (capilares) de electroforesis. No obstante, estos números están fuertemente relacionados con los límites actuales de las técnicas actualmente conocidas. Basándose en el conocimiento facilitado por la presente invención, los técnicos en la materia serán capaces de adaptar estos parámetros cuando sean aplicables otras
15 circunstancias.

La fiabilidad de la amplificación múltiple se mejora adicionalmente limitando la variación en la longitud de los amplicones. La limitación de la variación de longitud de los amplicones es preferible a la utilización de inyección múltiple más eficientemente y resulta además en la reducción de la amplificación preferencial de pequeños
20 cebadores compuestos alargados en una reacción competitiva de amplificación con cebadores compuestos alargados más grandes. Esto mejora la fiabilidad del procedimiento de alta producción de la presente invención. Junto con el protocolo de inyección múltiple que se describe, estas medidas, solas o en combinación, proporcionan un incremento significativo de la producción en comparación con la técnica conocida. Otra mejora adicional de la capacidad de producción elevada se obtiene limitando el número de diferentes amplicones en una muestra. Se
25 considera más eficiente y económico limitar la capacidad múltiple de la etapa de ligado/amplificación en combinación con la introducción de un protocolo de inyección múltiple. Uno de los aspectos más ventajosos de la presente invención consiste en la combinación del conjunto innovador de sondas (incluyendo el cebador compuesto), ligado múltiple, amplificación múltiple, preferentemente con un primer juego único de cebadores o con múltiples juegos múltiples de cebadores, cada uno de los cuales amplifica múltiples cebadores compuestos
30 alargados, inyección repetida y detección múltiple de diferentes etiquetados, opcionalmente en combinación con cebado selectivo que permite la flexibilidad de proporción múltiple entre las etapas de ligado y amplificación. Uno de los aspectos ventajosos adicionales de la presente invención consiste en la aplicación combinada de diferencias de longitud con diferentes etiquetas (solapado), de manera que cada cebador compuesto alargado, y por lo tanto, cada secuencia diana dentro de una muestra se puede caracterizar por un amplicón que tiene una combinación
35 única de longitud y de etiqueta. Esto permite una mejora significativa de la eficiencia del análisis de secuencias diana y también una reducción significativa de los costes para cada diana analizada.

El protocolo de inyección múltiple se puede llevar a cabo en una serie de diferentes formas. Una de estas formas es la carga múltiple de dos o más muestras en la misma matriz. Esto se considera ventajoso dado que la matriz es
40 reutilizada llevando a cabo pasadas consecutivas cortas incrementando, por lo tanto, la eficiencia y el rendimiento. Otra forma es la carga múltiple de dos o más muestras en la misma matriz en la misma pasada. Es preferible reutilizar la matriz llevando a cabo pasadas consecutivas cortas. En esta realización, se inyecta una primera muestra y se separa. Tan pronto como se detecta el último fragmento, se carga la siguiente muestra. Preferentemente, entre estas dos cortas pasadas consecutivas, la matriz no es sustituida, de manera que las pasadas son llevadas a cabo
45 en la misma matriz. Esto facilita una eficiencia adicional y una economía mejorada, dado que se deben producir menos cambios de la matriz, reduciendo la cantidad de consumibles de este tipo de análisis (por ejemplo, tampones, etc.), reduciendo el coste por cada punto de datos. Además, se pueden evitar en gran medida las sustituciones de la matriz, que consumen mucho tiempo, incrementando adicionalmente la eficiencia del procedimiento.

50 En sí mismos, ciertos aspectos de cargas múltiples o inyecciones múltiples han sido descritos, entre otros, en los documentos US6156178 y WO 01/04618. Esta última publicación da a conocer un aparato y procedimiento para el análisis con producción aumentada de pequeños compuestos utilizando inyecciones múltiples separadas temporalmente. La publicación da a conocer qué muestras, que comprenden cebadores ampliados por un nucleótido (extensión de cebador de nucleótido único o SnuPE, conocido también como minisequenciado) se podrían detectar
55 utilizando inyecciones múltiples separadas temporalmente en un dispositivo electroforético capilar. El minisequenciado se basa en la reasociación de un cebador complementario a una secuencia diana amplificada previamente. La subsiguiente extensión del cebador con un nucleótido etiquetado facilitado separadamente proporciona la identificación del nucleótido adyacente al cebador. Principalmente, el producto de extensión del cebador es de longitud constante. Para incrementar la producción se sugiere la utilización de inyecciones sucesivas de productos de extensión de la misma longitud por pasada. Para aumentar adicionalmente la producción, se
60 pueden utilizar cebadores de diferente longitud variando de manera típica de 15 a 25 nucleótidos. Como contraste, la presente invención prevé el análisis de productos de amplificación multiplex directamente con una variación de longitud típicamente entre 50 y 150 nucleótidos. Esto es significativamente más económico que el minisequenciado o SnuPE tal como se ha indicado anteriormente porque múltiples secuencias diana son amplificadas en una reacción
65 única, mientras que con el minisequenciado o SnuPE, la amplificación es llevada a cabo individualmente para cada secuencia diana. Además, la utilización de cebadores de diferente longitud y complementarios de la secuencia diana

pone en compromiso la eficiencia de la etapa de amplificación requerida en el procedimiento de la presente invención.

La eficiencia de la presente invención se puede ilustrar del modo siguiente. Cuando se utiliza un dispositivo electroforético capilar con 96 canales y capaz de detectar cuatro etiquetas simultáneamente, permitiendo 12 inyecciones subsiguientes por pasada por canal, son un periodo de tiempo seleccionado mínimo optimizado empíricamente entre las inyecciones, una muestra que contiene 20 secuencias diana de interés permite la detección de alta producción de $96 \text{ (canales)} * 12 \text{ (inyecciones)} * 20 \text{ (dianas)} * 4 \text{ (etiquetas)} = 92160$ secuencias diana utilizando el procedimiento de la presente invención. En el caso de detección de SNP co-dominante, se pueden detectar en una sola pasada 46080 SNP.

Escalera de dimensiones

La muestra puede ser suministrada con un patrón de dimensión de fragmentos de nucleótidos que comprende uno o varios nucleótidos de longitud conocida. Los procedimientos para la preparación y utilización de patrones de dimensión de nucleótidos son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook y Russell, 2001, mención anterior). Este patrón de dimensión forma la base para dimensionado apropiado de los amplicones en la muestra y, por lo tanto, para la identificación apropiada del fragmento detectado. El patrón de dimensión es suministrado preferentemente con cada muestra y/o con cada inyección. Un patrón de dimensión contiene preferentemente una serie de longitudes que preferentemente abarca toda la región de longitudes a analizar. En una realización específica de la presente invención, se considera ventajoso añadir patrones de dimensión adyacentes de las que se pueden deducir por interpolación las dimensiones de los amplicones. Un patrón de dimensiones adyacente es un patrón de dimensiones que comprende, como mínimo, dos secuencias de oligonucleótidos etiquetadas, de las que preferentemente una tiene una longitud que es, como mínimo, una base más corta que el amplicón más corto, y preferentemente, una que es como mínimo, una base más larga que el amplicón más largo para permitir la interpolación y minimizar la introducción de variación adicional de longitud en la muestra. Un patrón de dimensiones limitativos ("flanking") preferente contiene un nucleótido que es un nucleótido más corto que el amplicón más corto, y uno que es, como mínimo una base más largo que el amplicón más largo, y que está etiquetado, como mínimo con un tinte idéntico a la etiqueta utilizada para el etiquetado de los amplicones contenidos en la muestra.

Una forma conveniente de ensamblar un patrón de dimensiones adecuado es por síntesis química (especializada) de oligonucleótidos de las longitudes apropiadas, que se etiquetan en el extremo con una etiqueta adecuada. El patrón de dimensión es aplicado con cada muestra aplicada consecutivamente para servir como referencias de tamaños locales para dimensionar los fragmentos de muestra cargados. El patrón de dimensión puede ser aplicado en el mismo canal o vía que el dispositivo electroforético, igual que la muestra a analizar, es decir, conjuntamente con la muestra, o se puede aplicar en un canal paralelo o vía paralela de un dispositivo de canales/vías múltiples. El patrón de dimensión adyacente puede ser etiquetado con cualquiera de las etiquetas utilizadas en el procedimiento. Si se aplica el patrón de dimensión en el mismo canal del dispositivo, los fragmentos del patrón son etiquetados preferentemente con una etiqueta que se puede distinguir de las etiquetas utilizadas para la detección de los amplicones de una muestra.

Detección basada en la secuencia

Son ejemplos de plataformas de detección basadas en la secuencia, microconjuntos de fase sólida y de fase líquida. Preferentemente, se utilizan conjuntos direccionables de modo único en los que la sonda contiene una secuencia única (tal como una secuencia ZIP), proporcionando de esta manera que el amplicón hibride en un punto predeterminado en el conjunto en el que está situada la secuencia complementaria ZIP (cZIP). Los procedimientos de detección basados en conjuntos son habituales en la actualidad y la tecnología se ha extendido ampliamente, permitiendo al técnico en la materia crear un conjunto adecuado para la detección de los amplicones de la presente invención. Son ejemplos adecuados de procedimientos de detección basados en conjuntos, por ejemplo, WO 97/27317, WO 97/22720, WO 97/43450, EP 0 799 897, EP 0 785 280, WO 97/31256, WO 97/27317, WO 98/08083, y el conjunto Genechips, el chip de ADN Affymetrix y el conjunto VLSIPSTM. Son plataformas de detección adecuadas muy preferibles de manera específica para el ensayo de la presente invención los conjuntos descritos, entre otros, en W09902266, EP1050588, W00119517, W002072263, W002072268, W002072266, los llamados conjuntos Pam.

Detección basada en masa

Un ejemplo de las plataformas basadas en masa es MALDI-TOF. Los analitos a detectar tienen cada uno de ellos una masa diferente. Esto se puede conseguir, por ejemplo, por la incorporación de una secuencia identificadora que comprende un lugar de restricción en la segunda sonda o en el cebador compuesto. Cuando los cebadores compuestos alargados son restringidos antes de detección (opcionalmente después de amplificación), se obtiene un conjunto de fragmentos/oligonucleótidos, cada uno de los cuales tiene una masa diferencia que se asocia con la presencia, ausencia o la cantidad de una secuencia diana en la muestra.

Una realización de la invención que utilice detección basada en masa se refiere a un procedimiento para determinar la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia diana en una muestra de ácido nucleico, de manera que se determina la presencia, ausencia o cantidad de la secuencia diana por un ensayo de ligado de un oligonucleótido en combinación con un procedimiento de detección basado en masa molecular, y en el que cada secuencia diana de la muestra está representada por un identificador y la detección de las secuencias diana se basan en la detección de la presencia o ausencia de un fragmento que comprende dicho identificador. Este procedimiento se da a conocer también en el documento W003/030163 por el solicitante.

En ciertas realizaciones, la invención corresponde a un procedimiento para determinar la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia de nucleótido diana en una muestra de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

a) proporcionar a una muestra de ácido nucleico, como mínimo, una primera sonda para cada secuencia diana a detectar en la muestra, de manera que la primera sonda tiene una primera sección diana específica que es complementaria de una primera parte de la secuencia diana y, como mínimo, una segunda sonda para cada secuencia diana a detectar en la muestra, de manera que la segunda sonda tiene una segunda sección específica diana que es complementaria de una segunda parte de la secuencia diana, de manera que la primera y la segunda partes de la secuencia diana están situadas adyacentes entre sí, y de manera que la segunda sonda comprende además una sección de etiqueta que es esencialmente no complementaria de la secuencia diana, de manera que la sección de etiqueta comprende una primera secuencia de unión de cebador;

b) permitir que la primera y segunda secciones específicas diana de la primera y segunda sondas se reasocian con la primera y segunda partes de secuencias diana de manera que la primera y segunda secciones específicas diana de las sondas se realineen de forma adyacente en la secuencia diana;

c) proporcionar medios para conectar la primera y segunda secciones específicas diana reasociadas de forma adyacente a la secuencia diana y permitir que la primera y segunda secciones específicas diana queden conectadas, para producir una sonda conectada que corresponde a una secuencia diana de la muestra;

d) proporcionar a la mezcla resultante de la etapa c) un cebador compuesto que comprende una sección complementaria, como mínimo a una parte de la primera sección específica diana y una segunda sección de unión de cebador;

e) permitir que el cebador compuesto se reasocie, como mínimo, a una parte de la primera sección específica diana;

f) alargar el cebador compuesto;

g) proporcionar un conjunto de cebadores que comprenden un primer cebador que tiene una secuencia esencialmente idéntica a la primera sección de unión de cebador, y un segundo cebador que es complementario de la segunda sección de unión de cebador;

h) amplificar la muestra resultante para producir una muestra amplificada que comprende amplicones que son representaciones de las sondas conectadas;

i) determinar la presencia, ausencia o cantidad de secuencia diana en una muestra detectando la presencia, ausencia o cantidad del amplicón correspondiente;

en el que, como mínimo, uno de dichos cebador compuesto y segunda sonda de oligonucleótidos comprende adicionalmente un lugar de restricción para una enzima de restricción, cuyo lugar de restricción está situado entre el correspondiente lugar de unión de cebador y la sección de la sonda de oligonucleótidos que es complementaria de la primera sonda o de la segunda parte de la secuencia diana respectivamente, y en el que un identificador está situado entre el lugar de restricción y el lugar de unión a cebador, y en el que el procedimiento comprende además la etapa de digerir los amplicones con la enzima de restricción para producir un fragmento detectable antes de la etapa i).

Los amplicones son segmentados o cortados. La segmentación de los amplicones se puede conseguir por cualquier medio adecuado conocido en la técnica, siempre que se obtengan cadenas de nucleótidos segmentadas o cortadas reproducibles. El término reproducible se refiere a este respecto a la preferencia de que los medios para segmentar o cortar la secuencia de nucleótido en la misma posición en la secuencia de los amplicones. Los medios para segmentar los amplicones pueden ser químicos o enzimáticos, pero son preferentemente enzimáticos, tal como una enzima de restricción. Una enzima de restricción preferente es una endonucleasa de restricción. Un amplicón es segmentado preferentemente por la enzima de restricción en el lugar de restricción facilitado en la etiqueta de la segunda sonda o en el cebador compuesto entre el lugar de unión del cebador y la sección complementaria a la

primera sección específica diana. La segmentación de los amplicones produce o bien extremos romos en los que los nucleótidos terminales de ambas cadenas resultantes de la etapa de restricción son apareados, o extremos desplazados ("staggered") en los que uno de los extremos resultantes de la etapa de restricción sobresale facilitando una (corta) extensión única de la cadena. Preferentemente, el lugar de restricción es reconocido por una endonucleasa de restricción específica de la secuencia. En principio, se pueden utilizar cualesquiera endonucleasas de restricción conocidas en la técnica, siempre que produzcan un corte reproducible. La segmentación de amplicones en la muestra tiene como resultado un fragmento detectable. En ciertas realizaciones, se prevén oligonucleótidos adicionales para crear ácidos nucleicos de doble cadena que se puedan segmentar por la enzima de restricción.

Las endonucleasas de restricción son ampliamente conocidas en la técnica, una enzima de restricción adecuada puede tener una secuencia de reconocimiento de 4, 5, 6, 7, o 8 o más nucleótidos. Preferentemente, la endonucleasa de restricción es un cortador raro, (es decir, tiene una secuencia de reconocimiento de más de 4 nucleótidos). Preferentemente, la enzima de restricción es un tipo de enzima II o un tipo de enzima IIs. Las enzimas de restricción preferentes son EcoRI, HindIII, BamHI. Otras enzimas de restricción preferentes son enzimas de restricción de 6 cortadores, preferentemente 6- cortadores que son relativamente económicos.

La digestión de amplicones en la etapa (e), por ejemplo, con endonucleasas de restricción, tienen como resultado fragmentos detectables (comprendiendo la secuencia identificadora) y los restos de los amplicones (fragmentos sobrantes). Los fragmentos sobrantes comprenden parte del cebador compuesto alargado. La digestión con una endonucleasa de restricción tiene como resultado un fragmento detectable que es de doble cadena. Tanto los fragmentos detectables como los fragmentos sobrantes consisten en dos cadenas, una designada como cadena superior y la otra como cadena inferior. El fragmento detectable puede ser sometido a desnaturalización en un tratamiento para conseguir la cadena inferior y la cadena superior separadas. La cadena inferior es esencialmente complementaria de la cadena superior, es decir, la parte más larga de la secuencia de nucleótidos de la cadena superior y la cadena inferior son complementarias, a excepción de los nucleótidos que forman parte de un extremo desplazado ("staggered") o extremo adhesivo ("sticky"), esencialmente tal como se ha descrito anteriormente. Se pueden detectar la cadena superior o la cadena inferior, o tanto la cadena superior como la cadena inferior.

La detección se basa en la detección de la presencia, ausencia o cantidad del fragmento detectable. La detección del fragmento detectable es preferentemente indicativa de la presencia, ausencia o cantidad de los amplicones en la muestra amplificada y, por lo tanto, de la secuencia de nucleótidos diana de la muestra de ácido nucleico. Preferentemente, la detección se basa en la detección de la cadena superior y/o inferior del fragmento detectable. La detección de la cadena inferior, además de la cadena superior, tiene la ventaja de que se obtiene por duplicado la confirmación de la presencia, ausencia o cantidad de la secuencia diana.

La detección puede ser llevada a cabo directamente en la muestra digerida, pero es preferible que, antes de la detección, el fragmento detectable sea aislado, purificado o separado de las sondas conectadas amplificadas digeridas. El fragmento detectable puede ser aislado, purificado o separado de los amplicones digeridos por medios conocidos en la técnica, tales como purificación de columna giratoria ("spin"), purificación de fase inversa o, preferentemente, por técnicas de etiquetado de afinidad tales como combinación biotina - streptavidina, combinada con un portador adecuado tal como partículas magnéticas, bastones de sonda, retirada basada en hibridación, etc. Aislamiento, purificación o separación se pueden llevar a cabo también después de un tratamiento de desnaturalización en las cadenas superior y/o inferior.

El fragmento detectable es etiquetado preferentemente con una etiqueta de afinidad. La etiqueta de afinidad está situada preferentemente en el extremo del fragmento detectable, situado distalmente desde el lugar de restricción o, después de digestión, los restos del lugar de restricción. La cadena superior y/o la cadena inferior del fragmento detectable se pueden equipar con la etiqueta de afinidad. Preferentemente, es la cadena inferior la que comprende la etiqueta de afinidad y la secuencia identificadora. El concepto de cadena superior se utiliza en general para indicar que la secuencia de nucleótido de la cadena superior corresponde, por lo menos en parte, a la región de la etiqueta que comprende el identificador, el lugar de restricción y el lugar de unión de cebador, es decir, la cadena superior contiene una secuencia de nucleótido que es esencialmente idéntica a la de la sonda. La cadena inferior es la cadena complementaria de la cadena superior y se obtiene después de una primera ronda de amplificación por extensión de un cebador complementario del lugar de unión de cebador en la cadena superior, y cuyo cebador está dotado preferentemente de una etiqueta de afinidad. De acuerdo con ello, la cadena inferior contiene una secuencia que corresponde a la secuencia de nucleótido de uno de los cebadores. En una realización específica preferente, la cadena inferior está dotada de la etiqueta de afinidad. Preferentemente, la cadena inferior es aislada de la muestra que comprende fragmentos detectables desnaturalizados, preferentemente por la etiqueta de afinidad. Preferentemente, es la cadena inferior la que es detectada utilizando espectrometría de masas. Por lo tanto, la detección de la cadena inferior proporciona la información relativa a la presencia o ausencia de la cadena de nucleótido diana correspondiente.

La etiqueta de afinidad puede ser utilizada para el aislamiento de la cadena superior y/o inferior a partir de la mezcla de amplicones digeridos. Como etiqueta de afinidad, es preferible una combinación de biotina - streptavidina. La

cadena superior etiquetada por afinidad, la cadena inferior o fragmento detectable pueden ser detectadas subsiguientemente utilizando técnicas de detección basadas en masa molecular

5 Tal como se ha utilizado en esta descripción, el término etiqueta de afinidad comprende también etiquetas de afinidad que son acopladas a través de los llamados "enlazadores" (que tienen una determinada masa molecular) situados entre la secuencia de nucleótidos de la etiqueta y la verdadera etiqueta de afinidad.

10 En una realización alternativa, la etiqueta de afinidad se dispone en la etiqueta que no comprende la combinación del lugar de restricción - identificador. Esto permite el aislamiento de los amplicones antes de la etapa de digestión. La mezcla resultante, después de restricción y de desnaturalización opcional puede ser directamente analizada utilizando espectrometría de masas. Dado que la masa de los fragmentos detectables, o de las cadenas superior o inferior, es conocida o como mínimo puede ser calculada, los fragmentos sobrantes, es decir, los restos de las sondas conectadas amplificadas digeridas), no comprometen significativamente la detección dado que los fragmentos detectables, y tanto la cadena superior como la cadena inferior, se encuentran dentro de un rango conocido y una masa diferente.

15 Las técnicas de detección basadas en masa molecular son, por ejemplo, espectrometría de masas y más en particular las técnicas de espectrometría de masas adecuadas para la detección de moléculas grandes tales como oligonucleótidos. Son ejemplos de estas técnicas la llamada "tiempo de vuelo" ("time-of-flight") desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF), HPLC-MS, GC-MS, etcétera. Habitualmente, las técnicas de detección basadas en masa molecular prefieren que las muestras sometidas contengan oligonucleótidos en forma de una sola cadena. En caso de que el fragmento detectable haya sido aislado como oligonucleótido de doble cadena, el fragmento detectable es preferentemente desnaturalizado utilizando técnicas conocidas en este sector para facilitar oligonucleótidos de cadena única, por ejemplo, tal como los que se describen en esta descripción como cadenas superior y/o inferior.

20 Después de digestión con una endonucleasa de restricción, el fragmento detectable obtenido comprende preferentemente un identificador, restos del sitio de restricción, si existen, y el sitio de unión de cebador. Opcionalmente, un marcador de afinidad puede ser acoplado a la cadena superior y/o inferior, opcionalmente a través de un enlazador. La masa a detectar es, por lo tanto, la suma de la masa molecular del lugar de unión de cebador, el identificador, los restos del lugar de restricción y la etiqueta de afinidad opcional y enlazador opcional.

25 Para distinguir entre secuencias objetivo distintas en una muestra de ácido nucleico, los fragmentos detectables se designan de manera tal que un fragmento detectable que corresponde a una secuencia diana de la muestra difiere en masa con respecto a un fragmento detectable que corresponde a otra secuencia diana de la muestra. De acuerdo con ello, una muestra que comprende múltiples secuencias diana comprende (después de ligado, amplificación y digestión) múltiples fragmentos detectables, cada uno de dichos fragmentos detectables con una masa distinta. Después de desnaturalización de los fragmentos detectables en las respectivas cadenas superior e inferior, las diferentes cadenas superiores tienen cada una de ellas una masa distinta. De modo similar, las diferentes cadenas inferiores tienen cada una de ellas masa distinta. Preferentemente, la diferencia de masa entre dos fragmentos detectables diferentes (y por lo tanto, entre dos cadenas superior o inferior, respectivamente) es facilitada por la diferencia de masa del identificador.

30 La cadena superior o la cadena inferior se pueden considerar que comprenden una sección constante y una sección variable. La sección constante comprende el lugar de unión de cebador, la etiqueta de afinidad opcional (incluyendo el enlazador opcional) y los restos del lugar de restricción. La sección variable comprende el identificador. La sección constante es constante dentro de una muestra y es de masa constante. La sección variable proporciona preferentemente la diferencia de masa entre cadenas que corresponden a diferentes nucleótidos diana de una muestra.

35 En una realización de la presente invención, el fragmento detectable (y como consecuencia) las sondas de oligonucleótido se diseñan de manera que la sección constante también varía de masa. Esto permite la creación de múltiples regiones dentro de un espectro de masa. Cada región tendrá un límite inferior y un límite superior, definiendo de esta manera una ventana. El límite inferior de la ventana se define por la masa de la secuencia constante. Utilizando diferentes secuencias constantes se pueden definir regiones diferentes. Preferentemente, estas regiones no se solapan. Dentro de una región, la diferencia de masa entre los oligonucleótidos a detectar es creada por la diferencia de masa entre los identificadores, esencialmente como se ha descrito anteriormente. El límite superior de la región es, como mínimo, la suma del límite inferior de la región y el identificador con la masa más grande. Por ejemplo, dos secciones constantes tiene una masa de 6489 Dalton y 8214, Dalton, respectivamente. Las secuencias identificadores de hasta dos nucleótidos proporcionan 15 combinaciones diferentes (incluyendo la ausencia de un identificador, por lo tanto, masa 0), cada uno con un peso molecular distinto comprendido desde 0 hasta 642 (AG o GA). Esto permite dos regiones, una comprendida desde 6489 Dalton a 7131 Dalton y otra región comprendida desde 8214 Dalton a 8856 Dalton. Esto permite un incremento de la capacidad multiplex de la presente invención. Esto permite también la reunión de muestras antes del análisis de masas. En
40
45
50
55
60
65 ambos casos aumentará la elevada capacidad de producción de la presente invención.

Para diseñar identificadores que puedan ser utilizados en las sondas de la presente invención y que sean capaces de proporcionar una masa única a cada fragmento detectable y, por lo tanto, a la cadena superior o la cadena inferior de la muestra, los identificadores tienen que cumplir preferentemente los siguientes requerimientos: i) un número limitado de bases consecutivas idénticas para evitar deslizamiento de la polimerasa durante la etapa de amplificación; ii) sin lugar de reconocimiento interno para la enzima de restricción; iii) mínima diferencia de masa para asegurar resolución adecuada; iv) sin formación de horquillas, por ejemplo, con otras partes de las sondas de ligado, por ejemplo, debido a hibridación intramolecular.

Los identificadores adecuados para su utilización en la invención pueden ser diseñados utilizando un procedimiento que computa todas las posibles secuencias de identificador hasta una longitud predeterminada y que cumplen los criterios anteriormente indicados (i-iv). Este procedimiento puede ser llevado a cabo utilizando un programa de ordenador en un ordenador. Este procedimiento puede ser considerado como una invención en sí mismo. El programa de ordenador puede ser facilitado sobre un soporte de datos separado, tal como un disquete. El procedimiento empieza con la disposición del límite superior de longitud de la secuencia identificadora. A continuación, el procedimiento calcula todas las posibles permutaciones de secuencias de nucleótidos, y a través de un proceso de eliminación y selección, aplica los criterios i-iii que se han indicado anteriormente. El número de bases consecutivas permisibles se puede disponer separadamente o se puede predeterminar. El lugar de reconocimiento para la enzima de restricción se puede disponer como entrada separada, pero también se puede deducir de una base de datos de lugares de reconocimiento conocidos para la enzima de restricción, dependiendo de si se permite o no la presencia de secuencias de reconocimiento de otras enzimas de restricción. La diferencia de masa mínima puede ser también facilitada como entrada separada o como parámetro predeterminado. La formación de horquillas se puede comprobar utilizando un programa de selección estándar cebador PCR, tal como la versión Primer Designer 2.0 (copyright 1990, 1991, Scientific and Educational software). Las secuencias identificadoras resultantes pueden ser presentadas al usuario en un formato adecuado, por ejemplo, en un soporte de datos.

El procedimiento de acuerdo con la invención permite el análisis de múltiples secuencias diana incrementando de esta manera significativamente la producción del número de muestras que se pueden analizar. El término "producción", tal como se utiliza en esta descripción, define un parámetro relativo que indica el número de muestras y secuencias diana que se pueden analizar por unidad de tiempo.

Acumulación

En una variante de la tecnología, el material inicial (ADN) de múltiples individuos es cargado, de manera que se cargan en el dispositivo de detección menos muestras de detección que contienen este material. Esto puede ser ventajoso en el caso de Desequilibrio de Enlace ("Linkage Disequilibrium") (mapeado LD) cuando el objetivo consiste en identificar amplicones (tales como los que representan alelos de SNP), que son específicos para una acumulación específica de muestras iniciales, por ejemplo, acumulaciones de material inicial derivado de individuos que tienen diferentes fenotipos para un rasgo particular.

Aplicación

Un aspecto de la invención corresponde a la utilización del procedimiento en una serie de aplicaciones. Se encuentra la aplicación del procedimiento según la invención, sin que ello sea limitativo, en técnicas tales como genotipado, perfilado de transcripción, mapeado genético, descubrimiento genético, selección asistida de marcador, control de calidad de simiente, selección de híbrido, mapeado de QTL, análisis segregante en masa ("bulk segregant analysis"), toma de huellas de ADN y análisis de microsatélite. Otro aspecto corresponde a la detección simultánea de alta producción de la abundancia cuantitativa de secuencias de ácidos nucleicos diana. Este enfoque es conocido comúnmente como Análisis Segregante en Masa ("Bulk Segregant Analysis (BSA)").

Detección de polimorfismos de nucleótido único

Una aplicación particular preferente del procedimiento según la invención, se halla en la detección de polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP). Una primera sonda de oligonucleótidos (preferentemente la primera sonda) del par de acuerdo con la invención comprende una parte que es complementaria de una parte de la secuencia diana que está situada preferentemente adyacente al lugar polimórfico, es decir, el nucleótido polimórfico único. Una segunda sonda de oligonucleótidos (preferentemente la segunda sonda) del par según la invención es complementaria de la parte de la secuencia diana de manera que su base terminal está situada en el lugar polimórfico, es decir, es complementaria del nucleótido polimórfico único. Si la base terminal complementaria del nucleótido presente en el lugar polimórfico en una secuencia diana, se reasociará con la secuencia diana y resultará en el ligado de las dos sondas. Cuando el nucleótido final, es decir, el nucleótido específico del alelo no se corresponde, no tendrá ligado o solamente un bajo nivel de ligado, y el polimorfismo permanecerá sin detectar.

Cuando una de las secuencias diana de la muestra se deriva de un polimorfismo de nucleótido único (SNP) o lo contiene, además de las sondas específicas para dicho alelo, se pueden disponer otras sondas que no solamente permiten la identificación de dicho alelo, sino que sirven también para la identificación de cada uno de los posibles alelos del SNP (calificación co-dominante). Con esta finalidad, se puede facilitar una combinación de tipos de

sondas: un tipo de sonda que es igual para todos los alelos en cuestión y uno o varios del otro tipo de sonda que es específica para cada uno de los alelos posibles. Estos uno o varios otros tipos de sondas contienen la misma secuencia complementaria, pero difieren porque cada una contiene un nucleótido, preferentemente al final, que corresponde al alelo específico. La sonda específica del alelo se puede facilitar en un número correspondiente al número de diferentes alelos esperados. El resultado es que se puede caracterizar un SNP por la combinación de un tipo de sonda con otros cuatro tipos de sondas (específicas de alelo) identificando los cuatro alelos posibles teóricamente (uno para A, T, C, y G), por incorporación de secuencias identificadoras de diferentes longitudes (preferente) o diferentes etiquetas en las sondas específicas de alelo.

En ciertas realizaciones, el cebador compuesto puede ser diseñado de manera que abarca el punto de ligado y, por lo tanto, identifica el alelo del SNP.

En una realización específica, preferentemente dirigida a la identificación de polimorfismos de nucleótido único, la primera sonda de oligonucleótidos del conjunto según la invención está dirigida a una parte de la secuencia diana que no contiene el lugar polimórfico, y la segunda sonda de oligonucleótido del par según la invención contiene preferentemente en el extremo distal de la sección de unión de cebador, uno o varios nucleótidos complementarios del sitio polimórfico de interés. Después de ligado de las sondas adyacentes, la sonda conectada es específica para uno de los alelos de un único polimorfismo de nucleótidos. Para identificar el alelo del sitio polimórfico en la secuencia diana se puede disponer un par de sondas de oligonucleótidos, de manera que una es una primera sonda y una o varias son segundas sondas (en este caso, el par de sondas puede contener más de dos sondas). Cada segunda sonda contiene entonces un nucleótido específico al final de la secuencia complementaria, preferentemente en el extremo 3', en combinación con una longitud conocida del identificador. Por ejemplo, en caso de un polimorfismo A/C, la segunda sonda puede contener un nucleótido específico T en combinación con una longitud de identificador de un polimorfismo A/C, la segunda sonda puede contener un nucleótido específico T en combinación con una longitud del identificador de 2 nucleótidos, y otra segunda sonda para este polimorfismo combina un nucleótido específico G con una longitud de identificador de 0. Dado que los cebadores y las partes complementarias del cebador compuesto tienen preferentemente la misma longitud, esto crea una diferencia de longitud de los amplicones resultantes de 2 nucleótidos. En caso de que se desee la presencia y/o ausencia de todos los cuatro nucleótidos teóricamente posibles del sitio polimórfico, la combinación de nucleótidos específica del identificador se puede adaptar de acuerdo con ello. En esta realización, se puede considerar que la información específica de lugar está acoplada a la longitud del identificador en el cebador compuesto y la información específica de alelo del sitio polimórfico está acoplada a la longitud del segundo identificador. La longitud combinada de los dos identificadores se puede apreciar como indicativo de la combinación lugar-alelo. La longitud combinada de los dos identificadores puede ser apreciada como indicativa de la combinación lugar-alelo. En una muestra que contiene múltiples secuencias diana, amplificadas con el mismo conjunto de cebadores de amplificación (y por lo tanto, etiqueta) o con múltiples conjuntos de cebadores de amplificación con etiquetas que tienen espectros de emisión solapados, las longitudes del identificador combinado se escogen de manera que todos los cebadores compuestos alargados son de una longitud única. En una realización preferente, este principio puede ser ampliado a, como mínimo, diez lugares con, como mínimo, dos alelos por lugar. Otra ventaja de utilizar dos identificadores, uno en la segunda sonda y uno en el cebador compuesto, es que al incorporar la mayor parte de la longitud del identificador en el cebador compuesto (es decir, la sonda específica de lugar), las sondas específicas de alelo pueden permanecer más cortas, es decir, el número mínimo de bases suficiente para discriminación entre las sondas específicas de alelo, lo cual ahorra costes. La incorporación de la secuencia identificadora completa en la sonda específica de alelo requeriría la síntesis de la mayor parte de la secuencia del identificador dos veces.

Detección de secuencia diana específica

La secuencia diana contiene una secuencia de nucleótidos conocida derivada de un genoma. Esta secuencia no contiene necesariamente un polimorfismo, pero es, por ejemplo, específica de un gen, un promotor, un segmento de introgresión o un transgen o contiene información respecto a un rasgo de producción, resistencia a la enfermedad, rendimiento, vigor híbrido, indicativa de tumores u otras enfermedades y/o función de gen en humanos, animales y plantas. Con este objetivo, las partes complementarias de la primera sonda y la segunda sonda se diseñan para corresponder a una secuencia diana del genoma, preferentemente única, asociada con la información deseada. Las partes complementarias de la secuencia diana están situadas adyacentes entre sí. En el caso de que la secuencia diana deseada se encuentre presente en la muestra, las dos sondas se reasociarán de forma adyacente, y después de ello se puede detectar la reasociación de ligado y el alargamiento del cebador compuesto y la amplificación.

Detección de marcadores AFLP

AFLP, su aplicación y tecnología se describen en Vos y otros, Nucleic Acids Research, vol. 23, (1995), 4407-4414 así como en los documentos EP-A 0 534 858 y US 6045994. Para descripción adicional de AFLP, sus ventajas, sus realizaciones, técnicas, enzimas, adaptadores, cebadores y otros compuestos, herramientas y definiciones utilizadas, se hace referencia explícita a los tramos relevantes de las publicaciones mencionadas anteriormente con respecto a AFLP. AFLP y su tecnología relacionada es una ponderosa técnica de huella dactilar de ADN para la identificación de, por ejemplo, marcadores genéticos específicos (los llamados, marcadores AFLP) que pueden ser indicativos de la presencia de ciertos genes o rasgos genéticos o pueden, en general, ser utilizados para comparar

muestras de ADN, ADNc o ARN de origen o modelo de restricción conocidos. Los marcadores AFLP están asociados en general con la presencia de sitios polimórficos en una secuencia de nucleótidos a analizar. Dicho polimorfismo puede encontrarse presente en el sitio de restricción, en los nucleótidos selectivos, por ejemplo, en forma de indelos o sustituciones, o en el resto del fragmento de restricción, por ejemplo, en forma de indelos o sustituciones. Una vez se ha identificado un etiquetador AFLP como tal, el polimorfismo asociado con la etiqueta de AFLP puede ser identificado y se pueden desarrollar sondas para su utilización en el ensayo de ligado de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una primera sonda de ácido nucléico que comprende y consiste preferentemente en una parte que es capaz de hibridar a una primera parte de una secuencia diana. La invención se refiere también a una segunda sonda de ácido nucléico que comprende una parte capaz de hibridar a una segunda parte de la secuencia diana y, preferentemente, comprende una secuencia de unión a cebador y/o un identificador. La invención se refiere también a un par de sondas, preferentemente comprendiendo una primera y segunda sonda. La invención se refiere además a un cebador compuesto que comprende una sección que es capaz de reasociarse a parte de la primera sonda, y comprendiendo, preferentemente, una secuencia de unión a cebador y/o un identificador. La invención se refiere también a un conjunto de sondas, comprendiendo preferentemente un cebador compuesto, una primera y segunda sonda.

La invención se refiere en otro aspecto a la utilización de un par de sondas o un conjunto de sondas en el análisis de, por lo menos, una secuencia de nucleótidos y preferentemente en la detección de un único polimorfismo de nucleótidos, de manera que el par o conjunto comprende además, como mínimo, una sonda adicional que contiene un nucleótido que es complementario del alelo conocido SNP. Preferentemente, el par o conjunto comprende una sonda para cada alelo de un polimorfismo de nucleótidos único específico. La utilización de un par o conjunto de sondas es preferible adicionalmente en un procedimiento para la detección de alta producción de polimorfismos de nucleótidos únicos, en el que la longitud del primer identificador de la primera sonda es específica para un lugar de un único polimorfismo de nucleótidos y la longitud o la presencia del segundo identificador en la segunda sonda es específica para un alelo del polimorfismo de nucleótidos único.

Otro aspecto de la invención se refiere a los cebadores, y más en particular al conjunto de cebadores que comprende un primer y un segundo o varios segundos cebadores, en el que cada segundo cebador contiene una etiqueta, y cuyo segundo cebador comprende una secuencia de nucleótidos que es específica para dicha etiqueta.

La presente invención comprende también realizaciones en forma de kits. Los kits de acuerdo con la invención son, por ejemplo, kits que comprenden sondas (pares de sondas o conjuntos de sondas) adecuadas para su utilización en el procedimiento, así como un kit que comprende cebadores o conjuntos de cebadores, además, un kit combinación que comprende cebadores y sondas, preferentemente todos ellos equipados con tampones de enzimas, etcétera, comprendidos en la presente invención.

La invención se refiere también a la utilización de un par de conjuntos de sondas o dos o más pares o conjuntos de sondas, según la invención, para la detección o determinación de la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia diana en, como mínimo, una muestra.

Descripción de las figuras

Figura 1: Representación esquemática del procedimiento de la invención. Una secuencia diana T de una muestra es llevada a contacto de hibridación con una primera sonda 1 y una segunda sonda 2. La primera sonda contiene una primera sección 4 específica diana que es complementaria de una primera parte de la secuencia diana 5. La segunda sonda comprende una segunda sección 6 específica diana que es complementaria de una segunda parte de la secuencia diana 7. La segunda sonda comprende además una sección de etiqueta 8 que comprende una primera secuencia 10 de unión a cebador. Finalmente, la sección de etiqueta comprende una secuencia identificadora 9 situada entre la primera sección de unión y la segunda sección específica diana. Se dispone un cebador compuesto 12, que comprende una sección que es complementaria, como mínimo de una parte, de la primera sección 15 específica diana, y que comprende además una sección 14 de unión a cebador y, opcionalmente, una segunda sección 13 de identificadores. Cuando las sondas son ligadas para formar una sonda conectada 11, el cebador compuesto 12 es llevado a contacto de hibridación con la sonda conectada, preferentemente después de desnaturalizar el dúplex de la sonda conectada y la secuencia diana. El cebador compuesto hibridado es alargado según una polimerasa y varios dNTP para formar un cebador compuesto alargado 16. El cebador compuesto alargado es llevado, a continuación, a establecer contacto con los juegos de cebadores 17, 18 y es amplificado para proporcionar amplicones 19 que pueden ser detectados.

Figura 2: Representación esquemática de las realizaciones en las que el cebador compuesto es alargado en su extremo 3'.

Figura 3A y 3B: Representación esquemática de una realización en la que el cebador compuesto se reasocia con la primera sonda y una realización en la que el cebador compuesto se reasocia a través del punto de ligado a la primera y segunda sondas, creando una etapa adicional de discriminación.

Figura 4A: muestra la realización en la que dos segundas sondas están dotadas cada una de ellas con un nucleótido específico de alelo en el extremo 3' de la sonda para proporcionar discriminación específica de alelo.

5 **Figura 4B:** muestra la relación en la que el cebador compuesto comprende una segunda secuencia identificadora, tal que la presencia de la secuencia diana es determinada por la presencia de ambos identificadores en el amplicón.

10 **Figura 5:** imagen de pseudogel de los conjuntos de sondas de la presente invención en comparación con sondas semi-circularizables para comparación basándose en dos muestras diferentes de ADN, utilizando conjuntos de sondas 1-3 y contra agua MQ como referencia.

15 **Figura 6:** Representación esquemática de la estructura y funcionalidad de sondas de la presente invención, incluyendo las secciones de cierre. Las sondas P1, P2 contienen cada una de ellas una sección específica diana T1, T2 complementaria de una sección S1, S2 de la secuencia diana D. Cada una de las sondas C1, C2 capaz de hibridar una a otra. Una de las sondas contiene una primera sección de unión a cebador Pr1 capaz de hibridar a un cebador. Las sondas pueden ser hibridadas contra la secuencia diana. Cuando las sondas son hibridadas adyacentes a la secuencia diana, las sondas pueden ser ligadas junto con una ligasa. El cierre puede ser desnaturalizado, después de lo cual el cebador compuesto CP que comprende una segunda sección de unión a cebador Pr2 que puede ser reasociada a las sondas conectadas. La sonda compuesta puede ser alargada a lo largo de la sonda conectada y la sonda conectada alargada puede ser amplificada o multiplicada, por ejemplo, utilizando PCR u otra técnica de amplificación adecuada, utilizando uno o varios cebadores que pueden iniciar la amplificación desde Pr1 o Pr2 en la sonda compuesta alargada. Después de la amplificación, las sondas ligadas y amplificadas pueden ser detectadas.

25 **Figura 7A:** Representación esquemática y generalizada de un ensayo de ligado de oligonucleótidos específico de SNP o específico de alelo, en el que se dispone en la sonda el nucleótido específico de alelo que contiene la otra región (extendida) y en la que se forma la estructura de segmentación con i) el nucleótido en la secuencia diana situada adyacente al SNP a investigar, ii) el nucleótido de la sonda que hibrida al nucleótido de i), y iii) el nucleótido de la otra sonda que está situado en la otra región (extendida) y adyacente al nucleótido específico de alelo de la sonda. En esta realización, la estructura de segmentación está formada adyacente al SNP. Esto mejora la especificidad.

30 **Figura 7B:** Representación esquemática de dos ensayos de ligado de oligonucleótidos específicos de alelo o específicos de SNP, en los que en el primer ensayo, la estructura de segmentación está formada por los nucleótidos situados adyacentes al SNP a investigar, designado N, y en el que en el segundo ensayo la estructura de segmentación está formada por los nucleótidos del SNP a investigar, designados A o T.

35 **Figura 8:** Muestra la aplicabilidad general de la realización de las figuras 7A y 7B para ensayos OLA en general, es decir, cuando se utilizan sondas lineales 1, sondas circularizables/candado 2, sondas semi-circularizables/candado 3, y la combinación de primeras y segundas sondas y el cebador compuesto de la presente invención.

Ejemplos

40 La invención se muestra a continuación por medio de los siguientes ejemplos. También se pueden encontrar condiciones experimentales adecuadas, en particular respecto al ligado, amplificación y detección, en los documentos WO 03/052140, WO 03/052141, WO 03/052142 y WO 03/30163.

Ejemplo 1. Descripción de materiales biológicos y aislamiento de ADN.

50 El ADN fue aislado de material laminar de 4 líneas de tomates homogécicos, utilizando procedimientos conocidos en sí mismos, por ejemplo, los que se describen esencialmente en el documento EP 0 534 858, y almacenados en una solución de 1X TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 que contiene 1 mM EDTA). Las concentraciones fueron determinadas por mediciones de UV en un espectrofotómetro (MERK) utilizando procedimientos estándar, y ajustado a 100 ng/μl utilizando 1X TE.

Ejemplo 2. Identificación de SNP

Los SNP seleccionados son identificados y resumidos en la Tabla 1.

Ejemplo 3. Diseño de sonda de oligonucleótidos para reacción de ligado de oligonucleótidos

60 Las sondas de oligonucleótidos (orientación 5'-3') fueron seleccionadas para discriminar los alelos de SNP para cada uno de los lugares de SNP descritos en el ejemplo 2. Todas las sondas están fosforilados en el extremo 5'. Las secuencias están resumidas en la Tabla 2A y 2B. Un grupo de primeras sondas contiene enlaces tioato para hacerlas sondas resistentes a exonucleasa (indicado en negritas), los tres nucleótidos más hacia 3', Tabla 2B. Otro grupo de primeras sondas están biotiniladas en el extremo 3' (Tabla 2B).

Las segundas sondas están dispuestas en ambas formas específicas de alelo y con un identificador (indicado en negritas) que genera una diferencia de longitud de dos nucleótidos entre dos alelos para un lugar (Tabla 3).

5 **Ejemplo 4. Diseño de cebador compuesto de oligonucleótidos para reasociación a la primera sonda y subsiguiente reacción de alargamiento del cebador compuesto**

10 Los cebadores compuestos (orientación 5'-3') fueron seleccionados para hibridar a las primeras sondas descritas en el ejemplo 3. Las regiones de unión de PCR están subrayadas, las secuencias específicas de la primera sonda están subrayadas de forma doble. Las secuencias están resumidas en la Tabla 3.

Ejemplo 5. Diseño de los cebadores de amplificación PCR

15 La secuencia de uno de los cebadores utilizados para amplificación de PCR era complementaria de las regiones de unión de cebador PCR incorporadas en el cebador compuesto descrito en el ejemplo 4. La secuencia del segundo cebador PCR se correspondía con la región de unión de cebador PCR de la segunda sonda en el ejemplo 3. Usualmente, el cebador delantero está etiquetado. La concentración de los oligonucleótidos se ajustó a 50 ng/μl. La secuencia de los cebadores en orientación 5'-3' está mostrada en la Tabla 4.

20 **Tabla 5. Cebadores de amplificación PCR**

ID SEQ #		Nº Cebador	5'-3'	
1	Msel+0:	93E40	GATGAGTCCTGAGTAA*	M00k
2	EcoRI+0	93L01	GACTGCGTACCAATTC*	E00k
*Múltiples etiquetas posibles				

25 **Ejemplo 6. Ligado y amplificación**

4 muestras (muestras 1-4) de líneas de tomate homocigótico (Ejemplo 1) fueron sometidas a reacción de ligado de oligonucleótidos múltiples utilizando la mezcla de 20 sondas (2 sondas por lugar). Las condiciones utilizadas fueron 1x Taq ADN ligasa tampón (NEB), 0,2 U/μl Taq ADN ligasa, y 0,05 fmol/μl de cada sonda en un volumen de 10 μl. El ligado fue llevado a cabo en un termociclador (Perkin Elmer) con las siguientes condiciones de ciclado: 2 minutos a 94°C + 10*(15 segundos a 94°C + 60 minutos a 60 °C) + 4°C de manera continua. Después del ligado, el producto de ligado de 10 μl fue diluido con 30 μl 1x Taq ADN ligasa tampón.

30 Diez μl de las reacciones de ligado diluidas fueron utilizadas para llevar a cabo una PCR utilizando un combinado cebador E00k etiquetado con M00k. El cebador E00k fue etiquetado con JOE para posibilitar detección en el MegaBACE. El cebador compuesto fue añadido simultáneamente con los cebadores de amplificación. Las condiciones utilizadas en la PCR fueron 30 pg de cada cebador compuesto, 30 ng de cebador E00k etiquetado y 30 ng de cebador M00k, 1x Accuprime tampón I, 0,4 μl Accuprime polimerasa (Invitrogen) sobre 10 μl de producto de ligado diluido en una reacción PCR de 20 μl. Se llevó a cabo PCR en un termociclador con las siguientes condiciones de ciclado:

40 Para alargamiento cebador compuesto: 15 segundos a 94°C + 30 segundos a 56°C + 2 minutos a 68 °C, para amplificación seguida de: 2 minutos a 94°C + 35 *(15 segundos a 94°C + 30 segundos a 56°C + 60 segundos a 68 °C) +4°C de manera continua.

45 El producto de PCR fue purificado utilizando Sephadex 50 y fue diluido 80 veces con MQ. El producto de PCR diluido fue analizado en el MegaBACE.

Composiciones tampón:

50 **1x Tag ADN ligasa tampón**

20 mM Tris-HCl
 25 mM acetato potásico
 10 mM acetato magnésico
 55 10 mM DTT
 1 mM NAD
 0,1% Triton X-100
 (pH 7,6@ 25°C)

1x AccuPrime Tag ADN tampón polimerasa

20 mM Tris-HCl (pH 8,4)
 50 mM KCl
 5 1.5 mM MgCl₂
 0,2 mM dGTP, dATP, dTTP y dCTP
 Proteína AccuPrime TM termoestable
 10% glicerina.

Ejemplo 7. Purificación y dilución de amplicones

En el caso de detección utilizando el instrumento de secuenciado capilar MegaBACE 1000, se llevó a cabo la desalación y purificación de las reacciones de PCR en un formato de 96 pocillos, utilizando el siguiente procedimiento:

15 Se cargó en los pocillos de una placa de 96 pocillos (MultiScreen®-HV, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), Sephadex™ G-50 superfino seco (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), utilizando el cargador de columna de 45 microlitros (Millipore Corporation) del modo siguiente: se añadió al cargador de la columna Sephadex™ G-50 superfino.

20 Se retiró el exceso de Sephadex™ de la parte superior del cargador de la columna con una espátula. La placa de Multiscreen-HV fue dispuesta girada hacia abajo sobre el cargador de la columna. La placa Multiscreen-HV y el cargador de la columna estaban ambos en posición invertida.

25 El Sephadex™ G-50 fue liberado golpeando suavemente en la parte superior o en el lateral del cargador de columna. A continuación, se empapó y se lavó el Sephadex™ G-50 del modo siguiente: se añadieron 200 µl de agua Milli-Q por pocillo, utilizando un pipeteador de canales múltiples. Se colocó un armazón de alineación centrífuga en la parte superior de la micro-placa estándar de 96 pocillos, la placa Multiscreen-HV fue colocada en la parte superior y las mini-columnas fueron compactadas por centrifugado durante 5 min a 900 g.

30 La placa de 96 pocillos fue vaciada y colocada en la parte posterior. Las etapas 5-7 fueron repetidas una vez.

35 Se añadieron 200 µl de agua Milli-Q (MQ) a cada pocillo para empapar el Sephadex™ G-50 y se incubó durante 2-3 horas. Eventualmente, en esta etapa, las placas Multiscreen-HV con mini-columnas empapadas de Sephadex™ G-50 superfino fueron cerradas herméticamente con parafilm y almacenadas en refrigerado a 4°C hasta su utilización posterior. Se colocó un armazón de alineación centrífuga encima de la micro-placa estándar de 96 pocillos, la placa Multiscreen-HV fue colocada encima del conjunto y las mini-columnas fueron compactadas por centrifugado durante 5 minutos a 900g. La micro-placa de 96 pocillos fue retirada. Las mezclas conteniendo los amplicones fueron añadidas cuidadosamente al centro de cada pocillo. Utilizando el armazón de alineación centrífuga, la placa Multiscreen-HV fue colocada encima de una nueva placa de microtitulación con fondo en U, estándar, y se llevó a cabo la centrifugación durante 5 minutos a 900g. El eluido en la placa estándar de 96 pocillos (aproximadamente 25µl por pocillo) contiene el producto purificado. Las muestras purificadas fueron diluidas 25-75 veces en agua Milli-Q antes de inyección.

Ejemplo 8. Electroforesis capilar en el MegaBACE*Preparación de las muestras:*

50 Se llevó a cabo una dilución de 800 veces de tamaño estándar ET-900 Rox (Amersham Biosciences), se añadieron 8 µl de ET-900 Rox diluido a 2 µl de muestra purificada. Antes del proceso, la muestra que contenía el estándar de dimensionado se calentó, se desnaturalizó por incubación durante 1 min a 94°C y a continuación se colocó sobre hielo.

Detección en el MegaBACE:

55 Los capilares del MegaBACE se llenaron con matriz 1X LPA (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los parámetros para la inyección electrocinética de las muestras fueron los siguientes: 45 segundos a 3 kV. Los parámetros de trabajo fueron 110 min a 10 kV. Después del proceso, se llevó a cabo la corrección de interferencia, alisado de los picos, se llevó a cabo utilizando software Genetic Profiler, versión 1.0 modelo 20001017 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA), y se generaron electroferogramas.

Ejemplo 9.

65 Las sondas de la presente invención fueron comprobadas y comparadas a otros tipos de sondas que ha sido desarrollado recientemente, y se comprobó que eran superiores con respecto a sondas lineales o de candado. Este tipo de sonda es el objeto de una solicitud de patente separada, presentada en 17 de junio de 2004 con la

designación PCT/NL03/00444, cuyo contenido se incorpora en esta descripción a título de referencia. Las sondas designadas “candados” (“Keylocks”) se prevén también en esta solicitud en la Tabla 5. Las sondas de la presente invención fueron divididas en tres conjuntos, conjunto 1 que contenía la totalidad de las 10 sondas compuestas (Tabla 4, lugar 31-40), conjunto 2 que contenía 5 sondas compuestas (Tabla 4, lugar 31, 33, 35, 37, 39), y conjunto 3 que contenía las otras 5 sondas compuestas (Tabla 4, lugar 32, 34, 36, 38,40). Se sometieron dos muestras de las líneas de tomate homocigótico (Ejemplo 1) a una reacción de ligado de oligonucleótidos múltiplex utilizando una mezcla de 20 sondas (2 sondas por lugar). Las condiciones utilizadas fueron 100 ng ADN, 1x Taq ADN ligasa tampón (NEB), 0,2 U/μl Taq ADN Ligasa, y 0,5 fmol/μl de cada sonda en un volumen de 10 μl. El ligado fue llevado a cabo en un termociclador (Perkin Elmer) con las siguientes condiciones de ciclado: 2 minutos a 94°C + 10*(15 segundos a 94°C + 60 minutos a 60 °C) + 4°C de manera continua. Después de ligado, los 10 μl de producto de ligado fueron diluidos con 30 μl 1x Taq ADN ligasa tampón.

Diez μl de las reacciones de ligado diluidas se utilizaron para llevar a cabo una PCR utilizando un cebador E00k etiquetado combinado con M00k. El cebador E00k fue etiquetado con FAM para posibilitar la detección en el MegaBACE. El cebador compuesto fue añadido simultáneamente con los cebadores de amplificación. Las condiciones utilizadas en la PCR fueron 5 μl de 50 fmol/μl de cada cebador compuesto, 0,6 μl de cebador E00k etiquetado 50ng/μl y 0,6 μl de cebador M00k 50ng/μl, 2μl de tampón 10x Taq I, 0,08μl 5U/μl de polimerasa Amplitaq Gold sobre 10 μl de producto de ligado diluido en una reacción PCR de 20 μl. Se llevó a cabo PCR en un termociclador con las siguientes condiciones de ciclado:

- Para alargamiento del cebador compuesto: 12 minutos a 94°C + 10 * (15 segundos a 94°C + 2 minutos a 60°C + 1 minutos a 72 °C), para amplificación seguido por: 35* (15 segundos a 94°C + 30 segundos a 56°C + 60 segundos a 72 °C) +4°C de manera continua.

Las sondas “Keylock” fueron sometidas a las mismas condiciones de reacción y al mismo protocolo de ligado/amplificación, pero sin la adición de Blancos de sondas compuestas que contenían solamente agua MQ.

El producto de la PCR fue purificado utilizando Sephadex 50 y diluido 80 veces con MQ. El producto PCR diluido fue analizado en el MegaBACE. Los resultados se indican en la figura 5. La utilización de las sondas compuestas resultó en la detección de los productos deseados en comparación con las sondas candado. También se observó que las sondas compuestas de la presente invención tenían como resultado una menor proporción de subproductos en comparación con las sondas candado.

Ejemplo 10. Sondas candado utilizando el método segmentasa

Para demostrar la factibilidad del método de ligado de segmentasa, las sondas de la Tabla 2A, (ID SEQ #) se prolongaron en su extremo 5' con otra región que tenía la secuencia 'CACAC'. Las sondas alargadas fueron combinadas con las segundas sondas de la Tabla 3 y sometidas a la hibridación antes descritas y protocolo de ligado, en el que las enzimas (tanto ligasa como segmentasa (obtenidas de Third Wave Inc. Y utilizadas “en su estado” en cantidades variables entre 1 y 10 microlitros)). La mezcla resultante es incubada en un termociclador (Perkin Elmer) con las siguientes condiciones de ciclado: 4 minutos a 94°C + 240 minutos a 60°C + 4°C de manera continua. A continuación, la mezcla es amplificada en las condiciones descritas en el ejemplo 6. Se hallaron los productos esperados, es decir, sondas ligadas con longitudes que correspondían a los resultados obtenidos con las segundas sondas de la Tabla 3 que no estaban alargadas, indicando que la etapa de segmentasa y la etapa de ligado fueron satisfactorias, indicando que el método funciona. Se llevaron a cabo experimentos en ausencia de enzimas (combinaciones de enzimas). Estos experimentos demostraron que ambas enzimas son necesarias para que este tipo de sonda tenga como resultado una sonda ligada.

Tabla 1. Secuencias de SNP seleccionadas y posición del SNP.

ES 2 539 784 T3

ID SEC #	Lugar nº.	Longitud	Posición SNP	SEQUENCE W= A o T; M= A o C; R= A o G; Y= C o T; K= G o T; S= G o C; H= A, C o T; B= C, G o T; V= A, C o G; D= A, G o T; N= A, C, G o T
3	31	472	246	TATCCACTCAGGTCTCCGCAAGCCAGAAATGGGATATACAC CTTGTTACGACCYTCAAGCCATCCACTACTGCAATCTGTCA TGTACAGATGTTTCGGAAGATAATGTATAAGTACAACCTATA TAGTCGGAWTTGCATCTAGTCTAGCATTCCGAAAATGGGAA CCATGCTACTTCTAGCATAAAAAACAGCAGC TAGAAATCGT AACTCCAATGATACGAGGAAGTATTTCAGAGTTTGTAGAGTGA GTACAATGCAATTTAGAGAACAAGCATCTGCACATCRAAGT TACCTAGGTCCTCAGCGCCTGATGGACTTCCAACCTGTGTCA AGAAGGCGATAAAGGTCTTTCTCATTGAATCCTTCAGGTGG AGAGTAGTTTTCAAACTGCAAATGCCTCTGCACAGCGGA AAGATTGAATTAGATTTATGTTATATAGCCATTCTAGTCTT GCTTTAATGGATCTTTCTCGA
4	32	222	175	CCACAGTTTCATGCTGCACCTACATGTGTAAGCAACTATCA TAGCAAGTCTCGGAACAATTGGTAGGAAAAATCMYKTAAG GATATGAAACATACTGTCTTTCTTCATCTGAGTCTGYAGA GTTAATTTTTAACTCTTGGGATAAATGCAAAGAWTTAGACA TGGAKGAGTYCTTAACACGTCCAGACAAGAGGCGTAACACA GGTACACCTTTTCTCGA
5	33	133	116	TTGTGCTTGATGAATTGTAGGTCCAGTGCAGGTTTGCTTCT AAAACAGGGAGCACTTTGCAAGTGGTGAAGTTCTATTAGC TGGGAAAGTGTAGTTTGTAGCAGTTTTGAGCTGAR <u>TT</u> AACAA GAAAAATCGA

6	34	250	47	CCGCCACTGGGTAATTGAGTTTCATATTGATGGTTTTGTT TTTGTTRACGCTTCTTCCTTGTTGAGAGGGTTCAATGGAG AGATTCTATCTCGTCCTCCATTAGTTGAAGCTATTGCCTT TGATCCTATCCTTTCAAAGGYCAAGATGATTGCAGATAAT TGGAATCCATTAACCAATGATTCTACGGAAAATTTATTCC CTCACTGGAGGAGATGGCCAGAGATAAATATGAGATTTTG TGATGACAT
7	35	284	84	TCGAGTAAGGCGGATGGATATGGAACAAGCCATTTCAAGG AGCAATTTCCCAGGATTTTCAGCTTTGCAACAGCAGAAGT GTAYCTCTGCAGAGATAGATCATAACCTTTGGAAAGGFGT AGTAATTGTCAAAGGGAGGAATGAGCCAGGAAACTGATAG ACTATGTTGCGAAAATAAGCTATACTTCACTAAAAAAGG CTAGACGTTTGAGAAATGAAGCAAGAACTAACACCTCTCA CCAATTGCATCATTTTTCTTAGTTTCAGTTGATGTGATGAGC TTGT
8	36	320	31	TCGATATCCWCTCTTGTGTTGTTGCAGGAGC <u>W</u> GAACTATAA ATTGCTTGCAGGAACCTTGACATATGCTTTCTGTTGAGAC TTGAATCACCAGCATGGATTTGAATGCCTTGCCACAGCCA GAGGATGACGAYGAGATTTTGGACAACAATTAGAAGATG AACCACAAGAACCTATTTTACGTAGTGATGAGCSTGCAGA TTATGTCACGAGTGCTGTAGAGATTTACGTCGCGTATGT TTCTGCTTATACTGCTCGCTGTATCAACTATTGAACYGTA CTACTACTTGARCTTGCTCGTTTATTGGATATTTCTTTTT
9	37	193	159	GAATTCACACTASGTTTCGATGAAATTGAAACGTTCTCTTT CTGAAGAATAKATACACAAGAAAAAATCTTATAGTCCTCAAC AATATTCTTCTTCGTAACAGAAAACACGGAAGAAAAATCTC TTCTGAAAATCCCTATAATCACTGGCTGGAACCTCTCCSA ACTCTCAATTTTTCAACCTTCTCTATGTTAA
10	38	291	89	CTGCAGAADTACTGTTTGTTCAGGACTTACTAAAATATCCT AAACAAAATTGATGATAGAGCCAATAATGTATGCATGATT GGCGGTCCRTTCTTTTGTATAGCAAGAGCTTGAAGCTAA TTTTGTTTGTGATAATGGCCGCACTAATTGTTTATTATCT CAGAATGAACAAAAAGAAGCAAGTCAGAAGCTTTSTACTC TATACTGAACAACCTTGGAATTGGAACCTATGTACTTATCT AGCCACGCCTCATAGATCTTTGTGGTTTAGGAGTGTAA

11	39	337	122	<p>GAATTCACAATGAAAAAKGKDGTA AAAACACGAAATCAAT CAAGCATGCAAGAGATAATGTTGTCCATCCAGTTGTTGTT GATGTTTCGGTATTGTATGTGTGTTGGGAGGAGTTATCTG GRCAGCAAGTCGAGGTTTGAACGTCAAAAAGGTATGGGTT GTCTTCTCTCTTTGTCCCTTTTCGAAGAGACCCCTAAGGT TCAGACGAATCTATTCCAAAACTAGGGTTGTTCCCTGTT GCATCTCCTTKTACAAGCTCCCATCGCATCATAAGTAGG GTATGTTTGATGGTAGAATTTACGGATGTAATTTACTTTT GAAATGATTATGTTAA</p>
12	37	373	63	<p>AGAGAGACGAGAGCTCGACTAGTGATAGTGTATGTGCAA CAGTTGAATAGAAAGATGYACACGAGCCTCGGATCAATGG CAGGAAAAGAGGCGTGGTGCTACGAACCATAAAGGCAAGG TTGAGCTTTCCCTTACAGAGTACATCGCCTATTCCATACT CCGCTGATACTCTTTGATAAATCAAAATCTGTGGTGATCT CGTAGTTCTTGGGGATCCAGCCAAAACCACCTTCGAGGT TCAACACAACATAGACAGTATGGCAGAAATATCAAGACAAT GACTGCTCGAACTGCTGATGGCATTATGTGCAACCGTTG AATAGAGAGATGTACACGAGTCTCGGATCAATGGCAGGAA AAGAGAGTGCTTG</p>

Tabla 2A. Primeras sondas de oligonucleótidos con enlaces tioato para detección de los SNP de la Tabla 1.

5

ID SEC #	Lugar nº.	5'-PH -3'
13	31	GTACAATGCAATTTAGAGAACAAGCCCGGGCGGCCCGGGCGCGGC
14	32	CTTAACACGTCCAGACAAGAGGCCGCGGGCGCGCGGGCGGGCGG
15	33	TTAACAAGAAAAATCGGTCAGGACTCGCGGCGCCCGCGGCGCGGG
16	34	ACGCTTCTTCTTGTGAGAGGGCGCCGCGCCGGGCCCGCCGGC
17	35	CTCTGCAGAGATAGATCATAACCTGGCCCGCGCGCCCGGGCGGCG
18	36	GAACTATAAATTGCTTGACAGGAACCGGGCGGCCCGGCCCGCCGG
19	37	AACTCTCAATTTTCAACCTTCTCTACGCGCCGGCCCGCGGCGCGGC
20	38	TTCTTTTGTATAGCAAGAGCTTGAAGCCGGCCGCGCGCGCGGG
21	39	TCACAAGCTCCCATCGCATCATCGGCGCGGGCCCGCGCGCC
22	40	ACACGAGCCTCGGATCAATGCGGCCCGCCCGGGCGGCGGCC

Tabla 2B. Primeras sondas de oligonucleótidos (biotiniladas) para detección de los SNP de la Tabla 1.

ES 2 539 784 T3

ID SEC #	Lugar nº.	5'-PH -3'
23	31	GTACAATGCAATTTAGAGAACAAGCCCGGGCGGCCCGGGCGCGGC
24	32	CTTAACACGTCCAGACAAGAGGCCGCGGGCGCGCGGGCGGGCGG
25	33	TTAACAAGAAAAATCGGTCAGGACTCGCGGCCCGCGGGCGCGGGG
26	34	ACGCTTCTTCTTGTGAGAGGGCGCCCGGCCGGGCCCCGCCGGC
27	35	CTCTGCAGAGATAGATCATAACCTGGCCCCGCGCGCCCGGGCGGC
28	36	GAACTATAAATTGCTTGCAAGAACCGGGCGGCCCGGGCCCCGCCGG
29	37	AACTCTCAATTTTCAACCTTCTCTACGCGCCGGGCCGCGGGCGGC
30	38	TTCTTTTGTATAGCAAGAGCTTGAAGCCGGCCGGCCGCGCGCGGG
31	39	TCACAAGCTCCCATCGCATCATCGGCGCGCGGGGCCGCGCGCC
32	40	ACACGAGCCTCGGATCAATGCGGCCCGGCCCGGGCGGCCGCC

Tabla 3. Segundas sondas de oligonucleótidos con para detección de los SNP de la Tabla 1.

ID SEC #	Lugar nº.	5'(PH)- 3'
33	31	GCCGCGCCCGGGCCCGCCGGGATGAGTCTTGAGTAA <u>CGCTGGAAGTATTCA</u> GAGTTTAGAGTGAA
34		GCCGCGCCCGGGCCCGCCGGGATGAGTCTTGAGTAA <u>CGGGAAGTATTCAGA</u> GTTTAGAGTGAT
35	32	CCGCCCCGCGCGCCCGCGGATGAGTCTTGAGTAA <u>CGCAGCAAAGAATTA</u> GACATGGATGAGTT
36		CCGCCCCGCGCGCCCGCGGATGAGTCTTGAGTAA <u>CGCCAAAGATTTAGA</u> CATGGAGGAGTC
37	33	CCC GCGCCGCGGGCCCGCGGATGAGTCTTGAGTAA <u>CGCCTAGTTTGAGCA</u> GTTTTGAGCTGAA
38		CCC GCGCCGCGGGCCCGCGGATGAGTCTTGAGTAA <u>CGTAGTTTGAGCAGT</u> TTTGAGCTGAG
39	34	GCCGGCGGGCCCGCCGGCGGATGAGTCTTGAGTAA <u>CGCCTTCATATTGAT</u> GGTTTTGTTTTGTTA
40		GCCGGCGGGCCCGCCGGCGGATGAGTCTTGAGTAA <u>CGTTCATATTGATGG</u> TTTTGTTTTGTTG
41	35	CGCCGCGGGCGCGGGCCGATGAGTCTTGAGTAA <u>CGCAAGCTTTGCAAC</u> AGCAGAAGTGTAT
42		CGCCGCGGGCGCGGGCCGATGAGTCTTGAGTAA <u>CGAGCTTTGCAACAG</u> CAGAAGTGTAC

43	36	CCGGGCGGGCCGGGCGGCCCGATGAGTCCTGAGTAA CGCTCTCTCTTGT GTTGCAGGAGCA
44		CCGGGCGGGCCGGGCGGCCCGATGAGTCCTGAGTAA CGCACTCTTGT TGCAGGAGCT
45	37	GCCGGCCGGGCGGCCGGCGGATGAGTCCTGAGTAA CGCGATCACTGGCTG GAACTTCTCCC
46		GCCGGCCGGGCGGCCGGCGGATGAGTCCTGAGTAA CGATCACTGGCTGGA ACTTCTCCG
47	38	CCCGCGCGGGCCGGCCGGCGATGAGTCCTGAGTAA CGCCATGTATGCATG ATTGGCGGTCCA
48		CCCGCGCGGGCCGGCCGGCGATGAGTCCTGAGTAA CGATGTATGCATGAT TGGCGGTCCG
49	39	GGCGCGGGCCGGCGCGCGGATGAGTCCTGAGTAA CGCTGTTGTTCTTGT TTGCATCTCCTTT
50		GGCGCGGGCCGGCGCGCGGATGAGTCCTGAGTAA CGGTTGTTCTTGT GCATCTCCTTG
51	40	GGCGGCCGGGCGGGCGGGCGGATGAGTCCTGAGTAA CGTGCAACAGTTGAA TAGAAAGATGT
52		GGCGGCCGGGCGGGCGGGCGGATGAGTCCTGAGTAA CGCAACAGTTGAATA GAAAGATGC

Tabla 4. Cebadores compuestos de oligonucleótidos para detección de los SNP de la Tabla 1.

5

ID SEC #	Lugar nº.	secuencia 5'(PH)-3'
53	31	<u>GACTGCGTACCAATTCCCGATTACGATGCAGCTACGTCGATATCGATCGGATC</u> GCTTGTTCTCTAAATTGCATTGTAC
54	32	<u>GACTGCGTACCAATTCCGACTCAGTGCTATACGATCTACGTCGACATGGGCC</u> TCTTGTCTGGACGTGTTAAG
55	33	<u>GACTGCGTACCAATTCCGATAGTCCGTAAAGTTAGCATGCGTACAGTCCTGAC</u> CGATTTTTCTTGTAA
56	34	<u>GACTGCGTACCAATTCCTCATGTCGATAGCCTGAGCATCCCCTCTCAACAAGGA</u> AGAAGCGT
57	35	<u>GACTGCGTACCAATTCCTATGCTCAGCATGACGTGAAGGTTATGATCTATCTCT</u> GCAGAG
58	36	<u>GACTGCGTACCAATTCCTGTAACGTTAGCGGGTTCTGCAAGCAATTTATAGT</u> TC
59	37	<u>GACTGCGTACCAATTCCTCGAATGATAGAGAAGGTTGAAAAATTGAGAGTT</u>
60	38	<u>GACTGCGTACCAATTCCTCGTTCAAGCTCTTGCTATAACAAAAGAA</u>
61	39	<u>GACTGCGTACCAATTCCTCATGATGCGATGGGAGCTTGTGA</u>
62	40	<u>GACTGCGTACCAATTCCTATTGATCCGAGGCTCGTGT</u>

Tabla 5. Sondas candado de oligonucleótidos para detección de los SNP de la Tabla 1.

10

ES 2 539 784 T3

ID SEC #	Lugar nº.	Longitud (bp)	secuencia 5'(PH)-3'
63	31	124	<u>GCCGCGCCCGGGCCCGCCCGG</u> <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGCTGGAAGT</u> ATTCAGAGTTTAGAGTGAA
64	31	122	<u>GCCGCGCCCGGGCCCGCCCGG</u> <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGGGAAGTAT</u> TCAGAGTTTAGAGTGAT
65	31	rev	<u>GTACAATGCAATTTAGAGAACAAGCGATCCGATCGATATCGACGTA</u> <u>GCTGCATCGTAATCGGGGAATTGGTACGCAGTCCGGGGCGGCCCGG</u> <u>GCGCGGC</u>
66	32	119	<u>CCGCCCCCGCGCGCCCGCGG</u> <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGCAGCAAAG</u> AATTAGACATGGATGAGTT
67	32	117	<u>CCGCCCCCGCGCGCCCGCGG</u> <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGCCAAAGAT</u> TTAGACATGGAGGAGTC
68	32	rev	<u>CTTAACACGTCCAGACAAGAGGCCCATGTCGACGTAGATCCGTATA</u> <u>GCACTGAGTCGGGAATTGGTACGCAGTCCGCGGGCGCGCGCGGGC</u> <u>GG</u>
69	33	114	<u>CCC GCGCCGCGGGCGCCCGCGG</u> <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGCCTAGTTT</u> GAGCAGTTTTGAGCTGAA
70	33	112	<u>CCC GCGCCGCGGGCGCCGCGG</u> <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGTAGTTTGA</u> GCAGTTTTGAGCTGAG
71	33	rev	<u>TTAACAAGAAAAATCGGTCAGGACTGTACGCATGCTAACGTTACGG</u> <u>ACTATCGGGAATTGGTACGCAGTCCGCGGGCCCGCGGGCGGGG</u>
72	34	109	<u>GCCGGCGGGCCCGGCCGGCGG</u> <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGCCTTCATA</u> TTGATGGTTTTGTTTTGTTA
73	34	107	<u>GCCGGCGGGCCCGGCCGGCGG</u> <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGTTCATATT</u> GATGGTTTTGTTTTGTTG
74	34	rev	<u>ACGCTTCTTCCTTGTGAGAGGGGATGCTCAGGCTATCGACATGGG</u> <u>GAATTGGTACGCAGTCCGCGGGCCGGGCCCGCCGGC</u>
75	35	104	<u>CGCCGCGGGCGCGCGGGCC</u> <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGCAAGCTTT</u> GCAACAGCAGAAGTGAT

76	35	102	CGCCGCGGGCGCGGGCC <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> CGAGCTTTGC AACAGCAGAAGTGTAC
77	35	rev	<u>CTCTGCAGAGATAGATCATAA</u> <u>CCTTCACGTCATGCTGAGCATGGGA</u> <u>ATTGGTACGCAGTC</u> GGCCCGCGC CCCGGGCGCG
78	36	99	CCGGGCGGGCCGGGCGCC <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGCTCTCTCT</u> TGTTTGTTGCAGGAGCA
79	36	97	CCGGGCGGGCCGGGCGCC <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> CGCACTCTTG TTTGTTCAGGAGCT
80	36	rev	GAACTATAAATTGCTTGCAGGA <u>AACCCGCTAACGTTACGGGGAATTG</u> <u>GTACGCAGTC</u> GGGCGGCCCGCCCGCCCGG
81	40	94	GCCGCGCGGGCCCGGCGCG <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGCGATCACT</u> GGCTGGAACTTCTCCC
82	40	92	GCCGCGCGGGCCCGGCGCG <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGATCACTGG</u> CTGGAACTTCTCCG
83	40	rev	AACTCTCAATTTTTCAACCTT <u>CTCTATCATTGAGGGAATTGGTAC</u> <u>GCAGTCCGCGCCGGGCGCGCCCGG</u>
84	38	89	CCCGCGCGGGCCGGGCGCG <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGCCATGTAT</u> GCATGATTGGCGGTCCA
85	38	87	CCCGCGCGGGCCGGGCGCG <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> CGATGTATGC ATGATTGGCGGTCCG
86	38	rev	TTCTTTTGTATAGCAAGAGCT <u>TGAACGGGGAATTGGTACGCAGTC</u> GCCGGCCGGCCGGCGCGGGG
87	39	84	GGCGCGGGCCCGCGCGCC <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGCTGTTGTT</u> CCTTGTTCATCTCCTTT
88	39	82	GGCGCGGGCCCGCGCGCC <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> CGGTTGTTC TTGTTCATCTCCTTG
89	39	rev	TCACAAGCTCCCATCGCATCA <u>TGGGAATTGGTACGCAGTC</u> CGGGCG GCGGGCCGCGCC
90	37	79	GGCGGCCGCGGGCGGGCC <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> <u>CGTGCAACAG</u> TTGAATAGAAAGATGT
91	37	77	GGCGGCCGCGGGCGGGCC <u>GATGAGTCCTGAGTAA</u> CGCAACAGTT GAATAGAAAGATGC
92	37	rev	ACACGAGCCTCGGATCAAT <u>GGGAATTGGTACGCAGTC</u> CGGCCCGCC CGGCGGCCCGCC

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Keygene NV
- <120> Métodos basados en OLA para la detección de secuencias de ácido nucléico diana
- <130> P210599PCT1
- <150> PCT/NL03/00613
- <151> 2003-09-02
- 10 <150> EP04076618.0
- <151> 2004-06-02
- <160> 92
- <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- 15 <211> 16

ES 2 539 784 T3

<212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos
 5 <400> 1
 gatgagtctct gagtaa 16
 <210> 2
 <211> 16
 <212> ADN
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> cebador de oligonucleótidos
 <400> 2
 gactgcgtac caattc 16
 15 <210> 3
 <211> 472
 <212> ADN
 <213> Lycopersicon Esculentum
 <400> 3
 20 tatccactca ggctccgca agccagaaat gggatataca ccttgttacg accytcaagc 60
 catccactac tgcaatctgt catgtca cag atgttcggaa gataatgtat aagtacaact 120
 atatagtcgg awttgcatct agtctagcat tcggaaaatg gaagccatgc tacttctagc 180
 ataaaaaaca gcagctagaa atcgtaactc caatgatacg aggaagtatt cagagttag 240
 agtgawgtac aatgcaattt agagaacaag catctgcaca tcraagtac ctaggctc tc 300
 25 agcgcctgat ggactccaa cttgttcaag aaggcgataa aggtcttct cattgaatcc 360
 ttcagggtgga gagtagtttt cacaaactgc aaatgcctct gcacagcgga aagattgaat 420
 tagatttatg ttatatagcc attctagtct tgcttaatg gatctttctc ga 472
 <210> 4
 <211> 222
 30 <212> ADN
 <213> Lycopersicon Esculentum
 <400> 4
 ccacagtttc atgctgcacc tacatgtgta agcaactatc atagcaagtc tcggaacaat 60
 tggtaggaaa aaatcmkta aggatagaa acatactgty ctttctcat ctgagtctgy 120
 35 agagttaatt ttaactctt gggataaatg caaagawtta gacatggakg agt ycttaac 180
 acgtccagac aagaggcgta acacaggtac acctttctc ga 222
 <210> 5
 <211> 133
 <212> ADN
 40 <213> Lycopersicon Esculentum
 <400> 5
 ttgtgcttga tgaattgtag gtccagtgc ggttgcttc taaaacaggg agcactttgc 60
 aagtgtgaa agttctat ta gctgggaaag ttagtttga gcagtttga gctgarntaa 120
 caagaaaaat cga 133
 45 <210> 6
 <211> 249
 <212> ADN
 <213> Lycopersicon Esculentum
 <400> 6
 50 ccgccactgg gtaattgagt ttcatattga tggtttggtt ttgtracg cttctcctt 60
 gttgagaggg ttcaatggag agattctatc tcgtcctcca ttagtgaag ctattgcctt 120
 tgatcctatc cttcaaagg ycaagatgat tgcagataat tggatccat taaccaatga 180
 ttctacggaa aatttattcc ctactggag gagatgggca gagataaata tgagatttg 240
 tgatgacat 249
 55 <210> 7
 <211> 284
 <212> ADN
 <213> Lycopersicon Esculentum
 <400> 7
 60 tcgagtaagg cggatggata tggacaagc cattcaagg agcaattcc caggatttc 60
 agctttgcaa cagcagaagt gtayctctgc agagatagat cataa ccttt ggaagggtg 120
 agtaattgtc aaagggagga atgagccagg aaactgatag actatgttc gaaaataagc 180
 tatacttcac taaaaaaagg ctagacgttt gagaatgaa gcaagaacta acacctctca 240
 65 ccaattgcat cattttcta gttcagttga tggatgagc ttgt 284
 <210> 8

<211> 320
 <212> ADN
 <213> Lycopersicon Esculentum
 <400> 8
 5 tcgatatccw ctctgtttg ttgcaggagc wgaactataa attgcttga ggaacctga 60
 catatgcttt ctgttgagac tgaatcacc agcatggatt tgaatgcct gccacagcca 120
 gaggatgacg aygagatttt tggacaacaa ttagaagatg aaccacaaga acctattta 180
 cgtagtgatg agcstgcaga ttatgtcacg agtgctgtag agatttcacg tgcgctatg 240
 ttctgcttat actgctcgtct gtatcaacta tgaacygta ctactacttg arcttgctcg 300
 10 tttattggat atttctttt 320
 <210> 9
 <211> 191
 <212> ADN
 <213> Lycopersicon Esculentum
 <400> 9
 15 gaattcacac tasgttcat gaaattgaaa cgttctctt ctgaagaaka tacacaagaa 60
 aaaatctat agtctcaac aatattctt ttcgtaacag aaaacacgga agaaaatctc 120
 ttctgaaaat cctataatc actggctgga acttct ccsa actctcaatt ttcaacctt 180
 ctctatgta a 191
 20 <210> 10
 <211> 279
 <212> ADN
 <213> Lycopersicon Esculentum
 <400> 10
 25 ctgcagaadt actgttgtt caggacttac taaatctct aaacaaaatt gatgatagag 60
 ccaataatgt atgatgatt ggcggtcrt tctttgta tagcaagagc tgaagctaa 120
 tttgtttgt cataatggcc gactaattg tttattctc cagaatgaac aaaaagaagc 180
 aagtcaagaag cttstactc tatactgaac aacttgtaa ttggaactat gtacttatct 240
 30 agccacgcct catagatctt tgggtttag gagtgtaa 279
 <210> 11
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Lycopersicon Esculentum
 <400> 11
 35 gaattcacia tgaaaaakgk dgtaaaaaa
 cgaaatcaat
 caagcatgca agagataatg
 40 ttgtccatcc agttgt'gitt gatgtttcgg tattgtatgt gtgttggag gagttatctg 120
 grcagcaagt cgaggttga acgtcaaaaa ggtatgggt:t gtcttctc tttgccctt 180
 ttcgaagaga cccctaaggt tcagacgaat ctattccaaa aactaggggt gttcctgtt 240
 gcatctctt ktcacaagct cccatcgcat cataagtagg gtatgttga tggtagaatt 300
 tacggatgta attactttt gaa atgatta tjttaa 336
 45 <210> 12
 <211> 373
 <212> ADN
 <213> Lycopersicon Esculentum
 <400> 12
 50 agagagacga gagctcgact agtgatagtg ttatgtgcaa cagttgaata gaaagatgya 60
 cacgagcctc ggatcaatgg cagggaaaga ggcgtgggtgc tacgaacct aaa ggcaagg 120
 ttgagcttcc ctttacagag tacatcgctc attccatact ccgctgatac tctttgataa 180
 atcaaaatct gtggatgatc cgtagtctt ggggatccca gccaaaacca ccttcgaggt 240
 tcaacacaac atagacagta tggcagaata tcaagacaat gactgctga aactgctgat 300
 55 ggcattatgt gcaaccg ttg aatagagaga tgtacacgag tctcgatca atggcaggaa 360
 aagagagtgc ttg 373
 <210> 13
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 13.
 65 gtacaatgca attagagaa caagccc ggg cggcccgggc gcggc 45
 <210> 14

<211> 43
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 5 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 14
 cttaacacgt ccagacaaga ggccgcgggc gcgcgggcg egg 43
 <210> 15
 <211> 45
 10 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 15
 15 ttaacaagaa aaatcggta ggactcggc cgcccgggc gcggg 45
 <210> 16
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 16
 acgcttctc cttgttgaga gggcgc cggc cgggcccgc ggc 43
 <210> 17
 25 <211> 44
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 30 <400> 17
 ctctgcagag atagatcata acctggccc cgcgcccggc ggcg 44
 <210> 18
 <211> 45
 <212> ADN
 35 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 18
 gaactataaa ttgctgcag gaaccgggc gcccgccc cccgg 45
 40 <210> 19

 <211> 46
 <212> ADN
 <213> artificial
 45 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 19
 aactctcaat tttcaacct tctc acgc cgggcccgc gccgc 46
 <210> 20
 50 <211> 46
 <212> ADN
 <213> artificial

 <220>
 55 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 20
 ttctttgtt atagaagag ctgaagccg gccggccgc cgcggg 46
 <210> 21
 <211> 42
 60 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 21
 65 tcacaagctc ccatcgcac atcggcgcg gggccgcgc cc 42
 <210> 22

<211> 40
 <212> ADN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 22
 acacgagcct cggatcaatg cggc ccgccc ggcggccgcc 40
 10 <210> 23
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 23
 gtacaatgca atttagagaa caagcccggg cggcccgggc gcggc 45
 <210> 24
 <211> 43
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 24
 25 cttaacacgt ccagacaaga ggccgcgggc gcgcggcggg egg 43
 <210> 25
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 25
 ttaacaagaa aaatcgggtca gga ctgcgcg cgcccgcggc gcggg 45
 <210> 26
 <211> 43
 35 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 26
 acgcttctc cttgttgaga gggcgccgc cgggcccgcc ggc 43
 <210> 27
 <211> 44
 <212> ADN
 45 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 27
 ctctgcagag atagatcata acctggcccg cgcgcccggc ggcg 44
 <210> 28
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 55 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 28
 gaactataaa ttgctgcag ga accgggcg gcccgcccg cccgg 45
 <210> 29
 <211> 46
 60 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 65 EP 1 664 345 B1
 <400> 29

aactctcaat tttcaacct tctctacgcg ccgggccgcg gccggc 46
 <210> 30
 <211> 46
 <212> ADN
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 30
 ttctttgtt atagcaagag cttgaagccg gccgggccg cgcggg 46
 10 <210> 31
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 31
 tcacaagctc ccatgcatc a tcggcgcg gggccgcg cc 42
 <210> 32
 <211> 40
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 32
 25 acacgagcct cggatcaatg cggcccggc gccggccg 40
 <210> 33
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 33
 gccgcgccc ggccgcccg gatgagtct gagtaacgct ggaagtattc agagttaga 60
 gtgaa 65
 35 <210> 34
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 34
 gccgcgccc ggccgcccg gatgagtct gagtaacggg aagtattcag agtttagat 60
 gat 63
 45 <210> 35
 <211> 65
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 50 <400> 35
 ccgcccggc cgccgcccg gatgagtct gagtaacgca gcaaagaatt agacatgat 60
 gatt 65
 <210> 36
 <211> 63
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 36
 60 ccgcccggc cgccgcccg gatgagtct gagtaacgcc aaagattag acatggagga 60
 gtc 63
 <210> 37
 <211> 64
 <212> ADN
 65 <213> artificial
 <220>

ES 2 539 784 T3

<223> sonda de oligonucleótidos
<400> 37
cccgcgccg gggcgccgc gatgagtct gagtaacgcc tagttgagc agtttgagc 60
tga 64

5 <210> 38
<211> 62
<212> ADN
<213> artificial
<220>

10 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 38

EP 1 664 345 B1

15 cccgcgccg gggcgccgc gatgagtct gagtaacgta gtttgagcag ttttgagctg 60
ag 62
<210> 39
<211> 67
<212> ADN
<213> artificial

20 <220>

<223> sonda de oligonucleótidos
<400> 39
gccggcgggc ccggcggcg gatgagtct gagtaacgcc tcatattga tggtttgtt 60
tttgta 67

25 <210> 40
<211> 65
<212> ADN
<213> artificial
<220>

30 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 40
gccggcgggc ccggcggcg gatgagtct gagtaacggt catattgatg gttttgtt 60
tgttg 65

35 <210> 41
<211> 64
<212> ADN
<213> artificial
<220>

40 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 41
cgccgcggg cgccgggccc gat gagtct gagtaacgca agcttgcaa cagcagaagt 60
gtat 64
<210> 42
<211> 62

45 <212> ADN
<213> artificial
<220>

<223> sonda de oligonucleótidos
<400> 42

50 cgccgcggg cgccgggccc gatgagtct gag taacgag cttgcaaca gcagaagtgt 60
ac 62
<210> 43
<211> 63
<212> ADN

55 <213> artificial
<220>

<223> sonda de oligonucleótidos
<400> 43
ccggcgggc ccggcggccc gatgagtct gagtaacgct etc tcttgtt tgttcagga 60
gca 63
<210> 44
<211> 61
<212> ADN
<213> artificial

65 <220>
<223> sonda de oligonucleótidos

ES 2 539 784 T3

<400> 44
ccggcgggc cggcgccccc gatgagtct gagtaacgca ctctgtttg ttg caggagc 60
t 61

5 <210> 45
<211> 62
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> sonda de oligonucleótidos

10 <400> 45
gccggccgcg gccggcgcg gatgagtct gagtaacgcg atcactggct ggaactctc 60
cc

15 <210> 46 62
<211> 60
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> sonda de oligonucleótidos

20 <400> 46
gccggccgcg gccggcgcg gatgagtct gagtaacgat cactggctgg aacttctcc 60

<210> 47

25 <211> 63
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> sonda de oligonucleótidos

30 <400> 47
cccgcgcgcg gccggccgcg gatgagtct gagtaacgcc atgtatgcat gattggcgg 60
cca 63

35 <210> 48
<211> 61
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> sonda de oligonucleótidos

40 <400> 48
cccgcgcgcg gccggccgcg gatgagtct gagtaacgat gtagcatga ttggcggtcc 60
g 61

45 <210> 49
<211> 64
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> sonda de oligonucleótidos

50 <400> 49
ggcgcgcgcg cgcgcgcgcg gatgagtct gagtaacgct gttgtcctt gttcatctc 60
cttt 64

55 <210> 50
<211> 62
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> sonda de oligonucleótidos

60 <400> 50
ggcgcgcgcg cgcgcgcgcg gatgagtct gagtaacggt tgttcctgt tgcattctc 60
tg 62

65 <210> 51
<211> 62
<212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> sonda de oligonucleótidos

<400> 51
ggcggccgcc gggcgggcgc gatgagtct gagtaacgtg caacagtga atagaaagat 60

gt 62
 <210> 52
 <211> 60
 <212> ADN
 5 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 52
 ggcggccgcc gggcgggccc gatgagtcct gagtaacgca acagttgaat agaaagatgc 60
 10 <210> 53
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 15 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 53
 gactgcgtac caattccccg attacgatgc agctacgtcg atac gatcg gatcgctgt 60
 tctctaaatt gcattgtac 79
 <210> 54
 20 <211> 74
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 25 <400> 54
 gactgcgtac caattcccg ctcagtgcta tacggatcta cgtcgacatg ggcct cttgt 60
 ctggacgtgt taag 74
 <210> 55
 <211> 70
 30 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 55
 35 gactgcgtac caattcccg tagtccgtaa cgttagcatg cgtacagtcc tgaccgatt 6 0
 ttctgttaa 70
 <210> 56
 <211> 62
 <212> ADN
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 56
 gactgcgtac caattcccca tgtc gatagc ctgagcatcc cctctcaaca aggaagaagc 60
 45 gt 62
 <210> 57
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> artificial
 50 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 57
 gactgcgtac caattccat gctcagcatg acgtgaaggt tatgatctat ctctgcagag 60
 <210> 58
 55 <211> 56
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 60 <400> 58
 gactgcgtac caattcccc taacgttagc gggctcctgc aagcaattta tagttc 56
 <210> 59
 <211> 52
 <212> ADN
 65 <213> artificial
 <220>

<223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 59
 gactgctac caattccctc gaatgataga gaaggtgaa aaattgagag tt 52
 <210> 60
 5 <211> 46
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 10 <400> 60
 gactgctac caattcccg tcaagctct tgctataaca aaagaa 46
 <210> 61
 <211> 40
 <212> ADN
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 61
 gactgctac caattcccat gatgctgag gagcttgga 40
 20 <210> 62
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 62
 gactgctac caattcccat tgatccgagg ctcgtgt 37
 <210> 63
 <211> 65
 30 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 63
 35 gccgcgccg gccgcgccg gatgagtct gagtaacgct ggaagtattc agagttaga 60
 gtgaa 65
 <210> 64
 <211> 63
 <212> ADN
 40 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 64
 gccgcgccg gccgcgccg gatgagtct gagtaacggg aagtattcag agtttagagt 60
 45 gat 63

 EP 1 664 345 81
 <210> 65
 <211> 99
 50 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 65
 55 gtacaatgca atttagaaa caagcgtacc gatcgatgc gacgtagctg catcgtaac 60
 ggggaattgg tacgcagtcc cgggcggccc gggcgc ggc 99
 <210> 66
 <211> 65
 <212> ADN
 60 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 66
 ccgcccgcg cgcgccgcg gatgagtct gagtaacgca. gcaaagaatt agacatgat 60
 65 gagtt 65
 <210> 67

<211> 63
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 5 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 67
 ccgcccgcgc cgcgccgcgc gatgagtcct gagtaacgcc aaagatttag acatggagga 60
 gtc 63
 <210> 68
 10 <211> 94
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 15 <400> 68
 ctaaacacgt ccagacaaga ggcccatgtc gacgtagatc cgtatagcac tgagtcggga 60
 attggtacgc agtccgcggg cgcgcggcgc gcgg 94
 <210> 69
 <211> 64
 20 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 69
 25 cccgcgcgcg gggcgcgcgc gatgagtcct gagtaacgcc tagttgagc agtttgagc 60
 tgaa 64
 <210> 70
 <211> 62
 <212> ADN
 30 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 70
 cccgcgcgcg gggcgcgcgc gatgagtcct gagtaacgta gtttgagcag ttttgagctg 60
 ag 62
 <210> 71
 <211> 90
 <212> ADN
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 71
 ttaacaag a aaatcggtca ggactgtacg catgctaacg ttacggacta tcggaattg 60
 gtacgcagtc cgcggcgcgc gcggcgcggg 90
 45 <210> 72
 <211> 67
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 50 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 72
 gccggcgggc ccggccgggc gatgagtcct gagtaacgcc tcatattga tggtttgtt 60
 tttgta 67
 <210> 73
 55 <211> 65

 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 60 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 73
 gccggcgggc ccggccgggc gatgagtcct gagtaacggt catattgatg gttttgttt 60
 tgttg 65
 <210> 74
 65 <211> 82
 <212> ADN

<213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 74
 5 acgcttcttc cttgttgaga ggggatgctc aggctatcga catggggaat tggtagcgag 60
 tccgccggcc gggcccgcg gc 82
 <210> 75
 <211> 64
 <212> ADN
 10 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 75
 cgccgccggg cgccggggc gatgagtct gagtaacgca agcttgcaa cagcagaagt 60
 gtat 64
 15 <210> 76
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> artificial
 20 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 76
 cgccgccggg cgccggggc gatgagtct gagtaacgag cttgcaaca gcagaagtgt 60
 ac 62
 25 <210> 77
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> artificial
 30 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 77
 ctctgcagag atagatcata acctcacgt catgctgagc atgggaattg gtacgcagtc 60
 ggcccgcgcg cccggcgcg 80
 35 <210> 78
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 40 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 78
 ccgggcgggc cgggccgccc gatgagtct gagtaacgct ctctctgtt tgtgcagga 60
 gca 63
 45 <210> 79
 <211> 61
 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 50 <400> 79
 ccgggcgggc cgggccgccc gatgagtct gagtaacgca ctctgtttg ttgcaggagc 60
 t 61
 <210> 80
 <211> 76
 55 <212> ADN
 <213> artificial
 <220>
 <223> sonda de oligonucleótidos
 <400> 80
 60 gaactataaa ttgctgcag gaaccgcta acgttacggg gaattgttac gcagtcgggc 60
 ggcccggccc gcccgg 76
 <210> 81
 <211> 62
 <212> ADN
 65 <213> artificial
 <220>

ES 2 539 784 T3

<223> sonda de oligonucleótidos
<400> 81
gccggccgcg gcccgccgcg gatgagtct gagtaacgcg atcactggct ggaactctc 60
cc 62

5 <210> 82
<211> 60
<212> ADN
<213> artificial
<220>

10 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 82
gccggccgcg gcccgccgcg gatgagtct gagtaacgat cactggctgg aacttctccg 60
<210> 83
<211> 72
<212> ADN
<213> artificial
<220>

15 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 83
aactctcaat tttcaacct tctctatcat tcgagggaaat tggtacgcag tccgcgccg 60
gccgcggccg gc 72
<210> 84
<211> 63
<212> ADN
<213> artificial
<220>

20 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 84
cccgcgcgcg gccggccggc gatgagtct gagtaacgcc atgtatgcat gattggcgg 60
cca 63
<210> 85
<211> 61
<212> ADN
<213> artificial
<220>

25 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 85
cccgcgcgcg gccggccggc gatgagtct gagtaacgat gtatgcatga ttggcggtcc 60
g 61
<210> 86
<211> 66
<212> ADN
<213> artificial
<220>

30 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 86
ttctttgtt atagcaagag ctggaacggg gaattggtac gcagtcgccg gccggccgcg 60
cgcggg 66
<210> 87
<211> 64
<212> ADN
<213> artificial
<220>

35 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 87
ggcgcgcggc cgcgcgccg gatgagtct gagtaacgct gttgttcct gttgcatctc 60
cttt 64
<210> 88
<211> 62
<212> ADN
<213> artificial
<220>

40 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 88
ggcgcgcggc cgcgcgccg gatgagtct gagtaacggt tgttcctgt tgcattctc 60

45 <210> 89
<211> 62
<212> ADN
<213> artificial
<220>

50 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 89
ggcgcgcggc cgcgcgccg gatgagtct gagtaacggt tgttcctgt tgcattctc 60

55 <210> 90
<211> 62
<212> ADN
<213> artificial
<220>

60 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 90
ggcgcgcggc cgcgcgccg gatgagtct gagtaacggt tgttcctgt tgcattctc 60

65 <210> 91
<211> 62
<212> ADN
<213> artificial
<220>

ES 2 539 784 T3

tg 62
<210> 89
<211> 60
<212> ADN
5 <213> artificial
<220>
<223> sonda de oligonucleótidos
<400> 89
tcacaagctc ccatcgcatc atgggaattg gtacgcagtc cggcgcgcgg gccgcgcgcc 60
10 <210> 90

<211> 62
<212> ADN
<213> artificial
15 <220>
<223> sonda de oligonucleótidos
<400> 90
ggcggccgcc gggcgggccg ga tgagtct gagtaacgtg caacagttga atagaaagat 60
gt 62
20 <210> 91
<211> 60
<212> ADN
<213> artificial
<220>
25 <223> sonda de oligonucleótidos
<400> 91
ggcggccgcc gggcgggccg gatgagtct ga gtaacgca acagttgaat agaaagatgc 60
<210> 92
<211> 57
30 <212> ADN
<213> artificial
<220>
<223> sonda de oligonucleótidos
<400> 92
35 acacgagcct cggatcaatg ggaattgta cgcagtccgg cccgcccggc ggccgcc 57

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia de nucleótidos diana en una muestra de ácido nucléico, comprendiendo el procedimiento las siguientes etapas:

- 5
- a) proporcionar a una muestra de ácido nucléico una primera sonda (1) para cada secuencia diana (T) a detectar en la muestra, de manera que la primera sonda tiene una primera sección (4) específica de la diana que es complementaria de una primera parte de la secuencia diana (5) y una segunda sonda (2) para cada secuencia diana a detectar en la muestra, de manera que la segunda sonda tiene una segunda
- 10
- sección (6) específica diana, que es complementaria de una segunda parte de la secuencia diana (7), de manera que la primera y la segunda partes de la secuencia diana están situadas adyacentes entre sí (3), y de manera que la segunda sonda comprende además una sección de etiqueta (8) que es esencialmente no complementaria de la secuencia diana, de manera que la sección de etiqueta comprende una primera
- 15
- sección de unión a cebador (10);
- b) permitir que la primera y segunda secciones específicas diana de la primera y segunda sondas se reasocien a la primera y segunda partes de cada secuencia diana que se encuentra presente en la muestra, de manera que la primera y la segunda secciones específicas diana de las sondas son reasociadas de forma adyacente en la secuencia diana;
- 20
- c) proporcionar medios para conectar la primera y segunda secciones específicas diana reasociadas de forma adyacente a la secuencia diana, y permitiendo que la primera y segunda secciones específicas diana sean conectadas para producir una sonda conectada (11) correspondiente a una secuencia diana de la muestra;
- d) proporcionar a la mezcla resultante de la etapa c) un cebador compuesto (12) que comprende una
- 25
- sección (15) que es complementaria a, por lo menos, una parte de la primera sección específica diana y una segunda sección de unión a cebador (14);
- e) permitir que el cebador compuesto se reasocie a, como mínimo, una parte de la primera sección específica diana
- f) alargar el cebador compuesto;
- 30
- g) proporcionar un conjunto de cebadores que comprenden un cebador (18) que tiene una secuencia esencialmente idéntica a la primera sección de unión a cebador de la sonda conectada, y un segundo cebador (17) que es esencialmente idéntico a la segunda sección de unión a cebador del cebador compuesto;
- h) amplificar la mezcla resultante para producir una muestra amplificada que comprende amplicones (19) que son representaciones de las sondas conectadas;
- 35
- i) determinar la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia diana en la muestra detectando la presencia, ausencia o cantidad del amplicón correspondiente.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la proporción molar del primero, el segundo o el primero y el segundo cebadores con respecto al cebador compuesto está comprendida entre 10 y 1000.

40

3. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en el que se facilitan el primer y el segundo cebadores a la mezcla resultante de la etapa c) antes del alargamiento del cebador compuesto en la etapa f).

45

4. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el cebador compuesto comprende además una sección que es complementaria de la segunda sección específica diana.

5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que los lugares de unión de cebador son lugares de unión de cebador universales.

50

6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que, como mínimo, uno de dichos primer y segundo cebadores es un cebador selectivo.

7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que un amplicón correspondiente a una secuencia diana de la muestra difiere en longitud, masa o etiqueta de un amplicón que corresponde a una secuencia

55

diana diferente de la muestra.

8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la sección de etiqueta comprende una secuencia identificadora.

60

9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que para cada secuencia diana de la muestra se facilita al correspondiente amplicón una única secuencia identificadora.

10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la presencia, ausencia o cantidad de una secuencia diana en una muestra es detectada al detectar los amplicones que representan las sondas conectadas basándose en la masa molecular, longitud, etiqueta o secuencia.

65

11. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que el identificador proporciona la diferencia de masa molecular, longitud o secuencia.
- 5 12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia diana es seleccionada del grupo de ADN, ARN, ARNm, poliA+ ARN, ADNc, ADN genómico, ADN organular tal como ADN mitocondrial o ADN cloroplástico, ácidos nucleicos sintéticos, bibliotecas de ADN, bancos de clones o cualquier selección o combinación de los mismos.
- 10 13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la primera sonda comprende además una primera sección de cierre ("clamp section"), y una segunda sonda comprende además una segunda sección de cierre, en el que la primera y segunda secciones de cierre son capaces de hibridarse una a otra.
- 15 14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera o la segunda sonda comprenden otra región adicional que no es capaz de reasociarse a la secuencia de ácido nucleico diana, estando situada dicha región adicional en el extremo de la primera o segunda sonda, en la posición del lugar de unión entre la primera y segunda secciones de la secuencia de ácido nucleico diana.
- 20 15. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que la otra región adicional es capaz de crear una estructura de segmentación, y en el que al exponer la estructura de segmentación a un agente de segmentación, tendrá como resultado la segmentación de la estructura de segmentación cuando dichos estructura de segmentación y agente de segmentación son incubados en condiciones en las que pueda tener lugar la segmentación.
- 25 16. Utilización de un procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, para detección de alta producción de una multiplicidad de secuencias de nucleótidos diana.
- 30 17. Utilización, según la reivindicación 16, para la detección de polimorfismos, preferentemente polimorfismos de nucleótido único.
- 35 18. Utilización, según las reivindicaciones 16 ó 17, para determinar el perfilado de transcritos, para la detección de la abundancia cuantitativa de secuencias de ácido nucleico diana, para mapeado genético, descubrimiento de genes, selección asistida por marcador, control de la calidad de simiente, selección de híbrido, mapeado QTL, análisis segregante en masa, establecimiento de huella dactilar de ADN y para dar a conocer información relativa a trazos, resistencia a la enfermedad, rendimiento, vigor híbrido, y/o función de gen.
- 40 19. Conjunto de primera y segunda sondas de oligonucleótidos, en el que la primera sonda tiene una primera sección (4) específica de diana que es complementaria de una primera parte de la secuencia diana (5) y en el que la primera sonda no comprende una secuencia de unión a cebador, y en el que la segunda sonda tiene una sección específica diana (6) que es complementaria de una segunda parte de la secuencia diana de manera que la segunda sonda comprende una sección de etiqueta (8) que es esencialmente no complementaria de la secuencia diana y comprende una secuencia de unión a cebador (10), y un conjunto de cebadores y un cebador compuesto adecuados para llevar a cabo el procedimiento definido en las reivindicaciones 1-15.
- 45 20. Conjunto de cebadores y cebador compuesto adecuados para llevar a cabo el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
- 50 21. Kit que comprende las sondas de oligonucleótidos y cebadores de la reivindicación 19 o los cebadores de la reivindicación 20.
22. Utilización de un cebador compuesto en un procedimiento, según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
23. Kit, según la reivindicación 21 y 22, que comprende cebadores y/o sondas de oligonucleótidos, y/o sondas combinadas para utilización en un procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

FIG 1

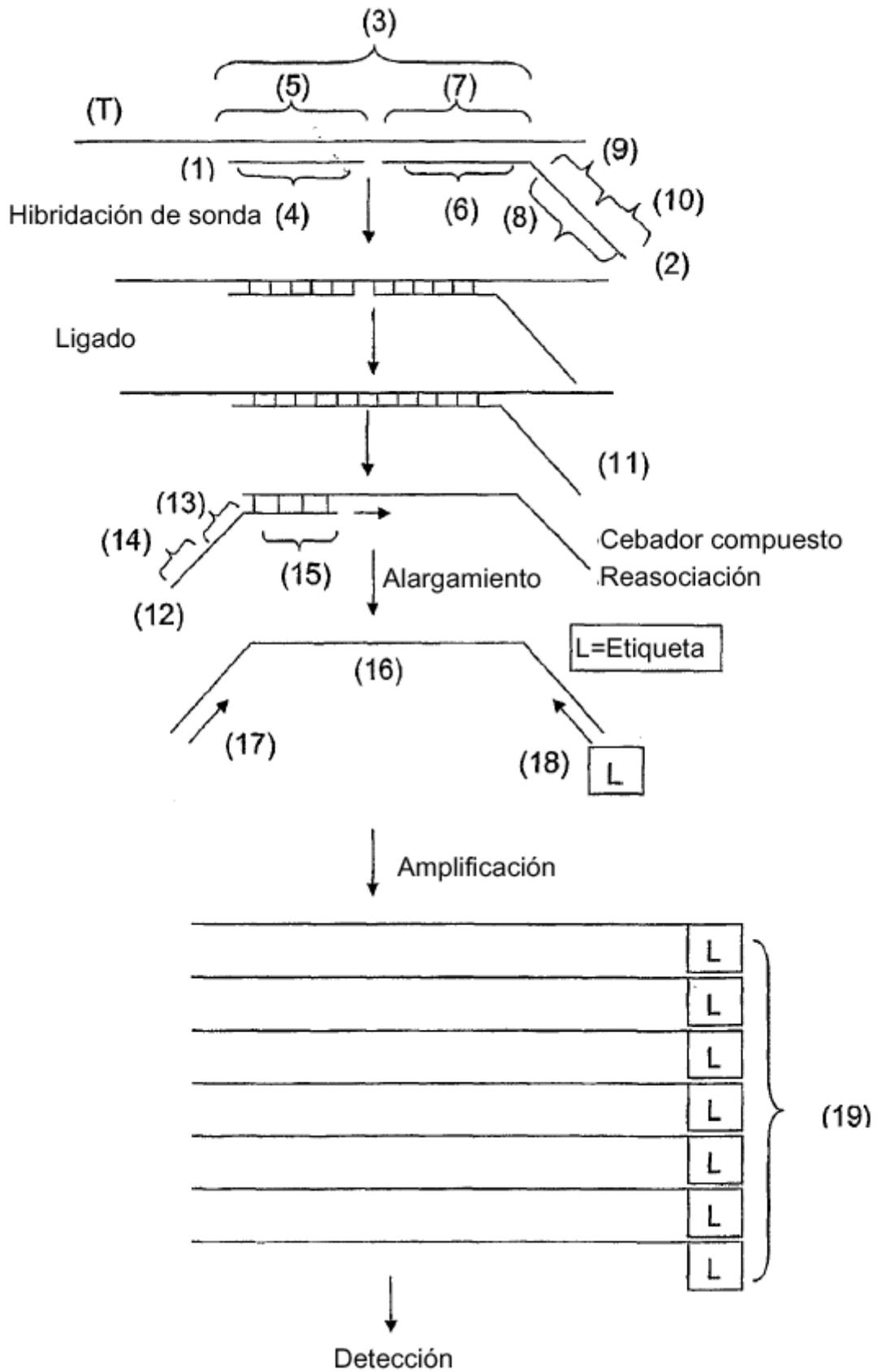


Fig 2A

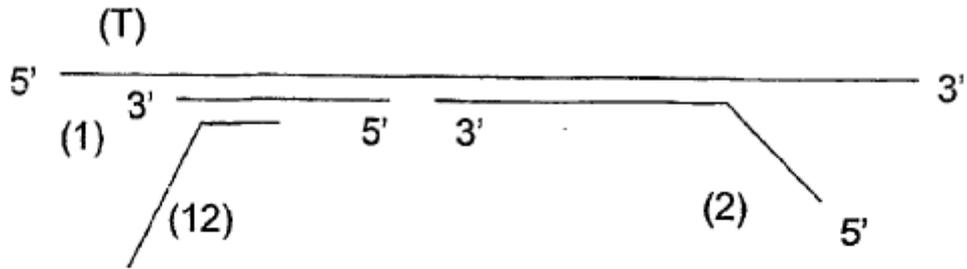


Fig 3A

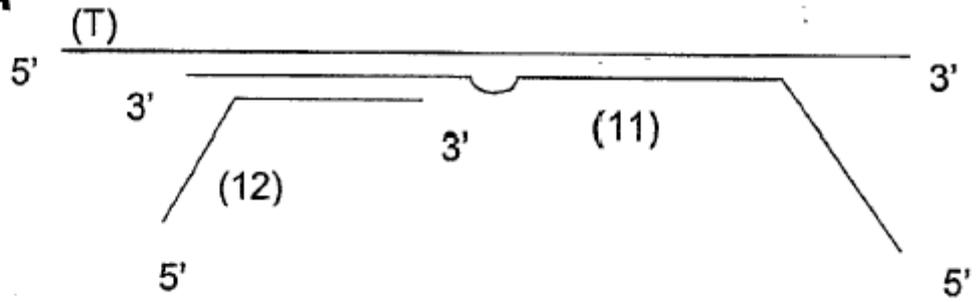


Fig 3B

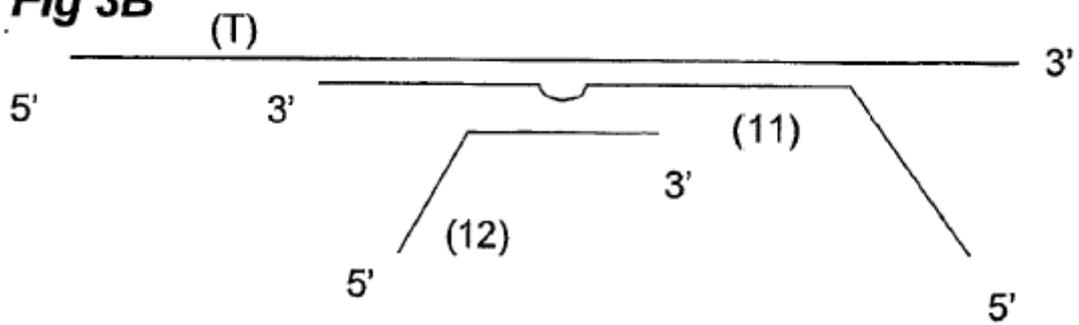


Fig 4A

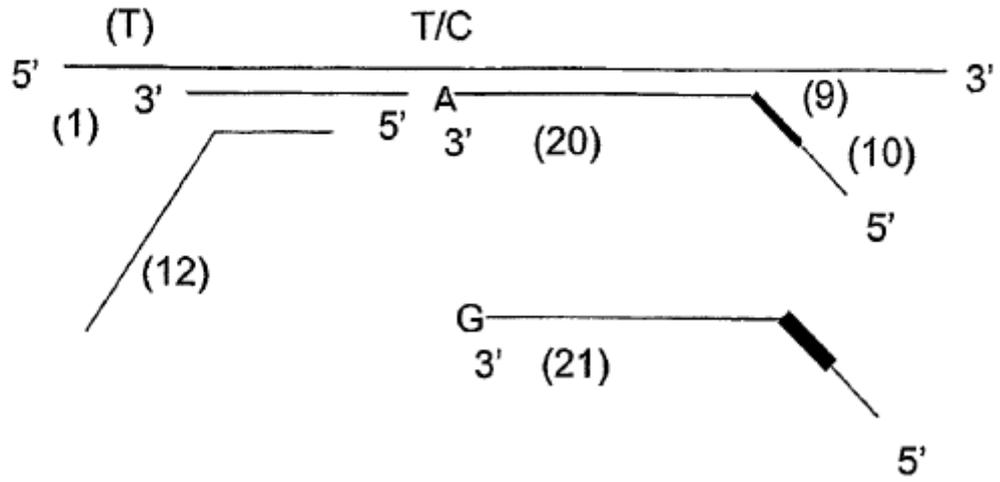


Fig 4B

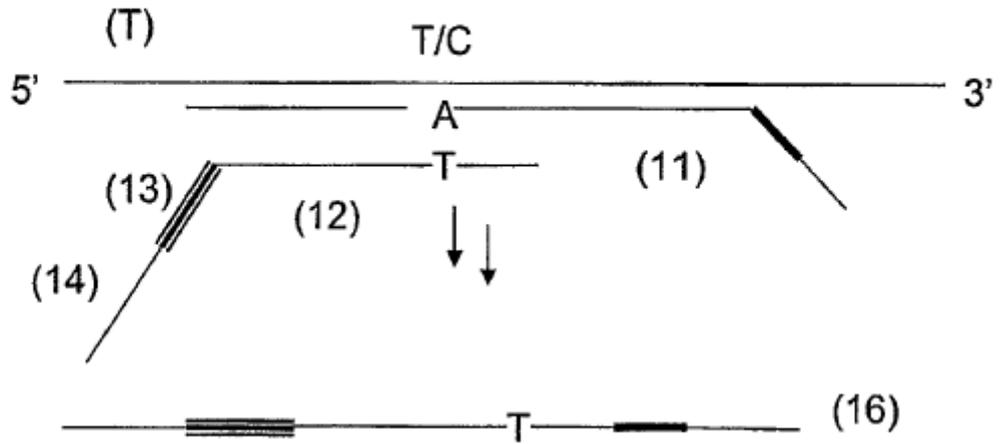
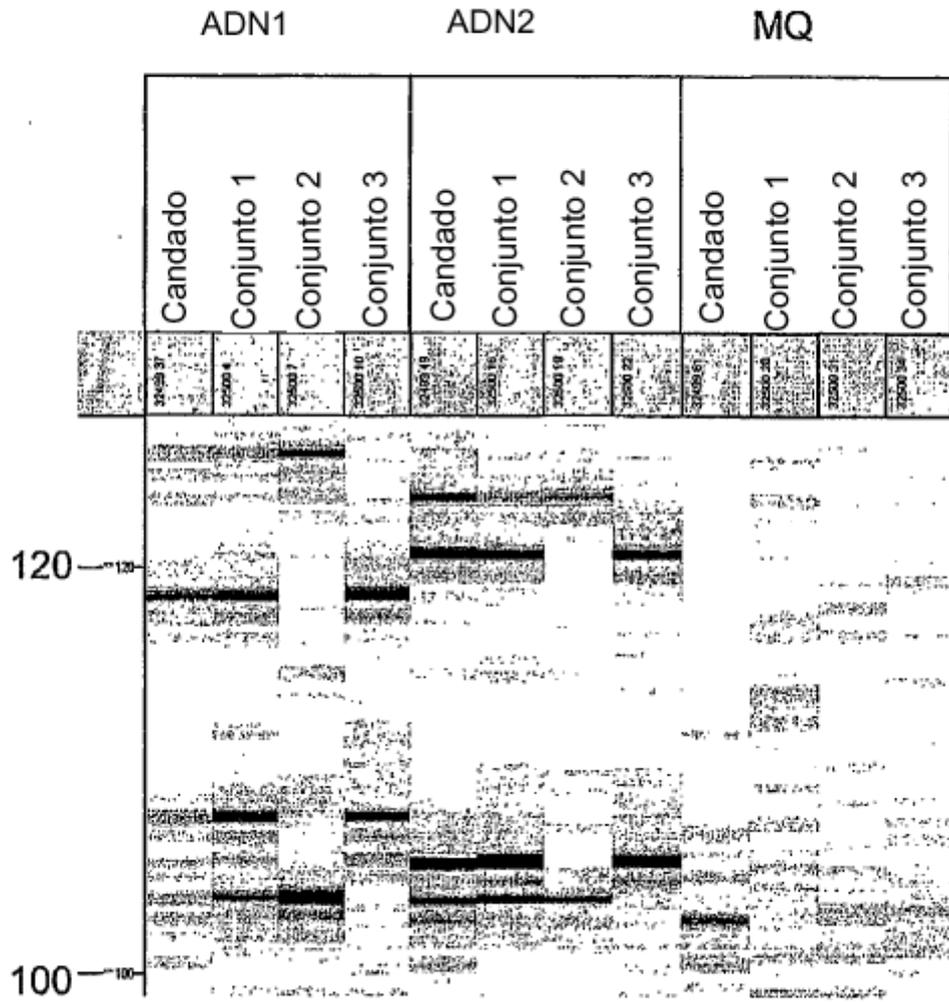
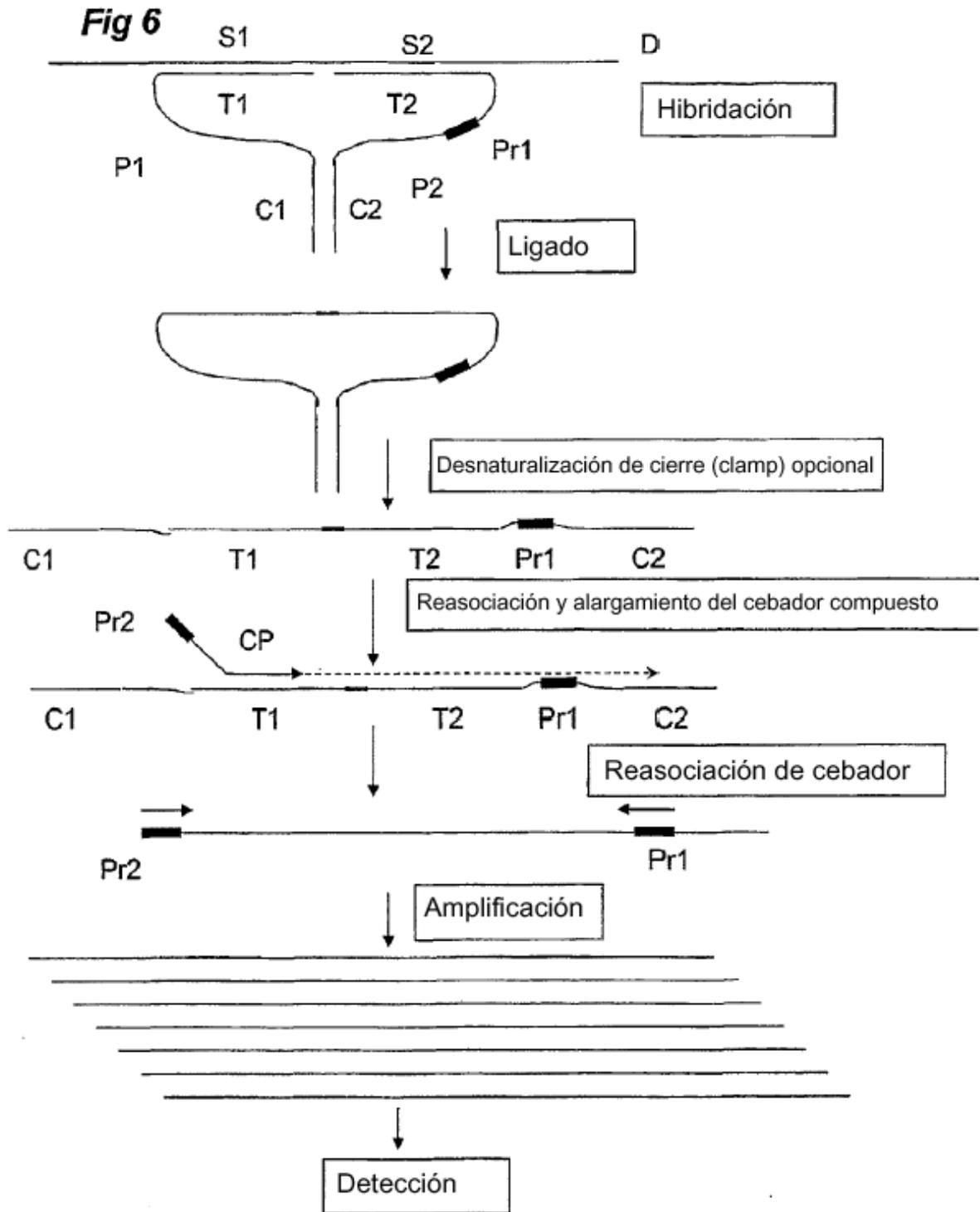


Fig 5





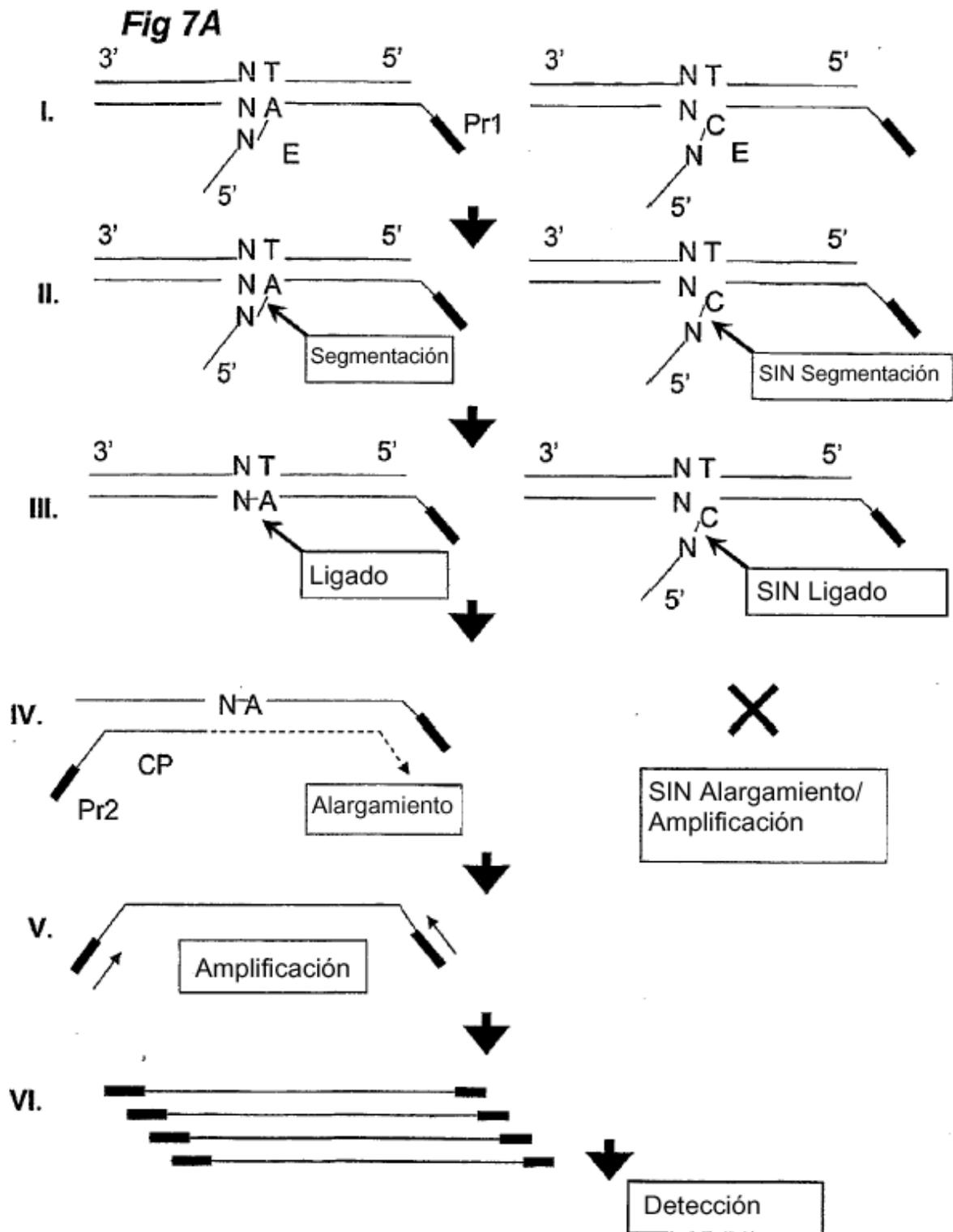


Fig 7B

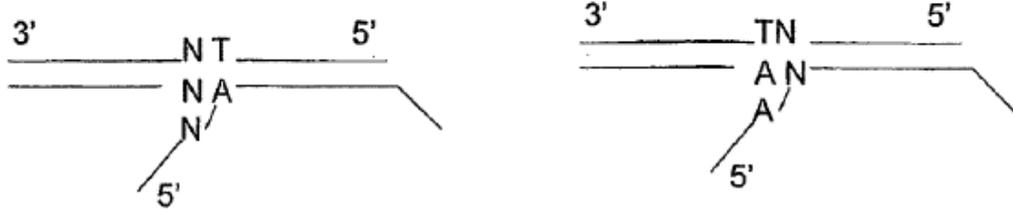


Fig 8

Tipos de sondas:

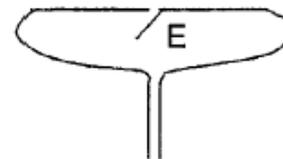
1. Sondas lineales



2. Sondas Candado/Circularizables



3. Sondas Candado/Semi-circularizables



4. Cebador compuesto de la presente invención

