

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 426**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2010** **E 10830217 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015** **EP 2522741**

54 Título: **Método de genotipado**

30 Prioridad:

16.11.2009 KR 20090110331

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

05.08.2015

73 Titular/es:

GENOMICTREE, INC. (100.0%)
829 Tamnip-dong Yuseong-gu
Daejeon 305-510, KR

72 Inventor/es:

AN, SUNG WHAN y
OH, MYUNG SOK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 542 426 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

Método de genotipado

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un método de genotipado múltiple que usa una secuencia ID, que se asigna a cada genotipo.

TÉCNICA ANTECEDENTE

Los métodos que se han desarrollado para detectar organismos infecciosos incluyen métodos tradicionales de identificación de las características físicas y químicas de patógenos mediante cultivo, y métodos de detección de las características genéticas específicas de los patógenos. Los métodos para detectar características genéticas incluyen análisis de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP), análisis de polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP), electroforesis en gel de campo pulsado, reacción en cadena de la polimerasa cebada arbitrariamente (AP-PCR), PCR a base de secuencia repetitiva, ribotipado, y secuenciación de ácido nucleico comparativa. Estos métodos son generalmente demasiado lentos, caros, irreproducibles, y técnicamente exigentes para ser usados en la mayoría de los escenarios de diagnóstico. Todos los métodos mencionados anteriormente requieren generalmente que se use una etapa electroforética en gel engorrosa, que el patógeno se haga crecer en cultivo, que se purifique su ADN genómico, y que la muestra no contenga más de un tipo de organismo. Estas limitaciones también se aplican a métodos de detección desarrollados recientemente que emplean micromatrices de alta densidad (Salazar et al., *Nucleic Acids Res.* 24:5056-5057, 1996; Troesch et al., *J. Clin. Microbiol.* 37:49-55, 1999; Lashkari et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 13057-13062, 1997). Mientras, la pirosecuenciación es un método de secuenciación de ADN basado en el principio de "secuenciación mediante síntesis de ADN", que se basa en la detección de la liberación de pirofosfato en la incorporación nucleotídica, a diferencia del método tradicional de secuenciación de Sanger. En el método de pirosecuenciación, se añaden secuencialmente cuatro trifosfatos desoxinucleotídicos (dNTPs) uno a uno durante la polimerización. El PPi unido a los dNTPs que se polimerizan emite luz mediante reacciones enzimáticas, y la luz emitida muestra un pico de señal según el orden de reacción de cada uno de los dNTPs añadidos secuencialmente, en el que el pico muestra un patrón que es alto o bajo en proporción al número de los dNTPs que se hicieron reaccionar, de manera que se puede determinar la secuencia nucleotídica del patógeno. En años recientes, se han usado métodos para detectar bacterias o virus patógenos en muestras clínicas basados en pirogramas obtenidos mediante pirosecuenciación de los productos de PCR de secuencias específicas de los patógenos (Travasso, CM et al, *J. Biosci.*, 33:73-80, 2008; Gharizadeh, B et al., *Molecular and Cellular Probes*, 20, 230-238, 2006; Hoffmann, C et al., *Nucleic Acid Research*, 1-8, 2007).

Sin embargo, en la técnica de pirosecuenciación, la secuencia nucleotídica se lleva a cabo según el orden de distribución de dNTPs, y un nucleótido en el molde, que está ausente en el orden de distribución, no reacciona, y de este modo no forma un pico. Sin embargo, cuando aparecen continuamente nucleótidos idénticos en el orden de distribución, las alturas de los picos se determinan según las intensidades de luz emitida. En consecuencia, cuando existen diversos patógenos en la misma muestra, los picos de los nucleótidos de los diversos patógenos aparecen solapados, haciendo así difícil identificar los genotipos a través de la interpretación de los pirogramas. Particularmente, a medida que aumenta el número de secuencias repetitivas, los picos de las secuencias anteriores se hacen relativamente más bajos. De este modo, en el caso de infección con múltiples patógenos, es difícil detectar un pico según el grado de infección con cada patógeno.

En consecuencia, los presentes inventores han realizado esfuerzos exhaustivos para permitir identificar los genotipos de interés mediante programas únicos y simples obtenidos cuando se lleva a cabo el genotipado usando pirosecuenciación. Como resultado, se ha encontrado que, cuando una secuencia ID, que tiene una marca ID, un indicador y una marca final, mientras que existe independientemente de la secuencia específica a tipar, está ligada con la secuencia específica y se usa para llevar a cabo la pirosecuenciación, se puede obtener un programa único y simple para cada genotipo, completando de ese modo la presente invención.

El documento WO 2008/061193 describe la secuenciación multietiqueta y análisis ecogenómico.

El documento WO 2009/049889 describe un método de genotipado de HLA de alta resolución y alto rendimiento mediante secuenciación clonal.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Es un objeto de la presente invención proporcionar un método de genotipado que usa una secuencia ID que es útil para llevar a cabo la pirosecuenciación a fin de permitir identificar los genotipos de interés mediante programas únicos y simples.

Todavía otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para genotipar HPV usando dicha secuencia ID.

Se describe además un método para detectar la mutación del gen KRAS usando dicha secuencia ID.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para detectar virus respiratorio usando dicha secuencia ID.

5 Se describe una secuencia ID para el genotipado que consiste en A(ID-S)_n-E, en la que ID es una marca ID que es un solo nucleótido seleccionado de entre A, T, C y G; S es un indicador, que es un nucleótido enlazado con la marca ID adyacente y diferente del de la marca ID adyacente; E es una marca final, que es un nucleótido diferente de aquél del indicador; y n es un número natural que oscila de 1 a 32.

También se describe una secuencia ID para el genotipado que consiste en ID-S, en la que ID es una marca ID que es un nucleótido seleccionado de entre A, T, C y G, y S es un indicador que es un nucleótido enlazado con la marca ID adyacente y diferente de aquél de la marca ID adyacente.

10 Se describe también un cebador de genotipado que comprende una secuencia específica del gen para el genotipado ligada a dicha secuencia ID.

La presente invención proporciona un método para genotipar diferentes secuencias diana en la misma muestra, que comprende

15 i) construir cebadores de genotipado, en el que los cebadores comprenden una secuencia específica del gen ligada a una secuencia ID que se asigna a cada genotipo, en el que cada secuencia ID consiste en una marca ID que es un nucleótido seleccionado entre A, T, C y G, N indicadores (S) que son nucleótidos dispuestos en el mismo orden y diferentes de la marca ID adyacente, una marca final (E) que es un nucleótido que sigue y es diferente del indicador más posterior; en el que N es un número natural que oscila de 2 a 32 y en el que la marca ID se puede situar delante del indicador y puede ser uno de tres nucleótidos
20 diferentes que consiste en un nucleótido diferente del indicador situado detrás de él, o la marca o marcas ID pueden estar situadas entre dos indicadores y pueden ser uno de dos nucleótidos diferentes que consiste en un nucleótido diferente de los indicadores situados a ambos lados de él;

ii) amplificar moldes de los genes diana mediante PCR usando los cebadores de genotipado de i), obteniendo de ese modo productos de PCR; y

25 iii) secuenciar los productos de PCR de la etapa ii) con distribución de dNTPs según el orden de las secuencias ID diseñado en la etapa i), orden en el cual el dNTP para la marca final no está incluido;

iv) genotipar según el nucleótido y situación de la marca ID.

La presente invención también proporciona un método para genotipar HPV según el método anterior, en el que la secuencia específica del gen se selecciona entre secuencias nucleotídicas de SEC ID NOs: 1 a 15.

30 Se describe un método para detectar mutación del gen KRAS, comprendiendo el método las etapas de: (a) diseñar una secuencia ID para genotipado según la mutación génica de cada KRAS, consistiendo la secuencia ID en (ID-S)_n-E, en el que ID es una marca ID que es un nucleótido seleccionado entre A, T, C y G; S es un indicador que es un nucleótido ligado con la marca ID adyacente y diferente del de la marca ID adyacente; E es una marca final que es un nucleótido diferente de aquél del indicador, y n es un número natural que oscila de 1 a 32; (b) construir un
35 cebador de detección compuesto de una secuencia de cebador de pirosecuenciación, la secuencia ID, y una secuencia específica para una mutación del gen KRAS que corresponde a la secuencia ID; (c) amplificar una muestra que contiene el gen KRAS mediante PCR usando el cebador de detección; y (d) someter el producto de la PCR amplificado a pirosecuenciación para obtener un pirograma de la secuencia ID, y detectar la mutación del gen KRAS según la secuencia ID.

40 La presente invención también proporciona un método para detectar virus respiratorio según el método anterior, en el que la secuencia específica del gen es SEC ID NO:41 para el virus de la gripe A, SEC ID NO:42 para el virus de la gripe B, SEC ID NO:43 para RSV B, SEC ID NO:44 para rinovirus, y SEC ID NO:45 para coronavirus OC 43.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 La FIG. 1 muestra un procedimiento de pirosecuenciación, que se lleva a cabo según un orden de distribución, y el pirograma resultante.

La FIG. 2 muestra el cambio en los picos del pirograma según las secuencias analíticas.

La FIG. 3 muestra el cambio en los picos del pirograma según las secuencias analíticas.

La FIG. 4 muestra el cambio en picos del pirograma, que resulta de la inserción de un indicador.

La FIG. 5 muestra pirogramas obtenidos para una mezcla de dos secuencias analíticas.

50 La FIG. 6 muestra pirogramas obtenidos en presencia o ausencia de un indicador en un orden de distribución.

La FIG. 7 muestra los cambios en patrones del pirograma según los cambios en una secuencia posterior a un indicador.

La FIG. 8 muestra muestra pirogramas obtenidos en ausencia de una marca final.

La FIG. 9 muestra muestra pirogramas obtenidos en ausencia de una marca final.

5 La FIG. 10 muestra el cambio en el orden de distribución según el cambio en el orden de un indicador.

La FIG. 11 muestra un método para diseñar una secuencia ID según un orden de distribución.

La FIG. 12 muestra un método para diseñar un orden de distribución.

La FIG. 13 muestra pirogramas obtenidos mediante secuencias ID según órdenes de distribución.

La FIG. 14 muestra un método para diseñar una secuencia ID tras determinar un orden de distribución.

10 La FIG. 15 muestra pirogramas obtenidos mediante secuencias ID según órdenes de distribución.

La FIG. 16 muestra un método para genotipar HPV usando una secuencia ID de la presente invención.

La FIG. 17 muestra un sistema general para detectar mutaciones *KRAS*.

La FIG. 18 muestra un método para detectar mutaciones *KRAS* usando secuencias ID de la presente invención.

15 La FIG. 19 muestra los resultados obtenidos genotipando 15 tipos de HPV usando secuencias ID de la presente invención.

La FIG. 20 muestra los resultados obtenidos genotipando dos o más tipos de HPV.

La FIG. 21 muestra los resultados de detectar mutaciones *KRAS* usando secuencias ID de la presente invención.

20 La FIG. 22 muestra los resultados de detectar múltiples mutaciones *KRAS* usando secuencias ID de la presente invención.

La FIG. 23 muestra los resultados de detectar mutaciones *KRAS* en tejido de cáncer colorrectal usando secuencias ID de la presente invención.

25 La FIG. 24 muestra un método para detectar infección por virus respiratorio usando una secuencia ID de la presente invención.

La FIG. 25 muestra los resultados de detectar infecciones individuales de 5 tipos de virus respiratorios usando secuencias ID de la presente invención.

La FIG. 26 muestra los resultados de detectar múltiples infecciones de 5 tipos de virus respiratorios usando secuencias ID de la presente invención.

30 MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Otras características y realizaciones de la presente invención serán más manifiestas a partir de las siguientes descripciones detalladas y las reivindicaciones anejas.

La presente invención se refiere a un método para genotipar diferentes secuencias diana en la misma muestra, que comprende

35 i) construir cebadores de genotipado, en el que los cebadores comprenden una secuencia específica del gen ligada a una secuencia ID que se asigna a cada genotipo, en el que cada secuencia ID consiste en una marca ID que es un nucleótido seleccionado entre A, T, C y G, N indicadores (S) que son nucleótidos dispuestos en el mismo orden y diferentes de la marca ID adyacente, una marca final (E) que es un nucleótido que sigue y es diferente del indicador más posterior; en el que N es un número natural que oscila
40 de 2 a 32 y en el que la marca ID se puede situar delante del indicador y puede ser uno de tres nucleótidos diferentes que consiste en un nucleótido diferente del indicador situado detrás de él, o la marca o marcas ID pueden estar situadas entre dos indicadores y pueden ser uno de dos nucleótidos diferentes que consiste en un nucleótido diferente de los indicadores situados a ambos lados de él;

45 ii) amplificar moldes de los genes diana mediante PCR usando los cebadores de genotipado de i), obteniendo de ese modo productos de PCR; y

iii) secuenciar los productos de PCR de la etapa ii) con distribución de dNTPs según el orden de las secuencias ID diseñado en la etapa i), orden en el cual el dNTP para la marca final no está incluido;

iv) genotipar según el nucleótido y situación de la marca ID.

5 Se describe una secuencia ID para genotipado que consiste en A(ID-S)_n-E, en la que ID es una marca ID que es un nucleótido seleccionado de entre A, T, C y G; S es un indicador, que es un nucleótido ligado con la marca ID adyacente y diferente del de la marca ID adyacente, E es una marca final, que es un nucleótido diferente de aquél del indicador; y n es un número natural que oscila de 1 a 32.

10 Se describe una secuencia ID para el genotipado que consiste en ID-S, en la que ID es una marca ID que es un nucleótido seleccionado de entre A, T, C y G, y S es un indicador que es un nucleótido ligado con la marca ID adyacente y diferente de aquél de la marca ID adyacente.

Como se usa aquí, la expresión "secuencia ID" no es una secuencia específica conservada en cada gen, y se refiere a una secuencia nucleotídica construida artificialmente que se puede asignar específicamente a cada genotipo en el método de genotipado de la presente invención.

15 Como se usa aquí, la expresión "marca ID adyacente" significa una marca ID situada delante de o detrás del indicador.

La secuencia ID se usa para llevar a cabo la pirosecuenciación, de manera que el pirograma se distingue mediante un nucleótido según el orden de distribución determinado usando el indicador y la marca final, que permite que se forme el pico del pirograma en una localización específica sin estar influido por la siguiente secuencia.

20 En esta invención, un nucleótido que forma un pico específico según el orden de distribución en este procedimiento de pirosecuenciación se denomina "marca ID", y una secuencia que comprende el indicador y la marca final, que es una secuencia requerida para formar un único pico mediante la marca ID, se denomina "secuencia ID". Puede haber tres tipos de marcas ID que no están influidas por una secuencia génica situada próxima a la marca ID, mediante el uso de un indicador y una marca final, y de este modo el número de tipos que se pueden genotipar es tres. A fin de llevar a cabo un genotipado múltiple de más de tres tipos, se requieren indicadores y marcas ID adicionales.

25 En la pirosecuenciación general, la secuenciación nucleotídica se lleva a cabo según el orden de distribución (el orden de adición de nucleótidos en la síntesis de ADN), y si un molde tiene un nucleótido ausente en el orden de distribución, no se producirá reacción, y de este modo no se formará pico, pero si una secuencia idéntica a la secuencia incluida en el orden de distribución está presente de forma continua en el molde, la altura del pico se forma según la intensidad de la luz emitida (FIG. 1).

30 Se cree que, cuando se usa un nucleótido como una secuencia analítica, se puede distinguir por cuatro picos diferentes en el pirograma. Sin embargo, de hecho, una secuencia próxima a la secuencia analítica es una de A, T, G y C, y de este modo en al menos un caso, se forman necesariamente múltiples picos (si las secuencias idénticas se repiten, se forma un gran pico). Como resultado, hay como máximo tres métodos capaces de distinguir un único pico mediante un solo nucleótido (FIG. 2).

35 Además, se forma un pico indeseado debido a una secuencia que sigue a la secuencia analítica, y si nucleótidos repetidos están presentes continuamente tras la secuencia de análisis, se producirán reacciones de polimerización de forma inmediata para formar un único pico. Sin embargo, debido a que aumenta la intensidad de la luz generada en las reacciones, la altura del pico aumenta proporcionalmente, y si existen tales secuencias repetitivas, la altura del pico para un único nucleótido disminuye relativamente (FIG. 3). Debido a tales problemas, hay un límite al genotipado múltiple que usa un único nucleótido. Para resolver tales problemas, en la secuencia ID de la presente invención, una secuencia que separa la "secuencia analítica" para no estar influida por la siguiente secuencia y permite el análisis adicional se denomina "indicador" (FIG. 4).

Además, un diseño del orden de distribución para la pirosecuenciación varía dependiendo de la secuencia del indicador.

45 Si un nucleótido en una secuencia analítica que consiste en dos nucleótidos se establece como un indicador, cada uno de tres nucleótidos se puede situar en el sitio del nucleótido que queda (si se sitúan secuencias idénticas, los picos se solaparán, y de este modo tres nucleótidos, excluyendo el nucleótido asignado como el indicador, se pueden situar en el sitio del un nucleótido que queda), y el nucleótido situado delante del indicador se puede fijar como se muestra en la FIG. 4, de manera que el pico se puede distinguir independientemente sin estar influido por el nucleótido situado detrás de la secuencia analítica.

El nucleótido individual separado por el indicador en la secuencia analítica se denomina "marca ID", y como se muestra en la FIG. 4, es posible el genotipado múltiple de tres tipos usando una marca ID y un indicador. Aquí, la posición del indicador en el orden de distribución es después de la marca ID (debido a que solamente la marca ID situada delante del indicador no está influida por la secuencia situada tras la secuencia analítica).

En un aspecto de la presente invención, a fin de genotipar una secuencia analítica binucleotídica que consiste en una marca ID de un nucleótido y un indicador, como se muestra en la FIG. 5, las secuencias analíticas de tipo 1 (secuencia analítica: AC), tipo 2 (secuencia analítica: TC) y tipo 3 (secuencia analítica: GC) se sintetizan y se someten a pirosecuenciación. Como resultado, para tipo 1, el pico de A aparece en el orden 1 de distribución, y el pico de C aparece en el orden 4 de distribución. Para el tipo 2, el pico de T aparece en el orden 2 de distribución, y el pico de C aparece en el orden 4 de distribución. Para el tipo 3, el pico de G aparece en el orden 3 de distribución, y el pico de C aparece en el orden 4 de distribución. Aquí, A, T y G, que son los primeros nucleótidos de las secuencias analíticas, son respectivamente marcas ID, y C, que es el segundo nucleótido de cada una de las secuencias analíticas, es un indicador.

Para llevar a cabo el genotipado múltiple para los tres tipos de secuencias analíticas, como se muestra en FIG. 5(a), se pirosecuencia una muestra que consiste en el tipo 1 (secuencia analítica: AC) y tipo 2 (secuencia analítica: TC) en el orden de dispensación de A→T→G→C. Como resultado, el pico de A aparece en la secuencia 1 de distribución, el pico de T aparece en la secuencia 2 de distribución, no aparece ningún pico en la secuencia 3 de distribución, y el pico de C, que es el indicador, aparece en la secuencia 4 de distribución. Aquí, el pico del indicador C es dos veces mayor que los picos de A y T y está presente en ambos tipos, y de este modo la cantidad de la reacción es dos veces mayor y la intensidad del pico es también dos veces mayor que aquellas de A y T.

De forma similar, como se muestra en FIG. 5(b), en el caso de una muestra que consiste en tipo 1 (secuencia analítica: AC) y tipo 3 (secuencia analítica: GC), el pico de A aparece en el orden 1 de distribución, el pico de G aparece en el orden 3 de distribución, no aparece ningún pico en el orden 2 de distribución, y el pico de C, que es el indicador, aparece en el orden 4 de distribución. Aquí, el pico del indicador C es dos veces mayor y está presente en ambos tipos, y de este modo la cantidad de la reacción es dos veces mayor y la intensidad del pico es también dos veces mayor.

Además, como se muestra en in FIG. 5(c), en el caso de una muestra que consiste en el tipo 2 (secuencia analítica: TC) y tipo 3 (secuencia analítica: GC), el pico de T aparece en el orden 2 de distribución, el pico de G aparece en el orden 3 de distribución, no aparece ningún tipo en el orden 1 de distribución, y el pico de C, que es el indicador, aparece en el orden 4 de distribución. Aquí, el pico del indicador C es dos veces mayor y está presente en ambos tipos, y de este modo la cantidad de la reacción es dos veces mayor y la intensidad del pico es también dos veces mayor.

En consecuencia, la marca ID se puede separar de las siguiente secuencia mediante el indicador, y puede estar presente independientemente de la siguiente secuencia. De este modo, se puede usar ventajosamente en el genotipado múltiple.

Los resultados del genotipado en la pirosecuenciación llevada a cabo usando una secuencia analítica que consiste en una "marca ID" y un "indicador" no están influidos por si la secuencia del indicador está insertada o no en el orden de distribución. Sin embargo, si la secuencia del indicador no está insertada en el orden de distribución, habrá un problema por cuanto no se puede determinar un error mecánico (FIG. 6). Por esta razón, la secuencia del indicador se inserta preferiblemente en el orden de distribución para hacer posible determinar si la pirosecuenciación se llevó a cabo normalmente o no. Además, debido a que el pico de la marca ID en el genotipado múltiple en la pirosecuenciación no es capaz de ser mayor que el pico del indicador, esto también se puede usar como una referencia para determinar el error de la pirosecuenciación (FIG. 6).

Marca final

El indicador funciona para separar la marca ID de un único nucleótido de la siguiente secuencia para que no esté influida por la siguiente secuencia. Sin embargo, cuando la siguiente secuencia es idéntica al indicador, la altura del pico aumenta en proporción al incremento en la intensidad de luz emitida. Por esta razón, puede ocurrir el fenómeno de que la altura del pico de la marca ID cambie (FIG. 7). Para resolver este fenómeno, se puede insertar una secuencia nucleotídica diferente del indicador tras el indicador, a fin de evitar que la marca ID y el indicador se vean influidos por la siguiente secuencia. Aquí, la secuencia insertada se denomina "marca final", y la marca final no está insertada en el orden de distribución. La marca final funciona para evitar que la marca ID y el indicador se vean influidos por la siguiente secuencia, y hacer que la altura del pico sea constante.

En otras palabras, en el caso en el que la marca final está ausente como se muestra en la FIG. 8, si el tipo 1 (secuencia analítica: AC) es seguido de CA y si la pirosecuenciación se lleva a cabo en el orden de distribución de A→T→G→C, el pico de C en el orden 3 de distribución será más grande que el pico de A en el orden 1 de distribución, debido al C solapante próximo al indicador C. De forma similar, si el tipo 3 (secuencia analítica: GC es seguido de CC, el pico de G en el orden 3 de distribución será mucho más pequeño que el pico excesivamente grande de C en el orden 4 de distribución, debido a que C próximo al indicador C se solapa tres veces.

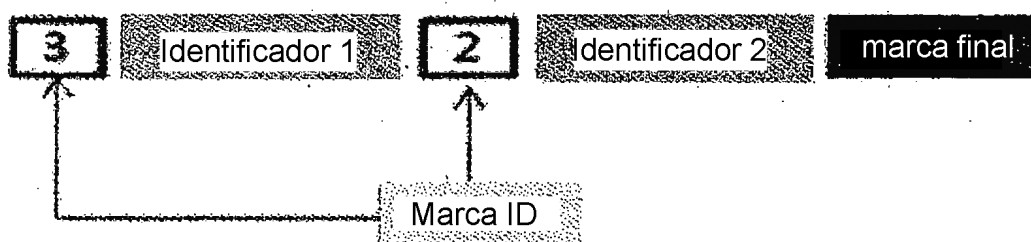
En el caso en el que la marca final esté presente como se muestra en la FIG. 9, si el tipo 1 (secuencia analítica: AC) es seguido de CA y si T como la marca final se inserta entre medias y si la pirosecuenciación se lleva a cabo en el orden de distribución de A→T→G→C, C no solapará debido a la inserción de T próximo al indicador C, y la altura del pico de A en el orden 1 de distribución y la altura del pico de C en el orden 3 de distribución serán constantes. De

forma similar, si el tipo 3 (secuencia analítica: GC) es seguido de CC, C próximo al indicador no solapará debido a la inserción del T de la marca final próximo al C del indicador, y la altura del pico de G en el orden 3 de distribución será igual a la altura del pico de C en el orden 4 de distribución. En la presente invención, el número N de indicadores que se pueden añadir es preferiblemente 2-32, y si N es 32, es posible genotipar 65 tipos.

- 5 Cuando se usa una pluralidad de marcas ID y una pluralidad de indicadores, es posible el genotipado de 3 o más tipos.

3 nucleótidos diferentes

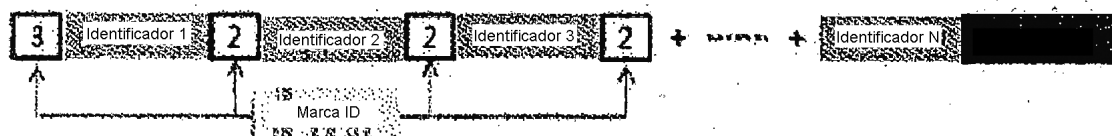
2 nucleótidos diferentes



En este caso, las secuencias nucleotídicas adyacentes deberían de diferir entre sí a fin de obtener pirogramas de picos individuales. La marca ID puede estar situada delante del indicador o entre dos indicadores. La marca ID situada entre dos indicadores puede consistir en dos nucleótidos diferentes, debido a que debe de tener nucleótidos diferentes de los indicadores situados a ambos lados de la misma. Además, la marca ID situada delante del indicador puede consistir en tres nucleótidos diferentes, debido a que debe de tener un nucleótido diferente del indicador situado detrás de la misma.

Aquí, el nucleótido del indicador 1 debería de ser idéntico al nucleótido del indicador 3, y la secuencia nucleotídica del indicador más posterior tampoco debe de ser idéntica a la secuencia base de la marca final.

3 nucleótidos diferentes 2 nucleótidos diferentes 2 nucleótidos diferentes 2 nucleótidos diferentes



En la presente invención, la secuencia que consiste en la marca ID, el indicador y la marca final se denomina "secuencia ID". En la presente invención, la secuencia ID también puede estar compuesta de la marca ID y del indicador. Preferiblemente, consiste en la marca ID, el indicador y la marca final.

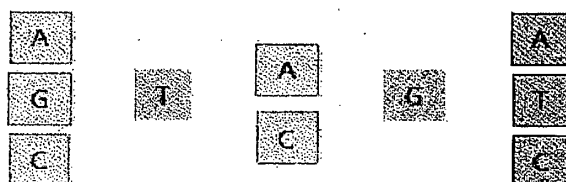
- 20 Siempre que se añada un indicador, la secuencia ID de la presente invención permite que se distingan dos tipos adicionales. De este modo, permite que se distingan $2N + 1$ (N = el número de indicadores) tipos mediante genotipado según la situación de la marca ID.

Las secuencias nucleotídicas que excluyen la marca ID y la marca final se usan como los indicadores. A fin de distinguir las marcas ID de la secuencia ID en el mismo orden de distribución, las secuencias nucleotídicas de los indicadores en la secuencia ID deben de estar situadas en el mismo orden. En otras palabras, solamente la marca ID debería de estar situada delante de o entre los indicadores, y los indicadores se deberían de disponer en el mismo orden. Esto es debido a que, cuando la disposición de los indicadores cambia, el orden de distribución también cambia debido a la característica de pirosecuenciación (FIG. 10).

Diseño de secuencia ID

- 30 Caso de obtener secuencia ID tras determinar los indicadores

En el caso en el que una secuencia ID comprenda dos indicadores, si se usan T y G como indicador 1 e indicador 2, respectivamente, una marca ID que esté situada delante del indicador 1 (T) puede ser uno cualquiera de A, G y C, una marca ID que esté situada entre el indicador 1 y 2 puede ser A o C, y una marca final puede ser uno cualquiera de A, T y C.



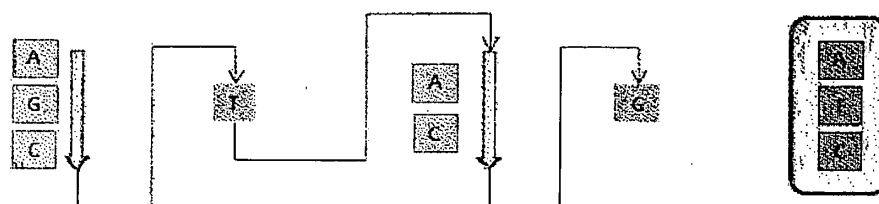
De este modo, como se muestra en la FIG. 11, hay los siguientes cinco casos en los que la secuencia ID que consiste en la marca ID, el indicador y la marca final se puede producir usando una marca ID: tres casos (A, G y C) en los que la marca ID está situada delante del indicador 1; y dos casos (A y C) en los que la marca ID está situada entre el indicador 1 y el indicador 2.

5 Aquí, debido a que las marcas finales no están incluidas en el orden de distribución, las marcas finales en las secuencias ID pueden ser iguales o diferentes.

Diseño del orden de distribución

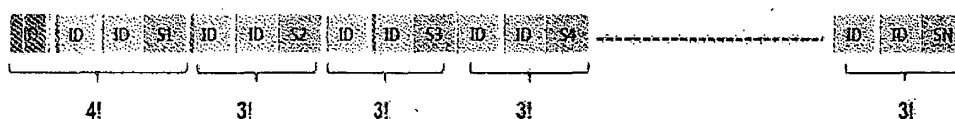
En el genotipado que se lleva a cabo usando la secuencia ID, las marcas ID situadas en la secuencia ID forman secuencialmente picos independientes según el orden de distribución. El orden de distribución se puede diseñar según diversas permutaciones que se pueden formar usando el indicador como un límite.

En la siguiente figura se muestra uno de los órdenes de distribución que se pueden formar según la secuencia ID, y la marca final no está incluida en el orden de distribución:



La FIG. 12 muestra 12 órdenes de distribución que se pueden formar según la secuencia ID, y se puede usar uno
15 seleccionado de entre los 12 órdenes de distribución.

El número de órdenes de distribución que se puede formar es 4×6^N (N = número de indicadores). De este modo, si el número de indicadores es 2, entonces se pueden obtener 144 órdenes de distribución.



En consecuencia, como se muestra en la FIG. 13, la secuencia ID tiene picos característicos según el orden de distribución.

Método para diseñar una secuencia ID después de determinar el orden de distribución

Una secuencia ID consiste en una marca ID, uno o más indicadores y al menos una marca final. En la secuencia ID, los nucleótidos adyacentes deben de diferir entre sí, y el orden de distribución debe de tener las mismas condiciones como se describe anteriormente. Además, la secuencia ID también se puede diseñar después de determinar el orden de distribución.

En el orden de distribución, tres marcas ID se pueden situar delante del indicador 1, y dos marcas ID se pueden situar entre dos indicadores. Cuando se usa esta regla, se puede obtener la siguiente secuencia ID con el orden de distribución.

30 Por ejemplo, cuando se han de separar 9 genotipos, se necesitan 4 indicadores según la fórmula ($2N + 1$). Como se muestra en la FIG. 14, si el orden de distribución se determina de manera que A, T, G y C están repetidos n veces, los indicadores serán C, G, T y A, la marca final será T, y las marcas ID estarán situadas entre los indicadores, construyendo de ese modo una secuencia ID. Cuando la pirosecuenciación se lleva a cabo según el orden de distribución, se pueden obtener los resultados mostrados en la FIG. 15.

35 Se describe además un cebador de genotipado que comprende una secuencia específica del gen para el genotipado enlazada a dicha secuencia ID.

En la presente invención, la secuencia específica del gen para el genotipado es preferiblemente una secuencia específica de un gen seleccionado del grupo que consiste en genes víricos, genes de enfermedad, genes bacterianos, y genes de identificación. El cebador contiene preferiblemente además una secuencia de cebador de secuenciación en el extremo terminal 5'. a fin de facilitar la pirosecuenciación.

40 La presente invención se refiere a un método de genotipado que comprende usar dichos cebadores de genotipado. El cebador de genotipado que comprende la secuencia ID se puede usar en diversos métodos de genotipado que se llevan a cabo usando órdenes de distribución y métodos de secuenciación. Preferiblemente, se puede usar en métodos de pirosecuenciación y métodos de secuenciación en semiconductores, pero no se limita a ellos.

En la presente invención, el método de pirosecuenciación es un método en el que la luz emitida procedente de la degradación de ppi (pirofosfato) generado en el proceso de secuenciación, y el método de secuenciación en semiconductores es un método en el que el cambio en la corriente por un protón (ion H^+) generado en el proceso de secuenciación se analiza mediante un chip (Andersona, Erik P. et al., Sens Actuators B Chem.; 129(1): 79, 2008).

- 5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para genotipar HPV como se define anteriormente.

En la presente invención, la secuencia específica para un genotipo de virus se selecciona entre secuencias nucleotídicas mostradas mediante SEC ID NOS: 1 a 15.

- 10 El HPV (virus del papiloma humano) es uno de los virus más habituales que infectan la piel o membrana mucosa humana. Actualmente se conocen más de alrededor de 150 tipos de HPV, y alrededor de 30 tipos infectan el aparato genital. Alrededor de 85% de cánceres provocados por el virus del HPV están asociados con cáncer de cuello uterino. Entre 30 tipos de HPV que infectan el aparato genital, se sabe que 15 tipos son tipos de alto riesgo que provocan cáncer de cuello uterino. El cáncer de cuello uterino ocupa el sexto lugar en la incidencia de cáncer entre mujeres en Corea, y las citologías vaginales tienen poca sensibilidad y reproducibilidad, y de este modo tienen
15 problemas implicados en la detección de estados precancerosos. Además, estos métodos de ensayo incurrir en un coste elevado debido a los ensayos frecuentes. Los métodos de ensayo del HPV aprobados por la FDA hasta la fecha incluyen HybridCaptureII, pero este método puede diagnosticar solamente la infección por HPV y no puede determinar qué tipo de infección por HPV está presente.

- 20 Debido a que HPV muestra diferentes incidencias de cáncer, tipos de cáncer y procesos metastásicos del cáncer dependiendo de los genotipos, es importante identificar el genotipo de HPV, que infectó al paciente, mediante genotipado. Por ejemplo, se dio a conocer que el 55% de la incidencia de CIN III+ está asociado con HPV tipo 16, el 15% con HPV tipo 18, y el 30% restante con HPV tipo 13.

- 25 La razón más importante para genotipar HPV es que el genotipado hace posible monitorizar infecciones por HPV específicas del genotipo. Un período de infección persistente en mujeres ancianas es generalmente más prolongado que en mujeres jóvenes, y esto es debido a que las mujeres ancianas estuvieron muy probablemente infectadas durante un tiempo prolongado. Aunque todavía no se ha determinado clínicamente un período crítico de infección persistente, se sabe generalmente que un período de infección mayor de 1 año tiene un mayor riesgo. Aunque también es importante identificar HPV tipo 16 y HPV tipo 18, es muy importante examinar la infección persistente con infección por HPV carcinogénica.

- 30 En un ejemplo de la presente invención, se genotiparon 15 tipos de virus de HPV usando la secuencia ID. Cada uno de los 15 genomas virales de HPV se amplificó mediante PCR usando la proteína HPV L1 específica para 15 tipos de virus de HPV, cebadores (cebador GT-HPV 15 tipos) que contiene 15 clases de secuencias ID y secuencias de cebadores de secuenciación, y un cebador GP6 plus biotinilado en 5', y los productos de la PCR se pirosecuenciaron. Como resultado, se pudieron obtener pirogramas de 15 secuencias ID para 15 tipos de virus (FIG.
35 16).

- En otro ejemplo de la presente invención, una muestra de una mezcla del ADN genómico de la línea celular CaSki infectada con HPV tipo 16, y la misma cantidad del ADN genómico de la línea celular HeLa infectada con HPV tipo 18, se amplificó mediante PCR usando un cebador GT-HPV 15 tipos y un cebador GP6 plus biotinilado en 5', y el producto de la PCR se pirosecuenció. Como resultado, se pudieron obtener pirogramas de secuencias ID, que
40 estaban nítidos sin la interferencia de picos solapantes, y correspondieron a HPV tipo 16 y HPV tipo 18.

- Se describe además un método para detectar mutación del gen KRAS, comprendiendo el método las etapas de: (a) diseñar una secuencia ID para genotipado según la mutación génica de cada KRAS, consistiendo la secuencia ID en (ID-S)n-E, en la que ID es una marca ID que es un nucleótido seleccionado de entre A, T, C y G; S es un indicador que es un nucleótido ligado con la marca ID adyacente y diferente de aquel de la marca ID adyacente; E es una
45 marca final que es un nucleótido diferente de aquel del indicador, y n es un número natural que oscila de 1 a 32; (b) construir un cebador de detección compuesto de una secuencia de cebador de pirosecuenciación, la secuencia ID, y una secuencia específica para una mutación del gen KRAS que corresponde a la secuencia ID; (c) amplificar una muestra que contiene el gen KRAS mediante PCR usando el cebador de detección; y (d) someter el producto de la PCR amplificado a pirosecuenciación para obtener un pirograma para la secuencia ID, y detectar la mutación del gen KRAS según la secuencia ID.
50

- El gen Ras se identificó por primera vez como un oncogén retroviral que provoca un sarcoma en ratas. Puesto que la presencia de K-ras en los ganglios linfáticos de pacientes con cáncer pancreático se identificó en 1985, se han realizado diversos estudios sobre el gen K-ras. La mutación de este oncogén se encuentra frecuentemente en las mutaciones malignas del cuerpo humano. Como genes que tienen una estructura y función similar a las de este
55 oncogén, H-ras y N-ras son también conocidos como oncogenes. Las mutaciones en los codones 12, 13 y 61 de K-ras influyen sobre la actividad de la proteína provocando actividad excesiva.

Las mutaciones en el gen K-ras se encuentran en adenocarcinoma del sistema digestivo. En el caso de adenocarcinoma del páncreas, el 90% de las mutaciones se puede encontrar en el jugo y tejido pancreático, y son

conocidas como mutaciones del codón 12. Además, estas mutaciones se encuentran en 40-45% de cáncer colorrectal, y se sabe que están asociadas con una disminución en la respuesta a fármacos tales como cetuximab o panitumumab, que se usan para cáncer de colon avanzado que no responde a quimioterapia. Además, estas mutaciones se observan en 5-30% de cáncer de pulmón no microcítico, y se observan principalmente en pacientes fumadores. Además, estas mutaciones se encuentran exclusivamente con mutaciones de EGFR.

Tres tipos de mutaciones, incluyendo una mutación del codón 12 (GGT>GTT) y mutaciones del codón 13 (GGC>TGC y GGC>GCC), en KRAS de tipo salvaje, son difíciles de detectar mediante un método de pirosecuenciación general. Particularmente, la mutación del codón 12 (GGT>GTT) tiene una alta frecuencia de incidencia, y de este modo es difícil de excluir debido al límite de detección (FIG. 17).

En un ejemplo, se describió un método para detectar mutaciones en el codón 12 y en el codón 13 del gen KRAS. En la presente invención, se diseñaron cebadores que se unen específicamente a los tres tipos de mutaciones del codón 12 (GGT>GTT) y codón 13 (GGC>TGC y GGC>GCC), de tal manera que las mutaciones se pueden detectar usando secuencias ID situadas delante de las secuencias nucleotídicas específicas para los tres tipos de cebadores. Según el método de la presente invención, se pueden detectar 12 tipos de mutaciones de KRAS mediante un único procedimiento de PCR usando 3 tipos de cebadores directos y 1 tipo de cebador inverso biotinilado (FIG. 18).

La secuencia específica para una mutación del gen KRAS se puede seleccionar entre secuencias nucleotídicas mostradas mediante SEC ID NOS: 34 a 35.

En todavía un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para detectar virus respiratorio como se define anteriormente.

En un ejemplo de la presente invención, se describió un método para detectar virus respiratorio. En este método, se diseñan cebadores que se unen específicamente a 5 tipos de virus respiratorios de manera que los virus se pueden detectar usando secuencias ID situadas delante de las secuencias nucleotídicas específicas para los cebadores. ADNc se sintetiza usando 5 tipos de cebadores directos que se unen a 5 tipos de GT-virus respiratorios y 1 tipo de cebador inverso biotinilado, y se amplificó mediante PCR usando un cebador ID GT-RespiVirus y un cebador inverso M13 biotinilado en 5', y los productos de la PCR se pirosecuenciaron.

En la presente invención, las secuencias específicas para los genotipos del virus respiratorio son secuencias nucleotídicas mostradas mediante SEC ID NO: 41 para el virus de la gripe A, SEC ID NO: 42 para el virus de la gripe B, SEC ID NO: 43 para RSV B, SEC ID NO: 44 para rinovirus, y SEC ID NO: 45 para coronavirus OC43.

EJEMPLOS

Aquí en lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos. Será obvio para una persona que tiene pericia normal en la técnica que estos ejemplos son con fines solamente ilustrativos y no se han de interpretar como limitantes del alcance de la presente invención. Esto es, las siguientes etapas se describirán como ilustrativas, y no limitan el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Genotipado de HPV usando secuencia ID

Usando las secuencias ID de la presente invención, se tiparon los genes de los tipos de alto riesgo del HPV (virus del papiloma humano) que provocan cáncer de cuello uterino.

Se diseñaron secuencias ID para 15 tipos de HPV de alto riesgo como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

[Tabla 1] Secuencias ID para 15 tipos de HPV

Secuencias ID	Tipos de HPV
<u>A</u> GCACATG	HPV tipo 16
<u>T</u> GCACATG	HPV tipo 58
<u>C</u> GCACATG	HPV tipo 18
G <u>A</u> CACATG	HPV tipo 33
G <u>T</u> CACATG	HPV tipo 52
GC <u>G</u> ACATG	HPV tipo 35
GCT <u>A</u> CATG	HPV tipo 45
GCATCATG	HPV tipo 51

Secuencias ID	Tipos de HPV
GCAGCATG	HPV tipo 31
GCACTATG	HPV tipo 39
GCACGATG	HPV tipo 56
GCACACTG	HPV tipo 59
GCACAGTG	HPV tipo 68
GCACATAG	HPV tipo 66
GCACATCG	HPV tipo 82

5

Una secuencia nucleotídica específica para cada uno de los 15 tipos de HPV se ligó al extremo terminal en 3' de cada una de las 15 secuencias ID, y una secuencia de cebador de secuenciación común se ligó al extremo terminal en 5', de manera que los 15 tipos de secuencias ID diferentes se pueden usar en la pirosecuenciación con un único cebador de secuenciación, construyendo de ese modo cebadores de PCR que contienen las secuencias ID (Tabla 2).

[Tabla 2] Mezclas de cebadores de PCR de secuenciación de ID para análisis del genotipo de HPV – cebadores de HPV basados en la secuencia ID: cebadores para 15 GT-HPV 15 tipos

Construcción del cebador de GT-HPV 15 tipos			
	Sitio de unión al cebador de secuenciación	Secuencias ID	Secuencia específica del tipo de HPV
HPV tipo 16 (SEC ID NO: 16)	TAATACGACTCACTATAGGG	<u>A</u>GCACATG	TGTCATTATGTGCTGCCATATC (SEC ID NO: 1)
HPV tipo 58 (SEC ID NO: 17)	TAATACGACTCACTATAGGG	<u>I</u>GCACATG	ACTGAAGTAACTAAGGAAGG (SEC ID NO: 2)
HPV tipo 18 (SEC ID NO: 18)	TAATACGACTCACTATAGGG	<u>C</u>GCACATG	ACAGTCTCCTGTACCTGGG (SEC ID NO: 3)
HPV tipo 33 (SEC ID NO: 19)	TAATACGACTCACTATAGGG	<u>G</u>ACACATG	TATGCACACAAGTAACTAGTG (SEC ID NO: 4)
HPV tipo 52 (SEC ID NO: 20)	TAATACGACTCACTATAGGG	<u>G</u>TCACATG	TGACTTTATGTGCTGAGG (SEC ID NO: 5)
HPV tipo 35 (SEC ID NO: 21)	TAATACGACTCACTATAGGG	<u>G</u>CGACATG	TGTTCTGCTGTGTCTTCTAG (SEC ID NO: 6)
HPV tipo 45 (SEC ID NO: 22)	TAATACGACTCACTATAGGG	CTACATG	CCAAGTACATATGACCCTAC (SEC ID NO: 7)
HPV tipo 51 (SEC ID NO: 23)	TAATACGACTCACTATAGGG	GCA<u>T</u>CATG	ACTGCCACTGCTGCGGTTTC (SEC ID NO: 8)
HPV tipo 31 (SEC ID NO: 24)	TAATACGACTCACTATAGGG	GCAGCATG	CAATTGCAAACAGTGATAC (SEC ID NO: 9)

Construcción del cebador de GT-HPV 15 tipos			
	Sitio de unión al cebador de secuenciación	Secuencias ID	Secuencia específica del tipo de HPV
HPV tipo 39 (SEC ID NO: 25)	TAATACGACTCACTATAGGG	GCACTATG	AGAGTCTTCCATACCTTCTAC (SEC ID NO: 10)
HPV tipo 56 (SEC ID NO: 26)	TAATACGACTCACTATAGGG	GCACGATG	TACTGCTACAGAACAGTTAAG (SEC ID NO: 11)
HPV tipo 59 (SEC ID NO: 27)	TAATACGACTCACTATAGGG	GCACACTG	TGTGCTCTACTACTCTCTATTC (SEC ID NO: 12)
HPV tipo 68 (SEC ID NO: 28)	TAATACGACTCACTATAGGG	GCACAGTG	ACTACTGAATCAGCTGTACC (SEC ID NO: 13)
HPV tipo 66 (SEC ID NO: 29)	TAATACGACTGACTATAGGG	GCACATAG	ACTATTAATGCAGCTAAAAGCAC (SEC ID NO: 14)
HPV tipo 82 (SEC ID NO: 30)	TAATACGACTCACTATAGGG	GCACATCG	TGTTACTCCATCTGTTGCAC (SEC ID NO: 15)

Los 15 tipos de virus HPV se obtuvieron extrayendo ADN genómico de secreciones cervicovaginales de mujeres coreanas (Department of Obstetrics & Gynecology, Chungnam National University), identificando los genotipos infectados usando un chip de ADN de HPV, y amplificando el gen L1 del virus HPV mediante PCR.

- 5 Como cebadores de PCR para determinar si las muestras clínicas se infectaron con HPV, se usó un cebador GP5 plus y un cebador GP6 plus.

[Tabla 3] Cebador GP5 plus/cebador GP6 plus

Cebador directo	
Cebador GP5 plus	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3' (SEC ID NO: 31)
Cebador inverso	
Cebador GP6 plus	5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3' (SEC ID NO:32)

- 10 Usando cada uno de los 15 tipos de virus HPV como molde, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR en las siguientes condiciones usando cebadores directos (15 tipos de cebadores de GT-HPV) que consisten en los 15 tipos de cebadores de PCR mostrados en la Tabla 2, y un cebador inverso que consiste en un cebador GP6 plus biotinilado en 5' (Bioneer, Corea): 95°C durante 15 min.; después 45 ciclos, consistiendo cada uno en 95°C (0,5 min.), 45°C (0,5 min.) y 72°C (0,5 min.); después 72°C (10 min.); y después almacenamiento a -4°C.

- 15 Los productos de la PCR contenían un común. En este Ejemplo, se usó un cebador T7 general (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3') para llevar a cabo la pirosecuenciación con las secuencias ID, y los pirogramas se analizaron para tipar HPV (FIGS. 19 y 20).

En la porción superior de la FIG. 19 se muestran las localizaciones de marcas ID formadas según los tipos de HPV en el orden de distribución. En la FIG. 19, los picos indicados en rojo son marcas ID, y los picos indicados en azul son indicadores.

- 20 Como resultado, se podía observar que los picos del pirograma aparecieron solamente en marcas ID específicas que corresponden a los 15 tipos de virus HPV.

Ejemplo 2: Genotipado múltiple de HPV

Usando las secuencias ID de HPV construidas en el Ejemplo 1, se llevó a cabo el genotipado de infecciones de múltiples HPV.

(1) Genotipado múltiple de 4 tipos de HPV

5 Usando el ADN genómico de cada uno de 4 tipos de HPV (HPV 16, 33, 31 y 66) como molde, la amplificación mediante PCR se llevó a cabo con el cebador GP5 plus y el cebador GP6 plus. Después, usando como molde una mezcla 1:1 de los productos de PCR para cada tipo de HPV, se llevó a cabo una amplificación mediante PCR con 15 tipos de cebadores GT-HPV y un cebador GP6 plus biotinilado en 5'. Después, los productos de la PCR se pirosecuenciaron usando un cebador T7.

10 Como resultado, como se muestra en la FIG. 20a), se pudieron obtener los mismos pirogramas que los resultados esperados teóricamente.

(2) Genotipado múltiple de HPV usando la línea celular CaSki y la línea celular HeLa

15 Usando como molde una mezcla de 10 ng del ADN genómico de la línea celular CaSki (ATCC CRL-1550™) infectada con HPV tipo 16 y 10 ng del ADN genómico de la línea celular HeLa (ATCC CCL-2™) infectada con HPV 18, se llevó a cabo la amplificación mediante PCR con 15 tipos de cebadores directos GT-HPV y un cebador GP6 plus biotinilado en 5'. Después, los productos de la PCR se pirosecuenciaron usando un cebador de secuenciación T7 para obtener pirogramas para las secuencias ID.

20 Como resultado, como se muestra en la FIG. 20b), se pudieron obtener los mismos pirogramas que los resultados teóricamente esperados, debido a que se sabe que las células CaSki contienen alrededor de 600 copias de HPV tipo 16 por célula, y las células HeLa contienen alrededor de 50 copias de HPV tipo 18 por células.

(3) Genotipado múltiple de HPV para muestras de restos cervicales

ADNg extraído de muestras de restos cervicales se sometió a genotipado múltiple de HPV usando las secuencias ID, o a secuenciación general. Como resultado, se pudo observar que los resultados del genotipado múltiple de HPV fueron completamente idénticos a los de la secuenciación general (Tablas 4 y 5).

25 [Tabla 4]

Sumario de la comparación entre los resultados del genotipado múltiple de HPV a base de secuencias ID y los resultados de la secuenciación general

Idéntico	Igual	Total
68/79 (86,1%)	11/79 (13,9%)	79/79 (100%)

[Tabla 5]

30 Comparación entre los resultados del genotipado múltiple de HPV a base de secuencias ID y los resultados de la secuenciación general

Muestras nº	Genotipado múltiple de HPV a base de secuencias ID	Resultados de la secuenciación general	Muestras nº	Genotipado múltiple de HPV a base de secuencias ID	Resultados de la secuenciación general
1	16	16	41	35	35
2	66	66	42	16	16
3	52	52	43	35	35
4	33, 68	33	44	58	58
5	16	16	45	35	35
6	16, 68	66	46	16, 52	52
7	56	56	47	33	33

ES 2 542 426 T3

Muestras nº	Genotipado múltiple de HPV a base de secuencias ID	Resultados de la secuenciación general	Muestras nº	Genotipado múltiple de HPV a base de secuencias ID	Resultados de la secuenciación general
8	16	16	48	16, 31	16
9	66	66	49	58	58
10	33	33	50	58	58
11	18	18	51	16	16
12	18, 51	51	52	33	33
13	56	56	53	16, 51	51
14	16	16	54	16	16
15	18	18	55	16	16
16	58, 66	66	56	18, 31	31
17	51	51	57	16	16
18	52	52	58	16	16
19	58, 33	33	59	58	58
20	16	16	60	16	16
21	16	16	61	16, 58	16
22	18	18	62	16	16
23	51	51	63	33	33
24	56	56	64	16, 56	16
25	16	16	65	18	18
26	58	58	66	16	16
27	18	18	67	16	16
28	52	52	68	58	58
29	16	16	69	16	16
30	33	33	70	16	16
31	58	58	71	33	33
32	16	16	72	16	16
33	16	16	73	16	16
34	16	16	74	16	16
35	16	16	75	16	16
36	33	33	76	58	58
37	18	18	77	16	16
38	56	56	78	58	58
39	16	16	79	16	16

Muestras n°	Genotipado múltiple de HPV a base de secuencias ID	Resultados de la secuenciación general	Muestras n°	Genotipado múltiple de HPV a base de secuencias ID	Resultados de la secuenciación general
40	16	16			

Ejemplo 3: Detección de mutaciones de *KRAS* usando secuencias ID (de referencia)

A fin de detectar mutaciones en el gen *KRAS* usando las secuencias ID de la presente invención, se diseñaron secuencias ID para tres tipos de mutaciones de *KRAS*, esto es, mutaciones de codón 12 (GGT>GTT) y codón 13 (GGC>TGC y GGC>GCC) (Tabla 6).

[Tabla 6]

Secuencias ID para tres tipos de mutaciones de *KRAS*

Secuencias ID		Tipos de mutaciones de <i>KRAS</i>
ID1	GTGCA <u>AGT</u>	codón 12 (GGT>GTT)
ID2	GTGCT <u>TGT</u>	codón 13 (GGC>TGC)
ID3	GTGCGA <u>T</u>	codón 13 (GGC>GCC)

Además, una secuencia nucleotídica específica para cada uno de los tres tipos de mutaciones de *KRAS* se ligó al extremo terminal en 3' de cada una de las secuencias ID, y una secuencia de cebador de secuenciación común al extremo terminal en 5', de manera que se puede llevar a cabo la pirosecuenciación usando las tres secuencias ID diferentes con un único cebador de secuenciación, construyendo de ese modo cebadores de PCR que contienen secuencias ID (Tabla 7).

[Tabla 7] Cebadores de *KRAS* a base de secuencias ID: cebadores GT-*KRAS* ID

	Cebador directo GT- <i>KRAS</i> ID		
	Sitio de unión al cebador de secuenciación	Secuencia ID	Secuencia específica de la mutación de <i>KRAS</i>
Codón12 (GGT>GTT) (SEC ID NO: 36)	AACTTGTGGTAGTTGGAGCT	<u>GTGCAAGT</u>	TGGAGCTGT(SEC ID NO: 33)
Codón13 (GGC>TGC) (SEC ID NO: 37)	AACTTGTGGTAGTTGGAGCT	<u>GTGCTGT</u>	GAGCTGGTT(SEC ID NO: 34)
Codón13 (GGC>GCC) (SEC ID NO: 38)	AACTTGTGGTAGTTGGAGCT	<u>CGCACATT</u>	AGCTGGTGC(SEC ID NO: 35)

Los moldes para mutaciones que corresponden a las secuencias ID usadas como muestras se obtuvieron a través de síntesis génica (Bioneer, Corea), y se usó la línea celular de *KRAS* normal Caco2 (ATCC HTB-37) y las líneas celulares mutantes A549(ATCC CCL-185) y HCT116(ATCC CCL-247).

[Tabla 8] Cebadores de PCR de *KRAS*

Cebador directo	
<i>KRAS-F</i> (SEC ID NO: 39)	5'-NNNGCCTGCTGAAAATGACTGAA-3'
Cebador inverso	
<i>KRAS-R</i> (SEC ID NO: 40)	5'-TTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCT-3'

Cada uno de los moldes se amplificó mediante PCR usando los cuatro tipos de cebadores directos de *KRAS* y un

cebador inverso biotinilado en 5', y los productos de la PCR se pirosecuenciaron en las siguientes condiciones:

95°C durante 5 min., después 40 ciclos de 95°C (0,5 min.), 60°C (0,5 min.) y 72°C (0,5 min.), después 72°C (10 min.), y después almacenamiento a -4°C.

5 Usando como molde cada uno de la línea celular *KRAS* normal y un plásmido mutante de *KRAS* procedente de las líneas celulares mutantes, se detectaron mutaciones de *KRAS* usando las secuencias ID (FIG. 21).

Como resultado, se pudo observar que los picos del pirograma aparecieron en las marcas ID específicas que corresponden a las cepas mutantes.

10 A fin de determinar si la detección de múltiples mutaciones se puede lograr mediante el método de mutación de *KRAS* a base de secuencias ID, se examinaron en la misma relación los tres tipos de ADN mutantes de *KRAS*, seguido de la pirosecuenciación para la detección de mutaciones de *KRAS*.

Como resultado, como se puede observar en la FIG. 22, se obtuvieron los mismos pirogramas que los resultados teóricamente esperados.

15 Además, si el método de detección de mutaciones múltiples de *KRAS* a base de secuencias ID se puede aplicar a las muestras clínicas reales se ensayó usando ADN_g de muestras de tejido colorrectal procedentes de 12 pacientes con cáncer colorrectal. Como resultado, se pudieron detectar mutaciones en 3 pacientes, y los pirogramas típicos para las mutaciones se muestran en la FIG. 23.

Ejemplo 4: Detección de infecciones por virus respiratorio usando secuencias ID

20 Nuevos virus de la gripe A (H1N1) y virus de la gripe A (H1 y H3) y B estacionales predominan en la misma estación y muestran síntomas de infección similares, pero muestran diferentes respuestas a agentes antivirales. De este modo, es necesario identificar con exactitud los tipos de virus para el tratamiento. De este modo, en la presente invención, se desarrolló un método para genotipar virus respiratorio usando la secuencia ID.

En este Ejemplo, se llevó a cabo la detección de virus respiratorios típicos, virus de la gripe A, virus de la gripe B, RSV B, rinovirus y coronavirus OC43. Las secuencias ID para los 5 tipos de virus respiratorios se diseñaron como se muestra en la Tabla 9 a continuación.

25 [Tabla 9] Secuencias ID para cinco tipos de virus respiratorios

Secuencia ID	Clase de virus respiratorios
CATA	Virus de la gripe A
GATA	Virus de la gripe B
TATA	RSV B
ACTA	Rinovirus 1
ATCA	Coronavirus OC43

30 Una secuencia nucleotídica específica para cada uno de los 5 tipos de virus respiratorios se ligó al extremo terminal en 5' de cada una de las secuencias ID, y una secuencia de cebador de secuenciación común se ligó al extremo 5', y la pirosecuenciación para los 5 tipos de secuencias ID se puede llevar a cabo usando un único cebador de secuenciación, construyendo de ese modo cebadores de PCR que contienen secuencias ID (Tabla 10).

[Tabla 10] Cebadores directos de virus respiratorios a base de secuencias ID: cebadores GT-RespiVirus ID

Construcción del cebador de GT- virus respiratorio 5 tipos			
	Sitios de unión al cebador de secuenciación	Secuencia ID	Secuencia específica del virus respiratorio
Virus de la gripe A (SEC ID NO: 46)	TAATACGACTCACTATAGGG	CATA	ATATACAACAGGATGGGGCTG TG (SEC ID NO: 41)
Virus de la gripe B (SEC ID NO: 47)	TAATACGACTCACTATAGGG	GATA	ATCATCATCCCAGGCGACAAAG ATG ((SEC ID NO: 42)
RSV B (SEC ID NO: 48)	TAATACGACTCACTATAGGG	TATA	TGATATGCCTATAACAAATGACC

Construcción del cebador de GT- virus respiratorio 5 tipos			
	Sitios de unión al cebador de secuenciación	Secuencia ID	Secuencia específica del virus respiratorio
			AGAAA (SEC ID NO: 43)
Rinovirus 1 (SEC ID NO: 49)	TAATACGACTCACTATAGGG	ACTA	GCCAGAAAGTGGACAAGGTGTG AAGAG (SEC ID NO: 44)
Coronavirus OC43 (SEC ID NO: 50)	TAATACGACTCACTATAGGG	ATCA	GCAGATTTGCCAGCTTATATGAC TGTT (SEC ID NO: 45)

En el método de detección de virus respiratorios de este Ejemplo, los ADNc procedentes de células infectadas con virus se sintetizaron usando los 5 tipos de cebadores directos GT-respiratorio y un cebador inverso biotinilado en 5' (Tabla 11), y entonces se amplificaron mediante PCR usando los cebadores GT-RespiVirus ID mostrados en la Tabla 10 y un cebador inverso M13 biotinilado en 5'. Los productos de la PCR se pirosecuenciaron para detectar la infección por virus (FIG. 24).

[Tabla 11]

Cebadores de transcripción inversa (RT) de virus respiratorio basados en secuencias ID: cebadores GT-RespiVirus RT

Construcción del cebador R GT-RespiVirus RT		
	Secuencia de etiquetado R de M13	Secuencia específica del virus respiratorio
Virus de la gripe A (SEC ID NO: 51)	CAGGAAACAGCTATGACC	ATATACAACAGGATGGGGGCTGTG
Virus de la gripe B (SEC ID NO: 52)	CAGGAAACAGCTATGACC	ATCATCATCCCAGGCGACAAAGATG
RSV B (SEC ID NO: 53)	CAGGAAACAGCTATGACC	TGATATGCCTATAACAAATGACCAGAAA
Rinovirus 1 (SEC ID NO: 54)	CAGGAAAGAGCTATGACC	GCCAGAAAGTGGACAAGGTGTGAAGAG
Coronavirus OC43 (SEC ID NO: 55)	CAGGAAACAGCTATGACC	GCAGATTTGCCAGCTTATATGACTGTT

En este Ejemplo, se sintetizaron las porciones requeridas de los genes del virus, y se llevó a cabo una PCR múltiple usando como moldes los genes del virus sintetizados, seguido de la pirosecuenciación para la detección de los genes del virus.

Como resultado, como se puede observar en la FIG. 25, se pudieron obtener los mismos pirogramas que los resultados teóricamente esperados.

Además, en un ensayo para la detección de infecciones múltiples, los moldes de los genes de virus se mezclaron en la misma relación, y después se amplificaron mediante PCR múltiple, seguido de la pirosecuenciación para la detección de los genes virales. Como resultado, se detectaron normalmente infecciones múltiples.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

Cuando se lleva a cabo la pirosecuenciación usando la secuencia ID, se puede obtener para cada genotipo un pirograma único y simple. De este modo, el uso de la secuencia ID hace posible genotipar genes virales, genes de enfermedades, genes bacterianos, y genes de identificación de una manera simple y eficiente.

<110> GenomicTree, Inc.

<120> Método de genotipado

<130> PP-B0862

<150> KR10-2009-0110331

<151> 16-11-2009

<160> 55
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 22
 5 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 16
 <400> 1
 tgtcattatg tgctgccata tc 22
 <210> 2
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 58
 <400> 2
 actgaagtaa ctaaggaagg 20
 15 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 16
 <400> 3
 20 acagtctcct gtacctggg 19
 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 33
 25 <400> 4
 tatgcacaca agtaactagt g 21
 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> Virus del papiloma humano tipo 20
 <400> 5
 tgactttatg tgctgagg 18
 <210> 6
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 35
 <400> 6

tgttctgctg tgtcttctag 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Virus del papiloma humano tipo 45
 <400> 7
 ccaagtacat atgaccctac 20
 <210> 8
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 23
 <400> 8
 actgccactg ctgcggtttc 20
 <210> 9
 15 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 31
 <400> 9
 caattgcaaa cagtatac 19
 20 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 39
 <400> 10
 25 agagtcttcc ataccttcta c 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 56
 30 <400> 11
 tactgtctaca gaacagttaa g 21
 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Virus del papiloma humano tipo 59
 <400> 12
 tgtgtcttac tactctctat tc 22

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 68
 5 <400> 13
 actactgaat cagctgtacc 20
 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Virus del papiloma humano tipo 66
 <400> 14
 actattaatg cagctaaaag cac 23
 <210> 15
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Virus del papiloma humano tipo 82
 <400> 15
 tgttactcca tctgtgcac 20
 <210> 16
 20 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 25 <400> 16
 taatacgact cactataggg agcacatgtg tcattatgtg ctgccatc 50
 <210> 17
 <211> 48
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 17
 taatacgact cactataggg tgcacatgac tgaagtaact aaggaagg 48
 35 <210> 18
 <211> 47
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 18
 5 taatacgact cactataggg cgcacatgac agtctcctgt acctggg 47
 <210> 19
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 19
 taatacgact cactataggg gacacatgta tgcacacaag taactagt 49
 <210> 20
 15 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 20
 taatacgact cactataggg gtcacatgtg actttatgtg ctgagg 46
 <210> 21
 <211> 48
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 21
 taatacgact cactataggg ggcacatgtg ttctgctgtg tcttctag 48
 30 <210> 22
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <223> cebador
 <400> 22
 taatacgact cactataggg gctacatgcc aagtacatat gaccctac 48

<210> 23
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 23
 taatacgact cactataggg gcatcatgac tgccactgct gcggtttc 48
 <210> 24
 10 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 15 <400> 24
 taatacgact cactataggg gcagcatgca attgcaaaca gtgatac 47
 <210> 25
 <211> 49
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 25
 taatacgact cactataggg gcactatgag agtcttccat acctctac 49
 25 <210> 26
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> cebador
 <400> 26
 taatacgact cactataggg gcacgatgta ctgctacaga acagttaag 49
 <210> 27
 <211> 50
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> cebador
 <400> 27
 taatacgact cactataggg gcacactgtg tgcttacta ctctctattc 50
 <210> 28
 5 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 28
 taatacgact cactataggg gcacagtgc tactgaatca gctgtacc 48
 <210> 29
 <211> 51
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 29
 taatacgact cactataggg gcacatagac tattaatgca gctaaaagca c 51
 20 <210> 30
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> cebador
 <400> 30
 taatacgact cactataggg gcacatcgtg ttactccatc tgttgac 48
 <210> 31
 <211> 23
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 31
 35 ttgttactg tggtagatac tac 23
 <210> 32
 <211> 25

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 32
 gaaaaataaa ctgtaaatca tattc 25
 <210> 33
 <211> 9
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 tggagctgt 9
 <210> 34
 <211> 9
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 34
 gagctggtt 9
 <210> 35
 20 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Homosapiens
 <400> 35
 agctggtgc 9
 25 <210> 36
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> cebador
 <400> 36
 aactgttgt agttggagct gtcagttgg agctgt 36
 <210> 37
 <211> 36
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> cebador
 <400> 37
 aactgtggt agtggagct gtgctgtgag ctggtt 36
 <210> 38
 5 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 38
 aactgtggt agtggagct cgcacattag ctggtgc 37
 <210> 39
 <211> 24
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 39
 nnnggcctgc tgaaaatgac tgaa 24
 20 <210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> cebador
 <400> 40
 ttagctgtat cgtcaaggca ctct 24
 <210> 41
 <211> 24
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 41
 35 atatacaaca ggatgggggc tgtg 24
 <210> 42
 <211> 25

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 42
 atcatcatcc caggcgacaa agatg 25
 <210> 43
 <211> 28
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 43
 tgatatgcct ataacaaatg accagaaa 28
 15 <210> 44
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 44
 gccagaaaagt ggacaagggtg tgaagag 27
 <210> 45
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 45
 30 gcagatttgc cagcttatat gactgtt 27
 <210> 46
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 46

taatacgact cactataggg cataatatac aacaggatgg gggctgtg 48

<210> 47

<211> 49

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 47

taatacgact cactataggg gataatcatc atcccaggcg acaaagatg 49

10 <210> 48

<211> 52

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 48

taatacgact cactataggg tatatgatat gcctataaca aatgaccaga aa 52

<210> 49

<211> 51

20 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 49

25 taatacgact cactataggg actagccaga aagtggaaca ggtgtgaaga g 51

<210> 50

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> cebador

<400> 50

taatacgact cactataggg atcagcagat ttgccagctt atatgactgt t 51

<210> 51

35 <211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador
 <400> 51
 caggaaacag ctatgacat atacaacagg atgggggctg tg 42
 5 <210> 52
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> cebador
 <400> 52
 caggaaacag ctatgacat catcatcca ggcgacaaag atg 43
 <210> 53
 <211> 46
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 53
 20 caggaaacag ctatgacctg atatgcctat aacaaatgac cagaaa 46
 <210> 54
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 54
 caggaaacag ctatgaccgc cagaaagtg acaaggtgtg aagag 45
 <210> 55
 30 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 55
 caggaaacag ctatgaccgc agatttgcca gcttatatga ctgtt 45

REIVINDICACIONES

1. Un método para genotipar diferentes secuencias diana en la misma muestra, que comprende

i) construir cebadores de genotipado, en el que los cebadores comprenden una secuencia específica del gen ligada a una secuencia ID que se asigna a cada genotipo, en el que cada secuencia ID consiste en una marca ID que es un nucleótido seleccionado entre A, T, C y G, N indicadores (S) que son nucleótidos dispuestos en el mismo orden y diferentes de la marca ID adyacente, una marca final (E) que es un nucleótido que sigue y es diferente del indicador más posterior; en el que N es un número natural que oscila de 2 a 32 y en el que la marca ID se puede situar delante del indicador y puede ser uno de tres nucleótidos diferentes que consiste en un nucleótido diferente del indicador situado detrás de él, o la marca o marcas ID pueden estar situadas entre dos indicadores y pueden ser uno de dos nucleótidos diferentes que consiste en un nucleótido diferente de los indicadores situados a ambos lados de él;

ii) amplificar moldes de los genes diana mediante PCR usando los cebadores de genotipado de i), obteniendo de ese modo productos de PCR; y

iii) secuenciar los productos de PCR de la etapa ii) con distribución de dNTPs según el orden de las secuencias ID diseñado en la etapa i), orden en el cual el dNTP para la marca final no está incluido;

iv) genotipar según el nucleótido y situación de la marca ID.

2. El método de la reivindicación 1, en el que los genes diana se seleccionan del grupo de genes virales, genes de enfermedades, genes bacterianos, y genes de identificación.

3. El método de la reivindicación 1, en el que la diana es HPV, y en el que la secuencia específica de un gen se selecciona entre las secuencias nucleotídicas de SEC ID NOs:1 a 15.

4. El método de la reivindicación 1, en el que la diana es un virus respiratorio, y en el que la secuencia específica de un gen es SEC ID NO:41 para el virus de la gripe A, SEC ID NO:42 para el virus de la gripe B, SEC ID NO:43 para RSV B, SEC ID NO:44 para rinovirus, y SEC ID NO:45 para coronavirus OC43.

FIG. 1

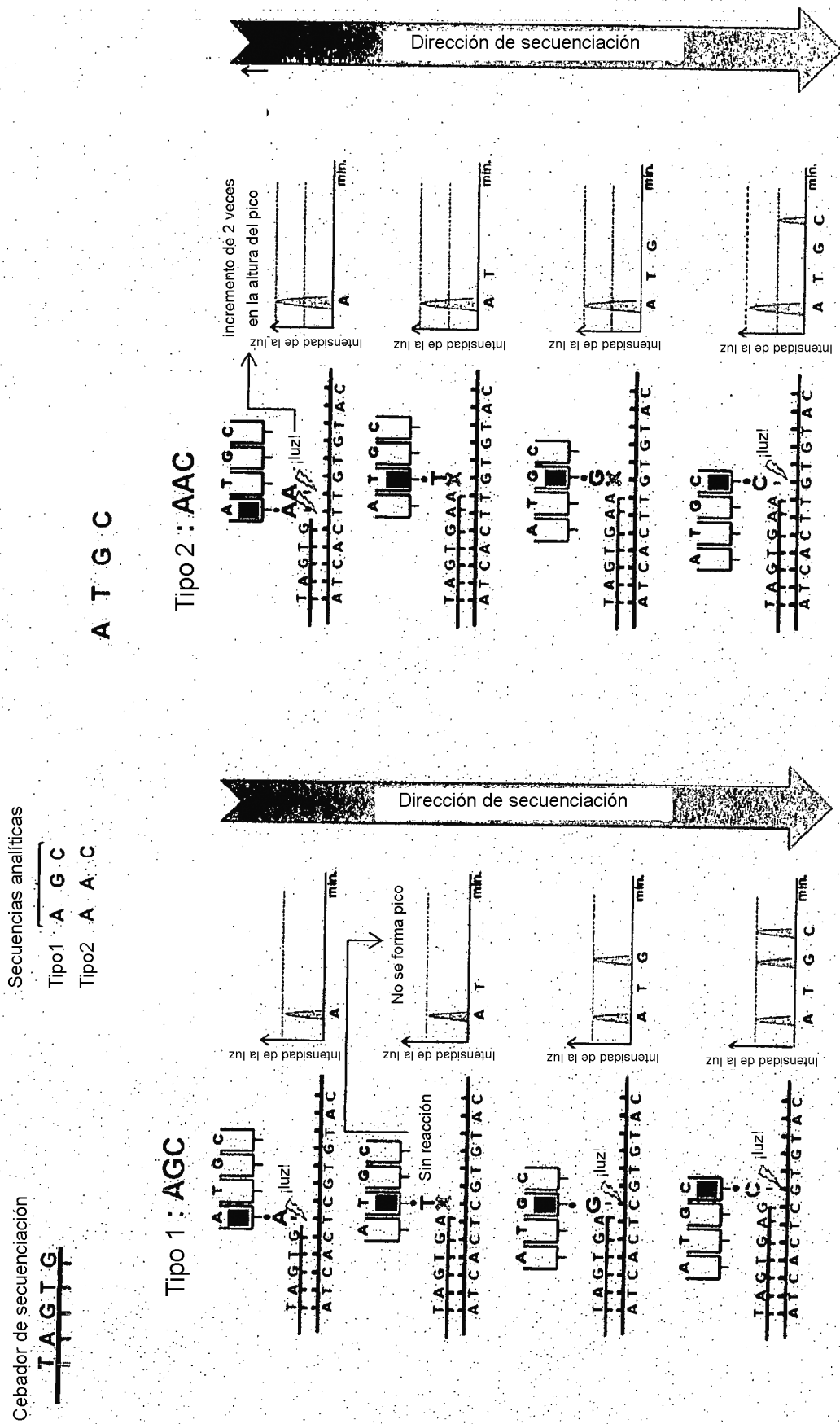
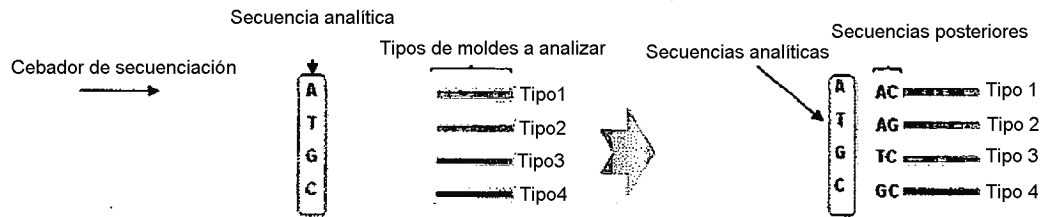
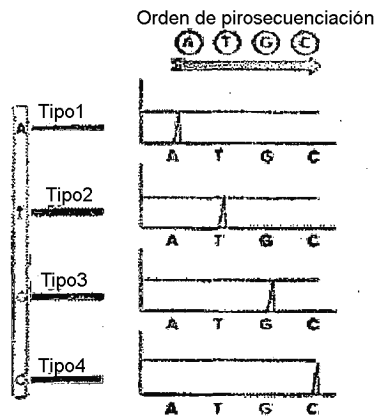


FIG. 2



Resultados esperados



Resultados medidos

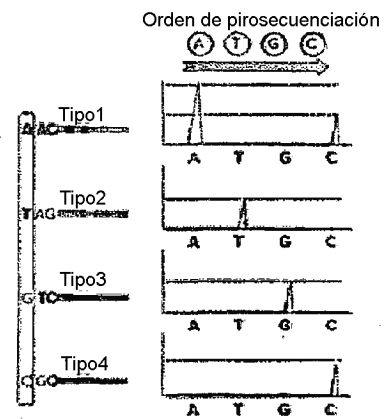
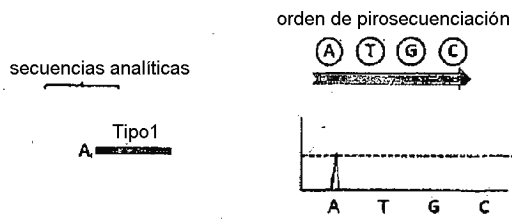
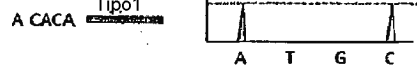


FIG. 3

Resultados esperados



aparece pico inesperado



el pico analítico se hace gradualmente más pequeño debido a la influencia de pico posterior

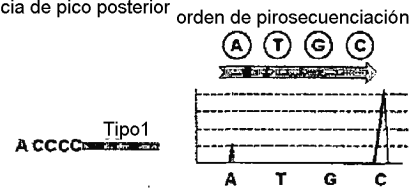


FIG. 4

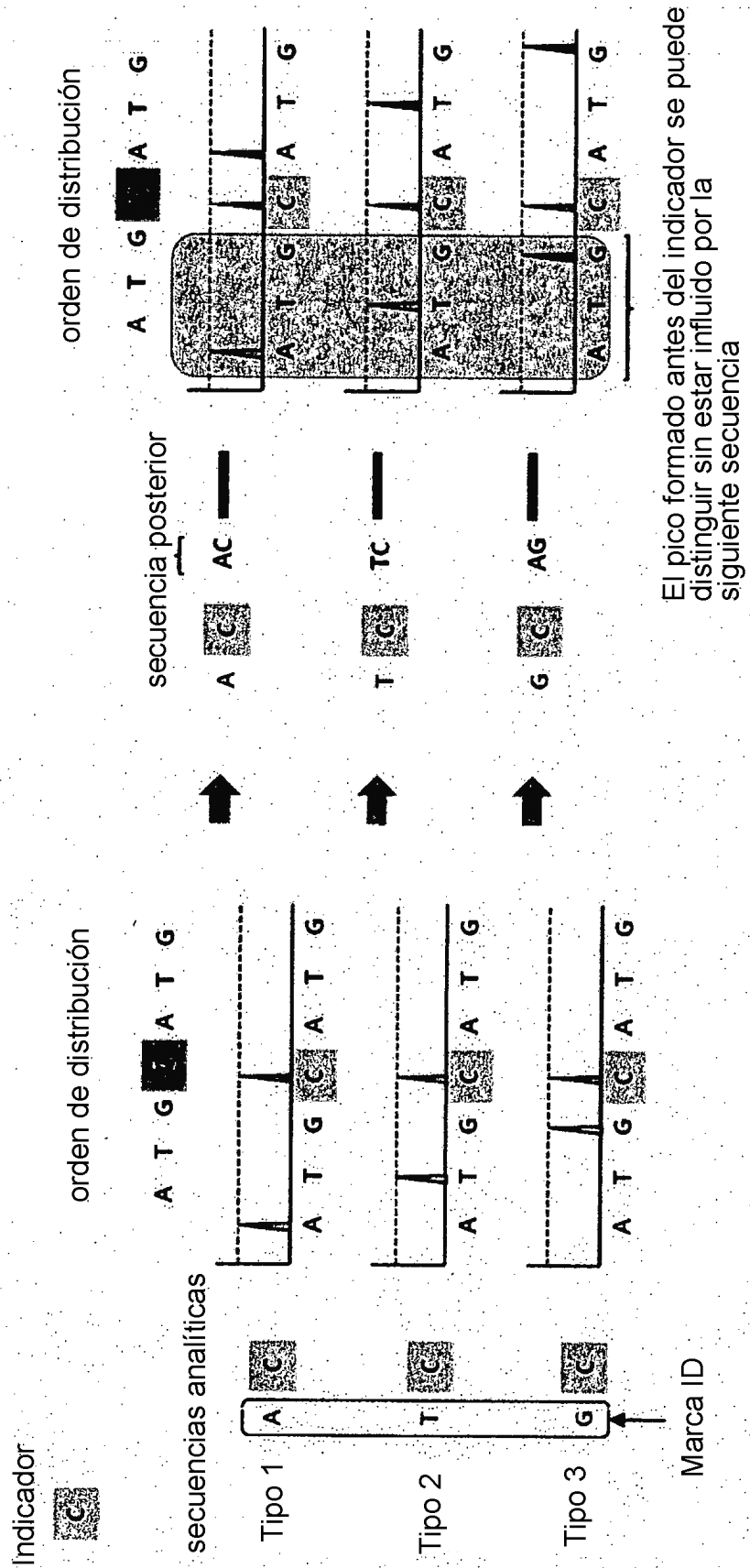


FIG. 5

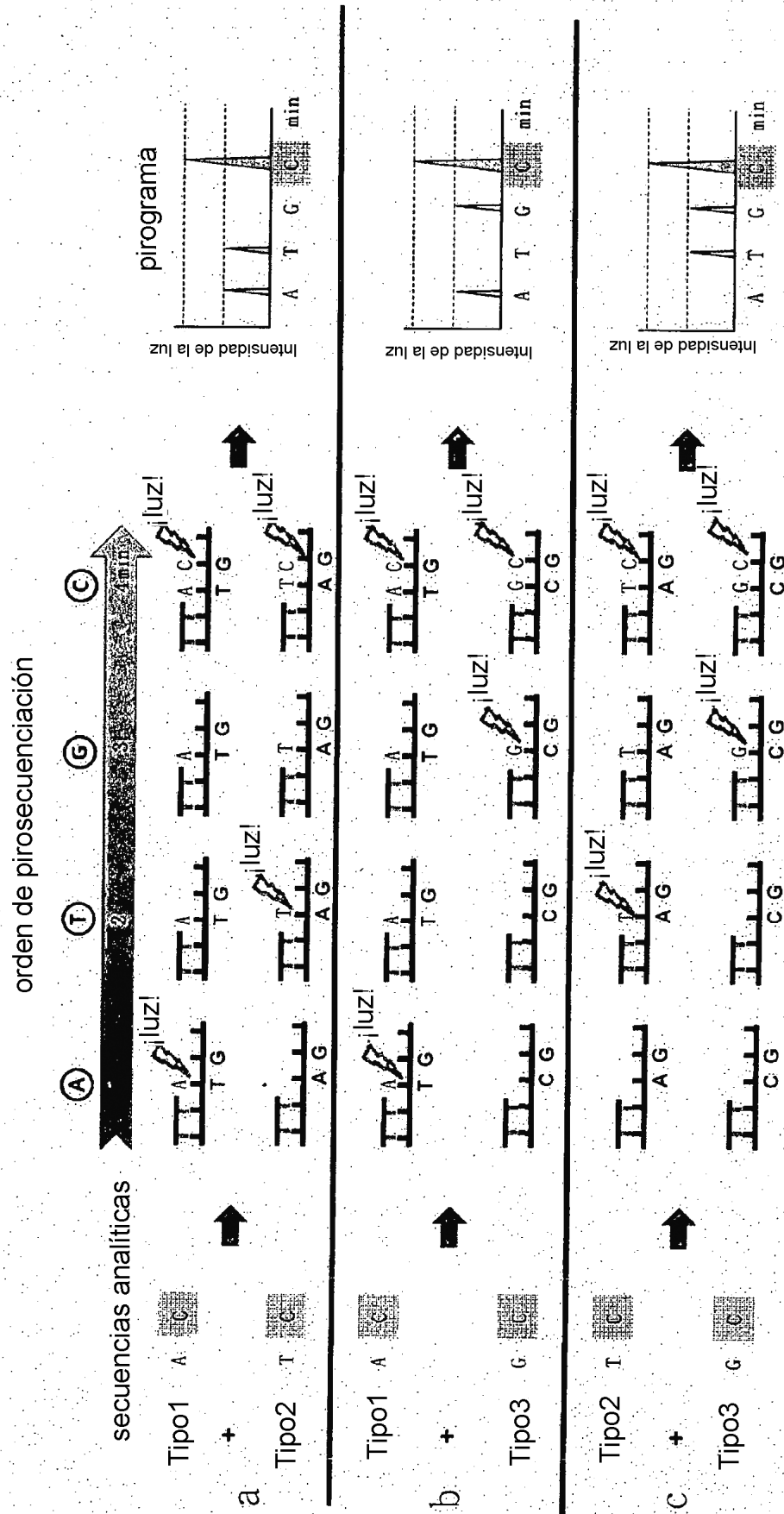


FIG. 6

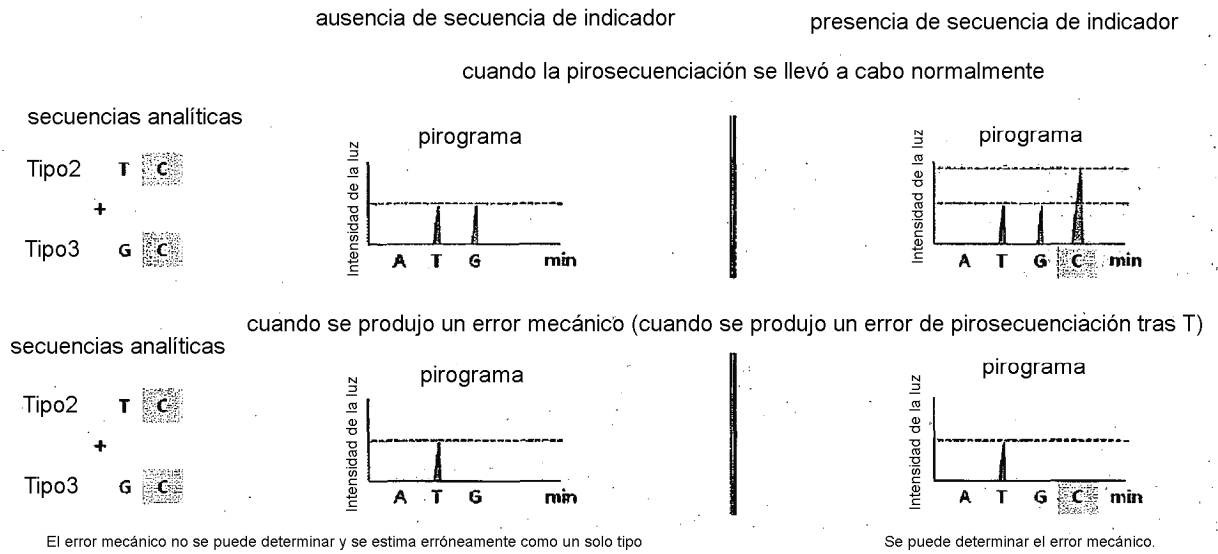


FIG. 7

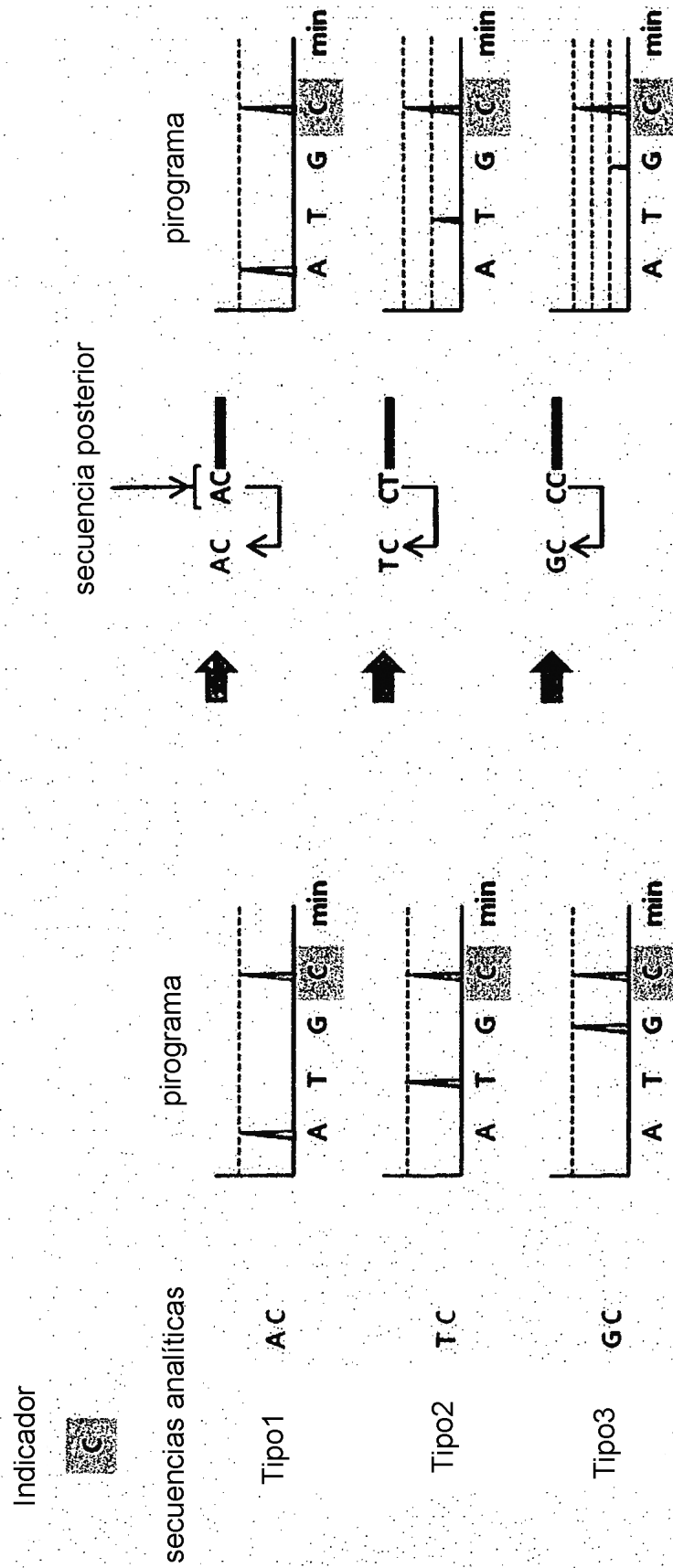


FIG. 8

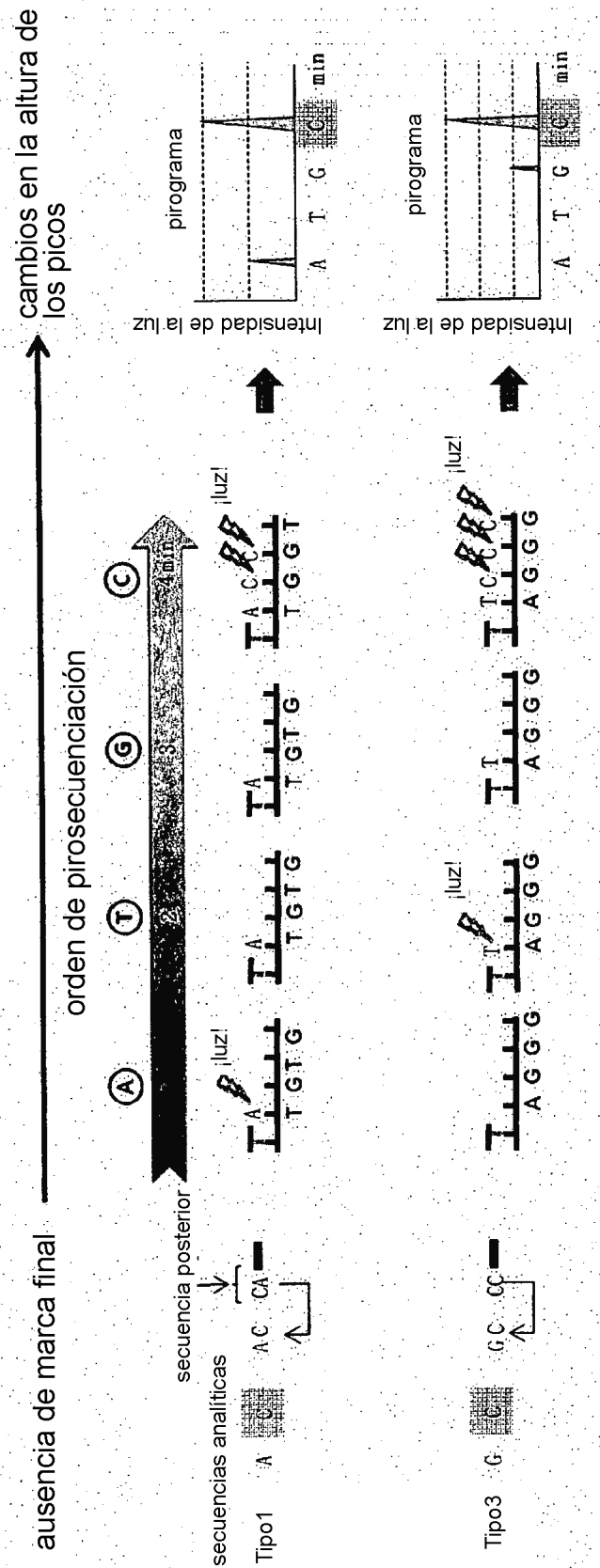


FIG. 9

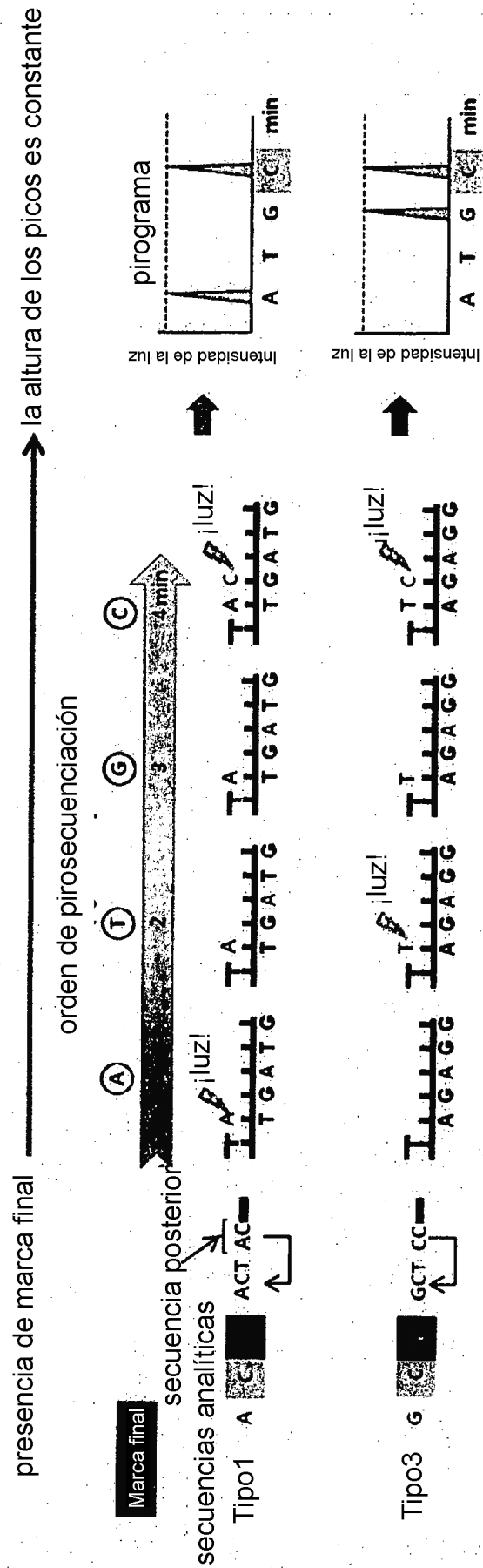
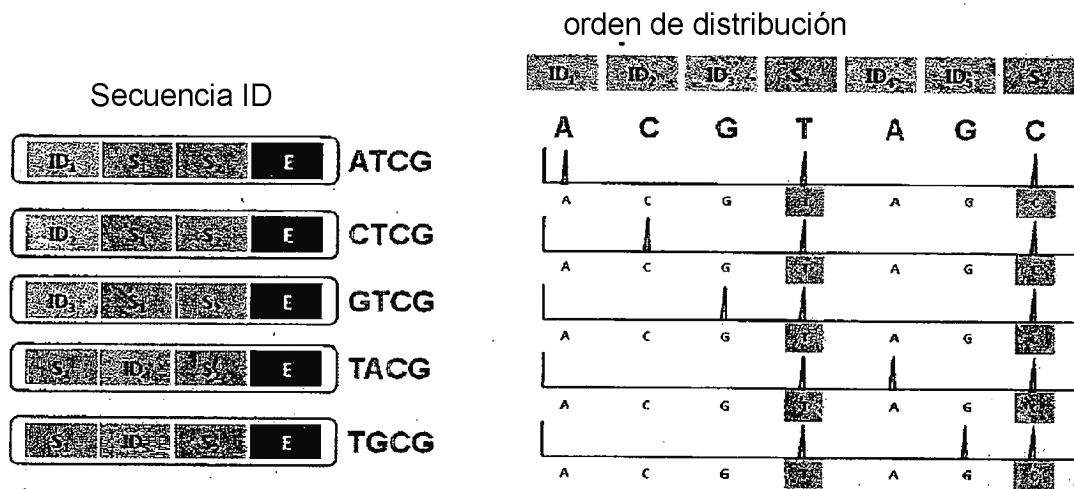


FIG. 10



cuando el orden del indicador cambia -> también cambia el orden de distribución

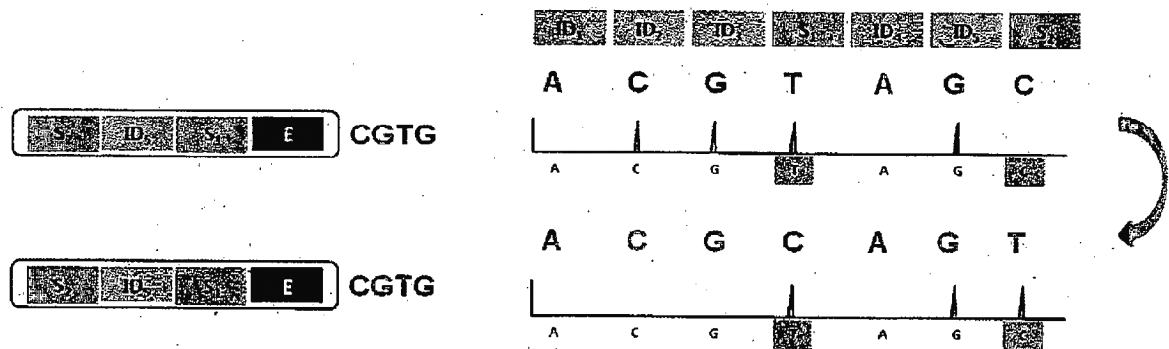


FIG. 11

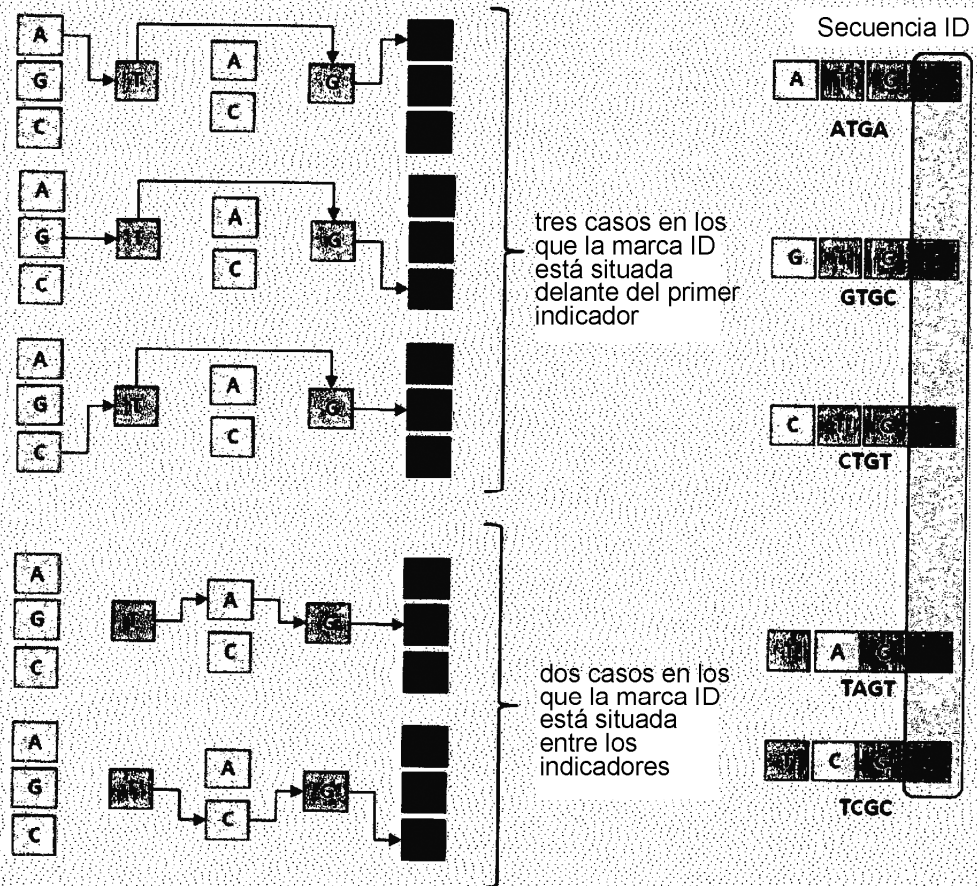


FIG. 12

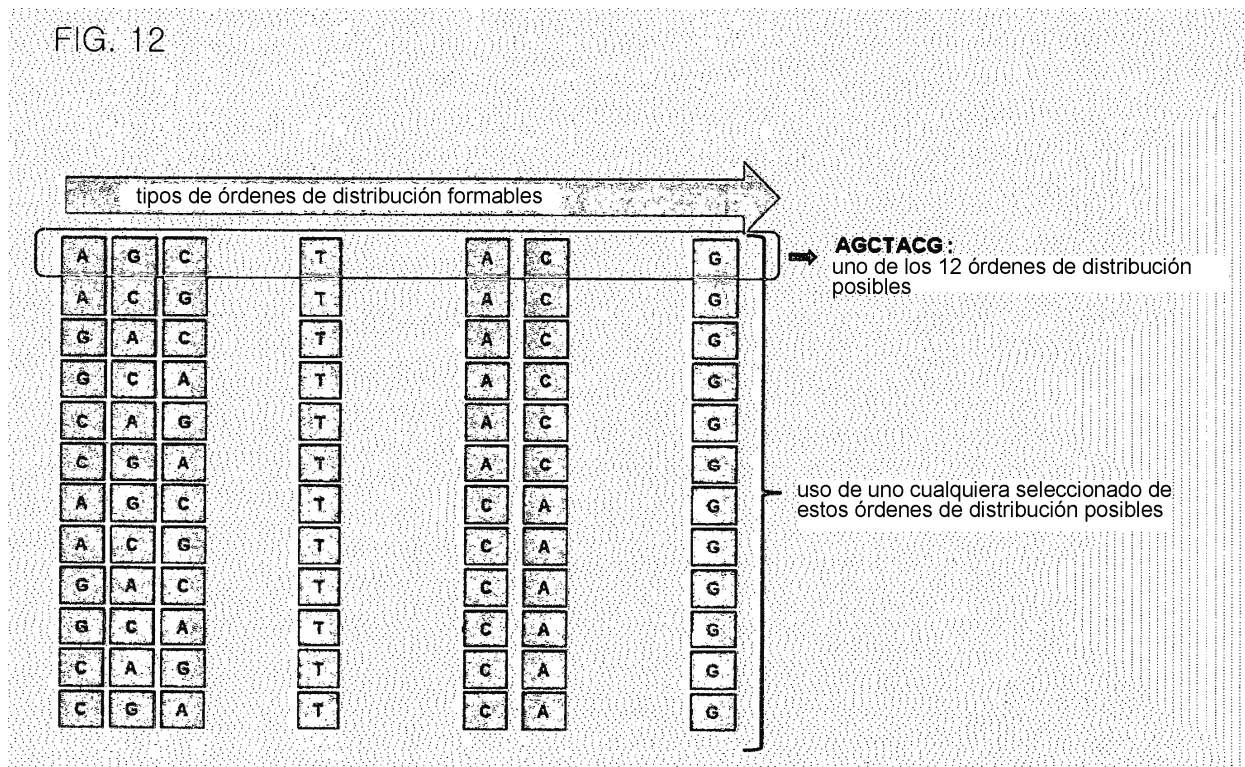


FIG. 13

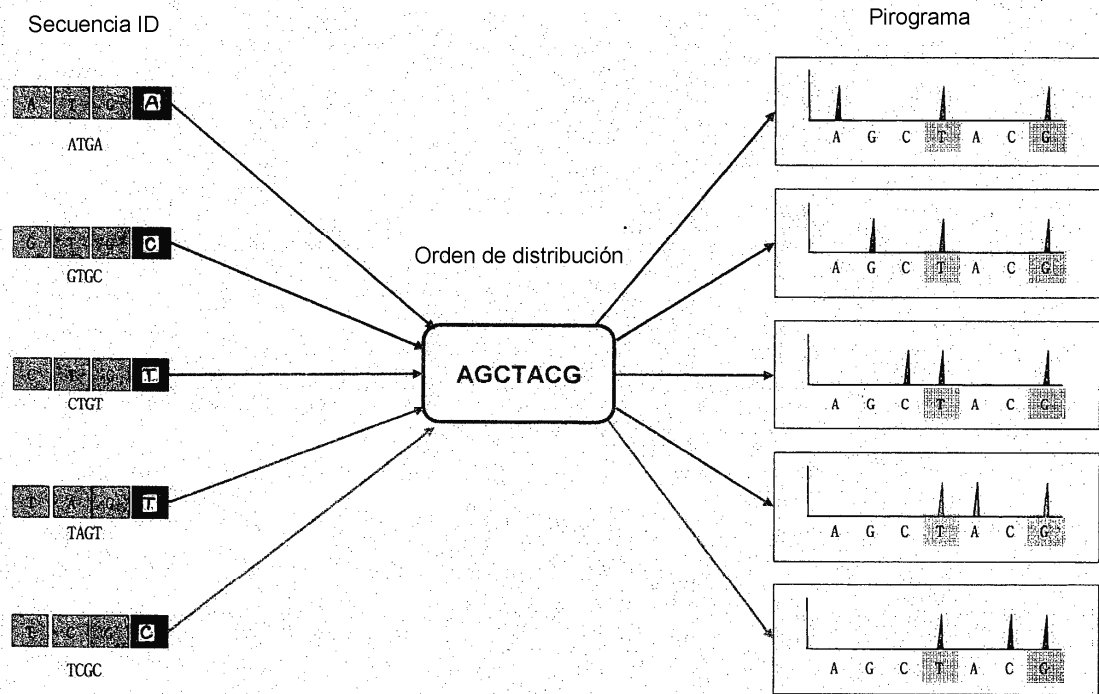


FIG. 14

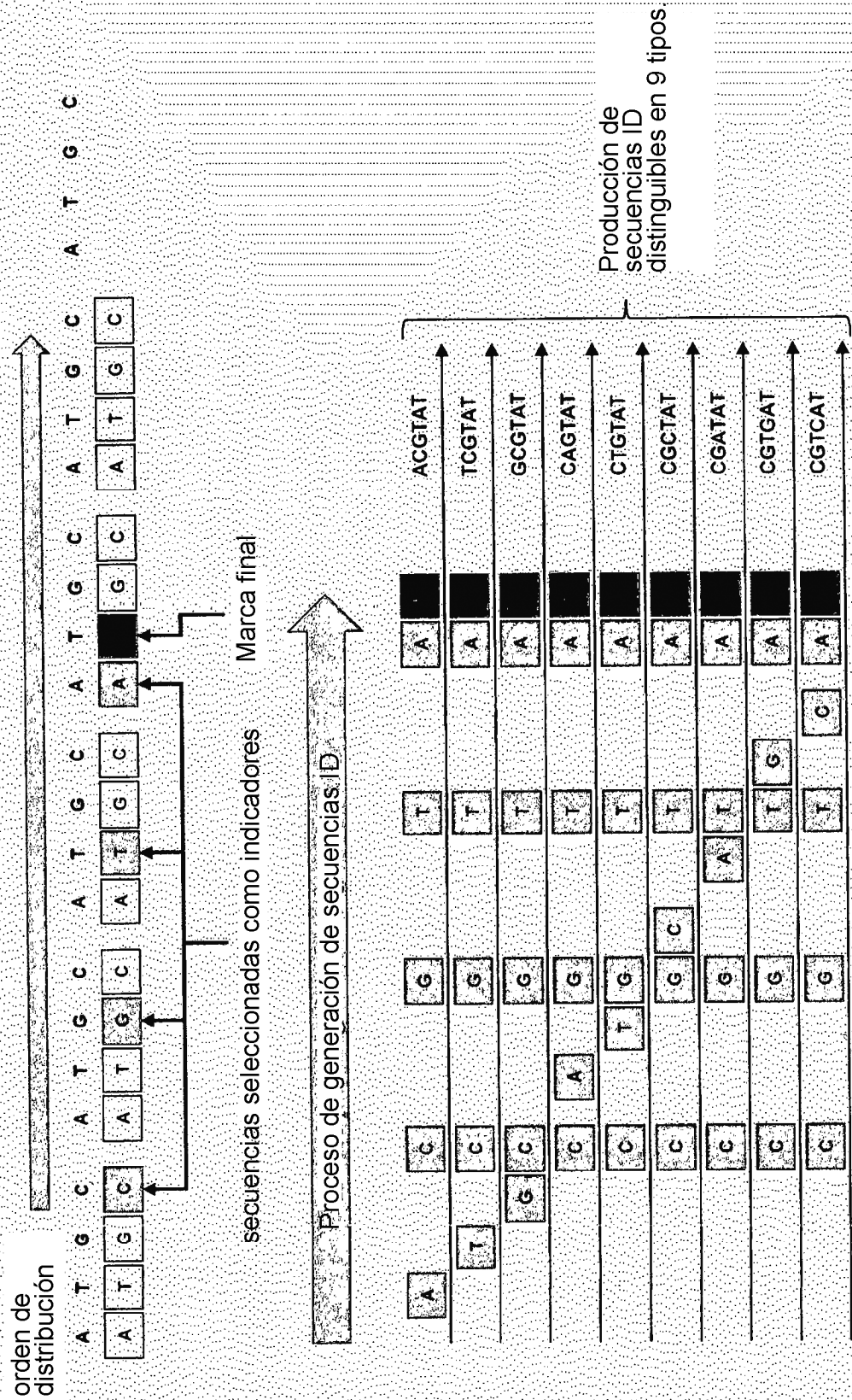


FIG. 15

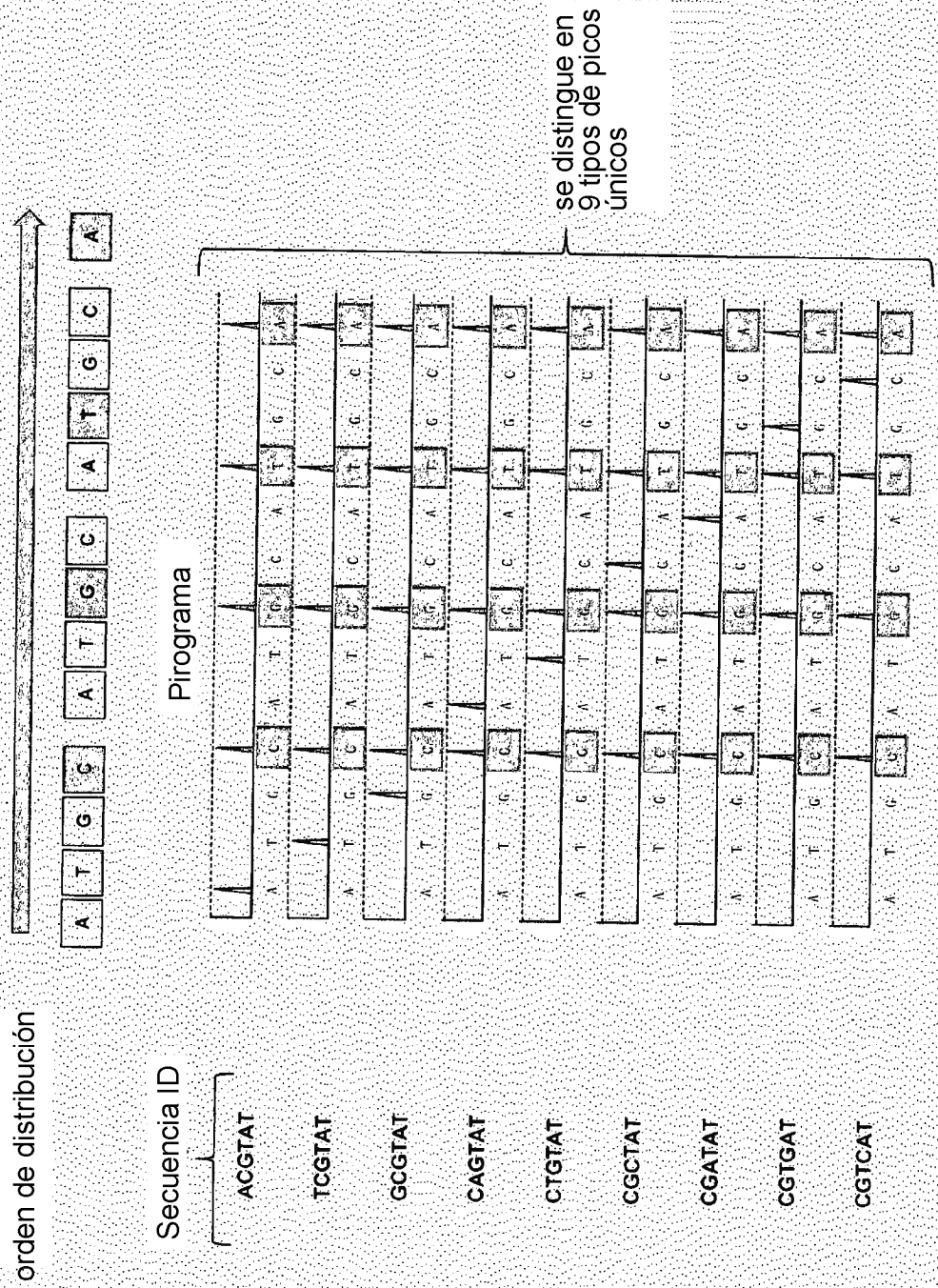


FIG. 16

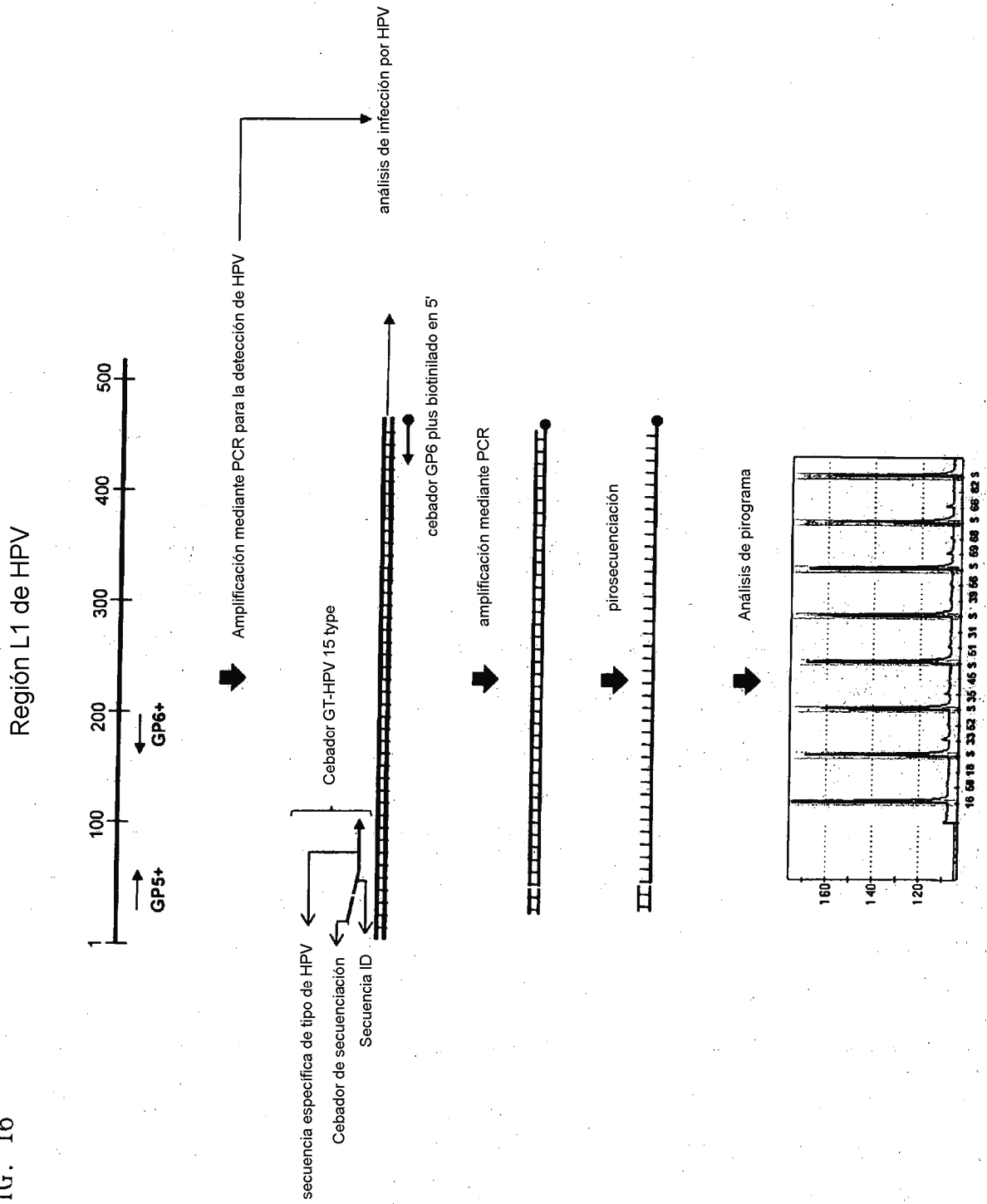
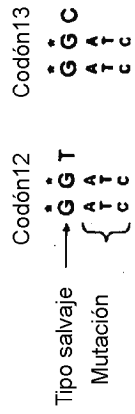
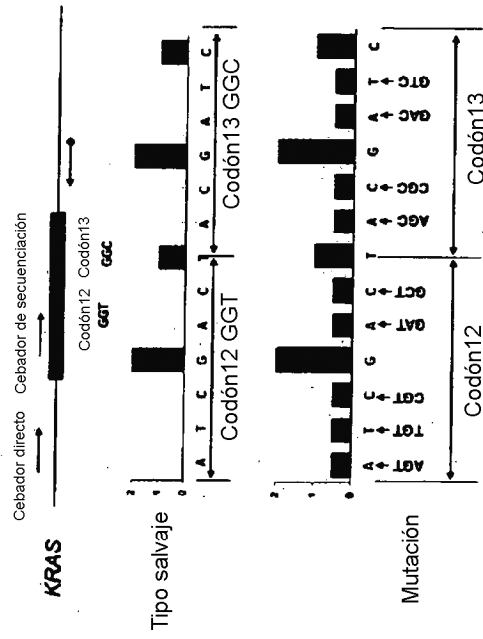


FIG. 17

1) tipos de mutaciones de KRAS



2) pirosecuenciación general y resultados



3) Mutación de KRAS difícil de detectar mediante técnica de pirosecuenciación general

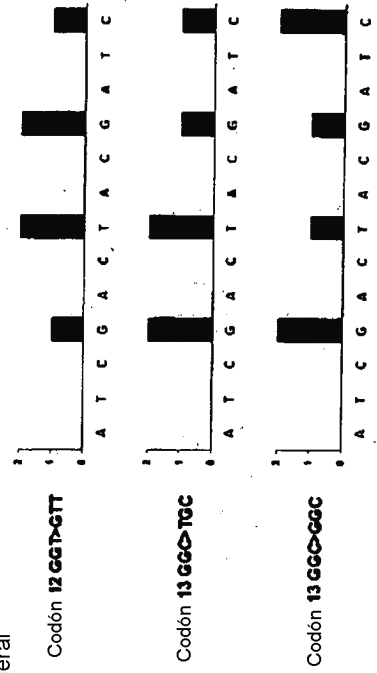


FIG. 18

Sistema de detección de mutación de KRAS a base de secuencias ID

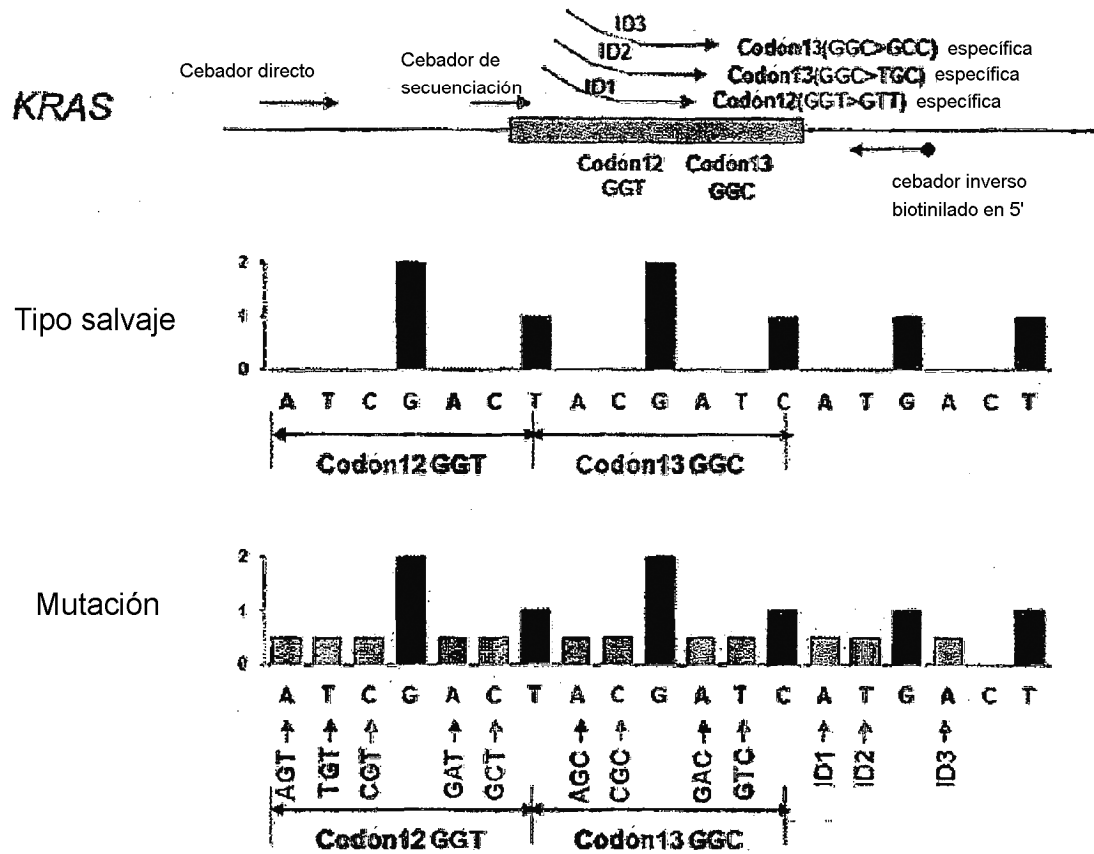


FIG. 19

Localizaciones de marcas ID formadas según los tipos de HPV en el orden de distribución

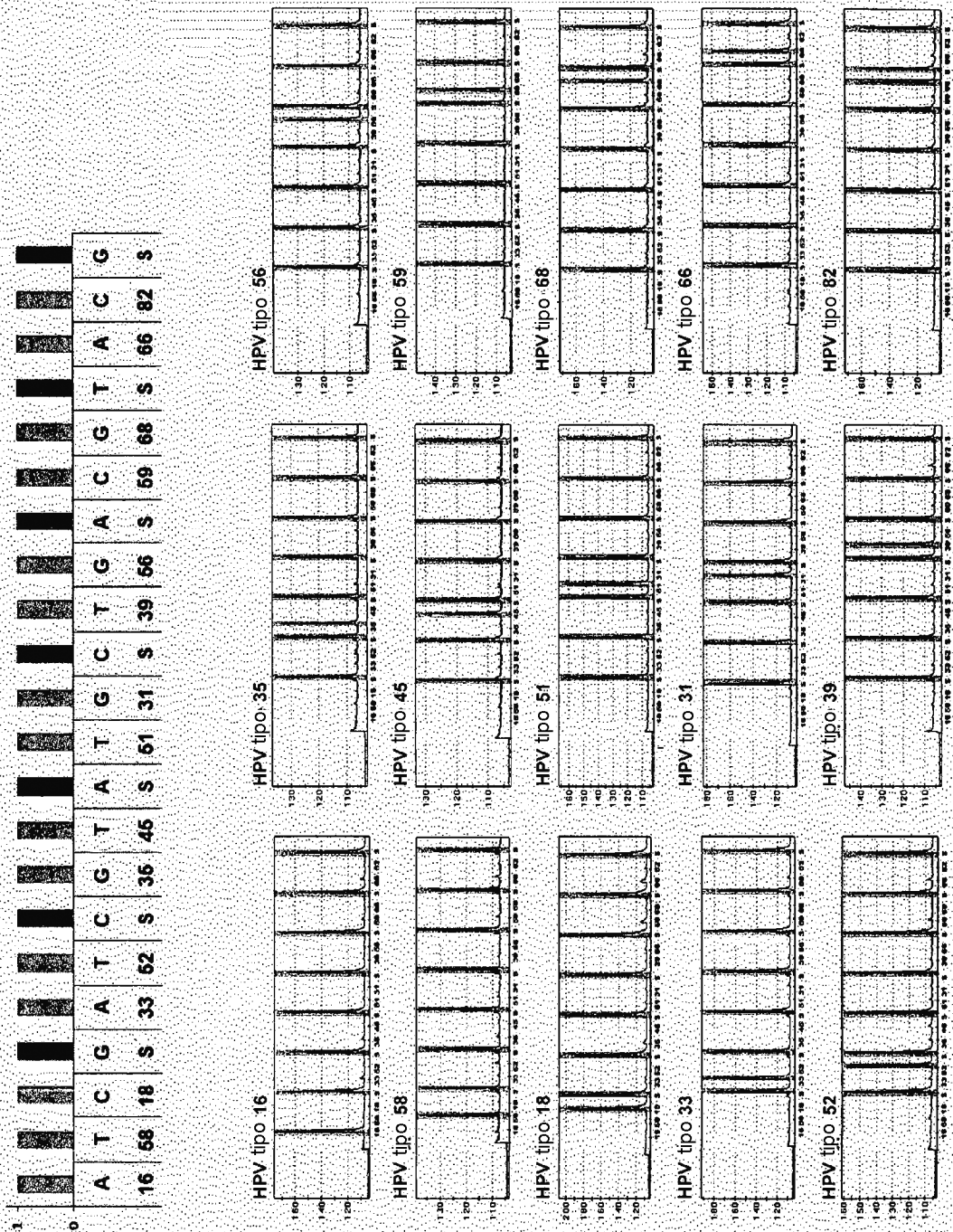
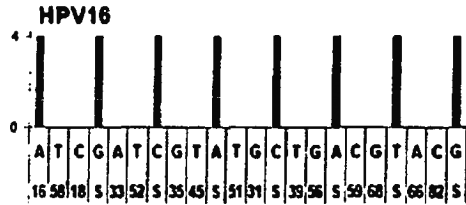


FIG. 20

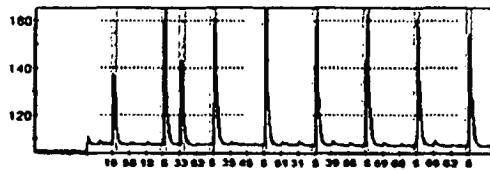
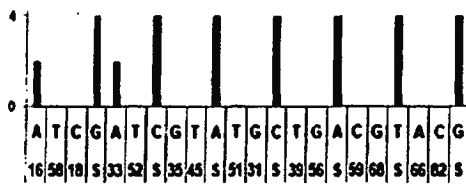
Ejemplo 1) ensayo usando mezclas de la misma cantidad de productos de PCR procedentes de 4 tipos de HPV

Resultados esperados

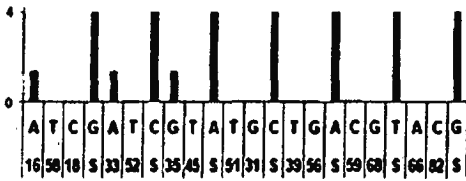
Resultados medidos



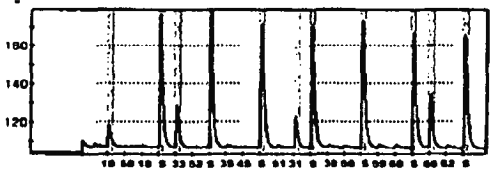
Mezcla 1:1 productos de PCR de HPV16,HPV33



Mezcla 1:1:1 de productos de PCR de HPV16,HPV33,HPV35



Mezcla 1:1:1 de productos de PCR de HPV16,HPV33,HPV35,HPV66



Ejemplo 2) ADN genómico de CaSki (HPV16): ADN genómico de HeLa (HPV18) = 1:1

Resultados esperados

Resultados medidos

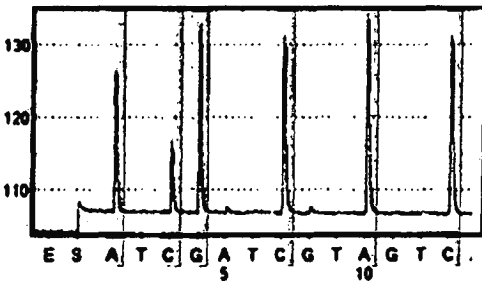
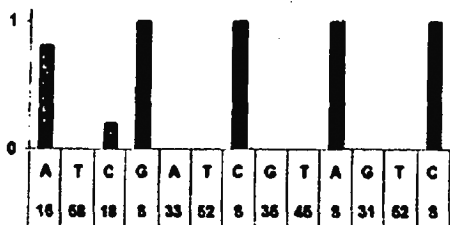


FIG. 21

Ejemplo 1) Ensayo que usa línea celular KRAS normal, línea celular mutante y vector plasmídico

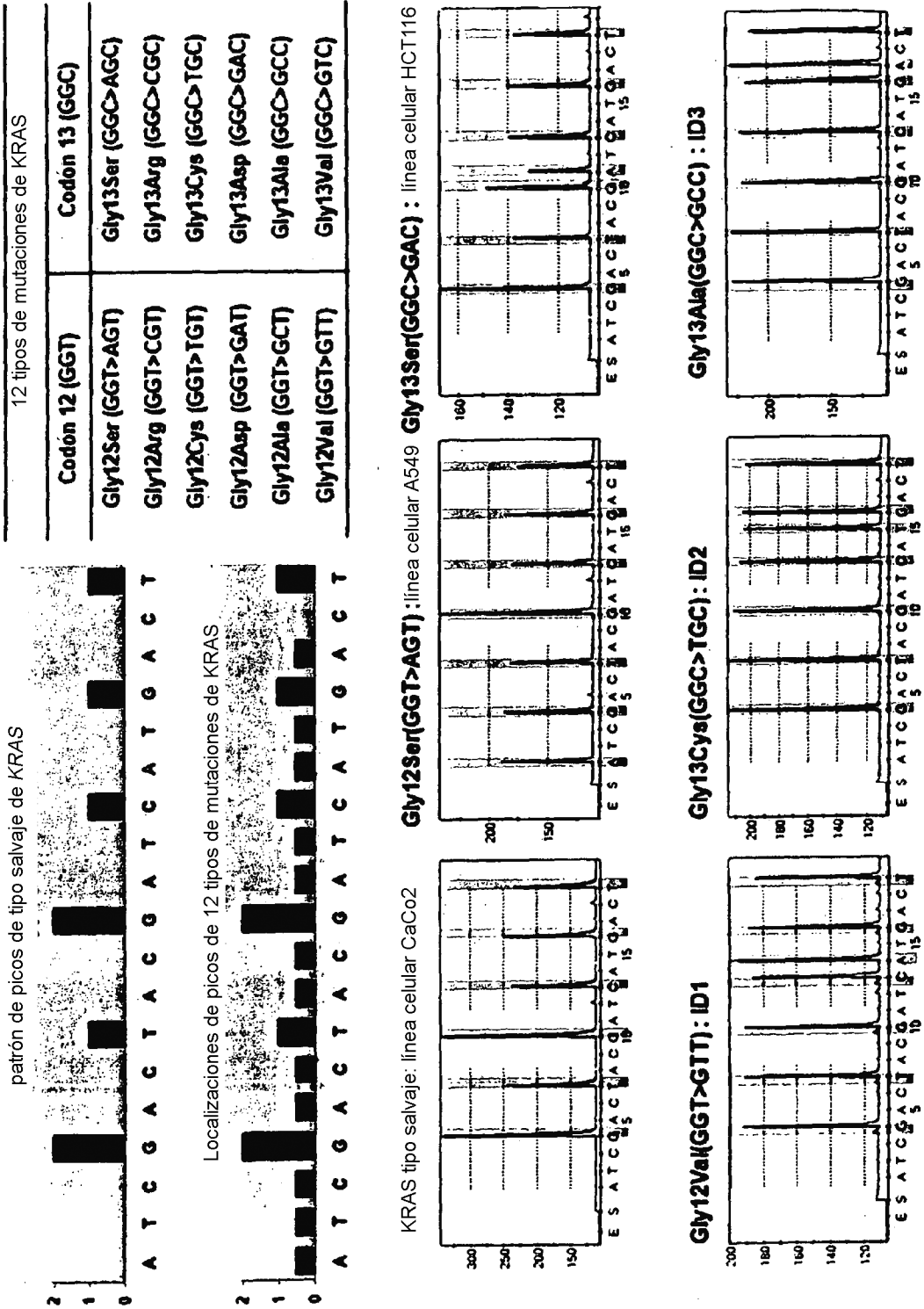


FIG. 22

Ejemplo 2) ensayo de detección de mutación múltiple de KRAS

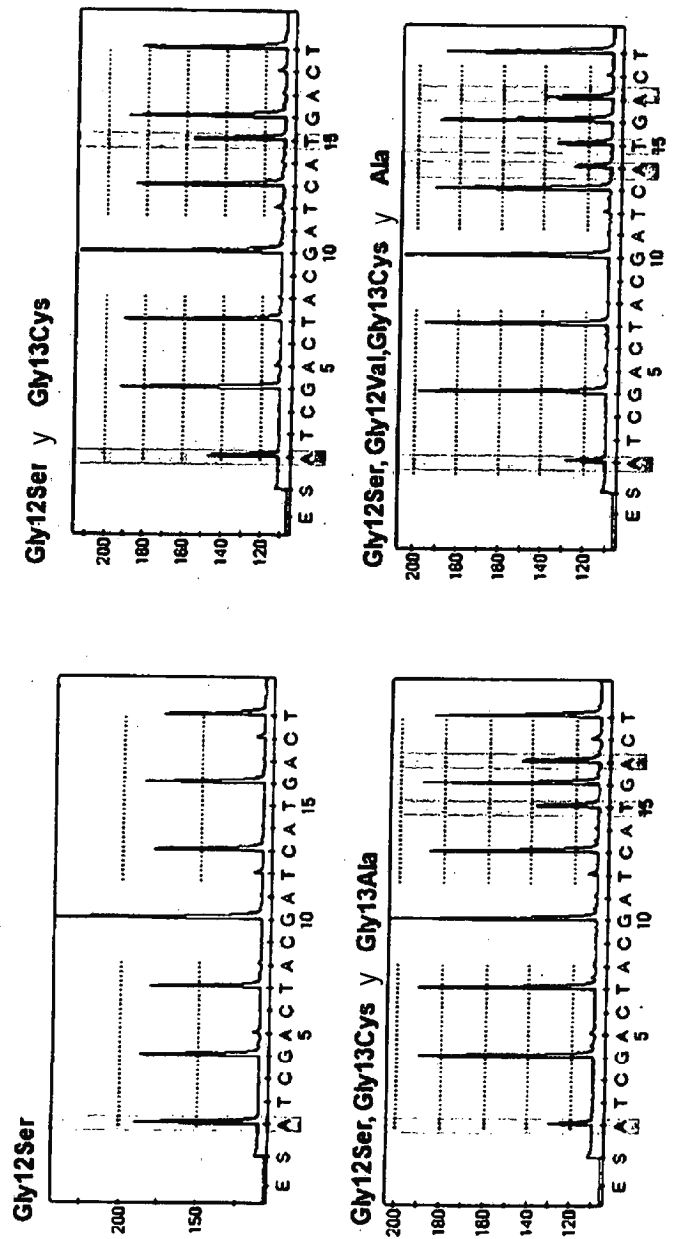
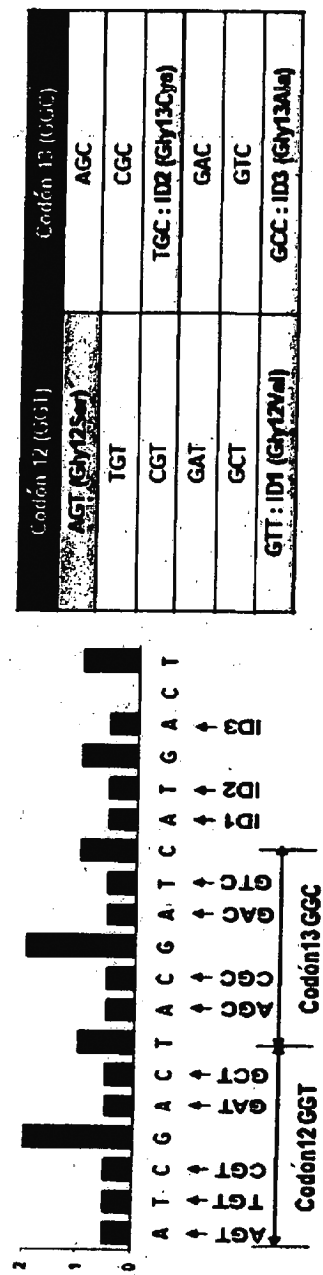


FIG. 23

Ejemplo 3) detección de mutación de KRAS en muestras de tejido colorrectal

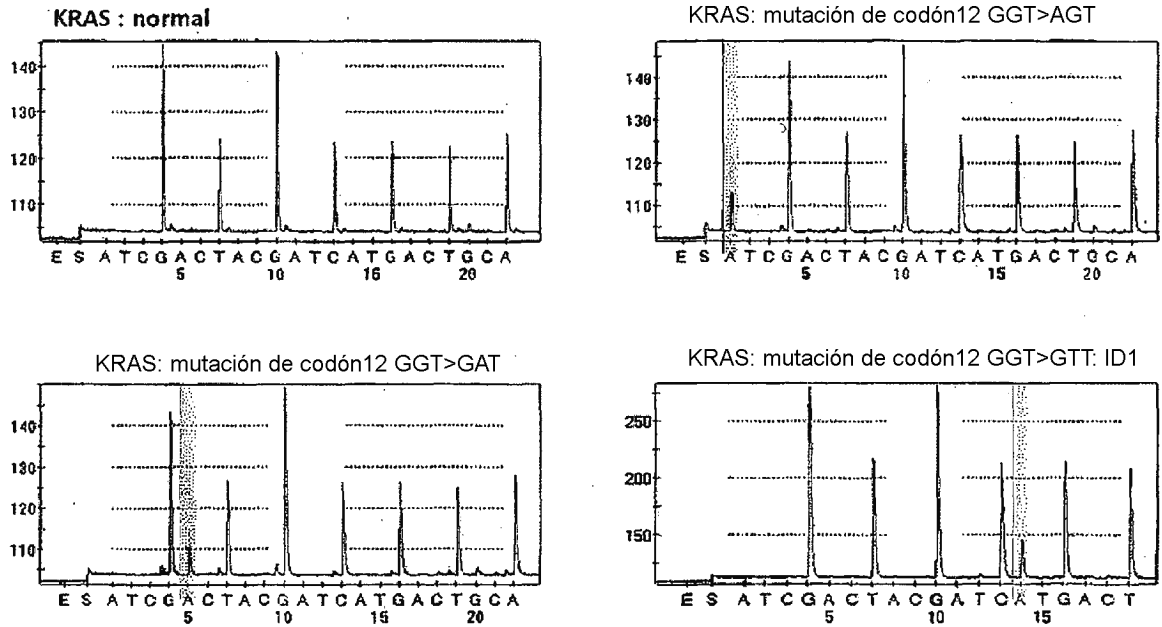


FIG. 24

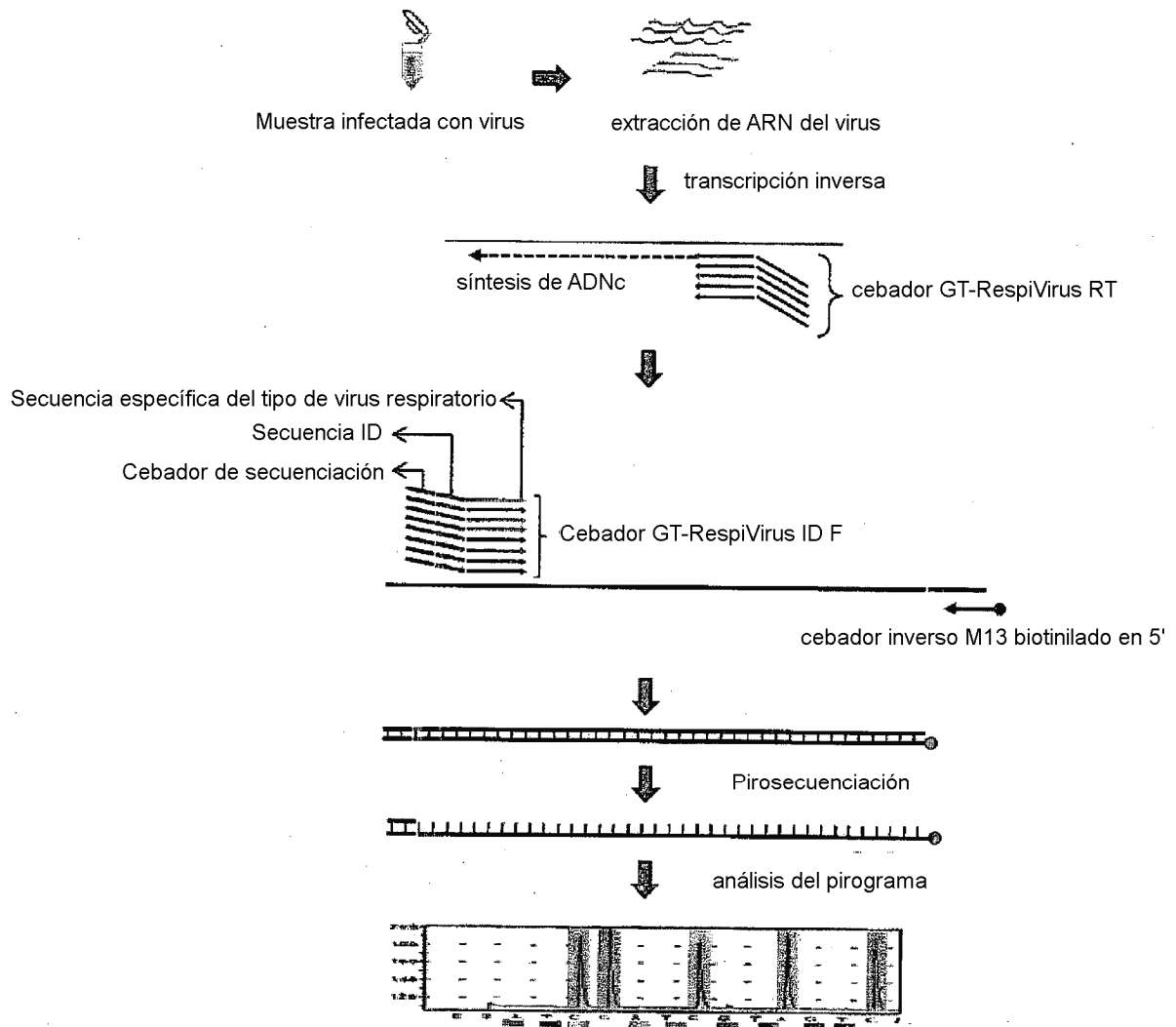


FIG. 25

Localizaciones de marcas ID que aparecen según el orden de distribución

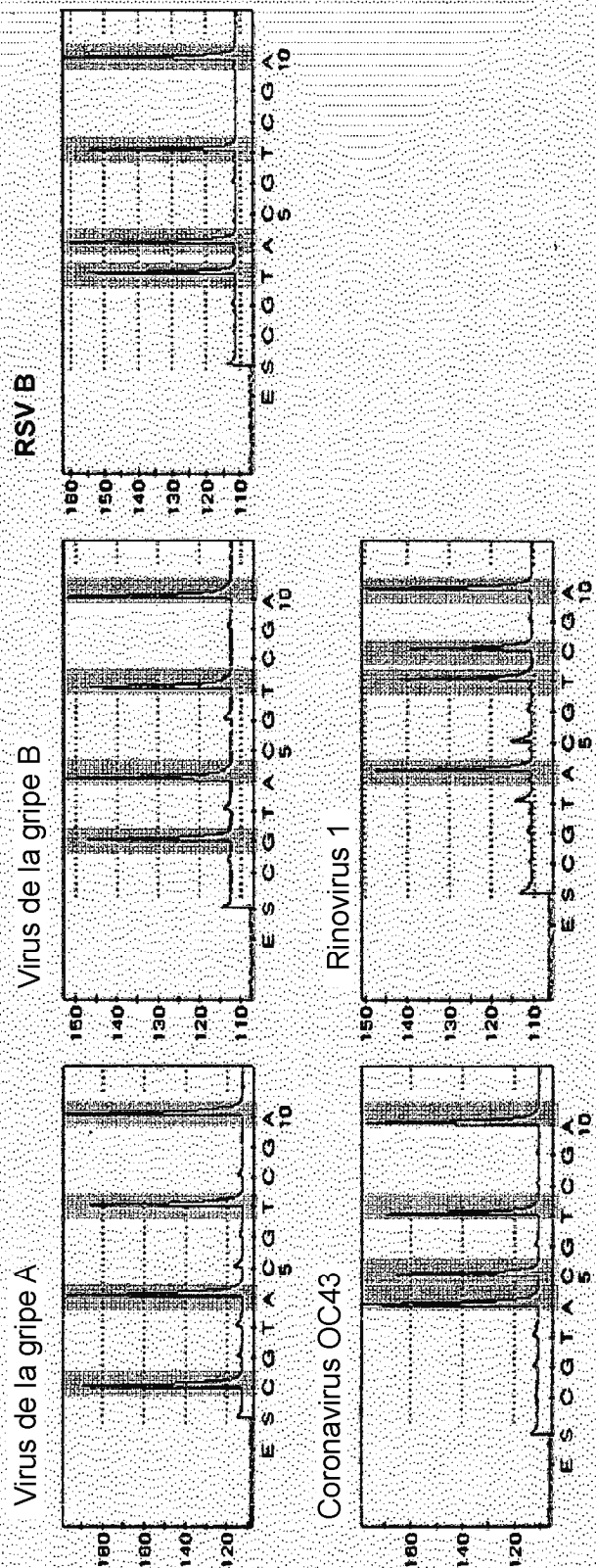
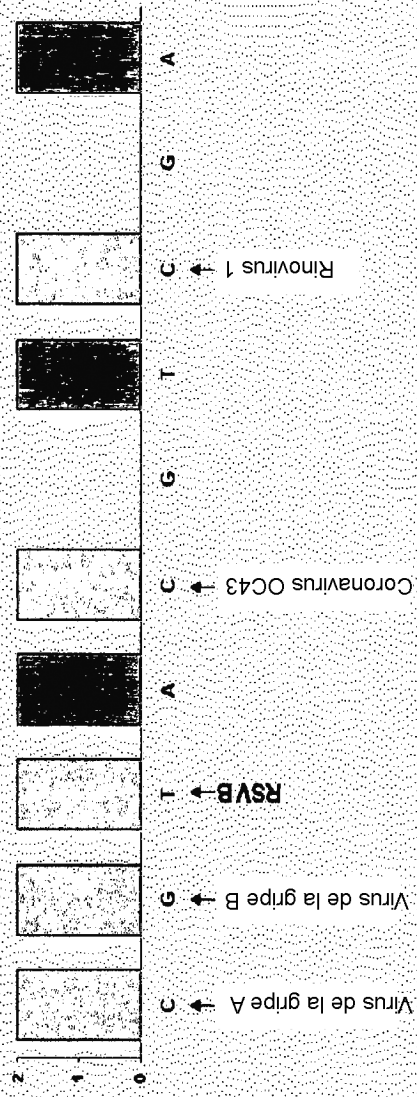


FIG. 26

