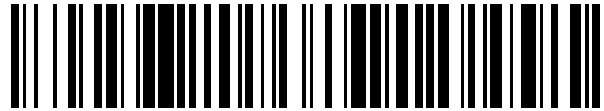


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 331**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2010 E 10702857 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.01.2016 EP 2384368**

54 Título: **Análisis de dosificación génica**

30 Prioridad:

30.01.2009 EP 09151698

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

04.04.2016

73 Titular/es:

**KANTONSSPITAL AARAU AG (100.0%)
Tellstrasse
5001 Aarau, CH**

72 Inventor/es:

**HUBER, ANDREAS R.;
BERNASCONI, LUCA;
HERKLOTZ, ROBERTO y
BRUNNER-AGTEN, SASKIA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 565 331 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

Análisis de dosificación génica

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos para la detección cuantitativa diferencial de múltiples genes estrechamente vinculados, en particular a procedimientos que permiten un genotipado rápido y preciso de los alelos de los genes fuertemente homólogos de la cadena α de la hemoglobina. Los genes de la globina α y $\alpha 2$.

Antecedentes

10 Se están usando técnicas de genotipado que han evolucionado rápidamente en un intento de identificar la base genética de las enfermedades hereditarias y de establecer una correlación genotipo/fenotipo, que a su vez pueda permitir un diagnóstico molecular más predictivo. Además, la mayoría de las enfermedades hereditarias son genéticamente muy complejas y a menudo implican múltiples combinaciones alélicas, que pueden no mostrar siempre un fenotipo específico de enfermedad. En tales casos, es necesario el genotipado de todas las variantes alélicas para poder distinguir entre, por ejemplo, portadores de la enfermedad y no portadores de la enfermedad. Solo el conocimiento del genotipo exacto de un individuo permitirá un pronóstico preciso del modelo heredado, en la expectativa de una predicción precisa de los síntomas relacionados con la enfermedad a medida que la enfermedad progresa, así como un tratamiento fiable para el individuo.

20 Dichas enfermedades incluyen todas las enfermedades genéticas basadas en la multiplicación de una parte del genoma debido a acontecimientos de entrecruzamiento desiguales entre cromosomas homólogos, que conduce a agrupaciones de secuencias homólogas (duplicaciones) y deleciones en un cromosoma (Figura 1). Dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, atrofia muscular espinal (AME), microtriplicaciones directas, y talasemia. La talasemia, por ejemplo, es un trastorno genético común, que conduce en su forma más moderada a una anemia microcítica hipocrómica debido a una formación de hemoglobina deteriorada. El resultado clínico de los casos más graves conduce a anemia muy grave o hidropesía fetal. Dependiendo de los defectos genéticos subyacentes, la talasemia se clasifica en β -talasemia y α -talasemia. En la β -talasemia, la mayoría de los casos se deben a mutaciones puntuales o ráster en el locus de la β -globina del cromosoma 11, que contiene un único gen que codifica las cadenas de la β -globina. Las α -talasemias, que se clasifican en α -talasemia, α^+ -talasemia y α^0 -talasemia, son principalmente el resultado de deleciones en el cromosoma 16, que contiene en su región telomérica dos genes estrechamente vinculados y fuertemente homólogos (genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$) que codifican las cadenas de α -globina. Los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la globina alfa duplicados están incluidos en dos regiones marcadamente homólogas que se extienden durante aproximadamente 4 kb. Durante la meiosis, la alineación incorrecta de cromosomas homólogos seguida por la recombinación recíproca en tres segmentos fuertemente homólogos, denominados x, y, y z, da como resultado varios acontecimientos de deleción-duplicación (Figura 2).

Las causas de la α -talasemia, α^+ -talasemia y α^0 -talasemia son la deleción o la disfunción de uno o ambos genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$, respectivamente.

35 La talasemia α^+ delecional es el resultado de la pérdida de uno de los dos genes de la globina α ($\alpha\alpha/\alpha$), por ejemplo, mediante recombinación recíproca entre la región z, que está separada por 3,7 kb, o entre la región X, que está separada por 4,2 kb, dando como resultado la deleción $-\alpha^{3,7\text{kb}}$ y la deleción $-\alpha^{4,2\text{kb}}$, respectivamente. La Figura 2 es una ilustración esquemática de acontecimientos de entrecruzamiento desiguales que conducen a dichas deleciones (los cuadrados rellenos representan los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ activos funcionales de la agrupación de genes de la globina alfa y los cuadrados blancos representan las secuencias homólogas X, Y Z y una de las dos pseudoglobinas, es decir $\Psi\alpha 1$). Los portadores heterocigóticos de la α^+ -talasemia resultantes de la combinación de una α^+ -talasemia delecional ($-\alpha$) y una normal ($\alpha\alpha$) (que también se conoce como portador silencioso de la α -talasemia ($(-\alpha/\alpha)$) pueden tener un fenotipo hematológico silencioso a diferencia de los portadores homocigóticos ($(-\alpha/\alpha)$) que presentan una imagen hematológica de tipo talasemia moderada (véase, por ejemplo, Herklotz y col, Ther Umsch, 2006, 63(1), p. 35).

La α^0 -talasemia puede estar producida por deleciones extendidas que varían de 5,2 kb a 25 kb y más, dando como resultado una deleción o disfunción de ambos genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ (homocigóticos $(-/-)$ o heterocigóticos ($\alpha\alpha/-$)), por ejemplo, $-\alpha^{\text{SEA}}$, $-\alpha^{\text{TAI}}$, $-\alpha^{\text{FIL}}$, $-\alpha^{\text{MED}}$, $-(\alpha)^{20,5\text{kb}}$. Se han notificado hasta la fecha aproximadamente 30 deleciones diferentes tales como la α^0 -talasemia.

50 Los resultados de las α -talasemias son múltiples y la gravedad esta correlacionada con el número de loci de α -globina afectados, es decir, la naturaleza exacta de la deleción génica, como se ilustra en la Figura 3 (recuadros rellenos, gen(es) de la α -globina presentes, recuadros blancos: gen(es) de la α -globina eliminados).

Los fenotipos de la α -talasemia tienen dos formas clínicamente significativas, que son el síndrome de hidropesía fetal con Hb de Bart (Hb de Bart) y la enfermedad de la hemoglobina H (HbH). En la enfermedad de Hb de Bart, los cuatro alelos de la α -globina $(-/-)$ están eliminados o inactivados. Es la forma más grave y se caracteriza por un inicio de edema fetal generalizado, siendo la muerte en el periodo neonatal siempre inevitable. La enfermedad de HbH es un resultado de deleción o disfunción en tres de los cuatro alelos de la α -globina $(-/-\alpha)$. Se caracteriza por

anemia hemolítica hipocrómica microcítica, hepatoesplenomegalia, ictericia leve, y algunas veces cambios óseos y cardíacos.

Las formas más leves de talasemia ((-α/-α), (--/αα) conducen a cambios hematológicos, usualmente sin ningún síntoma clínico. Sin embargo, para la denominada talasemia “silenciosa”, el diagnóstico exacto sigue siendo muy importante (αα/-α).

Se estima que existen al menos 200 millones de personas afectadas en todo el mundo. Además, están naciendo cada año 300.000-400.000 niños gravemente afectados, de los cuales más del 95 % de los nacimientos se producen en Asia, India, y Oriente Medio

El ensayo actual de la α-talasemia se basa en un algoritmo de diagnóstico por exclusión (es decir, para excluir la deficiencia de hierro, la β-talasemia, las hemoglobinopatías y la anemia hemolítica), que requiere un amplia gama de procedimientos tales como un ensayo hematológico de índices de glóbulos rojos, frotis de sangre periférica, tinción supravital para detectar cuerpos de inclusión en glóbulos rojos (RBC por sus siglas en inglés), análisis de hemoglobina cualitativo y cuantitativo, examen de médula ósea, y síntesis in vitro de cadenas de globina marcadas con elementos radioactivos en individuos afectados. La prueba final de la presencia de una α-talasemia se obtiene usando diagnósticos biomoleculares (Huber y col., Swiss medical Forum, 2004). Entre estas se incluyen la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (gap-PCR) de los genes α1 y α2 normales o α2/α1 híbridos de la globina (Chang y col., Blood, 1991, 78(3), 853; Ko y col., Hum genet, 1992, 88(3), 245) ensayos de enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) para la detección de las cadenas de zeta-globina en circulación (Ausavarugnirum y col., Am J Hematol, 1998, 57(4), 283) y ensayos de hibridación con α-tiras

Se ha aplicado la técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) para diferentes investigaciones, incluyendo detección de patógenos, discriminación alélica, expresión génica y regulación génica (Bowie y col., Clin Chem, 1994, 40(12), 2260; Das y col., Br J Cancer, 2000, 82(10), 1682; Fujii y col., Mutat, 2000, 15(2), 189), así como la detección de duplicaciones y deleciones, por ejemplo, en distrofias musculares de Duchenne y Becker, fibrosis quística y neuroblastomas (Joncourt y col., Hum Mutant 2004, 23(4): 385), detección de deleciones de exones en un gen completo (CFTR) mediante cuantificación relativa en el LightCycler (Schneider M. y col., American Association for Clinical Chemistry 2006, 52: 11) cuantificación del número de copias de genes MYCN, DDX1 y NAG en neuroblastoma utilizando un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (De Preter K. y col., Mod Pathol 2002, 15(2): 159-166). Sin embargo, aunque la RT-PCR también se ha aplicado en la detección de la α-talasemia (Armour y col., Hum Mutant, 2002, 20(5): 325), los procedimientos actuales permiten solo la detección de algunas mutaciones restringidas tales como la delección del tipo sudeste asiático, o un grupo de, por ejemplo, tres deleciones diferentes (-α^{3,7kb}, -α^{SEA} y -α^{MED}).

Claramente, las tecnologías actuales requieren mucha mano de obra y/o necesitan tiempo y en el caso de enfermedades hereditarias vinculadas a agrupaciones de genes repetidos, es decir, múltiples genes, tales como α-talasemia, pueden seguir sin proporcionar un análisis fiable de todas las variantes de las enfermedades.

De esta manera, existe una gran necesidad de un procedimiento de cribado general, rápido y eficaz, que sea completamente normalizado y adecuado para la rutina del laboratorio, que permita la detección mediante cuantificación diferencial de loci múltiples de genes homólogos bajo los que subyace una enfermedad hereditaria específica, tales como los mencionados anteriormente en el presente documento.

Los solicitantes han diseñado ahora un nuevo procedimiento de cribado que utiliza múltiples conjuntos de cebadores que realizan un único ciclo de la RT-PCR, que permite la clasificación del genotipo de un individuo afectado por dicha enfermedad hereditaria. La cuantificación de cada una de las regiones génicas amplificadas por referencia a un control, preferentemente uno o varios controles endógenos (gen de referencia), y particularmente la relación entre cada una de las regiones amplificadas permite la identificación bien definida del genotipo del individuo. En el caso de un genotipo anómalo, un posterior análisis, por ejemplo, la secuenciación, permite caracterizar adicionalmente la naturaleza y localización exactas de la mutación.

El nuevo procedimiento de acuerdo con la invención es aplicable a cualquier trastorno genético basado en múltiples loci de genes homólogos. Por ejemplo, los solicitantes han mostrado que el nuevo procedimiento de cribado permite una clasificación clara del genotipo de la α-talasemia de cualquier paciente llevando a cabo un único ciclo de la RT-PCR. La cuantificación de cada una de las regiones del gen de la α-globina amplificadas y particularmente la relación entre aquellas regiones permitirá la determinación de la prevalencia real de la α-talasemia detectando todos los portadores, que de otra forma estarían sujetos a un diagnóstico incorrecto o a quedar sin diagnóstico. Se trata de una herramienta particularmente importante para el asesoramiento genético general y/o al diagnóstico prenatal.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona en un primer aspecto un procedimiento para la detección cuantitativa diferencial de dos o más genes homólogos, estrechamente vinculados, en una muestra.

De forma más específica, la presente invención proporciona un procedimiento para la detección cuantitativa diferencial de dos o más genes homólogos estrechamente vinculados en una muestra que comprende las etapas de

(i) someter la muestra a reacciones de amplificación separadas utilizando (a) una primera pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados y (b) una segunda pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cola de cada uno de los dos o más genes homólogos estrechamente vinculados, y (ii) detectar y cuantificar productos de la amplificación con respecto a un producto del control, en el que cada primera pareja de cebadores se hibrida en la dirección 5' de, y cada segunda pareja de cebadores se hibrida en la dirección 3' de, un punto de rotura estimado debido a un entrecruzamiento en cada uno de los correspondientes dos o más genes homólogos estrechamente vinculados y en el que la región de cabeza de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente relacionados representa una secuencia de nucleótidos en el extremo 5' de dicho gen y en la región de cola de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados representa una secuencia de nucleótidos en el extremo 3' de dicho gen, con la condición de que la pareja de cebadores directo e inverso se seleccionen de tal manera que la pareja de cebadores localizada en la región de cola no se solape con la pareja de cebadores localizada en la región de cabeza de dos genes adyacentes de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados.

En una realización, se llevan a cabo las reacciones de amplificación utilizando la RT-PCR, preferentemente en una única etapa, más preferentemente utilizando una o más sondas de hibridación basadas en fluorescencia.

En otra realización, el producto del control es el producto de la amplificación de una secuencia control, preferentemente una secuencia control endógena.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de cribado preciso para portadores de un polimorfismo genético en dos o más genes homólogos estrechamente vinculados en una muestra. De esta manera, la presente invención se refiere también a un procedimiento para diagnosticar a un individuo mediante una identificación precisa y exacta de su genotipo.

En una realización específica, la presente invención proporciona un procedimiento para una detección cuantitativa precisa del (de los) gen(es) α en portadores de α -talasemia determinando por tanto la clasificación clínica relevante de las α -talasemias (Figuras 2, 3). De esta manera, la presente invención proporciona un procedimiento de cribado preciso para portadores de una α -talasemia (deleccional).

En una realización preferida, un procedimiento para la detección cuantitativa precisa del (de los) gen(es) α en una muestra biológica comprende las etapas de:

(i) amplificar una primera porción de la muestra con una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de $\alpha 1$;

(ii) amplificar una segunda porción de la muestra con una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de $\alpha 2$;

(iii) amplificar una tercera porción de la muestra con una pareja de cebadores directo e inverso de la región de la cola de $\alpha 1$;

(iv) amplificar una cuarta porción de la muestra con una pareja de cebadores directo e inverso de la región de la cola de $\alpha 2$;

y

(v) detectar y cuantificar los productos de amplificación con respecto a un producto del control.

En una realización, la etapa de detección se lleva a cabo utilizando sondas de hibridación marcadas.

En otra realización, el producto del control es el producto de la amplificación de una secuencia control endógena, tal como un gen constitutivo o una secuencia relacionada con el gen que se va a detectar, tal como el gen β .

Se describen también oligonucleótidos para su uso como cebadores en la amplificación de las regiones especificadas en la agrupación del gen de la α -globina, es decir, las regiones de cabeza y cola del gen $\alpha 1$ y el gen $\alpha 2$. Dichos oligonucleótidos pueden diseñarse basándose en la secuencia no homóloga conocida de las regiones de cabeza y cola del gen $\alpha 1$ y el gen $\alpha 2$ y tienen aproximadamente de 10 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Los oligonucleótidos pueden comprender cualquier secuencia específica de las regiones de cabeza y cola de la región del gen $\alpha 1$ y el gen $\alpha 2$, respectivamente, en la agrupación del gen de la alfa-globina que se identifica por el N.º de referencia del GenBank AE006462. En una realización preferida, los oligonucleótidos comprenden las secuencias no homólogas en la agrupación de genes de la alfa-globina que se muestra en las SEC ID NO: 1-8 y las sondas de hibridación basadas en fluorescencia comprenden las secuencias SEC ID NO: 9-16.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit para detección cuantitativa diferencial de dos o más genes homólogos estrechamente vinculados para permitir el cribado y el diagnóstico de un individuo. El kit puede incluir en compartimentos separados parejas de cebadores de acuerdo con la invención capaces de hibridarse específicamente y amplificar las regiones de la cabeza y la cola del gen en cuestión. El kit puede incluir además sondas de hibridación marcadas adecuadamente para la detección y una pareja de cebadores capaz de

hibridarse y amplificar una secuencia control.

De esta manera, en una realización específica, la presente invención proporciona un kit para la detección cuantitativa de delecciones en la agrupación de genes de la α -globina para permitir el cribado y el diagnóstico de la talasemia en un individuo. El kit puede incluir parejas de cebadores en compartimentos separados de acuerdo con la invención capaces de hibridarse específicamente a y amplificar las regiones de la cabeza y la cola de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ y las sondas de hibridación opcionalmente marcadas para la detección y una pareja de cebadores capaz de hibridarse y amplificar una secuencia control, tal como una región de la secuencia del gen de la β -globina.

En otro aspecto más adicional, los procedimientos de la invención pueden llevarse a cabo utilizando (micro) matrices. De esta manera, la presente divulgación proporciona también una matriz para genotipar polimorfismos basándose en dos o más genes homólogos estrechamente vinculados utilizando los procedimientos de la invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Acontecimiento de entrecruzamiento desigual en una agrupación de repetición en tándem (genoma homocigótico del cromosoma duplicado original).

Figura 2. (A) organización estructural de la agrupación de genes de la α -globina; (B) y (C): acontecimientos de entrecruzamiento desigual que conducen a α^+ -talasemia deletérea.

Figura 3. Presentación esquemática de las formas de delección clásicas de la α -talasemia y la correlación entre fenotipo y genotipo.

Figura 4. Genotipos seleccionados y modelos de relación.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se ha desarrollado en respuesta a una necesidad de un procedimiento rápido, muy específico, y económico para genotipar individuos que transportan múltiples genes homólogos vinculados a una enfermedad hereditaria, tal como atrofia muscular espinal (AME), microtriplicaciones diversas, α -talasemia, y otras. Salvo que se especifique lo contrario, los términos usados en el presente documento se definen de acuerdo con el estado general de la técnica.

El término “amplificación” o “amplificar” como se usa en el presente documento significa aumentar el número de copias de una molécula de ácido nucleico. Los productos resultantes de la amplificación se denominan “productos amplificados” o “amplicones”. Un ejemplo de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en la cual, una muestra se pone en contacto con una pareja de cebadores de oligonucleótidos en condiciones que permitan la hibridación de los cebadores con un molde de ácido nucleico de la muestra. Los cebadores se amplían en condiciones adecuadas, se disocian del molde, se vuelven a hibridar, se amplían, y se disocian para amplificar el número de copias del ácido nucleico. Este ciclo se puede repetir. Se puede caracterizar el producto de la amplificación mediante técnicas conocidas en la materia tales como electroforesis, modelos de escisión de la endonucleasa de restricción, hibridación o ligadura de oligonucleótidos, y/o secuenciación de ácidos nucleicos. Otros ejemplos de técnicas de amplificación in vitro incluyen la PCR cuantitativa en tiempo real, PCR mediante transcriptasa inversa, PCR mediante transcriptasa inversa en tiempo real, PCR anidada; amplificación con desplazamiento de hebra (véase documento US 5.744.311), amplificación de la reacción en cadena de la ligasa (véase el documento EP-A-320 308); amplificación mediante reacción en cadena de la ligasa con llenado de huecos (véase el documento US 5.427.930), detección de la ligasa acoplada y PCR (véase el documento US 6.027.889), amplificación de sonda dependiente de ligadura multiplete (MLPA), etc.

El término “PCR en tiempo real” (RT PCR) como se usa en el presente documento, se basa en el procedimiento de la PCR y significa un procedimiento para amplificar y cuantificar simultáneamente productos generados durante cada ciclo de una PCR, que son proporcionales a la cantidad del molde de ácido nucleico antes del inicio de la PCR. De esta manera, se permite la detección y la cuantificación simultánea (como número absoluto de copias o cantidad relativa cuando se normaliza con respecto al ADN de partida o con o genes de normalización adicionales) de una secuencia específica en una muestra de ADN. Se hace referencia también a una revisión general de técnicas de la PCR y a la nota explicatoria titulada “Quantitation of DNA/RNA Using Real-Time PCR Detection” publicada por Perkin Elmer Applied Biosystems (1999) y a los PCR Protocols (Academic Press Nueva York, 1989) así como las descripciones proporcionadas a partir de ahora en el presente documento.

La cuantificación mediante la RT PCR se basa en la detección de un indicador fluorescente (Lee, 1993; Livak, 1995). Esta señal cambia (aumento o disminución) en proporción directa a la cantidad de producto de la PCR en una reacción. Registrando la cantidad de emisión de fluorescencia en cada ciclo, es posible vigilar la reacción de la PCR durante la fase exponencial donde el primer cambio significativo en la cantidad de producto de la PCR está correlacionado con la cantidad inicial de molde diana.

Los sistemas de vigilancia de la fluorescencia para la amplificación del ADN que se van a emplear en los procedimientos de la invención incluyen por ejemplo la unión del ADN o agentes intercalantes (tales como bromuro

de etidio o SYBR® Green I) y sondas basadas en la transferencia de energía de resonancia mediante fluorescencia (FRET)

El uso de una química de colorantes unidos a ADN bicatenarios permite cuantificar la producción de amplicones (incluyendo la amplificación no específica y el complejo cebador-dímero) mediante el uso de un agente intercalante fluorescente no específico de secuencias tal como SYBR-GREEN I, bromuro de etidio, o similares ((véase por ejemplo el documento US.569.627).

La tecnología FRET (véanse, por ejemplo, los documentos US 4.996.143, US 5.565.322, US 5.849.489, y US 6.162.603) se basa en el concepto de que cuando un resto fluorescente donante y un resto fluorescente aceptor correspondiente se sitúan a una determinada distancia entre sí, tiene lugar una transferencia de energía entre los dos restos fluorescentes que se puede visualizar o detectar y/o cuantificarse de otra manera. Se pueden llevar a cabo análisis de fluorescencia utilizando, por ejemplo, un sistema de microscopio epifluorescente con recuento de fotones (que contiene el espejo dicróico y los filtros adecuados para vigilar la emisión fluorescente en el intervalo concreto, un sistema fotomultiplicador de recuento de fotones o un fluorómetro. La excitación para iniciar la transferencia de energía puede llevarse a cabo con un láser iónico de argón, una lámpara de arco de mercurio (Hg) de alta intensidad, una fuente de luz de fibra óptica, u otra fuente de luz de alta intensidad adecuadamente filtrada para la excitación en el intervalo deseado.

Como se usa en el presente documento con respecto a los restos donante y aceptor fluorescentes correspondientes "correspondiente" se refiere a un resto fluorescente aceptor que tiene un espectro de emisión que solapa el espectro de excitación del resto fluorescente donante. La longitud de onda máxima del espectro de emisión del resto fluorescente aceptor debe ser al menos 100 nm mayor que la longitud de onda máxima del espectro de excitación del resto fluorescente donante. De acuerdo con ello, la transferencia de energía no radiante eficaz se puede producir entre los anteriores. Los restos fluorescentes donante y aceptor se pueden unir a la sonda de oligonucleótidos adecuada mediante un brazo de engarce. La longitud de cada brazo de engarce es importante, en la medida en que los brazos de engarce afectarán a la distancia entre los restos fluorescentes donante y aceptor.

Los restos donante y su correspondiente aceptor fluorescentes se seleccionan generalmente para (a) transferir energía Förster de alta eficacia; (b) un desplazamiento de Stokes final grande (>100 nm); (c) un desplazamiento de la emisión en lo posible en la parte del rojo del espectro visible (>600 nm); y (d) desplazamiento de la emisión hasta una longitud de onda mayor que la emisión de fluorescencia Raman en la banda del agua producida por la excitación en la longitud de onda de excitación del donante.

Los restos fluorescentes donantes representativos que se pueden usar con diversos restos fluorescentes aceptores en la tecnología FRET incluyen fluoresceína, Lucifer Yellow, B-ficoeritrina, 9-acridinaisotiocianato, Lucifer Yellow VS, ácido 4-acetamido-4'-isotio-cianoestilbeno-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)-4-metilcoumarina, 1-pirenobutirato de succinimidilo, y derivados del ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico. Los restos fluorescentes aceptores representativos, dependiendo del resto fluorescente donante utilizado incluyen LC™ - Red 640, LC™ -Red 705, Cy5, Cy5.5, cloruro de lisamina rodamina B sulfonilo, isocianato de tetrametilo rodamina, rodamina x isotiocianato, isotiocianato de eritrosina, fluoresceína, pentaacetato de dietilentríamina u otros quelatos de iones lantánidos (por ejemplo, europio, o terbio). Se pueden obtener restos fluorescentes donantes y aceptores, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, Oreg.) o Sigma Chemical Co (St. Louis, MO).

Las sondas basadas en la tecnología FRET incluyen, por ejemplo, sondas de hibridación (por ejemplo, sondas LightCycler), sondas de hidrólisis tales como sondas Taqman™ (Heid y col, 1996, incorporado al presente documento por referencia por su enseñanza de las sondas de hidrólisis), balizas moleculares (Mhlanga, 2001; Vet, 2002, Abravaya, 2003; Tan, 2004; Vet y Marras, 2005, incorporados al presente documento por su enseñanza de las balizas moleculares) y sondas *scorpion* (Saha, 2001; Solinas, 2001; Terry, 2002, incorporados en el presente documento por referencia por su enseñanzas de las sondas *scorpions*)

Los oligonucleótidos que se van a usar como sondas de hibridación incluyen una pareja de dos oligonucleótidos diferentes, transportando uno de ellos un donante FRET, el otro un aceptor FRET. Esta pareja de sondas se hibrida preferentemente con un producto de amplificación a una distancia de no más de 5 nucleótidos entre sí en la misma hebra que lleva los restos fluorescentes respectivos en proximidad suficiente para que se produzca el FRET (por ejemplo, en no más de 1, 2, 3, o 4 nucleótidos entre sí). Debe entenderse, sin embargo, que son posibles otras distancias de separación (por ejemplo, 6 o más nucleótidos), con la condición que los restos fluorescentes se sitúen adecuadamente uno respecto al otro (por ejemplo, con un brazo de engarce) de tal manera que se produzca FRET. Análogamente a los cebadores de oligonucleótidos, las sondas de oligonucleótidos tienen usualmente temperaturas de fusión similares, y la longitud de cada sonda debe ser suficiente para que se produzca la hibridación específica de secuencia, pero no tan larga como para que se reduzca la fidelidad durante la síntesis. Dichas sondas de oligonucleótidos tienen generalmente 10 a 40, preferentemente 15 a 30 nucleótidos de longitud.

Las sondas Taqman™ que se van a usar en la presente invención son normalmente oligonucleótidos únicos más largos que los cebadores de la invención (20-30 bases de longitud con un valor de la T_f 10 °C mayor) que contienen un colorante fluorescente usualmente en la base 5', y un colorante de inactivación normalmente en la base 3'. Cuando se irradian, el colorante fluorescente excitado transfiere la energía a la molécula de colorante de inactivación

más cercana. De esta manera, solamente tras la replicación de un molde al cual se ha unido la sonda Taqman™ y tras la escisión de la sonda, se emite la fluorescencia (proporcional a la velocidad de escisión de la sonda). La acumulación de productos de la PCR de acuerdo con la invención se detecta vigilando el aumento de la fluorescencia del colorante indicador. El ensayo TaqMan™ utiliza parámetros de ciclación térmica y condiciones de reacción de la PCR universales.

Se pueden usar también balizas moleculares en los procedimientos de la presente invención. Estas contienen también colorantes fluorescentes (FAM, TAMRA, TET, ROX) y colorantes de inactivación (normalmente DABCYL) en cualquier extremo, pero se diseñan para adoptar una estructura en horquilla cuando están libres en solución para llevar el colorante fluorescente y el colorante inactivador en estrecha proximidad para que se produzca FRET, mientras que la hibridación evita la formación de la estructura en horquilla.

Utilizando sondas Scorpion para la presente invención, se consigue un cebado específico de secuencia y la detección del producto de la PCR utilizando un único oligonucleótido. La sonda Scorpion mantiene una configuración de tallo-bucle en el estado sin hibridar, teniendo un fluoróforo unido al extremo 5' y un resto de inactivación acoplado al extremo 3'. La porción 3' del tallo contiene también una secuencia que es complementaria del producto de extensión del cebador y que se une a su complemento tras la ampliación de la secuencia por lo cual permite observar una señal de fluorescencia.

Se puede llevar a cabo la reacción de la PCR en tiempo real en una amplia variedad de plataformas incluyendo, pero sin limitarse a ABI 7700 (ABI), el LightCycler (Roche Diagnostic), iCycler (BioRad), DNA Engine Opticon Continuous Fluorescence Detection System (MJ Research), Mx400 (Stratagene), Chimaera Quantitative Detection System (Thermo Hybaid), Rotor-Gen 3000 (Corbett Research), Smartcycler (Cepheid), o el formato MX3000P (Stratagene)

Los términos "genoma", "muestra genómica", "ADN genómico", "material genómico (ácido nucleico)" se pueden usar de forma indistinta y significan las moléculas de ácidos nucleicos en un organismo o célula que son la fuente, en última instancia, de la información genética heredable del organismo. Para la mayoría de organismos, un genoma consiste principalmente en ADN cromosómico, pero puede incluir también plásmidos, ADN mitocondrial, etc. Para algunos organismos, tales como los virus de ARN, un genoma consiste en ARN. Como se usa en la presente memoria descriptiva, el ADN genómico no se digiere, o permanece intacto salvo que se indique lo contrario. Por "ácido nucleico" se entiende ADN, ARN, u otras composiciones relacionadas de materia que pueden incluir sustituciones de restos similares. Por ejemplo, los ácidos nucleicos pueden incluir bases que no se encuentran en el ADN o el ARN, incluyendo, pero no de forma limitativa, xantina, inosina, uracilo en el ADN, timina en el ARN, hipoxantina, y así sucesivamente. Los ácidos nucleicos pueden incluir también modificaciones químicas de restos fosfato o azucarados, que se pueden introducir para aumentar la estabilidad, resistencia a la degradación enzimática, o alguna otra propiedad útil. El material genómico puede aislarse de virtualmente cualquier muestra, normalmente, la muestra es una muestra biológica o una muestra bioquímica.

El término "muestra biológica", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra que contiene ácido nucleico, es decir, material genómico, y se obtiene de un organismo o de los componentes (por ejemplo, células) de un organismo. La muestra puede ser de cualquier tejido o fluido biológico (humano o animal), preferentemente la muestra será una "muestra clínica" derivada de un individuo. Dichas muestras incluyen, pero no de forma limitativa, esputo, fluido cerebroespinal, sangre, fracciones sanguíneas, tales como suero, incluyendo suero de feto (por ejemplo, SFC) y plasma, células sanguíneas (por ejemplo, glóbulos blancos), muestras de biopsia de tejidos o tomadas mediante aguja fina, orina, fluido peritoneal, y fluido pleural, o células derivadas de los anteriores. Las muestras biológicas pueden incluir también cortes de tejido. Una muestra que contiene (o se sospecha que tiene) un contenido genómico, puede ser un material biológico o cualquier material que comprenda material biológico a partir del cual se pueden preparar ácidos nucleicos y analizarse para la presencia cualitativa y cuantitativa de secuencias de ácidos nucleicos concretas. El material del ácido nucleico genómico que se va a usar en los procedimientos de la presente invención está preferentemente en forma aislada, es decir, sometido a alguna preparación antes de su uso, que puede implicar la eliminación de desechos de ácidos no nucleicos, así como la suspensión/dilución del material de ácido nucleico puro o aislado en agua o un tampón adecuado. Por "puro" o "aislado" en referencia a un ácido nucleico (por ejemplo, aislados de ADN recombinantes o clonados, aislados de ARN, polímeros mixtos, oligonucleótidos, y análogos sintetizados químicamente) se entiende aquel que está sustancialmente separado de otros componentes celulares y desechos de ácidos no nucleicos. El término puede abarcar también una suspensión/dilución del material de ácido nucleico puro o aislado en agua o un tampón adecuado.

El término "dos o más genes homólogos estrechamente vinculados" se refiere a agrupaciones de genes con repeticiones múltiples, en el que múltiples, es decir, al menos dos genes homólogos, están relacionados por un modelo de expresión. Por ejemplo, con respecto a la α -talasemia, los genes $\alpha 1$, $\alpha 2$ representan la "agrupación con repetición en tándem" o "dos genes estrechamente vinculados".

El término "genotipo" se refiere a la constitución genética de un organismo. Más específicamente, el término se refiere a la identidad de los alelos presentes en un individuo. "Genotipado" de un individuo o de una muestra de ADN se refiere a identificar la naturaleza, en términos de bases de nucleótidos, de los dos alelos poseídos por un individuo en un sitio polimórfico conocido. El término "alelo" se usa en el presente documento para referirse a

diferentes versiones de una secuencia de nucleótidos. El término “natural” o “wt” como se usa en el presente documento se refiere a la forma normal, o no mutada, o funcional de un gen que no transporta mutaciones. Una mutación que afecta solo a un alelo se denomina “heterocigótica”. Una mutación “homocigótica” es la presencia de la mutación idéntica de ambos alelos de un gen específico. Cuando ambos alelos de un gen albergan mutaciones, pero dichas mutaciones son diferentes”, se denomina “heterocigótico compuesto”. De esta manera, con respecto a la α -talasemia, un individuo que tiene (i) los cuatro alelos intactos se denomina “wt” ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), (ii) uno de cuatro alelos eliminados se denomina α^+ -talasemia heterocigótica ($-\alpha/\alpha\alpha$), (iii) dos de cuatro alelos eliminados se denomina tanto α^+ -talasemia homocigótica ($-\alpha/-\alpha$) como α^0 -talasemia heterocigótica ($--/\alpha\alpha$), (iv) tres de cuatro alelos eliminados se denomina heterocigótico compuesto con α^+/α^0 -talasemia ($--/-\alpha$), y (v) los cuatro alelos eliminados se denomina α^0 -talasemia homocigótica ($---/---$).

El término “oligonucleótido” como se usa en el presente documento se refiere a cebadores, sondas y fragmentos de oligómeros que se van a detectar y se definen como una molécula que comprende dos o más desoxirribonucleótidos, preferentemente no más de tres. Su tamaño exacto depende de diversos factores, incluyendo la función o el uso en última instancia del oligonucleótido y se definirán por separado.

El término “cebador”, como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido monocatenario corto capaz de hibridarse con una secuencia complementaria en una muestra de ADN. Un cebador sirve como un punto de inicio para la síntesis de ADN dependiente de molde. Los desoxirribonucleótidos se pueden unir a un cebador mediante una ADN polimerasa. Una “pareja de cebadores “par de cebadores” o “conjunto de cebadores” se refiere a un conjunto de cebadores que incluye un cebador en la dirección 5’, o cebador directo, que se hibrida con el complemento del extremo 5’ de la secuencia de ADN que se va a amplificar y un cebador en la dirección 3’, o cebador inverso, que se hibrida con el extremo 3’ de la secuencia de ADN que se va a amplificar. El término “cebador de la PCR” como se usa en el presente documento se refiere a un cebador utilizado para la reacción de la PCR.

El término “secuencia control” como se usa en el presente documento significa un gen o secuencia de ácido nucleico en un nivel de expresión consistente que se incluye como un control interno o secuencia patrón para asegurar que la amplificación ha progresado, proporcionando un producto amplificado, denominado también en el presente documento “fragmento control” o “producto del control”. Se diseña de tal manera que se pueda amplificar mediante el mismo o diferentes cebadores, preferentemente diferentes cebadores, de los utilizados para amplificar la secuencia de ADN diana. El tamaño del fragmento control amplificado puede ser igual o diferente al de la secuencia de ADN diana. Cuando se analiza el producto obtenido, por ejemplo, utilizando fluorescencia, el fragmento control amplificado puede ser igual o diferente al de la secuencia del ADN diana. Cuando se analiza el producto obtenido, utilizando, por ejemplo, electroforesis en gel, el fragmento control amplificado es preferentemente diferente, de tal manera que se produce una banda separada en el gel (indicando que la reacción de amplificación ha progresado). La secuencia control es preferentemente una secuencia control endógena y está presente en una cantidad conocida en el material de partida. Las secuencias control endógenas preferidas son por ejemplo genes constitutivos que se usan normalmente para la normalización debido a sus niveles de expresión estables en todos los tipos de células e incluyen genes tales como porfobilinógeno desaminasa, hipoxantina fosforribosiltransferasa, δ -aminolevulinato-sintasa, β 2-microglobulina, albúmina, β -actina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y similares. Dicha secuencia control o gen constitutivo se puede determinar utilizando protocolos normalizados (por ejemplo, el conjunto de selección de genes h-constitutivos Lightcycler® (Roche)). De forma alternativa, se puede usar una secuencia específica del gen que se va a detectar como secuencia control endógena, tal como la secuencia del gen β en el caso del diagnóstico de los genes α de la talasemia. La secuencia diana y la secuencia control se pueden amplificar en reacciones de la RT-PCR separadas. De forma alternativa, la secuencia control se amplifica junto con la secuencia diana en el mismo tubo de ensayo (control interno). Se entiende que el control interno y los cebadores específicos de gen deben ser compatibles (es decir, sin hibridación cruzada). Se entiende también que el uso de un control interno implica que los productos de la RT-PCR pueden discriminarse suficientemente, por ejemplo, sobre la base de diferentes señales de fluorescencia. Se entiende además que se pueden usar una secuencia control o más de una.

Por “complemento” y palabras similares, por ejemplo, “complementario” y complementariedad, se entiende la secuencia complementaria a un ácido nucleico (ARN, ADN, ADNc) de acuerdo con las reglas de emparejamiento de Watson/Crick normalizadas. Determinadas bases que no se encuentran comúnmente en ácidos nucleicos naturales se pueden incluir en los ácidos nucleicos descritos en el presente documento; estas incluyen, por ejemplo, inosina, 7-deazaguanina, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). La complementariedad no necesita ser perfecta; dupletes estables pueden contener parejas de bases emparejadas incorrectamente, bases degeneradas, o no emparejadas. Los expertos en la materia de la tecnología del ácido nucleico pueden determinar la estabilidad del duplete empíricamente teniendo en cuenta numerosas variables que incluyen, por ejemplo, la longitud del oligonucleótido, la composición de las bases y la secuencia del oligonucleótido, la fuerza iónica y la incidencia de parejas de bases emparejadas incorrectamente.

El término “sustancialmente complementaria” como se usa en el presente documento significa que las dos secuencias se hibridan en condiciones de hibridación rigurosas. El técnico experto entenderá que las secuencias sustancialmente complementarias no necesitan hibridarse a lo largo de su longitud completa. En particular, las secuencias sustancialmente complementarias comprenden una secuencia de bases contiguas que no se hibridan

con una secuencia diana, situada 3' o 5' de una secuencia de bases contigua que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con una secuencia diana.

El término “condiciones rigurosas” como se usa en el presente documento se refiere a las condiciones de lavado utilizadas en el protocolo de hibridación y significa que la hibridación se produciría solo si existe al menos un 95 % y preferentemente al menos un 97 % de identidad entre las secuencias. En general, las condiciones de lavado deben ser una combinación de temperatura y concentración salina seleccionadas de tal manera que la temperatura de desnaturalización sea aproximadamente 5-20 °C por debajo de la T_f calculada (la temperatura de fusión a la cual la mitad de las moléculas se disocian de sus moléculas de hibridación asociadas) del ácido nucleico híbrido en estudio. Las condiciones de temperatura y sal se determinan fácilmente de forma empírica en experimentos preliminares en los cuales las muestras de ADN de referencia inmovilizadas sobre filtros se hibridan con el ácido nucleico que codifica la sonda o la proteína de interés y a continuación se lavan en condiciones de diferente rigor. Se puede estimar la T_f de dicho oligonucleótido estableciendo 2 °C para cada nucleótido A o T, y 4 °C para cada G o C.

Las personas expertas en la técnica conocen bien las condiciones de hibridación rigurosas adecuadas (véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Sambrook y col., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; *DNA Cloning: A practical Approach*, Glover & Hames eds., Oxford University Press, 1996; *Nucleic Acid Hybridization: Essential techniques*, Ross ed. Wiley, 1998). Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas puede ser 4 x SSC (solución salina de citrato normalizada) a 65 °C. Las condiciones de lavado muy rigurosas incluyen, por ejemplo, 0,2 x SSC a 65 °C. El término “delección” como se usa en el presente documento abarca una mutación que elimina uno o más nucleótidos de un ácido nucleico. De forma inversa, el término “duplicación” se refiere a una mutación que inserta uno o más nucleótidos de secuencia idéntica (en la mayor parte) directamente cerca de esta secuencia en un ácido nucleico. En una realización preferida, una delección o duplicación implica un segmento de cuatro o más nucleótidos. Con respecto a la α -talasemia, una delección puede eliminar parte o todo el gen $\alpha 1$, el gen $\alpha 2$ o parte o todo de ambos ($\alpha 1/\alpha 2$).

El término “específico” como se usa en el presente documento en referencia a un cebador de oligonucleótido significa que la secuencia de hibridación del cebador tiene al menos 10 bases de identidad de la secuencia con una parte del ácido nucleico que se va a amplificar cuando el oligonucleótido y el ácido nucleico se alinean. Un cebador de oligonucleótido que es específico de un ácido nucleico es aquel que, en las condiciones de hibridación o lavado adecuadas, es capaz de hibridarse “específicamente con y amplificar” la diana de interés y no hibridarse sustancialmente con y amplificar ácidos nucleicos que no son de interés. Se prefieren mayores niveles de identidad de la secuencia e incluyen al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % y de forma más preferente al menos un 80 % de identidad de la secuencia.

El término “hibridar” o “hibridar específicamente” como se usa en el presente documento se refiere a un procedimiento donde dos hebras complementarias de ácido nucleico se hibridan entre sí en condiciones rigurosas de forma adecuada. Las hibridaciones se llevan a cabo normal y preferentemente con moléculas de ácidos nucleicos con la longitud de una sonda, preferentemente 10-100 nucleótidos de longitud, más preferentemente 10-50 nucleótidos de longitud, lo más preferente 10-30 nucleótidos de longitud: Son bien conocidas en la materia las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. Véase, por ejemplo, Sambrook, y col., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. Los expertos en la materia saben cómo estimar y ajustar el rigor de las condiciones de hibridación de tal manera que las secuencias que tienen al menos un nivel deseado de complementariedad se hibriden de forma estable, mientras que aquellas que tienen una complementariedad más baja no lo hagan. Para los ejemplos de las condiciones y parámetros de hibridación, véanse, por ejemplo, Sambrook, y col., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición; Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y.; Ausubel, F.M. y col. 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Secaucus, N.J.

El término “homólogo” con referencia a las secuencias de ácidos nucleicos indica que dos o más secuencias comparten una mayoría de su secuencia. Generalmente, esto será al menos aproximadamente un 70 % de su secuencia y preferentemente al menos un 95 % de su secuencia. Otra indicación de que las secuencias son sustancialmente idénticas si se hibridan con la misma secuencia de nucleótidos en condiciones rigurosas (véanse, por ejemplo, Sambrook y col., *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias.

Los términos “cabeza” y “cola” como se usa en el presente documento (por ejemplo, en combinación con el término “región” se refieren a secuencias de nucleótidos en cualquier extremo, es decir, 5' o 3' de un gen concreto. Las regiones de la cabeza y la cola pueden estar flanqueadas tanto sin solapamiento con el gen respectivo o bien pueden solaparse con el extremo respectivo del gen. En el último caso los extremos de las regiones de cabeza y cola (es decir, el extremo 3' de la región de cabeza y el extremo 5' de la región de cola) están tanto separados por un hueco como (ii) colindantes entre sí o (iii) se solapan entre sí. Más específicamente, en una realización, las secuencias de ácidos nucleicos específicas de las regiones de cabeza y/o las regiones de cola pueden ser específicas de una región que (i) flanquea y se solapa con el respectivo extremo del gen, o (ii) flanquea solo el respectivo extremo del gen, o (iii) se solapa solo con el respectivo extremo del gen o (iv) sus combinaciones. La longitud de la región de cabeza y cola de un gen, por ejemplo, el gen $\alpha 1$, está confinada normalmente por el gen

adyacente, por ejemplo, el gen $\alpha 2$. De acuerdo con la convención, las secuencias de las hebras monocatenarias de ADN y ARN se escriben en la dirección 5' a 3'. De esta manera, con respecto a los genes de la α -globina, las regiones de cabeza y cola de $\alpha 1$ comprenden aproximadamente los nucleótidos 163708 a 167099 de la secuencia 5' (es decir, la región de cabeza) y aproximadamente los nucleótidos 167099 a 170335 de la secuencia 3' (es decir, la región de cola) de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank AE006462. De esta forma, las regiones de cabeza y cola de $\alpha 2$ comprenden aproximadamente los nucleótidos 158640 a 162875 de la secuencia 5' (es decir, la región de cabeza) y aproximadamente los nucleótidos 162875 a 166679 de la secuencia 3' (es decir, la región de cola) de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el Número de registro del GenBank AE006462.

A la vista de lo anterior resulta evidente que los cebadores pueden tener diversas longitudes diferentes, y que la localización exacta del tramo de nucleótidos contiguos al cual se hibrida el cebador, puede variar. Por tanto, es importante que las secuencias a las cuales se hibridan los cebadores directo e inverso de cada pareja de cebadores (para cada uno de los genes homólogos estrechamente vinculados) estén localizadas en ambos lados de la posición concreta del acontecimiento de entrecruzamiento (que ocasiona los diversos genotipos). Por ejemplo, cuando se diseñan las parejas de cebadores para la amplificación de genes múltiples muy adyacentes (al menos dos), cada ensayo consiste en dos parejas de cebadores para cada uno de los genes homólogos estrechamente vinculados; una primera pareja de cebadores localizada en la dirección 5' del punto de ruptura estimado debido al entrecruzamiento en el primer gen dirigido (región de cabeza) y una segunda pareja de cebadores localizada en la dirección 3' del punto de rotura en el primer gen dirigido (región de cola), con la condición de que las localizaciones del cebador se seleccionen de tal manera que la pareja de cebadores localizada en la región de cola del primer gen no esté solapándose con la pareja de cebadores localizada en la región de cabeza del segundo gen de dichos genes homólogos múltiples estrechamente vinculados. Por ejemplo, donde los genes homólogos múltiples estrechamente vinculados representan el gen $\alpha 1$ y el gen $\alpha 2$ de la α -talasemia, el amplicón de cabeza de $\alpha 2$ es el amplicón en la dirección 5' del primer gen de estos dos genes fuertemente homólogos, el amplicón de cola de $\alpha 2$ es el amplicón en la dirección 3' del primer gen de estos dos genes fuertemente homólogos, el amplicón de cabeza de $\alpha 1$ es el amplicón en la dirección 5' y el amplicón de cola de $\alpha 1$ es el amplicón de cola del segundo gen de estos dos genes fuertemente homólogos.

Como se usa en el presente documento, el término "amplicón" se refiere a una secuencia de polinucleótidos amplificada en una secuencia diana, y definida por los extremos distales de los dos sitios de unión al cebador. Para uso en la presente invención los amplicones generados por las diversas parejas de cebadores pueden ser iguales o diferentes.

Como se usa en el presente documento, "vinculado" o "enlace" (que se distingue del término "enlazado operativamente") debe referirse al enlace genético o físico de los loci o genes. Los loci o genes se consideran genéticamente vinculados si la frecuencia de recombinación entre ellos es menor de aproximadamente un 50 % determinado en una cartografía de meiosis simple. Están progresivamente más vinculados si la frecuencia de recombinación es aproximadamente 40 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 10 % o menos, como se ha determinado en una cartografía de meiosis simple. El término "estrechamente vinculado" significa que dos loci genéticos están normalmente comprendidos en 10 centimorgans (cM) entre sí. Esto es, los dos elementos genéticos asociados experimentan la recombinación durante la meiosis entre sí a una frecuencia de menos de o igual a aproximadamente 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 0,75 %, 0,5 %, 0,25 % o menos. Se espera que los loci estrechamente vinculados segreguen simultáneamente al menos aproximadamente el 90 % del tiempo.

La presente invención proporciona en un primer aspecto un procedimiento para la detección cuantitativa precisa de delección(ones) o duplicación(ones) de un polimorfismo genético que se produce en dos o más genes homólogos estrechamente vinculados en una muestra.

Más específicamente, este procedimiento comprende

(i) someter la muestra a reacciones de amplificación separadas usando (a) una primera pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados y (b) una segunda pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cola de cada uno de los mencionados dos o más genes homólogos estrechamente vinculados, y (ii) detectar y cuantificar productos de la amplificación con respecto a un producto del control, en el que cada primera pareja de cebadores se hibrida en la dirección 5', y cada segunda pareja de cebadores se hibrida en la dirección 3' de un punto de rotura estimado debido a un entrecruzamiento en cada uno de los dos o más genes homólogos estrechamente vinculados correspondientes y en el que la región de cabeza de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados representa una secuencia de nucleótidos en el extremo 5' de dicho gen y la región de cola de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados representa una secuencia de nucleótidos en el extremo 3' de dicho gen, con la condición de que la pareja de cebadores directo e inverso se seleccionen de tal manera que la pareja de cebadores localizada en la región de cola no se solape con la pareja de cebadores localizada en la región de cabeza de dos genes adyacentes de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados.

60

De esta manera, en el caso de dos genes homólogos estrechamente vinculados, el procedimiento comprende las etapas de:

- 5 (i) someter la muestra a una primera reacción de amplificación que utiliza una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de un primero de los mencionados genes homólogos estrechamente vinculados,
- (ii) someter la muestra a una segunda reacción de amplificación utilizando una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cola de dicho primero de dichos dos genes homólogos estrechamente vinculados,
- 10 (iii) someter la muestra a una tercera reacción de amplificación utilizando una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de un segundo de dichos dos genes homólogos estrechamente vinculados,
- (iv) someter la muestra a una segunda reacción de amplificación utilizando una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cola de dicho segundo de dichos dos genes homólogos estrechamente vinculados,
- 15 (v) detectar los productos de la amplificación obtenidos en las reacciones de las etapas (i) a (iv), y cuantificar opcionalmente dichos productos de amplificación con respecto a un producto del control.

En una realización preferida, las reacciones de amplificación utilizadas en los procedimientos para la detección y la cuantificación de un polimorfismo genético que se produce en dos o más genes homólogos estrechamente vinculados en una muestra, se llevan a cabo utilizando técnicas de la PCR, utilizando preferentemente la RT-PCR, utilizando preferentemente sondas de hibridación (FRET) o sondas de hidrólisis.

De esta manera, en una realización específica, cada reacción de amplificación incluye poner en contacto la muestra con (a) una pareja de cebadores directo e inverso de la respectiva parte (cabeza o cola) de un gen (como se ha descrito anteriormente en el presente documento) para producir el producto de amplificación respectivo, y (b) una pareja de sondas de hibridación específicas del producto de amplificación respectivo, del cual, una primera sonda de la pareja se marca normalmente con un resto fluorescente donante y una segunda sonda de la pareja se marca con un resto fluorescente aceptor correspondiente. El procedimiento incluye además detectar la presencia o ausencia de FRET entre el resto fluorescente donante de la primera sonda y el resto aceptor fluorescente de la segunda sonda. La presencia de FRET es (usualmente) indicativa de la presencia de producto de amplificación en la muestra, mientras que la ausencia de FRET es (usualmente) indicativa de la ausencia de producto de amplificación en la muestra. Alternativamente, se usa una sonda de hibridación simple que tiene en uno de sus extremos un resto fluorescente donante y en el otro extremo un resto fluorescente aceptor.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de cribado preciso para los portadores de un polimorfismo genético en dos o más genes homólogos estrechamente vinculados utilizando un procedimiento de acuerdo con la invención. De esta manera, la presente invención se refiere también a un procedimiento para diagnosticar a un individuo identificando su genotipo.

Por ejemplo, en una realización específica, la presente invención proporciona procedimientos para la detección y la cuantificación de un polimorfismo genético que se produce en los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la talasemia en una muestra, utilizando las técnicas de la RT-PCR anteriores, determinando por tanto la clasificación clínica relevante de las α -talasemias (Figura 3). De esta manera, la presente invención proporciona también un procedimiento de cribado preciso de portadores de α -talasemia (deleccional).

En una realización específica, el procedimiento para la detección cuantitativa precisa del (de los) gen(es) α en una muestra biológica comprende las etapas de:

- (i) amplificar una primera parte de la muestra con una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de $\alpha 1$;
- 45 (ii) amplificar una segunda parte de la muestra con una pareja de cebadores directo e inverso específica de la región de cabeza de $\alpha 2$;
- (iii) amplificar una tercera parte de la muestra con una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cola de $\alpha 1$;
- 50 (iv) amplificar una cuarta parte de la muestra con una pareja de cebadores directo e inverso de la región de cola de $\alpha 2$; y
- (v) detectar y cuantificar los productos de la amplificación con respecto a un producto del control.

En una realización, el producto del control es un producto del control endógeno, preferentemente el producto de amplificación del gen β . De esta manera, el procedimiento de la invención puede incluir una pareja de cebadores

directo e inverso específicos de la β -globina, es decir, que son capaces de hibridarse específicamente a y amplificar una secuencia del gen de la β -globina como se ha identificado por el N.º de registro del GenBank U01317. En una realización, la pareja de cebadores directo e inverso específicos de la β -globina se incluyen en cada reacción de amplificación (i) a (iv), en otra realización se lleva a cabo una reacción de la RT-PCR separada utilizando los

5
 En otra realización, las regiones de cabeza y cola de $\alpha 1$, que se definen como las regiones de los extremos 5' y 3' de $\alpha 1$, corresponden, respectivamente a los nucleótidos 163708 a los nucleótidos 167099 de la secuencia 5' (es decir, la región de cabeza) y de los nucleótidos 167099 a los nucleótidos 170335 de la secuencia 3' (es decir, la región de cola) de la agrupación de genes de la α -globina, por ejemplo, como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank AE006462. En otra realización, las regiones de cabeza y cola de $\alpha 2$, corresponden respectivamente a los

10
 nucleótidos 158640 a los nucleótidos 162875 de la secuencia 5' (es decir, la región de cabeza) y a los nucleótidos 162875 a 166679 de la secuencia 3' (es decir, la región de cola) de la agrupación de genes de la α -globina, por ejemplo, como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank AE006462.

15
 En una realización adicional se lleva a cabo la etapa de detección utilizando al menos una sonda de hibridación marcada. En una realización preferida, se usa una pareja de sondas, en el que una primera sonda tiene una marca en su extremo 3' y una segunda sonda tiene una marca en su extremo 5'. En otra realización, se utiliza una sonda que tiene una marca en cada uno de sus extremos 3' y 5'.

Las parejas de sondas preferidas son la SEQ ID NO: 9 y 10 para la región de cabeza de $\alpha 1$, 11 y 12 para la región de cola de $\alpha 1$, 13 y 14 para la región de cabeza de $\alpha 2$, y 15 y 16 para la región de cola de $\alpha 2$.

20
 En una realización adicional, las posiciones de los cebadores se seleccionan de tal manera que obtienen un amplicón que tiene una longitud de 150 a 250 pb.

Junto con el procedimiento, la presente divulgación proporciona también oligonucleótidos específicos que se van a usar como cebadores en los procedimientos de acuerdo con la invención.

25
 De esta manera, en una realización específica adicional, las parejas de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza o cola de cada uno de $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son cada uno una secuencia de ácido nucleico de entre 10 y aproximadamente 100 nucleótidos, preferentemente 10 y aproximadamente 50 nucleótidos, más preferentemente aproximadamente 10 y 30 nucleótidos, lo más preferente, entre 14 y 22 nucleótidos de longitud. Dichos oligonucleótidos o parejas de cebadores de la PCR pueden derivarse de la secuencia conocida de la agrupación de genes de la α -globina que se muestra en el N.º de registro del GenBank AE006462 utilizando los programas

30
 informáticos previstos para este fin tales como LightCycler Probe Design Software 2.0 (Roche Applied Science, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) o Primer (Versión 0.5, © 1991, Witehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA) o cualquier otro programa y son de composición y longitud específicas de tal manera que son capaces de hibridarse en condiciones muy rigurosas y/o muy estrictas a su sitio diana. De la misma forma, los oligonucleótidos o parejas de cebadores de la PCR de la secuencia génica de control de elección (por ejemplo, la

35
 secuencia del gen de la β -globina), pueden derivarse de la secuencia conocida del gen de la β -globina que se muestra en el N.º de registro del GenBank: U01317.

De esta manera, en una realización, la pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza y cola de $\alpha 1$ comprende una secuencia de ácido nucleico específica de los nucleótidos 163708 a los nucleótidos 167099 de la secuencia 5' (es decir, la región de cabeza) y de los nucleótidos 167099 a los nucleótidos 170335 de la

40
 secuencia 3' (es decir, la región de cola) de la agrupación de genes de la α -globina (como se ha identificado por el N.º de Registro del GenBank AE006462). En otra realización, la pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza y cola de $\alpha 2$ comprende una secuencia de ácido nucleico específica de los nucleótidos 158640 a los nucleótidos 162875 de la secuencia 5' (es decir, la región de cabeza) y a los nucleótidos 162875 a los nucleótidos 166679 de la secuencia 3' (es decir, la región de cola) de la agrupación de genes de la α -globina (como se ha identificado por el N.º de Registro del GenBank AE006462).

45

La pareja de cebadores directo e inverso específicos de las regiones de cabeza y cola de $\alpha 1$ puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos un 95 % idéntica a las secuencias de nucleótidos que se muestran como SEQ ID NO: 1 ($\alpha 1$ -cabeza-directo) y 4 ($\alpha 1$ -cabeza-inverso) correspondientes a las posiciones 165586-165607 y 165737-165752, y la SEQ ID NO: 3 ($\alpha 1$ -cola-directo) y 2 ($\alpha 1$ -cola-inverso), correspondientes a las posiciones 168-168354 y 168476-168494, respectivamente. La pareja de cebadores directo e inverso específicos de las regiones de cabeza y cola de $\alpha 2$ puede comprender una secuencia de ácido nucleico al menos un 95 % idéntica a la secuencia de nucleótidos que se muestra como SEQ ID NO: 5 ($\alpha 2$ -cabeza-inverso) correspondiente a las posiciones 161708-161723 y 161899-161914, y la SEQ ID NO: 7 ($\alpha 2$ -cola-directo) y 8 ($\alpha 2$ -cola-inverso) correspondiente a las posiciones 163584-163602 y 1637439-163755, respectivamente.

50

55
 Se entiende que los oligonucleótidos que consisten en la SEQ ID NO: 1 a 8 pueden contener deleciones, adiciones y/o sustituciones menores de bases de ácidos nucleicos, en la medida en que dichas alteraciones no afecten negativamente el rendimiento o el producto obtenido en un grado significativo.

5 En una realización más específica, el (los) cebador(es) comprende una marca, por ejemplo, una marca fluorescente, biotina, enzimática, química o radiomarca, preferentemente una marca fluorescente, o una derivatización adicional como se define anteriormente en el presente documento necesaria para el uso en la RT-PCR, es decir, para estabilizar los productos de la amplificación o para potenciar la separación de fragmentos que hace la discriminación, identificación y cuantificación de amplicones más precisa.

Los procedimientos para preparar y utilizar cebadores se describen en, por ejemplo, Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York; Ausubel y col. (1987) Current Protocols en Molecular Biology, Green Publ. Assoc. & Wiley-Intersciences.

10 De esta manera, en una realización más específica, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar un polimorfismo genético en los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la talasemia, que comprende las etapas de:

(i) obtener una muestra genómica

(ii) someter dicha muestra a cuatro reacciones de amplificación separadas mediante la RT-PCR utilizando

15 (a) en una primera reacción una pareja de cebadores que se hibrida específicamente en la dirección 5' de un punto de rotura estimado debido al entrecruzamiento, en condiciones adecuadas de una PCR con una secuencia entre los nucleótidos 163708 a los nucleótidos 167099 de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el N.º de Registro del GenBank AE006462 (secuencia de cabeza de $\alpha 1$), preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 1 y 2 (cebador de cabeza de $\alpha 1$),

20 (b) en una segunda reacción, una pareja de cebadores que tiene una secuencia que se hibrida específicamente en la dirección 3' de un punto de rotura estimado debido al entrecruzamiento en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia entre los nucleótidos 158640 a los nucleótidos 162875 de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank AE006462 (secuencia de cabeza de $\alpha 2$), preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 5 y 6 (cebador de cabeza $\alpha 2$),

25 (c) En una tercera reacción, una pareja de cebadores que se hibrida específicamente en la dirección 3' de un punto de rotura estimado debido al entrecruzamiento en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia entre los nucleótidos 167099 a los nucleótidos 170335 de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el N.º de Registro del GenBank AE006462 (secuencia de cola de $\alpha 1$), preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 3 y 4 (cebador de cola de $\alpha 1$),

30 (d) En una cuarta reacción, una pareja de cebadores que tiene una secuencia que se hibrida específicamente en la dirección 3' de un punto de rotura estimado debido al entrecruzamiento en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia entre los nucleótidos 162875 a los nucleótidos 166679 de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank AE006462 (secuencia de cola de $\alpha 2$), preferentemente, una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO 7 y 8 (cebador de cola de $\alpha 2$), y

(iii) detectar y cuantificar los productos de la amplificación con respecto a un producto del control,

35 (iv) en el que las localizaciones de los cebadores se seleccionan de tal manera que la pareja de cebadores de cola de $\alpha 2$ no se solapan con la pareja de cebadores de cabeza de $\alpha 1$.

40 El producto de control puede ser un producto de control endógeno, preferentemente el producto de amplificación del gen β . De esta manera, el procedimiento puede incluir añadir una pareja de cebadores de una secuencia control endógena, por ejemplo, una pareja de cebadores que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia del gen de la β -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank U01317, preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 17 y 18 (cebador del gen de la β -globina), a cada una de las reacciones de amplificación.

45 Alternativamente, el procedimiento puede incluir una etapa adicional que comprende someter dicha muestra a una quinta reacción de amplificación separada mediante la RT PCR utilizando una pareja de cebadores que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia del gen de la β -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank U01317, preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 17 y 18 (cebador del gen de la β -globina).

De esta manera, se describe también en el presente documento un procedimiento para detectar un polimorfismo genético en los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la talasemia, que comprende las etapas de:

50 (i) obtener una muestra genómica,

(ii) someter dicha muestra a cuatro reacciones de amplificación separadas mediante la RT-PCR utilizando

(a) en una primera reacción una pareja de cebadores que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia de entre aproximadamente los nucleótidos 163708 a los

nucleótidos 167099 de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank AE00642 (secuencia de cabeza de α_1), preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 1 y 2 (cebador de cabeza de α_1) y una pareja de cebadores que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia del gen de la β -globina, como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank U01317, preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 17 y 18 (cebador del gen de la globina- β),

(b) En una segunda reacción, una pareja de cebadores que tiene una secuencia que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia de entre aproximadamente los nucleótidos 158640 a los nucleótidos 162791 de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank AE006462 (secuencia de cabeza de α_2), preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 5 y 6 (cebador de cabeza de α_2), y una pareja de cebadores que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia del gen de la β -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank U01317, preferentemente, una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 17 y 18 (cebador del gen de la globina β),

(c) En una tercera reacción, una pareja de cebadores que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia de entre aproximadamente los nucleótidos 167099 a los nucleótidos 170335 de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank AE006462 (secuencia de cola de α_1), preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 3 y 4 (cebador de cola de α_1), y una pareja de cebadores que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia del gen de la β -globina como se ha identificado en el N.º de Registro del GenBank U01317, preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO. 17 y 18 (cebador del gen de la β -globina),

(d) En una cuarta reacción, una pareja de cebadores que tiene una secuencia que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia de entre aproximadamente los nucleótidos 162791 a los nucleótidos 166679 de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank AE006462 (secuencia de cola de α_2), preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 7 y 8 (cebador de cola de α_2), y una pareja de cebadores que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia del gen de la β -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank U01317, preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 17 y 18 (cebador del gen de la β -globina), y

(iii) detectar y cuantificar los productos de la amplificación con respecto a un producto del control.

Se describe además en el presente documento un procedimiento para detectar un polimorfismo genético en los genes α_1 y α_2 de la talasemia, que comprende las etapas de:

(i) obtener una muestra genómica,

(ii) Someter dicha muestra a cinco reacciones de amplificación separadas mediante la RT-PCR utilizando

(a) En una primera reacción, una pareja de cebadores que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia de entre aproximadamente los nucleótidos 163708 a los nucleótidos 167099 de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el n.º de registro del GenBank AE006462 (secuencia de cabeza de α_2), preferentemente, una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 5 y 6 (cebador de cabeza de α_2),

(b) En una segunda reacción, una pareja de cebadores que tiene una secuencia que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia de entre aproximadamente los nucleótidos 158640 a los nucleótidos 162791 de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el N.º de Registro del GenBank AE006462 (secuencia de cabeza de α_2), preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 5 y 6 (cebador de cabeza de α_2),

(c) En una tercera reacción, una pareja de cebadores que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia de entre aproximadamente los nucleótidos 167099 a los nucleótidos 170335 de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank AE006462 (secuencia de cola de α_1), preferentemente una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 3 y 4 (cebador de cola de α_1),

(d) En una cuarta reacción, una pareja de cebadores que tiene una secuencia que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia de entre aproximadamente los nucleótidos 162791 a los nucleótidos 166679 de la agrupación de genes de la α -globina como se ha identificado en el N.º de registro del GenBank AE006462 (secuencia de cola de α_2) preferentemente, una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 7 y 8 (cebador de cola de α_2),

(e) En una quinta reacción, una pareja de cebadores que tiene una secuencia que se hibrida específicamente en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia del gen de la β -globina como se ha identificado en el n.º de registro del GenBank U01317, preferentemente, una pareja de cebadores tal como la SEQ ID NO: 17 y 18 (cebador del gen de la β -globina), y

- 5 (iii) detectar productos de la amplificación para cada una de las etapas (a) a (d) y un producto del control de la amplificación para la etapa (e), y cuantificar los productos de la amplificación con respecto al producto del control de la amplificación

La cuantificación relativa de acuerdo con la etapa (iii) proporciona una relación en el que la relación permite identificar un portador de la α -talasemia.

- 10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona usos para un procedimiento de acuerdo con la invención, por ejemplo, utilizar el procedimiento para determinar un genotipo de dos o más genes homólogos, estrechamente vinculados, en una muestra (i) amplificando la región de la cabeza y la cola de cada uno de los dos o más genes homólogos estrechamente vinculados en reacciones de amplificación separadas utilizando una pareja de cebadores directo e inverso, y (ii) detectar y cuantificar los productos de la amplificación con respecto a un producto del control.

- 15 En un aspecto adicional, la invención proporciona kits para la detección cuantitativa diferencial de dos o más genes homólogos estrechamente vinculados en una muestra que comprende reactivos que se pueden usar para practicar los procedimientos descritos en el presente documento. De esta manera, un kit de acuerdo con la invención comprende, en compartimentos separados (a) una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados, y (b) una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cola de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados. El kit puede incluir además una o más sondas de hibridación adecuadamente marcadas para la detección y un cebador capaz de hibridarse y amplificar una secuencia control, preferentemente una secuencia control endógena de elección, para la cuantificación relativa. Los kits pueden incluir también reactivos adicionales para la amplificación, reactivos control de la reacción, tampones e instrucciones para llevar a cabo ensayos para interpretar los resultados.

- 25 En una realización específica, un kit para la detección cuantitativa diferencial de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de una muestra, comprende en compartimentos separados parejas de cebadores directo e inverso capaces de hibridarse específicamente a y amplificar las regiones de cabeza y cola de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de acuerdo con la invención. El kit puede incluir además una o más sondas de hibridación marcadas adecuadamente para la detección y una pareja de cebadores capaz de hibridarse a y amplificar una secuencia control, preferentemente una secuencia control endógena de elección, por ejemplo, la secuencia del gen de la β -globina.

- 30 En un aspecto adicional, los procedimientos de la invención pueden llevarse a cabo utilizando (micro) matrices. Los procedimientos de la invención como se ha descrito anteriormente permiten un procesamiento paralelo de un gran número de muestras de ácidos nucleicos genómicos y se pueden aplicar a plataformas robóticas automatizadas. Dicho sistema comprende usualmente una microplaca con una matriz de pocillos dispuesta en hileras y columnas, en la que cada pocillo podría asignarse a una reacción de amplificación específica, por ejemplo, una microplaca con una matriz de noventa y seis pocillos permite un procesamiento en paralelo de un gran número de hibridaciones dando como resultado un análisis de alto rendimiento muy eficaz.

Ejemplos

40 Materiales y procedimientos

Muestras. Se extrajeron muestras de sangre de pacientes con α -talasemia en el laboratorio de forma rutinaria para las hemoglobinopatías. Se utilizaron muestras de individuos sanos como controles.

- 45 **Extracción del ADN.** Se extrajo ADN genómico de sangre periférica humana utilizando un procedimiento de extracción del ADN manual (Qiagen Mini Kit, Qiagen AG, Basilea, Suiza) o automatizado (MagnaPure, Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Suiza). Se llevó a cabo la cuantificación fotométrica del ADN genómico en Nanodrop (Roche Technologies, Inc. Wilmington, EE.UU.) y se seleccionaron solo muestras con una relación de 260 nm: 280 nm en un intervalo definido para los experimentos. Se ajustó el ADN a la concentración deseada (10 ng/ μ l) y o bien se almacenó a 4 °C o bien se utilizó inmediatamente.

- 50 **PCR en tiempo real (RT).** Todos los experimentos RT-PCR se llevaron a cabo el LightCycler System (Roche Diagnostics AG, Rotkreuz, Suiza). Tras la desnaturalización inicial durante 10 min a 95 °C, se llevó a cabo la amplificación utilizando las siguientes condiciones de ciclación. 40 ciclos durante 10 min a 95 °C, 10 min a 55 °C y 10 min a 72 °C, y un ciclo para enfriar a 40 °C.

- 55 Se vigiló la intensidad de la fluorescencia una vez por ciclo tras cada fase de alargamiento. Se produjo una curva de fusión después de un ciclo totalmente completado comenzando a 55 °C calentando hasta 99 °C a una velocidad de transición de 0,1 °C/s.

5 **Diseño de cebadores.** Se diseñaron cebadores y sondas utilizando el LightCycler Probe Design Software 2.0 (Roche Applied Science, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Todos los cebadores cumplieron los siguientes criterios: los productos de la amplificación tienen 200-300 pb, las temperaturas de fusión son 45-65 °C, ausencia de formación de dímeros estables y formación de estructuras en horquillas estables. La modificación de las sondas de hibridación incluyó fosfato (PH) y el marcado con 3'-fluoresceína (FL) y 5'-LightCycler Red 640 (LC), respectivamente.

La tabla 1 siguiente resume una selección de cebadores y sondas que se utilizaron para la amplificación de cuatro loci diferentes en el gen de la α -globina y un locus en el gen de la β -globina, que fue seleccionado como gen de referencia en este caso específico:

10 Tabla 1:

Cebador/ Sonda	Nombre	Secuencia (con/sin marcas)	SEQ ID NO	Posición de bases
α 1-cabeza- directo	α 1h-F	5'-CCTCCTCCACCTAATACATATC-3'	1	165586-165607
α 1-cabeza- inverso	α 1h-R	5'-AggTAggCAGTCCTCT-3'	2	165737-165752
α 1-cola-directo	α 1t-F	5'-CTggCCCTCAACTgAT-3'	3	168339-168354
α 1-cola-inverso	α 1t-R	5'-AAATAACgAAgACACCgTC-3'	4	168476-168494
α 2-cabeza- directo	α 2h-F	5'-gACggggTTTCTCCAT-3'	5	162708-161723
α 2-cabeza- inverso	α 2h-R	5'-ggTgAggAAggAAggg-3'	6	161899-161914
α 2-cola-directo	α 2t-F	5'-CTCCAAATACCgTTAAgCTg-3'	7	163584-163603
α 2-cola-inverso	α 2t-R	5'-ATTgTTggCACATTCCg-3'	8	163739-163755
α 1-cabeza-P1	α 1h-P1	5'-ACTAACCTggTCACCTTgAA-FL	9	165640-165660
α 1-cabeza-P2	α 1h-P2	Red640-CCTCgTCCACACCTCCag-Ag.PH	10	165663-165680
α 1-cola-P1	α 1t-P1	5'-TCACCCTTggTAAACACCTATggC-FL	11	168386-168409
α 1-cola-P2	α 1t-P2	LC Red640-gCCCTCTgCCTgCgTT-PH	12	168412-168427
α 2-cabeza-P1	α 2h-P1	5'-ggTCTCgAACTCCCgACC-FL	13	161736-161753
α 2-cabeza-P2	α 2h-P2	5'-LC Red640-AgCTgATCCACCCgCC-PH	14	161756-161771
α 2-cola-P1	α 2t-P1	5'-CCTTCCTggTCTTTgAATAAAgTTgAg-FL	15	163673-163700
α 2-cola-P2	α 2t-P2	5'-LC Red640-ggCAgCAgCCTgTgTgTgT-PH	16	163703-163719
β -directo	β -F	5'-ACACAACCTgTgTTCACTAgC-3'	17	4035529- 4035510
β -inverso	β -R	5'-CAACTTCATCCACgTTCACC-3'	18	4035420- 4035439
β -P1	β -P1	5'-AAACAgACACCATggTgCACCTgA- CTCCTgAggA-FL	19	4035503- 4035470
β -P2	β -P2	5'-LC Red640-AAgTCT- gCCTTACTgCCCTgTggggCAA-PH	20	4035468- 4035440

Ejemplo 1: Optimización de la RT PCR cuantitativa

15 Se llevó a cabo la optimización de la RT PCR para la cuantificación utilizando el colorante SYBR green fluorescente intercalante de ADN (que representa las señales de fluorescencia potencial que surgen debido a productos bicatenarios no específicos con colorantes intercalantes). La mezcla de reacción contenía 1x LightCycler FastStart DNA Master SYBR GREEN I (Roche Diagnostic AG, Rotkreuz, Suiza) MgCl₂ 1 mM, 0,5 μ M de cebadores directo e

inverso tanto para la región de la cabeza como de la cola de $\alpha 1$ (SEQ ID NO 1-4) o de la región de la cabeza o la cola de $\alpha 2$ (SEQ ID NO 5-8), o 1 μm de cebadores directo e inverso específicos del gen de la β -globina (SEQ ID NO 17-18). Se llevaron a cabo las reacciones de la PCR en un volumen total de 10 μl distribuyendo alícuotas de 8 μl de la mezcla maestra en los capilares, seguido por la adición de 2 μl de ADN que contiene 10 ng/ μ .

5 **Ejemplo 2:**

Basándose en las condiciones de reacción optimizadas de acuerdo con el Ejemplo 1, se adaptó el procedimiento para el uso de sondas marcadas. Se prepararon cuatro mezclas de reacción diferentes, mientras que todas ellas contenían 1x LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche) y 1,5 mM de MgCl_2 , además de los cebadores y sondas relacionados.

- 10 1. 0,5 mM del cebador directo de cabeza de $\alpha 1$ SEQ ID NO 1 y del cebador inverso de cabeza de $\alpha 1$ SEQ ID NO 2, 0,5 mM de los cebadores directo e inverso de la β -globina SEQ ID NO 17 y 18, 0,2 mM de las sondas de hibridación marcadas con FL y 0,3 mM de las sondas de hibridación marcadas con LC para la región del gen de la cabeza de $\alpha 1$ (SEQ ID NO 9 y 10) y la región del gen de la β -globina (SEQ ID NO 19 y 20)
- 15 2. 0,5 mM del cebador directo de la cabeza de $\alpha 2$ SEQ ID NO 5 y del cebador inverso de la cabeza de $\alpha 2$ SEQ ID NO 6, 0,5 mM de los cebadores directo e inverso de la β -globina SEQ ID NO 17 y 18, 0,2 mM de las sondas de hibridación marcadas con FL y 0,3 mM de las sondas de hibridación marcadas con LC para la región del gen de la cabeza de $\alpha 2$ (SEQ ID NO 13 y 14) y la región de la β -globina (SEQ ID NO 19 y 20)
- 20 3. 0,5 mM de cebador directo de cola de $\alpha 1$ SEQ ID NO 3 y cebador inverso de cola de $\alpha 1$ SEQ ID NO 4, 0,5 mM de cebadores directo e inverso de la β -globina SEQ ID NO 17 y 18, 0,2 mM de sondas de hibridación marcadas con LC para la región del gen de la cola de $\alpha 1$ (SEQ ID NO 11 y 12) y la región del gen de la β (SEQ ID NO 19 y 20)
- 25 4. 0,5 mM de cebador directo de la cola de $\alpha 2$ SEQ ID NO 7 y del cebador inverso de la cola de $\alpha 2$ SEQ ID NO 8, 0,5 mM de los cebadores directo e inverso de la β -globina SEQ ID NO 17 y 18, 0,2 mM de sondas de hibridación marcadas con FL y 0,3 mM de sondas de hibridación marcadas con LC para la región del gen de la cola de la β -globina (SEQ ID NO 19 y 20)

Se llevó a cabo la reacción de la PCR en un volumen total de 10 ml, de los cuales, 8 ml eran alícuotas de la mezcla maestra, seguido por la adición de 2 ml que contenían 10 ng/ml.

30 Tras la desnaturalización inicial durante 10 min a 95 °C, se llevó a cabo la amplificación utilizando las siguientes condiciones de ciclación: 45 ciclos durante 10 min a 95 °C, 10 min a 55 °C y 10 min a 72 °C, y un ciclo para enfriar a 40 °C/.

35 *Análisis* Se controló la especificidad de los amplicones obtenidos mediante las curvas de fusión, electroforesis en gel y/o secuenciación. Se analizaron los productos de la amplificación utilizando el procedimiento automatizado del software de análisis de datos Lightcycler (Versión 4.0, Roche. Se determinó la relación señal a cu entre el gen de la α -globina y el gen de referencia de la β -globina permitiendo identificar la cantidad relativa de los genes amplificados (el parámetro cu o "ciclo umbral" se define como el número de ciclos al cual la emisión de la fluorescencia excede el umbral fijado, que se ajusta significativamente por encima del valor inicial). Mediante el análisis del modelo de relación obtenido, se definió el genotipo del paciente (Tabla 2, Figura 4). La Figura 4 muestra las diversas combinaciones de haplotipos posibles de deleciones y triplicaciones del gen α y el número de copias genómicas correspondientes para las regiones de la cabeza y la cola de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Solo en tres circunstancias (combinaciones sombreadas) es un análisis de las regiones tanto de la cabeza como de la cola de los genes α necesario para definir el genotipo exacto. Para el resto de combinaciones, el análisis de la región de cabeza es suficiente. Se llevó a cabo el análisis estadístico con el software SPSS (versión 10.0 para Windows).

45 En los casos con resultados de cribado positivos, la detección de un modelo de relación anómalo, obtenido con el procedimiento descrito, se realizaron métodos específicos tales como la secuenciación para obtener una definición detallada del defecto genético.

Tabla 2: Cuantificación e identificación del genotipo de muestras (i) a (v) utilizando los cebadores y sondas de acuerdo con el Ejemplo 2:

Ej. 2	Cu $\alpha 1\text{h}$	Cu $\alpha 1\text{t}$	Cu $\alpha 2\text{h}$	Cu $\alpha 2\text{t}$	Cu $\beta 2\text{t}$	Relaciones Cu calculadas	Genotipo
i	27	27	27	27	27	1	wt
ii	28	27	27	28	27	$\alpha 1\text{h/b} = 1,04$ $\alpha 1\text{t/b} = 1$ $\alpha 2\text{h/b} = 1$ $\alpha 2\text{t/b} = 1,04$	$-\alpha^{3,7\text{kb}}$ heterocigótico

(continuación)

Ej. 2	Cu α 1h	Cu α 1t	Cu α 2h	Cu α 2t	Cu β 2t	Relaciones Cu calculadas	Genotipo
iii	n.d.	27	27	n.d.	27	α 1h/b = 0 α 1t/b = 1 α 2h/b = 1 α 2t/b = 0	$-\alpha$ ^{3,7kb} homocigótico
iv	28	28	28	28	27	α 1h/b = 1,04 α 1t/b = 1,04 α 2h/b = 1,04 α 2t/b = 1,04	α^0 heterocigótico
v	27	27	n.d.	n.d.	27	α 1h/b = 1 α 1t/b = 1 α 2h/b = 0 α 2t/b = 0	$-\alpha$ ^{4,2kb} homocigótico

n.d. = no detectable

5 Estos resultados indican sin ambigüedad que el individuo de la muestra (i) es un individuo sano mientras que los individuos de las muestras (ii) a (v) son portadores de diferentes deleciones en la agrupación de genes de la α -globina.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Kantonsspital Aarau AG
- <120> Análisis de dosificación génica
- <130> P154272
- 15 <140> 09151698.9
- <141> 30-01-2009
- <160> 20
- 20 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 22
- <212> ADN
- 25 <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- cctcctccac ctaatacata tc 22
- 30 <210> 2
- <211> 16
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 35 <400> 2
- aggtaggcag tcctct 16
- <210> 3
- <211> 16
- <212> ADN
- 40 <213> *Homo sapiens*
- <400> 3
- ctggccctca actgat 16
- 45 <210> 4
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*

ES 2 565 331 T3

	<400> 4 aaataacgaa gacaccgtc	19
5	<210> 5 <211> 16 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 5 gacggggtt ctccat	16
15	<210> 6 <211> 16 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 6 ggtgaggaag gaaggg	16
25	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 7 ctccaaatac cgtaagctg	20
35	<210> 8 <211> 17 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 8 attgttgca cattccg	17
45	<210> 9 <211> 21 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<220> <221> misc_feature <222> (21)..(21) <223> n = Base A modificada por fluoresceína	
55	<400> 9 actaacctg gtcacctga n	21
60	<210> 10 <211> 21 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> n= Base C modificada por LC Red 640	
70	<220> <221> misc_feature <222> (21)..(21) <223> n = Base G modificada por fosfato	
75	<400> 10 ncctcgtcca cacctccaga n	21

ES 2 565 331 T3

5	<210> 11 <211> 24 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<220> <221> misc_feature <222> (24)..(24) <223> n = Base C modificada por fluoresceína	
15	<400> 11 tcacccttg taaacaccta tggg	24
20	<210> 12 <211> 16 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> n = Base G modificada por LC Red 640	
30	<220> <221> misc_feature <222> (16)..(16) <223> n = Base T modificada por fosfato	
35	<400> 12 nccctctgcc tgcgtn	16
40	<210> 13 <211> 18 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<220> <221> misc_feature <222> (18)..(18) <223> n = Base C modificada por fluoresceína	
50	<400> 13 ggtctcgaac tcccgacn	18
55	<210> 14 <211> 16 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(1) <223> n = Base A modificada por LC Red 640	
65	<220> <221> misc_feature <222> (16)..(16) <223> n = Base C modificada por fosfato	
	<400> 14 ngctgatcca cccgcn	16
	<210> 15 <211> 27 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 565 331 T3

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (27)..(27)	
5	<223> n = G modificada por fluoresceína	
	<400> 15	
	ccttcctggt cttgaataa agttgan	27
10	<210> 16	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> n = Base G modificada por LC Red 640	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (17)..(17)	
	<223> n = Base T modificada por fosfato	
25	<400> 16	
	ngcagcagcc tgtgtgn	17
30	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 17	
	acacaactgt gttcactagc	20
40	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
45	<400> 18	
	caactcatc cacgtcacc	20
50	<210> 19	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (34)..(34)	
	<223> n = Base A modificada por fluoresceína	
	<400> 19	
	aaacagacac catggtgcac ctgactcctg aggn	34
60	<210> 20	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(1)	
	<223> n = Base A modificada por LC Red 640	
	<220>	

<221> misc_feature
<222> (29)..(29)
<223> n = Base A modificada por fosfato

5

<400> 20
nagtctgccg ttactgccct gtggggcan

29

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la detección cuantitativa diferencial de dos o más genes homólogos estrechamente vinculados en una muestra que comprende las etapas de:
- 5 (i) someter la muestra a reacciones de amplificación separadas utilizando (a) una primera pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados y (b) una segunda pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cola de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados; y
- (ii) detectar y cuantificar los productos de la amplificación con respecto a un producto del control,
- 10 en el que cada primera pareja de cebadores se hibrida en la dirección 5' y cada segunda pareja de cebadores se hibrida en la dirección 3' de un punto de rotura estimado debido al entrecruzamiento en cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados correspondientes,
- y en el que la región de cabeza de cada uno de los mencionados dos o más genes homólogos estrechamente vinculados representa una secuencia de nucleótidos en el extremo 5' de dicho gen y la región de cola de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados representa una secuencia de nucleótidos
- 15 en el extremo 3' de dicho gen,
- con la condición de que la pareja de cebadores directo e inverso se seleccione de tal manera que una pareja de cebadores localizada en la región de cola no se solape con una pareja de cebadores localizada en la región de cabeza de dos genes adyacentes de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra es ADN genómico.
- 20 3. El procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la amplificación se lleva a cabo mediante la RT-PCR.
4. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que los cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados son cada uno una
- 25 secuencia de ácido nucleico de entre 10 y 100 nucleótidos de longitud capaz de hibridarse en condiciones muy estrictas a la región de cabeza de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados, y la pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cola de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados son cada uno una secuencia de ácido nucleico de entre 10 y 100 nucleótidos de longitud capaz de hibridarse en condiciones muy estrictas a la región de cola de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados.
- 30 5. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que los dos o más genes homólogos estrechamente vinculados representan los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la talasemia.
6. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5 que comprende las etapas de:
- (i) amplificar una primera porción de la muestra con una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la
- 35 región de cabeza de $\alpha 1$;
- (ii) amplificar una segunda porción de la muestra con una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de $\alpha 2$;
- (iii) amplificar una tercera porción de la muestra con una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la
- 40 región de cola de $\alpha 1$;
- (iv) amplificar una cuarta porción de la muestra con una pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cola de $\alpha 2$, y
- (v) detectar y cuantificar los productos de la amplificación con respecto a un producto del control.
7. El procedimiento de las reivindicaciones 5 o 6, en el que la región de cabeza de $\alpha 1$ consiste en los nucleótidos 163708 a 167099 y/o la región de cabeza de $\alpha 2$ consiste en los nucleótidos 158640 a 162791 y/o la región de cola de $\alpha 1$ consiste en los nucleótidos 167099 a 170335 y/o la región de cola de $\alpha 2$ consiste en los nucleótidos 162791 a
- 45 166679 de la agrupación de genes de la α -globina como se muestra en el N.º de registro del GenBank AE006462.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el producto del control se obtiene amplificando una secuencia control endógena (i) en cada una de las reacciones de amplificación separadas o (ii) en una reacción de amplificación separada, utilizando una pareja de cebadores directo e inverso específicos de dicha secuencia control endógena.
- 50

9. Un procedimiento de determinación de un genotipo de dos o más genes homólogos estrechamente vinculados en una muestra utilizando un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
10. Un procedimiento de cribado de un portador de la α -talasemia que comprende las etapas de:
- (i) obtener una muestra genómica,
 - (ii) someter dicha muestra a cuatro reacciones de amplificación separadas mediante la RT-PCR utilizando
 - (a) una pareja de cebadores (cabeza de $\alpha 1$), preferentemente de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y 2, que se hibrida específicamente en la dirección 5' de un punto de rotura estimado debido al entrecruzamiento, en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia entre los nucleótidos 163708 a los nucleótidos 167099 de la agrupación de genes de la α -globina identificada en el N.º de registro del GenBank AE006462,
 - (b) una pareja de cebadores (cabeza de $\alpha 2$), preferentemente de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 y 6, que tiene una secuencia que se hibrida específicamente en la dirección 5' de un punto de rotura estimado debido al entrecruzamiento, en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia entre los nucleótidos 158640 a los nucleótidos 162791 de la agrupación de genes de la α -globina identificada en el N.º de registro del GenBank,
 - (c) una pareja de cebadores (cola de $\alpha 1$), preferentemente de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 y 4, que se hibrida específicamente en la dirección 3' de un punto de rotura estimado debido al entrecruzamiento, en condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia entre los nucleótidos 167099 a los nucleótidos 170335 de la agrupación de genes de la α -globina identificada en el N.º de registro del GenBank AE006462,
 - (d) una pareja de cebadores (cola de $\alpha 2$), preferentemente de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 y 8, que tienen una secuencia que se hibrida específicamente en la dirección 3' de un punto de rotura estimado debido al entrecruzamiento, en las condiciones adecuadas para una PCR con una secuencia entre los nucleótidos 162791 a los nucleótidos 166679 de la agrupación de genes de la α -globina identificada en el N.º de Registro del GenBank AE006462, y
 - (iii) detectar y cuantificar los productos de la amplificación con respecto a un producto del control,
 - (iv) en el que las localizaciones del cebador se seleccionan de tal manera que la pareja de cebadores de la cola de $\alpha 2$ no se solapa con la pareja de cebadores de la cabeza de $\alpha 1$.
11. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de cada uno de dichos genes y la pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cola de cada uno de dichos genes se inmovilizan en una matriz.
12. Un kit para la detección cuantitativa diferencial de dos o más genes homólogos estrechamente vinculados en una muestra, que comprende en compartimentos separados (a) una primera pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cabeza de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados y (b) una segunda pareja de cebadores directo e inverso específicos de la región de cola de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados
- en el que cada primera pareja de cebadores es capaz de hibridarse en la dirección 5' y cada segunda pareja de cebadores es capaz de hibridarse en la dirección 3' de un punto de rotura estimado debido al entrecruzamiento en cada uno de los correspondientes dos o más genes homólogos estrechamente vinculados,
- y en el que la región de cabeza de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados representa una secuencia de nucleótidos en el extremo 5' de dicho gen y la región de cola de cada uno de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados representa una secuencia de nucleótidos en el extremo 3' de dicho gen
- con la condición de que la pareja de cebadores directo e inverso se seleccionen de tal manera que una pareja de cebadores localizada en la región de cola no sea capaz de solaparse con una pareja de cebadores localizada en la región de cabeza de dos genes adyacentes de dichos dos o más genes homólogos estrechamente vinculados.
13. Un kit para la detección cuantitativa diferencial de los genes $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la talasemia en una muestra, que comprende, en compartimentos separados (a) una pareja de cebadores directo e inverso que consisten en
- (i) una pareja de cebadores que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 1 y 2,
 - (ii) una pareja de cebadores que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 3 y 4,
 - (iii) una pareja de cebadores que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 5 y 6, y
 - (iv) una pareja de cebadores que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 7 y 8.

14. El kit de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además una pareja de cebadores directo e inverso específicos de una secuencia control endógena.

Figura 1

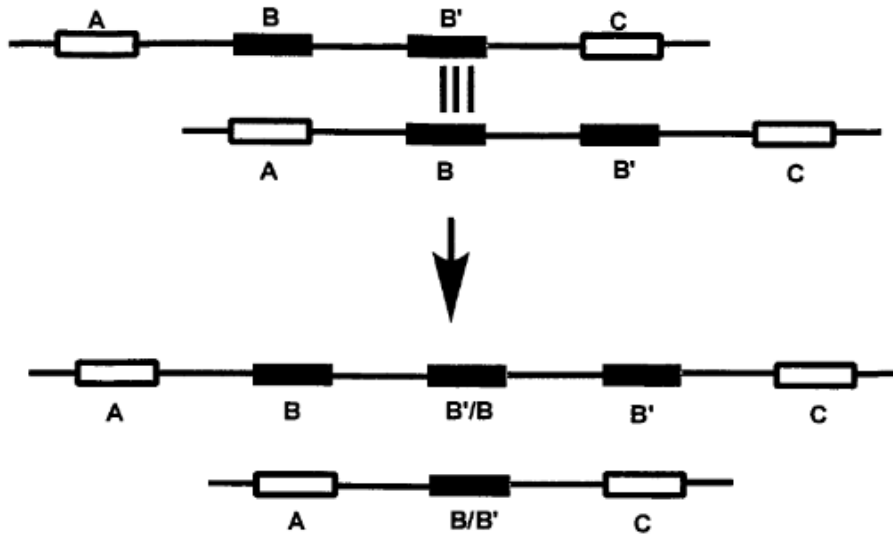


Figura 2

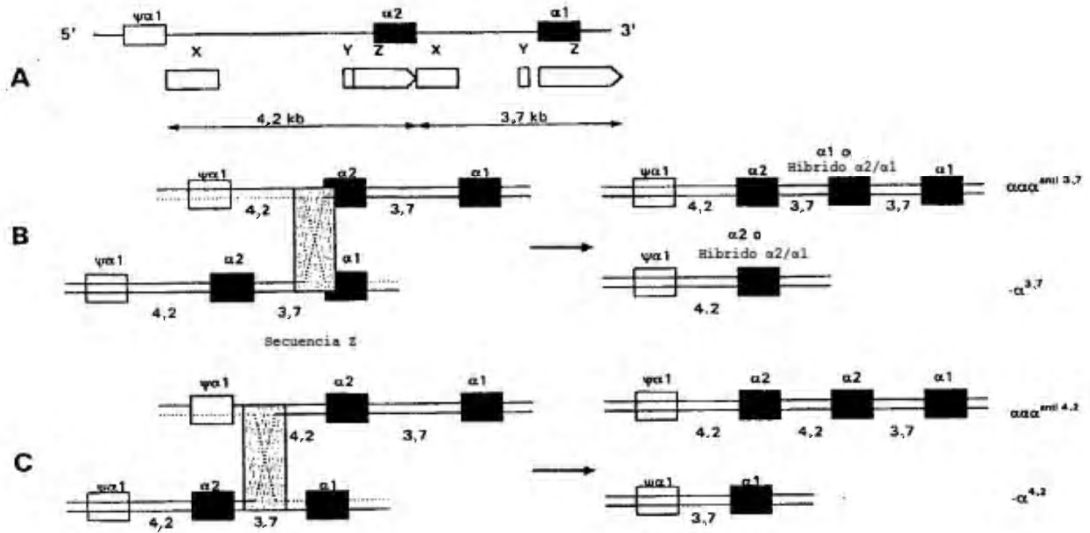


Figura 3

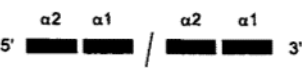
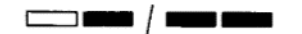
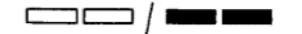
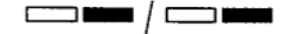
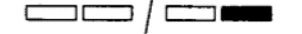
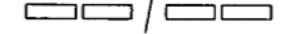
		Genotipo	Diagnóstico	Clínica
5'		$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	normal	
		$\alpha\alpha/\alpha\alpha$	Heterocigoto α^+ -talasemia	Forma no aparente
		$-/\alpha\alpha$	Heterocigoto α^0 -talasemia	Talasemia menor
		$-\alpha/-\alpha$	Heterocigoto α^+ -talasemia	Talasemia menor
		$-/-\alpha$	Heterocigoto mixto α^+/α^0 -talasemia	Enfermedad HbH
		$-/-$	Homocigoto α^0 -talasemia	Síndrome de hidropesía fetal de HbBart

Figura 4

