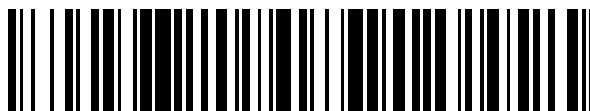


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 391**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2009 E 09769582 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2307569**

54 Título: **Patrones de tamaño para uso en análisis de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

27.06.2008 GB 0811796

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

05.09.2016

73 Titular/es:

**QIAGEN GMBH (100.0%)
Qiagen Str. 1
40724 Hilden, DE**

72 Inventor/es:

**TUCKER, VALERIE CAROL;
KOURI, PIERIS;
HOPWOOD, ANDREW JOHN y
ELLIOT, KEITH**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 581 391 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

Patrones de tamaño para uso en análisis de ácidos nucleicos

Campo técnico

5 Esta invención se refiere a las mejoras relacionadas con el análisis, particularmente de muestras que contienen ácido nucleico.

10 Existen enfoques para el análisis de muestras que contienen ácido nucleico, por ejemplo muestras de ADN forenses, que utilizan un patrón de tamaño para proporcionar puntos de referencia a partir de los cuales se puede determinar los tamaños de los elementos en la muestra analizar. El patrón de tamaño está formado por una serie de elementos patrón de tamaño. Los elementos patrón de tamaño de un patrón de tamaño están marcados con una etiqueta, siendo la identidad de la etiqueta diferente a las etiquetas utilizadas para las identidades desconocidas en la muestra que está siendo testada. La solicitud de patente internacional WO01/92575 por ejemplo describe un número de patrones de tamaño.

El número de etiquetas disponible está restringido y por tanto hay una restricción en el número de loci que pueden ser considerados en un análisis.

15 Entre los objetivos potenciales de la invención está proporcionar un enfoque que incremente el número de loci que pueden ser considerados en uno de los análisis de una muestra a analizar y/o incrementar el número de muestras a analizar que pueden ser consideradas en una unidad de tiempo.

20 Un primer aspecto de la invención es el uso de un patrón de tamaño para determinar el tamaño o tamaños de dos o más loci en una muestra que contiene ácido nucleico, cada uno de los loci tiene uno o más posibles tamaños conocidos, los posibles tamaños conocidos tienen un intervalo de tamaños definido por el más grande y el más pequeño posible tamaño conocido,

el patrón de tamaño incluye elementos patrón de tamaño, donde el tamaño de uno o más de esos elementos patrón de tamaño se seleccionan por ser:

- 25 a) mayor que el más grande de los posibles tamaños conocidos para el locus; o
- b) menor que el más pequeño de los posibles tamaños conocidos para el locus; o
- c) diferente de cualquiera de los tamaños de los posibles tamaños conocidos para el locus

30 en el que patrón de tamaño incluye un conjunto de uno o más elementos patrón de tamaño provistos con una unidad característica y uno o más conjuntos adicionales de uno o más elementos patrón de tamaño provistos con una unidad característica diferente, caracterizada porque cada uno de los dos o más loci están separados en tamaño del loci adyacente que tiene la misma unidad característica por un solo elemento patrón de tamaño,

donde una unidad característica es una etiqueta.

35 Los loci pueden ser seleccionados desde los siguientes loci: VWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA, D3S1358, D10S1248, D22S1045, D2S441, D1S1656, D12S391, TPOX, D14S1434, CSF1PO, D5S818, D7S820, D13S317 o SE33. El uso puede utilizar dos o más de estos loci, preferiblemente cinco o más de estos loci, más preferiblemente ocho o más de estos loci e idealmente once o más de estos loci. Uno o más de estos loci pueden usarse junto a uno o más de otros loci.

El tamaño o tamaños del locus pueden ser el tamaño o tamaños para esa muestra fuera del conjunto de uno o más posibles tamaños. El tamaño o tamaños son preferiblemente el tamaño o tamaños del alelo.

40 Se describe un patrón de tamaño, el patrón de tamaño que se usa en la determinación del tamaño o tamaños del alelo en un locus en la muestra que contiene ácido nucleico, el locus tiene uno o más posibles tamaños conocidos de alelo, los posibles tamaños conocidos de alelo que tienen un intervalo de tamaños definidos por el más grande y el más pequeño tamaño posible conocido de alelos, el patrón de tamaño incluye uno o más elementos patrón de tamaño, donde el tamaño de uno o más de estos elementos patrón de tamaño se selecciona por ser: mayor que el más grande de los posibles alelos conocidos; o menor que el más pequeño de los posibles alelos conocidos; o diferente de cualquiera de los tamaños de los posibles alelos conocidos. Preferiblemente el tamaño de uno o más de los elementos patrón de tamaño se selecciona por ser mayor que el más grande de los posibles alelos conocidos y/o menor que el más pequeño de los posibles alelos conocidos y/o diferente de cualquiera de los tamaños de los posibles alelos conocidos, teniendo en cuenta cualquier parte adicional de la secuencia que se adicionan a las partes de tamaño variable del alelo(s), por ejemplo la secuencia flanqueante incluida en el extremo 5' y/o 3' del locus/loci amplificado de la muestra.

50 El locus y/o tamaño o tamaños del locus incluyen una etiqueta como unidad característica, por ejemplo un colorante. La misma unidad característica puede ser utilizada para todos los tamaño o tamaños del mismo locus. La misma

unidad característica puede ser utilizada para el patrón de tamaño y/o uno o más, preferiblemente todos, de los elementos patrón de tamaño utilizados para determinar el tamaño o tamaños de un locus que está incluido en el tamaño o tamaños del locus para ese locus.

5 La misma unidad característica puede ser utilizada para dos o más loci, particularmente donde el intervalo de tamaños definidos por el más grande y el más pequeño de los posibles tamaños conocidos para esos dos o más loci no se solapan en tamaño. La misma unidad característica puede utilizarse para el patrón de tamaño y/o uno o más, preferiblemente todos, de los elementos patrón de tamaño utilizado para determinar el tamaño o tamaños de todos los loci que usan la misma unidad característica.

10 Preferiblemente se proporcionan al menos cinco diferentes loci que cada uno incorporará una unidad característica diferente del otro. Se proporcionan uno, dos, tres o más diferentes loci que incorporan la misma unidad característica para cada uno de cinco, potencialmente más, unidades características diferentes.

Preferiblemente todos los canales y/o capilares en el instrumento de análisis se usan para las muestras a analizar con ácido nucleico desconocido.

El patrón de tamaño puede incluir uno o más de los elementos patrón de tamaño formados por ácidos nucleicos.

15 Preferiblemente el patrón de tamaño incluye uno o más de los elementos patrón de tamaño, donde el tamaño de uno o más de esos elementos patrón de tamaño se selecciona por ser: mayor que el más grande de los posibles tamaños conocidos para cada locus que incluyen la misma unidad característica que el patrón de tamaño, o menor que el más pequeño de los posibles tamaños conocidos para cada locus que incluyen la misma unidad característica que el patrón de tamaño; o diferente de cualquiera de los tamaños de los posibles tamaños conocidos para cada locus que incluyen la misma unidad característica que el patrón de tamaño. Preferiblemente el patrón de tamaño incluye uno o más de los elementos patrón de tamaño, donde el tamaño de uno o más de esos elementos patrón de tamaño se selecciona por ser: mayor que el más grande de los posibles tamaños conocidos del alelo para cada locus que incluye la misma unidad característica que el patrón de tamaño; o menor que el más pequeño de los posibles tamaños conocidos del alelo para cada locus que incluye la misma unidad característica que el patrón de tamaño. Preferiblemente el patrón de tamaño incluye uno o más de los elementos patrón de tamaño se selecciona por ser mayor que el más grande de los posibles alelos conocidos y/o menor que el más pequeño de los posibles alelos conocidos y/o diferente de cualquiera de los tamaños de los posibles alelos conocidos, teniendo en cuenta cualquier parte adicional de la secuencia que se adiciona a las partes de tamaño variable del alelo(S), por ejemplo la secuencia flanqueante incluida en el extremo 5' y/o 3' del locus/loci amplificado de la muestra.

20

25

30

El patrón de tamaño puede incluir uno o más elementos patrón de tamaño, donde el tamaño de uno o más de esos elementos patrón de tamaño no se selecciona por ser: mayor que el más grande de los posibles tamaños conocidos para uno o más, posiblemente cada, locus que incluye una unidad característica diferente a la del patrón de tamaño; o menor que el más pequeño de los posibles tamaños conocidos para uno o más, posiblemente cada, locus que incluye una unidad característica diferente a la del patrón de tamaño; o diferente de cualquiera de los tamaños de los posibles tamaños conocidos de uno o más, posiblemente cada, locus que incluye una unidad característica diferente a la del patrón de tamaño.

35

Uno o más de los elementos patrón de tamaño pueden ser de un tamaño que sea menor que el tamaño más pequeño de los posibles tamaños conocidos para uno de los locus y mayor que el tamaño más grande de los posibles tamaños conocidos del otro locus. Preferiblemente el tamaño más pequeño de uno de los locus es mayor en tamaño que el tamaño más grande del otro locus. Preferiblemente uno de los locus y el otro locus utilizan la misma unidad característica. Donde tres o más loci se considera que utilizan la misma unidad característica, preferiblemente uno o más de los elementos patrón de tamaño pueden ser de un tamaño que sea menor que el tamaño más pequeño de los posibles tamaños conocidos para uno de los locus y mayor que el tamaño más grande de los posibles tamaños conocidos del otro locus, con respecto a cada par de loci cuyos posibles intervalos de tamaño conocidos sean contiguos.

40

45

Donde se considera que dos o más loci usan la misma unidad característica, preferiblemente se proporcionan uno o más elementos patrón de tamaño que tienen un tamaño menor que el tamaño más pequeño de los posibles tamaños conocidos de los dos o más loci. Preferiblemente al menos dos de tales elementos patrón de tamaño son proporcionados así.

50

Donde se considera que dos o más loci usan la misma unidad característica, preferiblemente se proporcionan uno o más elementos patrón de tamaño que tienen un tamaño mayor que el tamaño más grande de los posibles tamaños conocidos de los dos o más loci. Preferiblemente al menos dos de tales elementos patrón de tamaño son proporcionados así.

55

Preferiblemente se considera que dos o más loci usan la misma unidad característica con respecto a cada una de las dos o más unidades características diferentes. Preferiblemente para cada una de las dos o más unidades características diferentes, se proporcionan uno o dos o más de los elementos patrón de tamaño que tienen un

- tamaño menor que el tamaño más pequeño de los posibles tamaños conocidos de los dos o más loci y/o se proporciona uno o dos o más elementos patrón de tamaño que tienen un tamaño mayor que el tamaño más grande de los posibles tamaños conocidos de los dos o más loci. Preferiblemente dos o más loci se considera que usan la misma unidad característica con respecto a cada una de las cinco unidades características diferentes.
- 5 Preferiblemente para cada una de las cinco unidades características diferentes, se proporcionan uno o dos o más de los elementos patrón de tamaño que tienen un tamaño menor que el tamaño más pequeño de los posibles tamaños conocidos de los dos o más loci y/o se proporcionan uno o dos o más de los elementos patrón de tamaño que tienen un tamaño mayor que el tamaño más grande de los posibles tamaños conocidos de los dos o más loci.
- 10 Uno o dos o más de los elementos patrón de tamaño pueden tener un tamaño que sea menor que uno de los posibles tamaños conocidos para un locus y que sea mayor que uno de los posibles tamaños conocidos de ese locus. Uno o dos o más de los elementos patrón de tamaño pueden ser de un tamaño que encaje en un hueco dentro de los posibles tamaños conocidos para un locus.
- 15 El patrón de tamaño puede incluir un conjunto de uno o más elementos patrón de tamaño provisto con una unidad característica y uno o más conjuntos adicionales de uno o más elementos patrón de tamaño provistos con una unidad característica diferente. El patrón de tamaño puede ser una composición formada por dos o más conjuntos de uno o más elementos patrón de tamaño, estando provistos los conjuntos con unidades características diferentes. Un conjunto puede incluir dos o más, preferiblemente 3 o más, más preferiblemente 5 o más, e idealmente siete o más elementos patrón de tamaño. El número de elementos patrón de tamaño puede ser el mismo en cada conjunto o puede ser diferente. Cuatro, cinco, seis, siete o más conjuntos de elementos patrón de tamaño pueden ser proporcionados, cada uno con una unidad característica diferente.
- 20 El patrón de tamaño puede incluir al menos 10 elementos patrón de tamaño, preferiblemente al menos 15, más preferiblemente al menos 20 e idealmente al menos 25. El patrón de tamaño puede incluir 36 elementos patrón de tamaño o menos y puede tener 30 elementos patrón de tamaño o menos.
- 25 Donde dos o más loci son considerados, después uno o más elementos patrón de tamaño que son del mismo tamaño pueden ser utilizados para dos o más de los dos o más loci considerados.
- Uno o más elementos patrón de tamaño que tienen el mismo tamaño entre sí pueden ser mayores que el más grande de los tamaños posibles conocidos para dos o más de esos dos o más loci que están siendo considerados. Todos los elementos patrón de tamaño que tiene el mismo tamaño entre sí pueden ser mayores que el más grande de los tamaños posibles conocidos para todos de los dos o más loci que están siendo considerados.
- 30 Uno o más de los elementos patrón de tamaño que tienen el mismo tamaño entre sí pueden ser menores que el más pequeño de los tamaños posibles conocidos para dos o más de esos dos o más loci que están siendo considerados. Todos los elementos patrón de tamaño que tienen el mismo tamaño entre sí pueden ser menores que el más pequeño de los tamaños posibles conocidos para todos de los dos o más loci que están siendo considerados.
- 35 Uno o más de los elementos patrón de tamaño que tienen el mismo tamaño entre sí pueden ser diferentes en tamaño de todos los posibles tamaños conocidos para dos o más de esos dos o más loci que están siendo considerados. Todos los elementos patrón de tamaño que tienen el mismo tamaño entre sí pueden ser diferentes en tamaño de todos los posibles tamaños conocidos para todos de los dos o más loci que están siendo considerados.
- 40 Puede ser proporcionado un elemento patrón de tamaño que sea al menos 1 par de bases menor en tamaño que el más pequeño posible alelo conocido patrón de tamaño que se está usando para calibrar. Preferiblemente el elemento patrón de tamaño es al menos 2 pares de bases menor, más preferiblemente al menos 3 pares de bases menor y potencialmente 4 o más pares de bases menor. Puede ser proporcionado un elemento patrón de tamaño que sea al menos 0,1 designaciones menores en tamaño que el más pequeño posible alelo conocido patrón de tamaño que está siendo usado para calibrar. Preferiblemente el elemento patrón de tamaño es al menos 0,2 designaciones menor, más preferiblemente al menos 0,3 designaciones menor y potencialmente 1 o más designaciones menor.
- 45 Puede ser proporcionado un elemento patrón de tamaño que tenga al menos 1 par de bases mayor en tamaño que el más grande posible alelo conocido patrón de tamaño que está siendo usado para calibrar. Preferiblemente el elemento patrón de tamaño es al menos 2 pares de bases más grande, más preferiblemente al menos 3 pares de bases más grande y potencialmente 4 o más pares de bases más grande. Puede ser proporcionado un elemento patrón de tamaño el cual sea al menos 0,1 designaciones mayor en tamaño que el más grande posible alelo conocido patrón de tamaño que está siendo usado para calibrar. Preferiblemente el elemento patrón de tamaño es al menos 0,2 designaciones mayor, más preferiblemente al menos 0,3 designaciones mayor y potencialmente 1 o más designaciones mayor.
- 50 Cuando se proporciona un elemento patrón de tamaño intermedio en el posible intervalo de tamaños de alelos conocidos para un locus y posible intervalo de tamaño conocido para otro locus, es preferible que el elemento patrón de tamaño proporcionado sea al menos 1 par de bases mayor en tamaño que el alelo más grande del intervalo con los menores tamaños y al menos 1 par de bases menor en tamaño que el alelo más pequeño del intervalo con los tamaños más grandes. El elemento patrón de tamaño puede ser al menos 2 pares de bases mayor y al menos 2
- 55

5 pares de bases menor respectivamente. El elemento patrón de tamaño puede ser al menos 3 pares de bases mayor y al menos 3 pares de bases menor respectivamente. El elemento patrón de tamaño puede ser al menos 4 pares de bases mayor y al menos 4 pares de bases menor respectivamente. Cuando se proporciona un elemento patrón de tamaño intermedio en el posible intervalo de tamaños de alelos conocidos para un locus y el posible intervalo de tamaños conocidos para otro locus, es preferible que el elemento patrón de tamaño proporcionado sea al menos 0,1 designaciones mayor en tamaño que el alelo más grande del intervalo con los tamaños menores y al menos 0,1 designaciones menor en tamaño que el alelo más pequeño del intervalo con los tamaños mayores. El elemento patrón de tamaño debe ser al menos 0,2 designaciones mayor y al menos 0,2 designaciones menor respectivamente. El elemento patrón de tamaño debe ser al menos 0,3 designaciones mayor y al menos 0,3 designaciones menor respectivamente. El elemento patrón de tamaño debe ser al menos 1 designación mayor y al menos 1 designación menor respectivamente.

El término locus puede ser remplazado por el término componente y/o el término loci puede ser remplazado por el término componentes, o viceversa, en cualquiera de las afirmaciones contenidas aquí.

La invención puede también requerir el uso de uno o más de los siguientes componentes:

- 15 a) uno o más cebadores;
- b) una o más sondas;
- c) una o más unidades características, tales como etiquetas o colorantes;
- d) uno o más tampones;
- e) uno o más soluciones de HCl
- 20 f) uno o más soluciones de EDTA
- g) uno o más marcadores de género, tales como Amelogenina;
- h) una o más escalera alélicas;
- i) uno o más enzimas, tales como la Taq polimerasa;
- j) uno o más reactivos para uso en RCP;
- 25 k) uno o más deoxinucleótido trifosfato;
- l) una o más soluciones que contienen iones Mg y/o iones Mn;
- m) una o más soluciones que contienen iones potasio.

30 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona un método de análisis de una muestra que contiene ácido nucleico para determinar el tamaño o tamaños de uno o más loci de la muestra, cada uno de los loci tiene uno o más posibles tamaños conocidos, los posibles tamaños conocidos tienen un intervalo definido por los más grandes y los más pequeños posibles tamaños conocidos, el método incluye:

introducir un patrón de tamaño de al menos una parte de la muestra, el patrón de tamaño incluye uno o más elementos patrón de tamaño;

realizar una separación basada en el tamaño en al menos una parte de la muestra;

- 35 determinar las posiciones de los elementos patrón de tamaño detectados;
- utilizar los elementos patrón de tamaño para determinar el tamaño o tamaños de los locus;
- donde el tamaño de uno o más de esos elementos patrón de tamaño es seleccionado por ser:
 - a) mayor que el más grande de los tamaños posibles conocidos para el componente; o
 - b) menor que el más pequeño de los tamaños posibles conocidos para el componente; o

- 40 c) diferente de cualquiera de los tamaños de los posibles tamaños conocidos para el componente;

en los que el patrón de tamaño incluye un conjunto de uno o más elementos patrón de tamaño provistos con una unidad característica y uno o más conjuntos adicionales de uno o más elementos patrón de tamaño provistos con una unidad característica diferente, caracterizada porque cada uno de los dos o más loci están separados en tamaño del loci adyacente que tiene la misma unidad característica por un solo elemento patrón de tamaño, donde una unidad característica es una etiqueta.

45

El método puede incluir una o más de las siguientes etapas: recogida de la muestra; preparación de la muestra para la amplificación; amplificación de la muestra, por ejemplo usando RCP; realización de una separación basada en el tamaño usando electroforesis, por ejemplo en un capilar o canal, particularmente usando un instrumento de electroforesis de gel capilar.

- 5 El método puede incluir la adición de uno o más de los componentes de a) a m) del primer aspecto de la invención. Los uno o más componentes pueden ser añadidos durante la preparación de la muestra por amplificación y/o durante la amplificación y/o en la preparación para la separación basada en el tamaño.

- 10 Preferiblemente el método incluye el análisis de la muestra en al menos 1 canal o capilar de un instrumento. Preferiblemente todos los capilares o canales usados para analizar una muestra se utilizan para realizar una separación basada en el tamaño en la muestra. Preferiblemente ninguno de los capilares o canales usados para analizar una muestra se usan para realizar una separación basada en el tamaño en sólo un patrón de tamaño.

El método puede determinar las posiciones de los elementos patrón de tamaño usando un láser. El láser puede causar fluorescencia de una unidad característica de un elemento patrón de tamaño, particularmente un colorante.

- 15 La determinación de las posiciones de los elementos patrón de tamaño puede incluir la generación de un conjunto de datos que incluye datos de componentes que representan la posición de la fluorescencia y el nivel de fluorescencia observado para cada capilar con relación al más pequeño de cada elemento patrón de tamaño y preferiblemente cada elemento patrón de tamaño y cada tamaño o tamaños del alelo o alelos de un locus. El conjunto de datos puede incluir uno o dos componentes para el tamaño o tamaños del alelo para cada locus analizado donde el origen de la muestra es de una única persona. El conjunto de datos puede incluir uno o más componentes para el tamaño o tamaños del alelo para cada locus analizado donde el origen de la muestra es de más de una persona. Antes de que los elementos patrón de tamaño sean utilizados para determinar el tamaño o tamaños del locus o loci, la consistencia de la migración del patrón de tamaño y/o los elementos patrón de tamaño durante la separación basada en el tamaño debe ser comprobada.

- 20 La determinación de las posiciones de los elementos patrón de tamaño detectados puede proporcionar una posición experimental para uno o más, preferiblemente cada uno, de los elementos patrón de tamaño. El método puede incluir conocimientos previos de las posiciones teóricas de los elementos patrón de tamaño después de que la separación basada en el tamaño ha sido realizada.

- 25 La posición teórica de uno o más elementos patrón de tamaño puede ser comparada con la posición experimental de uno o más elementos patrón de tamaño. Preferiblemente la posición experimental y la posición teórica para el mismo elemento patrón de tamaño son así comparadas. La comparación puede ser una comparación directa de la posición teórica y la posición experimental para un elemento patrón de tamaño. La comparación puede ser una comparación basada en la posición experimental de un elemento patrón de tamaño respecto a la posición experimental de uno u otros más elementos patrón de tamaño, por ejemplo cuando se compara con la posición teórica de un elemento patrón de tamaño respecto a la posición teórica de uno u otros más elementos patrón de tamaño. Uno o dos o más elementos patrón de tamaño cuyo tamaño sea menor que el elemento patrón de tamaño que está siendo comprobado pueden ser utilizados y/o uno o dos o más elementos patrón de tamaño cuyo tamaño sea mayor que el elemento patrón de tamaño que está siendo comprobado pueden ser utilizados. Preferiblemente los elementos patrón de tamaño son aquellos inmediatamente menores y/o mayores en tamaño que el elemento patrón de tamaño que está siendo considerado. Idealmente los mismos elementos patrón de tamaño serían considerados en cada tal comparación.

- 30 Una representación gráfica de las posiciones teóricas para dos o más de los elementos patrón de tamaño puede ser comparada para sus ajustes con una representación gráfica de las posiciones experimentales para dos o más de los elementos patrón de tamaño. La representación gráfica puede ser de la posición de migración frente al tamaño. Una herramienta estadística puede ser utilizada para cuantificar el ajuste. Si el ajuste es inferior al umbral, el análisis puede ser parado o descartado o sometido a un método de análisis específico. Si el ajuste es superior al umbral, el análisis puede ser continuado y/o utilizado.

- 35 El método puede incluir la comprobación de la consistencia de la migración por diferentes unidades características por comparación de las posiciones experimentales para un primer elemento patrón de tamaño y un segundo elemento patrón de tamaño, el primero y segundo elemento patrón de tamaño son del mismo tamaño, pero difieren en términos de la unidad característica. Una pluralidad de primeros tamaños de elementos patrón de tamaño que difieren uno del otro en el tamaño, pero se corresponden en el tamaño a uno de los primeros patrones de tamaño considerados. Se pueden proporcionar los primeros y segundos elementos patrón de tamaño que tengan un tamaño mayor que el tamaño más grande posible conocido para uno o más, preferiblemente todos los loci. Se pueden proporcionar los primeros y segundos elementos patrón de tamaño que tengan un tamaño menor que el más pequeño tamaño posible conocido para uno o más, preferiblemente todos los loci. Se pueden proporcionar los primeros y segundos elementos patrón de tamaño que tengan un tamaño intermedio al más grande posible tamaño conocido para uno o más, preferiblemente todos los loci y el más pequeño posible tamaño conocido para uno o más, preferiblemente todos los loci. Los mismos primero y segundo elementos patrón de tamaño pueden ser utilizados para dos o más, y preferiblemente todas, las unidades características usadas.

Los elementos patrón de tamaño se usan para determinar el tamaño o tamaños del locus o loci, si la consistencia de migración del patrón de tamaño y/o los elementos patrón de tamaño durante la separación basada en el tamaño es aceptable.

5 Los elementos patrón de tamaño pueden ser usados indirectamente para determinar el tamaño o tamaños del locus o loci. Los elementos patrón de tamaño pueden ser usados para determinar el nivel de migración de uno u otros más elementos de tamaño conocido. Los elementos patrón de tamaño pueden ser usados para determinar la posición de uno u otros más elementos conocidos. El uno u otros más elementos de tamaño conocido pueden ser elementos de una escalera alélica.

10 Los elementos patrón de tamaño pueden ser usados para determinar el tamaño o tamaños del locus o loci por comparación de la posición experimental del tamaño o tamaños del locus con la relación de posición a un tamaño definido por las posiciones experimentales de los elementos patrón de tamaño. La posición puede ser convertida a un tamaño por esta comparación. La relación puede ser una relación correcta al reflejar diferencias en y/o la comparación de la posición experimental y la posición teórica de uno o más de los elementos patrón de tamaño.

15 Los elementos patrón de tamaño pueden ser usados directamente para determinar el tamaño o tamaños del locus o loci.

20 Los elementos de tamaño pueden ser usados para determinar el tamaño o tamaños del locus o loci por comparación de la posición experimental del tamaño o tamaños del locus con la relación de posición al tamaño definido por las posiciones experimentales de los elementos patrón de tamaño. La posición puede ser convertida a un tamaño por esta comparación. La relación puede ser una relación correcta al reflejar diferencias en y/o la comparación de la posición experimental y la posición teórica de uno o más de los elementos patrón de tamaño.

El tamaño o tamaños del loci puede ser almacenado electrónicamente y/o mostrado a un usuario, por ejemplo electrónicamente y/o en forma impresa. La información almacenada puede incluir el tamaño y/o cantidad del locus detectado, por ejemplo como un nivel asociado de fluorescencia. El tamaño o tamaños del loci puede expresarse de una forma adicional, por ejemplo como un genotipo para el ácido nucleico de una muestra.

25 El uno o más tamaños posibles conocidos para un locus puede ser una suma del conocimiento publicado en el locus en el momento en el que el patrón de tamaño es elaborado y/o el método de preparación es definido y/o la forma del patrón de tamaño es definida. El uno o más posibles tamaños conocidos para un locus puede ser una suma de los conocimientos publicados en el locus el 15 de Junio de 2009. El uno o más posibles tamaños conocidos pueden ser un conjunto de tamaños para ese locus. El conjunto de tamaños para uno o más del loci que figuran en la Tabla 1 puede ser como se define en la Tabla 1, preferiblemente de acuerdo con la nomenclatura de Gill y colaboradores, *Considerations from the European DNA profiling Group (EDNAP) concerning STR nomenclature, Forensic Science International, 87 (1997) (185-192)* y/o potencialmente con la adición de una parte de tamaño adicional correspondiente a la secuencia flanqueante en el lado 5' y/o el lado 3' de la secuencia de repetición corta en tandem introducida durante la amplificación por los cebadores utilizados.

35 Varias realizaciones de la invención serán descritas, a modo de ejemplo único, y con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1 es una ilustración de los alelos conocidos y los elementos sintéticos de la presente invención para un locus;

Figura 2 es una ilustración de los elementos sintéticos de la presente invención en el contexto de un multiplex para el análisis simultáneo de unas series de loci usando cinco diferentes colorantes;

40 Figura 3 es una ilustración de los resultados de análisis para el loci con colorante azul de la Figura 2, mostrando las posiciones de los elementos sintéticos y las posiciones de los alelos desconocidos de la muestra; y

Figura 4 es una ilustración de los elementos sintéticos de la presente invención en el contexto de un multiplex para el análisis simultáneo de unas series de loci, usando seis diferentes colorantes.

45 Por una variedad de razones, es útil poder analizar muestras que contienen ácido nucleico, incluyendo muestras que contienen ADN. Tales análisis son útiles en ciencias forenses y en situaciones médicas, por ejemplo.

50 El análisis se refiere frecuentemente a la consideración de las identidades particulares presentes en una o más identidades capaces de variación. Un ejemplo de este enfoque es la consideración de la identidad o identidades del alelo presente en una localización, locus, conocido por ser variable. Los alelos varían en identidad debido a las variaciones en su tamaño en muchos casos, tales como en STR_S. Las variaciones en tamaño son causadas por las variaciones en la forma de la repetición de la secuencia corta en tandem, STR, de estos loci. La secuencia STR está formada por repeticiones de series de 4 bases, con número variable de cada una de las repeticiones. Sin embargo, otras variaciones aparte del número y tipo de los 4 pares de bases presentes repetidas pueden ocurrir. La variación en el número de unidades presentes repetidas y/o otras bases presentes da lugar a diferentes tamaños de alelos. Considerando la identidad del alelo (para individuos homocigóticos) o identidades de los alelos (para individuos heterocigóticos) que están presentes para un número de loci diferente información significativa puede ser obtenida.

Mientras que la invención está descrita con relación al STRs, es aplicable para cualquier enfoque en el que se establezcan identidades desconocidas. Tales situaciones incluyen la consideración de los productos PCR desde VTNRs y RAPDs, por ejemplo, donde el tamaño varía también.

5 Cuando una muestra problema de un origen único es analizada, solo uno o dos de estos alelos estarán presentes para cada locus.

Para revelar las identidades de los alelos en el análisis de la muestra, la electroforesis capilar es utilizada para separar los alelos en base a su tamaño, después de la amplificación de la muestra usando –PCR. El resultado de la separación basada en el tamaño es que los alelos se encuentran en diferentes posiciones dentro del gel del capilar.

10 Las diferentes posiciones se hacen detectables al introducir etiquetas en los alelos previo a la separación basada en el tamaño. Las etiquetas pueden ser introducidas durante la amplificación. Las etiquetas emiten fluorescencia en respuesta a la luz láser aplicada por el instrumento de detección. La posición en el capilar en el que la fluorescencia es detectada y el nivel de fluorescencia da información sobre la identidad del alelo y el nivel en el que está presente.

15 Los instrumentos y etiquetas están diseñados con referencia uno a otro. Una intención común es proporcionar una pluralidad de etiquetas que se exciten por la misma longitud de onda de la luz láser, pero que emitan a longitudes de onda que sean diferentes unas de otras. De esta manera, un láser único puede ser usado por el instrumento, pero la detección separada de cada etiqueta puede ser prevista.

Este enfoque normalmente limita las etiquetas disponibles a un total de 5 disponibles para uso simultáneo en la mayoría de los casos, o seis en desarrollos más recientes.

20 Cuando se investiga la identidad de los alelos de esta manera, la posición dentro del capilar atribuida a una emisión debe ser establecida con precisión. Para hacer esto, es conocido el uso de un patrón de tamaño en cada capilar que presenta una muestra problema y una escalera alélica en un capilar aparte. Las posiciones de los elementos patrón de tamaño conocidos que constituyen los patrones de tamaño pueden entonces ser utilizados como puntos de referencia para determinar el tamaño de las posiciones observadas en el análisis de las muestras que tienen alelos desconocidos. Esto se hace por comparación de los elementos patrón de tamaño con la escalera alélica para establecer el alcance de la migración de la escalera alélica. Las posiciones de los alelos en la escalera alélica son así definidas. Estos alelos de tamaño conocido pueden entonces ser utilizados para designar los tamaños de los alelos desconocidos en la muestra que está siendo examinada.

30 Este enfoque utiliza una etiqueta para el patrón de tamaño y sus elementos patrón de tamaño y así deja una menos, por ejemplo cuatro, etiquetas para la muestra a analizar y sus alelos desconocidos. Para obtener suficiente información en las muestras a analizar y sus alelos, unas series de diferentes loci que tienen alelos de identidad variable son consideradas. Donde los tamaños de los alelos desconocidos para diferentes loci puedan solapar una etiqueta diferente debe ser utilizada para los diferentes loci de modo que puedan ser distinguidos. Por otra parte, no hay forma de saber que locus y que alelo está involucrado.

35 Este requisito, junto con el requisito para el patrón de tamaño para tener su propia etiqueta, limita el número total de loci que pueden ser considerados en un análisis.

Uso de elementos sintéticos

La presente invención proporciona un enfoque diferente para la forma y localización utilizadas para el suministro de patrones de tamaño.

40 El enfoque puede ser ilustrado con respecto a un locus específico para el que está siendo analizado. Para un locus específico, la investigación y la experiencia han revelado la medida de los alelos observados para ese locus, junto con los datos de los alelos individuales observados para ese locus. Así, para el locus HUMTH01, la medida de los alelos puede variar desde 4 a 13,3 (de acuerdo con la forma aceptada de nomenclatura de Gill y colaboradores. *Considerations from the European DNA profiling Group (EDNAP) concerning STR nomenclature, Forensic Science International, 87 (1997) (185-192)* y con ese locus que tiene los alelos individuales 4, 5, 6, 7, 8, 9, 9,3, 10, 11, y 13,3.

45 La designación está basada en las repeticiones presentes de unidades de un número de 4 bases; números enteros que representan repeticiones enteras de 4 bases; 0,1, 0,2 y 0,3 que representan bloques de 1, 2 y 3 bases, una repetición incompleta. Esta posición está ilustrada en la Figura 1 con una línea vertical que corresponde a la posición de cada uno de los posibles alelos.

50 Como puede verse en la Figura 1, hay pequeños huecos entre los diversos alelos, un espacio mayor entre los alelos hacia la parte superior y huecos por encima y por debajo de los alelos de valores extremos. El enfoque de las invenciones para el patrón de tamaño hace uso de estos huecos.

55 Unas series de elementos sintéticos son proporcionadas para el patrón de tamaño para determinar el tamaño de los alelos de un locus. Éstos utilizan el mismo colorante u otra etiqueta es también usada para identificar los alelos de ese locus. Así usarán la misma etiqueta que los elementos de la muestra a analizar con respecto a ese locus. Los alelos sintéticos son cuidadosamente elaborados para ser colocados en los huecos.

Los huecos pueden ser utilizados en una amplia variedad de maneras, con una forma particularmente preferida para su uso considerando simultáneamente un gran número de loci especificados a continuación.

5 Como una ilustración del elemento sintético usado en un solo caso de locus, en el ejemplo, alelos sintéticos podrían proporcionarse en tamaños de 2,2, 3,2, 14,2 y 15,2. Estos elementos sintéticos se muestran en la Figura 1 como líneas verticales punteadas.

Es importante que los elementos sintéticos no coincidan en tamaño con cualquiera de los alelos esperados de la muestra problema. Por otra parte podrían posiblemente ocultar un alelo presente en la muestra problema o posiblemente dar una indicación errónea de que un alelo está presente en la muestra problema. Así los elementos sintéticos son diferentes en términos de su posición después de la separación basada en el tamaño; electroforesis.

10 Proporcionar el patrón de tamaño de esta manera significa que el colorante previamente utilizado para el patrón de tamaño puede ser empleado para otro uso. El otro uso puede, por ejemplo, ser marcar los alelos de uno o más loci. Esto es beneficioso ya que el número de colorantes disponibles es limitado. La provisión de más colorantes no es sencilla ya que necesitan ser detectados por el instrumento, comportarse de una manera coherente con los colorantes existentes y así sucesivamente. El análisis simultáneo de más loci permite obtener más información sin
15 requerir un análisis separado que ocupa más tiempo y/o recursos.

En la Tabla 1 se definen los posibles tamaños para los loci enumerados, con esos loci se incluyen muchos de importancia para las investigaciones forenses. Este dato es consistente con el proporcionado en la base de datos de ADN de repetición en tándem corto operado por Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST)/ Oficina de Normas de Cumplimiento de la Ley proporcionado por el Instituto Nacional de Justicia el 15 de Junio de 2009.

20 Un ejemplo de multiplex que usa el enfoque de la presente invención se muestra en la Figura 2. Un multiplex hace posible que un gran número de loci sean considerados simultáneamente.

El colorante azul (línea superior) es usado para marcar los loci THO1, DIO y D 18. El mismo colorante puede ser utilizado para múltiples loci mientras que el intervalo de tamaños de alelos encontrado para cada uno de estos loci sea distinto de uno a otro. Elementos sintéticos X son proporcionados en la parte inferior y parte superior del
25 intervalo global de estos tres loci en los pares de bases 49 y 54 y los pares de bases 240 y 246. Elementos sintéticos Y son también proporcionados en localizaciones intermedias entre los diferentes loci, pares de bases 100 y 154.

El colorante verde (segunda línea hacia abajo) es usado para los loci D8, D2p, DI y D21. Alelos sintéticos superior e inferior son proporcionados en los pares de bases 48 y 53 y en los pares de bases 248 y 254. Elementos sintéticos
30 intermedios son proporcionados en los pares de bases 102, 140 y 186.

El colorante amarillo (tercera línea hacia abajo) es usado para los loci D22, D16, D12 y D2q. Elementos sintéticos superior e inferior son proporcionados en los pares de bases 68 y 78 y en los pares de bases 258 y 268. Elementos sintéticos intermedios son proporcionados en los pares de bases 112, 156 y 204.

El colorante rojo (cuarta línea hacia abajo) es usado para los loci vWA, FGA y FGA raros. Elementos sintéticos superior e inferior son proporcionados en los pares de base 88 y 96 y en los pares de bases 302 y 310. Elementos sintéticos intermedios son proporcionados en los pares de bases 154 y 246.
35

El colorante naranja (línea de fondo) es usado para los loci D3 raros, D3, D19 y D19 raros. Elementos sintéticos superior e inferior son proporcionados en los pares de bases 70 y 78 y en los pares de bases 202 y 210. Un elemento sintético intermedio es proporcionado al par de bases 142.

40 Mientras que los elementos sintéticos pueden ser proporcionados al final del intervalo para un loci dado, como se muestra arriba en la Figura 1 para un locus único y Figura 2 para una serie de loci, sería posible proporcionar elementos sintéticos de tamaños intermedios dentro del intervalo de tamaño del locus. Esto es posible como una manera alternativa o una manera adicional a lo descrito anteriormente.

Así en el ejemplo TH01, los elementos sintéticos podrían ser proporcionados a los tamaños 2,2, 3,2, 5,2, 8,2, 11,2, 14,2 y 15,2. Los tamaños intermedios se seleccionan de manera que no se correspondan con ningún tamaño de alelo.
45

Ya sea proporcionado en la parte superior o inferior del intervalo de alelos para un locus y/o dentro del intervalo de alelos para el locus, los alelos sintéticos son usados de manera equivalente para medir las identidades de las muestras problema.

50 *Uso de los alelos sintéticos*

El multiplex ilustrado arriba en relación con la Figura 2, se puede utilizar como sigue.

Una muestra que contiene DNA, pero para la que las identidades de los alelos son desconocidas es recogida, preparada y puesta en contacto con los reactivos multiplex. Estos reactivos incluyen los cebadores para la

amplificación y los reactivos para la introducción de los marcadores en los productos de amplificación durante la amplificación. Los reactivos para los diferentes loci comparten marcadores comunes según el formato de la Figura 2. Los reactivos también incluyen el patrón de tamaño en la forma de elementos sintéticos previamente descritos.

5 Después de la amplificación, el producto amplificado se divide a fin de introducir una muestra en el principio de cada uno o en capilares más separados proporcionados como parte de un instrumento. La electroforesis es entonces usada para lograr la separación basada en el tamaño con respecto a todos los capilares.

Después de la electroforesis, el instrumento y su láser examinan los capilares para generar un conjunto de datos que represente la posición de fluorescencia y el nivel de fluorescencia observado para cada capilar.

10 Dentro del conjunto de datos que representa la posición de fluorescencia y el nivel de fluorescencia observado para cada capilar sería un componente de datos para cada uno de los elementos sintéticos. Estos se muestran en la Figura 3 para el capilar con colorante azul, con los elementos sintéticos mostrados como picos con línea de puntos.

15 Además, si la muestra a analizar es de una única persona, habría uno o más componentes de datos para cada uno de los loci analizados que corresponde al alelo único o dos alelos presentes y observados. La presencia de uno o dos componentes de datos dependerá de sí o no la persona es heterocigótica u homocigótica con respecto a ese locus particular.

Si la muestra a analizar es de un origen mixto, entonces uno, dos o más componentes de datos estarán presentes para cada locus analizado.

Como se muestra en la Figura 3, la persona que es la fuente de la muestra es homocigótica para el loci TH01 y D10 pero es heterocigótica para el locus D18.

20 El procesamiento de los componentes de datos esta basado en el patrón de tamaño. Con respecto a los componentes de datos que corresponden a un elemento sintético del patrón de tamaño, el sistema tiene conocimiento sobre la posición teórica de ese elemento sintético. Esto se suma a la posición experimental observada por el instrumento. Esto es verdad para cada elemento sintético dentro de cada capilar, y por eso el sistema tiene conocimiento de la posición teórica de cada uno de los elementos sintéticos en relación unos con otros.

25 Como primer paso es posible usar las posiciones teóricas de los elementos sintéticos para confirmar que un capilar ha funcionado correctamente, en particular, la consistencia de la migración puede ser comprobada. Esto puede conseguirse de una o más formas.

30 En primer lugar, es posible considerar el ajuste entre un gráfico de todas las posiciones teóricas después de un tiempo de migración dado y un gráfico de todas las posiciones experimentales después de un tiempo de migración dado. El ajuste entre los gráficos se puede considerar usando una o más herramientas estadísticas conocidas para considerar la buena calidad del ajuste.

35 En segundo lugar, es posible comparar las posiciones relativas de las posiciones experimentales frente a las posiciones relativas de las posiciones teóricas. La medida de los dos intervalos pueden ser diferente una de otra, pero las posiciones relativas dentro de los intervalos deben ser consistentes. Esto puede ser comprobado usando todas las posiciones y comparándolas y/o seleccionando alguna de las posiciones y comparándolas. Por ejemplo, la posición teórica para un elemento sintético puede ser utilizada junto con la posición teórica del siguiente elemento sintético mayor y el siguiente elemento sintético menor para establecer que la posición teórica es 0,6 de la separación entre los elementos sintéticos más alto y más bajo. El proceso puede entonces ser aplicado a las posiciones experimentales para ver si la posición 0,6 es correcta en las posiciones experimentales. La utilización de solo alguna de las posiciones potencialmente permite uno o más de los elementos sintéticos que no han migrado consistentemente para ser identificados.

45 Si la migración consistente es observada, entonces se puede suponer que se produzcan resultados fiables para la muestra a analizar considerada en ese capilar. Si la migración inconsistente es observada, entonces los resultados para la muestra a analizar pueden ser descartados.

50 Como segundo paso, el patrón de tamaño puede ser usado para determinar la posición de los alelos dentro de la muestra a analizar. Esto se puede lograr mediante el establecimiento de la posición de un alelo desconocido en los resultados relativos a la posición experimental de uno o más de los elementos sintéticos. Por ejemplo, las posiciones experimentales del patrón de tamaño se pueden usar para definir una curva que exprese la posición frente al tamaño. Por lo tanto, la posición del alelo puede ser comparada con el gráfico para dar un tamaño de alelo. Es posible hacer la comparación y determinar los tamaños directamente del patrón de tamaño o indirectamente, utilizando el patrón de tamaño para procesar una escalera alélica, donde la escalera alélica se usa para designar los alelos en la muestra problema que está siendo analizada.

55 Los elementos patrón de tamaño pueden ser utilizados en una variedad de formas. En primer lugar, los elementos patrón de tamaño asociados con un locus pueden ser utilizados en el procesamiento justo de ese locus.

En segundo lugar, los elementos patrón de tamaño asociados con un número de loci, que usan la misma unidad característica, tal como un color de colorante, pueden ser utilizados en el procesamiento de justo esos loci que usan la misma unidad característica.

5 En tercer lugar, es posible combinar los elementos de tamaño provistos con una unidad característica en combinación con los elementos de tamaño provistos con otra unidad característica. Idealmente, todos los elementos de tamaño con todas las unidades características diferentes podrían ser combinados, y de esta forma, se consigue una composición patrón de tamaño. Cuando los elementos patrón de tamaño con una unidad característica tienen un tamaño posiblemente común con o cerca de un alelo que usa una unidad característica diferente, los dos pueden distinguirse basándose en las diferentes unidades características.

10 La comparación de las posiciones teóricas y experimentales para uno o más de los alelos sintéticos puede ser usada para asegurar que la gráfica de la posición experimental frente al tamaño es un reflejo exacto del tamaño.

El tamaño y su asociado nivel de fluorescencia pueden entonces ser usados en el procesamiento subsiguiente, por ejemplo para definir un genotipo para la muestra a analizar. El genotipo puede ser usado como parámetro de búsqueda y/o ser almacenado en una base de datos de genotipos.

15 En una variación adicional, es posible examinar los resultados y ver si los diferentes alelos asociados con los diferentes colorantes están migrando correctamente. Se proporciona así una comprobación de la calibración del cruce de colorantes.

Para proporcionar ésta, un ejemplo diferente de un multiplex que usa el enfoque de la presente invención se muestra en la Figura 4. En este caso seis colorantes son usados.

20 El colorante azul oscuro (línea superior) es usado para marcar uno o más loci. El mismo colorante puede ser usado para múltiples loci donde el intervalo de tamaño de alelos encontrado para cada uno de esos loci es distinto uno de otro. Elementos sintéticos X son proporcionados en la parte inferior y parte superior del intervalo general de los loci combinados. Elementos sintéticos Y son también proporcionados en localizaciones intermedias. Un elemento sintético Z es proporcionado en una localización intermedia común para todos los colorantes diferentes.

25 El colorante azul claro (segunda línea hacia abajo) es usado para marcar uno o más loci. El mismo colorante puede ser usado por múltiples loci donde el intervalo de tamaños de alelos encontrados para cada uno de esos loci es distinto de uno a otro. Elementos sintéticos X son proporcionados en la parte inferior y parte superior del intervalo general de los loci combinados. Elementos sintéticos Y son también proporcionados en localizaciones intermedias. Un elemento sintético Z como se describe arriba es proporcionado en una localización intermedia común para todos los colorantes diferentes.

30 El colorante verde (tercera línea hacia abajo) es usado para marcar uno o más loci. El mismo colorante puede ser usado para múltiples loci donde el intervalo de tamaños de alelos encontrado para cada uno de esos loci es distinto de uno a otro. Elementos sintéticos X son proporcionados en la parte inferior y parte superior del intervalo general de los loci combinados. Elementos sintéticos Y son también proporcionados en localizaciones intermedias. Un elemento sintético Z como se describe arriba es proporcionado en una localización intermedia común para todos los colorantes diferentes.

35 El colorante amarillo (cuarta línea hacia abajo) es usado para marcar uno o más loci. El mismo colorante puede ser usado para múltiples loci donde el intervalo de tamaños de alelo encontrados para cada uno de esos loci es distinto de uno a otro. Elementos sintéticos X son proporcionados en la parte inferior y parte superior del intervalo general de los loci combinados. Elementos sintéticos Y son también proporcionados en localizaciones intermedias. Un elemento sintético Z como se describe arriba es proporcionado en una localización intermedia común para todos los colorantes diferentes.

40 El colorante rojo (tercera línea hacia abajo) es usado para marcar uno o más loci. El mismo colorante puede ser usado para múltiples loci donde el intervalo de tamaños de alelo encontrado para cada uno de esos loci es distinto de uno a otro. Elementos sintéticos X son proporcionados en la parte inferior y parte superior del intervalo general de los loci combinados. Elementos sintéticos Y son también proporcionados en localizaciones intermedias. Un elemento sintético Z como se describe arriba es proporcionado en una localización intermedia común para todos los colorantes diferentes.

45 El colorante naranja (línea de fondo) es usado para marcar uno o más loci. El mismo colorante puede ser usado para múltiples loci donde el intervalo de tamaños de alelo encontrado para cada uno de esos loci es distinto uno de otro. Elementos sintéticos X son proporcionados en la parte inferior y parte superior del intervalo general de los loci combinados. Elementos sintéticos Y son también proporcionados en localizaciones intermedias. Un elemento sintético Z como se describe arriba es proporcionado en una localización intermedia común para todos los colorantes diferentes.

50 En general, en esta realización, los elementos sintéticos de tamaño superior para cada color del colorante son del mismo tamaño uno como el otro y son más grandes en tamaño que el alelo más grande de cualquier color del

- 5 colorante. El tamaño más pequeño de los elementos sintéticos para cada color del colorante son también del mismo tamaño uno como otro y son más pequeños en tamaño que el alelo más pequeño de cualquier color del colorante. Los elementos sintéticos de tamaño intermedio común son también del mismo tamaño uno como el otro y son diferentes en tamaño de cualquiera de los alelos de cualquiera de los colores del colorante. Como resultado de los elementos sintéticos que son del mismo tamaño a través de los diferentes colorantes, esos elementos sintéticos migrarían a la misma velocidad y por lo tanto aparecerían en la misma posición dentro de los resultados.

Una vez que la verificación de la correcta migración del colorante ha sido confirmada, el método puede continuar al segundo paso para determinar las posiciones de los alelos.

Ventajas

- 10 La provisión de elementos sintéticos de esta manera proporciona ventajas al permitir considerar que un gran número de loci utilicen un número de etiquetas existentes. La provisión de elementos sintéticos de esta manera proporciona mayores multiplex para ser considerados en el mismo periodo de tiempo y al mismo coste de proceso. Multiplex más grandes ofrecen mayor resolución entre las personas y/o mayor robustez en la resolución.

TABLA 1

Locus	Alelos
VWA	10, 11, 12, 13, 14, 15, 15.2, 16, 16.1, 17, 18, 18.1, 18.2, 18.3, 19, 19.2, 20, 21, 22, 23, 24, 25,
D16S539	4, 5, 6, 7, 8, 8.3, 9, 9.3, 10, 11, 11.3, 12, 12.1, 12.2, 13, 13.1, 13.3, 14, 14.3, 15, 16,
D2S1338	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 23.2, 23.3, 24, 25, 26, 27, 28,
D8S1179	7, 8, 9, 10, 10.2, 11, 12, 12.3, 13, 14, 15, 15.1, 15.3, 16, 17, 17.1, 18, 19, 20,
D21S11	12, 24, 24.2, 24.3, 25, 25.1, 25.2, 25.3, 26, 26.1, 26.2, 27, 27.1, 27.2, 27.3, 28, 28.1, 28.2, 28.3, 29, 29.1, 29.2, 29.3, 30, 30.1, 30.2, 30.3, 31, 31.1, 31.2, 31.3, 32, 32.1, 32.2, 32.3, 33, 33.1, 33.2, 33.3, 34, 34.1, 34.2, 34.3, 35, 35.1, 35.2, 35.3, 36, 36.1, 36.2, 36.3, 37, 37.2, 38, 38.2, 39, 39.2, 40.2, 41.2,
D18S51	7, 8, 9, 9.2, 10, 10.2, 11, 11.1, 11.2, 12, 12.2, 12.3, 13, 13.1, 13.2, 13.3, 14, 14.2, 15, 15.1, 15.2, 15.3, 16, 16.1, 16.2, 16.3, 17, 17.1, 17.2, 17.3, 18, 18.1, 18.2, 19, 20, 20.1, 20.2, 21, 21.1, 21.2, 22, 22.1, 22.2, 23, 23.1, 23.2, 24, 24.2, 25, 26, 27, 28.1, 28.3, 39.2,
D19S433	5.2, 6.2, 7, 8, 9, 10, 11, 11.1, 12, 12.1, 12.2, 13, 13.1, 13.2, 13.3, 14, 14.1, 14.2, 14.3, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2, 18, 18.2, 19, 19.2, 20,
TH01	3, 4, 5, 5.3, 6, 6.1, 6.3, 7, 7.3, 8, 8.3, 9, 9.3, 10, 10.3, 11, 12, 13.3, 14,
FGA	12.2, 13, 13.2, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.1, 16.2, 17, 17.1, 17.2, 18, 18.1, 19, 19.1, 19.2, 19.3, 20, 20.1, 20.2, 20.3, 21, 21.1, 21.2, 21.3, 22, 22.1, 22.2, 22.3, 23, 23.1, 23.2, 23.3, 24, 24.1, 24.2, 24.3, 25, 25.1, 25.2, 25.3, 26, 26.1, 26.2, 26.3, 27, 27.1, 27.2, 27.3, 28, 28.1, 28.2, 29, 29.1, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.1, 32.2, 33.1, 33.2, 34.1, 34.2, 35.2, 41.1, 41.2, 42, 42.1, 42.2, 43.1, 43.2, 44, 44.2, 44.3, 45, 45.1, 45.2, 46, 46.1, 46.2, 47, 47.2, 48, 48.2, 49, 49.1, 49.2, 50.2, 50.3, 51, 52.2
D3S1358	8, 8.3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 14.3, 15, 15.1, 15.2, 15.3, 16, 16.2, 17, 17.1, 17.2, 18, 18.1, 18.2, 18.3, 19, 20,
D10S1248	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19,
D22S1045	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,
D2S441	8, 9, 10, 11, 11.3, 12, 12.3, 13, 13.3, 14, 14.3, 15, 16, 17,
D1S1656	9, 10, 11, 12, 13, 13.3, 14, 14.3, 15, 15.3, 16, 16.3, 17, 17.1, 17.3, 18, 18.3, 19, 19.3, 20, 20.3, 21,
D12S391	15, 16, 17, 17.3, 18, 18.3, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,
TPOX	4, 5, 6, 7, 7.3, 8, 9, 10, 10.1, 10.3, 11, 12, 13, 13.1, 14, 15, 16,
CSF1PO	5, 6, 6.3, 7, 7.3, 8, 8.3, 9, 9.1, 9.3, 10, 10.1, 10.2, 10.3, 11, 11.1, 11.3, 12, 12.1, 13, 14, 15, 16,
D5S818	6, 7, 8, 9, 10, 10.1, 11, 11.1, 12, 12.3, 13, 14, 15, 16, 17, 18,
D7S820	5, 5.2, 6, 6.2, 6.3, 7, 7.1, 7.3, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 10, 10.1, 10.3, 11, 11.1, 11.3, 12, 12.1, 12.2, 12.3, 13, 13.1, 14, 14.1, 15, 16,
D13S317	5, 6, 7, 7.1, 8, 8.1, 9, 10, 11, 11.1, 11.3, 12, 13, 13.3, 14, 14.3, 15, 16, 17,
SE33	3, 4.2, 6.3, 7, 8, 8.1, 9, 9.2, 10, 11, 11.2, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 14.3, 15, 15.2, 16, 16.2, 16.3, 17, 17.2, 17.3, 18, 18.2, 18.3, 19, 19.2, 20, 20.2, 20.3, 21, 21.1, 21.2, 22, 22.2, 23, 23.2, 24, 24.2, 25, 25.2, 26, 26.2, 27, 27.2, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.1, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 36.2, 37, 38, 39, 39.2,

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un patrón de tamaño que determina el tamaño o tamaños de dos o más loci en una muestra que contiene ácido nucleico, cada uno de los loci tiene uno o más posibles tamaños conocidos, los posibles tamaños conocidos tienen un intervalo de tamaños definidos por el más grande y el más pequeño posibles tamaños conocidos, el patrón de tamaño incluye elementos patrón de tamaño, donde el tamaño de uno o más de esos elementos patrón de tamaño es seleccionado por ser:
- a) mayor que el más grande de los tamaños posibles conocidos para el locus; o
 - b) menor que el más pequeño de los posibles tamaños conocidos para el locus; o
 - c) diferente de cualquiera de los tamaños de los posibles tamaños conocidos para el locus;
- 10 en los que el patrón de tamaño incluye un conjunto de uno o más elementos patrón de tamaño provistos con una unidad característica y uno o más aún conjuntos de uno o más elementos patrón de tamaño provistos con una unidad característica diferente, caracterizada porque cada uno de los dos o más loci están separados del loci adyacente que tiene la misma unidad característica por un único elemento patrón de tamaño, donde una unidad característica es una etiqueta.
- 15 2. Uso de un patrón de tamaño de acuerdo con la reivindicación 1 en la que uno o más de los elementos patrón de tamaño son de un tamaño que encaja en un hueco dentro de los posibles tamaños conocidos para un locus.
3. Uso de un patrón de tamaño de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones en el que al menos se proporcionan cinco loci diferentes que incorporan una unidad característica diferente unos de otros.
- 20 4. Uso de un patrón de tamaño de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones en el que se proporciona un elemento patrón de tamaño que es al menos 1 par de bases menor en tamaño que el más pequeño posible alelo conocido del patrón de tamaño que se está usando para calibrar y/o se proporciona un elemento patrón de tamaño que es al menos 1 par de bases mayor en tamaño que el más grande alelo posible conocido del patrón de tamaño que se está usando para calibrar y/o se proporciona un elemento patrón de tamaño intermedio en el intervalo de tamaño de los alelos posibles conocidos para un locus y el posible intervalo de tamaño conocido para otro locus y se proporciona un elemento patrón de tamaño que sea al menos 1 par de bases más grande en tamaño que el alelo más grande del intervalo con los tamaños más pequeños y al menos 1 par de bases más pequeño en tamaño que el alelo más pequeño del intervalo con los tamaños más grandes.
- 25 5. Uso de un patrón de tamaño de acuerdo con cualquiera de las anteriores reivindicaciones en el que se proporciona un elemento patrón de tamaño que es al menos 4 pares de bases más pequeño que el más pequeño posible alelo conocido del patrón de tamaño que se está usando para calibrar y/o puede ser proporcionado un elemento patrón de tamaño que sea al menos 4 pares de bases más grande en tamaño que el más grande posible alelo conocido del patrón de tamaño que se está usando para calibrar y/o se proporciona un elemento patrón de tamaño intermedio en el intervalo de tamaños de los posibles alelos conocidos para un locus y el posible intervalo de tamaño conocido para otro locus y se proporciona un elemento patrón de tamaño que sea al menos 4 pares de bases más grande en tamaño que el alelo más grande del intervalo con los tamaños más pequeños y al menos 4 pares de bases más pequeño en tamaño que el alelo más pequeño del intervalo con los tamaños más grandes.
- 30 6. Un método para analizar una muestra que contiene ácido nucleico para determinar el tamaño o tamaños de dos o más loci de la muestra, cada uno de los loci tiene uno o más posibles tamaños conocidos, los posibles tamaños conocidos que tienen un intervalo definido por el más grande y el más pequeño de los tamaños posibles definidos, el método incluye:
- 40 introducir un patrón de tamaño de al menos una parte de la muestra, el patrón de tamaño incluye uno o más de los elementos patrón de tamaño;
- realizar una separación basada en el tamaño en al menos una parte de la muestra;
- determinar las posiciones de los elementos patrón de tamaño detectados;
- 45 usar los elementos patrón de tamaño para determinar el tamaño o tamaños del locus;
- donde el tamaño de uno o más de esos elementos patrón de tamaño se seleccionan por ser:
- a) mayor que el más grande de los posibles tamaños conocidos para el locus; o
 - b) menor que el más pequeño de los posibles tamaños conocidos para el locus; o
 - c) diferente de cualquiera de los tamaños de los posibles tamaños conocidos para el locus;

en el que el patrón de tamaño incluye un conjunto de uno o más elementos patrón de tamaño provistos con una unidad característica y uno o más aún conjuntos de uno o más elementos patrón de tamaño provistos con una unidad característica diferente, caracterizada porque cada uno de los dos o más loci están separados en tamaño del loci adyacente que tiene la misma unidad característica por un único elemento patrón de tamaño, donde una unidad característica es una etiqueta.

5

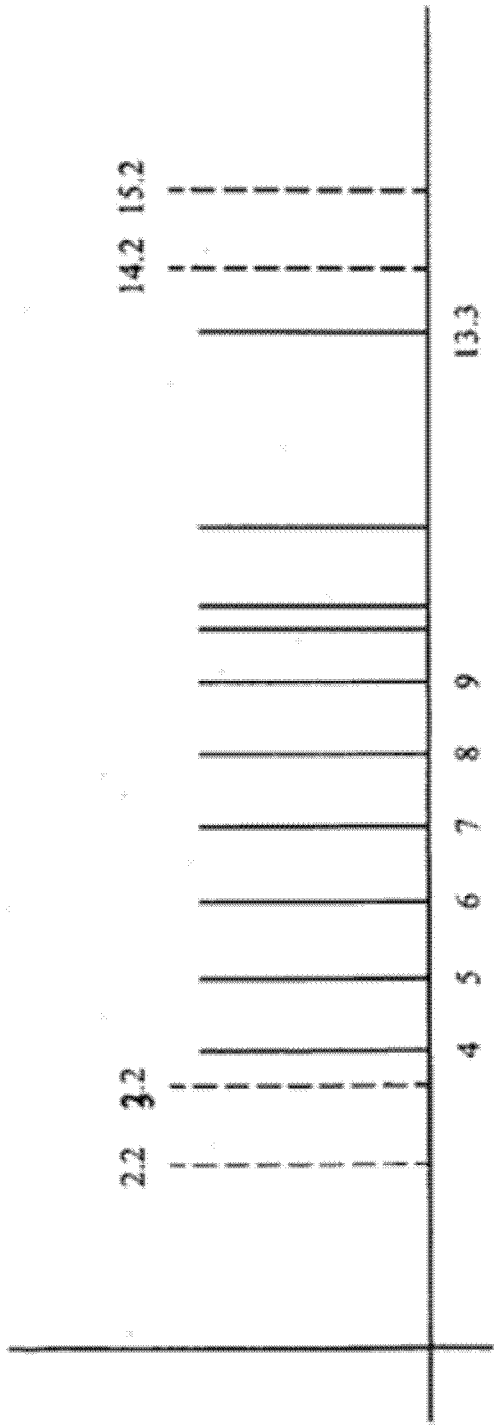


FIG. 1

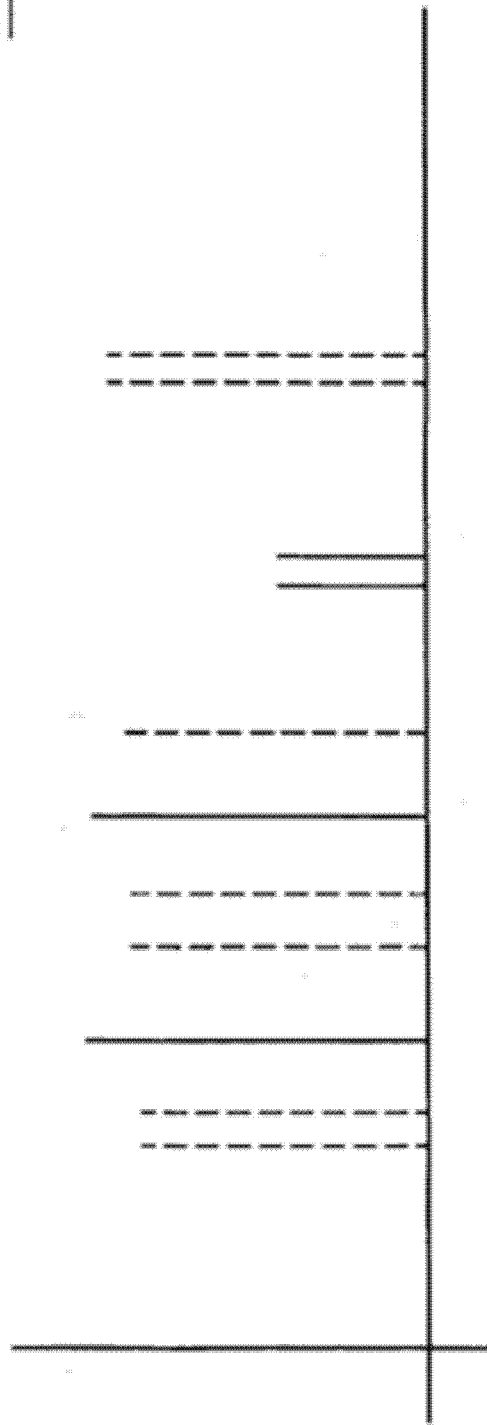


FIG. 3

5 Colores 16-Plex

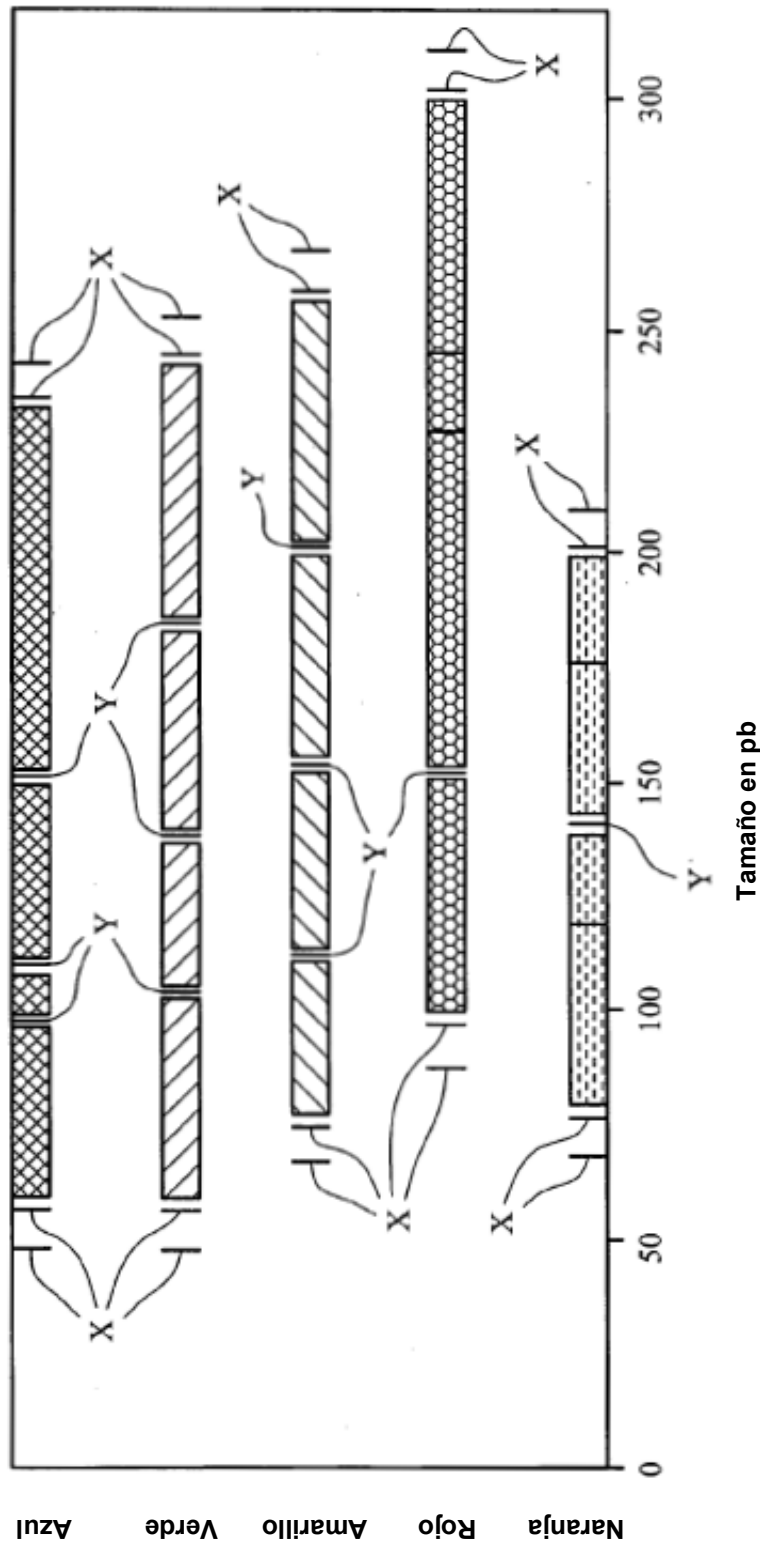


FIG. 2

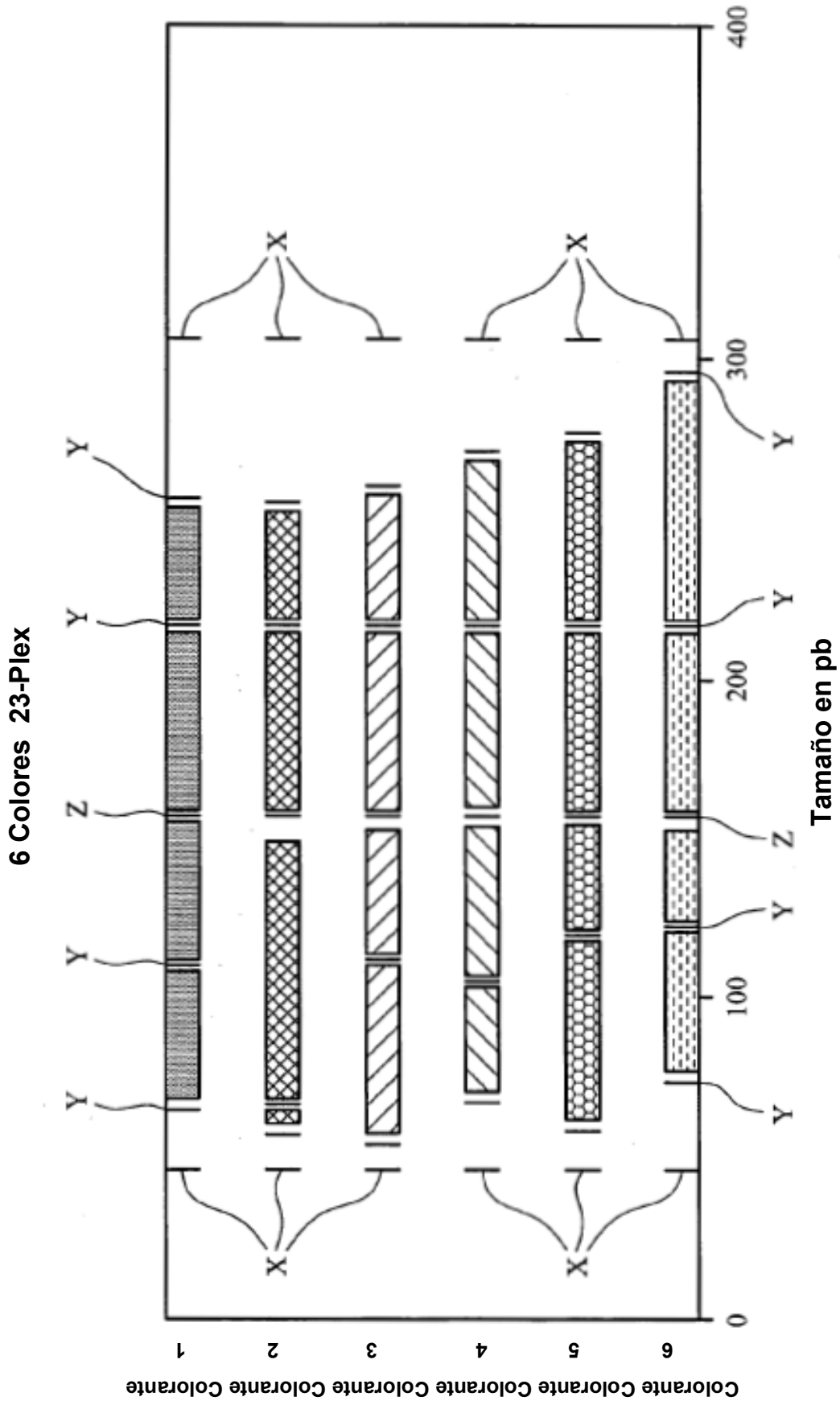


FIG. 4