

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 606 689**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.06.2009 E 14160458 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2806033**

54 Título: **Sonda para su utilización en el diagnóstico de porfiria y para la cuantificación alélica de genes relativos a la porfiria mediante reacciones de ligamiento y amplificación**

30 Prioridad:

**30.06.2008 IT MI20081205**

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

**27.03.2017**

73 Titular/es:

**FONDAZIONE IRCCS "CA' GRANDA - OSPEDALE  
MAGGIORE POLICLINICO" (100.0%)  
Via Francesco Sforza, 28  
20122 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**DI PIERRO, ELENA;  
CAPPELLINI, MARIA DOMENICA;  
BESANA, VALERIA y  
BRANCALEONI, VALENTINA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 606 689 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**

Sonda para su utilización en el diagnóstico de porfiria y para la cuantificación alélica de genes relativos a la porfiria mediante reacciones de ligamiento y amplificación.

5 La presente invención se refiere a sondas y a la utilización de dichas sondas en un método de diagnóstico y a un kit de diagnóstico para detectar la presencia de Porfiria, en particular para detectar la cantidad alélica de genes relativos a la Porfiria.

10 El término Porfiria incluye un grupo de siete enfermedades debidas a anomalías genéticas, a menudo relacionadas con un fenotipo clínico grave, que se derivan de defectos hereditarios que implican al menos una de las enzimas de la vía biosintética del hemo, un elemento reactivo de hemoproteínas celulares tales como, por ejemplo, hemoglobina, citocromos, peroxidase, etc. Las secuencias de los siete genes responsables de la Porfiria en el homo sapiens están disponibles en el banco de datos NCBI con los siguientes números de identificación (GenelD):

- aminolevulinato delta dehidratasa (ALAD) – 210;
- 15 - hidroximetilbilano sintasa (HMBS) – 3145;
- uroporfirinógeno sintasa (UROS) – 7390;
- uroporfirinógeno decarboxilasa (UROD) - 7389;
- coproporfirinógeno oxidasa (CPOX) – 1371;
- protoporfirinógeno oxidasa (PPOX) – 5498; y
- 20 - ferroquelatasa (FECH) – 2235.

Se sabe que dichos siete genes son responsables en el Homo sapiens de siete formas diferentes de Porfiria, que, en función de los síntomas clínicos, pueden ser clasificadas como agudas o crónicas.

25 La Porfiria aguda se manifiesta a través de varios síntomas que ocurren de manera aguda esporádicamente, inducidos por factores exógenos tales como infecciones intercurrentes, dietas de bajas calorías, ingestión de productos alcohólicos y fármacos con acción porfirinogénica (barbitúricos, sulfonamidas, anestésicos y anticonceptivos por vía oral), o por factores endógenos tales como, por ejemplo, estrés físico o químico y fluctuaciones de hormonas esteroideas gonadales (estrógenas y progesteronas) durante los periodos premenstruales y de embarazo. Los ataques tienen inicio principalmente con síntomas neurológicos que pueden manifestarse tanto en el sistema nervioso central como en el vegetativo-periférico.

30 La Porfiria crónica, por el contrario, está caracterizada por fotosensibilidad cutánea relacionada con la acumulación de precursores fotorreactivos principalmente en la epidermis, donde vienen excitados con facilidad por la luz dando lugar a radicales libres de oxígeno con consiguiente daño del tejido y una fuerte respuesta inflamatoria. Generalmente la fotosensibilidad está restringida a las superficies expuestas directamente a la luz solar (dorso de las manos, cuello, piernas y tobillos en las mujeres), especialmente si son sometidas a repetidos traumatismos o si

35 están caracterizadas por una aumentada fragilidad de la piel. Sin embargo, a menudo los signos externos de daño cutáneo pueden no existir o pueden limitarse principalmente a edemas, eritemas y/o urticarias.

La tabla que sigue muestra la relación entre gen, tipo de Porfiria y síntomas clínicos:

Gen defectuoso	Porfiria	Síntomas clínicos
HMBS	Porfiria aguda intermitente (PAI)	Porfiria aguda
PPOX	Porfiria diversificada (PV)	Porfiria aguda
CPOX	Coproporfiria hereditaria (CPH)	Porfiria aguda
ALAD	Porfiria de deficiencia ALAD (PDA)	Porfiria aguda
UROD	Porfiria cutánea tardía (PCT)	Porfiria crónica
FECH	Protoporfiria eritropoiética (PPE)	Porfiria crónica
UROS	Porfiria eritropoiética congénita (PEC)	Porfiria crónica

Asimismo, se sabe que mutaciones especiales de los siete genes antes mencionados pueden implicar genes adyacentes o regiones intergénicas flanqueantes. Por lo tanto, han sido seleccionadas las correspondientes siete regiones cromosómicas incluyendo el gen implicado y los genes flanqueantes. En un primer momento, dichas regiones han sido seleccionadas de modo que las mismas incluyeran al menos un gen antes y un gen después del gen implicado, para luego extenderlas en base a la densidad génica del locus. En el ámbito de la presente invención, dichas regiones cromosómicas, listadas abajo, vienen incorporadas en la definición del mismo gen:

gen ALAD: NC\_000009:115174000-115213000 (complemento inverso)

gen HMBS: NC\_000011:118442000-118494000

gen UROS: NC\_000010:127443000-127533000 (complemento inverso)

gen UROD: NC\_000001:45225000-45320000

gen CPOX: NC\_000003: 99733000-99863000 (complemento inverso)

gen PPOX: NC\_000001:159334500-159451000

gen FECH: NC\_000018:53290000-53442000 (complemento inverso).

La preponderancia de Porfiria no puede ser establecida de manera definitiva; sobre todo porque a menudo falta el diagnóstico. En general, se cree que esas enfermedades tienen baja frecuencia, con preponderancia de las distintas formas variables de una raza a otra y también de una zona geográfica a otra. En Europa hay aproximadamente 75.000 pacientes que padecen Porfiria aguda, pero es posible encontrar una gran preponderancia en algunas zonas geográficas. Dos ejemplos son Escocia, donde un paciente cada 50.000 padece de una forma de Porfiria, con preponderancia de PAI (Porfiria aguda intermitente, en inglés Intermittent Acute Porphyria IAP) y PCT (Porfiria cutánea tardía, en inglés Porphyria Cutanea Tarda), y Sudáfrica, donde la forma preponderante es la PV (Porfiria Variegada, en inglés Variegated Porphyria), con una incidencia de uno cada 1.000 personas entre la población blanca.

En nuestros días, el diagnóstico de la Porfiria no es sencillo debido a la analogía del cuadro clínico con otras enfermedades de origen diferente. Asimismo, las enfermedades relacionadas con la Porfiria son clasificadas como raras y la falta de instrumentos de diagnóstico fáciles de usar a menudo es motivo de errores de diagnóstico.

En efecto, actualmente el diagnóstico se basa principalmente en la identificación de una elevada concentración de productos intermedios de la vía biosintética (porfirinas libres) en eritrocitos, plasma, orinas y heces, que no es siempre posible en todas las estructuras clínicas y que no es totalmente fiable debido a las fluctuaciones fisiológicas que sufren esos metabolitos.

Por otro lado, la determinación de la actividad enzimática eritrocitaria de las enzimas individuales puede ser llevada a cabo únicamente con algunas de ellas. Donde fuera posible, tal determinación no es totalmente fiable debido a la superposición entre el intervalo de valores normales y valores patológicos.

Actualmente la identificación de anomalías genéticas fundamento de las diferentes formas de Porfiria utiliza un protocolo de diagnóstico, compuesto por una reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (en inglés, PCR = Polymerase Chain Reaction) y una secuenciación automática, que principalmente describe mutaciones puntiformes o pequeñas supresiones – inserciones en las regiones codificantes y en las zonas de unión de los genes implicados. Esos tipos de defectos genéticos confirman el diagnóstico sólo en el 80% de los pacientes con síntomas clínicos y bioquímicos que pueden ser relacionados con la Porfiria. El restante 20%, que por lo tanto no viene diagnosticado, recientes evidencias sugieren, como causa de la Porfiria, la presencia de reorganizaciones cromosómicas (supresiones y duplicaciones). Dichos defectos no pueden ser identificados con el protocolo estándar de análisis.

Actualmente, la identificación de esas mutaciones particulares viene llevada a cabo a través de dos aproximaciones, las cuales son caras y demandan mucho tiempo.

La primera aproximación es el estudio sobre la “segregación familiar de polimorfismos conocidos”. Dicha aproximación requiere, obligatoriamente, los padres biológicos del paciente y, en caso de defecto de identificación, la presencia de polimorfismos con una frecuencia significativa en la población. Además, dicha aproximación no es bastante decisiva puesto que la presencia de dichos polimorfismos podría no ser suficiente para demostrar la carencia de segregación mendeliana, que es absolutamente necesaria para el diagnóstico de supresiones génicas. De todos modos, con dicha aproximación no es posible identificar las duplicaciones.

La segunda aproximación es la denominada “dosis génica”, un método de cuantificación relativa de amplicones correspondientes al gen implicado. Dicha aproximación utiliza varios pares de cebadores con un elevado riesgo de formación de dímeros. Asimismo, la diferente eficacia de asociación (annealing) de los distintos pares de cebadores perjudica la reacción de amplificación, puesto que las dianas más cortas son favorecidas termodinámicamente y su competición reduce la fiabilidad del ensayo de cuantificación relativa. Finalmente, no todas las regiones implicadas pueden ser amplificadas siempre al mismo tiempo, por ende podría ser necesario llevar a cabo más de una reacción de

amplificación. Las condiciones de RCP de los fragmentos individuales pueden ser efectivamente diferentes y la cantidad de amplicones en la RCP Múltiple, de todos modos, es reducida.

5 Groesz U et al. 1999 ofrece una relación sobre el primer análisis molecular de mutaciones genéticas HMBS en pacientes A1P clásicos de origen germánico. En particular, las mismas demostraron la heterogeneidad alélica de las mutaciones HMBS en pacientes AIP de origen germánico.

Sorprendentemente la parte Solicitante ha hallado que los problemas mencionados con anterioridad concernientes al diagnóstico de Porfiria pueden ser solucionados utilizando pares específicos de sondas en reacciones de ligamiento, presencia de al menos una enzima ligasa y subsiguiente amplificación RCP dependiente del ligamiento.

10 Las reacciones de amplificación RCP dependiente del ligamiento son conocidas en el sector como MLPA (del inglés Multiplex Ligation dependent Probe Amplification, en castellano amplificación múltiple de sondas dependientes de ligamiento), en particular cuando se realizan varias reacciones. Cada uno de los pares de sondas incluye una diferente secuencia nucleotídica complementaria a la secuencia antisentido humana (secuencia hibridizante) y, en los terminales de dicha secuencia una secuencia fija nucleotídica no humana (etiqueta o tag). La amplificación a través de la reacción RCP sucede únicamente si el par de sondas reconoce la secuencia diana de tipo nativo (type-wild) y las dos sondas vienen dispuestas una adyacente a la otra de modo de ser enlazadas. La presencia de la ligasa permite que el enlace de las sondas pueda crear una secuencia única a ser amplificada mediante RCP usando cebadores en acoplamiento con secuencias de etiquetas.

20 En función de la estructura de las sondas originales y del resultado de la amplificación de las reacciones RCP, un técnico experto está en condiciones de entender de que manera una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo un gen, puede presentar diferentes resultados con respecto a la secuencia de tipo nativo.

El resultado de la reacción RCP permite una cuantificación relativa de los genes implicados en la Porfiria, con una elevada sensibilidad y reproducibilidad.

La presente invención viene dada a conocer a través de la descripción detallada que sigue y más adelante gracias a las figuras anexas.

25 La figura 1 muestra esquemáticamente pares específicos de sondas según la presente invención (sonda L y sonda R, en la cual el terminal 5' es fosforilato) y cómo esos se hibridizan a la secuencia de ADN específica (ADN diana) (1); su ligamiento en presencia del ADN diana (2); productos amplificados que se derivan de la reacción RCP (3), y cómo la electroforesis capilar permite obtener resultados con relevancia diagnóstica (4) (para mayor información, ver el Ejemplo 1). Como puede observarse, las etiquetas presentes en las sondas, denominadas etiqueta F y etiqueta R, siguen estando en los productos amplificados que se derivan de la amplificación de la sonda enlazada.

30 La figura 2 presenta un ejemplo de picos obtenidos por electroforesis capilar de los productos de amplificación de la reacción RCP (productos amplificados) sobre ADN de una muestra de conformidad con el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Nótese que hay 27 picos y 3 de los 27 picos representan sondas de control interno utilizadas para normalizar los resultados de otros picos. Esos picos vienen denominados con el nombre de gen al cual le corresponden las sondas de control interno.

35 La figura 3 muestra los resultados del método de diagnóstico para detectar el estado del gen FECH, esquemáticamente y después de la normalización con tres controles internos, de varios pacientes (ver el Ejemplo 1). CTRL 1, 2 y 3 representan algunos sujetos sanos sobre los cuales han sido calibrados los demás resultados (control externo). Nótese que los pacientes 55 y 400 no exhiben anomalías con respecto a los testigos (controles), mientras que los pacientes 399, 744 y 909 presentan anomalías en el gen FECH.

40 La figura 4 muestra los resultados del método de diagnóstico para detectar el estado del gen HMBS, esquemáticamente y después de la normalización con tres controles internos de varios pacientes (ver el Ejemplo 2). CTRL 1, 2 y 3 representan algunos sujetos sanos sobre los cuales han sido calibrados los demás resultados (control externo). Los pacientes 543 y 827 no presentan anomalías con respecto a los testigos (controles), mientras que los pacientes 496, 526 y 642 presentan anomalías en el gen HMBS.

45 En un primer aspecto la presente invención se refiere a una asociación de sondas que comprende un grupo de sondas que posee en correspondencia de un terminal de la secuencia una etiqueta y en correspondencia del otro terminal una secuencia que hibridiza al menos una parte de la secuencia del gen HMBS, dichas secuencias hibridizantes siendo SEC ID NOs: 25-47 y un grupo de sondas que posee en correspondencia de un terminal de la secuencia una etiqueta y en correspondencia del otro terminal una secuencia que hibridiza al menos una parte de la secuencia del gen HMBS, dichas secuencias hibridizantes siendo SEC ID NOs: 166-188. Preferentemente, la asociación de sondas tiene como etiqueta SEC ID NO: 283 o SEC ID NO: 284. Preferiblemente, la etiqueta está en el terminal 5' mientras que la secuencia hibridizante está en el terminal 3'. Más preferiblemente, la etiqueta está en el terminal 5' de SEC ID NOs: 25-47.

50 De conformidad con una realización preferida, la asociación de sondas tiene la SEC ID NO: 283 como etiqueta en el terminal 5' de SEC ID NOs: 25-47. Preferiblemente, la etiqueta está en el terminal 3' mientras que la secuencia hibridizante

está en el terminal 5'. Más preferiblemente, la etiqueta está en el terminal 3' de SEC ID NOs: 166-188. En particular, la etiqueta en correspondencia del terminal 3' de SEC ID NOs: 166-188 es SEC ID NO: 284.

Otro aspecto de la invención es un método para determinar la presencia de Porfiria Intermitente Aguda en una muestra de tejido biológico que incluye las siguientes etapas operativas:

- 5 (i) extracción de ácido nucleico de una muestra;
- (ii) introducción de la asociación de sondas de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8 en el ácido nucleico extraído según la etapa operativa (i), y reacción en presencia de al menos una enzima ligasa en al menos una reacción de ligamiento;
- 10 (iii) ejecución de al menos una reacción de amplificación en las sondas obtenidas a partir de la etapa operativa (ii); y
- (iv) determinación de la presencia y de la cantidad de secuencias nucleotídicas que se derivan del ligamiento y la amplificación.

15 Preferentemente, el par de sondas para control interno viene introducido en la etapa (ii), dicho par de sondas preferiblemente teniendo las secuencias hibridizantes: SEC ID Nos: 285-286 y/o 287-288 y/o 289-290, y la misma etiqueta de la asociación de sondas presentes en la etapa operativa (ii). Más preferiblemente la información dada por el par de sondas teniendo las secuencias hibridizantes SEC ID NOs: 285-286 y/o 287-288 y/o 289-290 viene utilizada para normalizar los datos determinados según la etapa operativa (iv).

Un aspecto adicional de la invención se refiere al uso de la asociación de sondas en una reacción de ligamiento y una reacción RCP para diagnosticar la presencia de anomalías porfíricas, preferiblemente para diagnosticar anomalías del gen HMBS.

20 Un aspecto adicional de la invención se refiere a un kit para diagnosticar Porfiria Intermitente aguda que incluye al menos un compartimiento que contiene en su interior los reactivos para llevar a cabo al menos un ligamiento y al menos una reacción RCP, y al menos un compartimiento que contiene la asociación de sondas según se ha descrito arriba.

El ácido nucleico extraído en la etapa operativa (i) preferentemente es ADN.

25 Un técnico experto puede seleccionar un método adecuado entre los métodos conocidos en el sector para extraer ácido nucleico de la muestra. Preferentemente, es posible utilizar un kit disponible en el comercio, tal como, por ejemplo, Puregene de Qiagen.

En el método según el presente descubrimiento, la muestra utilizada en la etapa operativa (i) puede ser tomada de cualquier tipo de tejido biológico humano. Preferentemente, el tejido biológico humano es sangre periférica.

30 Cada uno de los pares de sondas mencionados en la etapa operativa (ii) tiene una secuencia hibridizante especialmente para una secuencia nucleotídica diana y una etiqueta F o una etiqueta R en los terminales de dicha sonda (en los terminales 5' o 3', respectivamente; ver la figura 1).

Dichas secuencias hibridizantes vienen elegidas de manera que los pares de sondas se ubiquen adyacentes entre sí en una parte de las secuencias de los siete genes de la vía biosintética del hemo de modo de ser enlazados mediante una ligasa, como puede verse en la figura 1.

35 Los pares pueden ser diseñados por un técnico experto seleccionando un método apropiado entre los métodos conocidos en el sector para diseñar secuencias nucleotídicas específicas. Preferentemente, la sonda del par en la posición 3' es fosforilata. Aún más preferiblemente, las sondas según el presente descubrimiento presentan las siguientes propiedades:

- la temperatura de fusión de la secuencia hibridizante es mayor o igual que 67,5°C, y
- 40 - el contenido de pares GC (par de bases guanina-citosina) de la secuencia hibridizante es del 30 al 63%, y
- deltaG (termodinámica del plegado) de toda la sonda es mayor o igual que cero a una temperatura de 60°C con una concentración de Na<sup>+</sup> de 0,35 M, y
- al menos una C o G adyacente a la etiqueta (5' y 3' respectivamente), y
- màx. 4 bases G y/o C adyacentes a la etiqueta.

45 Preferentemente, las secuencias hibridizantes vienen elegidas entre las secuencias que comprenden SEC ID NOs 1-282.

En el ámbito de la presente invención, las secuencias vienen diseñadas de conformidad con las Normas Internacionales WIPO ST.25 y su descripción ha sido desarrollada con el software Patent-In 3.5. La descripción de las secuencias mencionadas en la presente invención está adjuntada al presente documento.

50 Preferentemente, las sondas son ADN.

Un técnico experto puede elegir apropiadamente entre reactivos, métodos, protocolos y etiquetas conocidos en el sector para realizar e inferir datos a partir de una reacción de amplificación conocida en el sector como MLPA y como se ha expuesto arriba.

Preferentemente, las sondas de conformidad con el descubrimiento pueden ser subdivididas en dos grupos:

- 5 1. Sondas L, donde la sonda tiene una etiqueta en el terminal 5' de la secuencia nucleotídica y en el otro terminal una secuencia nucleotídica hibridizante según se ha descrito con anterioridad y como se puede apreciar en la figura 1.

10 Preferentemente, la secuencia hibridizante de la sonda L posee un máximo de dos nucleótidos GC en el terminal 3'. Aún más preferentemente, la secuencia hibridizante viene elegida entre las SEC ID NOs de 1 a 141. Preferentemente, las sondas L se componen de una secuencia seleccionada entre las SEC ID NOs de 1 a 141 y una etiqueta F en el terminal 5' de dicha secuencia. Preferentemente, la etiqueta F para sondas L es SEC ID NO 283.

- 15 2. Sondas R, donde la sonda tiene una etiqueta R en el terminal 3' de la secuencia nucleotídica y en el otro terminal una secuencia nucleotídica hibridizante según se ha descrito con anterioridad, fosforilata en el terminal 5' y en la posición 3' con respecto a la sonda L y de modo de ser enlazada a una ligasa, como puede apreciarse en la figura 1. Preferentemente, la secuencia hibridizante en la posición 3' con respecto a la sonda L de modo de ser enlazadas mediante una ligasa viene elegida entre SEC ID NOs de 142 a 282. Preferentemente, las sondas R se componen de una secuencia seleccionada entre SEC ID NOs de 142 a 282 y una etiqueta R en el terminal 3' de dicha secuencia. Preferentemente, la etiqueta para sondas R es SEC ID NO 284.

25 Preferentemente, las secuencias de las sondas L y R se componen de SEC ID NOs 1-282 y etiquetas SEC ID NOs 283-284 como se ha indicado arriba, porque de este modo es posible minimizar la longitud total de las sondas L y R, respectivamente. Una longitud minimizada de las sondas permite su síntesis química, en lugar de usar métodos más caros, sin menoscabar la idoneidad de dichas sondas en el método según la presente invención.

30 En la etapa operativa (ii) del método según este descubrimiento hay al menos un par de sondas específicas. Dicho al menos un par específico es un par de al menos una sonda L y al menos una sonda R como se ha dicho con anterioridad. Preferentemente, la sonda L presenta la secuencia hibridizante SEC ID NO n en el terminal 3' de la secuencia nucleotídica, donde n es un número entero comprendido entre 1 y 141, y la sonda R presenta la secuencia hibridizante SEC ID NO m en el terminal 5' de la secuencia nucleotídica, donde m es igual a n+141.

35 En la etapa operativa (iii), para llevar a cabo la por lo menos una amplificación, un técnico experto puede elegir apropiadamente entre todos los protocolos y los métodos conocidos en el sector. Preferentemente, al menos una amplificación es al menos una reacción RCP, más preferentemente de conformidad con un protocolo MLPA. Preferentemente, en la por lo menos una reacción RCP, los cebadores F y R vienen introducidos en acoplamiento con todas las etiquetas F y R, respectivamente, presentes en las sondas agregadas en la etapa operativa (ii). En particular, el cebador F es el cebador directo (es decir, correspondiente a la etiqueta F), mientras que el cebador R es el cebador inverso (por lo tanto, complementario a la etiqueta R).

40 La etapa operativa (iv) comprende la determinación de la presencia y la cantidad relativa de ácido nucleico resultante del ligamiento y amplificación obtenidas en las etapas operativas (ii) y (iii). La presencia puede ser determinada con métodos conocidos en el sector para dividir secuencias de ácido nucleico en función de su longitud, tal como, por ejemplo, mediante un protocolo de electroforesis capilar. Un técnico experto, conociendo la longitud del par de sondas iniciales y su posición hibridizante en el ADN, está en condiciones de calcular la longitud del producto amplificado resultante. Dicho técnico experto, luego, puede controlar si el producto amplificado resulta ser de esa longitud o no. La reducción o el aumento del producto amplificado resultante indica que se tiene una anomalía en el ácido nucleico extraído en la etapa operativa (i) en la posición en la cual se hibridiza una de las sondas responsable de dicho producto amplificado en ambos alelos.

45 En una ejecución preferente del método según la presente invención según se ha descrito arriba, el cebador F o el cebador R viene marcado adecuadamente en un terminal. Preferentemente, el cebador marcado es el cebador F marcado en el terminal 5'. El cebador marcado sigue siendo adecuado para el método según la presente invención y permite, en la etapa operativa (iv), reconocer la secuencia por medio del marcador. El marcador puede ser seleccionado apropiadamente entre marcadores conocidos en el sector, tales como por ejemplo átomos radiactivos, fluorocromos o anticuerpos adicionalmente marcados, también en función del método de determinación empleado en la etapa operativa (iv), de la presencia y de la cantidad de secuencias de ácidos nucleicos que se derivan del ligamiento y de la amplificación. En una ejecución preferente, el marcador enlazado al cebador es un fluorocromo, tal como, por ejemplo, FAM (6-carboxifluorosceína) o HEX. En dicha ejecución, la presencia y la cantidad de los productos amplificados resultantes de la etapa operativa (iii) pueden ser medidas a través de electroforesis capilar con un secuenciador disponible en el mercado, tal como, por ejemplo, Abi Prism 310. Los picos resultantes se refieren a la presencia y a la cantidad de los productos amplificados resultantes.

Los ejemplos 1 y 2 describen en detalles ejecuciones ejemplificadoras y, por ende, para nada restrictivas del método según la presente invención.

La cantidad del producto amplificado resultante puede ser la misma, aproximadamente la mitad o aproximadamente el doble con respecto a los demás productos amplificados resultantes de la misma reacción y/o con respecto a un producto amplificado resultante del uso de las mismas sondas en el ADN de tipo nativo (control externo). Si la cantidad del producto amplificado es aproximadamente la mitad, entonces debe suponerse que hay una anomalía en una copia del gen, en particular una anomalía en uno de los alelos y no en el otro. Si la cantidad de producto amplificado es aproximadamente el doble, entonces debe suponerse que hay una anomalía de genotipo caracterizada por una mutación por duplicación de ambas copias del gen o por una mutación por triplicación de una sola copia del gen.

En una ejecución preferente del método según la presente invención, en la etapa operativa (ii) se introduce al menos un par de sondas para control interno, preferentemente junto con dicho al menos un par de sondas. Los pares de sondas para control interno vienen preparados de manera similar al par de sondas L y R de conformidad con la presente invención según se ha descrito con anterioridad, la única diferencia siendo la que dichos pares para control interno tienen secuencias hibridizantes para porciones de genes que se conocen como no implicadas en enfermedades genéticas humanas. Preferentemente, las secuencias hibridizantes en las sondas para control interno vienen seleccionadas entre los pares SEC ID NOs 285-286, 287-288 y 289-290. La utilización de dichas sondas para control interno es ventajosa puesto que permite determinar si la reacción RCP ocurrió correctamente y/o permite normalizar la cantidad de un producto amplificado, que representa la cantidad de diploides (2n). El par SEC ID NOs 285-286 corresponde a una parte del gen ILKAP, que codifica para una fosfatasa conocida por tener una función en la regulación de las señales intra e/o intercelulares. El par SEC ID NOs 287-288 corresponde a una parte del gen DACH, que codifica para una proteína conocida por jugar un determinado papel en el desarrollo de varios organismos. El par SEC ID NOs 289-290 corresponde a una parte del gen DEFB129, que codifica para una proteína conocida por jugar un papel determinado en el sistema inmunitario. Es aún más ventajoso usar los tres pares de control puesto que los tres productos amplificados son de diferentes longitudes y permiten normalizar productos amplificados de diferentes longitudes. Los productos amplificados resultantes de pares de sondas que contienen las secuencias hibridizantes SEC ID NOs 285-286, 287-288 y 289-290 tienen una longitud de 132 nucleótidos, 118 nucleótidos y 80 nucleótidos, respectivamente.

En una ejecución preferente del método según el presente descubrimiento, dicha al menos una reacción de ligamiento y amplificación de las etapas operativas (ii) y (iii) viene seleccionada entre siete posibles reacciones, donde en cada reacción al menos un par específico de sondas reacciona con uno de los siete genes de la vía biosintética del hemo responsable de la Porfiria.

Preferentemente, los pares específicos de sondas en cada una de las siete posibles reacciones pueden ser seleccionados a partir de los siguientes grupos para las reacciones de ligamiento-RCP:

- reacción de ligamiento-RCP 1 = par de sondas en las cuales una sonda tiene la secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 1 y 24, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEC ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen FECH.

- reacción de ligamiento-RCP 2 = par de sondas en las cuales una sonda tiene una secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 25 y 47, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEC ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen HMBS.

- reacción de ligamiento-RCP 3 = par de sondas en las cuales una sonda tiene una secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 48 y 71, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEC ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen PPOX.

- reacción de ligamiento-RCP 4 = par de sondas en las cuales una sonda tiene una secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 72 y 87, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEC ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen CPOX.

- reacción de ligamiento-RCP 5 = par de sondas en las cuales una sonda tiene una secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 88 y 105, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEQ ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen UROD.

- reacción de ligamiento-RCP 6 = par de sondas en las cuales una sonda tiene una secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 106 y 125, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEC ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen UROS.

- reacción de ligamiento-RCP 7 = par de sondas en las cuales una sonda tiene una secuencia hibridizante ID NO n, donde n es un número entero comprendido entre 126 y 141, y la otra sonda tiene la secuencia hibridizante SEC ID NO m, donde m es igual a n+141. La ausencia o presencia de cantidades que son la mitad de los productos amplificados que se derivan de dichas sondas corresponde a una anomalía resultante para el gen ALAD.

- 5 Por consiguiente, la elección de cuáles reacciones, y en cuál secuencia, se tienen que realizar para obtener un diagnóstico preciso se basa substancialmente en los resultados dados por las pruebas bioquímicas y/o en el estudio clínico llevados a cabo con anterioridad sobre el paciente.

En una ejecución aún más preferente, las siete posibles reacciones de ligamiento-RCP, como se ha listado arriba, incluyen asociaciones de sondas que comprenden todas las secuencias hibridizantes SEC ID NOs 1-282 divididas en siete asociaciones separadas para las siete reacciones de ligamiento-RCP siguiendo la precedente distribución. Por lo tanto, la asociación para la reacción de ligamiento-RCP 1 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 1 a 24 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 142 a 165, la asociación para la reacción de ligamiento-RCP 2 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 25 a 47 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 166 a 188, la asociación para la reacción de ligamiento-RCP 3 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 48 a 71 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 189 a 212, la asociación para la reacción de ligamiento-RCP 4 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 72 a 87 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 213 a 228, la asociación para la reacción de ligamiento-RCP 5 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 88 a 105 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 229 a 246, la asociación para la reacción de ligamiento-RCP 6 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 106 a 125 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 247 a 266, y la asociación para la reacción de ligamiento-RCP 7 comprende un grupo de sondas L que tiene las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 126 a 141 y un grupo de sondas R que tienen las secuencias hibridizantes SEC ID NOs de 267 a 282.

Más preferentemente, las secuencias nucleotídicas de las sondas se componen de una secuencia de ácido nucleico elegida entre secuencias SEC ID NOs 1-282 como se acaba de describir, y una etiqueta SEC ID NOs 283 o 284 si las sondas son L o R, respectivamente.

La ventaja de usar dichas asociaciones de sondas es que cada secuencia resultante de la amplificación varía en longitud total de 80-132 nucleótidos y difiere en longitud con respecto a otras secuencias de la misma asociación (es decir, para la misma reacción RCP) de al menos 2 nucleótidos. Ventajosamente, esto permite usar hasta 27 pares de sondas con el mismo marcador en una única reacción de ligamiento-RCP y estar en condiciones de discriminar entre los resultados de los 27 pares de sondas (que corresponden a un área específica de un gen).

A partir de los resultados obtenidos en la etapa operativa (iv) un técnico experto puede inferir, con una precisión de 80-132 nucleótidos, la ubicación de una anomalía o una diferencia alélica en uno o varios de los siete genes implicados en la etiología de la Porfiria.

En el caso que se deban efectuar varias reacciones de ligamiento-RCP, las mismas pueden ser llevadas a cabo en probetas separadas, simultánea o secuencialmente.

Para reducir las reacciones de ligamiento-RCP, antes de comenzar con el método descrito con anterioridad conviene determinar si el paciente padece de anomalías génicas por Porfiria aguda o crónica haciendo uso de los métodos conocidos en el sector. Si el paciente exhibe anomalías génicas por Porfiria aguda, entonces se utilizan las asociaciones para las reacciones de ligamiento-RCP 2, 3, 4 y 7; mientras que si el paciente exhibe anomalías génicas por Porfiria crónica, entonces se utilizan las asociaciones para las reacciones de ligamiento-RCP 1, 5 y 6. En base al análisis de las manifestaciones clínicas y bioquímicas del tipo de Porfiria que el paciente padece, en algunos casos el método puede ser restringido a la utilización de únicamente una asociación, relacionada con el tipo de enfermedad de Porfiria a diagnosticar.

En otra ejecución del método según la presente invención, se utilizan dos o más asociaciones de sondas para las reacciones de ligamiento-RCP, seleccionadas de 1 a 7 como se ha descrito arriba, en una única reacción de ligamiento-RCP usando diferentes etiquetas F y R en las sondas pertenecientes a las dos o más asociaciones de sondas. Las diferentes etiquetas empleadas son específicas para una de las dos o más asociaciones y diferentes marcadores vienen enlazados al grupo de cebadores presentes en la reacción RCP de la etapa operativa (iii). Utilizando marcadores específicos asociados a cebadores en acoplamiento a las diferentes etiquetas F y R, el mismo puede ser discriminado entre las diferentes asociaciones, o sondas, obteniendo de esta manera más resultados de una sola reacción de ligamiento-RCP en las etapas operativas (ii) y (iii).

Otro objetivo del presente descubrimiento incluye sondas que tienen una etiqueta en un terminal de las secuencias y en el otro terminal una secuencia que se hibridiza a por lo menos parte de las secuencias de los siete genes de la vía biosintética del hemo implicada en la etiología de la Porfiria. Preferentemente, las sondas están provistas de las propiedades en sus secuencias como se ha mencionado arriba. Preferiblemente, la secuencia hibridizante viene

elegida entre SEC ID NOs 1-282. Aún más preferiblemente, la secuencia de etiquetas viene elegida entre SEC ID NOs 283 y 284.

5 Otro objetivo del presente descubrimiento incluye asociaciones de sondas que tienen secuencias nucleotídicas según se ha dado a conocer con anterioridad.

Para las ejecuciones preferentes de dichas sondas, ver las reivindicaciones anexas.

10 Otro objetivo del presente descubrimiento es un kit de diagnóstico que comprende al menos un compartimiento que contiene en su interior los reactivos para efectuar el por lo menos un ligamiento de la etapa operativa (ii) y la por lo menos una amplificación de la etapa operativa (iii), y al menos un compartimiento que contiene en su interior las sondas a usar para al menos una de las siete asociaciones para las reacciones de ligamiento-RCP 1-7, como ya se ha descrito con anterioridad. Preferiblemente hay siete compartimientos que contienen las sondas, cada uno de ellos incluyendo una de las siete asociaciones para reacciones de ligamiento-RCP 1-7, como se ha descrito con anterioridad. Preferiblemente, el kit de diagnóstico comprende al menos un par de sondas para control interno, preferentemente sondas que incluyen SEC ID NOs 285-290, como se ha descrito con anterioridad.

### 15 Ejemplo 1 – Diagnóstico de la presencia de anomalías relacionadas con la Porfiria en el gen FECH

20 Se llevó a cabo un análisis sobre 30 sujetos, de los cuales 15 sanos y 15 con síntomas clínicos que pueden ser relacionados con la Porfiria. De cada persona se ha tomado una muestra de 7 ml de sangre periférica en EDTA. La muestra fue centrifugada a 3.000 RPM por 10 minutos a 4°C. Después de quitar el plasma se ha agregado una solución fisiológica, después de lo cual se han mezclado todos los componentes. Posteriormente se ha centrifugado a 3.000 RPM por un lapso de tiempo de 10 minutos a 4°C y después de extraer la solución fisiológica, se ha tomado 150 µl de placa leucocitaria (linfocitos). Se ha extraído ADN con el kit Puregene – Genra (QUIAGEN) agregando a la muestra 450 µl de RBC Lysis Solution 1 y agitando por 10 minutos a temperatura ambiente (RT). Luego fue centrifugado a 14.000 RPM por un lapso de tiempo de 1 minuto a temperatura ambiente, se quitó el sobrenadante y volvió a suspender la pílora. Se agregaron 450 µl de Cell Lysis Solution 2 y se volvió a suspender la pílora. Se agregaron 150 µl de Protein Precipitation Solution 3 y se movió en remolino por un lapso de tiempo de 25 segundos. Después de la centrifugación a 14.000 RPM por 3 minutos a temperatura ambiente se recuperó el sobrenadante. Se agregó isopropanol al 100% v/v. Se centrifugó a 14.000 RPM por un lapso de tiempo de 1 minuto y después de quitar el sobrenadante, se agregaron 300 µl de etanol al 70%. Se centrifugó a 14.000 RPM por un lapso de tiempo de 1 minuto a temperatura ambiente y después de quitar el sobrenadante y secar la pílora con Speed Vacuum por un lapso de tiempo de 2 minutos, se volvió a suspender la pílora en 100 µl de TE (Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM). Luego, se diluyó el ADN a una concentración final de 20 ng/µl en TE.

Las secuencias de las sondas y de los cebadores fueron obtenidas mediante síntesis química.

35 Se preparó la mezcla de pares de sondas para el gen FECH uniendo 2,4 µl de cada sonda (sondas L: SEC ID NO 283 + SEC ID NOs 1-24 y sondas R: SEC ID NOs 142-165 + SEC ID NO 284) con una concentración de 1 pmol/µl. (FECH Probe Mix). También fueron agregados a la mezcla los 3 pares de sondas de los genes de control (sondas L: SEC ID NO 283 + SEC ID NOs 285, 287, 289 y sondas R: SEC ID NOs 286, 288, 290 + SEC ID NO 284) en un volumen total final de 600 µl de TE.

Los cebadores F (SEC ID NO 283 marcada con fluorocromo FAM en el terminal 5') y R (SEC ID NO 291) fueron diluidos a una concentración de 20 pmol/µl en TE y se ha preparado una alícuota concentrada de 10 mM de dNTPs.

40 Para el experimento se utilizó el kit MLPA reagents 100 reactions (MRC-Holland-RESNOVA) excepto para SALSA PCR primer mix.

45 Se desnaturalizaron 100 ng de ADN a 98°C por 5 minutos; se agregaron 2 µl de una mezcla que comprende 1,5 µl de FECH probe mix y 1,5 µl de SALSA MLPA buffer a 25°C. El todo fue incubado por un lapso de tiempo de 1 minuto a 95°C y por al menos 16 horas a 60°C (hibridación). Se preparó una mezcla con 3 µl de buffer A, 3 µl de buffer B de ligamiento, 25 µl de agua estéril y 1 µl de ligasa y se agregó al ADN a 54°C. Luego fue incubado a 54°C por un lapso de tiempo de 15 minutos, a 98°C por un lapso de 5 minutos y fue almacenado a 4°C (ligamiento). Fueron alícuotadas en probetas estériles 15 µl de mezcla 1 de RCP, con 13 µl de agua y 2 µl de SALSA PCR buffer. Se agregaron 5 µl de producto ligado y con las probetas a 60°C se agregaron 5µl de mezcla de 2 de RCP, con 2,75 µl de agua, 1 µl de Salsa Enzyme dilution buffer, 0,5 µl de dNTPs, 0,25 µl de SEC ID NO 283 y 0,25 µL de SEC ID NO 291 y 0,25 µl de SALSA Polymerase. Luego se dio inicio al protocolo RCP de 35 ciclos: 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 60°C; 60 segundos a 72°C con incubación final de 20 minutos a 72°C.

55 Se agregaron 0,75 µl de producto amplificado a 13,5 µl de formamida desionizada, 0,75µl de agua y 0,5 µl de (500Rox) tamaño estándar, y los fragmentos fueron analizados con un secuenciador Abi Prism 310 usando el capilar de 47 cm y el polímero POP-6. Se establecieron los siguientes parámetros de ejecución: tiempo de inyección 30 segundos, tensión de inyección 3,0 kV, temperatura de ejercicio 60°C y tiempo de ejecución 30 minutos. Los picos resultantes del análisis de los fragmentos, antes de su normalización, se exhiben en la figura II e indican el resultado obtenido.

5 Por cada muestra se seleccionaron los picos correspondientes a los 27 pares de sondas ligadas y amplificadas (24 picos que representan sondas para el gen FECH y 3 para controles internos) y se exportaron a un fichero Excel los valores de sus alturas. Después de ordenar los valores de altura de los picos correspondientes al gen implicado de conformidad con su posición en el cromosoma, dicho valor fue dividido por la suma de los valores de altura de los picos de control (normalización).

10 Por cada muestra los valores de los picos normalizados fueron divididos por el valor medio obtenido a partir de los valores de altura de los correspondientes valores normalizados en sujetos normales (calibración). Para visualizar los resultados se creó un gráfico para cada muestra. Los picos de 0,8 a 1,2 se hallan en copia doble en el genoma, mientras que si son de aproximadamente 0,4 – 0,5 son de copia simple, de aproximadamente 1,5 – 1,6 son de copia triple. En la figura III se muestran algunos ejemplos; donde los gráficos CRTL 1-3 representan los resultados obtenidos a partir de sujetos normales y necesarios para la calibración.

15 Los resultados ponen de manifiesto que de los 15 pacientes analizados 11 son normales por lo que se refiere al gen FECH, mientras que 4 de ellos presentan anomalías en el gen FECH y regiones circunstantes. Como puede verse en la figura 3, los pacientes 399, 844 y 909 presentan 3 supresiones diferentes en el gen FECH.

Dicho resultado fue confirmado con otras técnicas moleculares, tales como, por ejemplo, RCP larga (Long-PCR) y secuenciación de los puntos de rotura de supresión.

#### Ejemplo 2 – Diagnóstico de la presencia de anomalías relacionadas con la Porfiria en el gen HMBS

20 Se siguió el mismo protocolo que en el Ejemplo 1 usando 2,4 µl de cada sonda (sondas L: SEC ID NO 283 + SEC ID NOs 25-47 y sondas R: SEC ID NOs 166-188 + SEC ID NO 284) con una concentración de 1 pmol/µl (HMBS Probe Mix). Se agregó también la sonda HMBS con los 3 pares de sondas de control interno (sondas L: SEC ID NO 283 + SEC ID NOs 285, 287, 289 y sondas R: SEC ID NOs 286, 288, 290 + SEC ID NO 284) en un volumen total final de 600 µl de TE. Se llevó a cabo un análisis sobre muestras tomadas de 30 sujetos, de los cuales 16 sanos y 14 con síntomas clínicos que pueden ser relacionados con la Porfiria. Tres pacientes (los pacientes 496, 526 y 642) presentaban una anomalía en el gen HMBS. La figura 4 exhibe algunos ejemplos de los resultados.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> FONDAZIONE IRCCS "OSPEDALE MAGGIORE POLICLINO: MANGIAGALLI E REGINA ELENA"

5 <120> Sondas para su utilización en el diagnóstico de porfiria y para la cuantificación alélica de genes relativos a la porfiria mediante reacciones de ligación y amplificación

<130> 21.00107.12.EP10WD

<160> 291

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 <211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda de detección

15 <400> 1

ctgaagacac acggtagta aaaggcagaa cc32

<210> 2

<211> 46

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Sonda de detección

<400> 2

caaatgaaga ggaatcccg ggaaaagaaa gaggtgagtc ctgacc46

25 <210> 3

<211> 25

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Sonda de detección

<400> 3

ctttaaaaa atgcaggctc caggt25

<210> 4

<211> 44

35 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sonda de detección  
<400> 4  
ctggaacga ttctaacgt ggattctgaa taggtatcac atcc44  
<210> 5  
5 <211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
10 <400> 5  
ccagtctga gccccctagt gtaat25  
<210> 6  
<211> 28  
<212> ADN  
15 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 6  
cctccaagaa atgcactgc caggctgg28  
20 <210> 7  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
25 <223> Sonda de detección  
<400> 7  
cgggtcatat ttataagta ctttgaagt aatcctcatc tcc43  
<210> 8  
<211> 26  
30 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 8  
35 ccatggaggt ggaagtcagg tgcagc26  
<210> 9

<211> 38  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
5 <223> Sonda de detección  
<400> 9  
ctgactaaa gctttcactt cacattctgg aatagagg38  
<210> 10  
<211> 36  
10 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 10  
15 caccctggaa gaaaataaga agtgtgacaa atcaac36  
<210> 11  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
20 <220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 11  
ctggcaccat tcatcgccaa acg23  
<210> 12  
25 <211> 41  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
30 <400> 12  
cattgaacag ctgctctgag ggtacgtaag ctaggccagt g41  
<210> 13  
<211> 27  
<212> ADN  
35 <213> Artificial  
<220>

<223> Sonda de detección  
<400> 13  
ctagaaaggg ctattgcttt cacacag27  
<210> 14  
5 <211> 44  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
10 <400> 14  
cctttacgag tctgttttt atttcacca taateaaaat gcat44  
<210> 15  
<211> 30  
<212> ADN  
15 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 15  
ctttatcctc ctttctgtt actcactcag30  
20 <210> 16  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
25 <223> Sonda de detección  
<400> 16  
ctcaggaggt aagcgccact gtccaaaaag tcatg35  
<210> 17  
<211> 38  
30 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 17  
35 ctcaaacaga cgaatctatc aaagggcttt gtgagagg38  
<210> 18

<211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Sonda de detección  
 <400> 18  
 cattgttctc taaggatatct acagtgttac aatcg35  
 <210> 19  
 <211> 27  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 19  
 15 ctgtgtcca agcagctgac cctgagc27  
 <210> 20  
 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 20  
 cttggataa tgataaaggt ctcttgtgg cgggtcgaa ttcagg47  
 <210> 21  
 25 <211> 52  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 30 <400> 21  
 caaatgtta atcagatctg ggggtgtata ctctgccta acgcaatctg ag52  
 <210> 22  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
<400> 22  
cactattgtc tccatcgcaa cgggagatat agagacaggt aa42  
<210> 23  
5 <211> 49  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
10 <400> 23  
gacataaaat ggcataaaca aatatacctt gggttcata agacaagtc49  
<210> 24  
<211> 24  
<212> ADN  
15 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 24  
cgttgagggt cagtgaacac cagg24  
20 <210> 25  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
25 <223> Sonda de detección  
<400> 25  
gccacacctg ctctggatc cgctgcttc aagtccttt gc42  
<210> 26  
<211> 40  
30 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 26  
35 ctgtgcaaca agttcatagc ctatagcacc gtcttgagg40  
<210> 27

<211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Sonda de detección  
 <400> 27  
 ctggctgaca tgcccagggc tccactctca tct33  
 <210> 28  
 <211> 26  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 28  
 15 caccacaca cagcctactt tccaag26  
 <210> 29  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 29  
 ctgaggaggg cagaaggtae tgaggaaggt taaagg36  
 <210> 30  
 25 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 30 <400> 30  
 caggaagaaa acagcccaaa gatgag26  
 <210> 31  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <400> 31  
 cagcttgctc gcatacagac ggacagtgtg gtggcaaca39  
 <210> 32  
 5 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 10 <400> 32  
 ctctctctc agttgctatg tccaccacag g31  
 <210> 33  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>.  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 33  
 ctgtccggca gattggagag aaaagcctgt ttac34  
 20 <210> 34  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <400> 34  
 ccatctctat agagtgacc tgggtgtca ctcctgaag g41  
 <210> 35  
 <211> 38  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 35  
 35 gggaaaaccc tcatgatgct gttgtcttc acccaaaa38  
 <210> 36

<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
5 <223> Sonda de detección  
<400> 36  
gtaactctc tctgggcagt gtggtgg27  
<210> 37  
<211> 23  
10 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 37  
15 ccgacactgt ggccttagc aac23  
<210> 38  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
20 <220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 38  
cagatcctgc accctgagga atg23  
<210> 39  
25 <211> 38  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
30 <400> 39  
catcttgat ctggtgggtg tgctgcacga tcccgaga38  
<210> 40  
<211> 28  
<212> ADN  
35 <213> Artificial  
<220>

<223> Sonda de detección  
<400> 40  
ggctgcagtg tgccagtagc cgtgcata28  
<210> 41  
5 <211> 39  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<223> Sonda de detección  
<400> 41  
10 ctggaggagt ctggagtcta gacggctcag atagcatac39  
<210> 42  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Artificial  
15 <220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 42  
catgaagatg gccctgagga tgaccacag ttgtagg38  
<210> 43  
20 <211> 30  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
25 <400> 43  
caatgatcaa gggactcaga catcatagaa30  
<210> 44  
<211> 52  
<212> ADN  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 44  
ctctaccagg tgaagacaa tgatggaagc agaatgact agtgactggc ca52  
35 <210> 45  
<211> 43

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 5 <400> 45  
 cctctctaag gcaacctatg ttctgccccg ctgcacccgc cta43  
 <210> 46  
 <211> 53  
 <212> ADN  
 10 <213> .Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 46  
 ctcttcgct tcaagtctt cgggagaac tggcagcggg cttgggtgcg agc53  
 15 <210> 47  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Sonda de detección  
 <400> 47  
 ctttctatt tatatgtg gcttaggacc ctccgtgaac agatgatag49  
 <210> 48  
 <211> 50  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 48  
 30 cctattgga tggcacctc cgccaaaac ctffcactct catccact50  
 <210> 49  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<400> 49  
cctttgctg aagctgctgt gtcagtgct caatgatct ctgtatctag50  
<210> 50  
<211> 39  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 50  
10 ccacaggctc ccccttctcg ctagtattcc agaccagg39  
<210> 51  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Artificial  
15 <220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 51  
ctgaggcatt tgacttcatt gcacgggacc ctgcagagac gctacacc48  
<210> 52  
20 <211> 46  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
25 <400> 52  
caggtagca atgctttcca gaatccctgc tcagcagctg caatcc46  
<210> 53  
<211> 44  
<212> ADN  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 53  
ctctgggtca acacatcata gccacatgct cctactaaat attt44  
35 <210> 54  
<211> 25

<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
5 <400> 54  
cgtgtgtgt ctgagatccc ggtgc25  
<210> 55  
<211> 23  
<212> ADN  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 55  
cacctgttaa tatccagccc cga23  
15 <210> 56  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
20 <223> Sonda de detección  
<400> 56  
ctaacaatcaa ggagctgttt atggagccgc ctccccgtg39  
<210> 57  
<211> 24  
25 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 57  
30 ctaaggtagag tgctccactt gtgc24  
<210> 58  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Artificial  
35 <220>  
<223> Sonda de detección

<400> 58  
ctagtgagaga gcagtgagcg tctgggaggc t31  
<210> 59  
<211> 30  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 59  
10 ctgcatgccc taccactgg cctcaggtaa30  
<210> 60  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
15 <220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 60  
caaagagcct gatgagactg tgc23  
<210> 61  
20 <211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
25 <400> 61  
cgctccttag tctagtctc accct25  
<210> 62  
<211> 23  
<212> ADN  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 62  
ctttgctcc tctgcagggc gga23  
35 <210> 63  
<211> 30

<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
5 <400> 63  
ctctcaaag tttcatgct ctcaggtatc30  
<210> 64  
<211> 34  
<212> ADN  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 64  
ctgagtgcca tcaactgcagt gtctgtagct gtgg34  
15 <210> 65  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
20 <223> Sonda de detección  
<400> 65  
ctccagggat ttggacattt ggt23  
<210> 66  
<211> 36  
25 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 66  
30 cagctgctac acaattagga ctgaaggaga tgccga36  
<210> 67  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Artificial  
35 <220>  
<223> Sonda de detección

<400> 67  
cctctcctct ctctcagaa ctgcattc28  
<210> 68  
<211> 37  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 68  
10 ctgttaatga ctgtatagag agtgggccc aggcagc37  
<210> 69  
<211> 42  
<212> ADN  
<213> Artificial  
15 <220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 69  
ctgagggtac tgtagacatc acgagggtga gaatagtaa at42  
<210> 70  
20 <211> 50  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
25 <400> 70  
ccacattgtt gtatccgtac ctgtgtggaa ggagtagatg gggagctcag50  
<210> 71  
<211> 31  
<212> ADN  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 71  
ctgaggggac tgagtgagct gcctgagaaa a31  
35 <210> 72  
<211> 34

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 5 <400> 72  
 gaataccttt aaagttcac cacatgtgat gtag34  
 <210> 73  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 73  
 cagcactgat ctaagatatt caagaccttt aggtgaatac aag43  
 15 <210> 74  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Sonda de detección  
 <400> 74  
 gtagcgtatc tcagctaaaa cccttattac ttcattgaat taac44  
 <210> 75  
 <211> 40  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 75  
 30 gaaaagcgcc ttgtgtcta acttgtaaag accttaatg40  
 <210> 76  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<400> 76  
 ccaacttttc tgtggaccgg tgg23  
 <210> 77  
 <211> 44  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 77  
 10 gtgtgttttc gaaaaggctg gggtagcat ttctgtgtt catg44  
 <210> 78  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 78  
 cattttgtgc tatggcgctg agctctgta tccacc36  
 <210> 79  
 20 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 25 <400> 79  
 caagcagtgg tggttggg gtagatgga c31  
 <210> 80  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 80  
 gtacagagct gtgccagggc ttagttcct tcttacattc c41  
 35 <210> 81  
 <211> 30

<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
5 <400> 81  
cacaaagttt ggcctcttca ctccaggatc30  
<210> 82  
<211> 29  
<212> ADN  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 82  
catccaaggg actgggtgcg ttgatgcag29  
15 <210> 83  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
20 <223> Sonda de detección  
<400> 83  
ccactgtggt tcatgtctca cttatgatt g31  
<210> 84  
<211> 30  
25 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 84  
30 caataccttg tctcacagtt taggtgcctc30  
<210> 85  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Artificial  
35 <220>  
<223> Sonda de detección

]

<400> 85  
ccaaatccta cctgttttag accaatccag g31  
<210> 86  
<211> 23  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 86  
10 clacacttcc acagctccac cag23  
<210> 87  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificial  
15 <220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 87  
ctcttcttcc tctggcaaa atcttct27  
<210> 88  
20 <211> 44  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
25 <400> 88  
gagggaggaa cggtaaactg gggcaggggt gtgcatagct ctag44  
<210> 89  
<211> 37  
<212> ADN  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 89  
cgagtaagtc cctcactctc atgccatacc thtagtc37  
35 <210> 90  
<211> 37

<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
5 <400> 90  
ctgtcctgcc cagagcctac ttacttgaca atggtgc37  
<210> 91  
<211> 44  
<212> ADN  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 91  
cagattcagg ttaaattgtg gattgagctc gcagttacag acag44  
15 <210> 92  
<211> 36  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
20 <223> Sonda de detección  
<400> 92  
gaaacagact acactcccgt ttggtgcatg cgccag36  
<210> 93  
<211> 28  
25 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 93  
30 caggactttt tcagcacgtg togctctc28  
<210> 94  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial  
35 <220>  
<223> Sonda de detección

<400> 94  
ctgccaccta gcaacctgct tcttg25  
<210> 95  
<211> 25  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 95  
10 ggatccagaa gggtagcct ctgag25  
<210> 96  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Artificial  
15 <220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 96  
ccatctfct atccttctct agtggaccct30  
<210> 97  
20 <211> 29  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
25 <400> 97  
gcattgcagc tgttgagtc ccatgcagg29  
<210> 98  
<211> 23  
<212> ADN  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 98  
cgtaagcca tggaagggtg agg23  
35 <210> 99  
<211> 27

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 5 <400> 99  
 gctggctttg ctccagggga gtgtgtg27  
 <210> 100  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 100  
 ggaggagatc gggcagttgg tgaag25  
 15 <210> 101  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Sonda de detección  
 <400> 101  
 gaattgttcg gagtctcaaa gtgtctccta tag33  
 <210> 102  
 <211> 35  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 102  
 30 gttgggcagg cagacgggtg atgctggagc ttaag35  
 <210> 103  
 <211> 45  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<400> 103  
gcaaattctt atttgagggt gctgtatcac aactgagtat acatg45  
<210> 104  
<211> 42  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 104  
10 gcacacccat aaagcccctg gaaaataaag caacccatat tc42  
<210> 105  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Artificial  
15 <220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 105  
gtctggtcag cctctccac tagattcaa gtattcagtt cag43  
<210> 106  
20 <211> 40  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
25 <400> 106  
cttattatga cagagcaatt ccaacagtca tgaaggtcc40  
<210> 107  
<211> 38  
<212> ADN  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 107  
caaattgctt ttcacatgtg ccacatggag ctgaagag38  
35 <210> 108  
<211> 38

<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
5 <400> 108  
ctccacaaa tgtctacta atcagaaggt aaaagtag38  
<210> 109  
<211> 38  
<212> ADN  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 109  
cacactccca atatggttct gttgaattaa gagatctg38  
15 <210> 110  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
20 <223> Sonda de detección  
<400> 110  
cttacagtca cgtccagctt gc22  
<210> 111  
<211> 30  
25 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 111  
30 cagtaaaagg gtgactgtg ttattgctga30  
<210> 112  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Artificial  
35 <220>  
<223> Sonda de detección

<400> 112  
ctgccaggca ataatgaagg ttcttttact gaag34  
<210> 113  
<211> 51  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 113  
10 ccaatccaga actatattct ttcatttcag gaattaggat tatatggact t51  
<210> 114  
<211> 47  
<212> ADN  
<213> Artificial  
15 <220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 114  
ctftctcatc ctgaagatta cgggggactc attttacca gccccag47  
<210> 115  
20 <211> 37  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
25 <400> 115  
cagtctggga aaggctctg aaagaaaaat ggaatgc37  
<210> 116  
<211> 26  
<212> ADN  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 116  
ccagtgagta aaattgcct ggatac26  
35 <210> 117  
<211> 25

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 5 <400> 117  
 ggattaggac ccagttctct tggtc25  
 <210> 118  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 118  
 ctgagcactg cctctctat tccctgtg29  
 15 <210> 119  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Sonda de detección  
 <400> 119  
 gtaaagtctt tctgctttt gattgtgcc ag32  
 <210> 120  
 <211>.34  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 120  
 30 ctctggcctc acatacagtc tcaagcacat tcag34  
 <210> 121  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<400> 121  
catcatgtga gcattcattg acacagg27  
<210> 122  
<211> 23  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 122  
10 ctctgtggaa gccagcttaa acc23  
<210> 123  
<211> 44  
<212> ADN  
<213> Artificial  
15 <220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 123  
gggacagccc tgcaagggtc cccaacaccg caatagtaag gatc44  
<210> 124  
20 <211> 41  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
25 <400> 124  
cagctgttac tggctttatg aaaatcgaaa caataggaca c41  
<210> 125  
<211> 51  
<212> ADN  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 125  
gaaaaccgga tttcagtag ctgaagaaaa tatggcactg taagttaaaa c51  
35 <210> 126  
<211> 42

<212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 5 <400> 126  
 ctcaagtcta acaactttgc aatgaaagga aagcggaaga cg42  
 <210> 127  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 127  
 ctaggctggg caaaggaatg ctgt24  
 15 <210> 128  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Sonda de detección  
 <400> 128  
 ggagttaaca caccagggtt ctagt25  
 <210> 129  
 <211> 25  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 129  
 30 tccaacctca tctaccccat ctttg25  
 <210> 130  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<400> 130  
cttccacag ctaccaatcc atatcccacc cccgctcttg cag43  
<210> 131  
<211> 41  
5 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 131  
10 gcctacgctg tgcctgatc ttggcgtcc ccagcagagt t41  
<210> 132  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Artificial  
15 <220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 132  
cgaggagtcc ccagctattg aggcaatcca tctgttgag39  
<210> 133  
20 <211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
25 <400> 133  
gctccccaaa acccagtcac ctg23  
<210> 134  
<211> 38  
<212> ADN  
30 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 134  
caaggcaggt gagtgaacca ccagcagggga tgggcacc38  
35 <210> 135  
<211> 40

<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
5 <400> 135  
gatgtcaggt ggtagccccg toggacatga tggatggacg40  
<210> 136  
<211> 36  
<212> ADN  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 136  
cataggtatc ggtgatgagc tacagtgcc aatttg36  
15 <210> 137  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
20 <223> Sonda de detección  
<400> 137  
caccctgatg actctgcttt gcagg25  
<210> 138  
<211> 28  
25 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<400> 138  
30 gacatgctca tgggaagcc gggaatgc28  
<210> 139  
<211> 44  
<212> ADN  
<213> Artificial  
35 <220>  
<223> Sonda de detección

<400> 139  
 catttcagcc tgtctcctg tctgctccc tgcagcacc tgac44  
 <210> 140  
 <211> 47  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 140  
 10 gcaacttct gcatctctcc caacacaggt gctgacatca tcatcac47  
 <210> 141  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <400> 141  
 ctgaccaca aggcctggaa agag24  
 <210> 142  
 20 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 25 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 142  
 30 caggtttga ttccgaagcc ctggtcttt ccac34  
 <210> 143  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 5 <400> 143  
 ttgccatcgt gaacgttgtt aaagtttagaa ctctggcaac40  
 <210> 144  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 144  
 ggccatgagc tgagttgtga c21  
 <210> 145  
 20 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 25 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 145  
 30 gagacgtgtg cttataccct cgattgtcc agcgtgcac40  
 <210> 146  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 5 <400> 146  
 ctggatggtt ttgtttaat acggatggcc agc33  
 <210> 147  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 147  
 ccttcacttt tcctaagct ctcagtgag ttcac36  
 <210> 148  
 20 <211> 47  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 25 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 148  
 30 tatgtgatag aaaagtgcca ttatagattt caatactgt gtatctc47  
 <210> 149  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 149  
 tgcagcggcc gtcaccacag aaac24  
 <210> 150  
 <211> 40  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 150  
 ggtgtcagac tggggcttac taatgcgcta ttcacatgc40  
 20 <210> 151  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 151  
 cgtgtattt tattttat aggaagccga aaactg36  
 <210> 152  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 152  
 ccgaaccccc aagattcaag agcagtacc29  
 <210> 153  
 <211> 27  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 153  
 agtgatgtgt ttgggctca ctctggc27  
 20 <210> 154  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 154  
 tatccacagt acagctgctc caccacagg29  
 <210> 155  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)

5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 155  
 ctactaagtg gtctctgtat atttcaggca gc32  
 <210> 156  
 <211> 30

10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>

15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 156  
 tgctttgcag atcatattct aaaggaactg30

20 <210> 157  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'

30 <400> 157  
 gaaaggctgg agtactgcaa cccctac27  
 <210> 158  
 <211> 32  
 <212> ADN

35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 158  
 gggaggaaga atatcctct ggtccgata gc32  
 <210> 159  
 <211> 39  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 159  
 ttttagtaga acataccaga gagtaatcct ctgagaaac39  
 20 <210> 160  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 160  
 tgtccgctct ggtcaatcc tgtctgc27  
 <210> 161  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 161  
 gccagccaaa acaaacatgc aagggaatg cag33  
 <210> 162  
 <211> 42  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 162  
 gttttctgg aatttggtc tgactttgt ttggacagtg cc42  
 20 <210> 163  
 <211> 50  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 163  
 cttttctcaa agatggggct gctcctctg agtccaagct tggcaaggcc50  
 <210> 164  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)

5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 164  
 ttctggcaa agtgaacca gccagacca tgcatgcc39  
 <210> 165  
 <211> 24

10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>

15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 165  
 cgggacttct tctggaatt gttc24

20 <210> 166  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'

30 <400> 166  
 ctccctctg gcatcactgt ctgcgactca gg32  
 <210> 167  
 <211> 48  
 <212> ADN

35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 167  
 atgtagtgga tgtgcttgct gagtggggct ccctgtacgt gctgacgc48  
 <210> 168  
 <211> 27  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 168  
 aatgtcacag ccctcagaac taaagcg27  
 20 <210> 169  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 169  
 cggagccatg tctggtaacg gcaatg26  
 <210> 170  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 170  
 gaccagcct ggagtatttc cccactctga gactcagctg gc42  
 <210> 171  
 <211> 28  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 171  
 agtgattcgc gtgggtaccc gcaagagc28  
 20 <210> 172  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 172  
 ttgaaagcct cgtaccctgg cctgc25  
 <210> 173  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)

5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 173  
 ggacaagatt cttgatactg cactctctaa g31  
 <210> 174  
 <211> 32

10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>

15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 174  
 caaggagctt gaacatgccc tggagaagaa tg32

20 <210> 175  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'

30 <400> 175  
 acctgcccac tgtgcttcct cctggcttca c31  
 <210> 176  
 <211> 38  
 <212> ADN

35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 176  
 ttgttgga agaccctaga aaccctgcca gagaagag38  
 <210> 177  
 <211> 21  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 177  
 gaaccagctc cctgcaaga g21  
 20 <210> 178  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 178  
 tctccacagc ggggaaacct caacacc27  
 <210> 179  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)

5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 179  
 catgtatgct gtgggccagg tac23  
 <210> 180  
 <211> 32

10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>

15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 180  
 ctctgctcg ctgcatcgct gaaagggcct tc32

20 <210> 181  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'

30 <400> 181  
 cagctatgaa ggatgggcaa gtaagtgg28  
 <210> 182  
 <211> 29  
 <212> ADN

35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)

5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 182  
 aagagacat gcaggctacc atccatgct29  
 <210> 183  
 <211> 42

10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>

15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 183  
 catcactgct cgtaacattc cagggggcc ccagttggct gc42

20 <210> 184  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

25 <223> Sonda de detección  
 <220>.  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'

30 <400> 184  
 gagtcgaacg agctgatatc gaatggag28  
 <210> 185  
 <211> 38  
 <212> ADN

35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 185  
 gcctctaggc cgtaattcc tgctaggata ttgatggc38  
 <210> 186  
 <211> 43  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 186  
 tctactgttt ccgcccggat ctgttcgct gaacaacccat tac43  
 20 <210> 187  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 187  
 gctgaacgag caggcctgca gaaacgggt gagtggac39  
 <210> 188  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 188  
 agggcatctc tcccaggtga cccttcttt ctgtc35  
 <210> 189  
 <211> 44  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 189  
 ctcgaaaaac aaaagcctaa gcagattct caggcaattt atcc44  
 20 <210> 190  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 190  
 aggacaagt acagggatta tataaggaat tcaggactcc40  
 <210> 191  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5"  
 <400> 191  
 tgggtaccct gcttcgctt agccactcct cacctgc37  
 <210> 192  
 <211> 38  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 192  
 tgtctgaacc actgggtggg aaacttttg aagaatac38  
 20 <210> 193  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 193  
 ccaccgtact gaaagggcag ggaagaacc gatgagac38  
 <210> 194  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 194  
 ttttacaagt cagtggtagt accagttag agtaaagcag atctgttc48  
 <210> 195  
 <211> 39  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 195  
 tgaagactaa cgccggaccc cgagatcgtg agttgtggg39  
 20 <210> 196  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 196  
 gtgggatcca agctaccatt tgc23  
 <210> 197  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 197  
 gactggcctt aaggtccct atctattctc cctac35  
 <210> 198  
 <211> 28  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 198  
 cagagggagc ttcattaat gctctcc28  
 20 <210> 199  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 199  
 ggattcgctc cgttcgaggc cctaattggtg c31  
 <210> 200  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 200  
 caccagcacc tccgctcctt ttactgtgcc30  
 <210> 201  
 <211> 43  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 201  
 acagttttgc ccagcgccgc ctggacctg aggtgacact tgc43  
 20 <210> 202  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 202  
 taaggtggcg tctctagcca tggacagtct c31  
 <210> 203  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 203  
 cccacagcc agactcagca ctcattc27  
 <210> 204  
 <211> 24  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 204  
 tctaaggac agcagtctgg aggc24  
 20 <210> 205  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 205  
 tgaatctgca gtaccaagga gcccatctgc ctgtcc36  
 <210> 206  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial'  
 <220>

<223> Sonda de detección -  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 206  
 gccatctca gaagatccag gagtc25  
 <210> 207  
 <211> 42  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 207  
 gccactgctt ggtccatcta cacaaggtaa gttgggataa ac42  
 20 <210> 208  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 208  
 cccagtatac actaggtcac tggcaaaaac30  
 <210> 209  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

- <223> Sonda de detección  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (1)..(1)
- 5 <223> Fosforilación en 5'  
<400> 209  
agtcagtgtc ctgggcacag aacctaacag c31  
<210> 210  
<211> 46
- 10 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<220>
- 15 <221> base modificada  
<222> (1)..(1)  
<223> Fosforilación en 5'  
<400> 210  
gtcggtcctt gatctcggcc aaatagggca ctgagacttc ggaagc46
- 20 <210> 211  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>
- 25 <223> Sonda de detección  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (1)..(1)  
<223> Fosforilación en 5'
- 30 <400> 211  
gatcacctga atcccctcag ccttctgagc30  
<210> 212  
<211> 41  
<212> ADN
- 35 <213> Artificial  
<220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 212  
 gagggtaggg aacaggttaag gaggcacaa gaggaagaa c41  
 <210> 213  
 <211> 36  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 213  
 gttcttgata aggattctt attaggctca agtctc36  
 20 <210> 214  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 214  
 cacctactt caatgggtat gattattagg ttgtc35  
 <210> 215  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 215  
 ctttaacca gcctoccttt ttctaagcct ttagtg36  
 <210> 216  
 <211> 44  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 216  
 gatgttgat aatgccaag atgatggtga ctaacagctg ttg44  
 20 <210> 217  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 30 <400> 217  
 gagaggaagg aaggaagga ggc23  
 <210> 218  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>

<223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada.  
 <222> (1)..(1)  
 5 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 218  
 gaaatcttc agaggaagct gcaaaacaaa tg32  
 <210> 219  
 <211> 32  
 10 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 15 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 219  
 ccaagaatcc tcatgctcct actatccatt tc32  
 20 <210> 220  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 25 <223> Sonda de detección <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 220  
 30 ctcaactcaa cataactgaa tcaagaagac g31  
 <210> 221  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 5 <400> 221  
 cctgtgaaa aagcactgtg atgactcatt c31  
 <210> 222  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 222  
 cagaattgaa agtatcttga tgccttacc tctaac36  
 <210> 223  
 20 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 25 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 223  
 30 gcagaatggc tgtgcagggg tttggag27  
 <210> 224  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<220>  
<221> base modificada  
<222> (1)..(1)  
<223> Fosforilación en 5'  
5 <400> 224  
ggagattctg aagttggcaa tgtctacaat tcc33  
<210> 225  
<211> 28  
<212> ADN  
10 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<220>  
<221> base modificada  
15 <222> (1)..(1)  
<223> Fosforilación en 5'  
<400> 225  
cagcccctaa ccattattg cattcaag28  
<210> 226  
20 <211> 29  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
25 <220>  
<221> base modificada  
<222> (1)..(1)  
<223> Fosforilación en 5'  
<400> 226  
30 gatattatgt atggcgacct ggtggttac29  
<210> 227  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Artificial  
35 <220>  
<223> Sonda de detección

<220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 5 <400> 227  
 gcattacact ttgaaaccta aatggaggc29  
 <210> 228  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 228  
 gcatgaatga aggtggagag agc23  
 <210> 229  
 20 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 25 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 229  
 30 gaacaggttt aaggtctagg ctttagagt ggggaaaggg40  
 <210> 230  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 5 <400> 230  
 caggggcttt tcatattgt cagaggctt g31  
 <210> 231  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 231  
 ccttctcat agtaagccgt acccagtgt ggcac35  
 <210> 232  
 20 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 25 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 232  
 30 ctgaccatgg aagcgaatgg gttggg26  
 <210> 233  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<220>  
 <221> base modificada  
 <222> (l)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 5 <400> 233  
 gcaggccgtt acttaccagg taagagtc28  
 <210> 234  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 234  
 ctgaggcctg ctgtgaactg actctg26  
 <210> 235  
 20 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 25 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 235  
 30 ttctctacag cactgcgctc gcttc25  
 <210> 236  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 5 <400> 236  
 ctaggctatg tgtccaagc catcacc27  
 <210> 237  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 15 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 237  
 gatgacatac atggttgagg gtggtg26  
 <210> 238  
 20 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 25 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 238  
 30 gcatcttggc ccacagctct tcaacaagtt tgc33  
 <210> 239  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Sonda de detección

<220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 5 <400> 239  
 ccttgagggt gaggtggggg tgt23  
 <210> 240  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 240  
 gggaagacgg tgacattgca g21  
 <210> 241  
 <211> 33  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 241  
 cagatgctgg atgacttgg accacatcgc tac33  
 30 <210> 242  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda de detección  
 <220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 242  
 5 ggtcaagag aaggggcagg gtctattta aag33  
 <210> 243  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 243  
 gtctatctat gctcaccttt ggcag25  
 <210> 244  
 <211> 29  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 244  
 caaatggctt aggcttcaca taaatatcc29  
 30 <210> 245  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda de detección  
 <220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 245  
 5 ttaacatctc tccttgatg tgtgtgaag ccttaatg38  
 <210> 246  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 246  
 ctatgtcaag tgagctaggt ataatgatg aagcc35  
 <210> 247  
 <211> 38  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 247  
 ctggaaatca ctagagtg atcttgattg aattagtc38  
 30 <210> 248  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda de detección  
 <220>

<221> base modificada  
<222> (1)..(1)  
<223> Fosforilación en 5'  
<400> 248  
5 gctgcctga ctgttgaa gacatttta catccc36  
<210> 249  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Artificial  
10 <220>  
<223> Sonda de detección  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (1)..(1)  
15 <223> Fosforilación en 5'  
<400> 249  
cactccac atggctatt ggtctgtg gc32  
<210> 250  
<211> 26  
20 <212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección  
<220>  
25 <221> base modificada  
<222> (1)..(1)  
<223> Fosforilación en 5'  
<400> 250  
ttagtctgc agtgtcaca ggagcc26  
30 <210> 251  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
35 <223> Sonda de detección  
<220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 251  
 5 ggtcccatct tgctttttc ttcc24  
 <210> 252  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 252  
 taccagaac accatgacat agaagg26  
 <210> 253  
 <211> 32  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 253  
 gatgccaagg aagatgactg tggcaggat cc32  
 30 <210> 254  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda de detección  
 <220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 254  
 5 gaagccactt tgatccctgt tttatcggtt gagttttgt c41  
 <210> 255  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 255  
 agcagtgga ggcagcagagt tatgtttgga gcaaaac37  
 <210> 256  
 <211> 51  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 256  
 caagtcagtg tatgtgggtg gaaatgctac tgcttctcta ggtaaggagt c51  
 30 <210> 257  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda de detección  
 <220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 257  
 5 agaaggagaa acctgtggaa atgcag26  
 <210> 258  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 258  
 ctgggacttt ttaggagtgt ctctg25  
 <210> 259  
 <211> 31  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 259  
 gaaacctcaa aagagaaatc ctgccaaaag c31  
 30 <210> 260  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda de detección  
 <220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 260  
 5 ggattgcat ggaaagcata actgtgtatc30  
 <210> 261  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 261  
 gagttatctg gtgacaatat cgatcaaatt aagg34  
 <210> 262  
 <211> 27  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 262  
 agtgaaaggc tcctgtgaaa aagctgc27  
 30 <210> 263  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda de detección  
 <220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 263  
 5 ctagccctgt gagagctcc tgtgc25  
 <210> 264  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 264  
 ctaacagctg tctggggtgg catccgtgga cttcac36  
 <210> 265  
 <211> 31  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 265  
 gctatgggga ccctatcaa atcctcactg g31  
 30 <210> 266  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda de detección  
 <220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 266  
 5 ccaatgggaa aagccttagt tgaac25  
 <210> 267  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 267  
 ctgaatgcca gtgatgtgct ctcagccatg gaag34  
 <210> 268  
 <211> 32  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 268  
 gaagtgaaac ctgggctgta accgcctccg ag32  
 30 <210> 269  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda de detección  
 <220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 269  
 5 cctttgctc gctgtgtggc t21  
 <210> 270  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 270  
 tcacgtgagt ctccaagaat ggg23  
 <210> 271  
 <211> 35  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 271  
 ggatgttctc gatgacatac agcctatcac cagcc35  
 30 <210> 272  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda de detección  
 <220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 272  
 5    cccaaggtga agaatcaaag gaagggctaa g31  
      <210> 273  
      <211> 25  
      <212> ADN  
      <213> Artificial  
 10   <220>  
      <223> Sonda de detección  
      <220>  
      <221> base modificada  
      <222> (1)..(1)  
 15   <223> Fosforilación en 5'  
      <400> 273  
      gaagaccttc cccaacctcc tgggtg25  
      <210> 274  
      <211> 27  
 20   <212> ADN  
      <213> Artificial  
      <220>  
      <223> Sonda de detección  
      <220>  
 25   <221> base modificada  
      <222> (1)..(1)  
      <223> Fosforilación en 5'  
      <400> 274  
      tcctgaaggg ctctgagtg aaaacgg27  
 30   <210> 275  
      <211> 24  
      <212> ADN  
      <213> Artificial  
      <220>  
 35   <223> Sonda de detección  
      <220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 275  
 5 tctgggtcag gaggtggcag agtg24  
 <210> 276  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 276  
 cgtggaagcc atcaaagagg ccctgatg28  
 <210> 277  
 <211> 30  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 277  
 cttcctgftt ctatggccct ttccggtgag30  
 30 <210> 278  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda de detección  
 <220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400>278  
 5 gatgcagcta agtcaagccc agcttttg29  
 <210> 279  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 279  
 cctacctgga catcgtgagg gaggtaaagg30  
 <210> 280  
 <211> 42  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 280  
 ctccctctcg ccgtgtacca cgtctctgga gagtttgcca tg42  
 30 <210> 281  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 35 <223> Sonda de detección  
 <220>

<221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 281  
 5 ctactacaca cgcgagctgc tgc23  
 <210> 282  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 282  
 gtgattgta ggtgcgag aggtgtctt atccag36  
 <210> 283  
 <211> 18  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Tag para Oligo L  
 <400> 283  
 25 ggccgcggga attcgatt18  
 <210> 284  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Tag para Oligo R  
 <400> 284  
 cactagtga ttcgggc18  
 <210> 285  
 35 <211> 21  
 <212> ADN

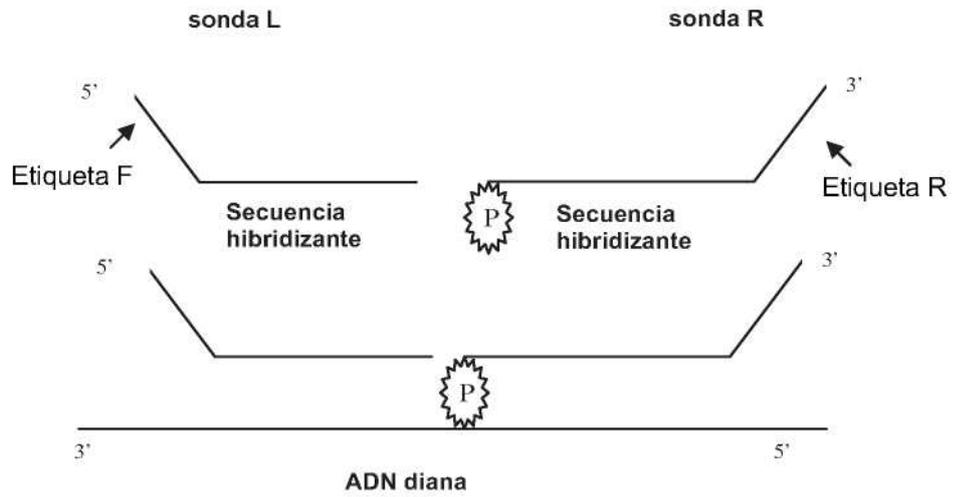
<213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección como control interno  
 <400> 285  
 5 gccaccatca gcactatgac c21  
 <210> 286  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Sonda de detección como control interno  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 15 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 286  
 ccaggacaga tcacatacac tgc23  
 <210> 287  
 <211> 46  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Sonda de detección como control interno  
 <400> 287  
 25 catttaagac cctgagacta tctgtgaag ctgcctggtt tagcgt46  
 <210> 288  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Sonda de detección como control interno  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> (1)..(1)  
 35 <223> Fosforilación en 5'  
 <400> 288

ctgttctgct tgttcacgcc gtttcgtctc aaactc36  
<210> 289  
<211> 50  
<212> ADN  
5 <213> Artificial  
<220>  
<223> Sonda de detección como control interno  
<400> 289  
ctggctggaa gctgtttaa ggaactctc atcagtatgc tgaagtg50  
10 <210> 290  
<211> 46  
<212> ADN  
<213> Artificial  
<220>  
15 <223> Sonda de detección como control interno  
<220>  
<221> base modificada  
<222> (1)..(1)  
<223> Fosforilación en 5'  
20 <400> 290  
ccaaaaggca tctctcacg gtttctcta cactgattac atctcc46  
<210> 291  
<211> 18  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador R para la SEQ ID NO. 284  
<400> 291  
gccgcgaatt cactagtg18  
30

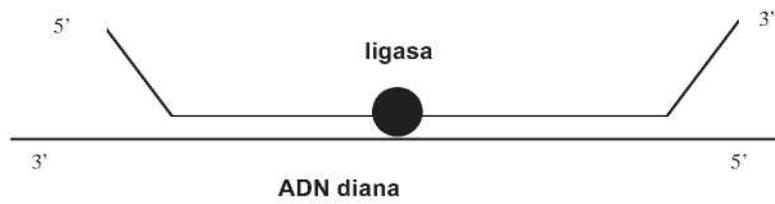
**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Asociación de sondas que comprende un grupo de sondas que tienen en un terminal de la secuencia una etiqueta y en el otro terminal una secuencia hibridizante a por lo menos una parte de la secuencia del gen HMBS, dichas secuencias hibridizantes siendo SEC ID NOs 25-47 y un grupo de sondas que tienen en un terminal de la secuencia una etiqueta y en el otro terminal una secuencia hibridizante a por lo menos una parte de la secuencia del gen HMBS, dichas secuencias hibridizantes siendo SEC ID NOs 166-188.
- 10 2.- Asociación de sondas según la reivindicación 1, donde la etiqueta es SEC ID NO 283 o SEC ID NO 284.
- 3.- Asociación de sondas según la reivindicación 1 o 2, donde la etiqueta está presente en el terminal 5' y la secuencia hibridizante en el terminal 3'.
- 15 4.- Asociación de sondas según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, donde la etiqueta está presente en el terminal 5' de SEC ID NOs 25-47.
- 5.- Asociación según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, donde la etiqueta en el terminal 5' de SEC ID NOs 25-47 es SEC ID NO 283.
- 20 6.- Asociación de sondas según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, donde la etiqueta está presente en el terminal 3' y la secuencia hibridizante está presente en el terminal 5'.
- 7.- Asociación de sondas según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, donde la etiqueta está presente en el terminal 3' de SEC ID NOs 166-188.
- 25 8.- Asociación según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6, donde la etiqueta en el terminal 3' de SEC ID NOs 166-188 es SEC ID NO 284.
- 30 9.- Método para determinar la presencia de Porfiria Aguda Intermitente en una muestra de tejido biológico que incluye las siguientes etapas operativas:
- (i) extracción de ácido nucleico de una muestra;
- (ii) introducción de la asociación de sondas según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8 dentro del ácido nucleico extraído según la etapa operativa (i), y reacción en presencia de al menos una enzima ligasa en al menos una reacción de ligamiento;
- 35 (iii) ejecución de al menos una reacción de amplificación en las sondas obtenidas a partir de la etapa operativa (ii), y
- (iv) determinación de la presencia y de la cantidad de secuencias nucleotídicas resultantes del ligamiento y la amplificación.
- 40 10.- Método según la reivindicación 8, donde un par de sondas para el control interno viene introducido en la etapa operativa (ii), dicho par de sondas preferentemente teniendo secuencias hibridizantes: SEC ID NOs 285-286 y/o 287-288 y/o 289-290, y la misma etiqueta de la asociación de sondas presente en la etapa operativa (ii).
- 45 11.- Método según la reivindicación 10, donde la información dada por el par de sondas que tienen secuencias hibridizantes SEC ID NOs 285-286 y/o 287-288 y/o 289-290 viene utilizada para normalizar los datos determinados de conformidad con la etapa operativa (iv).
- 50 12.- Uso de la asociación de sondas según una cualquiera de las precedentes reivindicaciones de 1 a 8 en una reacción de ligamiento y una reacción RCP para diagnosticar la presencia de anomalías porfíricas.
- 13.- Uso según la reivindicación 12 para diagnosticar anomalías del gen HMBS.
- 55 14.- Kit para diagnosticar Porfiria Aguda Intermitente que incluye al menos un compartimiento que contiene en su interior los reactivos para efectuar por lo menos un ligamiento y por lo menos una reacción RCP, y por lo menos un compartimiento que contiene en su interior la asociación de sondas según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 8.

1) Hibridación



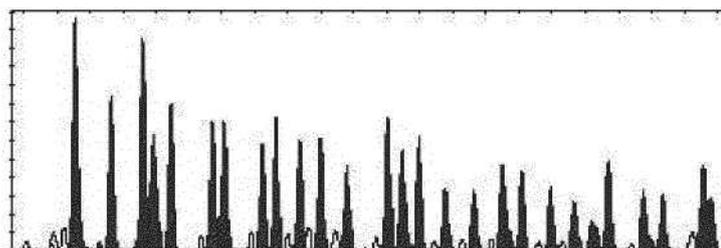
2) Ligamiento



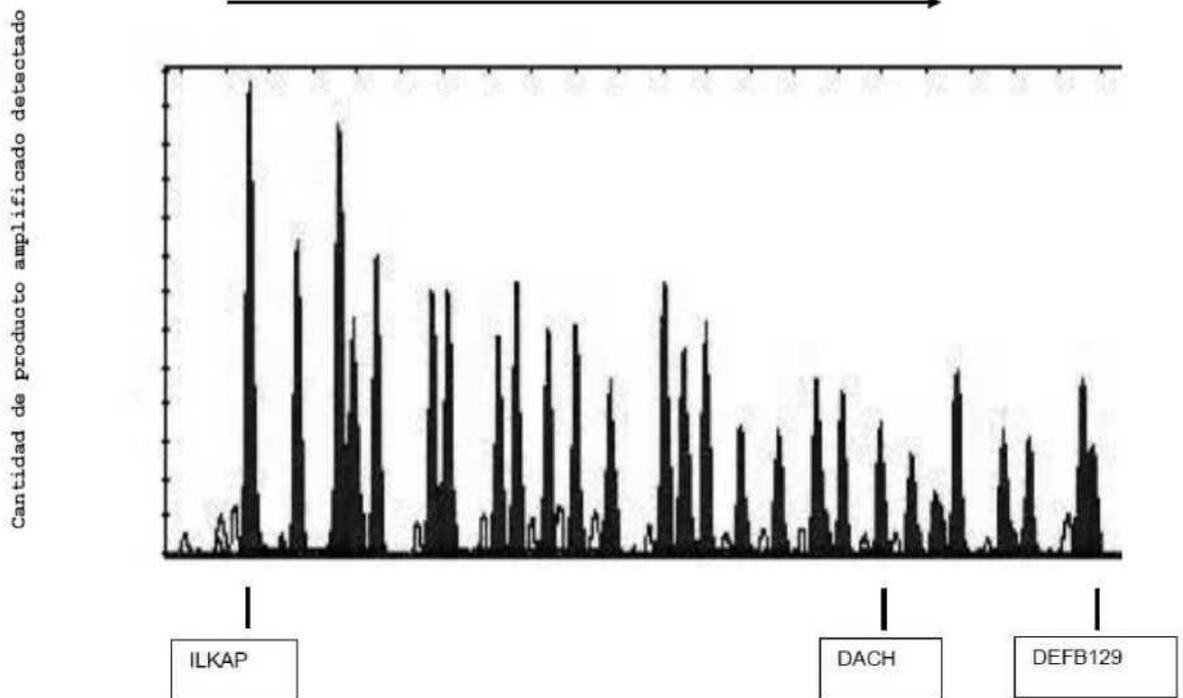
3) RCP

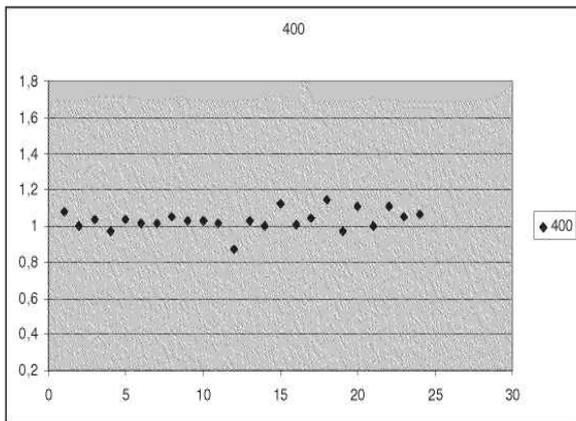
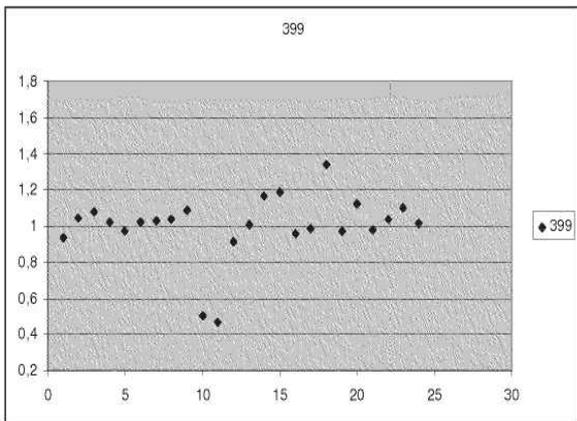
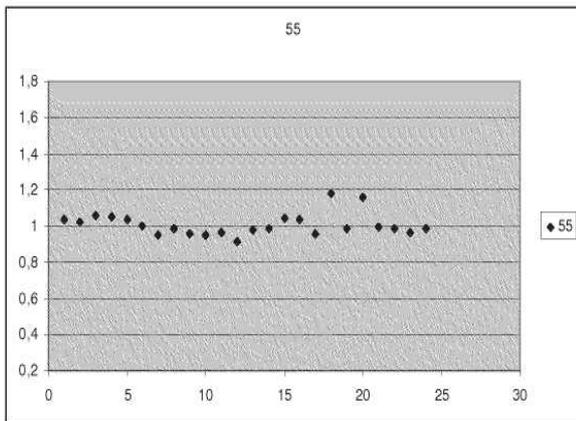
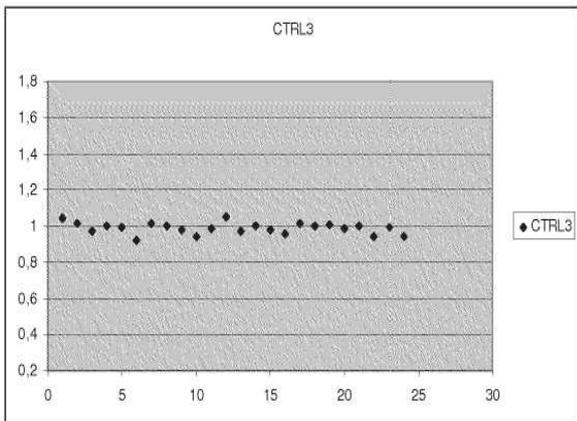
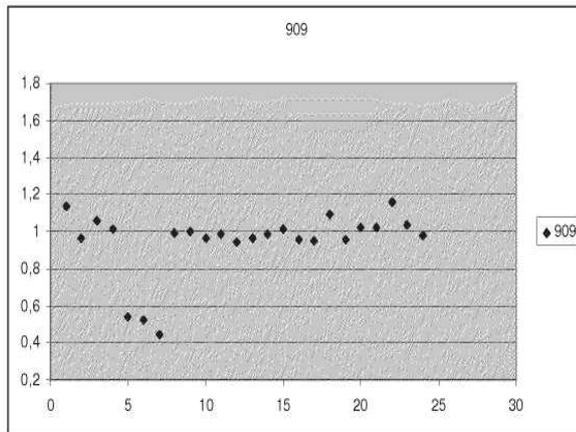
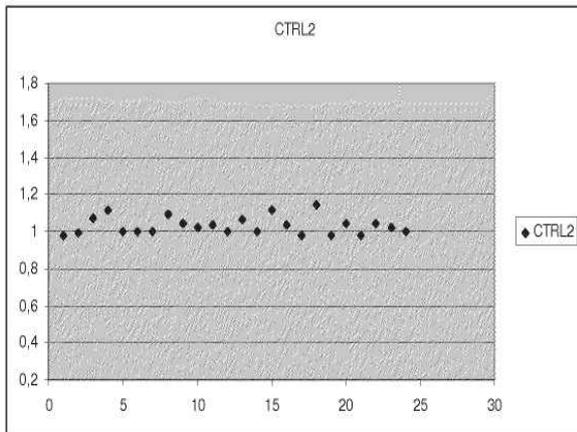
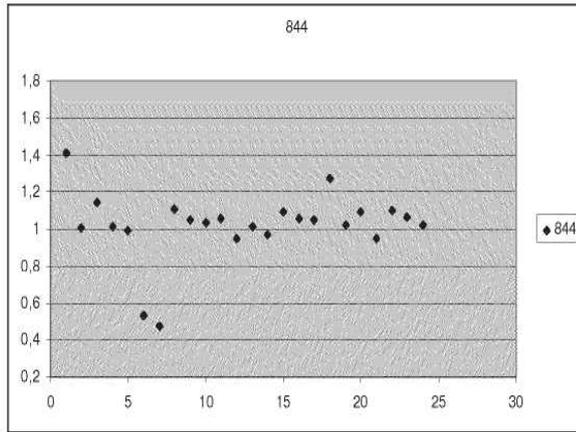
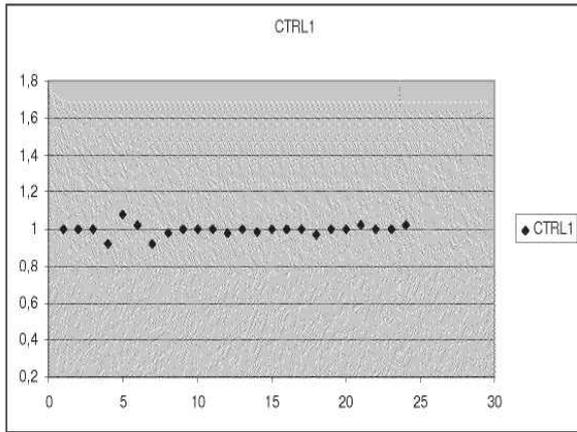


4) Separación por electroforesis capilar



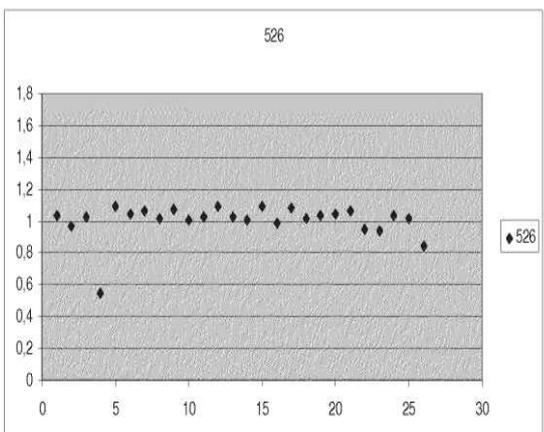
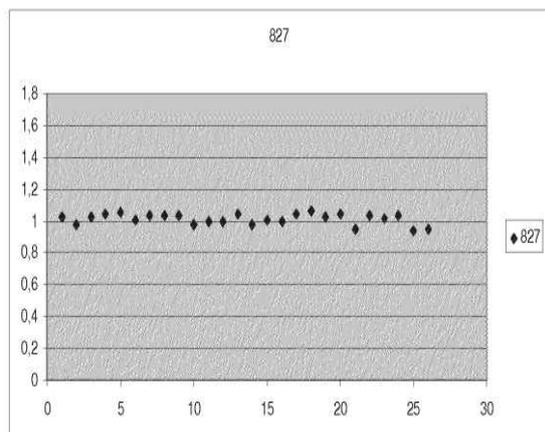
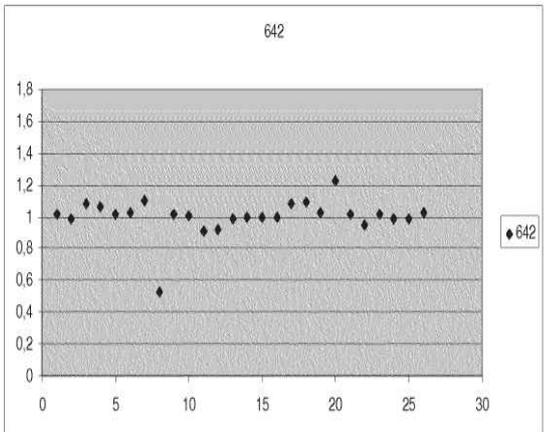
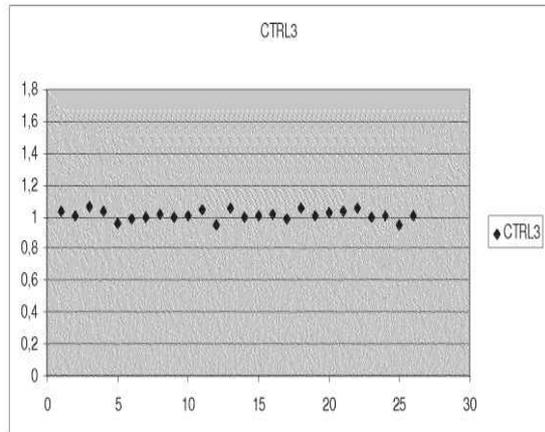
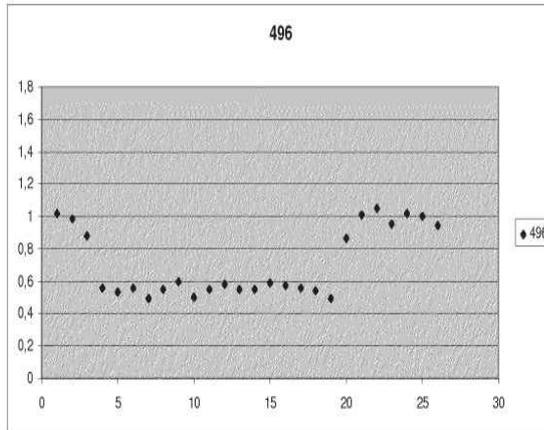
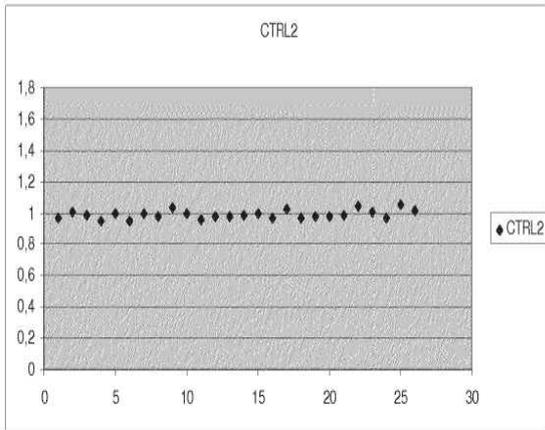
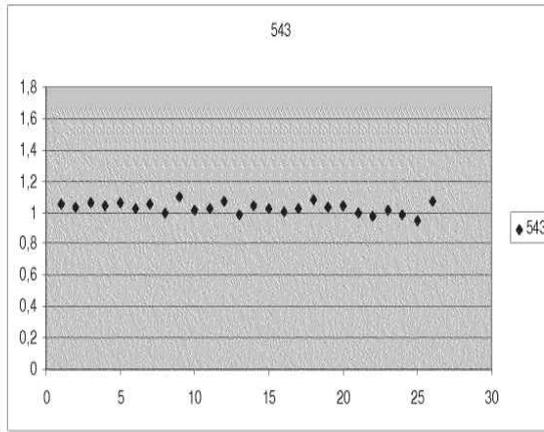
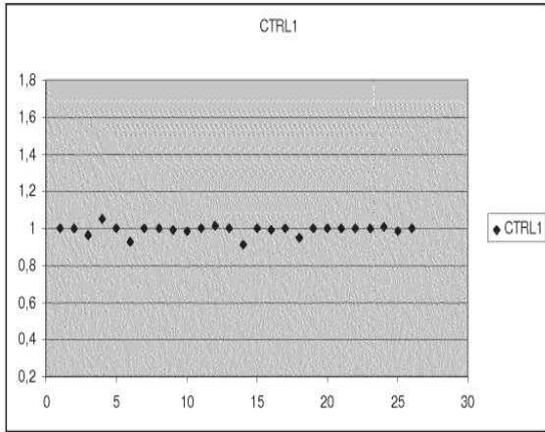
Longitud relativa del producto amplificado expresada en nucleótidos





3A/4

3B/4



4A/4

4B/4