

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 923**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2012 PCT/US2012/023974**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12106711**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2012 E 12742591 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2670867**

54 Título: **Un método para detectar simultáneamente la estructura cromosómica y la expresión génica en células sueltas**

30 Prioridad:

04.02.2011 US 201161439623 P

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

07.03.2018

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)
Center for Technology Transfer 3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**RAJ, ARJUN y
LEVESQUE, MARSHALL, J.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 657 923 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

Un método para detectar simultáneamente la estructura cromosómica y la expresión génica en células sueltas

Antecedentes de la invención

5 EL ADN de una única célula humana, si se extiende completamente, tendría una extensión aproximada de unos dos metros. Sin embargo, cada célula compacta estas moléculas poliméricas increíblemente largas dentro del núcleo de la célula, un espacio de tan solo unos pocos micrómetros. Los investigadores están encontrando cada vez más que esta conformación compactada no es solo una «pelota de cuerda», sino que más bien está muy organizada y su regulación es dinámica (Cremer et al., 2001, *Nat Rev Genet* 2: 292-301). El desarrollo de un mejor conocimiento de esta forma compactada proporcionará un conocimiento profundo clave sobre la manera en que la organización espacial de la información genética en el núcleo afecta a su lectura a través de la expresión génica.

10 La expresión génica implica la transcripción de moléculas de ARNm desde el genoma seguida de la exportación de estos ARNm al citoplasma. Existen datos que indican que la estructura de los cromosomas, organizados por lo general en territorios diferentes en el núcleo (Cremer et al., 2001, *Nat Rev Genet* 2: 292-301), tiene su importancia en ambos procedimientos (Fraser et al., 2007, *Nature* 447: 413-417; Misteli, 2007, *Cell* 128: 787-800; Papantonis et al., 2010, *Curr Opin Cell Biol.* 22(3): 271-6). En realidad, un recuento numérico de la transcripción revela que la abundancia de los complejos enzimáticos grandes que son necesarios para la polimerización del ARN y el ajuste oscila entre cientos y miles por célula, la cual debe transcribir de algún modo las muchas decenas de miles de genes que hay en el núcleo (Jackson et al., 1998, *Mol Biol Cell* 9: 1523-1536; Osborne et al., 2004, *Nat Genet* 36: 1065-1071; Wansink et al., 1993, *J Cell Biol* 122: 283-293). Algunos datos sugieren que cada conjunto de genes que se transcribe activamente está localizado en «factorías de transcripción» (Iborra et al., 1996, *J Cell Sci* 109: 1427-1436; Schoenfelder et al., 2010, *Nat Genet* 42: 53-61; Sexton et al., 2007, *Semin Cell Dev Biol* 18: 691-697). La formación transitoria de estas fábricas y su escasa accesibilidad podría ser el motivo de la naturaleza intermitente de la expresión génica que nosotros y otros investigadores hemos observado (Raj et al., 2006, *PLoS Biol* 4: e309; Raj et al., 2008, *Cell* 135: 216-226).

15 20 25 Mientras tanto, durante muchos años, los investigadores razonaron que la alta densidad de los materiales poliméricos que hay en el núcleo haría que la difusión del ARN fuera prohibitivamente lenta, lo que conduce a la hipótesis de la «compartimentación génica» (Blobel, 1985, *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 8527-8529), en la que los genes por sí mismos deben desplazarse a la periferia nuclear para que la exportación del ARN sea razonablemente eficaz. De hecho, existen algunas pruebas de ello, al verse que algunos genes se desplazan a la periferia tras la activación y se asocian físicamente con el complejo de los poros nucleares (Brown et al., 2007, *Curr Opin Genet Dev* 17: 100-106; Capelson et al., 2010, *Cell* 140: 372-383; Casolari et al., 2004, *Cell* 117: 427-439; Kalverda et al., 2010, *Cell* 140: 360-371). Sin embargo, los análisis biofísicos han demostrado que la difusión del ARN en el núcleo es más bien rápida y que, por lo tanto, no es limitante (Vargas et al., 2005, *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 17008-17013), y que la mayoría de genes permanecen en el interior nuclear (que a menudo, de hecho, aparecen silenciados en la periferia (Chuang et al., 2006, *Curr Biol* 16: 825-831; Kosak et al., 2002, *Science* 296: 158-162)).

30 35 Por desgracia, no contamos con un panorama claro de la estructura los cromosomas ni de la expresión de sus genes, que se entronca en la falta de herramientas eficaces para medir simultáneamente la estructura genética y la función en una única célula. La mayoría de los ensayos convencionales por toma de imágenes para la estructura de los cromosomas se centran solo en la posición de uno o dos locus a la vez, mientras que las estrategias bioquímicas globales proporcionan mediciones indirectas promediadas sobre poblaciones de muchos miles a millones de células. En cualquier caso, los datos de expresión génica son difíciles de obtener. Por estas razones, todavía quedan incógnitas relacionadas con cómo es la organización o desorganización espacial de la expresión génica en los cromosomas en interfase, o relacionadas con la variabilidad de las configuraciones de los cromosomas, y cómo estos contribuyen a la variabilidad de la expresión génica.

40 45 50 En la actualidad se utilizan a grandes rasgos dos clases de métodos para estudiar la estructura de los cromosomas. Un método es la captura de conformación del cromosoma (3C) (Dekker et al., 2002, *Science* 295: 1306-1311) y sus variantes, lo más notablemente Hi-C (Duan et al., 2010, *Nature* 465 (7296):363-7; Lieberman-Aiden et al., 2009, *Science* 326: 289-293). La 3C es una técnica bioquímica que mide la frecuencia de las interacciones físicas directas entre los locus genómicos en las poblaciones de células. Aunque la encarnación de Hi-C del método produce información sobre todo el genoma en estas interacciones, tiene una serie de inconvenientes. Por ejemplo, no produce datos a partir de una única célula, no da ninguna información sobre la expresión, y solo ofrece la probabilidad de una interacción en vez de la estructura cromosómica *per se*.

55 La otra estrategia es la FISH en el ADN, que implica la detección de sondas marcadas con fluorescencia que se hibridan selectivamente con regiones pequeñas o grandes de ADN (o incluso cromosomas enteros). Esta estrategia es más directa, pero los estudios hasta ahora se han centrado tan solo en unos pocos locus, lo que limita su alcance. Más importante aún, las duras condiciones necesarias para desnaturalizar el ADN cuando se prepara para la FISH en el ADN provocan la degradación significativa del ARN, lo que imposibilita por lo general su combinación con métodos de FISH en el ARN, salvo para las dianas muy abundantes (Chaumeil et al., 2006, *Genes Dev* 20: 2223-2237), o la utilización de métodos de amplificación de la señal que son difíciles de multiplexar (Takizawa et al.,

2008, *Genes Dev* 22: 489-498).

Existe la necesidad de un método que permita medir la expresión génica de uno o varios genes a través de FISH en el ARN mientras que se obtiene simultáneamente información estructural cromosómica relacionada con los cromosomas. La presente invención satisface esta necesidad.

5 Breve compendio de la invención

La presente invención hace referencia a un método *in vitro* para determinar la conformación estructural de un cromosoma en una célula. El método *in vitro* incluye la etapa de hibridación de numerosas secuencias diana de ARN en la célula con miembros de al menos un conjunto de sondas oligonucleotídicas marcadas con fluorescencia, en donde las numerosas secuencias diana de ARN se transcriben desde porciones de al menos un cromosoma, y en donde el patrón de las sondas marcadas con fluorescencia que se hibridan con las secuencias diana de ARN es indicativo de la conformación estructural del cromosoma, en donde el ARN diana es ARNm, y en donde la secuencia de ARNm diana es al menos una porción de un intrón de la secuencia del ARNm. En una realización, la localización de las sondas hibridadas es indicativa a la vez de la localización cromosómica de la expresión génica del ARN transcrito. En otra realización, el número, la intensidad, o las dos cosas, de las sondas fluorescentes es indicativo del nivel de expresión génica en la localización cromosómica. Aún en otra realización, cada conjunto de conjuntos de sondas oligonucleotídicas marcadas con fluorescencia están marcadas con un fluoróforo diferente, lo que da lugar a un color diferente y diferenciable cuando se mide la fluorescencia. Aún en otra realización, el método *in vitro* incluye la etapa de contar los puntos fluorescentes que corresponden a moléculas únicas del ARN diana para obtener un perfil de expresión génica que se corresponde con la conformación cromosómica asociada que se determina a la vez. En otra realización, las sondas no están solapadas. En otra realización, la hibridación de la sonda se produce en el núcleo de la célula. En otra realización, la célula es una célula viva. En otra realización, las secuencias diana de ARN son de ARN endógeno. En otra realización, la célula es una célula de mamífero, una célula de invertebrado, una célula de levadura o una bacteria. En otra realización, la célula es una célula de humano. En otra realización, la célula es una célula cancerosa. En otra realización, el ARN diana es ARNm. En otra realización, el ARNm diana es al menos una porción de un intrón de la secuencia del ARNm. En otra realización, el ARN diana es un ARN no codificante (ncRNA, por su nombre en inglés). También se describe un ensayo para determinar la conformación estructural de un cromosoma en una célula. El ensayo incluye la hibridación de numerosas secuencias diana de ARNm en la célula con miembros de numerosos conjuntos de sondas oligonucleotídicas marcadas con fluorescencia, en donde cada conjunto de sondas utiliza un color distinguible, las numerosas secuencias diana de ARNm se transcriben desde porciones de al menos un cromosoma, y el patrón de sondas marcadas con fluorescencia que están hibridadas a las secuencias diana de ARNm es indicativa de la conformación estructural del cromosoma. En una realización, el ensayo incluye la localización de las sondas hibridadas es indicativa a la vez de la localización cromosómica de la expresión génica del ARNm transcrito. En otra realización, el número, la intensidad, o las dos cosas, de las sondas fluorescentes es indicativo del nivel de expresión génica en la localización cromosómica. Aún en otra realización, el ensayo incluye la etapa de contar los puntos fluorescentes que corresponden a moléculas únicas del ARNm diana para obtener un perfil de expresión génica que se corresponde con la conformación cromosómica asociada que se determina a la vez. En otra realización, las sondas no están solapadas. En otra realización, la hibridación de la sonda se produce en el núcleo de la célula. En otra realización, la célula es una célula viva. En otra realización, las secuencias diana de ARNm se transcriben desde un gen endógeno. En otra realización, la célula es una célula de mamífero, una célula de invertebrado, una célula de levadura o una bacteria. En otra realización, la célula es una célula de humano. En otra realización, la célula es una célula cancerosa. En otra realización, la secuencia del ARNm diana es al menos una porción de un intrón de la secuencia del ARNm.

Breve descripción de los dibujos

45 Con el propósito de ilustrar la invención, en los dibujos se representan determinadas realizaciones de la invención. No obstante, la invención no está limitada a las organizaciones concretas ni a la intermediación de las realizaciones representadas en los dibujos.

En la figura 1, que comprende las figuras 1A a 1C, se representa la detección de la estructura cromosómica y la expresión génica en una única célula. En la figura 1A se representan los intrones marcados en el sitio de transcripción, lo que produce información sobre la localización del gen diana, así como sobre su nivel de expresión. Al emplear un esquema codificado de combinación de colores (con seudocolores), se pueden detectar docenas, o incluso cientos, de genes por separado a lo largo del cromosoma. En la figura 1B se representan 18 genes del cromosoma 19 sobre los que se ha actuado selectivamente. El primer tercio del cromosoma está en rojo, el tercio central en verde, y el último tercio en fucsia. Los dos cromosomas tienen una configuración parecida en el núcleo, en la que el primer tercio está alojado entre los tercios central y final. En la figura 1C se representa la hibridación selectiva y simultánea del cromosoma 19 (azul verdoso) y los ARN mensajeros de EEF2 (fucsia) en la misma célula, lo que demuestra la capacidad para detectar a la vez cromosomas, genes y una única molécula de ARN en una única célula.

60 La figura 2, que comprende las figuras 2A y 2B, es una representación de la detección en una única molécula de translocaciones cromosómicas y del transcrito de fusión resultante. En la figura 2A se representan los transcritos de

una célula normal y los transcritos de fusión de una célula cancerosa. Al marcar ambos extremos de la fusión con colores diferentes, los transcritos de fusión se pueden detectar directamente *in situ* al mismo tiempo que se detecta la anomalía cromosómica que lo ocasiona (figura 2B).

5 En la figura 3, que comprende las figuras 3A a 3I, se representa una demostración de un esquema de pseudocoloreado para medir la actividad transcripcional y la posición de 20 genes a la vez. En la figura 3A se representa un esquema para la marcación única de varios genes diferentes a lo largo de un cromosoma dentro de una única célula mediante el uso de combinaciones de fluoróforos para los oligonucleótidos. En la figura 3B se representa un esquema para la marcación única de 20 genes diferentes mediante el uso de combinaciones de 2 o 3 fluoróforos de una paleta de 5 fluoróforos distintos desde el punto de vista espectral. En la figura 3C se representa una tinción del núcleo con DAPI. En las figuras 3D a 3H se representan imágenes de fluorescencia bruta en los 5 canales de color verdadero para los 20 genes marcados con el esquema de pseudocoloreado de la figura 3B. En la figura 3I se representa la imagen con DAPI del núcleo superpuesta sobre los puntos pseudocoloreados resultantes que se han identificado por ordenador. El color de los puntos representa en qué lugar del cromosoma está localizado el gen concreto.

15 En la figura 4, que comprende las figuras 4A a 4C, se representa un esquema para medir directamente la transcripción de los cromosomas translocados. En la figura 4A se representa un diagrama que muestra el cariotipo del cromosoma 19 en las células HeLa, las cuales contienen dos copias intactas del cromosoma 19 y una copia que se ha dividido, con una sección fusionada al cromosoma 13 y la otra fusionada al cromosoma 6. En la figura 4B se representa la medición de la actividad transcripcional instantánea por cromosoma a través del aislamiento de cada uno de los cromosomas y fragmentos de cromosoma. En la figura 4C se representa un cuadro que muestra la actividad transcripcional medida para los 20 genes a lo largo del cromosoma 19. La tasa de transcripción de los genes de la porción del cromosoma 19 fusionada al cromosoma 13 se halló que era mayor que la de los genes del cromosoma 19 intacto, mientras que la porción del cromosoma 19 que está fusionada con el cromosoma 6 se halló que se transcribía aproximadamente lo mismo que dichos genes en el cromosoma 19 intacto.

25 En la figura 5, que comprende las figuras 5A a 5D, se representa la imagen en vivo de una molécula de ARN endógeno. En la figura 5A se representa una célula S2 de *Drosophila melanogaster* viva, en donde el núcleo y el ARN de roX2 son tal y como está marcado, en la cual se han introducido las sondas contra roX2 en la célula. En la figura 5B se representa la tinción con DAPI (núcleo) de estas células S2 después de la fijación. En la figura 5C se representan las señales de FISH que corresponden a roX2 en las mismas células fijadas que en la figura 5B. En la figura 5D se representa la señal de la imagen en vivo que permanece en las mismas células fijadas que en las figuras 5B a 5C.

30 En la figura 6, que comprende las figuras 6A a 6B, se representa una demostración de la detección de un sitio de transcripción de ARN endógeno con sondas introducidas en las células vivas. En concreto, se ha actuado selectivamente sobre el ARN del gen de MtnA. En la figura 6A se representan los puntos que corresponden a los sitios de transcripción de MtnA seleccionados con la sonda. En la figura 6B se representan los mismos transcritos de MtnA marcados con sondas para FISH en el ARN después de la fijación. La intensa colocalización demuestra que se están hibridado selectivamente los transcritos correctos.

35 En la figura 7 se representa la rápida degradación con el tiempo de los puntos de ARN intrónico en las células HeLa mediante la inhibición de la transcripción con actinomycin D. Prácticamente, todo el ARN intrónico desapareció o disminuyó enormemente su intensidad al cabo de de 30 minutos de exposición a la actinomycin D. El ARNm maduro se observó en todos los puntos de tiempo, lo que indica que las células todavía estaban vivas y que el tratamiento no afectó al propio ARN. Juntos, los resultados demuestran que el ARN intrónico se degrada rápidamente; así pues, la presencia de un punto de ARN intrónico indica que el gen deseado está activo desde el punto de vista transcripcional.

45 En la figura 8 se representa cómo la marcación del ARNm de la ciclina A2 permite la detección de las células en las fases S, G2 y M del ciclo celular. Se incubó Click-iT EdU en el interior de las células antes de la fijación para demostrar que las células con alta tasa de expresión estaban en la fase S-M, y se halló que cada célula que muestra la señal de Click-iT EdU tenía niveles altos del ARNm de ciclina A2. Este resultado muestra que el ARNm de la ciclina A2 proporciona un marcador fuerte para determinadas fases del ciclo celular. Las células con poca cantidad de ciclina A2 se seleccionaron para el estudio, ya que no se habían replicado.

Descripción detallada

La presente invención hace referencia a métodos *in vitro* para medir la estructura cromosómica y la expresión génica, tal y como está definido en las reivindicaciones adjuntas. También se describe un ensayo para determinar la organización espacial de la expresión génica en el núcleo. El ensayo se puede utilizar junto con entornos de trabajo computacional y analítico. En otra realización, el ensayo se puede utilizar para determinar la función que desempeña la organización espacial de la expresión génica en las enfermedades.

La presente invención también incluye un método *in vitro* basado en la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, por su nombre en inglés) que produce a la vez información sobre la posición física y sobre la expresión de cada uno

de los genes. Al iluminar un gran número de dianas en un cromosoma concreto mediante el uso de un esquema con código de colores, se puede determinar la estructura a gran escala de un cromosoma entero. En una realización, el método *in vitro* incluye la medición de la expresión de genes concretos o seleccionados, mientras que se determina a la vez la estructura del cromosoma, lo que proporciona una «matriz de expresión posicional *in situ*» a mesoescala.

5 Los métodos *in vitro* de la presente invención también se pueden comparar con los modelos biofísicos para la estructura de un cromosoma, mientras que también se desarrollan herramientas analíticas para conocer la relación entre la estructura y la expresión génica. Los métodos también se pueden utilizar *in vivo* y de esta forma dar a conocer, para la detección de ambos, una descripción dinámica detallada de la estructura de un cromosoma junto con la expresión de muchos genes en las células vivas, en donde se pueden detectar en las células humanas vivas

10 una gran cantidad de locus cromosómicos y someterlos al análisis al microscopio a cámara rápida. Así pues, la presente invención hace referencia a un método *in vitro* de FISH en el ARN con código de colores que está dirigido selectivamente a los locus de ADN del cromosoma, lo que produce simultáneamente y con eficacia datos sobre la estructura de un cromosoma y la expresión de muchos genes.

Definiciones

15 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material parecidos o equivalentes a los descritos en la presente memoria se puede utilizar para poner en práctica o para comprobar la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos.

20 Tal y como se emplea en esta memoria, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado a él en este apartado.

Los artículos «un» y «una» se utilizan en la presente memoria para hacer referencia a uno o más de uno (a saber, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o más de un elemento.

25 «Aproximadamente», tal y como se emplea en esta memoria cuando se hace referencia a un valor medible tal como una cantidad, una duración temporal, y similares, se entiende que abarca variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, más preferiblemente de $\pm 5\%$, incluso más preferiblemente de $\pm 1\%$, y aún más preferiblemente de $\pm 0,1\%$, del valor especificado, ya que tales variaciones son adecuadas para realizar los métodos descritos.

30 «Codificar» y «que codifica» hacen referencia a la propiedad inherente de determinadas secuencias de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, que las hace servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en los procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (a saber, ARNr, ARNt y ARNm) o bien una secuencia definida de aminoácidos, y las propiedades biológicas que resultan de ellas. Así pues, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm que corresponde al gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Se puede hacer referencia tanto a la hebra codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia del ARNm y que normalmente se da a conocer en listas de secuencias, como a la hebra no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, por codificar la proteína u otro producto del gen o el ADNc.

35 «Homólogo», tal y como se emplea en esta memoria, hace referencia a la similitud de secuencia de las subunidades entre dos moléculas poliméricas, p. ej., entre dos moléculas de ácido nucleico, p. ej., dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptidos. Cuando una posición de la subunidad en las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, p. ej., si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de posiciones concordantes u homólogas, p. ej., si la mitad (p. ej., cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias del compuesto son homólogas, entonces las dos secuencias tienen una homología del 50%, si el 90% de las posiciones, p. ej., 9 de 10, concuerdan o son homólogas, las dos secuencias comparten una homología del 90%. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 3'-ATTGCC-5' y 3'-TATGGC-5' comparten una homología del 75%.

40 Tal y como se emplea en esta memoria, la terminología «gen» y «gen recombinante» hace referencia a las moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco abierto de lectura que codifica un polipéptido de la invención. Tales variaciones alélicas naturales pueden dar lugar típicamente a una variación del 1 al 5% de la secuencia de nucleótidos de un gen dado. Los alelos alternativos se pueden identificar mediante la secuenciación del gen de interés en una serie de individuos diferentes. Esto se puede llevar a cabo con facilidad con sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético en una serie de individuos. Se pretende que estén dentro del alcance de la invención cualquiera y todas las variaciones de nucleótidos y los polimorfismos o variaciones de aminoácido resultantes que son el resultado de una variación alélica natural y que no altera la actividad funcional.

55 Una «región codificante» de un gen consiste en los restos nucleotídicos de la hebra codificante del gen y los nucleótidos de la hebra no codificante del gen que son homólogos o complementarios, respectivamente, a la región codificante de una molécula de ARNm que se produce por la transcripción del gen.

- Una «región codificante» de una molécula de ARNm también consiste en los restos nucleotídicos de la molécula de ARNm que concuerdan con una región anticodón de una molécula de ARN de transferencia durante la traducción de la molécula de ARNm, o que codifica un codón de parada. Así pues, la región codificante podría incluir restos nucleotídicos que corresponden a los restos aminoacídicos que no están presentes en la proteína madura codificada por la molécula de ARNm (p. ej., restos aminoacídicos de una secuencia señal de exportación de proteínas).
- «Codificar» y «que codifica» hacen referencia a la propiedad inherente de determinadas secuencias de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, que las hace servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (a saber, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos, y las propiedades biológicas que resultan de ellas. Así pues, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm que corresponde al gen produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Se puede hacer referencia tanto a la hebra codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia del ARNm y que normalmente se da a conocer en las listas de secuencias, como a la hebra no codificante, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc, por codificar la proteína u otro producto del gen o del ADNc.
- A menos que se especifique de otra manera, una «secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos» incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones sinónimas de cada una de ellas y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN podrían incluir intrones.
- Un «ácido nucleico aislado» hace referencia a un segmento o fragmento de ácido nucleico que ha sido separado de las secuencias que lo flanquean en el estado en que aparece de una forma natural, p. ej., un fragmento de ADN que se ha retirado de las secuencias que normalmente están adyacentes al fragmento, p. ej., las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que aparece de forma natural. La terminología también se aplica a los ácidos nucleicos, que se han purificado sustancialmente de otros componentes, que acompañan de manera natural al ácido nucleico, p. ej., ARN o ADN o proteínas, que los acompañan de forma natural en la célula. Por lo tanto, la terminología incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que está incorporado en un vector, en un plásmido o virus que se replica de manera autónoma, o en el ADN genómico de un procarionte o eucarionte, o que existe como una molécula independiente (p. ej., como un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido por PCR o por digestión con enzimas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante, que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia polipeptídica adicional.
- Una «enfermedad» es un estado de salud de un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un humano, en el que el animal no puede mantener la homeostasia, y en donde si la enfermedad no mejora, entonces la salud del animal continúa deteriorándose.
- En cambio, un «trastorno» en un animal es un estado de salud en el que el animal es capaz de mantener la homeostasia, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que lo sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no necesariamente ocasiona un empeoramiento adicional del estado de salud del animal.
- Una enfermedad o trastorno se «alivia» si se reduce la intensidad de un síntoma de la enfermedad o trastorno, la frecuencia con la que un paciente experimenta un síntoma, o ambas.
- Una «cantidad eficaz» o una «cantidad terapéuticamente eficaz» de un compuesto es la cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto beneficioso al sujeto al cual se administra el compuesto. Una «cantidad eficaz» de un vehículo de administración es la cantidad suficiente para que se fije o administre con eficacia un compuesto.
- Tal y como se emplea en esta memoria, el término «fragmento», tal y como se aplica a un ácido nucleico, hace referencia a una subsecuencia de un ácido nucleico más grande. Un «fragmento» de un ácido nucleico puede ser de al menos aproximadamente 15 nucleótidos de longitud; por ejemplo, de al menos aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 100 nucleótidos; de al menos aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nucleótidos, de al menos aproximadamente 500 a aproximadamente 1000 nucleótidos, de al menos aproximadamente 1000 nucleótidos a aproximadamente 1500 nucleótidos; o de aproximadamente 1500 nucleótidos a aproximadamente 2500 nucleótidos; o de aproximadamente 2500 nucleótidos (y cualquier valor de entero entre ellos).
- Tal y como se emplea en esta memoria, el término «fragmento», tal y como se aplica a una proteína o péptido, hace referencia a una subsecuencia de una proteína o péptido más grande. Un «fragmento» de una proteína o péptido puede ser de al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud; por ejemplo, al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud; al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud y al menos aproximadamente 400 aminoácidos de longitud (y cualquier valor entero entre ellos).
- Una «porción» de un polinucleótido significa al menos aproximadamente de quince a aproximadamente cincuenta restos nucleotídicos secuenciales del polinucleótido. Se entiende que una porción de un polinucleótido podría incluir todos los restos nucleotídicos del polinucleótido.

Tal y como se emplea en esta memoria, un «material didáctico» incluye una publicación, un registro, un diagrama o cualquier otro medio de expresión que se pueda utilizar para comunicar la utilidad de un compuesto, composición, vector o sistema de administración de la invención en el kit para efectuar el alivio de las diferentes enfermedades o trastornos citados en la presente memoria. Facultativamente, o como alternativa, el material didáctico puede describir uno o varios métodos para aliviar las enfermedades o trastornos en una célula o tejido de un mamífero. El material didáctico del kit de la invención puede, por ejemplo, ir adjunto a un envase que contiene el compuesto identificado, composición, vector o sistema de administración de la invención, o se puede expedir junto con un envase que contiene el compuesto identificado, composición, vector o sistema de administración. Como alternativa, el material didáctico puede estar expedido por separado del envase con la intención de que el material didáctico y el compuesto se utilicen cooperativamente por el destinatario.

«Aislado» significa que está alterado o retirado del estado natural. Por ejemplo, un ácido nucleico o un péptido presente de forma natural en un animal vivo no está «aislado», pero el mismo ácido nucleico o péptido separado parcialmente o por completo de los materiales coexistentes de su estado natural está «aislado». Un ácido nucleico o proteína aislados pueden existir en forma sustancialmente purificada, o pueden existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, una célula hospedadora.

«Que se produce de forma natural», tal y como se emplea en esta memoria, describe una composición que se puede hallar en la naturaleza como diferente de la que se produce de manera artificial. Por ejemplo, se produce de forma natural una secuencia de nucleótidos presente en un organismo, que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado de manera intencionada por una persona en el laboratorio.

A menos que se especifique de otra manera, una «secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos» incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones sinónimas de cada una ellas y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. La frase secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o un ARN podría también incluir intrones hasta el punto de que la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína podría en alguna versión contener uno o más intrones.

El término «polinucleótido», tal y como se emplea en esta memoria, se define como una cadena de nucleótidos. Además, los ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos. Así pues, los ácidos nucleicos y los polinucleótidos, tal y como se emplean en esta memoria, son intercambiables. El experto en la técnica tiene el conocimiento general de que los ácidos nucleicos son polinucleótidos, que se pueden hidrolizar en los «nucleótidos» monoméricos. Los nucleótidos monoméricos se pueden hidrolizar en nucleósidos. Tal y como se emplea en esta memoria, los polinucleótidos incluyen, pero sin limitarse a ellas, todas las secuencias de ácido nucleico que se obtienen por cualquiera de los medios disponibles en la técnica, que incluyen, sin limitación, medios recombinantes, a saber, la clonación de secuencias de ácido nucleico de una genoteca recombinante o un genoma celular, con el uso de la tecnología de clonación habitual y PCR™, y similares, y mediante medios sintéticos.

Tal y como se emplea en esta memoria, la terminología «péptido», «polipéptido» y «proteína» se utilizan indistintamente y hacen referencia a un compuesto que comprende restos aminoacídicos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. Una proteína o péptido debe contener al menos dos aminoácidos y no se coloca ninguna limitación en el número máximo de aminoácidos que puede comprender una secuencia de proteína o de péptido. Los polipéptidos incluyen cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos unidos uno al otro mediante enlaces peptídicos. Tal y como se emplea en esta memoria, la terminología hace referencia a ambas cadenas cortas, que también se suelen denominar en la técnica péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a cadenas más largas, que por lo general se denominan en la técnica proteínas, de las que hay muchos tipos. «Polipéptidos» incluye, por ejemplo, fragmentos biológicamente activos, polipéptidos sustancialmente homólogos, oligopéptidos, homodímeros, heterodímeros, variantes de polipéptidos, polipéptidos modificados, derivados, análogos, proteínas de fusión, entre otros. Los polipéptidos incluyen péptidos naturales, péptidos recombinantes, péptidos sintéticos, o una combinación de los mismos.

La terminología «paciente», «sujeto», «individuo», y similares, se utiliza indistintamente en la presente memoria y hace referencia a cualquier animal o células del mismo, tanto *in vitro* como *in situ*, que se prestan a los métodos descritos en la presente memoria. Preferiblemente, el paciente, sujeto o individuo es un mamífero y más preferiblemente un humano.

La terminología «tratamiento», tal y como se utiliza dentro del contexto de la presente invención, pretende incluir el tratamiento terapéutico, así como las medidas profilácticas o supresoras para la enfermedad o el trastorno. Así pues, por ejemplo, el término tratamiento incluye la administración de un agente antes o después del comienzo de una enfermedad o trastorno, y gracias a ello se previene o se retiran todos los signos de la enfermedad o trastorno. Como otro ejemplo, la administración del agente después de la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad comprende el «tratamiento» de la enfermedad.

Un tratamiento «terapéutico» es un tratamiento que se administra a un sujeto que presenta signos de enfermedad, con el propósito de disminuir o eliminar los signos.

Tal y como se emplea en esta memoria, «tratar una enfermedad o trastorno» significa la reducción de la frecuencia

con la que un paciente experimenta un síntoma de la enfermedad o trastorno. Enfermedad y trastorno se utilizan indistintamente en la presente memoria.

«Variante», como terminología que se emplea en esta memoria, es una secuencia de ácido nucleico o secuencia peptídica cuya secuencia difiere de una secuencia de referencia de ácido nucleico o una secuencia peptídica de referencia, respectivamente, pero que conserva las propiedades esenciales de la molécula de referencia. Los cambios en la secuencia de una variante de ácido nucleico podrían no alterar la secuencia de aminoácidos de un péptido codificado por el ácido nucleico de referencia, o podría dar lugar a sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos. Los cambios en la secuencia de las variantes peptídicas típicamente son escasos o conservativos, de manera que la secuencia del péptido de referencia y de la variante son muy similares de manera global y, en muchas regiones, idénticas. Un péptido variante y de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos por una o varias sustituciones, adiciones, deleciones en cualquier combinación. Una variante de un ácido nucleico o péptido puede ser uno que aparece en la naturaleza, tal como una variante alélica, o puede ser una variante que no se sabe si aparece en la naturaleza. Las variantes de ácidos nucleicos y péptidos que no aparecen de forma natural se podrían fabricar mediante técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se podrían comparar las secuencias problema. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias problema y de referencia se introducen en un ordenador, posteriormente se les designan las coordenadas, si es necesario, y se designan los parámetros del programa con el algoritmo para las secuencias. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la secuencia o secuencias problema con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros designados para el programa.

Márgenes: a lo largo de esta descripción, se pueden presentar diferentes aspectos de la invención en formato de márgenes. Se debe saber que la descripción en formato de márgenes es simplemente por comodidad y brevedad, y no se debe considerar como una limitación inflexible del alcance de la invención. De acuerdo con esto, la descripción de un intervalo se debe considerar que tiene todos los subintervalos posibles descritos específicamente, así como cada uno de los valores numéricos dentro del intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo, tal como de 1 a 6, se debe considerar que tiene los subintervalos descritos específicamente, tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como cada uno de los números contenidos en ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 2,7, 3, 4, 5, 5,3 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Descripción

Los métodos *in vitro* de la presente invención permiten iluminar directamente la estructura y la función del núcleo de una célula viva in directo mediante el uso de herramientas basadas en la fluorescencia, y utilizar después estas herramientas para construir un modelo cuantitativo y exhaustivo de la relación entre estructura y función. Las aplicaciones para la presente invención son muchas y pueden dar a conocer un mayor conocimiento de la enfermedad y del diagnóstico clínico.

La presente invención combina la riqueza de datos de imagen de una única molécula, lo que da unos datos con una calidad muy alta sobre la abundancia, localizaciones y dinámica de las biomoléculas, con la capacidad de generar más panoramas biológicos globales al medir la expresión y las posiciones de numerosos genes, lo que incluye decenas e incluso centenas de genes al mismo tiempo, mientras que también se realizan perturbaciones sistemáticas a escala genómica. Además, la generación y el análisis de la información espacial intracelular representa una nueva dirección de la biología de sistemas, dado que la inmensa mayoría de los estudios hasta la fecha se concentran principalmente en la abundancia global del ARNm o de la proteína. Mediante los métodos *in vitro* de la presente invención, se pueden generar los mapas espaciales de la estructura cromosómica y se puede crear un nuevo paradigma en el conocimiento de la importancia biológica de la organización espacial.

En el caso de los experimentos *in situ* descritos en la presente memoria, la presente invención deja el sistema sin perturbaciones en el sentido de que no se requieren modificaciones genéticas. Esto permite el cambio y la amplia adopción en una serie de contextos y, en concreto, puede mejorar el potencial de uso de los métodos *in vitro* de la presente invención en el diagnóstico clínico.

Medición de la expresión génica y determinación de la estructura cromosómica

La presente invención incluye los métodos *in vitro* para determinar la organización espacial de la expresión génica en el núcleo. El control espacial de la estructura cromosómica es una peculiaridad reguladora crítica para el control de la expresión génica, ya que puede influir de manera variable en la expresión génica de una célula a otra. El control espacial de la estructura cromosómica puede incluso dar a conocer una base estructural para la coordinación de los módulos de redes de genes dentro del núcleo. La presente invención, en combinación con marcos de trabajo computacionales y analíticos, puede dar a conocer también una nueva base para incorporar la información espacial en el conocimiento de la regulación y de la organización de la información genética, y puede expandir enormemente el conocimiento de la función que la organización espacial de la expresión génica realiza en la enfermedad y en el diagnóstico clínico.

La presente invención utiliza la visualización directa, mediciones cuantitativas y el modelado analítico y computacional para elucidar la función biológica. En una realización, la presente invención incluye un método *in vitro* basado en la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) que produce al mismo tiempo información sobre la posición física así como sobre la expresión de cada uno de los genes.

5 Por ejemplo, al iluminar al mismo tiempo un gran número de estas dianas en un cromosoma concreto mediante el uso de un esquema con código de colores, se puede extraer con eficacia la estructura a gran escala de un cromosoma entero al mismo tiempo que también se mide la expresión de dichos genes, lo que da a conocer una «matriz de expresión posicional *in situ*» a mesoescala (figura 1A). En una realización, el número de dianas puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 a 1000 dianas únicas. En otra realización, el número de dianas puede estar en el intervalo de aproximadamente 5 a 200 dianas únicas. Aún en otra realización, el número de dianas puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 a 100 dianas únicas. Como alternativa, el número de dianas puede ser de más de 1.000, de más de 5.000 o incluso de más de 10.000.

15 En una realización, estas regiones diana corresponden a la localización de un gen en un cromosoma concreto. El método *in vitro* de la presente invención permite la marcación simultánea de muchos genes y muchas localizaciones génicas al mismo tiempo, «pintando» con eficacia los cromosomas diana. En una realización, el número de genes que se puede marcar simultáneamente podría estar entre 1 y 100. En otra realización, el número de genes marcados puede estar entre 5 y 50. Aún en otra realización, el número de genes marcados puede estar entre 10 y 30. Por ejemplo, el sitio de transcripción de 20 genes únicos a lo largo de un único cromosoma en una única célula se puede detectar con sondas codificadas con colores, tal y como está descrito en otra parte de la presente memoria (figuras 1 y 4). En otra realización, estos datos sobre los puntos para 20 genes se pueden utilizar para reconstruir la conformación cromosómica de los genes que se transcriben activamente (figura 4). La presente invención da a conocer una tasa de identificación de puntos falsos por debajo del 10%, preferiblemente por debajo del 5%, e incluso más preferiblemente por debajo del 4%, por debajo del 3%, por debajo del 2%, e incluso por debajo del 1%.

25 La presente invención incluye los métodos *in vitro* para medir la expresión génica. La presencia o ausencia de un punto para un gen concreto indica si el gen se transcribe activamente en un momento concreto de tiempo. No todos los genes se expresan en cada célula porque la transcripción es en sí misma un proceso pulsátil. En una realización, la tasa global de la transcripción de un gen concreto se puede determinar mediante la cuantificación de tanto (o solo una) la frecuencia con la que se observa un punto sobre un conjunto de células, o la intensidad de los puntos observados. De principio a fin de la segregación espacial del cromosoma, la localización de cada punto y, por lo tanto, de cada gen o porción del mismo, se puede asignar a un cromosoma concreto. Con la repetición de este procedimiento para un gran número de células, la frecuencia de transcripción y la expresión génica (que es proporcional a la tasa de transcripción) se pueden determinar para cada cromosoma. Así pues, la presente invención da a conocer un mecanismo para medir la expresión génica de determinados cromosomas.

35 En otra realización, la expresión génica se puede medir para un fragmento cromosómico. Aún en otra realización, la expresión génica se puede medir para un fragmento cromosómico de resultados de la translocación de cromosomas. Por ejemplo, un fragmento cromosómico translocado se puede comparar con la copia intacta de cromosoma para determinar si la expresión génica del fragmento cromosómico es la misma o es diferente.

40 La presente invención también incluye los métodos *in vitro* para perfilar la expresión génica para cada cromosoma. Esto permite el análisis de los niveles de expresión específicos de la copia del cromosoma y, así pues, un método para el análisis de la expresión de los SNP (polimorfismos mononucleotídicos) en una única célula, lo que hasta la fecha ha sido muy difícil de conseguir. Por ejemplo, en las células normales, la diferencia entre las copias materna y paterna de un cromosoma se determina por los genes sellados. Se ha demostrado que estos genes, de los cuales los científicos solo han aislado un número pequeño, solo se transcriben de la copia materna o bien de la copia paterna, pero nunca de ambas. Tales genes se pueden utilizar como marcadores para determinar qué copia de un cromosoma concreto de interés es la copia materna y cuál es la copia paterna. En una realización, la expresión génica se puede medir en los genes sellados. Por ejemplo, al utilizar los genes sellados como marcadores, se puede determinar qué copia de un cromosoma concreto de interés es la copia materna y cuál es la copia paterna.

50 Los métodos *in vitro* de la presente invención también se pueden comparar con los modelos biofísicos de la estructura de un cromosoma, mientras que también se desarrollan herramientas analíticas para conocer la relación entre la estructura y la expresión génica. Tal y como se demuestra en la presente memoria, los cromosomas pueden adoptar una amplia gama de configuraciones, y estas configuraciones están relacionadas con la expresión génica (figura 1B). Para indagar los mecanismos moleculares que subyacen en los patrones observados, se puede utilizar una plataforma de cribado por RNAi para buscar proteínas que alteran aspectos espaciales de la expresión génica, lo que establece un nuevo nivel de sofisticación en el uso de imágenes en el cribado a gran escala.

55 Los datos generados por los métodos *in vitro* de la presente invención pueden además conectarse con el análisis cuantitativo. Por ejemplo, se pueden utilizar programas informáticos de análisis de imágenes para facilitar la extracción exacta tanto del valor de la posición como del valor de la expresión a partir de los datos del microscopio. Una vez procesados, un nivel de análisis es simplemente analizar la configuración espacial de los genes que se expresan activamente en un cromosoma. Los modelos existentes se centran principalmente en modelos poliméricos de la estructura de los cromosomas, que consisten en un paseo al azar, bucle al azar y descripciones de glóbulos

(Lieberman-Aiden et al., 2009, *Science* 326: 289-293; Cook et al., 2009, *J Cell Biol* 186: 825-834). Mientras que los datos generados por la presente invención informarán con certeza de tales modelos, la capacidad para generar y correlacionar los datos posicionales con los datos de expresión génica puede añadir una nueva dimensión importante a tales modelos, que por lo general no incorporan información sobre el estado transcripcional. Así pues, la presente invención da a conocer una plataforma y un método *in vitro* para probar hipótesis sobre las desviaciones de modelos nulos en los que la expresión no se correlaciona con la estructura, a saber, si determinados genes se expresan solo cuando el cromosoma adopta determinadas conformaciones.

Aplicaciones a células vivas y a enfermedades

La presente invención se puede utilizar también en las células vivas. A lo largo del desarrollo y la aplicación de las nuevas técnicas de detección de ácidos nucleicos *in vivo*, se pueden detectar grandes cantidades de locus cromosómicos en las células humanas vivas y someterlas al análisis a cámara rápida al microscopio. Así pues, la presente invención da a conocer tanto la detección de una descripción dinámica detallada de la estructura de un cromosoma como la expresión de muchos genes en las células vivas, lo que marca un gran avance en el campo. La presente invención también puede tener un amplio impacto en otros campos, de igual forma. Por ejemplo, la visualización directa de la estructura nuclear y la expresión génica puede incluir aplicaciones en sistemas de desarrollo, tales como *C. elegans*. También se describen métodos para tomar imágenes en vivo de las células. Por ejemplo, en las células vivas se puede introducir una sonda para la toma de imágenes en vivo, y las señales de la sonda se pueden detectar a continuación con los métodos descritos en la presente memoria. En una realización, la sonda para la toma de imágenes en vivo contiene aproximadamente de 1 a 100 oligonucleótidos marcados. En otra realización, la sonda contiene aproximadamente de 4 a 50 oligonucleótidos marcados. A continuación, las señales se pueden verificar por métodos de FISH en el ARN tal y como está descrito en la presente memoria. Los ejemplos no limitantes de la aplicación de los métodos de toma de imágenes en vivo incluyen la detección de ARN endógeno en una única célula viva o la determinación de la estructura cromosómica. Tal y como se contempla en la presente memoria, las aplicaciones de la presente invención a las enfermedades humanas incluyen la capacidad de identificar la formación de translocaciones cromosómicas estereotípicas en el cáncer. Dada la aparición generalizada de fusiones de genes en el cáncer y la capacidad de dirigir los métodos *in vitro* de la presente invención, se puede tener un conocimiento mucho más profundo de los mecanismos por los que se producen las translocaciones. Dado que la presente invención no introduce perturbaciones, también quiere decir que estos métodos *in vitro* también se pueden aplicar a los cortes de tejidos, lo que es posible que dé lugar a mejores herramientas de diagnóstico molecular gracias a la evaluación detallada de las translocaciones en los tumores. Más en general, se pueden elucidar las maneras en las que las translocaciones afectan a la expresión génica, y establecer la relación de estructura/función como un biomarcador para la enfermedad.

Por ejemplo, la presente invención se puede aplicar a muestras de tejido congeladas y a las incluidas en parafina, lo que representa un paso crucial hacia la viabilidad clínica. Al estudiar la dinámica de la propia translocación junto con las diferencias inducidas en la expresión génica a nivel de una única molécula, se puede determinar la génesis de las translocaciones específicas y cómo influyen en la expresión de los transcritos de fusión relevantes. La presente invención también se podría utilizar como diagnóstico clínico y nuevos ensayos para cribar compuestos, o junto a todos ellos. Así pues, la presente invención da a conocer un mejor conocimiento de cómo afecta la estructura del núcleo a la expresión génica mediante la visualización directa de los procesos nucleares en las células fijadas y vivas.

Método de FISH en el ARN

La presente invención incluye el uso de un método de FISH en el ARN específico y muy sensible para marcar los intrones de los genes, tal y como se muestra en la figura 1A. Se puede encontrar otra descripción y explicación de las metodologías de FISH en el ARN en la publicación de solicitud de patente en tramitación con la presente número WO/2010/030818.

Los intrones se degradan típicamente poco después de haber sido transcritos, antes de que tengan la oportunidad de alejarse del propio sitio de transcripción. Cuando se iluminan selectivamente con el método *in vitro* de FISH en el ARN de la presente invención, se puede observar un punto en el microscopio que ofrece dos tipos de información. Primero, el brillo del punto, o su presencia o su ausencia, está relacionado con la tasa instantánea de transcripción, y la localización del punto da la posición del gen, con exactitud a longitudes por debajo del límite de difracción del microscopio. Este método *in vitro* implica además el diseño de sondas para marcar simultáneamente docenas e incluso cientos de intrones espaciados a lo largo de un solo cromosoma, con lo que se crea un «cuadro puntillista» y tridimensional del cromosoma, en el que cada uno de los puntos corresponde a un único gen.

Por ejemplo, aproximadamente de 1 a 1000 sondas diferentes, cada una marcada con un fluoróforo igual o diferente, se hibridan simultáneamente a una secuencia diana de una molécula nucleotídica, tal como una molécula de ARN. En determinadas realizaciones, el número de sondas puede oscilar de 4 a 100, de 10 a 80, de 15 a 70 o de 20 a 60. Se crea un punto fluorescente que se puede detectar a partir de la fluorescencia combinada de numerosas sondas. Las sondas pueden carecer de solapamiento, lo que significa que la región de la secuencia diana con la cual se hibrida cada sonda es única (o al menos no están solapadas). Las sondas en un conjunto de 2 o más para una secuencia diana seleccionada se pueden diseñar para que se hibriden adyacentemente la una a la otra, o para que

se hibriden de forma no adyacente, con tramos de la secuencia diana, desde un nucleótido a cien nucleótidos o más, que no son complementarios a ninguna de las sondas.

De acuerdo con esto, la presente invención da a conocer un método *in vitro* para explorar una secuencia diana de moléculas del ácido nucleico, tales como, por ejemplo, ARN en una célula permeabilizada y fijada, o una célula viva, en donde dicha secuencia diana incluye al menos 2 regiones sin solapamiento de fijación a las sondas de 15 a 100 nucleótidos. El método *in vitro* puede incluir las etapas de inmersión de la célula en un exceso de al menos 30 sondas de hibridación de ácido nucleico, cada una únicamente marcada con una marcación fluorescente y cada una con una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a una región de fijación a una sonda diferente de la secuencia diana, se lava la célula para retirar las sondas sin fijar, y se detecta la fluorescencia de las sondas.

Las sondas útiles en esta invención podrían ser de ADN, de ARN o mezclas de ADN y ARN. Podrían incluir nucleótidos no naturales y podrían incluir enlaces internucleotídicos que no son naturales. Los nucleótidos no naturales que incrementan la afinidad de fijación de las sondas incluyen 2'-O-metil-ribonucleótidos, por ejemplo. La longitud de las sondas útiles en esta invención puede ser aproximadamente de 15 a 40 nucleótidos para las sondas de ADN o ARN típicas de afinidad de fijación media. La longitud preferida de las sondas de ADN y de las sondas de ARN está en el intervalo de aproximadamente 15 a 20 nucleótidos, más preferiblemente de 17 a 25 nucleótidos e incluso más preferiblemente de 17 a 22 nucleótidos. En determinadas realizaciones, las sondas tienen aproximadamente 20 nucleótidos de largo. Si se incluyen los medios para incrementar la afinidad de fijación de una sonda, la sonda puede ser más corta, de tan solo siete nucleótidos, como apreciarán los expertos en la técnica. Se puede unir un fluoróforo a una sonda en cualquier posición, que incluye, sin limitación, la unión de un fluoróforo a un extremo de una sonda, preferiblemente al extremo en 3'. Las sondas se podrían incluir en una solución de hibridación que contiene las numerosas sondas en exceso, habitualmente en el intervalo de 0,2 a 1 nanogramos por microlitro. Se añade suficiente solución para cubrir y mojar la célula de tal manera que la célula quede sumergida en la solución que contiene la sonda. En otra realización, los fluoróforos se pueden incorporar en las sondas durante la síntesis automática del ADN.

En una única célula se pueden explorar de manera simultánea muchas secuencias diana de ARN, o bien más de una secuencia diana de una molécula de ARN, o una o varias secuencias de moléculas de ARN diferentes. Aún más, una secuencia diana de una molécula de ARN se puede explorar con más de un conjunto de sondas, en donde cada conjunto está marcado con un fluoróforo diferente, y los fluoróforos son diferenciables. Por ejemplo, al explorar con sondas una secuencia génica, al menos 2 sondas marcadas con verde se pueden utilizar para explorar una porción de la secuencia génica a modo de secuencia diana, y al menos 2 sondas marcadas con rojo se pueden utilizar para explorar una porción diferente de la secuencia génica a modo de secuencia diana. La utilización de más de un color para cada una de las diferentes sondas permite utilizar esquemas de códigos de colores en los métodos *in vitro* con sondas muy multiplexadas, de acuerdo con la presente invención.

Los métodos *in vitro* de la presente invención también podrían incluir la determinación de si están presentes uno o varios puntos que representan una secuencia diana. Los métodos *in vitro* de acuerdo con la presente invención también incluyen el recuento de puntos de un color dado que corresponde a una especie de ARN dada. Cuando se desea detectar más de una especie de ARN, se pueden utilizar diferentes conjuntos de sondas marcadas con diferentes fluoróforos en la misma mezcla de hibridación. Se construye un perfil de expresión génica para cada especie de ARN mediante el recuento de los puntos de diferentes colores.

Los puntos se pueden detectar con la utilización de métodos al microscopio. No es necesario utilizar un microscopio confocal, ya que es suficiente un microscopio de fluorescencia de campo amplio. Para diferenciar entre los puntos que reflejan positivamente una secuencia diana y los puntos oscuros que podrían reflejar la fluorescencia de fondo o una fijación inespecífica, los métodos *in vitro* de acuerdo con esta invención incluyen la detección. En una realización, la detección comprende la filtración de las imágenes con un filtro lapaciano de gaussiano lineal y tridimensional, y aplicar un umbral de detección. Si se representa el número de puntos en tres dimensiones para todos los umbrales que oscilan de cero a la intensidad máxima de píxeles de la imagen filtrada, hay una meseta amplia, indicativa de una región en la que el número de puntos detectados es insensible al umbral. Así pues, el método comprende además la representación del número de puntos, la determinación de las fronteras de una región meseta, y la selección del umbral preferiblemente dentro de dicha región. Se describen también conjuntos de sondas para la hibridación *in situ* que permiten la detección de cada una de las moléculas de los ARN en las células. Las sondas hacen que cada molécula emita fluorescencia con tanta intensidad que se puede observar como un punto fluorescente delgado en la microcopia de fluorescencia. Se puede utilizar un programa informático para identificar y contar todas las moléculas de ARN en la célula a partir de la imagen al microscopio. Las hibridaciones *in situ* realizadas con los conjuntos de sondas descritas más arriba permiten el análisis estructural cromosómico preciso y simple, el análisis de la expresión génica, la detección de patógenos y estados patogénicos, tales como el cáncer. Se describe también un medio legible por ordenador, que incluye instrucciones para obtener una pila tridimensional de imágenes fluorescentes bidimensionales, filtrar la pila tridimensional con un filtro tridimensional, contar un número total de puntos tridimensionales en la pila tridimensional filtrada para cada uno de los muchos umbrales de intensidad, obtener un umbral de intensidad óptimo representativo de una región meseta en un gráfico del número total de puntos tridimensionales frente al umbral de intensidad en el que se contó el número total, y utilizar el número total de puntos tridimensionales obtenidos con el umbral óptimo como representativo de las numerosas partículas fluorescentes detectadas en la pila tridimensional. Se describe también un programa informático para implementar el

algoritmo de detección de umbral, tal y como está descrito más arriba. En una realización, la determinación del umbral se consigue con el filtro laplaciano de gaussiano lineal y tridimensional. Se describe también un kit, que comprende en líneas generales un conjunto de sondas, un manual de instrucciones para realizar cualquiera de los métodos contemplados en la presente memoria y, opcionalmente, el medio legible por ordenador tal y como está descrito en la presente memoria.

Código de colores cromosómico

En otro aspecto de la presente invención, la FISH multicolores se puede utilizar para diferenciar la expresión de cada uno de los genes en el conjunto mediante el uso de un esquema de código de colores, tal y como está descrito en la figura 1A. Esto da a conocer la capacidad de discriminar tres colores fluorescentes al microscopio, lo que además da a conocer la capacidad de diferenciar hasta 5 colores de ARN al mismo tiempo. En otras realizaciones, la paleta de colores se puede expandir mediante el uso de combinaciones de 5 colores básicos para producir hasta 31 colores reales. Se debe apreciar que la presente invención no está limitada a ningún número concreto de colores y, por lo tanto, los métodos *in vitro* de la presente invención pueden utilizar cualquier tipo y número de colores diferenciables que esté disponible, bien como colores diferentes o bien mediante la combinación de colores. Aún más, el uso de FISH multicolores permite incrementar el número de genes que se desea identificar inequívocamente mediante un esquema de código de colores para marcar los cromosomas. Por ejemplo, al marcar cada punto con una secuencia no repetitiva de colores (p. ej., RRGRRBBG...) y utilizar la proximidad espacial de los puntos a modo de guía, el código permite «conectar los puntos» dentro del núcleo e identificar inequívocamente tanto la localización como el nivel de expresión de cada uno de los genes. En otras realizaciones, el código se puede construir de tal manera que tolere los «agujeros» en el código debido a la expresión variable de los genes diana. Este método *in vitro* puede dar a conocer patrones de expresión para cientos de genes, lo que constituye una forma de «micromatriz *in situ*». En otras realizaciones, se pueden colorear grupos de genes organizados por la localización o bien por la función, según el problema biológico que se estudie.

Uso el cribado por RNAi para determinar las bases moleculares de la estructura nuclear

Los métodos *in vitro* de la presente invención dan a conocer un ensayo compacto para medir la estructura cromosómica y la expresión génica. Para obtener una perspectiva de conjunto de los mecanismos moleculares subyacentes, cada gen se puede alterar sistemáticamente y se pueden medir sus efectos mediante la construcción de una plataforma de RNAi para analizar los datos de FISH de alta resolución. Tal plataforma permite crear un cuadro global de las proteínas específicas responsables de los patrones estructurales observados en los datos de FISH que son el resultado de los métodos *in vitro* de la presente invención.

El éxito final de un cribado por RNAi basado en imágenes depende de que se tenga un ensayo reproducible y sencillo, y de que se tengan los medios para analizar rápidamente el raudal de datos que la plataforma genera. El propio ensayo puede ser una versión del ensayo por FISH descrito en la presente memoria, aunque simplificado de tal manera que aumente al máximo la información, al mismo tiempo que se aumenta al máximo la robustez del ensayo y se disminuye al mínimo la complejidad del análisis. Por ejemplo, en una realización, un ensayo inicial podría incluir unas pocas regiones diferentes de un cromosoma marcado con diferentes colores, lo que proporciona datos que son relativamente simples de analizar, además de informativos. La propia adquisición de datos puede incluir una plataforma de microscopía automatizada capaz de cumplir los requisitos de los métodos de alta resolución, tales como la FISH. Con este fin, se puede demostrar en un formato de placa de 384 pocillos la capacidad que tiene el método de la FISH en el ARN para detectar diferencias espaciales sutiles de la expresión génica por FISH. En otra realización, se puede incluir una plataforma computacional que es capaz de almacenar y analizar las grandes cantidades de datos que genera un cribado con RNAi.

Aunque la presente invención hace referencia de forma general a ensayos de la estructura de un cromosoma, también se puede incluir una plataforma de alto rendimiento para cribado acoplada a la microscopía de una única molécula. Las aplicaciones de esto podrían incluir el estudio de ARN no codificantes, que se cree que modifican la cromatina y, así pues, afectan a la estructura cromosómica. En una realización, la presente invención incluye un ensayo para medir la expresión de los ARN no codificantes (ncRNA, por su nombre en inglés) al mismo tiempo que la estructura cromosómica, y a continuación el cribado de las proteínas implicadas en la respuesta.

Ejemplos experimentales

La invención se describe ahora con referencia a los ejemplos que vienen a continuación. Estos ejemplos se dan a conocer solo con propósitos ilustrativos y la invención no debe de ninguna manera considerarse limitada por estos ejemplos, sino que más bien se debe considerar que abarca cualquiera y todas las variaciones que se harán evidentes como resultado de las enseñanzas dadas a conocer en la presente memoria.

Los métodos siguientes se utilizaron para llevar a cabo los ejemplos experimentales:

Cultivo celular, fijación e hibridación *in situ* fluorescente

Los fibroblastos de prepucio humano primario (ATCC CRL 2097) o las células HeLa (donación del laboratorio de Phillip Sharp) se hicieron crecer en el medio de Eagle modificado de Dulbecco con glutamax (DMEM, Life

Technologies) complementando con penicilina/estreptomicina y suero bovino fetal al 10%. Se enriqueció el cultivo con células en la fase G0/G1 mediante el procedimiento de bloqueo doble con timidina (timidina a 2 µg/ml en el medio) y se liberaron durante una cantidad de tiempo adecuada antes de la fijación. Para fijar las células, se siguió el protocolo de Raj et al. (*Nat. Meth.* 2008, 5, 877-879). Brevemente, se fijaron las células con formaldehído al 4%/formol al 10% en la solución salina tamponada con fosfato a 1× (PBS), luego se le dieron dos enjuagues en PBS a 1×, tras lo cual las células se permeabilizaron con EtOH al 70% y se conservaron a 4 °C al menos durante una noche.

Para realizar la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), se siguió el procedimiento de Raj et al. (*Nat. Meth.* 2008, 5, 877-879) con algunas modificaciones menores. Se realizó el prelavado con un tampón de lavado que contenía formamida al 10% y citrato de sodio-solución salina a 2× (SSC), después se realizó la hibridación con la adición de la cantidad y el tipo de sonda (descrita después) adecuada en un tampón que contiene formamida al 10%, SSC a 2× y sulfato de dextrano al 10% (p/v). Se hibridaron las muestras durante una noche en una cámara humidificada mantenida a 37 °C, luego se lavó dos veces durante 30 minutos con el tampón de lavado a 37 °C (y se añade DAPI a una concentración de 50 ng/ml en el segundo lavado), y a continuación se tomaron imágenes en SSC a 2×, tal y como está descrito más adelante.

En el caso de los experimentos con actinomicina D, se incubaron las células HeLa en 2 µg/ml de actinomicina D (Sigma) durante 0, 30, 60 y 120 minutos, tras lo cual se fijaron las células y se realizó la FISH tal y como está descrito en la figura 7. La actinomicina D se mezcló exhaustivamente en el medio antes de añadirla para evitar la heterogeneidad espacial en la actividad del fármaco.

Para los experimentos con ARNasa, las células se fijaron y se permeabilizaron tal y como está descrito en líneas generales más arriba, tras lo cual se aspiró el EtOH al 70%, se lavó una vez con PBS a 1×, seguido de la adición de PBS a 1× con 10 µg/ml de ARNasa A (Sigma). Las células fijadas se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, se lavaron con PBS a 1× y a continuación se realizó la FISH como está descrito en líneas generales más arriba. Como control, se realizó exactamente el mismo procedimiento con las células en el pocillo vecino, pero no se le añadió la ARNasa A al PBS a 1× para la incubación.

Toma de imágenes y análisis de imagen

Se tomaron imágenes de todas las muestras en un microscopio invertido de fluorescencia Ti-E de Nikon con un objetivo Plan-Apo de 100× y una cámara CCD refrigerada (Pixis 1024B de Princeton Instruments). Se adquirieron secuencialmente pilas tridimensionales de imágenes fluorescentes en 6 canales fluorescentes diferentes con conjuntos de filtros para DAPI, Atto 488, Cy3, Alexa 594, Atto 647N y Atto 700. El tiempo de exposición osciló entre 2 y 3 s para la mayoría de los fluoróforos, excepto para el DAPI (que se expuso ~ 100 ms) y para el Atto 700 (que se expuso ~ 5 s, debido a que la iluminación era algo más débil en el aparato). El espaciado entre los planos consecutivos de las pilas fue de 0,3 µm.

Una vez que se adquirieron, las imágenes, se introdujeron en un flujo lineal de análisis de imagen hecho con un programa informático personalizado de reconocimiento semiautomático de puntos que está escrito en MATLAB con las siguientes series de etapas:

- 1) Los puntos candidato se identificaron primero en una imagen tridimensional al filtrar la imagen con un filtro laplaciano de gaussiano, y se tomaron como candidatos los 300 primeros puntos. En algunos casos, se eligieron las células para el análisis basándose en su fase del ciclo celular. En esos casos, se eligieron las células que tenían pocos o ningún ARNm de ciclina A2. Este método ha sido validado por otros experimentos (figura 8).
- 2) A continuación, cada candidato se ajustó a un perfil de intensidad gaussiano, con lo que se obtuvieron estimaciones precisas del centro, de la anchura y de la intensidad del punto.
- 3) Basándose en los histogramas de intensidades y anchuras, se seleccionaron a mano un subconjunto de puntos con cualidades (anchura uniforme, intensidad más alta) que eran más elevadas que las del fondo. Esto sigue el mismo espíritu que el procedimiento descrito en Raj et al. (*Nat. Meth.* 2008, 5, 877-879), en el que se eligió un umbral para separar los puntos de ARN legítimos de los puntos de ruido de fondo. En este caso, los puntos que podrían haber sido de ruido de fondo se incluyeron porque el esquema de multicolores para la asignación de puntos proporcionó otros medios con los que descartar los puntos de ruido de fondo.
- 4) Una vez que se seleccionaron los puntos, se ejecutó el programa informático que hallaba los marcadores fiables (en este caso, las sondas en los 5 colores del ARN que se hibrida selectivamente con el ARNm de SuZ12). De esta manera, se pudieron medir por separado cada uno de los desplazamientos entre los diferentes canales de fluorescencia en cada célula. A continuación, estos desplazamientos se aplicaron para alinear los puntos identificados por medios informáticos entre los diferentes canales de fluorescencia.
- 5) Tras el alineamiento, se ejecutó el programa informático que buscaba los puntos colocalizados que corresponden al esquema de pseudocoloreado concreto elegido para los intrones deseados. Se estimó que el programa informático tiene una exactitud que ronda el 75% a la hora de asignar puntos colocalizados a genes concretos en esta etapa.
- 6) Se realizó un proceso de corrección manual en el que se corrigieron los errores que el programa informático hacía a la hora de identificar los puntos. Los problemas habituales incluían la incapacidad de detectar señales tenues (pero claramente presentes) en uno de los canales de fluorescencia, y la resolución de dos puntos fluorescentes cercanos en el espacio que el filtro laplaciano de gaussiano y las etapas de identificación de candidatos habían marcado como un punto único.
- 7) Una vez que los intrones marcados de los locus de los genes se habían anotado correctamente, se

examinaron las células a mano para separar cada uno de los cromosomas. Se descartaron las células en las que los cromosomas estaban superpuestos, lo que hacía difícil asignar puntos concretos a cromosomas concretos.

Cariotipado de las células HeLa

5 El análisis de bandas G (cariotipado) se realizó en propagaciones en metafase de las células HeLa siguiendo los procedimientos estándares. Esto indicaba que las células contenían dos copias intactas del cromosoma 19 y una tercera copia completa del cromosoma 19, que se dividió en dos fragmentos y se fusionó con otros cromosomas. Un fragmento incluía la primera mitad del brazo p del cromosoma 19 y se fusionó con una gran porción del cromosoma 6. El segundo fragmento era la porción restante del cromosoma 19 (la mitad del brazo p hasta el centrómero y todo el brazo q), que estaba fusionado al brazo q del cromosoma 13. Para demostrar de manera concluyente que el cromosoma 19 estaba dividido de esta manera concreta, se realizó un análisis por FISH en el ADN sobre las mismas propagaciones en metafase con las que se realizó el análisis de bandas G. Se utilizaron sondas que se hibridaban selectivamente en el interior de las regiones 19p13 y 19q13 del cromosoma 19, cada una marcada con un fluoróforo diferente (Abbot Molecular). Los resultados confirmaron los resultados del análisis de bandas G. Este análisis se realizó en 10 células, cada una de las cuales mostró las mismas anomalías genéticas, lo que indicaba que las células no variaban mucho en esta característica concreta de unas células y otras.

Análisis Click-iT EdU de la progresión del ciclo celular

20 Para mostrar que el ARNm de la ciclina A2 era un marcador exacto de la posición del ciclo celular, se utilizó el kit Click-iT EdU Alexa Fluor 594 Imaging (Invitrogen), que incorporaba un producto químico dirigible a un ADN recién replicado. En este caso, las células se incubaron con el reactivo Click-iT EdU a 10 μ M durante 5 minutos antes de fijar las células. Se realizó el protocolo de la FISH con estas células usando una sonda del ARNm de la ciclina A2 marcada con Cy3, y tras la hibridación y las etapas de lavado, se siguieron las instrucciones dadas a conocer con el kit para la marcación con fluorescencia de la EdU incorporada.

Cultivo de las células S2 de *Drosophila*

25 Se obtuvieron las células S2 de *Drosophila* de la ATCC y se hicieron crecer en el medio completo de Schneider complementado con suero bovino fetal inactivado con calor al 10%, L-glutamina a 2 mM y penicilina/estreptomicina. Las células se subcultivaron diluyéndolas 10 veces en medio recién preparado una vez cada 3 o 4 días, una vez que el cultivo había alcanzado la confluencia.

En los experimentos en los que se indujo la expresión de *MtnA*, se añadió al medio de cultivo sulfato de cobre a una concentración final de 1 mM, y las células se incubaron durante 5 horas antes de la toma de imágenes en vivo.

Diseño de las sondas

30 Las sondas oligonucleotídicas de 20 bases se diseñaron contra los intrones utilizando el programa informático de diseño personalizado para FISH (<http://www.biosearchtech.com/stellarisdesigner/>). Cuando era posible, se intentaron diseñar 16 oligonucleótidos que se hibridaban selectivamente sobre el primer intrón del gen. Los oligonucleótidos se encargaron a Biosearch Technologies (Novato, CA), que sintetizaron los oligonucleótidos con grupos amina unidos al extremo 3'. A estos extremos 3' se les acoplaron diferentes fluoróforos orgánicos (que incluyen Atto 488 (Atto-Tec), Cy3 (GE), Alexa 594 (Invitrogen), Atto 647N (Atto-Tec), y Atto 700 (Atto-Tec)) tal y como está indicado en el texto y en la tabla 1. Las sondas se purificaron por HPLC tal y como está descrito en Raj et al. (*Nat. Meth.* 2008, 5, 877-879).

Sondas utilizadas para la toma de imágenes en vivo

40 Todas las sondas utilizadas en el estudio eran oligonucleótidos monocatenarios de 20 bases sintetizados con esqueletos de ácido nucleico modificados con 2'O-metil. Todos los oligonucleótidos tienen el colorante tetrametilrodamina (TAMRA) unido covalentemente al extremo 3'.

Las secuencias específicas utilizadas para los oligonucleótidos que se hibridan selectivamente con el ARN de *roX2* eran (5' a 3') y se recogen en la tabla 1. También está recogida en la tabla 1 la secuencia (5' a 3') de los oligonucleótidos utilizados para hibridarse selectivamente con el gen *MtnA*.

Sondas utilizadas para la FISH

50 Se realizó la FISH con sondas contra el mismo ARN diana que las sondas para la toma de imágenes en vivo, pero en donde los oligonucleótidos para la FISH se hibridaron selectivamente con diferentes secuencias dentro del ARN diana para evitar la competición entre las sondas. Todos los oligonucleótidos utilizados para la FISH eran oligonucleótidos de ADN monocatenario con una molécula fluorescente de Cy5 unida covalentemente al extremo 3' (se eligió el Cy5 porque es diferente al TAMRA desde el punto de vista espectral, que se utilizaba en las sondas para la toma de imágenes en vivo). Las secuencias para los oligonucleótidos utilizados para hibridarse selectivamente con el ARN de *roX2* para el análisis de colocación por FISH son (5' a 3') y se recogen en la tabla 1.

Las secuencias para los oligonucleótidos utilizados para hibridarse selectivamente con el ARNm de *MtnA* para el análisis de colocalización por FISH son (5' a 3') y se dan a conocer en la tabla 1.

Introducción de los oligonucleótidos para la toma de imágenes en vivo

5 Los oligonucleótidos para la toma de imágenes en vivo que son específicos de la diana de interés se introdujeron en las células S2 vivas de *Drosophila* con el sistema de transfección Neon (Invitrogen/Life Technologies). El conjunto de oligonucleótidos para la toma de imágenes en vivo se añadió directamente al tampón que contenía las células a una concentración de 0,8 μ M por oligonucleótido, y luego se realizó la microporación siguiendo esencialmente las instrucciones de los fabricantes, con 4 pulsos de 5 ms de amplitud y un voltaje de 2000 V. Las células se microporaron y a continuación se colocaron en cubreobjetos con cámaras revestidos con concanavalina A para promover la adhesión celular. La toma de imágenes comenzó al cabo de una hora.

La hibridación in situ fluorescente (FISH) después de la toma de imágenes en vivo

15 En estos experimentos, se introdujeron las sondas para la toma de imágenes en vivo tal y como está descrito más arriba. Al cabo de 6 horas, las células se fijaron siguiendo el protocolo de Raj et al. (*Nat. Meth.* 2008, 5, 877-879); brevemente, las células se fijaron en formaldehído al 4% en la solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 1 \times , se lavaron dos veces en PBS a 1 \times y a continuación se permeabilizaron en EtOH al 70%. Después de la fijación, se llevó a cabo la hibridación, en la que se añadieron aproximadamente 0,2 ng/ μ l (concentración oligonucleotídica total) de la sonda para FISH a la solución de hibridación, se hibridó durante 1 hora y a continuación se lavó dos veces con un tampón de lavado que contenía citrato de sodio-solución salina (SSC) a 2 \times y formamida al 10%, y se le añadió DAPI al segundo lavado y después se lavó. Se añadió SSC a 2 \times a las muestras, de las cuales se tomaron imágenes tal y como está descrito más adelante.

Toma de imágenes en vivo del ARN

25 Se realizó la toma de imágenes de todas las muestras en un microscopio invertido de fluorescencia Leica DMI6000B con un objetivo Plan-Apo de 100 \times y una cámara CCD refrigerada (Pixis 1024B de Princeton Instruments). Se utilizó un conjunto de filtros optimizado para el fluoróforo TAMRA. Se utilizaron tiempos de exposición de 2 s y el número de exposiciones se limitó a 10 para evitar la fototoxicidad. En algunos casos, se adquirieron una serie de cortes ópticos que corresponden a diferentes planos focales (una pila z) para tomar un juego completo de imágenes de todas las partes de la célula; con un espaciado de 0,3 μ m entre los cortes ópticos.

30 En los experimentos donde se tomaron imágenes simultáneamente de la sonda para la toma de imágenes en vivo y de la señal de FISH que está sobre el mismo ARN, se adquirieron pilas z secuenciales con filtros que pueden distinguir el TAMRA (sonda para la toma de imágenes en vivo) del Cy5 (sonda para la FISH), con lo que se permite la colocalización de las señales.

Tabla 1.

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
DHPS_int_1	ctagtaccgcggttggtcta	ATTO647N	SEQ ID NO: 1
DHPS_int_2	cagagtgcaaaatccccttc	ATTO700	SEQ ID NO: 2
DHPS_int_3	taccgtaccagcatgtaact	Alexa594	SEQ ID NO: 3
DHPS_int_4	cacaccaagaatcagtcctc	ATTO647N	SEQ ID NO: 4
DHPS_int_5	gcccatccagaaagcttta	ATTO700	SEQ ID NO: 5
DHPS_int_6	cctcccatatcctcccttaa	Alexa594	SEQ ID NO: 6
DHPS_int_7	tctaaattcaagaaccgcc	ATTO647N	SEQ ID NO: 7
DHPS_int_8	atctccttcagatccggtc	ATTO700	SEQ ID NO: 8
DHPS_int_9	ggctccagaaacagatttca	Alexa594	SEQ ID NO: 9
DHPS_int_10	taaatcccagactcaggact	ATTO647N	SEQ ID NO: 10

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
DHPS_int_11	aaggccaagtcaagtaag	ATTO700	SEQ ID NO: 11
DHPS_int_12	ataactgcattgccattga	Alexa594	SEQ ID NO: 12
DHPS_int_13	tgactctatgaggagctc	ATTO647N	SEQ ID NO: 13
DHPS_int_14	agtgaattggccaagaag	ATTO700	SEQ ID NO: 14
DHPS_int_15	cagagatagtctggaggag	Alexa594	SEQ ID NO: 15
DHPS_int_16	gctaagtgtgccttactg	ATTO647N	SEQ ID NO: 16
DNMT1_int_1	gaatccacggtccatttg	ATTO700	SEQ ID NO: 17
DNMT1_int_2	cttgctgtattgggatca	Cy3	SEQ ID NO: 18
DNMT1_int_3	catcgagatgcacagcttg	Alexa594	SEQ ID NO: 19
DNMT1_int_4	gtgacatccgtctctggagg	ATTO700	SEQ ID NO: 20
DNMT1_int_5	aaggagcaagaaccacacag	Cy3	SEQ ID NO: 21
DNMT1_int_6	aatgcacggttaaagttcct	Alexa594	SEQ ID NO: 22
DNMT1_int_7	caggcacagattacaggaa	ATTO700	SEQ ID NO: 23
DNMT1_int_8	agccagtctcattagcaag	Cy3	SEQ ID NO: 24
DNMT1_int_9	acacactaaagaacacacccc	Alexa594	SEQ ID NO: 25
DNMT1_int_10	gatcctgtgcacggaagt	ATTO700	SEQ ID NO: 26
DNMT1_int_11	aatgaactgatggcgttcat	Cy3	SEQ ID NO: 27
DNMT1_int_12	cacacctcacttgaacaagt	Alexa594	SEQ ID NO: 28
DNMT1_int_13	gtgagggtcctctgactca	ATTO700	SEQ ID NO: 29
DNMT1_int_14	ttcacaaatccagctggaa	Cy3	SEQ ID NO: 30
DNMT1_int_15	cccaaagacccaaatcagaa	Alexa594	SEQ ID NO: 31
DNMT1_int_16	ggggtgaaccaaatacca	ATTO700	SEQ ID NO: 32
EEF2_int_1	attactacgcctgccacatc	Cy3	SEQ ID NO: 33
EEF2_int_2	cggcagaaaatcgatctcaa	ATTO647N	SEQ ID NO: 34
EEF2_int_3	ctttgctcgttctgccattc	Cy3	SEQ ID NO: 35
EEF2_int_4	ctttgtacatctgggagtca	ATTO647N	SEQ ID NO: 36

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
EEF2_int_5	acacctcgtgtctcaataag	Cy3	SEQ ID NO: 37
EEF2_int_6	cgagcaagaagcttcatcat	ATTO647N	SEQ ID NO: 38
EEF2_int_7	acgtaagggatgaatcctct	Cy3	SEQ ID NO: 39
EEF2_int_8	actaaagtctcattggggc	ATTO647N	SEQ ID NO: 40
EEF2_int_9	tgagtgtcaacagatttct	Cy3	SEQ ID NO: 41
EEF2_int_10	ggaaccaccgtaatagggtg	ATTO647N	SEQ ID NO: 42
EEF2_int_11	gaatcttgccagcctaacac	Cy3	SEQ ID NO: 43
EEF2_int_12	gttcagtccaacgaaccag	ATTO647N	SEQ ID NO: 44
EEF2_int_13	ctcgtgattccaggaacac	Cy3	SEQ ID NO: 45
EEF2_int_14	gaaagagacgttgccaagtc	ATTO647N	SEQ ID NO: 46
EEF2_int_15	ggactgaacctcactcattc	Cy3	SEQ ID NO: 47
EEF2_int_16	agatattgtaggagtggggg	ATTO647N	SEQ ID NO: 48
EGLN2_int_1	aactgcctaaacctctgtg	ATTO700	SEQ ID NO: 49
EGLN2_int_2	gtccccacaagtaagcatac	ATTO647N	SEQ ID NO: 50
EGLN2_int_3	atcaggtgcacacattaagg	ATTO700	SEQ ID NO: 51
EGLN2_int_4	aaagtcaagaaccactgtgg	ATTO647N	SEQ ID NO: 52
EGLN2_int_5	gaatgtcagcagctctcatg	ATTO700	SEQ ID NO: 53
EGLN2_int_6	gacagacagcaacagagaac	ATTO647N	SEQ ID NO: 54
EGLN2_int_7	gatggactagaaacatgggc	ATTO700	SEQ ID NO: 55
EGLN2_int_8	ccacctgaagacaatgat	ATTO647N	SEQ ID NO: 56
EGLN2_int_9	cagaagcagaacccaagatg	ATTO700	SEQ ID NO: 57
EGLN2_int_10	gctcagctatcaagtaacgg	ATTO647N	SEQ ID NO: 58
EGLN2_int_11	gtattccgtggatcagcaaa	ATTO700	SEQ ID NO: 59
EGLN2_int_12	gtcccaaccacatagaaag	ATTO647N	SEQ ID NO: 60
EGLN2_int_13	tccttactccctaggacaa	ATTO700	SEQ ID NO: 61
EGLN2_int_14	cccatctaaaagcgggaaag	ATTO647N	SEQ ID NO: 62

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
EGLN2_int_15	gagtacaggagagagtccag	ATTO700	SEQ ID NO: 63
EGLN2_int_16	cagaacgactaagaagcacg	ATTO647N	SEQ ID NO: 64
EIF3K_int_11	gattctctcgcttctaggcc	ATTO700	SEQ ID NO: 65
EIF3K_int_2	cgaagagactgagtgtacc	ATTO488	SEQ ID NO: 66
EIF3K_int_3	aaggaaacctaaggcaatt	ATTO700	SEQ ID NO: 67
EIF3K_int_4	atgtccacctgaacactctg	ATTO488	SEQ ID NO: 68
EIF3K_int_5	tcctgaatgtctctgctact	ATTO700	SEQ ID NO: 69
EIF3K_int_6	tcagtcactgcagctgtac	ATTO488	SEQ ID NO: 70
EIF3K_int_7	taggatgcctcctcaacctc	ATTO700	SEQ ID NO: 71
EIF3K_int_8	aagctctaaactccactgga	ATTO488	SEQ ID NO: 72
EIF3K_int_9	ttcttatcccagacctctcg	ATTO700	SEQ ID NO: 73
EIF3K_int_10	gctctatccaggtagtgaat	ATTO488	SEQ ID NO: 74
EIF3K_int_11	cagccaccttatggagcaag	ATTO700	SEQ ID NO: 75
EIF3K_int_12	agacagagagctagacactt	ATTO488	SEQ ID NO: 76
EIF3K_int_13	ctagttgctgcaatgggagt	ATTO700	SEQ ID NO: 77
EIF3K_int_14	gctgcattgttcaggatact	ATTO488	SEQ ID NO: 78
EIF3K_int_15	ctagtctgacaccaagag	ATTO700	SEQ ID NO: 79
EIF3K_int_16	ctctgtcccaacttccttg	ATTO488	SEQ ID NO: 80
FBL_int_1	gacctgctggaatcagaatc	ATTO488	SEQ ID NO: 81
FBL_int_2	cctattagacggcctcaatg	ATTO700	SEQ ID NO: 82
FBL_int_3	ctctgccaatatccaaaa	Alexa594	SEQ ID NO: 83
FBL_int_4	cagatgcctgaatccaaact	ATTO488	SEQ ID NO: 84
FBL_int_5	caagcctgattcccaaaaca	ATTO700	SEQ ID NO: 85
FBL_int_6	ggtggaaatcttaatcccca	Alexa594	SEQ ID NO: 86
FBL_int_7	cgagctgttaagtctctg	ATTO488	SEQ ID NO: 87
FBL_int_8	gagtggtttcagcagaatct	ATTO700	SEQ ID NO: 88

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
FBL_int_9	accaccgagaaggattctaa	Alexa594	SEQ ID NO: 89
FBL_int_10	ttctcacacagatgagtgcg	ATTO488	SEQ ID NO: 90
FBL_int_11	taggaaaacagacccttgg	ATTO700	SEQ ID NO: 91
FBL_int_12	tcaagagatccccaacacg	Alexa594	SEQ ID NO: 92
FBL_int_13	atcacagaccagaatgcctg	ATTO488	SEQ ID NO: 93
FBL_int_14	cattctaccacacatggagg	ATTO700	SEQ ID NO: 94
FBL_int_15	gagctaacacctgacaactt	Alexa594	SEQ ID NO: 95
FBL_int_16	ctcactcaggctaaaatcct	ATTO488	SEQ ID NO: 96
ILF3_int_1	atgcttggaaaaggctaca	ATTO488	SEQ ID NO: 97
ILF3_int_2	actgactcgttcctactact	ATTO700	SEQ ID NO: 98
ILF3_int_3	ggacaagcaaactgaaaagc	ATTO647N	SEQ ID NO: 99
ILF3_int_4	gagcacaactgaagaaccaa	ATTO488	SEQ ID NO: 100
ILF3_int_5	tatcgctcgtgtgtaaagc	ATTO700	SEQ ID NO: 101
ILF3_int_6	tgacaattcagaatgatgc	ATTO647N	SEQ ID NO: 102
ILF3_int_7	agcccaacgttcacatcttta	ATTO488	SEQ ID NO: 103
ILF3_int_8	agaggctggagtctctaga	ATTO700	SEQ ID NO: 104
ILF3_int_9	aattcagtctgaccacaacc	ATTO647N	SEQ ID NO: 105
ILF3_int_10	atcctcaatcagcatgccta	ATTO488	SEQ ID NO: 106
ILF3_int_11	tggtgtcacctactgagaa	ATTO700	SEQ ID NO: 107
ILF3_int_12	cacagaatctctgtggcttg	ATTO647N	SEQ ID NO: 108
ILF3_int_13	cttatgaccctgcagtcag	ATTO488	SEQ ID NO: 109
ILF3_int_14	acgtgaagtttatgccaat	ATTO700	SEQ ID NO: 110
ILF3_int_15	tctatctagccatccatcca	ATTO647N	SEQ ID NO: 111
ILF3_int_16	gctttgatccaatggaaga	ATTO488	SEQ ID NO: 112
MARK4_int_1	gacctgaagaagccagaaa	ATTO488	SEQ ID NO: 113
MARK4_int_2	cctgaagctgagaagttgat	Cy3	SEQ ID NO: 114

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
MARK4_int_3	caagggaaaaggctgaaa	ATTO647N	SEQ ID NO: 115
MARK4_int_4	gagaaagctccagcagatt	ATTO488	SEQ ID NO: 116
MARK4_int_5	aggcaaggggtctagaaat	Cy3	SEQ ID NO: 117
MARK4_int_6	agatgaataaaggctgagcc	ATTO647N	SEQ ID NO: 118
MARK4_int_7	ctggaagtatgggtaggaa	ATTO488	SEQ ID NO: 119
MARK4_int_8	tcctaggaatcagagaagg	Cy3	SEQ ID NO: 120
MARK4_int_9	ggaatggtgaaagtgacaa	ATTO647N	SEQ ID NO: 121
MARK4_int_10	tgatcagagacacaggagat	ATTO488	SEQ ID NO: 122
MARK4_int_11	gcaggctttggaagtgatc	Cy3	SEQ ID NO: 123
MARK4_int_12	tggggagaagtctaggattg	ATTO647N	SEQ ID NO: 124
MARK4_int_13	gatctgcaagatgaggaagg	ATTO488	SEQ ID NO: 125
MARK4_int_14	actccaaattggagtctgg	Cy3	SEQ ID NO: 126
MARK4_int_15	attgtagtaccaaggaaca	ATTO647N	SEQ ID NO: 127
MARK4_int_16	ctgaatcgagtaagccttg	ATTO488	SEQ ID NO: 128
PPP2R1A_int_1	caaccggggagataagagac	Cy3	SEQ ID NO: 129
PPP2R1A_int_2	cctacttgagcaagtcag	Alexa594	SEQ ID NO: 130
PPP2R1A_int_3	aattaggatggcaggccttc	Cy3	SEQ ID NO: 131
PPP2R1A_int_4	aaaatgagagggcggaggaag	Alexa594	SEQ ID NO: 132
PPP2R1A_int_5	cgctctcttaggacacctaa	Cy3	SEQ ID NO: 133
PPP2R1A_int_6	gctcctaaactggctagtc	Alexa594	SEQ ID NO: 134
PPP2R1A_int_7	tatcctggtaatgggagga	Cy3	SEQ ID NO: 135
PPP2R1A_int_8	gcttagcaaatccctcaacc	Alexa594	SEQ ID NO: 136
PPP2R1A_int_9	catcccataaccaggaatgt	Cy3	SEQ ID NO: 137
PPP2R1A_int_10	cctcttaatcaccactccc	Alexa594	SEQ ID NO: 138
PPP2R1A_int_11	aacagacctaaaggaggat	Cy3	SEQ ID NO: 139
PPP2R1A_int_12	gtttggcaggttaccagtg	Alexa594	SEQ ID NO: 140

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
PPP2R1A_int_13	tataccaggaacctaggagg	Cy3	SEQ ID NO: 141
PPP2R1A_int_14	tccccagcatcatatctcat	Alexa594	SEQ ID NO: 142
PPP2R1A_int_15	tatagcaactgggtctcca	Cy3	SEQ ID NO: 143
PPP2R1A_int_16	cctgttcacatctggatcc	Alexa594	SEQ ID NO: 144
PTBP1_int_1	gaatgcgaaacatctccagc	Cy3	SEQ ID NO: 145
PTBP1_int_2	aaacttctcaggaaaacgga	ATTO700	SEQ ID NO: 146
PTBP1_int_3	ctctctgacaccacagact	Cy3	SEQ ID NO: 147
PTBP1_int_4	gggggaaggtggatagaaag	ATTO700	SEQ ID NO: 148
PTBP1_int_5	gaacacagcctcagttactg	Cy3	SEQ ID NO: 149
PTBP1_int_6	ctgaaactggcaaaactcaca	ATTO700	SEQ ID NO: 150
PTBP1_int_7	gtgcttccagtaagtggga	Cy3	SEQ ID NO: 151
PTBP1_int_8	cacgtccaagacaaaagaca	ATTO700	SEQ ID NO: 152
PTBP1_int_9	ccactgactgcaactgaa	Cy3	SEQ ID NO: 153
PTBP1_int_10	cgctagagaaagctcagaag	ATTO700	SEQ ID NO: 154
PTBP1_int_11	cggagaagcaaagtgagaag	Cy3	SEQ ID NO: 155
PTBP1_int_12	aactccagattccagaccaa	ATTO700	SEQ ID NO: 156
PTBP1_int_13	tgacagcaagaaccgaagag	Cy3	SEQ ID NO: 157
PTBP1_int_14	taggctggattctatccagg	ATTO700	SEQ ID NO: 158
PTBP1_int_15	tcaaccagtaaatgccatc	Cy3	SEQ ID NO: 159
PTBP1_int_16	cccttctcacatgctgag	ATTO700	SEQ ID NO: 160
RPL18A_int_1	gtgggtgcaacaagagaag	ATTO488	SEQ ID NO: 161
RPL18A_int_2	ctatgctgcgcgacttattc	ATTO647N	SEQ ID NO: 162
RPL18A_int_3	ttcatctgctctcacagc	ATTO488	SEQ ID NO: 163
RPL18A_int_4	tatgtaccacagcgtaagc	ATTO647N	SEQ ID NO: 164
RPL18A_int_5	ccatagagccgttgattct	ATTO488	SEQ ID NO: 165
RPL18A_int_6	agtcaggttctctatctc	ATTO647N	SEQ ID NO: 166

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
RPL18A_int_7	agctggagatctggacataa	ATTO488	SEQ ID NO: 167
RPL18A_int_8	cctttgacagcaaggaaacc	ATTO647N	SEQ ID NO: 168
RPL18A_int_9	gttcaggaagggacaatgg	ATTO488	SEQ ID NO: 169
RPL18A_int_10	tttactgtgaacctgacctc	ATTO647N	SEQ ID NO: 170
RPL18A_int_11	aaaccacctctgaaactgac	ATTO488	SEQ ID NO: 171
RPL18A_int_12	aatctttggtcaagtccagg	ATTO647N	SEQ ID NO: 172
RPL18A_int_13	ggttacagatgcagagggtg	ATTO488	SEQ ID NO: 173
RPL18A_int_14	aactgcaatccaacgtttg	ATTO647N	SEQ ID NO: 174
RPL18A_int_15	agaactaggacaagacctca	ATTO488	SEQ ID NO: 175
RPL18A_int_16	catcttcttccacctgagg	ATTO647N	SEQ ID NO: 176
RPS19_int_1	tctggatcgactaacagag	Cy3	SEQ ID NO: 177
RPS19_int_2	catcctaaaccggtgacctc	ATTO488	SEQ ID NO: 178
RPS19_int_3	ggagaaagtcaagcatgtga	Cy3	SEQ ID NO: 179
RPS19_int_4	ttgaacctcagtccccaaa	ATTO488	SEQ ID NO: 180
RPS19_int_5	gtacaaagagaggctggaac	Cy3	SEQ ID NO: 181
RPS19_int_6	cctcaacacaactatgctgt	ATTO488	SEQ ID NO: 182
RPS19_int_7	ctaccccatatcccaaatgc	Cy3	SEQ ID NO: 183
RPS19_int_8	cacgattcagtcatctccac	ATTO488	SEQ ID NO: 184
RPS19_int_9	aagacaaaaacagtgggaaa	Cy3	SEQ ID NO: 185
RPS19_int_10	gaagtatggtttgtgccagg	ATTO488	SEQ ID NO: 186
RPS19_int_11	gaaagagctcagaggagaca	Cy3	SEQ ID NO: 187
RPS19_int_12	caagtggtagacacaaccaag	ATTO488	SEQ ID NO: 188
RPS19_int_13	tcgaatgtcacatcacacaa	Cy3	SEQ ID NO: 189
RPS19_int_14	aaaaactggagtaccaagt	ATTO488	SEQ ID NO: 190
RPS19_int_15	ttcatctgtctctggtttcc	Cy3	SEQ ID NO: 191
RPS19_int_16	aaaccacctgtaagcaaat	ATTO488	SEQ ID NO: 192

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
RPS9_int_1	gcttactcatggaaactcgg	ATTO488	SEQ ID NO: 193
RPS9_int_2	tcatagtacgtatctgcccc	Alexa594	SEQ ID NO: 194
RPS9_int_3	atccgatctcgcgagaataa	ATTO488	SEQ ID NO: 195
RPS9_int_4	gagagaagtgtagcgtaag	Alexa594	SEQ ID NO: 196
RPS9_int_5	atagagtacatgggcacctt	ATTO488	SEQ ID NO: 197
RPS9_int_6	gtaccaaatttagggacgg	Alexa594	SEQ ID NO: 198
RPS9_int_7	tggaatcacaacaccttct	ATTO488	SEQ ID NO: 199
RPS9_int_8	cgtagctggcacaacaactag	Alexa594	SEQ ID NO: 200
RPS9_int_9	gggagaatgaacctcacaag	ATTO488	SEQ ID NO: 201
RPS9_int_10	gacacaactctcatcactgg	Alexa594	SEQ ID NO: 202
RPS9_int_11	aaggctggttcatttatcc	ATTO488	SEQ ID NO: 203
RPS9_int_12	tttctacttcacaagtgcc	Alexa594	SEQ ID NO: 204
RPS9_int_13	acctaagaacagggcaaag	ATTO488	SEQ ID NO: 205
RPS9_int_14	aggcctatcttagctctgg	Alexa594	SEQ ID NO: 206
RPS9_int_15	gccagaaattccacttcat	ATTO488	SEQ ID NO: 207
RPS9_int_16	aaccctgtatcaccatcac	Alexa594	SEQ ID NO: 208
SLCIA5_int_1	gaggactcactgagcgaag	ATTO700	SEQ ID NO: 209
SLC1A5_int_2	tgcattttccaggaactaa	Cy3	SEQ ID NO: 210
SLCIA5_int_3	tgagcccgtattctcattga	ATTO488	SEQ ID NO: 211
SLC1A5_int_4	aattaaactcacaggaggc	ATTO700	SEQ ID NO: 212
SLC1A5_int_5	atgccaagctaacaatgctc	Cy3	SEQ ID NO: 213
SLC1A4_int_6	gtgtccatcgttaccagggc	ATTO488	SEQ ID NO: 214
SLC1A5_int_7	taggcaaagaggttagagccc	ATTO700	SEQ ID NO: 215
SLC1A5_int_8	aaggactgcagagtgtcaat	Cy3	SEQ ID NO: 216
SLC1A5_int_9	acaagtagagacctatcca	ATTO488	SEQ ID NO: 217
SLC1A5_int_10	cacctggggtgggaaaagag	ATTO700	SEQ ID NO: 218

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
SLCIA5_int_11	gagagggcagcatggaatgg	Cy3	SEQ ID NO: 219
SLC1A5_int_12	cagtttgagcaggtgaggg	ATTO488	SEQ ID NO: 220
SLC1A5_int_13	aaaggacactcagtctacct	ATTO700	SEQ ID NO: 221
SLC1A5_int_14	ctgtgggcaaggaacagatc	Cy3	SEQ ID NO: 222
SLC1A5_int_15	caaacagaatgccccgcacc	ATTO488	SEQ ID NO: 223
SLC1A5_int_16	gtgaatagaggggtcccat	ATTO700	SEQ ID NO: 224
SUPT5H_int_1	tctctgagacaatctggga	ATTO647N	SEQ ID NO: 225
SUPT5H_int_2	ccttgctgactcgact	Cy3	SEQ ID NO: 226
SUPT5H_int_3	tgttatctcactggacctga	Alexa594	SEQ ID NO: 227
SUPT5H_int_4	cttttttaggggtggtgg	ATTO647N	SEQ ID NO: 228
SUPT5H_int_5	ctctgatccaaccaaagtgg	Cy3	SEQ ID NO: 229
SUPT5H_int_6	ggaacacagtagtagatgca	Alexa594	SEQ ID NO: 230
SUPT5H_int_7	accagacacctgagaagtaa	ATTO647N	SEQ ID NO: 231
SUPT5H_int_8	ctggtttgtgattgctacct	Cy3	SEQ ID NO: 232
SUPT5H_int_9	gtgcatcaaacaagggatct	Alexa594	SEQ ID NO: 233
SUPT5H_int_10	ggcaactaacatatcctggg	ATTO647N	SEQ ID NO: 234
SUPT5H_int_11	acacagccacatgaaatctt	Cy3	SEQ ID NO: 235
SUPT5H_int_12	gcactctccatctaccaaac	Alexa594	SEQ ID NO: 236
SUPT5H_int_13	taagtgactgggacaagtca	ATTO647N	SEQ ID NO: 237
SUPT5H_int_14	ggcaatcaaagtccacaga	Cy3	SEQ ID NO: 238
SUPT5H_int_15	cactctcaaaggtcacaat	Alexa594	SEQ ID NO: 239
SUPT5H_int_16	atccagtgctacagcttaga	ATTO647N	SEQ ID NO: 240
TOMM40_int_1	atcacctcctagtgctgta	ATTO647N	SEQ ID NO: 241
TOMM40_int_2	ccatcattctaagccccaag	Alexa594	SEQ ID NO: 242
TOMM40_int_3	ctgctatgacattccatccc	ATTO647N	SEQ ID NO: 243
TOMM40_int_4	gatcacaagagaagtctggc	Alexa594	SEQ ID NO: 244

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
TOMM40_int_5	gaacaccagaacagaactcc	ATTO647N	SEQ ID NO: 245
TOMM40_int_6	cacagaattgtccaaggat	Alexa594	SEQ ID NO: 246
TOMM40_int_7	aagctgagcaactttaggtc	ATTO647N	SEQ ID NO: 247
TOMM40_int_8	ttgcttgcctcaaatctcact	Alexa594	SEQ ID NO: 248
TOMM40_int_9	tacagcctagtagacaggg	ATTO647N	SEQ ID NO: 249
TOMM40_int_10	gattccacctgtaaagaggc	Alexa594	SEQ ID NO: 250
TOMM40_int_11	cacagcagaacatctcacia	ATTO647N	SEQ ID NO: 251
TOMM40_int_12	gagaagagaaaacgctgtcac	Alexa594	SEQ ID NO: 252
TOMM40_int_13	tctggcactatatctccgag	ATTO647N	SEQ ID NO: 253
TOMM40_int_14	taggtcccaactgagtag	Alexa594	SEQ ID NO: 254
TOMM40_int_15	agagactcagagaaaggagg	ATTO647N	SEQ ID NO: 255
TOMM40_int_16	tgtgacgatactggacagat	Alexa594	SEQ ID NO: 256
UBA2_int_1	ccaagaacagtctcctccc	ATTO647N	SEQ ID NO: 257
UBA2_int_2	ttgaaggaggagataagaggc	ATTO488	SEQ ID NO: 258
UBA2_int_3	ctcctaacagccgggaattt	Alexa594	SEQ ID NO: 259
UBA2_int_4	ttaaagtcacaacatccgcg	ATTO647N	SEQ ID NO: 260
UBA2_int_5	tcgttacttcggagttacga	ATTO488	SEQ ID NO: 261
UBA2_int_6	tcgctatcattgccatcctc	Alexa594	SEQ ID NO: 262
UBA2_int_7	ctgtgagagcaatgacagtc	ATTO647N	SEQ ID NO: 263
UBA2_int_8	atgaaacaagcgagtgtacc	ATTO488	SEQ ID NO: 264
UBA2_int_9	caaaaggcacagtctcaacg	Alexa594	SEQ ID NO: 265
UBA2_int_10	aaatagcactggctgtcaa	ATTO647N	SEQ ID NO: 266
UBA2_int_11	ttaaactcacaccgaagg	ATTO488	SEQ ID NO: 267
UBA2_int_12	tgttccactagcccctaag	Alexa594	SEQ ID NO: 268
UBA2_int_13	aacctgagaactgtgaaagg	ATTO647N	SEQ ID NO: 269
UBA2_int_14	cctcccttaattcaagcctt	ATTO488	SEQ ID NO: 270

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
UBA2_int_15	ttcgaatcgccatacaccacaaa	Alexa594	SEQ ID NO: 271
UBA2_int_16	tacattagtgaggaaaagcgt	ATTO647N	SEQ ID NO: 272
UBA52_int_1	ctaaagtcagcacaacccac	ATTO700	SEQ ID NO: 273
UBA52_int_2	gagaagcaagggcaaacacag	Alexa594	SEQ ID NO: 274
UBA52_int_3	caaacgttctcagatcaca	ATTO700	SEQ ID NO: 275
UBA52_int_4	ggccaactgaggtagaagat	Alexa594	SEQ ID NO: 276
UBA52_int_5	cactacccccagtttctcaa	ATTO700	SEQ ID NO: 277
UBA52_int_6	tattactggcagtgctctct	Alexa594	SEQ ID NO: 278
UBA52_int_7	gaggctcagttagaggctct	ATTO700	SEQ ID NO: 279
UBA52_int_8	caatgctcctttcctaggac	Alexa594	SEQ ID NO: 280
UBA52_int_9	acactgaattctgtgcgctc	ATTO700	SEQ ID NO: 281
UBA52_int_10	aaggtcagacactgaagtct	Alexa594	SEQ ID NO: 282
UBA52_int_11	ccgacctctaagtggttcag	ATTO700	SEQ ID NO: 283
UBA52_int_12	gcatccatctgggttctaa	Alexa594	SEQ ID NO: 284
UBA52_int_13	ggagtctgagactgacacat	ATTO700	SEQ ID NO: 285
UBA52_int_14	cggtggaagatacactgctc	Alexa594	SEQ ID NO: 286
UBA52_int_15	gcctatagtctgctgcttc	ATTO700	SEQ ID NO: 287
UBA52_int_16	caagcatcggagcacacata	Alexa594	SEQ ID NO: 288
ZNF444_int_1	gagtcacactggtttcagg	ATTO700	SEQ ID NO: 289
ZNF444_int_2	cttctctgataagccgtgac	Cy3	SEQ ID NO: 290
ZNF444_int_3	gagaggacagctggtaactg	ATTO647N	SEQ ID NO: 291
ZNF444_int_4	tttgaacacattggggctcc	ATTO700	SEQ ID NO: 292
ZNF444_int_5	gtgccactactgaaaggatg	Cy3	SEQ ID NO: 293
ZNF444_int_6	gactgctctgactcttcacc	ATTO647N	SEQ ID NO: 294
ZNF444_int_7	ggtagcacttatgaggaac	ATTO700	SEQ ID NO: 295
ZNF444_int_8	tctctgctgctacatctcag	Cy3	SEQ ID NO: 296

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
ZNF444_int_9	catgagaagggagacggatg	ATTO647N	SEQ ID NO: 297
ZNF444_int_10	atccagacaataagagggg	ATTO700	SEQ ID NO: 298
ZNF444_int_11	cgaggatagagaagccagag	Cy3	SEQ ID NO: 299
ZNF444_int_12	cccacttttgggaacaatga	ATTO647N	SEQ ID NO: 300
ZNF444_int_13	gctgctgttgatttgta	ATTO700	SEQ ID NO: 301
ZNF444_int_14	ggatgaaagcagaggtcaag	Cy3	SEQ ID NO: 302
ZNF444_int_15	ggatgaaagcagaggtcaag	ATTO647N	SEQ ID NO: 303
ZNF444_int_16	taagtgggtcaaggtcagag	ATTO700	SEQ ID NO: 304
ZNF91_int_1	gattgtggagctgactgaag	ATTO488	SEQ ID NO: 305
ZNF91_int_2	catcttatcgctgaagggga	Cy3	SEQ ID NO: 306
ZNF91_int_3	ctgcacaatctgggagagac	Alexa594	SEQ ID NO: 307
ZNF91_int_4	gagttaggctggaggaacag	ATTO488	SEQ ID NO: 308
ZNF91_int_5	tgtaagatagctgctcta	Cy3	SEQ ID NO: 309
ZNF91_int_6	actgaagacacatcaccta	Alexa594	SEQ ID NO: 310
ZNF91_int_7	tccaagaaaaactgaagg	ATTO488	SEQ ID NO: 311
ZNF91_int_8	agagaatatgaccagaagc	Cy3	SEQ ID NO: 312
ZNF91_int_9	tcaatacctcaggtgtcct	Alexa594	SEQ ID NO: 313
ZNF91_int_10	gtccacactgagaagctaa	ATTO488	SEQ ID NO: 314
ZNF91_int_11	cactatcttctgcccccta	Cy3	SEQ ID NO: 315
ZNF91_int_12	gcaagttcttacccatcta	Alexa594	SEQ ID NO: 316
ZNF91_int_13	gtgcctcaggcacattatac	ATTO488	SEQ ID NO: 317
ZNF91_int_14	aggagactctgaactatgcc	Cy3	SEQ ID NO: 318
ZNF91_int_15	ttaagtgtcaataaccccc	Alexa594	SEQ ID NO: 319
ZNF91_int_16	tcaagtcaggccattcaatt	ATTO488	SEQ ID NO: 320
SUZ12_mRNA_1	ctccatttcggcttctca	ATTO647N	SEQ ID NO: 321
SUZ12_mRNA_2	gaggaaaagctcgtggtcag	ATTO488	SEQ ID NO: 322

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
SUZ12_mRNA_3	gatctgtgttgcttctcaa	ATTO700	SEQ ID NO: 323
SUZ12_mRNA_4	gagattccgagttcgaagaa	Cy3	SEQ ID NO: 324
SUZ12_mRNA_5	tgtgcaaaaatattggtgct	Alexa594	SEQ ID NO: 325
SUZ12_mRNA_6	tctggagtttcgatgagaca	ATTO647N	SEQ ID NO: 326
SUZ12_mRNA_7	tgagattctgtctctcttt	ATTO488	SEQ ID NO: 327
SUZ12_mRNA_8	ctgcaaatgagctgacaagc	ATTO700	SEQ ID NO: 328
SUZ12_mRNA_9	tggaagaaaccagtaaactgt	Cy3	SEQ ID NO: 329
SUZ12_mRNA_10	aagagtgaactgcaacgtag	Alexa594	SEQ ID NO: 330
SUZ12_mRNA_11	gcaataggagccgtagattt	ATTO647N	SEQ ID NO: 331
SUZ12_mRNA_12	atttctagtggaagaggtt	ATTO488	SEQ ID NO: 332
SUZ12_mRNA_13	taactgaaccaggcttgttt	ATTO700	SEQ ID NO: 333
SUZ12_mRNA_14	acagcaatagttgagtagg	Cy3	SEQ ID NO: 334
SUZ12_mRNA_15	tgttgccttgattgtgtt	Alexa594	SEQ ID NO: 335
SUZ12_mRNA_16	caggatcatcttctctcag	ATTO647N	SEQ ID NO: 336
SUZ12_mRNA_17	tcagagtacaccaagggcaa	ATTO488	SEQ ID NO: 337
SUZ12_mRNA_18	aaactataaagttgctggca	ATTO700	SEQ ID NO: 338
SUZ12_mRNA_19	tggcagagtttaagatgctt	Cy3	SEQ ID NO: 339
SUZ12_mRNA_20	cctagcacctttggatgat	Alexa594	SEQ ID NO: 340
SUZ12_mRNA_21	ggagccatcataacactcat	ATTO647N	SEQ ID NO: 341
SUZ12_mRNA_22	tatcctgaggatttctgca	ATTO488	SEQ ID NO: 342
SUZ12_mRNA_23	tgcgactaaaagcaaatcca	ATTO700	SEQ ID NO: 343
SUZ12_mRNA_24	gggttctcttaactgttcc	Cy3	SEQ ID NO: 344
SUZ12_mRNA_25	gcctgcacacaagaatatgt	Alexa594	SEQ ID NO: 345
SUZ12_mRNA_26	catgcttgctttgttcgtt	ATTO647N	SEQ ID NO: 346
SUZ12_mRNA_27	ctttgctgttctactcccc	ATTO488	SEQ ID NO: 347
SUZ12_mRNA_28	aaatacagacgattgtggcc	ATTO700	SEQ ID NO: 348

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
SUZ12_mRNA_29	agaggtaagcaggatcact	Cy3	SEQ ID NO: 349
SUZ12_mRNA_30	gacatggagattccagagtt	Alexa594	SEQ ID NO: 350
SUZ12_mRNA_31	cagcaataaacccatgcttc	ATTO647N	SEQ ID NO: 351
SUZ12_mRNA_32	caggcatgattcatttgatt	ATTO488	SEQ ID NO: 352
SUZ12_mRNA_33	tgaagcatgaagtttcgaca	ATTO700	SEQ ID NO: 353
SUZ12_mRNA_34	aaagtcatgcatgctgacta	Cy3	SEQ ID NO: 354
SUZ12_mRNA_35	catttcacggagcttggtaa	Alexa594	SEQ ID NO: 355
SUZ12_mRNA_36	tatttctcgtttgcagggg	ATTO647N	SEQ ID NO: 356
SUZ12_mRNA_37	ccatttgctgtcccatttg	ATTO488	SEQ ID NO: 357
SUZ12 mRNA 38	ctgtttgaaaccctgaga	ATTO700	SEQ ID NO: 358
SUZ12_mRNA_39	acatggggtagagcttttc	Cy3	SEQ ID NO: 359
SUZ12_mRNA_40	agaggatgaattccctaaaa	Alexa594	SEQ ID NO: 360
SUZ12_mRNA_41	tgaagtagaacctgataca	ATTO647N	SEQ ID NO: 361
SUZ12_mRNA_42	cctcccaagaaaatgtctc	ATTO488	SEQ ID NO: 362
SUZ12_mRNA_43	aggatcaaagttgactgca	ATTO700	SEQ ID NO: 363
SUZ12_mRNA_44	gggtgagcaatgcactaaaa	Cy3	SEQ ID NO: 364
SUZ12_mRNA_45	acagcttaatttccgtgtg	Alexa594	SEQ ID NO: 365
SUZ12_mRNA_46	caaatgcttcttcttgg	ATTO647N	SEQ ID NO: 366
SUZ12_mRNA_47	ttctcccctataagtgaca	ATTO488	SEQ ID NO: 367
SUZ12_mRNA_48	agtcagcttatctctattgg	ATTO700	SEQ ID NO: 368
SUZ12_mRNA_49	acacataaacacagggcaa	Cy3	SEQ ID NO: 369
SUZ12_mRNA_50	caactgcaaataatgtgcgtg	Alexa594	SEQ ID NO: 370
SUZ12_mRNA_51	tgcttgtaatgtgccagta	ATTO647N	SEQ ID NO: 371
SUZ12_mRNA_52	cggagttggaataaaaacct	ATTO488	SEQ ID NO: 372
SUZ12_mRNA_53	gatgttactcaaccacagtg	ATTO700	SEQ ID NO: 373
SUZ12_mRNA_54	acacatctaaagaccagtc	Cy3	SEQ ID NO: 374

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
SUZ12_mRNA_55	tcgttaaatagcctcacagt	Alexa594	SEQ ID NO: 375
SUZ12_mRNA_56	tgacaaatcacatccacact	ATTO647N	SEQ ID NO: 376
SUZ12_mRNA_57	aatgaaagctgcagtttccc	ATTO488	SEQ ID NO: 377
SUZ12_mRNA_58	gcttaccatcaaggaatct	ATTO700	SEQ ID NO: 378
SUZ12_mRNA_59	ccagaggcaaaaatcagagt	Cy3	SEQ ID NO: 379
SUZ12_mRNA_60	cgagataaacgctcgagatc	Alexa594	SEQ ID NO: 380
SUZ12_mRNA_61	tatgtgcacagcttagcaa	ATTO647N	SEQ ID NO: 381
SUZ12_mRNA_62	ttctacacctacatctcccc	ATTO488	SEQ ID NO: 382
SUZ12_mRNA_63	agcattaagagcataactgc	ATTO700	SEQ ID NO: 383
SUZ12_mRNA_64	gcaaacaatgctagccttct	Cy3	SEQ ID NO: 384
SUZ12_mRNA_65	gggtggaatcaccaactttt	Alexa594	SEQ ID NO: 385
CCNA2_exons_1	gtctgctgcaatgctagcag	Cy3	SEQ ID NO: 386
CCNA2_exons_2	gcctttccgggtgatatt	Cy3	SEQ ID NO: 387
CCNA2_exons_3	ggttcccggacttcagtacc	Cy3	SEQ ID NO: 388
CCNA2_exons_4	aggaagatcctaaggggtg	Cy3	SEQ ID NO: 389
CCNA2_exons_5	ttgcttccaaggaggaacg	Cy3	SEQ ID NO: 390
CCNA2_exons_6	gtgaacgcaggctgttact	Cy3	SEQ ID NO: 391
CCNA2_exons_7	ttctgctcatccacatgaa	Cy3	SEQ ID NO: 392
CCNA2_exons_8	ctggcttctctgagcttct	Cy3	SEQ ID NO: 393
CCNA2_exons_9	tcacgctctattttgaga	Cy3	SEQ ID NO: 394
CCNA2_exons_10	tgaattaaagccagggcat	Cy3	SEQ ID NO: 395
CCNA2_exons_11	aagagggaccaatggttttc	Cy3	SEQ ID NO: 396
CCNA2_exons_12	ttccctaaggatgtgtga	Cy3	SEQ ID NO: 397
CCNA2_exons_13	tcatgtaaccacttaggt	Cy3	SEQ ID NO: 398
CCNA2_exons_14	gtagtgatgtctggctgft	Cy3	SEQ ID NO: 399
CCNA2_exons_15	ccacgaggatagctctcata	Cy3	SEQ ID NO: 400

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
CCNA2_exons_16	atgtagttcacagccaaatg	Cy3	SEQ ID NO: 401
CCNA2_exons_17	acatggaagacaggaaccta	Cy3	SEQ ID NO: 402
CCNA2_exons_18	ctaacagcatagcagcagtg	Cy3	SEQ ID NO: 403
CCNA2_exons_19	gtacacaaactctgctact	Cy3	SEQ ID NO: 404
CCNA2_exons_20	ttgggtaggtatcatctgt	Cy3	SEQ ID NO: 405
CCNA2_exons_21	gctccattctcagaactgtg	Cy3	SEQ ID NO: 406
CCNA2_exons_22	gtcaaaagtaaggactttca	Cy3	SEQ ID NO: 407
CCNA2_exons_23	gatttactgttgagcagct	Cy3	SEQ ID NO: 408
CCNA2_exons_24	tgatgcagaaagtattgggt	Cy3	SEQ ID NO: 409
CCNA2_exons_25	ttcaactttgcagtttcag	Cy3	SEQ ID NO: 410
CCNA2_exons_26	ttgaggtatgggtcagcatc	Cy3	SEQ ID NO: 411
CCNA2_exons_27	agcaataactgatggcaaat	Cy3	SEQ ID NO: 412
CCNA2_exons_28	gtgctaaatgaaaggcagct	Cy3	SEQ ID NO: 413
CCNA2_exons_29	ctttgtcccgtgactgtgta	Cy3	SEQ ID NO: 414
CCNA2_exons_30	ccagtcttctgtattaatga	Cy3	SEQ ID NO: 415
CCNA2_exons_31	gcttaagactttccagggta	Cy3	SEQ ID NO: 416
CCNA2_exons_32	gtgctttgaggtaggctctgg	Cy3	SEQ ID NO: 417
CCNA2_exons_33	tattgactgtttgcatgct	Cy3	SEQ ID NO: 418
CCNA2_exons_34	gaggagagaaacaccatgat	Cy3	SEQ ID NO: 419
CCNA2_exons_35	gatttagtgtctctggtggg	Cy3	SEQ ID NO: 420
roX2_1	uauguaacaccaauuuaccc	TAMRA	SEQ ID NO: 421
roX2_2	ugugauuuccaaauagucgu	TAMRA	SEQ ID NO: 422
roX2_3	guuuuguagcuugacaagcg	TAMRA	SEQ ID NO: 423
roX2_4	uguauauuguauaucauuc	TAMRA	SEQ ID NO: 424
roX2_5	gcguuccaagacacauuuuu	TAMRA	SEQ ID NO: 425
roX2_6	cguuacccauauaugcauu	TAMRA	SEQ ID NO: 426

ES 2 657 923 T3

Sonda	Secuencia de la sonda	Tinte orgánico	Número de secuencia
roX2_7	ugacugguuaaggcgcguaa	TAMRA	SEQ ID NO: 427
MtnA_1	cugcugaccacaacugaugc	TAMRA	SEQ ID NO: 428
MtnA_2	cacugagaugauucacuuga	TAMRA	SEQ ID NO: 429
MtnA_3	gggcuauuuaggccuuuagu	TAMRA	SEQ ID NO: 430
MtnA_4	uauuucccucgaacuuguuca	TAMRA	SEQ ID NO: 431
MtnA_5	gcaaggcaucuugauugagu	TAMRA	SEQ ID NO: 432
MtnA_6	ccgcacuugcagucagaucc	TAMRA	SEQ ID NO: 433
MtnA_7	guguagagagacaagaugca	TAMRA	SEQ ID NO: 434
MtnA_8	aauggacauuuauugcagg	TAMRA	SEQ ID NO: 435
roX2_FISH_1	ttcgaacgatctctaaagc	Cy5	SEQ ID NO: 436
roX2_FISH_2	ttcgaacgattatcaatgt	Cy5	SEQ ID NO: 437
roX2_FISH_3	cttgattttgcttcggagaa	Cy5	SEQ ID NO: 438
roX2_FISH_4	tatgcggaatcggtactct	Cy5	SEQ ID NO: 439
roX2_FISH_5	attcaactaaacattttcg	Cy5	SEQ ID NO: 440
roX2_FISH_6	tcactcactgtccgtaaga	Cy5	SEQ ID NO: 441
roX2_FISH_7	tcaacatgaaaacaattcg	Cy5	SEQ ID NO: 442
roX2_FISH_8	gcattgcgactgtacaatg	Cy5	SEQ ID NO: 443
roX2_FISH_9	acacgtctttaagactca	Cy5	SEQ ID NO: 444
roX2_FISH_10	tttgcttaattgcaacatt	Cy5	SEQ ID NO: 445
roX2_FISH_11	acattcactagttatatga	Cy5	SEQ ID NO: 446
MtnA_FISH_1	attgcatccgctccgcat	Cy5	SEQ ID NO: 447
MtnA_FISH_2	agttgcaggatcccctgggtg	Cy5	SEQ ID NO: 448
MtnA_FISH_3	gcaggcggatttctgtcgc	Cy5	SEQ ID NO: 449
MtnA_FISH_4	ggaaagctcactcggagcag	Cy5	SEQ ID NO: 450
MtnA_FISH_5	gccttactccagatctttt	Cy5	SEQ ID NO: 451

Sin más descripción, se cree que el experto en la técnica puede, con el uso de la descripción anterior y de los ejemplos ilustrativos que vienen a continuación, fabricar y utilizar la presente invención y poner en práctica los

métodos *in vitro* reivindicados. Por lo tanto, los siguientes ejemplos de trabajo señalan específicamente a las realizaciones preferidas de la presente invención, y no se consideran como limitantes de ninguna manera el resto de la descripción.

Ejemplo 1: Determinación simultánea de la estructura cromosómica y de la expresión génica

5 Tal y como se representa en la figura 1B, se hibridaron selectivamente 18 genes a lo largo del cromosoma 19, lo que iluminaba el cromosoma con robustez y con poco ruido de fondo. Ya que el método *in vitro* de la presente invención se basa en la FISH en el ARN, es fácil combinar con los ARNm que marcan la FISH en el ARN para medir simultáneamente la expresión de genes concretos, tal y como se representa en la figura 1C. Los propios intrones también producen información crítica de la expresión génica, ya que los intrones de la mayoría de los genes producen puntos en menos del 50% de las células. Es decir, la determinación de la estructura cromosómica global a través de los métodos *in vitro* de la presente invención puede incluir adicionalmente la marcación de un gran número de genes, lo que confiere redundancia al método y puede además incluir un cribado por RT-PCR para ayudar en la identificación bioinformática de dianas intrónicas abundantes.

15 Tal y como se describe en la figura 1B, genes marcados de manera distinta en tres regiones diferentes del cromosoma 19 revelan una configuración intracromosómica ordenada muy marcada. Al comparar el patrón de los puntos en diferentes células, los cromosomas pueden adquirir una amplia gama de formas. Resulta sorprendente que algunos datos recogidos sugieran que dentro de determinadas células, las dos copias del cromosoma a veces adoptan un patrón de puntos muy parecido, tal y como está representado en la figura 1B. Esto indica que la expresión y la forma están correlacionadas entre las dos copias de los cromosomas dentro de cada una de las células.

20 En una segunda serie de experimentos, el sitio de la transcripción de 20 genes únicos a lo largo del cromosoma 19 se detectó con sondas codificadas con colores, tal y como está descrito en la figura 3. Aquí se muestra una tasa de identificación de puntos falsos por debajo del 5%. Estos datos de puntos para los 20 genes se utilizaron para reconstruir las conformaciones cromosómicas de los genes que se transcriben activamente (figura 3).

25 Ejemplo 2: Medición de la estructura cromosómica y de la expresión génica *in vivo*

Muchos conocimientos de la biología de sistemas han surgido del uso de la microscopia a cámara rápida para comprender la dinámica de los procesos celulares. Por este motivo, los métodos *in vitro* de la presente invención también se pueden aplicar a las células vivas para dar a conocer una perspectiva dinámica de la estructura cromosómica y de la expresión génica. Hasta la fecha, no hay manera de examinar la estructura cromosómica o la expresión génica sin introducir perturbaciones (a saber, sin manipulación genética) a través de la microscopia de células vivas sueltas.

35 Los experimentos se pueden realizar para afrontar los desafíos de la hibridación selectiva de ácidos nucleicos *in vivo*. Por ejemplo, las consideraciones incluyen la cinética de la hibridación, el diseño de las secuencias, la química de los oligonucleótidos y los métodos de introducción, entre otros muchos. Se puede hibridar selectivamente el ARN de un único intrón de un gen que se expresa mucho mediante el diseño de una serie de 16 a 48 oligonucleótidos, con la idea de que la fijación de un gran número de oligonucleótidos a una única localización en la célula puede dar lugar a un punto detectable. Estos oligonucleótidos se pueden sintetizar con una serie de síntesis químicas de esqueletos modificados (tales como con 2'O-etilo), que son necesarias para hacer que los oligonucleótidos sean insensibles a las diferentes nucleasas celulares. En función de los resultados, se puede alterar el diseño de los oligonucleótidos, quizás mediante el empleo de una «baliza molecular» u otros diseños de sondas que son capaces de disminuir la señal de fondo mediante el uso de extintores, en concreto en el núcleo. Los métodos de introducción de sondas pueden incluir la microinyección, la microporación y los reactivos de transfección con lípidos, por ejemplo. Dados los métodos capaces de detectar un único ARN y el hecho de que la mayoría de puntos intrónicos contienen entre 5 y 10 moléculas de ARN intrónico con las que hibridarse selectivamente, cada uno de los puntos intrónicos se puede detectar *in vivo* con FISH como control para la validación.

45 Después de detectar un único intrón, se pueden utilizar los métodos *in vitro* de la presente invención para marcar a la vez varios intrones, con el objetivo de marcar un cromosoma entero *in vivo* al mismo tiempo que también se dan a conocer algunas mediciones toscas de la expresión génica. Los puntos pueden estar entonces codificados con colores para reproducir un cromosoma como un código de barras en una célula viva.

50 Los métodos descritos en la presente memoria dan a conocer un modo de realizar la toma de imágenes de ARN en vivo. Esta toma de imágenes se puede realizar sobre los ARN no codificantes largos (roX2) en las células de *Drosophila melanogaster*. Este ARN concreto reviste el cromosoma X, lo que da lugar a una distribución espacial muy peculiar en la célula. Esta distribución espacial se explotó para comprobar sin ambigüedad si el método descrito puede detectar ARN endógenos en una única célula viva y puede mostrar la estructura del cromosoma X. Por ejemplo, se halló que una sonda para la toma de imágenes en vivo (que consiste en ocho oligonucleótidos marcados) detectaba el ARN de roX2 y las señales se verificaron mediante la FISH en el ARN (figura 5). En otro ejemplo, se realizó la toma de imágenes de ARN en vivo con un gen endógeno en las células de *Drosophila melanogaster*. Se actuó selectiva y específicamente sobre el gen *MtnA*, que se enciende en presencia de cobre. Las

sondas oligonucleotídicas se introdujeron en las células vivas y, a continuación, las sondas se detectaron después de la fijación. La especificidad de la señal se verificó por hibridación selectiva de la misma diana después de la fijación con la FISH en el ARN con sondas marcadas de manera diferente, lo que dio lugar a la colocalización de las señales (figura 6).

5 **Ejemplo 3: Determinación de la localización y de la frecuencia transcripcional de los fragmentos cromosómicos**

10 La localización de diferentes fragmentos cromosómicos en las células HeLa se determinó en una única célula con los métodos descritos en la presente memoria. Tal y como se muestra en la figura 4, estos fragmentos cromosómicos incluyen dos copias intactas del cromosoma 19 así como otra copia del cromosoma 19 que se había dividido por la mitad, donde una mitad estaba fusionada a una porción del cromosoma 13 y la otra mitad estaba fusionada a una porción del cromosoma 6.

15 A continuación, se comparó la frecuencia transcripcional de las copias intactas del cromosoma 19 con la de los fragmentos translocados. Mediante la segregación especial de los intrones basada en la proximidad nuclear, se aislaron cada uno de los cromosomas y de los fragmentos de los cromosomas, y se midió la actividad transcripcional instantánea de cada cromosoma. Se midió la actividad transcripcional en unidades de fracción de los cromosomas que muestran un punto intrónico para el gen concreto de los 20 genes a lo largo del cromosoma 19. Se halló que los genes de la porción del cromosoma 19 que estaba fusionada al cromosoma 6 se transcribían aproximadamente con la misma frecuencia que los del cromosoma 19 intacto, mientras que los genes de la porción del cromosoma 19 que estaba fusionada con el cromosoma 13 se expresaban por lo general a una tasa considerablemente más alta que los de la copia intacta. Así pues, la presente invención da a conocer un método *in vitro* para medir la transcripción en cada cromosoma.

20 **Ejemplo 4: Translocaciones en el cáncer**

25 Muchas formas de cáncer muestran translocaciones cromosómicas estereotípicas (Mitelman et al., 2007, *Nat Rev Cancer* 7: 233-245), quizás la más famosa sea la translocación Filadelfia, que da lugar a la formación de una proteína de fusión oncogénica (BRC-ABL), que a su vez conduce a la leucemia mieloide crónica. El desarrollo de las tecnologías de secuenciación de ARN ha demostrado la prevalencia de las fusiones específicas en una serie de cánceres. Hasta el momento, sigue sin saberse cómo se producen exactamente estas translocaciones tan específicas. Las translocaciones específicas podrían surgir debido a la colocalización de determinadas localizaciones cromosómicas durante la transcripción de genes específicos.

30 El método *in vitro* descrito en la presente memoria da a conocer un nuevo modo de medir estas translocaciones. Al medir la estructura de los cromosomas a través de la presente invención, se puede detectar la propia translocación de manera directa. Además, el método *in vitro* se combina con facilidad con la FISH en el ARN, con lo que se facilita la detección del transcrito de fusión mediante la marcación de las dos mitades de la fusión con sondas de distinto color. Esto permitiría medir el nivel de expresión del transcrito de la fusión oncogénica, así como las translocaciones cromosómicas dentro de una única célula.

35 Por ejemplo, se pueden estudiar las translocaciones que dan lugar a la fusión de las proteínas JAZF1 y JJAZ1, que está implicada en la formación del cáncer de endometrio. Es interesante que los transcritos de la fusión aparecen incluso en las células que no son cancerosas y que no contienen la translocación, lo que sugiere que la transcripción normal de estos genes a veces puede producirse en una proximidad física que a continuación conduce a acontecimientos de transyuste. Se puede actuar selectivamente sobre los dos cromosomas implicados (7 y 17) a la vez que sobre las dos mitades del transcrito de la fusión a través de la FISH en el ARN de una única molécula en las células de tipo silvestre y en las células que albergan la translocación (figura 2 y figura 1C). El análisis de colocalización con los dos cromosomas permite determinar las localizaciones relativas de los locus genéticos relevantes y cómo están relacionados con la forma global de los cromosomas. Mientras tanto, se puede buscar simultáneamente la colocalización de las dos mitades del transcrito de la fusión. La colocalización de las dos sondas implica la presencia del transcrito de la fusión, mientras que la señal independiente de cada una de las sondas representa transcritos sin fusionar. En la actualidad, se sabe si las células de tipo silvestre contienen alguna cantidad del transcrito de la fusión en cada célula o si tan solo una pequeña subpoblación de células produce el transcrito de la fusión en gran abundancia. En cualquier caso, análisis de la presente invención de una única molécula en una única célula permite responder esta cuestión de forma directa y relacionar cualquier hallazgo con la estructura de los cromosomas implicados.

40 Aunque esta invención ha sido descrita con referencia a realizaciones específicas, es evidente que los expertos en la técnica podrían idear otras realizaciones y variaciones de esta invención sin alejarse del alcance de la invención. Las reivindicaciones adjuntas se han diseñado para interpretar que incluyen todas las realizaciones y variaciones equivalentes.

55

Lista de secuencias

5 <110> University of Pennsylvania
Raj, Arjun
Levesque, Marshall J.

<120> UN MÉTODO PARA DETECTAR SIMULTÁNEAMENTE LA ESTRUCTURA CROMOSÓMICA Y LA EXPRESIÓN GÉNICA EN CÉLULAS SUELTAS

10 <130> 46483-6004-00-WO.601321

<150> US 61/439,623
<151> 04-02-2011

15 <160> 451

<170> PatentIn version 3.5

20 <210> 1
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
25 <223> Sintetizado químicamente

<400> 1

30 ctagtaccgc gttggtcta 20

<210> 2
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 2

40 cagagtgcaa aatccccttc 20

<210> 3
<211> 20
45 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
50 <223> Sintetizado químicamente

<400> 3

taccgtacca gcatgtaact 20

55 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Sintetizado químicamente

<400> 4

65 cacaccaaga atcagtctc 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 5

 gccattcca gaaagctta 20

 <210> 6
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 6

 cctccatat cctccctaa 20
 25
 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 7
 35 tctaaattca agaaccgccc 20

 <210> 8
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 8

 atctccttc agatccggtc 20
 50
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 9
 60 ggctccagaa acagattca 20

 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 10
 5 taaattcccag actcaggact 20

 <210> 11
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15
 <400> 11

 aaggccaag tcaagttaag 20
 20 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 12
 30 ataactgcat tgccattga 20

 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 40 <400> 13

 tgactcttat gagggagctc 20

 <210> 14
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 14

 agtgaatttg gcccaagaag 20
 55
 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 15
 65 cagagatagt ctgggaggag 20

<210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 16

 gctaagtggt gcctctactg 20

 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 17

 gaatccacgg tccatttgg 20
 25
 <210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 18
 35
 cttgctgtat ttgggatca 20

 <210> 19
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 19

 catcgagatg cacagcttg 20
 50
 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 20

 60 gtgacatccg tctctggagg 20

 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 21
 5 aaggagcaag aaccacacag 20

 <210> 22
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 22

 aatgcacggt taaagttcct 20
 20 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 23
 30 caggcacaga tttagcaggaa 20

 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 24

 agccagttct cattagcaag 20
 45 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 25
 55 acacactaaa gaacacaccc 20

 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 26
 65 gatccttggt cacggaagtt 20

<210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 27

 aatgaactga tggcgttcat 20

 <210> 28
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 28

 cacacctcac ttgaacaagt 20
 25
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 29
 35
 gtgaggggtc ctctgactca 20

 <210> 30
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 30

 tttcacaat ccagctggaa 20
 50
 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 31

 60 cccaaagacc caaatcagaa 20

 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 32
 5 ggggtgaac caaatatcca 20

 <210> 33
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 33

 attactacgc ctgccacatc 20
 20 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 34
 30 cggcagaaaa tcgatctcaa 20

 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 35

 ctttgctcgt tctgccattc 20
 45 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 36

 cttgtacat ctgggagtca 20
 55 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 37
 65 acacctcgtg tctcaataag 20

<210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 38

 cgagcaagaa gcttcatcat 20

 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 39

 acgtaaggga tgaatcctct 20

 25 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 40

 35 actaaagtct catttggggc 20

 <210> 41
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 45 <400> 41

 tgagtgcaa cagatttct 20

 50 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 42

 60 ggaaccaccg ttaatagtg 20

 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 43
 5 gaatcttgcc agcctaacac 20

 <210> 44
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 44

 gttcagtcca aacgaaccag 20
 20 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 45
 30 ctcgtgattt ccaggaacac 20

 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 46

 gaaagagacg ttgccaagtc 20
 45 <210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 47

 ggactgaacc tcactcattc 20
 55 <210> 48
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 48
 65 agatattgta ggagtggggg 20

<210> 49
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 49

 aactgcctaa accttctgtg 20

 <210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 50

 gtccccacaa gtaagcatac 20
 25
 <210> 51
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 51
 35
 atcaggtgca cacattaagg 20

 <210> 52
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 52

 aaagtcaaga accactgtgg 20
 50
 <210> 53
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 53
 60
 gaatgcagc agctctcatg 20

 <210> 54
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 54
 5 gacagacagc aacagagaac 20

 <210> 55
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 55

 gatggactag aaacatggc 20
 20 <210> 56
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 56
 30 ccacccatga agacaatgat 20

 <210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 57

 cagaagcaga acccaagatg 20
 45 <210> 58
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 58

 gctcagctat caagtaacgg 20
 55 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 59
 65 gtattccgtg gatcagcaaa 20

<210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 10 <400> 60

 gtccccaacc acatagaaag 20

 <210> 61
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 61

 tccttacttc cctaggacaa 20
 25
 <210> 62
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 62
 35
 cccatctaaa agcgggaaag 20

 <210> 63
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 63

 gagtacagga gagagtccag 20
 50
 <210> 64
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 64
 60
 cagaacgact aagaagcacg 20

 <210> 65
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 65
 5 gattctctcg ctctaggcc 20

 <210> 66
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 66

 cgaagagact gagtggacc 20
 20 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 67
 30 aaggaaacct taaggcaatt 20

 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 68
 40 atgtccacct gaacctctg 20

 <210> 69
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 69

 tcctgaatgt ctctgctact 20
 55 <210> 70
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 70
 65 tcagtcactg cagctgtac 20

<210> 71
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 71
 taggatgcct cctcaacctc 20

 <210> 72
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 72
 aagctctaaa ctccactgga 20
 25
 <210> 73
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 73
 35 ttcttatccc agacctctcg 20

 <210> 74
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 74
 gctctatcca ggtagtgaat 20
 50
 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 75
 60 cagccacctt atggagcaag 20

 <210> 76
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 76
 5 agacagagag ctagacactt 20

 <210> 77
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 77

 ctagtgctg caatggagt 20
 20 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 78
 30 gctgcattgt tcaggatact 20

 <210> 79
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 79

 ctagtcttg acaccaagag 20
 45 <210> 80
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 80
 55 ctctgtccc aactccttg 20

 <210> 81
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 81
 65 gacctgctgg aatcagaatc 20

<210> 82
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 82

 cctattagac ggctcaatg 20

 <210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 83

 ctctgccca atatcaaaa 20
 25
 <210> 84
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 84
 35
 cagatgctg aatccaaact 20

 <210> 85
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 85

 caagcctgat tccaaaaca 20
 50
 <210> 86
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 86

 60 ggtgaaatc ttaatccca 20

 <210> 87
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 87
 5 cgagcttggt aagtctcgtc 20

 <210> 88
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 88

 gagtggttc agcagaatct 20
 20 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 89
 30 accaccgaga aggattctaa 20

 <210> 90
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 90
 40 ttctcacaca gatgagtgcg 20

 <210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 91
 50 taggaaaaca gacccttgg 20

 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 92
 65 tcaagagatc cccaaacacg 20

<210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 93

 atcacagacc agaatgcctg 20

 <210> 94
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 94

 cattctacca cacatggagg 20
 25
 <210> 95
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 95
 35
 gagctaacac ctgacaact 20

 <210> 96
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 96

 ctcaactcagg ctaaaatcct 20
 50
 <210> 97
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 97

 60 atgctttgga aaaggctaca 20

 <210> 98
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 98
 5 actgactcg tcctacact 20

 <210> 99
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 99

 ggacaagcaa actgaaaagc 20
 20 <210> 100
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 100
 30 gagcacaact gaagaaccaa 20

 <210> 101
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 101

 tatcgctcgt ggtaaaagc 20

 <210> 102
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 102

 tgcacaattc agaatgatgc 20
 55 <210> 103
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 103
 65 agcccaacgt tcactttta 20

<210> 104
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 104

 agaggctgga gtttctaga 20

 <210> 105
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 105

 aattcagtct gaccacaacc 20
 25
 <210> 106
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 106
 35
 atcctcaatc agcatgccta 20

 <210> 107
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 107

 tggttgtcac ctactgagaa 20
 50
 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 108
 60
 cacagaatct ctgtggctg 20

 <210> 109
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 109
 5 cttatgaccc ctgcagtcag 20

 <210> 110
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 110

 acgtgaagtt tatgcccaat 20
 20 <210> 111
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 111
 30 tctatctagc catccatcca 20

 <210> 112
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 112

 gctttgatc caatggaaga 20
 45 <210> 113
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 113

 gacctgaag aagccagaaa 20
 55 <210> 114
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 114
 65 cctgaagctg agaagttgat 20

<210> 115
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 115

 caagggaaaa gggcttgaaa 20

 <210> 116
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 116

 gagaaagctt ccagcagatt 20

 25 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 117

 35 aggtcaaggg gtctagaaat 20

 <210> 118
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 45 <400> 118

 agatgaataa aggctgagcc 20

 50 <210> 119
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 119

 60 ctggaagtat ggggtaggaa 20

 <210> 120
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 120
 5 tcctaggaat cagagaaggg 20

 <210> 121
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 121

 ggaatggtgg aaagtgacaa 20
 20 <210> 122
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 122
 30 tgatcagaga cacaggagat 20

 <210> 123
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 40 <400> 123

 gcaggtcttt ggaagtgatc 20
 45 <210> 124
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 124

 tggggagaag tctaggattg 20
 55 <210> 125
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 125
 65 gatctgcaag atgaggaagg 20

<210> 126
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 126

 actccaaatt ggagtctgg 20

 <210> 127
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 127

 attgtagtga ccaaggaaca 20
 25
 <210> 128
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 128
 35
 ctgaatcgag taagcctgg 20

 <210> 129
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 129

 caaccgggga gataagagac 20
 50
 <210> 130
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 130
 60
 cctacttggg gcaagtcag 20

 <210> 131
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 131
 5 aattaggatg gcaggccttc 20

 <210> 132
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 132

 aaaatgagag gcgaggaag 20
 20 <210> 133
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 133
 30 cgtcctcta ggacacctaa 20

 <210> 134
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 134

 gctcctaaac ttgctagtc 20
 45 <210> 135
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 135

 tatcctggtc aatgggagga 20
 55 <210> 136
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 136
 65 gcttagcaaa tcctcaacc 20

<210> 137
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 137

 catcccataa ccaggaatg 20

 <210> 138
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 138

 cctcttaat caccactccc 20

 25 <210> 139
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 139

 35 aacagaccta aaggaggat 20

 <210> 140
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 45 <400> 140

 gtttgcagg ttaccagtg 20

 50 <210> 141
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 141

 60 tatacagga acctaggagg 20

 <210> 142
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 142
 5 tccccagcat catatctcat 20

 <210> 143
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 143

 tatagcaact ggtgtctcca 20
 20 <210> 144
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 144
 30 cctgtttcac atctggatcc 20

 <210> 145
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 145

 gaatgcgaaa catctccagc 20
 45 <210> 146
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 146

 aaacttctca ggaaaacgga 20
 55 <210> 147
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 147
 65 ctcttctgac accacagact 20

<210> 148
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 10 <400> 148

 gggggaaggt ggatagaaag 20

 <210> 149
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 149

 gaacacagcc tcagttactg 20
 25
 <210> 150
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 150
 35
 ctgaaactgg caaactcaca 20

 <210> 151
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 151

 gtgcttcca gtaagtgga 20
 50
 <210> 152
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 152
 60
 cacgttcaa gacaaagaca 20

 <210> 153
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 153
 5 ccacttgact gcaactgaa 20

 <210> 154
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 154

 cgctagagaa agctcagaag 20
 20 <210> 155
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 155
 30 cggagaagca aagtgagaag 20

 <210> 156
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 156

 aactccagat tccagaccaa 20
 45 <210> 157
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 157

 tgacagcaag aaccgaagag 20
 55 <210> 158
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 158
 65 taggctggat tctatccagg 20

<210> 159
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 159

 tcaaccagta aatgccatc 20

 <210> 160
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 160

 cccttctc acatgctgag 20
 25
 <210> 161
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 161
 35
 gttgggtgca acaagagaag 20

 <210> 162
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 162

 ctatgctgcg cgactattc 20
 50
 <210> 163
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 163
 60
 ttcatctgc ttctcacagc 20

 <210> 164
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 164
 5 tatgtaccac agcgtaagc 20

 <210> 165
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 165

 ccatagagcc gttgattct 20
 20 <210> 166
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 166
 30 agtccaggtt ctctatctc 20

 <210> 167
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 167

 agctggagat ctggacataa 20
 45 <210> 168
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 168

 ccttgacag caaggaaacc 20
 55 <210> 169
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 169
 65 gttcaggaag ggaacaatgg 20

<210> 170
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 170

 ttttactgtg aacctgacct 20

 <210> 171
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 171

 aaaccacctc tgaaactgac 20
 25
 <210> 172
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 172
 35
 aatctttggt caagtcagg 20

 <210> 173
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 173

 ggtttacaga tgcagaggtg 20
 50
 <210> 174
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 174
 55
 aactgcaatc caaacgttg 20
 60
 <210> 175
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 175
 5 agaactagga caagacctca 20

 <210> 176
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15
 <400> 176

 catcttcttt caccctgagg 20
 20
 <210> 177
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 177
 30 tctggatcgc actaacagag 20

 <210> 178
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40
 <400> 178

 catcctaaac cgtggtaccc 20
 45
 <210> 179
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50
 <400> 179

 ggagaaagtc aagcatgtga 20
 55
 <210> 180
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 180
 65 tttgaacctc agtccccaaa 20

<210> 181
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 181

 gtacaaagag aggctggaac 20

 <210> 182
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 182

 cctcaacaca actatgctgt 20
 25
 <210> 183
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 183
 35
 ctaccccata tcccaaatgc 20

 <210> 184
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 184

 cacgattcag tcatctccac 20
 50
 <210> 185
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 185

 60 aagacaaaa cagtgggaaa 20

 <210> 186
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 186
 5 gaagtatggt ttgtgccagg 20

 <210> 187
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 187

 gaaagagctc agaggagaca 20
 20 <210> 188
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 188
 30 caagtggatga cacaaccaag 20

 <210> 189
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 189

 tcgaatgtca catcacacaa 20
 45 <210> 190
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 190

 aaaaacttgg agtaccaagt 20
 55 <210> 191
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 191
 65 ttcatctgtc tctggttcc 20

<210> 192
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 192

 aaaccacctg taagcaaat 20

 <210> 193
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 193

 gcttactcat ggaaactcgg 20
 25
 <210> 194
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 194
 35
 tcatagtcag tatctgcccc 20

 <210> 195
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 195

 atccgatctc gcgagaataa 20
 50
 <210> 196
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 196
 60 gagagaagtg tgagcgtaag 20

 <210> 197
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 197
 5 atagagtaca tgggcacctt 20

 <210> 198
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 198

 gtaccaaatt taggggacgg 20
 20 <210> 199
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 199
 30 tggaatcaca aaaccttct 20

 <210> 200
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 200

 cgtactggca caacaactag 20
 45 <210> 201
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 201

 gggagaatga acctcacaag 20
 55 <210> 202
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 202
 65 gacacaactc tcatcactgg 20

<210> 203
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 203

 aaggctggtt ccatttatcc 20

 <210> 204
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 204

 tttcctactt cacaagtgcc 20
 25
 <210> 205
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 205
 35
 acctaagaaa caggcгааag 20

 <210> 206
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 206

 aggctatct ttgctctgg 20
 50
 <210> 207
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 207

 60 gccagaaat tccacttcat 20

 <210> 208
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 208
 5 aaccctgta tcaccatcac 20

 <210> 209
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 209

 gaggactcac tgagcgaag 20
 20 <210> 210
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 210
 30 tgcattttc caggaactaa 20

 <210> 211
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 211

 tgagcccgta ttctcattga 20
 45 <210> 212
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 212

 aatfaaaact cacaggaggc 20
 55 <210> 213
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 213
 65 atgccaagct aacaatgctc 20

<210> 214
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 214

 ggtccatcg ttaccagggc 20

 <210> 215
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 215

 taggcaaaga ggtagagccc 20
 25
 <210> 216
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 216
 35
 aaggactgca gtagtcaat 20

 <210> 217
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 217

 acaaagtaga gacctatcca 20
 50
 <210> 218
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 218
 60
 cacctggggt gggaaaagag 20

 <210> 219
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 219
 5 gagagggcag catggaatgg 20

 <210> 220
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 220

 cagttgagc aggttgagg 20
 20 <210> 221
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 221
 30 aaaggacact cagtctacct 20

 <210> 222
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 222

 ctgtgggcaa ggaacagatc 20
 45 <210> 223
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 223

 caaacagaat gccccgacc 20
 55 <210> 224
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 224
 65 gtgaatagag ggtgccccat 20

<210> 225
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 225

 tctcttgaga caatctggga 20

 <210> 226
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 226

 cctttgcttg acttcgact 20
 25
 <210> 227
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 227
 35
 tgttatctca ctggacctga 20

 <210> 228
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 228

 ctttttttag ggggtggtgg 20
 50
 <210> 229
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 229
 55
 ctctgatcca accaaagtgg 20
 60
 <210> 230
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 230
 5 ggaacacagt agtagatgca 20

 <210> 231
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 231

 accagacacc tgagaagtaa 20
 20 <210> 232
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 232
 30 ctggtttgtg attgctacct 20

 <210> 233
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 233

 gtgcatcaaa caaggatct 20
 45 <210> 234
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 234

 ggcaactaac atatcctggg 20
 55 <210> 235
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 235
 65 acacagccac atgaaatctt 20

<210> 236
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 236

 gcactctcca tctaccaaac 20

 <210> 237
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 237

 taagtgactg ggacaagtca 20
 25
 <210> 238
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 238
 35
 ggcaatcaaa tgtccacaga 20

 <210> 239
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 239

 cactctcaa aggtcacaat 20
 50
 <210> 240
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 240
 60 atccagtgct acagcttaga 20

 <210> 241
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 241
 5 atcacctcct agtgctgta 20

 <210> 242
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 242

 ccatcattct aagccccaag 20
 20 <210> 243
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 243
 30 ctgctatgac attccatccc 20

 <210> 244
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 244

 gatcacaaga gaagtctggc 20
 45 <210> 245
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 245

 gaacaccaga acagaactcc 20
 55 <210> 246
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 246
 65 cacagaattg tccaaggat 20

<210> 247
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 247

 aagctgagca actttaggtc 20

 <210> 248
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 248

 ttgcttgctc aaatctcact 20
 25
 <210> 249
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 249
 35
 tacagcctag ttagacaggg 20

 <210> 250
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 250

 gattccacct gtaaagaggc 20
 50
 <210> 251
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 251

 60 cacagcagaa catctcacia 20

 <210> 252
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 252
 5 gagaagagaa acgctgtcac 20

 <210> 253
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 253

 tctggcacta tatctccgag 20
 20 <210> 254
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 254
 30 taggtcccca aactgagtag 20

 <210> 255
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 255

 agagactcag agaaaggagg 20

 <210> 256
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 256

 tgtgacgata ctggacagat 20
 55 <210> 257
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 257
 65 ccaaagaaca gtctcctccc 20

<210> 258
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 10 <400> 258

 ttgaagggag gataagaggc 20

 <210> 259
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 259

 ctctaacag ccgggaatt 20
 25
 <210> 260
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 260
 35
 ttaaagtcac aacatccgcg 20

 <210> 261
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 261

 tcgttacttc ggagttacga 20
 50
 <210> 262
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 262
 60
 tcgctatcat tgccatcctc 20

 <210> 263
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 263
 5 ctgtgagagc aatgacagtc 20

 <210> 264
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 264

 atgaaacaag cgagtgacc 20
 20 <210> 265
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 265
 30 caaaaggcac agtcctaacg 20

 <210> 266
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 266

 aaatagcact ggcttgtaa 20
 45 <210> 267
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 267

 tttaactca caccgaagg 20
 55 <210> 268
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 268
 65 tgtttccact agcccttaag 20

<210> 269
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 10 <400> 269

 aacctgagaa ctgtgaaagg 20

 <210> 270
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 270

 cctcccttaa ttcaagcctt 20
 25
 <210> 271
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 271
 35
 ttcgaatcgc catacaaaa 20

 <210> 272
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 272

 tacattagtg gagaaagcgt 20
 50
 <210> 273
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 273
 60
 ctaaagtcag cacaaccac 20

 <210> 274
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 274
 5 gagaagcaag ggcaaaacag 20

 <210> 275
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 275

 caaacgttct tcagtcaca 20
 20 <210> 276
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 276
 30 ggccaactga ggtagaagat 20

 <210> 277
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 277

 cactaccccc agtttctcaa 20
 45 <210> 278
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 278

 tattactggc agtgcctct 20
 55 <210> 279
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 279
 65 gaggctcagt tagaggctct 20

<210> 280
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 280

 caatgctct tcctaggac 20

 <210> 281
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 281

 acaactgaatt ctgtcgctc 20
 25
 <210> 282
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 282
 35
 aaggtcagac actgaagtct 20

 <210> 283
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 283

 ccgacctcta agtggttcag 20
 50
 <210> 284
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 284

 60 gcatccatct gggtttctaa 20

 <210> 285
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 285
 5 ggagtctgag actgacacat 20

 <210> 286
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 286

 cgtgtggaag atacactgtc 20
 20 <210> 287
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 287
 30 gcctatagtc tgctgcttc 20

 <210> 288
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 288

 caagcatcgg agcacacata 20
 45 <210> 289
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 289

 gagtcacact ggtttcagg 20
 55 <210> 290
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 290
 65 ctctctgat aagccgtgac 20

<210> 291
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 291

 gagaggacag ctggaactg 20

 <210> 292
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 292

 tttgaacac attgggtcc 20
 25
 <210> 293
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 293
 35
 gtgccactac tgaaggatg 20

 <210> 294
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 294

 gactgctctg actcttcacc 20
 50
 <210> 295
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 295
 60
 ggtacgcact tatgaggaac 20

 <210> 296
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 296
 5 tctctgctgc tacatctcag 20

 <210> 297
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 297

 catgagaagg gagacggatg 20
 20 <210> 298
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 298
 30 atcccagaca ataagagggg 20

 <210> 299
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 299

 cgaggataga gaagccagag 20
 45 <210> 300
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 300

 cccactttg ggaacaatga 20
 55 <210> 301
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 301
 65 gctgcgttg tgatttgta 20

<210> 302
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 302

 ggatgaaagc agaggtaag 20

 <210> 303
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 303

 ggatgaaagc agaggtaag 20
 25
 <210> 304
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 304
 35
 taagtgggtc aaggtcagag 20

 <210> 305
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 305

 gattgtggag ctgactgaag 20
 50
 <210> 306
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 306

 60 catcttatcg ctgaagggga 20

 <210> 307
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 307
 5 ctgcacaatc tgggagagac 20

 <210> 308
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 308

 gagttaggct ggaggaacag 20
 20 <210> 309
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 309
 30 tggtaagata gctgcgtcta 20

 <210> 310
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 310

 actgaagaca catcaccta 20
 45 <210> 311
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 311

 tccaagaaaa aactgaaggg 20
 55 <210> 312
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 312
 65 agagaatatg acccagaagc 20

<210> 313
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 313

 tcaatacctc aggtgtcct 20

 <210> 314
 15 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 314

 gtccacactt gagaagctaa 20
 25
 <210> 315
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 315
 35
 cactatnttt ctgccccta 20

 <210> 316
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 316

 gcaagttctt acgcatcta 20
 50
 <210> 317
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 317

 60 gtcctcagg cacattatac 20

 <210> 318
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 318
 5 aggagactct gaactatgcc 20

 <210> 319
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 319

 ttaagtgctc aataaccccc 20
 20 <210> 320
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 320
 30 tcaagtcagg ccattcaatt 20

 <210> 321
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 321

 ctccatttc ggcttctca 20
 45 <210> 322
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 322

 gaggaaaagc tcgtggtcag 20
 55 <210> 323
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 323
 65 gatctgtgtt ggcttctcaa 20

<210> 324
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 324

 gagattccga gttcgaagaa 20

 <210> 325
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 325

 tgtgcaaaaa tattggtgct 20
 25
 <210> 326
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 326
 35
 tctggagttt cgatgagaca 20

 <210> 327
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 327

 tgagattctt gctctcctt 20
 50
 <210> 328
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 328

 60 ctgcaaatga gctgacaagc 20

 <210> 329
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 329
 5 tggaagaaac cagtaaactg 20

 <210> 330
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 330

 aagagtgaac tgcaactgtag 20
 20 <210> 331
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 331
 30 gcaataggag ccgtagattt 20

 <210> 332
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 332

 atttctagtg gcaagaggtt 20
 45 <210> 333
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 333

 taactgaacc aggctgttt 20
 55 <210> 334
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 334
 65 acagcaatag ttgagtagg 20

<210> 335
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 335

 tgtgccttg tattgtgtt 20

 <210> 336
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 336

 caggtcatct ctgcttcag 20

 25 <210> 337
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 337

 35 tcagagtaca ccaaggcaa 20

 <210> 338
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 45 <400> 338

 aaactataaa gttgcgga 20

 50 <210> 339
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 339

 60 tggcagagtt taagatgctt 20

 <210> 340
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 340
 5 cctagcacct ttggatgat 20

 <210> 341
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 341

 ggagccatca taacactcat 20
 20 <210> 342
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 342
 30 tatcctgagg attcctgca 20

 <210> 343
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 343

 tgcgactaaa agcaaatcca 20
 45 <210> 344
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 344

 ggtgttctct taactgtcc 20
 55 <210> 345
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 345
 65 gcctgcacac aagaatatgt 20

<210> 346
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 346

 catgcttgct ttgttcggt 20

 <210> 347
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 347

 ctttgctggt ctactcccc 20

 25 <210> 348
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 348

 35 aaatacagac gattgtggcc 20

 <210> 349
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 45 <400> 349

 agaggaagc aggtatcact 20

 50 <210> 350
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 350

 60 gacatggaga ttccagagtt 20

 <210> 351
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 351
 5 cagcaataaa cccatgcttc 20

 <210> 352
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 352

 caggcatgat tcatttgatt 20
 20 <210> 353
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 353
 30 tgaagcatga agtttcgaca 20

 <210> 354
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 354

 aaagtcatgc atgctgacta 20
 45 <210> 355
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 355

 catttcacgg agcttggtaa 20
 55 <210> 356
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 356
 65 tatttctcg tttgcagggg 20

<210> 357
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 357

 ccatttgctg tcccatttg 20

 <210> 358
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 358

 ctgttttgaa acccctgaga 20
 25
 <210> 359
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 359
 35
 acatgggggtt agagcttttc 20

 <210> 360
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 360

 agaggatgaa ttcctaaaa 20
 50
 <210> 361
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 361

 60 tgaagtagaa ccctgataca 20

 <210> 362
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 362
 5 cctccccaag aaaatgtctc 20

 <210> 363
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 363

 aggatcaaag ttgactgca 20
 20 <210> 364
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 364
 30 gggtagcaa tgactaaa 20

 <210> 365
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 365

 acagctaat ttccgtgtg 20

 <210> 366
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 366

 caaatgcgtt cttccttg 20
 55
 <210> 367
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 367
 65 ttctcccctt ataagtgaca 20

<210> 368
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 368

 agtcagctta tctctattgg 20

 <210> 369
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 369

 acacataaa cacaggcaa 20

 25 <210> 370
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 370

 35 caactgcaaa tatgtgcgtg 20

 <210> 371
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 45 <400> 371

 tgcttgtaa tgtgccagta 20

 50 <210> 372
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 372

 60 cggagttgga ataaaaacct 20

 <210> 373
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 373
 5 gatgttactc aaccacagtg 20

 <210> 374
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 374

 acacatctta aagaccagtc 20
 20 <210> 375
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 375
 30 tcgttaaata gcctcacagt 20

 <210> 376
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 376

 tgacaaatca catccacact 20
 45 <210> 377
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 377

 aatgaaagct gcagttccc 20
 55 <210> 378
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 378
 65 gcttaccat caaggaatct 20

<210> 379
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 379

 ccagaggcaa aaatcagagt 20

 <210> 380
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 380

 cgagataaac gctcgagatc 20

 25 <210> 381
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 381

 35 tatgtgcaca gcttagcaa 20

 <210> 382
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 45 <400> 382

 ttctacacct acatctccc 20

 50 <210> 383
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 383

 60 agcattaaga gcataactgc 20

 <210> 384
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 384
 5 gcaaacaatg ctagccttct 20

 <210> 385
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 385

 ggtgggaatc accaactttt 20
 20 <210> 386
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 386
 30 gtctgctgca atgctagcag 20

 <210> 387
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 387

 gcctttccg ggttgatatt 20
 45 <210> 388
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 388

 ggtcccga ctcagtacc 20
 55 <210> 389
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 389
 65 aggaagatcc ttaaggggtg 20

<210> 390
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 390

 ttgcttcca aggaggaacg 20

 <210> 391
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 391

 gtgaacgcag gctgtttact 20

 25 <210> 392
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 392

 35 ttctgcttca tccacatgaa 20

 <210> 393
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 45 <400> 393

 ctggcttctt ctgagcttct 20

 50 <210> 394
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 394

 60 tcacgctcta tttttgaga 20

 <210> 395
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 395
 5 tgaattaa gccagggcat 20

 <210> 396
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 396

 aagagggacc aatggtttc 20
 20 <210> 397
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 397
 30 tttccctaag gtatgtgta 20

 <210> 398
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 398

 tcatgtaacc cacttaggt 20
 45 <210> 399
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 399

 gtagtgatg tctggctgtt 20
 55 <210> 400
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 400
 65 ccacgaggat agctctcata 20

<210> 401
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 401

 atgtagtca cagccaaatg 20

 <210> 402
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 402

 acatggaaga caggaaccta 20

 25 <210> 403
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 403

 35 ctaacagcat agcagcagtg 20

 <210> 404
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 45 <400> 404

 tgtacacaaa ctctgctact 20

 50 <210> 405
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 405

 60 ttggtgtagg tatcatctgt 20

 <210> 406
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 406
 5 gctccattct cagaactgt 20

 <210> 407
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 407

 gtcaaaagta aggacttca 20
 20 <210> 408
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 408
 30 gatttactgt tggagcagct 20

 <210> 409
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 409

 tgatgcagaa agtattgggt 20
 45 <210> 410
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 410

 ttcaacttg cagttgcag 20
 55 <210> 411
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 411
 65 ttgaggtatg ggtagcatc 20

<210> 412
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 412

 agcaataact gatggcaaat 20

 <210> 413
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 413

 gtgctaaatg aaaggcagct 20
 25
 <210> 414
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 414
 35
 cttgtcccg tgactgtgta 20

 <210> 415
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 45
 <400> 415

 ccagtcttc gtattaatga 20
 50
 <210> 416
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 416
 60
 gcttaagact ttccaggga 20

 <210> 417
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 417
 5 gtgctttgag gtaggtctgg 20

 <210> 418
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 418

 tattgactgt tgtgcatgct 20
 20 <210> 419
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 419
 30 gaggagagaa acacatgat 20

 <210> 420
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 420

 gatttagtgt ctctggtggg 20
 45 <210> 421
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 421

 uauguaacac caauuaccc 20
 55 <210> 422
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 422
 65 ugugauuucc aaauagucgu 20

<210> 423
 <211> 20
 <212> RNA
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 423

 guuuuguagc uugacaagcg 20

 <210> 424
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 424

 uguauauugu auaucuuca 20

 25 <210> 425
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 425

 35 gcguuccaag acacauuuu 20

 <210> 426
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 45 <400> 426

 cguuaccgau auaugcauau 20

 50 <210> 427
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 427

 60 ugacugguua aggcgguaa 20

 <210> 428
 <211> 20
 <212> RNA
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 428
 5 cugcugacca caacugauc 20
 <210> 429
 <211> 20
 10 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 429
 cacugaug auucacuuga 20
 20 <210> 430
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 430
 30 gggcuauua ggccuuagu 20
 <210> 431
 <211> 20
 <212> RNA
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 431
 uauuuccug aacuuguca 20
 <210> 432
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 50 <400> 432
 gcaaggcauc uugauagau 20
 55 <210> 433
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 <400> 433
 65 ccgcacuugc agucagauc 20

<210> 434
 <211> 20
 <212> RNA
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 434

 guguagagag acaaugca 20

 <210> 435
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 435

 aauuggacau uuauugcagg 20

 25 <210> 436
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 436

 35 ttcgaaacga tctctaaagc 20

 <210> 437
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 45 <400> 437

 tttcgaacga ttatcaatg 20

 50 <210> 438
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 438

 60 cttgatttg cttcgagaa 20

 <210> 439
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 439
 5 tatgcgaaa tcgtactct 20

 <210> 440
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 15 <400> 440

 attcaactta aacatttcg 20
 20 <210> 441
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 441
 30 tcatctcact gtccgtaaga 20

 <210> 442
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente
 40 <400> 442

 tcaacctga aaacaattcg 20
 45 <210> 443
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 50 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 443

 gcattgcgac ttgtacaatg 20
 55 <210> 444
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 444
 65 acacgtcttt taagacttca 20

<210> 445
 <211> 20
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 10 <400> 445

 ttgctaat tgcaacatt 20

 <210> 446
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 446

 acatttact agttatatga 20

 25 <210> 447
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 447

 35 atttgcattcc gcttccgcat 20

 <210> 448
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 45 <400> 448

 agttgcagga tcccttggtg 20

 50 <210> 449
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintetizado químicamente

 <400> 449

 60 gcaggcggat ttctgtcgc 20

 <210> 450
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

ES 2 657 923 T3

<220>

<223> Sintetizado químicamente

<400> 450

5

ggaaagctca ctggagcag 20

<210> 451

<211> 20

10

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintetizado químicamente

15

<400> 451

gccttactc cagatcttt 20

20

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un método *in vitro* para la determinación de la conformación estructural de un cromosoma en una célula, que comprende la hibridación de numerosas secuencias diana de ARN en la célula con miembros de al menos un conjunto de sondas oligonucleotídicas marcadas con fluorescencia, en donde las numerosas secuencias diana de ARN se transcriben desde porciones de al menos un cromosoma, y en donde el patrón de las sondas marcadas con fluorescencia que se hibridan con las secuencias diana de ARN es indicativo de la conformación estructural del cromosoma; en donde el ARN diana es ARNm; y en donde la secuencia de ARNm hibridada selectivamente es al menos una porción de un intrón de la secuencia de ARNm.
- 10 **2.** El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde cada conjunto de los conjuntos de sondas oligonucleotídicas marcadas con fluorescencia está marcado con un fluoróforo diferente, lo que da lugar a un color diferente y diferenciable cuando se mide la fluorescencia.
- 3.** El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula es una célula viva; en donde, optativamente, las secuencias diana de ARN son ARN endógeno.
- 15 **4.** El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la utilización de numerosos conjuntos de sondas oligonucleotídicas marcadas con fluorescencia, en donde cada conjunto de sondas utiliza un color diferenciable.
- 5.** El método *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4, en donde la localización de las sondas hibridadas es indicativa a la vez de la localización cromosómica de la expresión génica para el ARNm transcrito; en donde, opcionalmente, el número, la intensidad, o las dos cosas, de las sondas fluorescentes es indicativo del nivel de expresión génica en la localización cromosómica.
- 20 **6.** El método *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4, que comprende adicionalmente el recuento de los puntos fluorescentes que corresponden a moléculas únicas de ARN diana para obtener un perfil de expresión génica que se corresponde con la conformación cromosómica asociada que se determina a la vez.
- 7.** El método *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4, en donde las sondas no están solapadas.
- 25 **8.** El método *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4, en donde la hibridación de las sondas se produce en el núcleo de la célula.
- 9.** El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la célula es una célula viva; en donde, optativamente, las secuencias diana de ARNm se transcriben desde un gen endógeno.
- 30 **10.** El método *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 4, en donde la célula es una célula de mamífero, una célula de invertebrado, una célula de levadura o una bacteria.
- 11.** El método *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 3 o 4, en donde la célula es una célula humana; o en donde la célula es una célula cancerosa.

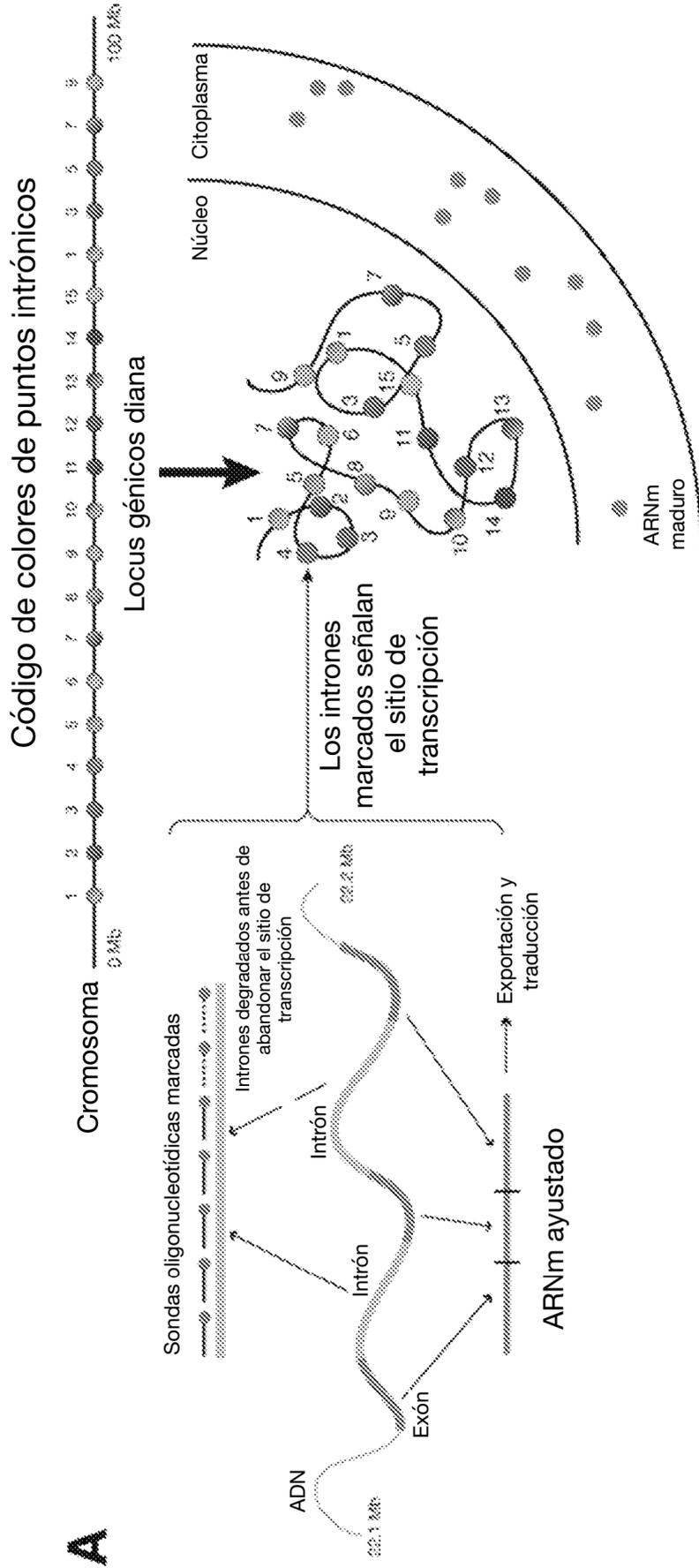
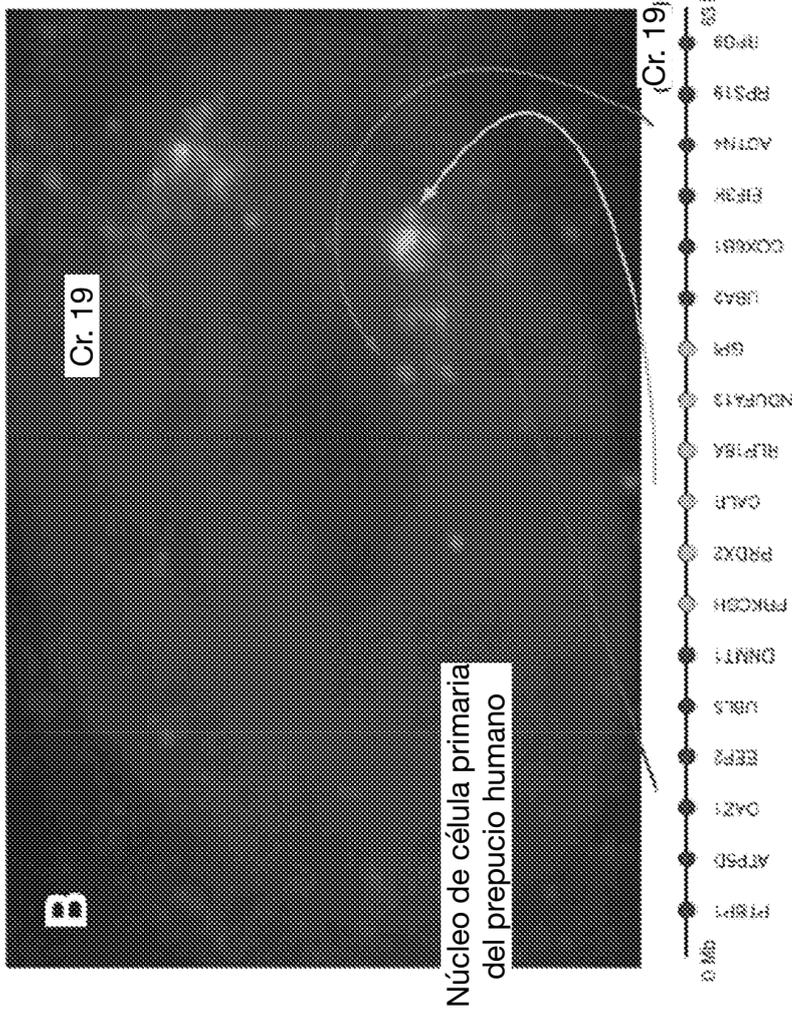
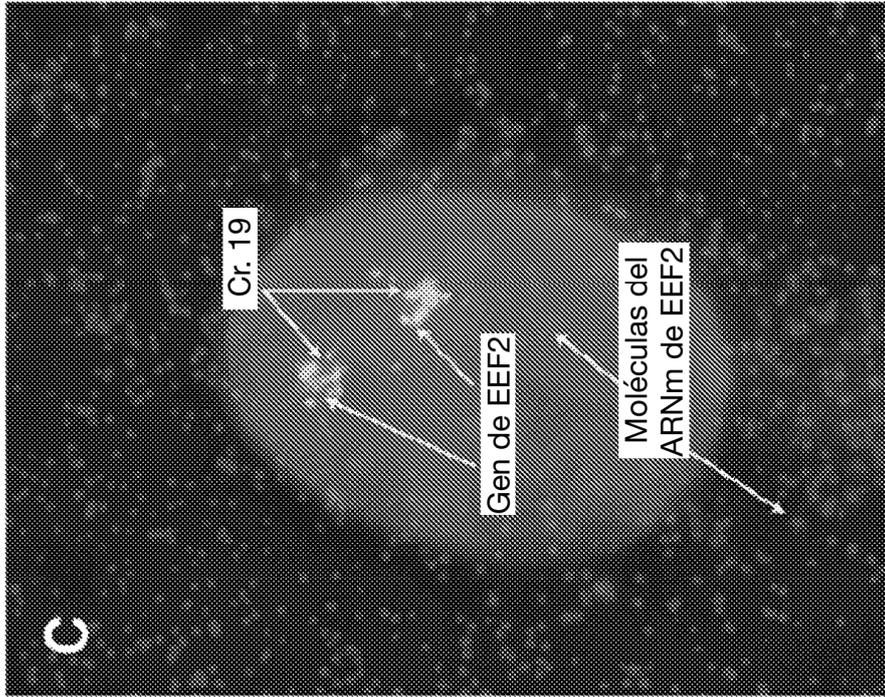


Figura 1A



Figuras 1B-1C

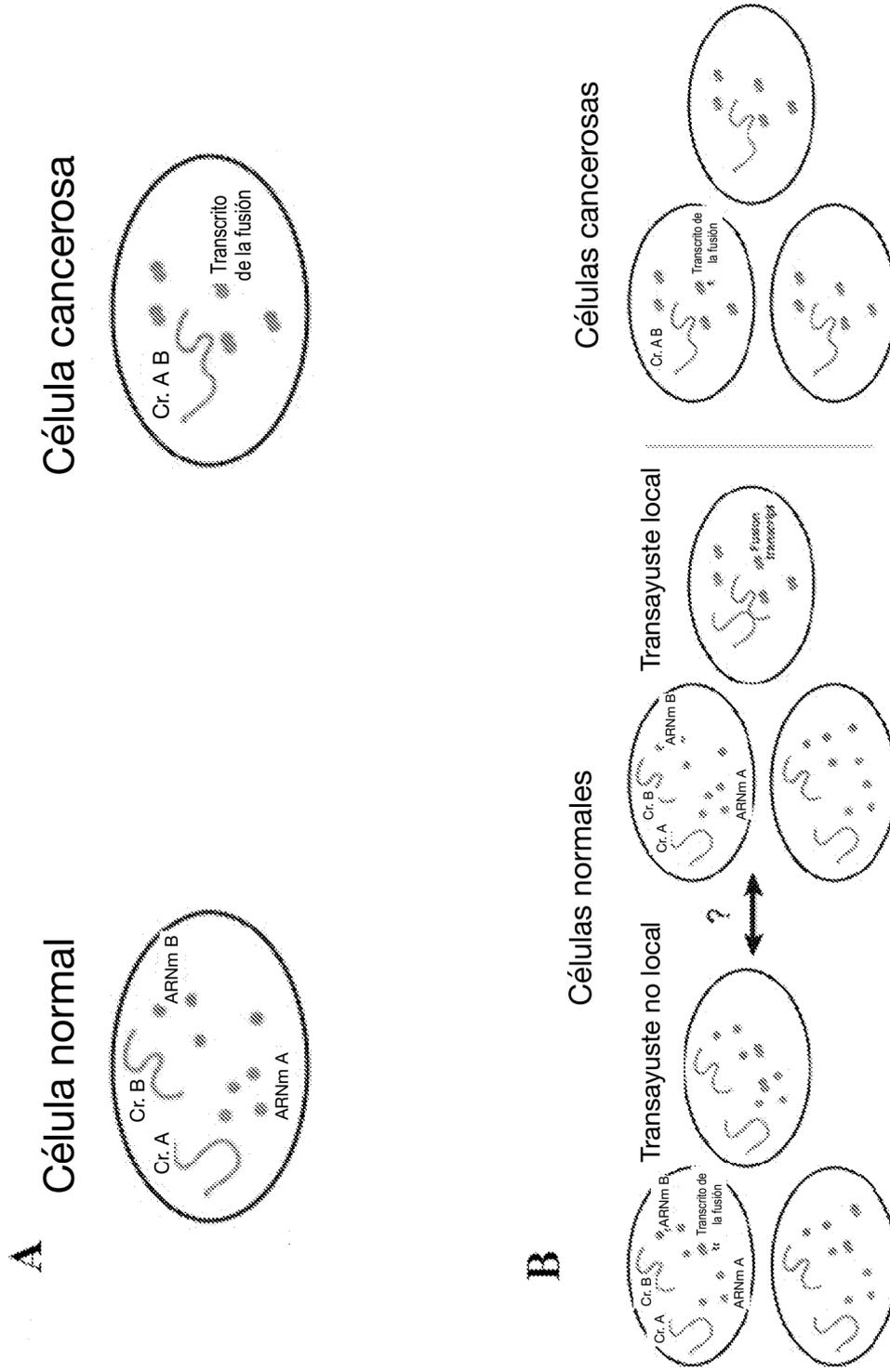
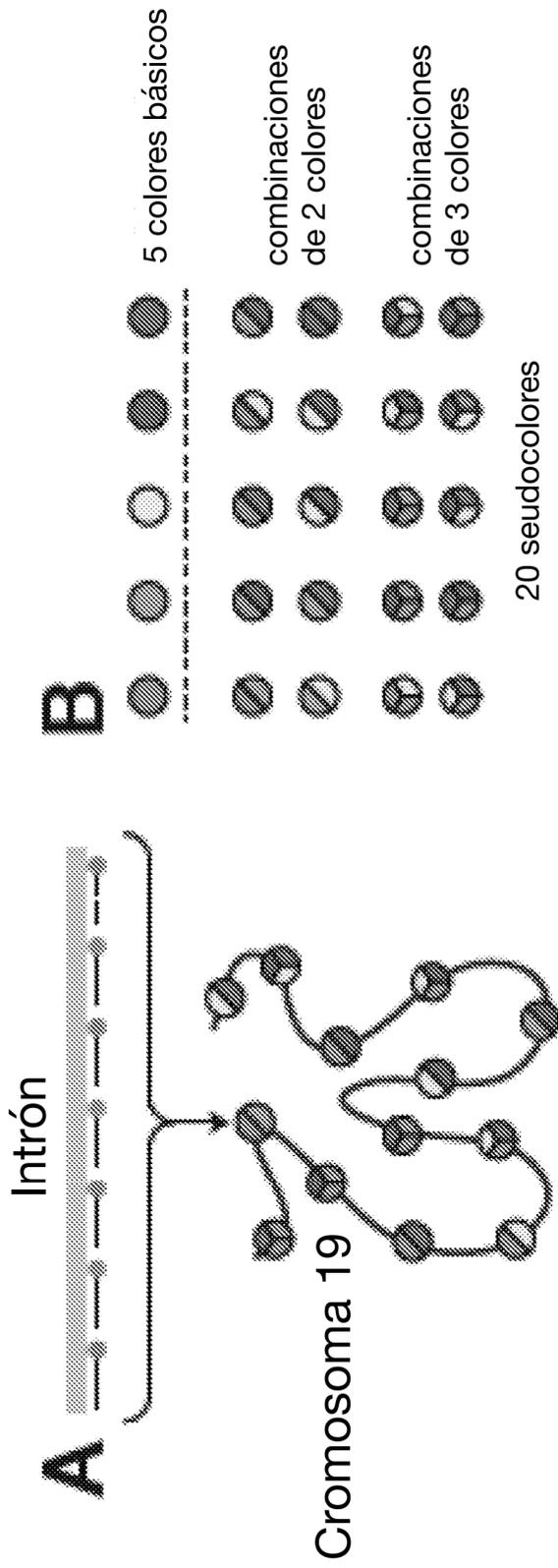
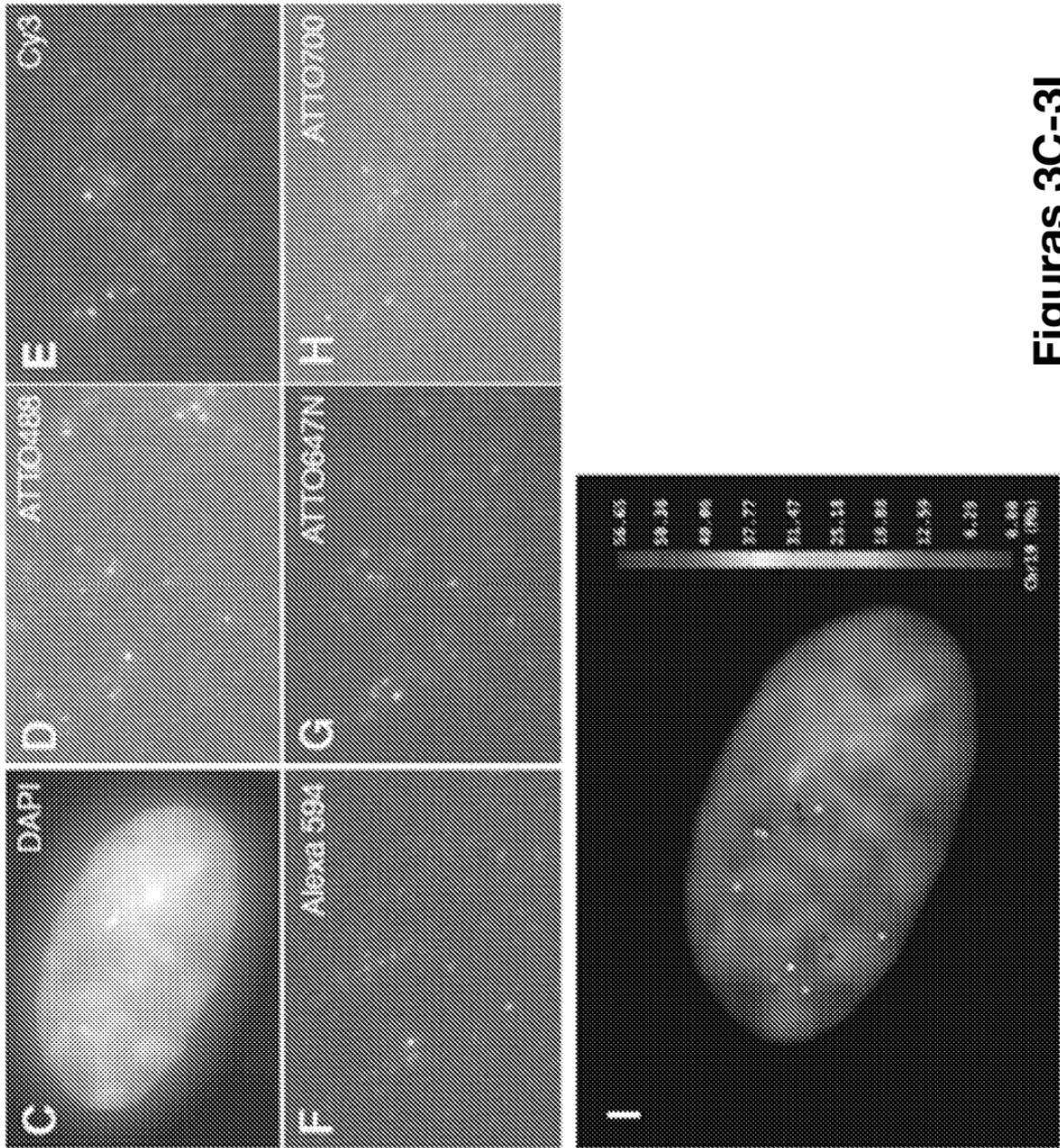


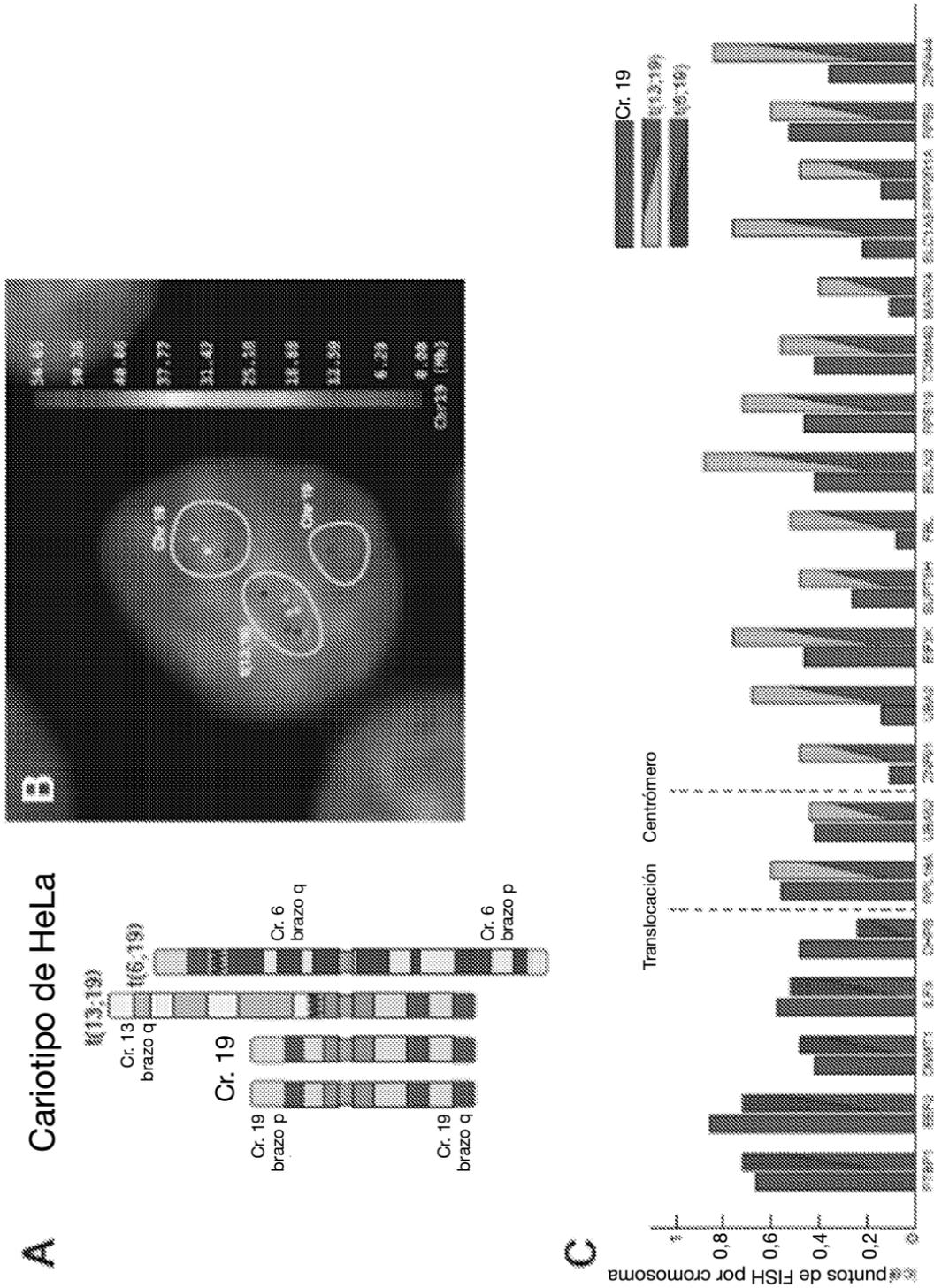
Figura 2



Figuras 3A-3B



Figuras 3C-3I



Nombre del gen en el cromosoma 19

Figura 4

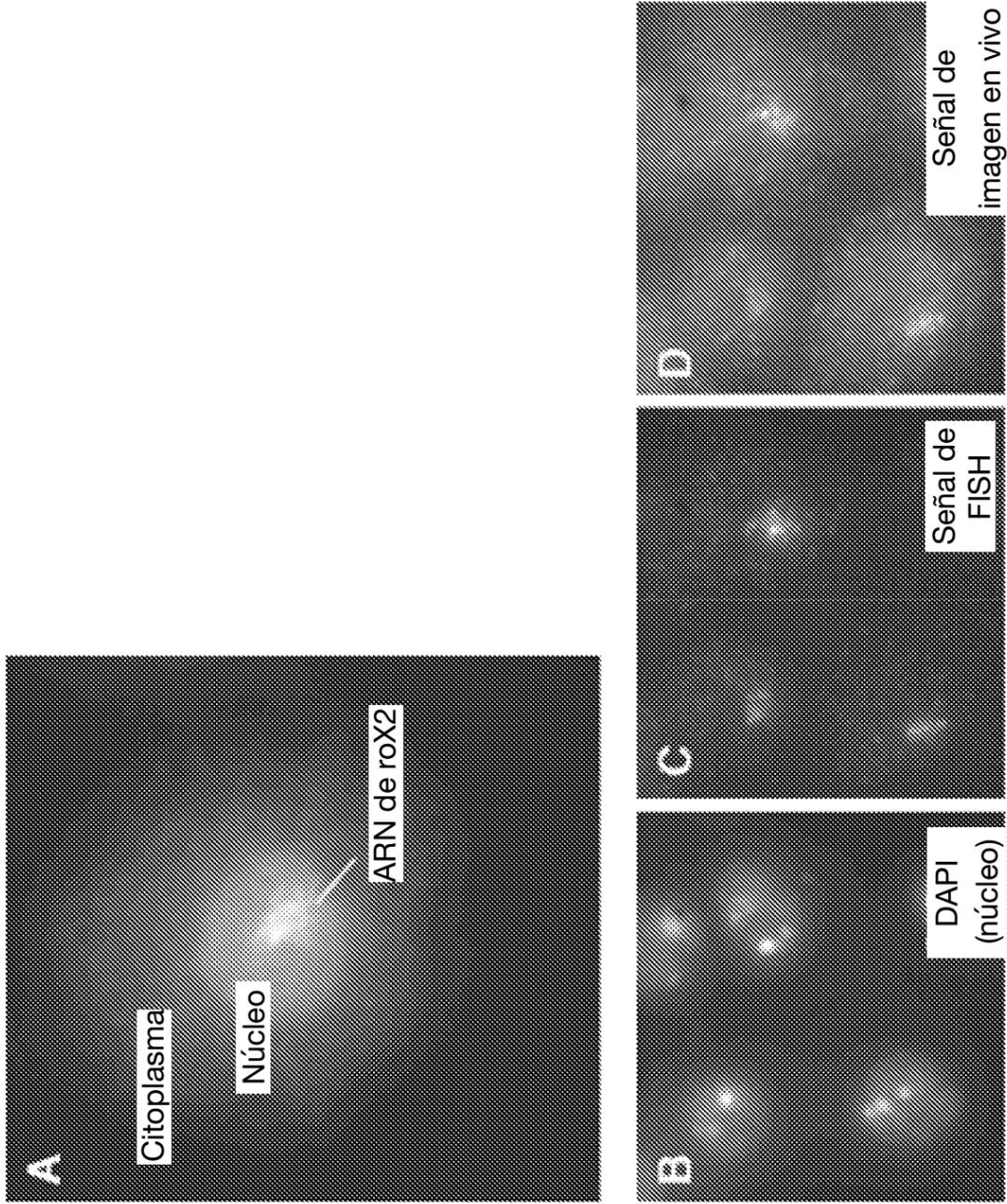


Figura 5

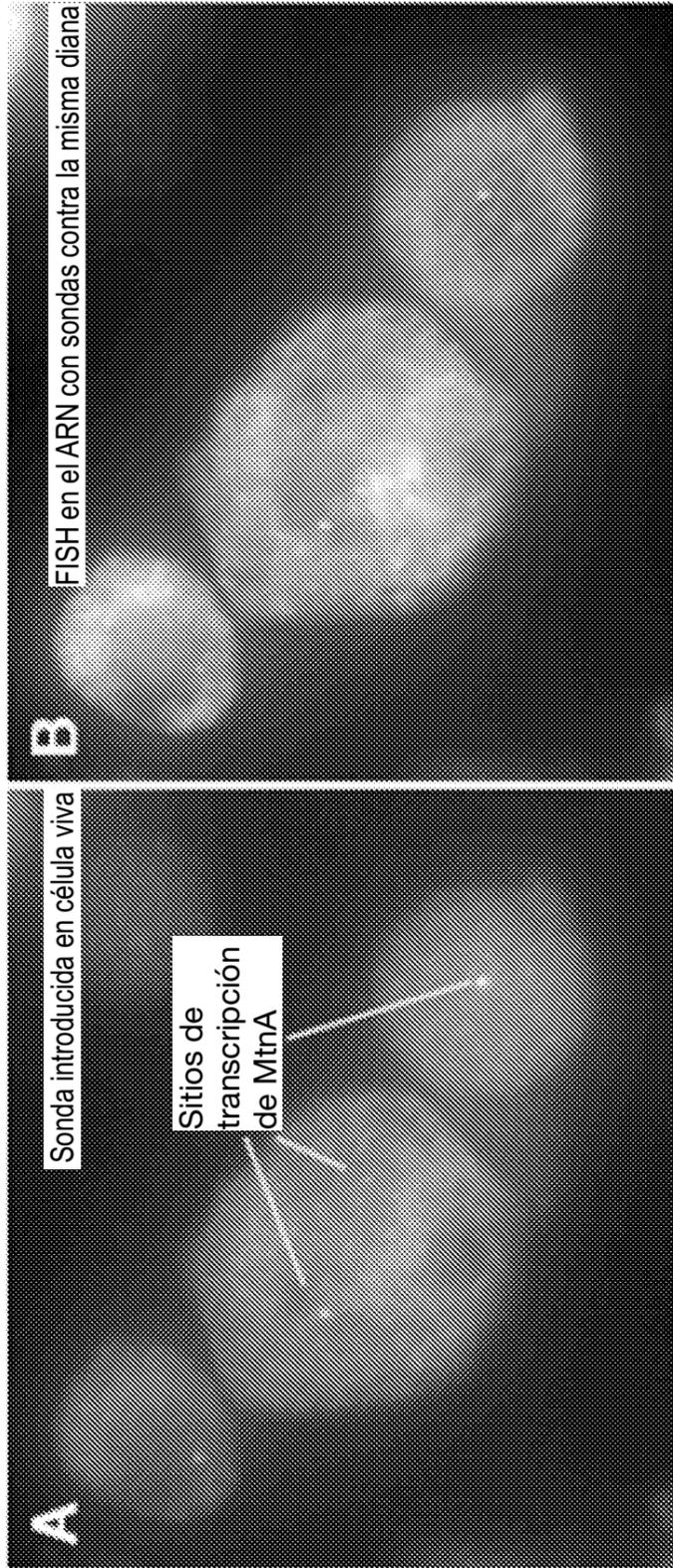


Figura 6

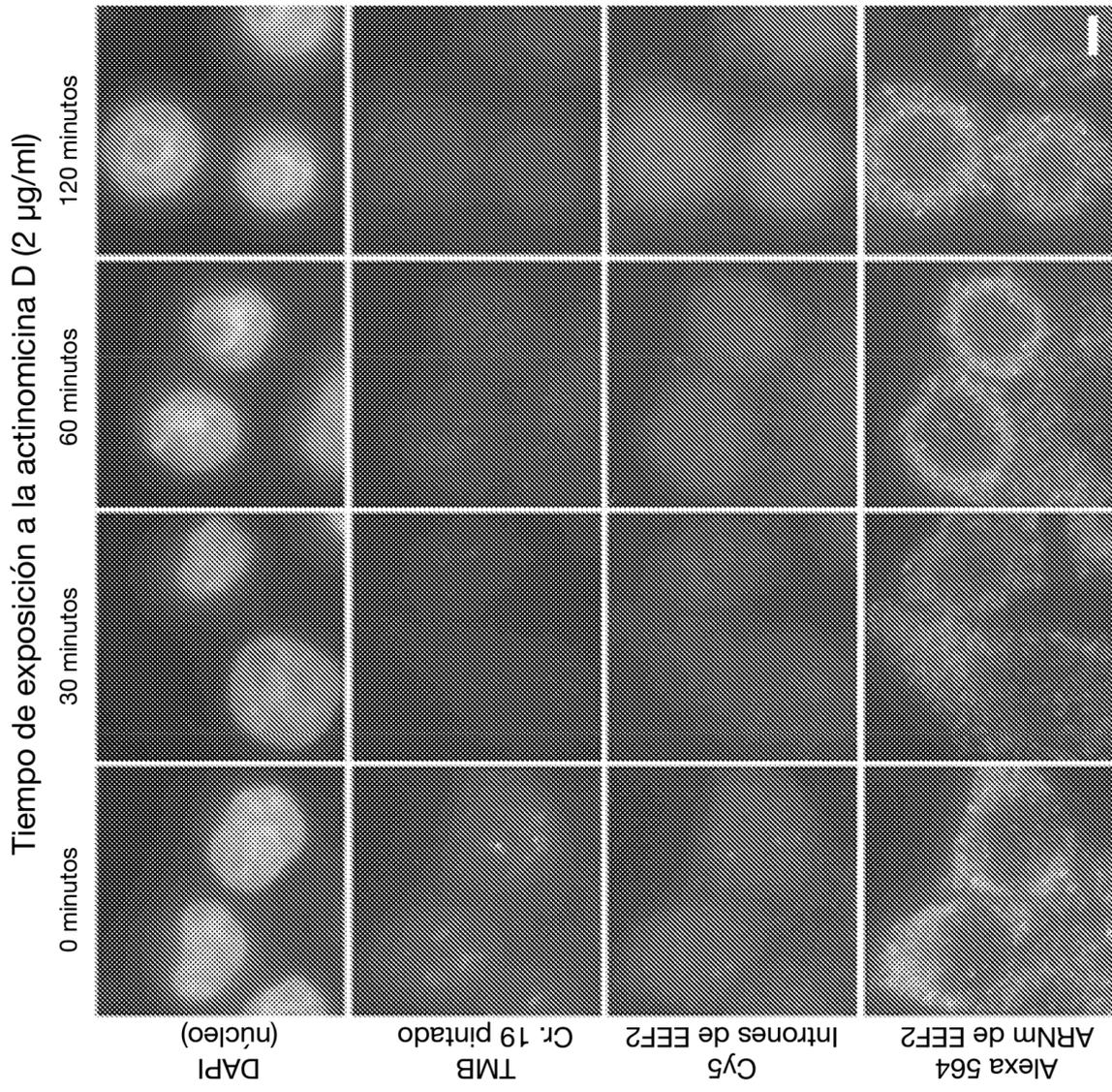


Figura 7

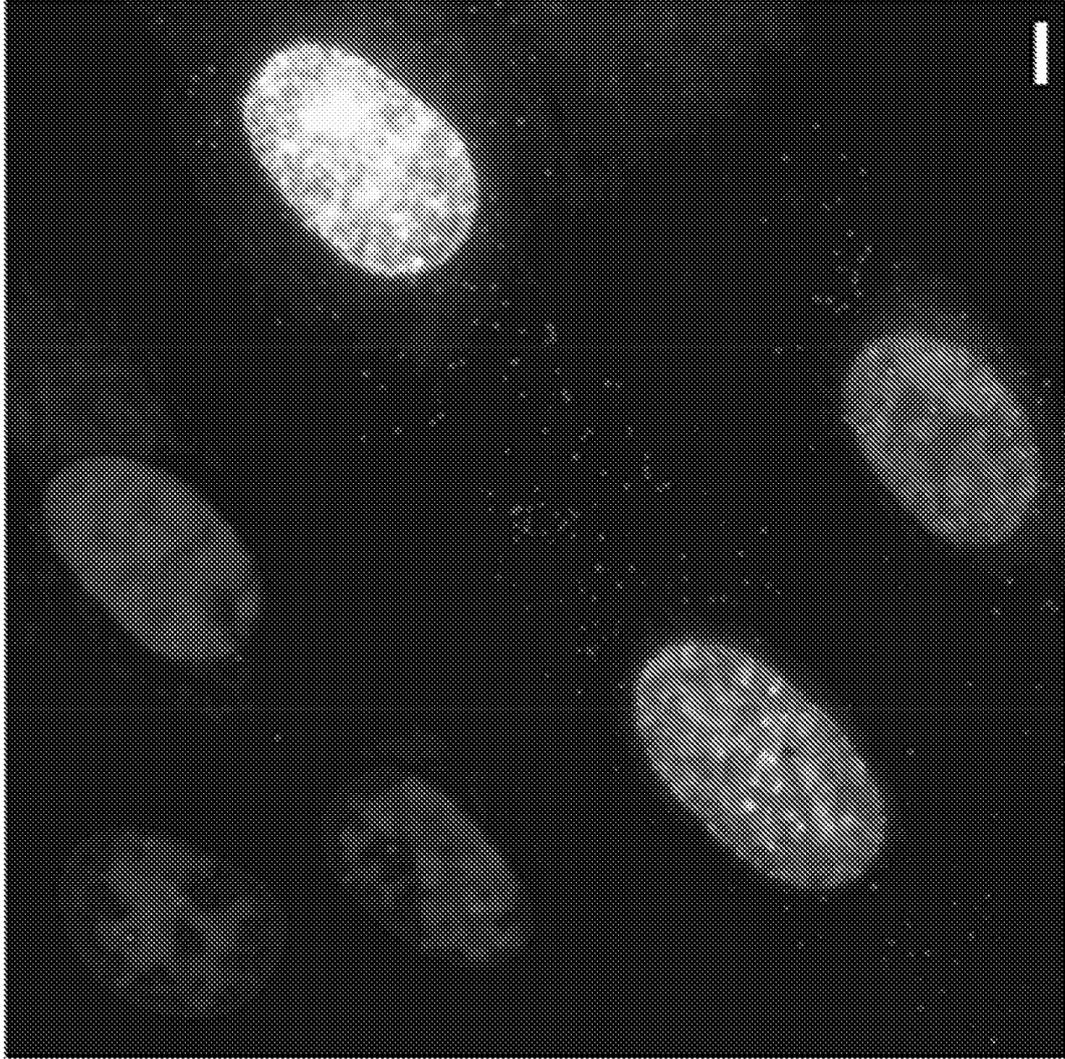


Figura 8