

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 868**

51 Int. Cl.:

G08B 15/02 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.10.2013** **PCT/US2013/065161**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014** **WO14062754**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2013** **E 13847647 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018** **EP 2909822**

54 Título: **Sistema de seguridad y método de marcado de un artículo de inventario y/o persona en las proximidades**

30 Prioridad:

16.10.2012 US 201213652781

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

25.07.2018

73 Titular/es:

APPLIED DNA SCIENCES INC. (100.0%)
50 Health Sciences Drive
Stony Brook, NY 11790, US

72 Inventor/es:

BERRADA, ABDELKRIM;
LIANG, BENJAMIN, MINGHWA;
JUNG, LAWRENCE y
JENSEN, KURT

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 676 868 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

Sistema de seguridad y método de marcado de un artículo de inventario y/o persona en las proximidades

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un sistema de seguridad y a métodos para marcar un artículo de inventario y/o una persona en las proximidades del artículo de inventario. Más particularmente, la presente invención se refiere a incorporar un ácido nucleico portador que incluye un marcador de ADN que tiene una secuencia identificable única en un fluido de humo, y descargar el fluido de humo incluyendo el ácido nucleico portador y el marcador de ADN en diversas superficies para identificación de inventario, autenticación o seguimiento, así como para marcar intrusos.

Antecedentes

15 La industria minorista a menudo enfrenta un dilema. Por un lado, cómo hacer que sus pantallas se abran e inviten a compradores potenciales, mientras que, por otro lado, aún protegen del robo su inventario y los artículos más valiosos.

Los robos de los minoristas u otras empresas generalmente suceden muy rápido y a menudo involucran artículos de alto valor. Los perpetradores que intentan este tipo de robo actúan muy rápidamente y pueden usar amenazas o violencia para intimidar al personal y eludir los sistemas de seguridad tradicionales. Además, las medidas de seguridad convencionales como las alarmas silenciosas y las cámaras de vigilancia son ignoradas rutinariamente por delincuentes determinados y, por lo tanto, estas medidas de seguridad suelen ser ineficaces para evitar el allanamiento de casas y negocios, y el posterior robo de objetos de valor o inventario.

25 Para abordar los problemas mencionados anteriormente, se han desarrollado sistemas de seguridad que incluyen generadores de humo o generadores de niebla. Estos sistemas pueden producir en pocos segundos una espesa nube de desorientación artificial y humo o niebla impenetrables. A diferencia de las cámaras de vigilancia y las alarmas, los sistemas de seguridad de humo o niebla detienen inmediatamente a los intrusos y los ladrones se devuelven al oscurecer todo lo que se ve en cuestión de segundos. Esta niebla desorientadora generalmente resulta en redirigir los esfuerzos de los intrusos de atacar objetos de valor por robo a encontrar una salida del edificio.

Los sistemas de humo o niebla de seguridad también se pueden usar junto con el audio y la iluminación para proporcionar un elemento de disuasión aún más fuerte. Estos sistemas están diseñados para proporcionar protección en ese momento crítico entre la activación del sistema y la llegada de un equipo de respuesta.

El humo denso y desorientador causa que los ladrones pierdan la habilidad de atacar rápidamente, ya que están distraídos por la intensa niebla que también les impide distinguir los objetos más valiosos que intentaban robar. Cuando se activa un humo o niebla tan densos, la mayoría de los intrusos abandonarán de inmediato cualquier intento de arreglárselas con objetos de valor e intentarán abandonar el área lo más rápido posible.

Los generadores de niebla o humo de seguridad se pueden integrar fácilmente en los sistemas de alarma existentes, como los sistemas de acceso y control y los sistemas de seguridad de circuito cerrado de televisión (CCTV). Sin embargo, aunque estos sistemas de niebla o humo de seguridad pueden evitar el robo y/o minimizar la cantidad de tal robo, los sistemas de niebla o humo de seguridad disponibles no proporcionan un método para identificar más tarde a los intrusos/ladrones y/o identificar exclusivamente cualquier artículo de inventario recuperado que pueda faltar en el local. Previamente se han descrito métodos para autenticar una persona o un objeto (EP2444136; WO95/02702; WO01/36676). Dichos métodos comprenden la disposición de un fluido generador de niebla al que se agrega un marcador de ADN, transformando el fluido en una niebla y llevando a la persona u objeto en contacto con la niebla a transferir el marcador sobre dicho objeto o persona.

Por lo tanto, subsiste una necesidad en la técnica de un sistema de humo o niebla de seguridad que no solo impida intrusos y robos, sino que también proporcione un método comprobado confiable para identificar si un sospechoso estaba presente cuando se activó el sistema de humo o neblina, e identifica de manera única los artículos del inventario marcados por el sistema de niebla o humo activado.

Resumen

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para marcar un artículo de inventario que comprende: proporcionar un generador de humo activable, proporcionar un depósito para contener un fluido de humo y adaptado para proporcionar un flujo de fluido de humo al generador; el depósito contiene un fluido de humo que incorpora un ácido nucleico portador y un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva; la activación el generador de humo para producir el humo marcador que comprende el ácido nucleico portador y el marcador de ADN para hacer que el humo marcador fluya sobre el artículo de inventario y marcar de ese modo de manera detectable el artículo de inventario con el marcador de ADN, en el que el marcador de ADN tiene una secuencia identificable exclusivamente que es menor que una parte por mil en peso del ácido nucleico portador.

En otro aspecto, la presente invención también proporciona un método para marcar a una persona en las proximidades de un generador de humo activado, el método comprende: proporcionar un generador de humo activable, proporcionar un depósito para contener un fluido de humo marcador y adaptado para proporcionar un fluido de humo y adaptado para proporcionar el flujo de fluido de humo al generador; el depósito comprende un fluido de humo que incluye un ácido nucleico portador y un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva; activar el generador de humo para producir humo marcador que comprende el ácido nucleico portador y el marcador de ADN para provocar que el humo marcador fluya sobre una persona que tenga una superficie corporal expuesta y/o uno o más artículos de prendas de la persona con marcador de ADN que tiene una secuencia exclusivamente identificable, en el que el marcador de ADN que tiene la secuencia exclusivamente identificable es menor que una parte por diez mil en peso del ácido nucleico portador.

En otra realización más, la invención proporciona un sistema de seguridad que comprende: un generador de humo activable; un depósito para contener un fluido de humo y adaptado para proporcionar un flujo de fluido de humo al generador; un fluido de humo comprende un ácido nucleico portador y un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva que se menor de una parte por cien mil en peso del ácido nucleico portador.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones de ejemplo del concepto de la invención se pueden entender más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con las figuras adjuntas.

La figura 1 muestra datos representativos de la amplificación y detección de ADN de telas textiles de algodón y lana después de la exposición a un marcador de humo que contiene un ácido nucleico portador que incluye un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva. El panel A es una traza de una separación por electroforesis capilar de los productos de amplificación por PCR de una muestra de tela de algodón expuesta a humo marcador que contiene el marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva. El panel B es una traza similar de una amplificación de PCR diferente de una muestra de tela de lana expuesta a humo marcador que contiene el marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva.

La figura 2 muestra la autenticación de ADN de un operador inmediatamente después de la exposición al humo marcador que incluye un ácido nucleico portador y un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva. Los paneles A, B, C y D muestran trazas de productos de amplificación por PCR de muestras tomadas de hisopos de la ventana nasal, la piel, la chaqueta y el calzado del operador, respectivamente, después de la separación por electroforesis capilar.

La figura 3 muestra la autenticación de ADN de un operador después de 48 horas después de la exposición al humo marcador que incluye un ácido nucleico portador y un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva. Los cuatro paneles A, B, C y D muestran los rastros de la separación por electroforesis capilar de productos de amplificación por PCR de muestras tomadas de hisopos de la ventana nasal, la piel, la chaqueta y el calzado del operador, respectivamente.

La figura 4 muestra la autenticación de ADN portátiles y zapatos de un operador hasta una semana después de la exposición al humo marcador que incluye un ácido nucleico portador y un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva. El panel A muestra un rastro de una separación por electroforesis capilar de los productos de amplificación por PCR de una muestra obtenida al frotar la mano del operador seis días después de la exposición. El panel B muestra un rastro de una separación por electroforesis capilar de productos de amplificación por PCR de una muestra obtenida limpiando los zapatos del operador una semana después de la exposición al humo marcador que incluye un ácido nucleico portador con un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva.

La figura 5 muestra la autenticación de una chaqueta de lana treinta días después de la exposición al humo marcador que incluye un ácido nucleico portador y un marcador de ADN que tiene una secuencia única identificable, habiéndose sometido la chaqueta a limpieza en seco después de la exposición al humo marcador que incluye un ácido nucleico portador con un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva.

Descripción detallada

Definiciones:

A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos utilizados en esta Solicitud, incluidas la especificación y las reivindicaciones, tienen las siguientes definiciones. Debe observarse que, tal como se usa en la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

El término "marcador de ADN" significa una etiqueta de ácido nucleico que comprende desoxinucleótidos. Un marcador de ADN puede ser de cadena doble o de cadena sencilla, ADNc, STR (repeticiones cortas en tándem) y similares. El

marcador de ADN también puede incluir la modificación de uno o más nucleótidos que ayudan en la identificación o detección del marcador de ADN. El término “marcador de ADN” como se usa en el presente documento significa un fabricante de ADN que comprende una secuencia identificable única que puede utilizarse para identificar o autenticar un artículo o producto particular, o incluso para identificar o autenticar la superficie corporal expuesta o el cabello de una persona expuesta a marcador humo o niebla que contiene el marcador de ADN.

El término “secuencia identificable” o “secuencia detectable” significa una secuencia de nucleótidos que puede detectarse por hibridación y/o tecnología de PCR mediante un cebador o sonda diseñada para interacción específica con la secuencia de nucleótidos objetivo a identificar. La interacción de la secuencia de nucleótidos objetivo con la sonda o cebador específico puede detectarse por medios ópticos y/o visuales para determinar la presencia de la secuencia de nucleótidos objetivo.

El término “artículo de inventario” tal como se utiliza en la presente memoria se define como cualquier objeto inanimado dentro del rango del humo o niebla del marcador producido a partir de un generador de humo.

El término “enlazador” significa un compuesto o una composición que une covalentemente una biomolécula a la superficie de un indicador emisor recubierto. Por ejemplo, pero sin limitarse a una partícula de fósforo de conversión creciente revestida sililada unida a una molécula de ADN.

El término “monómero”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier entidad química que se puede unir covalentemente a una o más de tales entidades para formar un oligómero o un polímero. Los ejemplos de “monómeros” incluyen nucleótidos, aminoácidos, sacáridos y similares.

El término “ácido nucleico” significa un polímero compuesto por nucleótidos que pueden ser desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. Estos compuestos pueden ser naturales o deoxirribonucleótidos o ribonucleótidos producidos sintéticamente. El ácido nucleico producido sintéticamente puede ser de una secuencia natural, o una secuencia única no natural.

El término “nucleótido” significa una unidad monomérica que comprende un azúcar fosfato, generalmente ribosa-5'-fosfato o 2'-desoxirribosa-5'-fosfato unido covalentemente a una base que contiene nitrógeno, generalmente, adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T) en el caso de un desoxirribonucleótido, y generalmente, adenina (A), guanina (G), citosina (C) o uracilo (U) en el caso de los ribonucleótidos.

Los ácidos nucleicos pueden hibridarse con ácidos nucleicos complementarios de una manera específica de secuencia. Es decir que pueden participar en reacciones de hibridación en las que los pares de bases complementarios A: T (adenina: timina) y G: C (guanina: citosina) forman enlaces de hidrógeno intermoleculares (o intramoleculares) e interacciones de apilamiento cooperativo entre las bases vecinas planas en cada filamento a través de electrones π , conocidos como interacciones de emparejamiento de bases Watson-Crick. Las bases de las cadenas de ácido nucleico también pueden hibridar para formar pares de bases no Watson-Crick mediante las interacciones denominadas “de oscilación” en las que G (guanina) se empareja con U (uracilo) o alternativamente, I (inosina) se empareja con C (citosina), U (uracilo) o A (adenina).

El término “oligómero” se refiere a una entidad química que contiene una pluralidad de monómeros. Como se usa en el presente documento, los términos “oligómero” y “polímero” se usan indistintamente. Los ejemplos de oligómeros y polímeros incluyen polidesoxirribonucleótidos (ADN), polirribonucleótidos (ARN), otros polinucleótidos que son C-glucósidos de una base de purina o pirimidina, polipéptidos (proteínas), polisacáridos (almidones o poliazúcar) y otras entidades químicas que contienen unidades de repeticiones de estructura química similar.

El término “polinucleótido” o “nucleótido” se refiere a un polímero de cadena sencilla o de cadena doble compuesto por monómeros de nucleótidos covalentes que forman una cadena de generalmente más de veinte a cincuenta nucleótidos de longitud.

El término “partícula de fósforo” significa una partícula o composición que comprende al menos un tipo de material de fósforo de conversión ascendente.

El término “cebador” significa un nucleótido con una secuencia de nucleótidos específica que es suficientemente complementaria a una secuencia particular de una molécula de ADN objetivo, de manera que el cebador se hibrida específicamente con la molécula de ADN objetivo.

El término “sonda” se refiere a un componente de unión que se une preferentemente a uno o más objetivos (por ejemplo, epítopos antigénicos, secuencias de polinucleótidos, receptores macromoleculares) con una afinidad suficiente para permitir la discriminación de sonda marcada unida a la sonda marcada no específicamente unida (es decir, fondo).

El término “polinucleótido de sonda” significa un polinucleótido que hibrida específicamente con un polinucleótido objetivo predeterminado.

El término “PCR” se refiere a una reacción en cadena de la polimerasa. La PCR es una tecnología de amplificación útil para expandir el número de copias de una secuencia de ácido nucleico a través de ciclos de temperatura a través de ciclos de fusión, reasociación y polimerización con pares de oligonucleótidos cebadores cortos complementarios a secuencias específicas que limitan con la secuencia de ácido nucleico en presencia de una ADN polimerasa, preferiblemente una ADN polimerasa termoestable tal como la polimerasa Taq termoestable originalmente aislada de la bacteria termófila (*Thermus aquaticus*). La PCR incluye, pero no se limita a, métodos de PCR estándar, en los que en las cadenas de ADN se copian para proporcionar un millón o más de copias de las cadenas de ADN originales (por ejemplo, PCR utilizando cebadores aleatorios: véase, por ejemplo, PCR con cebadores arbitrarios: Approach with Care. W.C. Black IV, Ins. Mol. Biol. 2: 1-6, Dec. 2007); Tecnología de PCR en tiempo real, en la que la cantidad de productos PCR se puede controlar en cada ciclo (*Real time quantitative PCR*: C.A. Heid, J. Stevens, K.J. Livak and P.M. Williams, 1996 Genome Research 6: 986-994); Transcripción PCR inversa en el que el ARN se copia primero en soportes de ADN y a continuación las cadenas de ADN se amplifican mediante reacciones de PCR estándar (Véase, por ejemplo: Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential: W.F. Freeman, S.J. Walker and K.E. Vrana; BioTechniques 26:112-125, January 1999).

Los términos “ácido ribonucleico” y “ARN” denotan un polímero compuesto de ribonucleótidos. Los términos “ácido desoxirribonucleico” y “ADN” denotan un polímero compuesto por desoxirribonucleótidos.

Un “ácido nucleico portador” como se usa en esta solicitud significa un ácido nucleico masivo que puede incluir moléculas de ácidos nucleicos grandes, oligómeros de ácidos nucleicos o fragmentos de ácidos nucleicos usados como portadores de un marcador de ADN que tiene una secuencia única identificable para identificar o autenticar un producto particular o para marcar a las personas presentes durante el empañamiento con el ácido nucleico portador. El ácido nucleico portador generalmente está presente en un gran exceso (p/p) sobre la cantidad de marcador de ADN, de modo que el aislamiento o incluso la detección del marcador de ADN es imposible sin conocimiento previo de al menos una parte de la secuencia de identificación exclusiva del marcador de ADN. Por lo tanto, el marcador de ADN y el ácido nucleico portador pueden compararse con la proverbial “aguja en un pajar” en la que el marcador de ADN es el análogo de la aguja oculta en el pajar de ácido nucleico portador.

El término “persona” se puede definir como un propietario, un empleado, un comprador u otro invitado, un licenciario como una persona que repara, o un intruso o un transgresor.

Adelante se enumeran las realizaciones de la presente invención.

La presente invención proporciona un método para marcar un artículo de inventario. El método incluye proporcionar un generador de niebla o humo activable y un depósito para contener un fluido de humo marcador y adaptado para proporcionar un flujo de fluido de humo marcador al generador. El depósito contiene un fluido de humo marcador que incluye un ácido nucleico portador y un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva, y tras la activación del generador de humo, se genera un marcador de humo o niebla que hace que fluya sobre el artículo del inventario. La secuencia identificable exclusivamente es menor de una parte por diez mil en peso del portador de ácido nucleico. El método incluye además activar el generador de humo para producir el humo marcador que incluye el ácido nucleico portador y el marcador de ADN para hacer que el humo marcador fluya sobre el artículo de inventario y por lo tanto marque de manera detectable el artículo de inventario con marcador de ADN.

Las realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención también proporcionan un sistema de seguridad. El sistema de seguridad incluye un generador de humo activable, un depósito para contener un fluido de humo marcador y adaptado para proporcionar un flujo de fluido de humo marcador al generador; un fluido de humo comprende un ácido nucleico portador y un marcador de ADN que tiene una secuencia identificable exclusivamente al generador de humo, en el que el marcador de ADN tiene una secuencia identificable exclusivamente que es menos de una parte por diez mil en peso del ácido nucleico portador.

Se usa una máquina de humo o una máquina de humo en realizaciones de ejemplo de la presente invención para crear una niebla o humo para marcar los artículos de inventario mencionados anteriormente con el ácido nucleico portador que incluye el marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva. El término “máquina de niebla” y “máquina de humo” se pueden utilizar indistintamente para significar lo mismo. Además, los términos “niebla” y “humo” pueden utilizarse indistintamente para significar lo mismo.

La máquina de niebla o máquina de humo es, por ejemplo, un dispositivo que emite humo, como un marcador de humo, para evitar que los intrusos permanezcan en el establecimiento y que contiene el ácido nucleico portador que incluye un marcador de ADN que tiene una secuencia identificable única para marcar un inventario artículo y/o persona presente en el local en el momento de la activación del generador de humo o niebla con el ácido nucleico portador que incluye el marcador de ADN.

Existen varios tipos diferentes de máquinas de humo o niebla que se pueden usar de acuerdo con las realizaciones de ejemplo de la presente invención para generar humo marcador que incluye un ácido nucleico portador que incluye un marcador de ADN. Por ejemplo, las máquinas de niebla o las máquinas de humo adecuadas incluyen máquinas de niebla a base de agua, máquinas de humo a base de aceite y máquinas de niebla de enfriamiento. La presente realización de ejemplo se refiere a máquinas de niebla a base de agua. Sin embargo, como se analiza a continuación, en realizaciones

alternativas de la presente invención, también se pueden usar máquinas de niebla a base de aceite y máquinas de niebla de enfriamiento.

Por ejemplo, una máquina de humo a base de agua puede incluir, por ejemplo, un depósito o tanque de fluido, una bomba (por ejemplo, una bomba eléctrica) para mover el fluido de humo incluyendo ácido nucleico portador que contiene el marcador de ADN y un intercambiador de calor que vaporiza el humo fluido con el marcador de ADN. Los modelos más complejos pueden incluir una variedad de otras características, incluyendo bombas de velocidad variable para controlar la salida de niebla, módulos de temporizador o componentes para operación remota y monitoreo del estado de la máquina de niebla.

En la presente realización de ejemplo, la máquina de nebulización a base de agua produce un humo marcador que incluye el ácido nucleico portador que incluye el marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva, que es un humo blanco generado térmicamente usado específicamente como medida de seguridad. Este marcador de humo que incluye ácido nucleico portador que incluye un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva de acuerdo con la presente realización de ejemplo de la presente invención puede crearse, en la máquina de nebulización a base de agua, por ejemplo, vaporizando glicol (por ejemplo, dietilenglicol), dipropilenglicol, propilenglicol o trietilenglicol) o glicerina mezclada con agua destilada sobre una fuente de calor de alta temperatura y calentada por encima de su rango de ebullición en la máquina de niebla. El fluido de niebla en el tanque de fluido es forzado a través de un intercambiador de calor por una bomba de alta presión. El intercambiador de calor mantiene una temperatura alta a la cual el fluido se vaporiza en un proceso comúnmente conocido como "evaporación relámpago". A medida que el fluido se "evapora", se expande rápidamente y esa expansión fuerza el vapor a través de la boquilla de la máquina.

Al salir de la máquina de humo o niebla y entrar en contacto con el aire frío fuera de la máquina de niebla, el vapor se enfría muy rápidamente y se condensa, formando así rápidamente una densa niebla blanca compuesta de millones de partículas de líquido microscópicas suspendidas en el aire que oscurecen la visión. la medida en que incluso los objetos a unos pocos centímetros de distancia no son fácilmente visibles y por lo tanto presenta una barrera de confrontación u obstáculo para cualquier intruso.

La apariencia blanca muy densa del marcador de humo o niebla es causada por la luz que se refracta a través de las partículas y se dispersa hacia atrás. Debido a que las partículas producidas son tan pequeñas (varía de un fabricante a otro, pero típicamente varían desde un diámetro promedio de, por ejemplo, aproximadamente 0.2 micras hasta aproximadamente 2.0 micras), el marcador de humo o niebla se instala muy lentamente. En algunas realizaciones, el humo marcador puede durar un período prolongado después de que el generador de humo se apaga, y sin embargo debido a las gotitas muy finas, el humo marcador no se asienta en las superficies a ningún nivel discernible y por lo tanto no contamina visiblemente los elementos expuestos o inventario

A diferencia de las cámaras de vigilancia y los sistemas de alarmas, el humo o la niebla de los marcadores detienen inmediatamente a los intrusos ocultando en pocos segundos todo lo que podría ser robado o vandalizado, y desorientando al intruso o a los intrusos. Esto deja al intruso con pocas opciones además de salir del edificio lo más rápido posible. El marcador de humo o niebla puede ser un líquido no tóxico a base de glicol que se disipa rápidamente sin residuos y no daña a las personas ni al papel ni a los productos electrónicos. Por ejemplo, en una realización de ejemplo, la máquina de niebla o máquina de humo es una máquina de humo a base de agua o máquina de humo que incluye un depósito para contener el fluido de humo marcador que incluye el ácido nucleico portador y un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva. El generador de humo que, cuando se activa, dispersa una niebla/marcador de seguridad que humea sobre los artículos del inventario y cualquier persona que se encuentre cerca de los artículos del inventario. Los generadores de niebla o humo de seguridad útiles en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, generadores de niebla de seguridad SmokeCloak (como SmokeCloak Vali V20, SmokeCloak Vali V 10, SmokeCloak Vali V5, gama Smoke Cloak IPX, Smoke Cloak Vali System 1000, SmokeCloak Vali System 2000, Smoke Cloak Vali System 3000, Smoke Cloak Vali System 4000, Smoke Cloak Vali System 4000 x-stream, Smoke Cloak Vali System 8000, SmokeCloak Vehicle Range System 24 de SmokeCloak, Dinamarca, FoQus, Protect 600, Protect 1100, Protect 220 de Protect A/S, Hasselager, Dinamarca, T-1500, T-1500X2, P-1500, P-1500X2 de Flash Fog Security, Ontario, Canadá, Bandit 240DB, 240PB de Bandit N/V, Opglabbeek, Bélgica) o cualquier otras máquinas de niebla o humo basadas en agua adecuadas conocidas por los expertos en la técnica.

En una realización, el fluido de humo almacenado en el depósito del dispositivo que se mezcla con el ácido nucleico portador y el marcador de ADN para humo de seguridad/marcador de niebla es, por ejemplo, un fluido a base de agua que incluye alimentos o glicoles de grado médico y alimenticio y agua desionizada. Estos fluidos de humo a base de agua incluyen, por ejemplo, FL600-V y FL-600, de SmokeCloak, Dinamarca, XTRA + de Protect A/S, Hasselager, Dinamarca, FlashFog de FlashFog Security, Ontario, Canadá, y paquete de cartuchos HY-3 de Bandit 240DB, 240PB de Bandit N/V, Opglabbeek, Bélgica o cualquier otro fluido de humo adecuado conocido por los expertos en la materia.

Alternativamente, en otra realización a modo de ejemplo, la máquina de humo o la máquina de humo puede ser una máquina de humo a base de aceite o una máquina de humo. Como con el glicol y agua nebulizada o el fluido de humo antes mencionados, el ácido nucleico portador que contiene un marcador de ADN se incluye igualmente en estos fluidos de humo a base de aceite con fines de marcado.

Estos fluidos de humo a base de aceite pueden incluir, por ejemplo, aceite mineral (por ejemplo, aceite para bebés). Las máquinas de niebla o humo propulsadas con gas usan un gas inerte (comúnmente dióxido de carbono o nitrógeno) para impulsar el aceite mineral en un intercambiador de calor donde el humo se atomiza y se envía al aire para producir el humo marcador que incorpora el ácido nucleico portador que incluye el marcador de ADN. Estos fluidos de humo basados en aceite que se convierten en máquinas de humo o niebla marcadora son similares en principio al fluido de humo creado por el fluido de humo a base de glicol, excepto que el humo marcador del humo de marcador basado en aceite puede soportar temperaturas mucho más altas y es mucho más denso que el humo marcador creado por los fluidos marcadores basados en glicol. Por lo tanto, el humo o la niebla a base de aceite es mucho más denso y permanece en el aire muchas veces más que la niebla a base de agua, ya que las partículas de niebla no se evaporan tan rápido. Al igual que con el humo de marcador a base de glicol, el humo de marcador a base de aceite es perfectamente seguro, no tóxico, intrínsecamente biodegradable y no deja residuos.

Las máquinas de niebla o humo basadas en aceite adecuadas incluyen, por ejemplo, Phantom PS31, Phantom PS 33 de Pea Soup Ltd., Reino Unido, Max 3000 APS generador de niebla, Max 5000 Fog APS generador de niebla, Max 5000 H.O. (Alto Rendimiento) APS Fog Generator de A.C.T. Lighting, Inc. en www.actlighting.com, y SG-OB30 - Máquina generadora de humo a base de aceite de Froggys Fog, Columbia, TN.

El fluido de humo basado en aceite puede incluir, por ejemplo, fluido de niebla neutra MDG de A.C.T. Lighting, Inc. en www.actlighting.com, PSSO180-5L: Smoke Oil 180, PSSO180-205L: Smoke Oil 180 de Pea Soup Ltd., Reino Unido, y Formula O Smoke Oil Fluid de www.froggysfog.com.

Alternativamente, en otras realizaciones más, el sistema de seguridad puede incluir otros tipos de máquinas de humo o niebla que no usan fluido de humo basado en glicol o fluido de humo basado en aceite mineral. Por el contrario, estas otras formas de realización pueden incluir máquinas de niebla enfriada que crean una niebla pesada de baja altura que usa hielo seco (es decir, dióxido de carbono sólido) o nitrógeno líquido. En estas realizaciones, el ácido nucleico portador que contiene el marcador de ADN también se incluye en la niebla resultante. A diferencia de otros tipos de humo o máquina de niebla, que crean un humo o niebla que flota en el aire o se eleva, la niebla creada por hielo seco o líquido está fría y, por lo tanto, se hunde en el suelo o en el nivel más bajo disponible.

Máquinas de niebla o humo refrigeradas adecuadas para uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, Peasouper Dry Ice Fog Machine Le Maitre Pea Soupe and FreezeFog Pro Heavy Fog Chiller de Pea Soup Ltd., United Kingdom, Chauvet Nimbus Dry Ice Fog Machine, Producto #: CVT NIMBUS LIST de Chauvet Lighting, Sunrise, FL City Theatrical SS6000 Dry Ice Fogger, Catálogo # SFXF-0296 de Production Advantage, Inc, Williston, VT.

En otra realización de ejemplo, en lugar de que se genere humo o niebla de color blanco, el sistema de seguridad puede acoplarse adicionalmente a un elemento de luz coloreado que también se activa cuando se activa el generador de humo o niebla. En esta realización, el elemento de luz coloreado cuando se activa brilla sobre la niebla clara de modo que la niebla refleja la luz coloreada en lugar de la luz normal/blanca para producir de ese modo un humo o niebla de color.

Además de las máquinas de humo o niebla mencionadas anteriormente, cualquier otro dispositivo o generador de humo utilizado para generar humo o niebla también se puede usar de acuerdo con una realización de ejemplo de la presente invención. Por ejemplo, en una realización, el marcador de ADN puede proporcionarse en un bote o una granada de humo, similar al usado por los militares para crear una pantalla de humo. Estos recipientes están contruidos con un cilindro de metal con orificios en la parte superior e inferior que liberan humo cuando se encienden al tirar de un pasador u otro mecanismo de activación. Muchos botes de humo contienen tinte que produce humo de color cuando se enciende. El humo o la niebla se pueden producir en una variedad de colores, como, por ejemplo, rojo, morado, naranja, amarillo, azul, verde, gris, blanco y negro.

En una realización de ejemplo de la presente invención, los generadores de humo pueden instalarse, por ejemplo, sobre techos o altos en paredes. En estas realizaciones, el humo se fuerza verticalmente hacia abajo y luego se eleva formando una barrera espesa, que protege el humo o el dispositivo generador de niebla, así como las instalaciones y los contenidos.

En otras realizaciones, la máquina de humo o niebla también se puede colocar en cualquier otra ubicación adecuada deseada que las mencionadas anteriormente. Por ejemplo, la máquina de humo o niebla puede ocultarse dentro de las paredes de las instalaciones o colocarse dentro de los conductos de aire. En otras formas de realización más, la máquina de humo o niebla puede colocarse, por ejemplo, en el piso de las instalaciones.

Las máquinas de niebla o humo de seguridad pueden activarse activando un sistema de alarma. Por ejemplo, los generadores de humo o niebla de seguridad de la presente realización de ejemplo pueden ser parte de un sistema de alarma de intrusión existente. Por ejemplo, una vez que el sistema de alarma detecta un robo en las instalaciones de alguien, un elemento calentador en el generador de niebla de seguridad convierte el glicerol líquido en una niebla artificial extremadamente densa que se propaga inmediatamente por toda el área.

Alternativamente, en una realización de ejemplo, el sistema de niebla o humo de seguridad puede ser parte de un sistema independiente con detectores dedicados y un panel de alarma que activa el dispositivo generador de seguridad de niebla.

Esto evita que el sistema de seguridad de humo o niebla se active si no se confirma la alarma de intrusión, como por ejemplo una falsa alarma debida a movimientos de aire, por ejemplo, movimiento causado por la convección de un acondicionador de aire detectado por un sensor de movimiento. Estos detectores se denominan “aguantadores” ya que impiden que el sistema se active hasta que se confirme el movimiento.

En una realización de ejemplo, además del efecto disuasorio anterior proporcionado por el humo marcador generado por la máquina de humo o niebla, el sistema de seguridad puede incluir adicionalmente accesorios disuasivos adicionales. Por ejemplo, el sistema de seguridad puede incluir además una luz estroboscópica intermitente brillante de alta intensidad que amplifica el efecto cegador del marcador de humo o niebla. La luz parpadeante rápida evita cualquier intento de ver a través del humo o la niebla, y llama la atención sobre la escena. Además, el sistema de seguridad puede incluir, además, un dispositivo de sonido, como, por ejemplo, una sirena que emite un ruido molesto pero inofensivo que atrae la atención y, en combinación con el marcador, el humo obliga al intruso a huir inmediatamente.

El generador de niebla o humo de seguridad de la presente realización de ejemplo puede funcionar inmediatamente para proteger las instalaciones de una persona impidiendo que uno o más intrusos saquen y/o destruyan la propiedad. Por ejemplo, en cuestión de segundos, el intruso puede estar completamente desorientado por la densa niebla e inmediatamente debe abandonar las instalaciones. Contrastando esto con el tiempo de respuesta por parte de la policía y el titular de la llave (por ejemplo, el dueño del local) que incluso en las mejores circunstancias llevará al menos unos minutos. Sin embargo, cuando llegan para investigar los efectos de la activación de la alarma, es posible que los intrusos ya se hayan ido y se hayan robado los bienes de las instalaciones. Los generadores de niebla o humo de seguridad de la presente realización de ejemplo inhiben rápidamente a los intrusos de permanecer en las instalaciones y de ese modo minimizan y/o previenen el robo. Además, dado que la niebla descargada del generador de niebla de seguridad del presente ejemplo de realización es un marcador de humo o niebla que incluye un ácido nucleico portador que contiene un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva, áreas expuestas del intruso tales como piel, pelo y tanto la ropa como los artículos de inventario tomados de las instalaciones están marcados con el ácido nucleico portador y el marcador de ADN y pueden identificarse posteriormente mediante técnicas de autenticación para determinar si el sospechoso y/o elemento estaban en el lugar en el momento del delito en cuestión, como se discutirá en detalle a continuación.

Por ejemplo, en una realización a modo de ejemplo, una persona en las proximidades del artículo de inventario está expuesta al marcador de humo o niebla, la persona tiene una prenda de vestir expuesta y/o una superficie corporal expuesta, y por lo tanto marca de manera detectable el artículo expuesto de ropa y/o la superficie expuesta del cuerpo de la persona en las proximidades del artículo de inventario con marcador de humo y ácido nucleico portador que incluye el marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva. Por ejemplo, las áreas expuestas del cuerpo humano que pueden marcarse con el marcador de humo generado por el generador de niebla de seguridad incluyen, por ejemplo, el cabello, la piel y las fosas nasales. Además, las prendas de vestir expuestas de una persona que pueden estar marcadas con el marcador de humo generado por el humo de seguridad o el generador de niebla pueden ser cualquier prenda de vestir, como, por ejemplo, sombreros, guantes, chaquetas, abrigos, camisas, suéteres, pantalones, jeans, sudaderas, pantalones cortos, camisetas, camisetas sin mangas, trajes, corbatas, vestidos, faldas, trajes de baño, calcetines, zapatos, zapatillas de deporte y botas.

En una realización, la prenda de vestir expuesta detectablemente marcada de una persona puede ser cualquier tela o material, tal como, por ejemplo, lana, algodón, lino, satén, rayón, viscosa, poliéster, nailon, acrílico, olefina, poliuretano, polilactida, plástico, cuero o un pelaje artificial o pieles de animales.

Estos generadores de niebla/humo de seguridad/marcadores de la presente realización de ejemplo tienen varias aplicaciones prácticas. Por ejemplo, el generador de niebla de seguridad puede proteger a los minoristas de artículos de alto valor, como joyeros y bancos. El generador de niebla o humo de seguridad también puede proporcionar protección para cajeros automáticos y otras áreas donde hay grandes cantidades de efectivo. Por ejemplo, los generadores de niebla o humo de seguridad se pueden usar para proteger negocios como oficinas de cambio de divisas. Estos generadores de humo o niebla también se pueden usar en casas privadas.

Estos generadores de niebla/humo de seguridad/marcadores no están restringidos a aplicaciones en locales pequeños, sino que también se pueden implementar para proteger oficinas, almacenes, casinos y estaciones de servicio de combustible. Estos pueden ser locales grandes y aislados, donde puede ser difícil proporcionar una respuesta rápida a los intrusos. Los generadores de niebla o humo de seguridad de la presente realización de ejemplo pueden desplegarse con precisión y activarse para proteger artículos de inventario valiosos, al tiempo que permiten a los intrusos abandonar las instalaciones.

En otras realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención, los generadores de niebla/humo de seguridad/marcadores también se pueden instalar en un vehículo para la protección del vehículo y los artículos contenidos en el mismo. Por ejemplo, este generador de niebla o humo de seguridad/marcador instalado en un vehículo puede estar dirigido a compañías que transportan bienes deseables o de alto valor como fármacos, cigarrillos, productos electrónicos, alcohol y dinero en efectivo.

Además, el humo denso creado por el generador de niebla o humo marcador de seguridad es completamente inofensivo. El humo o la niebla pueden crearse utilizando, por ejemplo, los mismos principios que se utilizan para fumar o máquinas de humo en teatros, clubes nocturnos y discotecas.

5 El denso humo o niebla creada por el generador de niebla de seguridad es adecuado para prácticamente cualquier entorno, ya que la niebla no es tóxica y no deja residuos. Esto significa que no hay daños en la ropa, el equipo, el mobiliario y las máquinas, y que es seguro usarlo en áreas utilizadas habitualmente por el personal, los clientes o incluso los animales.

10 A pesar de que el humo es tan denso que un intruso no puede ver su mano frente a su rostro, puede tomar solo unos veinte minutos de ventilación para despejar la habitación. Después, uno no podría decir que se había activado un sistema de protección contra el humo o la niebla en las instalaciones.

15 Además, como el humo denso emitido por el generador de niebla o humo de seguridad incluye un ácido nucleico portador que contiene un marcador de ADN que tiene una secuencia única identificable, la ropa, piel, cabello, cara, fosas nasales, manos y/o artículos del inventario tomados por el intruso por el intruso pueden marcarse con el ácido nucleico transportador y el marcador de ADN por el humo o la niebla emitidos de manera que el intruso y/o el objeto robado que contiene el ácido nucleico portador y el marcador de ADN puedan identificarse posteriormente y autenticarse. Por lo tanto, los generadores de niebla/humo de seguridad/marcador de la presente realización de ejemplo no solo proporcionan un
20 elemento de disuasión contra intrusos y ladrones para permanecer en las instalaciones, sino que también proporcionan una forma de identificar más tarde a un intruso para su enjuiciamiento criminal y/o identificar un artículo de inventario retirado de las instalaciones protegidas.

25 El ácido nucleico portador (NA) que incluye el marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva que se incorpora en el fluido de humo del generador de humo o niebla puede ser ADN natural, ADN sintético, ADNc u otro material de ADN o cualquier otro fragmento de ácido nucleico que comprende ADN o derivados de ADN. El ácido nucleico portador puede incluir fragmentos de ácido nucleico que son de cadena sencillas o bicatenarios y pueden variar en longitud. El marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva puede ser cualquier ADN que tenga una secuencia de identificación exclusiva. Por ejemplo, el ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva puede ser un ADN totalmente sintético, un ADN semisintético en el que un fragmento o fragmentos de ADN natural se reordenan y religan para producir la secuencia de identificación exclusiva, o en el que el fragmento o fragmentos de ADN natural se extienden o ligan con una o más bases, uno o más oligonucleótidos sintéticos o uno o más polinucleótidos para producir un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva. Todas estas secuencias de identificación
30 exclusiva son secuencias no naturales.

35 En una realización, el marcador de ADN puede incluir más de una secuencia única identificable, cada una de las cuales puede identificarse por separado detectando un producto de amplicón específico de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando un par de cebadores específico para la secuencia única particular. La identificación puede realizarse mediante cualquier método adecuado, tal como por ejemplo mediante determinación de secuencia, mediante
40 hibridación específica usando una o más sondas específicas de secuencia o mediante determinación de la longitud del amplicón de PCR en pares de bases después de electroforesis en gel o electroforesis capilar. En otra alternativa, cuando el marcador de ADN incluye dos o más secuencias únicas identificables, la identificación puede ser mediante PCR y determinación de la longitud de cada uno de los amplicones de PCR en pares de bases, en donde cada secuencia identificable de forma única y par de cebadores complementarios se eligen para producir un amplicón de una longitud de
45 pares de bases específica diferente. Los amplicones pueden entonces resolverse e identificarse sobre la base de las longitudes de cada uno de los amplicones producidos a partir de las secuencias de identificación exclusiva del marcador de ADN.

50 El ácido nucleico portador puede producirse sintéticamente usando un sintetizador de ácido nucleico o aislando material de ácido nucleico de levadura, estirpes celulares humanas, bacterias, animales, plantas y similares. En ciertas realizaciones, el material de ácido nucleico puede tratarse con enzimas de restricción y luego purificarse y relegarse aleatoriamente para producir un ácido nucleico formador adecuado que tenga secuencias no naturales. La longitud del marcador/etiqueta de ácido nucleico habitualmente oscila entre aproximadamente 100 y aproximadamente 10 kilobases, más habitualmente entre aproximadamente 500 bases y aproximadamente 6 kb, y preferentemente entre
55 aproximadamente 1 kb y aproximadamente 3 kb de longitud. En algunas realizaciones, la forma del ADN puede ser lineal o circular con tamaños que varían desde unas pocas bases (5 bases) hasta ADN genómico (de 1 a 30 mil millones de pares de bases).

60 En una realización de ejemplo, la secuencia de identificación exclusiva del marcador de ADN es una secuencia de aproximadamente 25 bases a aproximadamente 10.000 bases de longitud. En otra realización de ejemplo, la secuencia de identificación exclusiva del marcador de ADN es una secuencia de aproximadamente 50 bases a aproximadamente 5.000 bases de longitud. En otra realización de ejemplo, la secuencia de identificación exclusiva del marcador de ADN es una secuencia de aproximadamente 75 bases a aproximadamente 500 bases de longitud. En otra realización de ejemplo, la secuencia de identificación exclusiva del marcador de ADN representa menos de una parte por diez mil del ácido
65 nucleico portador. En otra realización de ejemplo, la secuencia de identificación exclusiva del marcador de ADN representa

menos de una parte por cada cien mil del ácido nucleico portador. En otra realización de ejemplo, la secuencia de identificación exclusiva del marcador de ADN representa menos de una parte por millón del ácido nucleico portador.

El ácido nucleico portador se incluye en el fluido de humo del generador de niebla/humo de marcador/seguridad para marcar un artículo de inventario y/o una persona en las inmediaciones del artículo de inventario cuando el humo o la niebla generada contiene el ácido nucleico portador incluyendo el marcador de ADN se libera en el artículo y/o persona del inventario.

En la presente realización a modo de ejemplo, el ADN es el ácido nucleico portador incluido en el fluido de humo marcador del humo de seguridad o generador de niebla para marcar un artículo de inventario y/o una persona en las proximidades del artículo de inventario cuando se genera humo o niebla. Sin embargo, en una realización de ejemplo alternativa, se pueden usar otros ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, ARN o un híbrido de ADN: ARN como el ácido nucleico portador que contiene el marcador de ADN en el fluido de humo en lugar de, o además del ADN, como portador ácido nucleico.

En la presente realización de ejemplo, el marcador de ADN incluido en el ácido nucleico portador puede comprender una secuencia específica de ácido nucleico o, alternativamente, puede comprender una pluralidad de diversas secuencias de ácido nucleico. En una realización, fragmentos de ADN polimórficos del tipo de repeticiones en tándem cortas (STR) o polimorfismos de nucleótido único (SNP) se utilizan como una etiqueta de ácido nucleico anti-falsificación. Si bien el uso de una secuencia única para un marcador de ADN puede facilitar y agilizar la detección del marcador, el uso de una pluralidad de secuencias de ácido nucleico tales como STR y SNP, en general, proporciona un mayor grado de confianza en una identificación positiva.

A modo de ejemplo, la concentración de ácido nucleico puede variar desde picogramos por litro (1×10^{-12} gramos/l) hasta micro gramos por litro (1×10^{-9} gramos/l). En ciertas realizaciones, la concentración de ADN puede variar de 1 ppb (partes por mil millones) a 500,000 ppb (es decir, 500 ppm). Una característica importante del ácido nucleico transportador es proteger el marcador de ADN que tiene la secuencia de identificación exclusiva de la radiación UV y otras influencias que pueden causar degradación a lo largo del tiempo.

En ciertas otras realizaciones de los métodos de la invención, el ácido nucleico portador se deriva de ADN extraído de una fuente de planta específica y se vuelve no funcional con secuencias mezcladas. Por ejemplo, el ADN puede digerirse específicamente y ligarse para generar secuencias artificiales de ácido nucleico que son únicas y desconocidas previamente en el mundo. La digestión y ligación del ADN extraído se completa mediante digestión de restricción estándar y técnicas de ligasa conocidas por los expertos en la técnica de la biología molecular. Una vez que se ha producido el marcador de ADN modificado, el marcador puede encapsularse en materiales para la protección contra la radiación UV y la degradación. El material encapsulante de ADN puede ser cualquier material encapsulante adecuado, tal como, por ejemplo, un material encapsulante de origen vegetal.

En ciertas realizaciones, cuando el marcador de ADN puede encapsularse y suspenderse en una solución de disolvente (solución de disolvente acuoso u orgánico) produciendo una solución de marcador de ADN "original" a una concentración especificada. Esta solución original de marcaje de ADN se puede añadir fácilmente al ácido nucleico transportador a una concentración apropiada para la incorporación en un fluido de humo marcador o fluido de niebla marcadora. En ciertos casos, el marcador de ADN puede mezclarse con otros componentes sin ninguna encapsulación previa. Varios procesos tales como la encapsulación de fragmentos de ácidos nucleicos y otras técnicas utilizadas para proteger nucleótidos, y en particular, el ADN de la degradación, son bien conocidos en la técnica.

En otras realizaciones, el ácido nucleico portador puede camuflar u "ocultar" la etiqueta de ácido nucleico especificada con oligómeros o fragmentos de ácido nucleico extraños e inespecíficos, haciendo así difícil que los individuos no autorizados identifiquen la secuencia del marcador de ADN. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico portador comprende un ADN de cadena doble especificado de secuencia conocida de una fuente conocida (por ejemplo, mamífero, invertebrado, fuentes vegetales y similares) junto con ADN genómico de la fuente de ADN correspondiente o similar. La cantidad de marcador de ADN a ser incorporado en un ácido nucleico portador varía dependiendo del humo del marcador particular que se utilizará y la configuración donde se va a desplegar el generador de humo marcador, la duración que el etiquetador debe ser viable (por ejemplo, 1 día, 1 mes, 1 año, múltiples años) antes de la identificación, la exposición ambiental esperada, el método de detección a ser utilizado, y así sucesivamente.

Después de que se ha fabricado o aislado el ácido nucleico portador que contiene el marcador de ADN con una secuencia única identificable, la preparación de ácido nucleico portador que contiene el marcador de ADN se mezcla con el fluido de humo y luego la mezcla se almacena en el depósito de humo o generador de niebla.

La mezcla de fluido de humo marcador que incluye el ácido nucleico portador y el marcador de ADN es convertido por el generador de humo para producir un humo marcador que comprende el ácido nucleico portador y el marcador de ADN para hacer que el humo marcador fluya sobre el artículo de inventario y cualquier persona en las proximidades del artículo del inventario, la persona que tiene una prenda de vestir expuesta y/o una superficie corporal expuesta, y por lo tanto marca de manera detectable el artículo de inventario con el etiquetador de ADN, y marca detectablemente la prenda de vestir expuesta y/o la superficie expuesta del cuerpo de cualquier persona presente en las proximidades del artículo de

inventario y dentro del alcance del humo del marcador con el marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva.

5 El ácido nucleico portador que contiene el marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva que se incluye en el humo marcador puede detectarse, recuperarse y autenticarse a continuación del artículo de inventario y/o la persona expuesta al humo marcador usando las siguientes técnicas explicadas a continuación.

10 En general, la PCR es una técnica útil para la detección del marcador de ADN como se describe a continuación. El número de copias del marcador de ADN en un tamaño de muestra predeterminado del ácido nucleico portador utilizado en el fluido de humo marcador es de aproximadamente 3 copias a aproximadamente 100,000 copias, más habitualmente de aproximadamente 10 copias a aproximadamente 50,000 copias, e incluso más habitualmente de aproximadamente 100 copias a aproximadamente 10,000 copias de marcador de ADN. La concentración de ácido nucleico portador que incluye el marcador de ADN incorporado en el fluido de humo del generador de niebla o humo de seguridad puede variar según se requiera dependiendo de realizaciones particulares de la invención.

15 En ciertas realizaciones, la colocación o posición del marcador de ADN en el cuerpo humano de una persona y/o en el artículo de inventario de interés puede localizarse mediante la detección de materiales o compuestos configurados para ser ópticamente detectables y pueden estar asociados con el marcador de ADN en el ácido nucleico portador. Por ejemplo, en muchas realizaciones, el marcador de ADN puede estar unido o acoplado a, o asociado de otro modo, a una etiqueta detectable química u ópticamente. La detección de porciones marcadas con ADN del artículo se puede llevar a cabo detectando ópticamente colorantes fluorescentes o convirtiendo partículas de fósforo que pueden detectarse fácilmente mediante fuentes de luz portátiles de UV y/o IR. Así, por ejemplo, una muestra de cabello, una muestra de ropa o una muestra del artículo de inventario podría examinarse con una fuente de luz UV o IR para encontrar una región o regiones particulares de la muestra (por ejemplo, muestra de cabello, muestra de ropa o una muestra del artículo del inventario) que contiene un marcador fluorescente particular. De esta manera, solo se necesita muestrear una pequeña porción del artículo (identificado por el colorante fluorescente o las partículas) para la detección de la secuencia marcadora de ADN. Los materiales o compuestos utilizados para ubicar la posición del ADN portador en la muestra de interés pueden recubrirse con grupos funcionales que pueden unirse covalentemente al ácido nucleico portador y al marcador de ADN, como se describe a continuación.

30 En general, analizar la muestra recogida (por ejemplo, muestra de cabello, muestra de ropa, muestra de artículo de inventario) para la presencia de marcador de ADN puede incluir, por ejemplo, proporcionar una "molécula de detección" configurada para detectar el marcador de ADN. La molécula de detección puede ser, pero no se limita a, una sonda de ácido nucleico y/o conjunto de cebadores que es complementario a la secuencia del marcador de ADN, o una marca de colorante o molécula productora de color configurada para unirse selectivamente y adherirse al marcador de ADN. por ejemplo, uniéndose covalentemente a una secuencia de bases con al menos una porción de la secuencia de identificación exclusiva del marcador de ADN. Cuando se usa un método de PCR en la detección del marcador de ADN que incluye amplificar el marcador de ADN, la (s) molécula (s) de detección son cebadores que se unen específicamente a una cierta secuencia del marcador de ADN. Cuando se utiliza PCR en tiempo real en el análisis de la muestra, también se puede proporcionar una sonda de nucleótidos identificable para mejorar la detección del marcador de ADN así como proporcionar resultados de autenticación semicuantitativos o cuantitativos. Con el uso de la PCR en tiempo real, los resultados del análisis de la muestra se pueden completar en 30 minutos a 2 horas, incluida la extracción o purificación del ácido nucleico portador que incluye el marcador de ADN de la muestra recolectada. Varias realizaciones utilizan una amplia gama de métodos de detección además de PCR y PCR en tiempo real, tales como sondas fluorescentes, sondas configuradas para moléculas que permiten la detección de la etiqueta de ácido nucleico cuando se unen a la sonda por espectroscopía Raman, espectroscopía infrarroja u otras técnicas espectroscópicas usadas por los expertos en la materia de detección de ácidos nucleicos.

50 Los resultados del análisis de la muestra recolectada se analizan luego para determinar si se detectó el marcador de ADN específico en la muestra. Si se detecta el marcador de ADN específico en la muestra, la muestra recolectada del elemento del inventario se autentica como genuina. Si el marcador de ADN se detecta en la muestra de interés recolectada, la conclusión del análisis es que esa persona no coincide o no puede verificarse como presente durante la activación del marcador de humo o máquina de humo.

55 Por lo tanto, entre los métodos de detección del marcador de ADN en la prenda de vestir o la piel o el cabello expuestos del sospechoso o en un artículo de inventario, el marcador de ADN puede estar vinculado o asociado de otro modo con un material indicador óptico para una rápida detección de la posición del ácido nucleico portador que contiene el marcador de ADN sobre la prenda de vestir o la piel o cabello expuestos del sospechoso o sobre un artículo de inventario. Para la identificación forense del ADN, el ADN se extrae de los objetos marcados con ADN y se somete a amplificación por PCR con cebadores específicos para producir amplicones que pueden analizarse mediante cualquiera de una serie de medios bien conocidos tales como, por ejemplo, mediante electroforesis en gel o electroforesis capilar. Alternativamente, la amplificación y detección RT-PCR por indicadores fluorescentes o cualquier medio de detección adecuado conocido en la técnica se puede usar para obtener resultados en un período de tiempo muy corto.

65 En algunas realizaciones, la cantidad o concentración del marcador de ADN dentro del ácido nucleico portador en una muestra recogida puede determinarse y compararse con la cantidad inicial de ácido nucleico portador que contiene el

marcador de ADN colocado en el producto para permitir la detección del fraude causado diluyendo el producto con productos inferiores por falsificadores. En general, los métodos de detección cuantitativa comprenden proporcionar un control interno o externo para evaluar la eficiencia de detección de una muestra/análisis a la siguiente. La eficacia de la detección puede verse afectada por muchos parámetros tales como, condiciones de hibridación de sonda, moléculas o sustancias en el producto que pueden interferir con la detección y/o integridad del cebador, calidad de enzima, variaciones de temperatura para métodos de detección que utilizan PCR. Al proporcionar un control, en los métodos de detección, cualquier condición variable se puede normalizar para obtener una concentración final precisa del marcador de ADN en el ácido nucleico portador presente en el producto.

10 Incorporación de restos detectables

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico portador que incluye el marcador de ADN se marca con al menos un compuesto o "molécula de detección" antes de incorporarse al fluido de humo en la extracción y/o detección del ácido nucleico portador de un artículo de inventario o una muestra del sospechoso que pudo haber estado expuesta al humo marcador incluyendo el ácido nucleico portador que contiene el marcador de ADN. Una molécula de detección es una molécula o compuesto con al menos una funcionalidad. Por ejemplo, las moléculas fluorescentes, que pueden estar en forma de partículas (por ejemplo, un fósforo de conversión ascendente: UCP), se pueden configurar para el ácido nucleico portador para ciertos métodos de detección que se describen en detalle a continuación.

En ciertas realizaciones, los colorantes adecuados incluyen, entre otros, colorantes de cumarina, colorantes de xanteno, resorufinas, colorantes de cianina, colorantes de difluoroboradiazaindaceno (BODIPY), colorantes ALEXA, indoles, bimanos, isoindoles, colorantes dansilo, naftalimidaz, ftalimidaz, xantenos, colorantes lantánidos, rodaminas y fluoresceínas. En otras realizaciones, se sabe que ciertos colorantes IR visibles y cercanos y materiales IR son suficientemente fluorescentes y fotoestables para detectarse como moléculas individuales. El colorante visible, BODIPY R6G (525/545) y un colorante más grande, el colorante infrarrojo cercano de LI-COR, IRD-38 (780/810) se puede detectar con sensibilidad de molécula única y se puede usar para practicar el proceso de autenticación descrito aquí. En ciertas realizaciones, los colorantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, 5-carboxifluoresceína (FAM), rodamina, ácido 5- (2'-aminoetil) aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS), antranilamida, cumarina, derivados de quelato de terbio, Rojo Reactivo 4, colorantes BODIPY y colorantes de cianina.

Existen muchos fracciones de enlace y metodologías adecuados para unir fluoróforos o restos de colorantes visibles a nucleótidos, como se ejemplifica en las siguientes referencias: Eckstein, editor, *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991); Zuckerman et al., *Nucleic Acids Research*, 15: 5305 - 5321 (1987) (grupo 3' tiol sobre oligonucleótido); Sharma et al., *Nucleic Acids Research*, 19: 3019 (1991) (3' sulfhidrilo); Giusti et al., *PCR Methods and Applications*, 2: 223 - 227 (1993) y Fung et al., Patente de los EE.UU. 4,757,141 (grupo fosfoamino 5' a través de Aminolink™ II disponible en Applied Biosystems, Foster City, California). Stabinsky, patente de EE.UU. 4,739,044 (grupo 3' aminoalquilfosforilo); Tecnología de etiquetado AP3 (patente de EE.UU. Nos. 5,047,519 y 5,151,507, cedidas a E.I. DuPont de Nemours & Co); Agrawal et al., *Tetrahedron Letters*, 31: 1543 - 1546 (1990) (unión a través de enlaces fosforamidato); Sproat et al., *Nucleic Acids Research*, 15: 4837 (1987) (grupo mercapto 5'); Nelson et al., *Nucleic Acids Research*, 17: 7187 - 7194 (1989) (grupo amino 3'); y similares.

En otras realizaciones, una sonda de ácido nucleico complementaria al marcador de ADN dentro del ácido nucleico portador se marca con al menos un compuesto o molécula con funcionalidad para ayudar en la detección del ácido nucleico portador o el marcador de ADN. Las técnicas y colorantes utilizados en el marcado de la etiqueta de ácido nucleico o la sonda complementaria son los mismos debido a la naturaleza de ácido nucleico de la etiqueta y la sonda.

Las moléculas de detección de la invención se pueden incorporar a motivos de sonda, tales como sondas Taqman (Held et al., *Genome Res.* 6: 986-994 (1996), Holland et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88: 7276 - 7280 (1991), Lee et al., *Nucleic Acids Res.* 21: 3761-3766 (1993)), balizas moleculares; Tyagi et al., *Nature Biotechnol.*, 16: 49 - 53 (1998), patente de EE.UU. No. 5.989.823, expedida el 23 de noviembre de 1999)) sondas escorpión (Whitcomb et al., *Nature Biotechnology* 17: 804 - 807 (1999)), sondas sunrise (Nazarenko et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 2516 - 2521 (1997)), sondas asistidas conformacionalmente (Cook, R., solicitud provisional de los Estados Unidos copendiente y cedida comúnmente No. 60/138.376, presentada el 9 de junio de 1999), sondas de iluminación basadas en ácido nucleico peptídico (PNA) (Kubista et al., WO 97/45539, diciembre de 1997), colorantes de ADN específicos de doble cadena (Higuchi et al., *Bio/Technology* 10: 413-417 (1992), Wittwer et al., *Bio/Techniques* 22: 130-138 (1997)) y similares. Estos y otros motivos de sonda con los que se pueden utilizar las presentes moléculas de detección se revisan en *Nonisotopic DNA Probe Techniques*, Academic Press, Inc. 1992.

En otras realizaciones, el sistema de baliza molecular se utiliza para detectar y cuantificar el marcador de ADN del elemento de interés. Las "balizas moleculares" son sondas de detección de ácido nucleico en forma de horquilla que experimentan una transición conformacional cuando se unen a su objetivo que permite detectar las balizas moleculares. En general, la porción de bucle de una baliza molecular es una secuencia de ácido nucleico sonda que es complementaria al ácido nucleico objetivo a detectar. La porción de vástago de la baliza molecular se forma mediante la hibridación de las secuencias de brazo de la baliza molecular que están presentes en cualquier lado de la secuencia de la sonda. Un grupo funcional tal como un fluoróforo (por ejemplo, cumarina, EDNAS, fluoresceína, amarillo lucifer, tetrametilrodamina, rojo texas y similares) está unido covalentemente al extremo de un brazo y una molécula atenuadora tal como un inhibidor no

- fluorescente (p. DABCYL) se une covalentemente al extremo del otro brazo. Cuando no existe un objetivo (tal como el marcador de ADN de la invención) presente, el vástago de la baliza molecular mantiene el grupo funcional inactivo debido a su proximidad cercana a la molécula que inhibe. Sin embargo, cuando la baliza molecular se une a su objetivo de etiquetado de ADN específico, se produce un cambio conformacional en la baliza molecular de forma tal que no se puede formar la estructura de vástago y bucle, aumentando así la distancia entre el grupo funcional y el atenuador que permite la presencia del Objetivo de marcador de ADN para ser detectado. Cuando el grupo funcional es un fluoróforo, la unión del marcador molecular al marcador de ADN se detecta mediante espectroscopía de fluorescencia.
- En ciertas realizaciones, se usa una pluralidad de etiquetas de ácido nucleico con secuencias variables en el marcado de un producto particular. Los diferentes marcadores de ADN pueden detectarse cuantitativamente mediante una pluralidad de balizas moleculares, cada una con un fluoróforo de color diferente y con una secuencia de sonda única complementaria a al menos una de la pluralidad de etiquetas de ácido nucleico. Ser capaz de cuantificar los diversos fluoróforos (por ejemplo, varios marcadores de ADN) proporciona un mayor nivel de confianza de identificación. Debe observarse que los otros grupos funcionales descritos anteriormente útiles en el marcado de las sondas de ácido nucleico también se pueden utilizar en balizas moleculares para la presente invención.
- En otras realizaciones, los métodos para autenticar un artículo o muestra de inventario de un sospechoso pueden comprender etiquetar el artículo con un marcador indicador óptico vinculado a un ácido nucleico portador que contiene un marcador de ADN, detectar el indicador óptico y luego caracterizar o verificar el marcador de ADN asociado con el artículo de una manera efectiva, mediante secuenciación de ácido nucleico, hibridación u otras técnicas similares.
- Por ejemplo, en una realización de ejemplo, un marcador indicador óptico que tiene un marcador de ácido nucleico unido a una partícula indicadora óptica, el ácido nucleico portador contiene un marcador de ADN que tiene una porción conocida de su secuencia identificable o secuenciable. En otra realización, el indicador óptico está incluido en el fluido de humo marcador, pero no está unido al ácido nucleico portador que contiene el marcador de ADN.
- La partícula indicadora óptica puede ser, por ejemplo, un indicador óptico emisor de luz tal como, por ejemplo, una partícula de fósforo de conversión creciente (UCP). En ciertas realizaciones, la partícula UCP de fósforo de conversión creciente se recubre con una composición de sililación que está configurada para unirse covalentemente al ácido nucleico portador que incluye el marcador de ADN. UCPs y otros indicadores ópticos, pueden utilizarse en el fluido de humo en combinación con el ácido nucleico portador que contiene el marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva para localizar la secuencia marcadora de ADN en una muestra expuesta a la niebla o humo marcador.
- En otra realización de ejemplo, el indicador óptico utilizado en combinación con el ácido nucleico portador puede ser un marcador ultravioleta (UV), un marcador UV largo o un fluoróforo UV. En otra realización más, el indicador óptico usado en combinación con el ácido nucleico portador puede completarse o reemplazarse por una proteína y/o un oligoelemento.
- El compuesto indicador óptico puede producirse como un sólido o líquido, a base de agua o aceite, una suspensión, un agregado o similar. El marcador indicador óptico permite una fácil detección de dónde se encuentra el marcador indicador óptico sobre o dentro del elemento de interés con equipos emisores de luz de alta intensidad tales como una lámpara ultravioleta (UV) portátil, diodo emisor de IR, IR portátil láser y similares.
- El marcador indicador óptico también permite la autenticación del elemento de interés confirmando que se detecta el espectro de emisión/longitud de onda correctos para la partícula indicadora óptica, así como que es capaz de localizar y determinar mediante secuenciación si el marcador de ADN comprende secuencia de ácido nucleico de identificación exclusiva correcta.
- El marcador indicador óptico ligado a ácido nucleico que incluye el marcador indicador óptico unido a ácido nucleico puede mezclarse con el fluido de humo marcador de un humo/niebla de seguridad/marcador para autenticar un artículo de interés de inventario o una muestra recogida de un sospechoso. El marcador indicador óptico ligado a ácido nucleico se puede aplicar en una cantidad o cantidad específica predeterminada. El marcador se puede aplicar en forma de humo denso o niebla que se emite desde el generador el humo o de niebla de seguridad debido a la activación del generador de calor del generador de humo o niebla de marcador seguridad. En particular, un elemento calentador en el generador de niebla/humo de seguridad/marcador puede activarse mediante un evento desencadenante como, por ejemplo, una alarma de seguridad para convertir glicerol líquido del fluido de humo marcador en un humo o niebla artificial extremadamente denso que incluye el marcador indicador óptico y que se extiende inmediatamente por toda el área, incluso en áreas expuestas de una persona (por ejemplo, cabello, piel, fosas nasales y/o ropa) en las proximidades del generador de niebla y en artículos de inventario ubicados en el área. Por lo tanto, las áreas expuestas de la persona y/o el artículo de inventario pueden marcarse con el marcador indicador óptico ligado a ácido nucleico y el indicador óptico ligado a ácido nucleico emitido en la niebla densa puede luego utilizarse con fines de autenticación para determinar si el sospechoso estaba en la ubicación del generador de neblina/humo de marcador/seguridad y/o si el artículo también estaba en ese lugar en el momento de la activación del generador de niebla/humo marcador/seguridad.
- Con el fin de detectar la etiqueta indicadora óptica unida a ácido nucleico asociada con la persona y/o elemento de interés. A menudo, la detección del marcador indicador óptico asociado con el elemento se produce después de que haya transcurrido un período de tiempo. Por ejemplo, después de marcar el artículo faltante, el artículo puede ser introducido

en una cadena de suministro o el artículo puede ponerse en servicio. Tener un método en el que el propietario original puede rastrear y autenticar artículos o bienes permite un mejor control de cuándo y dónde se venden los bienes robados.

- La detección de la (s) partícula (s) indicadora (es) óptica (s) representa un primer nivel de autenticación del elemento de interés. Cuando la partícula indicadora óptica es una partícula de fósforo de conversión creciente, el marcador puede ser detectado por una fuente de luz invisible de alta energía, tal como un láser infrarrojo, que puede ser sostenido y manipulado por un usuario, o montado adecuadamente para permitir que los bienes sean colocados en la salida de la lámpara. La luz infrarroja es absorbida por las partículas indicadoras ópticas, que a su vez emiten luz a una longitud de onda característica de la partícula indicadora óptica. Diversas composiciones de fósforo de conversión creciente (UCP) que proporcionan longitudes de onda de salida seleccionables son conocidas en la técnica, como se describe con más detalle a continuación, y pueden utilizarse con la invención. Una vez que el indicador óptico se ha ubicado dentro o sobre el artículo de inventario de interés o un artículo del sospechoso, puede producirse la obtención de una muestra del marcador indicador óptico.
- Se recoge una muestra del elemento de interés que tiene el marcador indicador óptico como se describe a continuación. En ciertas realizaciones, esto puede comprender inspeccionar visualmente el artículo para una señal indicadora óptica bajo la iluminación apropiada, y/o raspar, cortar o disolver una porción del artículo marcado para obtener una muestra para un análisis más detallado. La recogida de la muestra se puede llevar a cabo, por ejemplo, limpiando el artículo con una tela o un bastoncillo de algodón (que puede humedecerse con disolvente) para recuperar el marcador indicador óptico y el marcador de ADN asociado del artículo. En otra realización, el marcador indicador óptico puede recuperarse del artículo usando, por ejemplo, cinta médica. En otras realizaciones más, la recogida de muestras se puede lograr usando un corte, ranurado, raspado, raspado u otros métodos de muestreo de este tipo, por ejemplo, con una herramienta configurada para eliminar una porción del artículo que contiene el marcador indicador óptico.
- Una vez que se detecta la presencia y la ubicación del indicador óptico, la muestra recogida puede analizarse entonces para determinar la presencia del ácido nucleico portador que incluye el marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva. En algunos las realizaciones de la muestra recogida se pueden analizar determinando la secuencia de ADN del marcador de ADN, y comparando la secuencia de ADN determinada con una secuencia de ADN conocida o de referencia del marcador de ADN. El análisis de la muestra recogida del artículo puede tener lugar sin purificación adicional, pero en muchas realizaciones puede requerirse alguna forma de extracción, aislamiento o purificación de la etiqueta de ácido nucleico obtenida en la muestra. Los detalles sobre las técnicas de extracción, concentración y purificación útiles para los métodos de la invención se describen más completamente a continuación y también en los ejemplos.
- En general, analizar la muestra incluye proporcionar una "molécula de detección" complementaria al marcador de ADN. Una molécula de detección incluye, pero no se limita a, una sonda de ácido nucleico y/o conjunto de cebadores que es complementario a al menos una porción de la secuencia del marcador de ADN, o una marca de colorante o molécula productora de color configurada para unirse y adherirse al marcador de ADN. La detección del marcador de ácido nucleico puede comprender además amplificar el marcador de ADN usando PCR, siendo la (s) molécula (s) de detección cebadores que se unen específicamente a una cierta secuencia del marcador de ácido nucleico. Cuando se utiliza PCR en tiempo real en el análisis de la muestra, también se puede proporcionar una sonda de nucleótidos identificable para mejorar la detección del marcador de ácido nucleico, así como proporcionar resultados de autenticación semicuantitativos o totalmente cuantitativos. Con el uso de PCR en tiempo real, los resultados del análisis de la muestra pueden completarse en 30 minutos a dos horas, incluyendo la extracción o purificación del marcador de ácido nucleico de la muestra recogida. Diversas realizaciones de la invención pueden utilizar una amplia gama de métodos de detección además de PCR y PCR en tiempo real, tales como microarreglo de ADN, sondas fluorescentes, sondas configuradas para moléculas que permiten la detección de la etiqueta de ácido nucleico cuando se unen a la sonda por espectroscopía Raman, espectroscopía infrarroja u otras técnicas espectroscópicas utilizadas por los expertos en la materia de detección de ácidos nucleicos. El método utilizado para detectar el ácido nucleico depende de la cantidad de marcador de ácido nucleico asociado con el marcador indicador óptico. Cuando solo se recogen unas pocas copias del marcador de NA en la muestra marcadora, pueden preferirse técnicas de alta sensibilidad como la PCR sobre las sondas fluorescentes.

A continuación, se revisan los resultados del análisis de la muestra recogida y se realiza una consulta o determinación en cuanto a si se detectó o no el marcador de ácido nucleico específico en la muestra. Si el marcador de ADN no se encuentra o no se detecta en la muestra recolectada del elemento de interés, la conclusión del análisis es que el elemento no coincide. Si el marcador de ADN se detecta en la muestra, entonces el artículo se verifica como auténtico y, por lo tanto, como una coincidencia.

En algunas realizaciones, la cantidad o concentración del marcador de ácido nucleico dentro de una muestra recogida puede determinarse y compararse con la cantidad inicial de ácido nucleico portador colocada en el artículo para permitir la detección de fraude causado por la dilución del artículo con productos inferiores por falsificadores. En general, dicha detección cuantitativa comprendería, además, proporcionar un control interno o externo para evaluar la eficacia de la detección de una muestra/análisis a la siguiente. La eficiencia de la detección puede verse afectada por muchos parámetros tales como, condiciones de hibridación de sonda, moléculas o sustancias en el bien que pueden interferir con la detección y/o integridad del cebador, calidad de enzima, variaciones de temperatura para métodos de detección que

utilizan PCR. Al proporcionar un control, en los métodos de detección, cualquier condición variable se puede normalizar para obtener una concentración final precisa del ácido nucleico portador en el artículo.

En ciertas realizaciones, se puede usar una pluralidad de marcadores de ADN con secuencias variables asociadas con una pluralidad correspondiente de indicadores ópticos para marcar un único elemento. Las diferentes etiquetas de ácido nucleico pueden detectarse cualitativamente por la pluralidad de indicadores ópticos, cada uno con una longitud de onda de emisión diferente unida a un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva.

Encapsulación de un ácido nucleico portador

En algunas realizaciones, el ácido nucleico portador se incorpora en el producto en presencia de moléculas que encapsulan el ácido nucleico portador formando microesferas. Encapsular el ácido nucleico portador tiene el beneficio de prevenir o al menos inhibir o retrasar la degradación del ácido nucleico portador antes de la recuperación para la prueba o el análisis. Los materiales utilizados en el encapsulado pueden ser en algunas realizaciones de origen vegetal, pero también pueden ser materiales producidos sintéticamente. La encapsulación de un ácido nucleico portador incluye incorporar el ácido nucleico portador en un disolvente con un polímero configurado para formar una microesfera alrededor del ácido nucleico portador que alberga el marcador de ADN. Los polímeros usados se pueden seleccionar de polímeros biodegradables o no biodegradables. Los polímeros biodegradables adecuados son aquellos tales como ácidos lácticos y glicólicos y ésteres tales como polianhídridos, poliuretanos, poliácidos híbridos, poliácidos valéricos y similares. Los polímeros no biodegradables apropiados para la encapsulación son acetato de vinileno y poliácidos, poliamidas y copolímeros acrílicos como una mezcla de los mismos. Los polímeros también se pueden seleccionar a partir de compuestos naturales tales como dextrano, celulosa, colágeno, albúmina, caseína y similares.

Ciertos aspectos de la invención comprenden marcar las microesferas para beneficiarse en la captura de la etiqueta de ácido nucleico durante la extracción del marcador del producto de interés. Las microesferas pueden comprender moléculas cargadas magnéticamente que permiten que las microesferas que contienen la etiqueta de ácido nucleico sean extraídas de una solución mediante un imán.

Las microesferas también se pueden marcar con estreptavidina, avidina, compuestos biotinilados y similares. Etiquetar las microesferas ayuda a la purificación de la etiqueta de ácido nucleico antes de la detección y también es útil para concentrar la etiqueta de ácido nucleico para permitir en algunas realizaciones, detectar la etiqueta de ácido nucleico sin amplificación por PCR.

Métodos de extracción y captura de ácido nucleico portador

A lo largo de los años, se han desarrollado diversas soluciones de extracción de ácidos nucleicos para extraer secuencias de ácidos nucleicos de una muestra de interés. Ver, por ejemplo, Sambrook et al. (Eds.) Molecular Cloning, (1989) Cold Spring Harbor Press. Muchos de tales métodos requieren típicamente una o más etapas de, por ejemplo, una etapa mediada por detergente, una etapa de tratamiento con proteasa, una etapa de extracción de fenol y/o cloroformo, y/o una etapa de precipitación con alcohol. Algunas soluciones de extracción de ácido nucleico pueden comprender un reactivo de tipo etilenglicol o un derivado de etilenglicol para aumentar la eficacia de la extracción de ácido nucleico, mientras que otros métodos solo utilizan la molienda y/o la ebullición de la muestra en agua. Otros métodos, incluidos los sistemas basados en disolventes y la sonicación, también podrían utilizarse junto con otros métodos de extracción.

En algunas realizaciones, el proceso de autenticación incluye capturar la etiqueta de ácido nucleico directamente con una sonda de hibridación complementaria unida a un soporte sólido. En general, los métodos para capturar la etiqueta de ácido nucleico implican un material en una fase sólida que interactúa con reactivos en la fase líquida. En ciertos aspectos, la sonda de ácido nucleico se une a la fase sólida. La sonda de ácido nucleico puede estar en la fase sólida tal como inmovilizada en un soporte sólido, a través de cualquier tipo de una variedad de enlaces covalentes bien conocidos o interacciones no covalentes. En ciertos aspectos, el soporte se compone de materiales insolubles, tales como vidrio de poro controlado, una placa de vidrio o portaobjetos, poliestireno, gel de acrilamida y dextrano activado. En otros aspectos, el soporte tiene un carácter rígido o semirrígido, y puede tener cualquier forma, por ejemplo, esférico, como en perlas, partículas rectangulares, irregulares, geles, microesferas o soporte sustancialmente plano. En algunas realizaciones, puede ser deseable crear una matriz de regiones de secuenciación separadas físicamente en el soporte con, por ejemplo, pozos, regiones elevadas, hoyuelos, pasadores, zanjas, varillas, pasadores, paredes internas o externas de cilindros, y similares. Otros materiales de soporte adecuados incluyen, pero sin limitación, agarosa, poliácridamida, poliestireno, poliácridato, metacrilato de hidroxietilo, poliamida, polietileno, polietilenoxi o copolímeros e injertos de los mismos. Otras realizaciones de soportes sólidos incluyen partículas pequeñas, superficies no porosas, matrices direccionables, vectores, plásmidos o medios que inmovilizan polinucleótidos.

Como se usa en los métodos de captura de la etiqueta de ácido nucleico, una sonda de ácido nucleico se puede unir al soporte sólido mediante enlaces covalentes, u otras interacciones de afinidad, a la funcionalidad químicamente reactiva en los soportes sólidos. El ácido nucleico se puede unir a soportes sólidos en sus sitios 3', 5', azúcar o nucleobase. En ciertas realizaciones, se prefiere el sitio 3' para unirse mediante un enlazador al soporte debido a las muchas opciones disponibles para enlazadores estables o escindibles selectivamente. La inmovilización se realiza preferiblemente mediante un enlace covalente entre el soporte y el ácido nucleico. La unidad de enlace, o enlazador, está diseñada para ser estable

y facilitar el acceso del ácido nucleico inmovilizado a su secuencia de complemento. Alternativamente, son útiles los enlaces no covalentes tales como entre biotina y avidina o estreptavidina. Los ejemplos de otros enlazadores de grupos funcionales incluyen éster, amida, carbamato, urea, sulfonato, éter y tioéster. Un nucleótido biotinilado de 5 o 3 'puede inmovilizarse sobre avidina o estreptavidina unida a un soporte tal como vidrio.

Dependiendo de la concentración inicial de la etiqueta de ácido nucleico añadida al producto de interés, la etiqueta puede detectarse cuantitativamente sin amplificarse por PCR. En algunas realizaciones, un marcador de ADN de cadena sencilla marcado con una molécula de detección (es decir, fluoróforo, biotina, etc.) se puede hibridar con una sonda complementaria unida a un soporte sólido para permitir la detección específica de la "molécula de detección" configurada en el marcador. El marcador de ADN también puede ser de doble cadena (ADNs), con al menos una cadena marcada con una molécula de detección. En el caso de un marcador de dsDNA, el marcador debe calentarse suficientemente para fundir la estructura bicatenaria y luego enfriarse rápidamente para producir ADN de cadena sencilla, donde al menos uno de los filamentos configurados con una molécula de detección es capaz de hibridar a la sonda de ADN complementario en condiciones apropiadas de hibridación.

En ciertos aspectos de la divulgación, la sonda complementaria se marca con una molécula de detección y se deja hibridar con una cadena del marcador de ADN. La hibridación de la sonda se puede completar dentro de la prenda o se puede completar después de que se ha extraído del producto el ácido nucleico marcador/transportador de ADN que contiene el marcador de ADN. Los métodos de detección directa descritos aquí dependen de tener una gran concentración inicial de etiqueta de ácido nucleico incorporada en las prendas de vestir o métodos de extracción/captura rigurosos que concentran la etiqueta de ácido nucleico extraída de un gran volumen o masa de un producto particular.

En una realización, en la que el marcador de ADN incluye una partícula de fósforo convertidor de conversión (UCP), la extracción del marcador de ADN varía dependiendo de la prenda que se está autenticando. Cuando el ácido nucleico portador y el marcador de ADN se unen a una o más partículas de UCP, el ácido nucleico portador y el marcador de ADN pueden localizarse detectando la presencia del UCP mediante una fuente de luz apropiada. El marcador de ADN puede extraerse del artículo raspando, cortando o disolviendo la porción de la prenda que se determina que tiene la presencia de la (s) partícula (s) de fósforo de conversión creciente correctas. Una vez que la porción del artículo que contiene el marcador de ADN se ha eliminado del elemento de interés, el marcador de ADN puede aislarse y/o amplificarse por PCR usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Amplificación de PCR en tiempo real

En muchas realizaciones, el proceso de autenticación comprende amplificar la etiqueta nucleica mediante reacción en cadena de la polimerasa. Sin embargo, la amplificación por PCR convencional no es un método de detección cuantitativo. Durante la amplificación, los dímeros del cebador y otros ácidos nucleicos extraños se amplifican junto con el ácido nucleico correspondiente al analito. Estas impurezas deben separarse, generalmente con técnicas de separación de gel, del producto amplificado, lo que da como resultado posibles pérdidas de material. Aunque se conocen métodos en los que el producto de PCR se mide en la fase logarítmica, estos métodos requieren que cada muestra tenga las mismas cantidades de entrada de ácido nucleico y que cada muestra se amplifique con idéntica eficacia y, por lo tanto, no sean adecuadas para análisis de muestra rutinarios. Para permitir que se forme una cantidad de producto de PCR que sea suficiente para análisis posterior y para evitar las dificultades señaladas anteriormente, la amplificación PCR competitiva cuantitativa utiliza un competidor de control interno y se detiene solo después de que se ha completado la fase logarítmica de la formación del producto.

En un desarrollo adicional de la tecnología de PCR, la PCR cuantitativa en tiempo real se ha aplicado a analitos o plantillas de ácidos nucleicos. En este método, la PCR se usa para amplificar el ADN en una muestra en presencia de una sonda de hibridación fluorogénica doblemente marcada no extensible. Un colorante fluorescente sirve como indicador y su espectro de emisión se apaga mediante el segundo colorante fluorescente. El método usa la actividad nucleasa 5' de la polimerasa Taq para escindir una sonda de hibridación durante la fase de extensión de la PCR. La degradación de la nucleasa de la sonda de hibridación libera la atenuación del colorante indicador dando como resultado un aumento en la emisión máxima del indicador. Las reacciones son monitoreadas en tiempo real. También se ha descrito la transcriptasa inversa (RT), la PCR en tiempo real (RT-PCR) (Gibson et al., 1996). Numerosos termocicladores comerciales están disponibles que pueden monitorear continuamente los espectros fluorescentes de múltiples muestras en la reacción de PCR, por lo tanto, la acumulación de producto de PCR puede monitorearse en "tiempo real" sin el riesgo de contaminación del laboratorio por amplicones. Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. L.; Williams, P. W. (1996 Real time quantitative PCR. Gen. Meth. 6: 986- 994.

En algunas realizaciones del proceso de autenticación antifalsificación, se pueden usar estrategias de detección de PCR en tiempo real, que incluyen técnicas conocidas tales como colorantes intercalados (por ejemplo, bromuro de etidio) y otros colorantes de unión a ADN de doble cadena utilizados para la detección (tales como verde SYBR, una tinción fluorescente sensible que puede obtenerse de FMC Bioproducts), sondas fluorescentes duales (Wittwer, C. et al., (1997) Bio-Techniques 22: 176-181) y sondas fluorescentes angostas (es decir, balizas moleculares, Tyagi S., y Kramer FR. (1996) Nature Biotechnology 14: 303 - 308). Aunque los colorantes intercalantes y los colorantes de unión a ADN de cadena doble permiten la cuantificación de la acumulación de productos de PCR en aplicaciones en tiempo real, adolecen de la falta de especificidad previamente mencionada, la detección del dímero de cebador y cualquier producto de

amplificación no específico. La preparación y manipulación cuidadosas de las muestras, así como el diseño cuidadoso de los cebadores, utilizando técnicas conocidas, deben practicarse para minimizar la presencia de ADN matriz y contaminante y para prevenir la formación de dímeros cebadores. El software apropiado de análisis de instrumentos de PCR y el análisis de la temperatura de fusión permiten un medio para extraer especificidad y se pueden usar con estas realizaciones.

La amplificación por PCR se realiza en presencia de una sonda detectable no cebadora que se une específicamente al producto de amplificación por PCR, es decir, el resto de ADN detector amplificado. Los cebadores de PCR se diseñan de acuerdo con criterios conocidos y la PCR se puede realizar en instrumentos comercialmente disponibles. La sonda es preferiblemente un oligonucleótido de ADN específicamente diseñado para unirse a la molécula detectora amplificada. La sonda tiene preferiblemente un colorante indicador 5' y un colorante atenuador 3' cadena abajo unido covalentemente a la sonda, que permite la transferencia de energía de resonancia fluorescente. Tintes indicadores fluorescentes adecuados incluyen 6-carboxi-fluoresceína (FAM), tetracloro-6-carboxi-fluoresceína (TET), 2,7-dimetoxi-4,5-dicloro-6-carboxi-fluoresceína (JOE) y hexacloro-6-carboxi-fluoresceína (HEX). Un colorante indicador adecuado es 6-carboxi-tetrametil-rodamina (TAMRA). Estos colorantes están disponibles comercialmente en Perkin-Elmer. La detección del producto de amplificación de PCR puede ocurrir en cada ciclo de amplificación de PCR. En cualquier ciclo dado durante la amplificación de PCR, la cantidad de producto de PCR es proporcional al número inicial de copias de plantilla. El número de copias de plantilla es detectable por fluorescencia del colorante indicador. Cuando la sonda está intacta, el colorante indicador está cerca del colorante atenuador que suprime la fluorescencia del indicador. Durante la PCR, la ADN polimerasa escinde la sonda en la dirección 5' - 3' que separa el colorante indicador del colorante atenuador aumentando la fluorescencia del colorante indicador que ya no está cerca del colorante atenuador. El aumento en la fluorescencia se mide y es directamente proporcional a la amplificación durante la PCR. Este sistema de detección ahora está disponible comercialmente como el sistema de PCR TaqMan® de Perkin-Elmer, que permite la detección de PCR en tiempo real.

En una realización alternativa, el colorante indicador y el colorante atenuador pueden estar ubicados en dos sondas separadas que se hibridan con la molécula detectora de PCR amplificada en ubicaciones adyacentes suficientemente cerca para permitir que el colorante atenuador apague la señal de fluorescencia del colorante indicador. Como con el sistema de detección descrito anteriormente, la actividad nucleasa 5' - 3' de la polimerasa escinde el tinte de la sonda que lo contiene, separando el colorante indicador del colorante inactivador localizado en la sonda adyacente evitando el enfriamiento del colorante indicador. Como en la realización descrita anteriormente, la detección del producto de PCR es midiendo el aumento de la fluorescencia del colorante indicador.

Los sistemas de balizas moleculares se usan frecuentemente con PCR en tiempo real para detectar de manera específica la plantilla de ácido nucleico en la muestra de manera cuantitativa. Por ejemplo, el Roche Light Cycler™ u otros instrumentos similares se pueden usar para este propósito. La molécula de detección configurada para la sonda de baliza molecular puede ser visible a la luz del día o de iluminación convencional y/o puede ser fluorescente. También debe observarse que la molécula de detección puede ser un emisor de radiación, tal como un isótopo característico.

La capacidad de detectar y cuantificar de forma rápida y precisa moléculas biológicamente relevantes con alta sensibilidad es un tema central para la tecnología médica, la seguridad nacional, la seguridad pública y el diagnóstico médico civil y militar. Muchos de los enfoques actualmente utilizados, incluidos los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y PCR, son altamente sensibles. Sin embargo, la necesidad de amplificación por PCR hace que el método de detección sea más complejo, costoso y lleve más tiempo. En ciertas realizaciones, se detectan marcadores de ácido nucleico anti - falsificación por dispersión Raman mejorada en la superficie (SERS) como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 6,127,120 por Graham et al. SERS es un método de detección que es sensible a concentraciones de objetivo relativamente bajas (ácido nucleico), que preferiblemente pueden llevarse a cabo directamente en muestras no amplificadas. Las etiquetas de ácido nucleico y/o las sondas de ácido nucleico pueden marcarse o modificarse para lograr cambios en SERS de la etiqueta de ácido nucleico cuando la sonda se hibrida con la etiqueta de ácido nucleico. El uso de SERS para detectar cuantitativamente un ácido nucleico proporciona un método relativamente rápido para analizar y autenticar un producto particular.

Otro método de detección útil en la invención es el Quencher-Tether-Sistema de ligando (QTL) para un biosensor fluorescente descrito en la Patente de Estados Unidos No. 6,743,640 de Whitten et al. El sistema QTL proporciona una detección simple, rápida y altamente sensible de moléculas biológicas con especificidad estructural. El sistema QTL proporciona una fracción química formado por un inhibidor (Q), un elemento de anclaje (T) y un ligando (L). El sistema puede detectar los agentes biológicos objetivo en una muestra al observar cambios fluorescentes.

El sistema QTL puede detectar y cuantificar de forma rápida y precisa las moléculas biológicas objetivo en una muestra. Ejemplos adecuados de ligandos que se pueden usar en el enfoque de polímero-QTL incluyen ligandos químicos, hormonas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, oligonucleótidos, antígenos, polipéptidos, glicolípidos, proteínas, fragmentos de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos peptídicos y polisacáridos. Los ejemplos de inhibidores para uso en la molécula de QTL incluyen viológeno de metilo, quinonas, complejos de metal, colorantes fluorescentes y restos aceptor de electrones, donantes de electrones y de aceptación de energía. El elemento de anclaje puede ser, por ejemplo, un enlace sencillo, un átomo divalente único, un resto químico divalente y un resto químico multivalente. Sin embargo, estos ejemplos de los ligandos, elementos de anclaje y atenuadores que forman la molécula de QTL no deben interpretarse como limitantes, ya que un experto en la técnica determinará fácilmente otros ejemplos adecuados.

Kits para autenticar artículos que utilizan indicadores ópticos ligados a ácidos nucleicos

La divulgación también proporciona kits para autenticar artículos de interés. Los kits de la invención pueden incluir, por ejemplo, un contenedor que encierra el marcador indicador óptico, y un tubo de muestra para contener una muestra recogida del artículo o elemento a autenticar. Los kits también pueden incluir un aplicador para muestrear un artículo. Los kits aún pueden incluir una herramienta de recolección para tomar una muestra del artículo etiquetado para transferirlo al tubo de muestra. Los kits pueden incluir adicionalmente una fuente de luz portátil adecuada para detectar los indicadores ópticos.

A modo de ejemplo, el marcador indicador óptico puede estar en forma de una solución o dispersión líquida, y el contenedor con el kit estaría configurado de forma adecuada para contener un líquido. El aplicador del kit puede comprender un "cuentagotas" para aplicar una solución marcadora óptica líquida al artículo en forma de gotita, una espátula para untar la solución en un artículo, una jeringa para inyectar la solución en un artículo, o un tipo similar del aplicador. La herramienta de recolección del kit puede comprender una cuchara, una herramienta para raspar o formón para extraer una muestra del artículo etiquetado, una cuchilla o tijeras para cortar una pieza del artículo, un paño (que puede ser humedecido con solvente) para limpiar una muestra del artículo, o similar. El tubo de muestra del kit puede comprender un vial sellable o un tubo eppendorf, y puede contener un disolvente o solución para la extracción del marcador indicador óptico de la muestra tomada del artículo etiquetado. La fuente de luz portátil del kit puede comprender una lámpara UV portátil adecuada para detectar el marcador indicador óptico.

El kit puede incluir además uno o más cebadores y/o sondas, así como soluciones apropiadas para el análisis de PCR. El kit puede incluir además un instrumento de PCR para el análisis del marcador indicador óptico extraído. Los kits de la invención proporcionan así un sistema portátil conveniente para practicar los métodos de la invención.

Síntesis de partículas de UCP unidas covalentemente a biomoléculas

Los indicadores ópticos marcados con nucleótidos de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante una diversidad de métodos, que incluyen los descritos en la solicitud estadounidense copendiente "Métodos para enlazar Indicadores Ópticos para Biomoléculas".

Además, otros indicadores ópticos como, por ejemplo, indicadores ultravioletas (UV), convertidor ascendente de fósforo (UCP) infrarrojo (IR), marcador UV rojo, fluoróforo UV, marcador cerámico IR, marcadores de proteínas, y/o indicadores de oligoelementos se pueden usar en combinación con el ácido nucleico portador que incorpora la (las) etiqueta (s) del ADN. En una realización a modo de ejemplo, los marcadores usados pueden incluir, por ejemplo, una combinación de marcadores de ADN y un indicador de fósforo de conversión creciente por infrarrojos (UCP). Alternativamente, en otra realización a modo de ejemplo, los marcadores usados pueden incluir, por ejemplo, una combinación de marcadores de ADN, un indicador de fósforo de conversión creciente por infrarrojos (UCP) y un indicador de UV. Por ejemplo, en una realización de ejemplo, el indicador IR (UCP) puede ser, por ejemplo, un indicador IR verde, azul o rojo (UCP), tal como, por ejemplo, el marcador IR verde, producto No. BPP-1069; el UCP Azul, Producto No. BPP-1070; o Rojo UCP, Producto No. BPP-1071 de Boston Applied Technologies Inc., Woburn, MA.

Los objetos de interés marcados con ácido nucleico portador que incorpora marcadores de ADN según realizaciones de ejemplo de la presente invención incluyen, por ejemplo, superficies cerámicas, películas plásticas, láminas de vinilo, antigüedades, artículos de joyería, tarjetas de identificación, tarjetas de crédito, tarjetas de bandas magnéticas, pinturas, obras de arte, recuerdos, coleccionables deportivos y otros coleccionables. La autenticidad de estos objetos puede verificarse entonces recuperando e identificando los marcadores grabados sobre ellos a través, por ejemplo, de los métodos descritos con mayor detalle a continuación.

En otra realización, el etiquetador incluye un marcador de fósforo de conversión creciente de infrarrojos (UCP) y un marcador de ADN. En realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención, el marcador se puede recuperar de la parte recubierta de marcador del objeto sin alterar la apariencia del objeto. En otra realización, el marcador único es un marcador de ADN que tiene una secuencia de ADN única y la secuencia de ADN no natural única se almacena en una base de datos que combina la secuencia de ADN única con los elementos de datos correspondientes al objeto que está recubierto con el marcador único. La base de datos puede, a su vez, ubicarse en una computadora a la que se puede acceder para ubicar, rastrear, autenticar y verificar la identidad del objeto etiquetado del que se recuperó el etiquetador.

Marcadores de ADN útiles en los ejemplos descritos a continuación incluyen cualquier adecuado marcador de ADN, como por ejemplo, en una realización, el marcador de ADN es un oligómero de ADN de cadena doble que tiene una longitud de entre aproximadamente 40 pares de bases y aproximadamente 1000 pares de bases. En otras realizaciones, el marcador de ADN es un oligómero de ADN de cadena doble con una longitud de entre aproximadamente 80 y 500 pares de bases. En otra realización, el marcador de ADN es un oligómero de ADN de cadena doble que tiene una longitud de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 250 pares de bases. Alternativamente, el marcador de ADN puede ser ADN de cadena sencilla de cualquier longitud adecuada, tal como entre aproximadamente 40 bases y aproximadamente 1000 bases; entre aproximadamente 80 y 500 bases; o entre aproximadamente 100 y aproximadamente 250 bases. El marcador de ADN puede ser ADN natural, ya sea aislado de fuentes naturales o sintético; o el marcador de ADN puede ser una secuencia no natural producida sintéticamente. Toda o una parte del ADN puede comprender una secuencia identificable.

En una realización de ejemplo, el marcador de ADN es identificable por cualquier método de detección y/o identificación adecuado tal como, por ejemplo, hibridación con una sonda de ácido nucleico específica de secuencia marcadora, un método de hibridación in situ (que incluye hibridación fluorescente in situ: FISH), amplificación usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal como PCR cuantitativa/en tiempo real y detección de las secuencias amplificadas (amplicones) por cualquiera de la variedad de métodos estándares bien conocidos.

Por ejemplo, en el método de identificación de PCR, los marcadores de ácido nucleico, por ejemplo, marcadores de ADN recuperados del objeto se amplifican mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se resuelven mediante electroforesis en gel. Dado que la secuencia de los marcadores de ácido nucleico de la presente invención es única y específica para el objeto marcado, el ácido nucleico original se amplificará únicamente mediante el uso de cebadores que tienen secuencias específicas complementarias a una porción de la secuencia de marcador único. Mediante este procedimiento, si el objeto examinado porta el ácido nucleico original, el procedimiento de PCR amplificará el ácido nucleico extraído para producir amplicones de un tamaño predeterminado y una secuencia idéntica a una porción de la secuencia de ácido nucleico original del marcador. Por el contrario, si la muestra recuperada del objeto examinado no incluye el único ácido nucleico correspondiente al objeto auténtico, probablemente no habrá un producto de ácido nucleico amplificado, o si los cebadores amplifican el ácido nucleico recuperado para producir uno o más amplicones aleatorios, estos uno o más amplicones no pueden tener la secuencia única de ácido nucleico marcadora del objeto auténtico. Además, los amplicones aleatorios derivados de artículos falsificados también son de longitudes aleatorias y la probabilidad de producir amplicones de las longitudes exactas especificadas por los cebadores específicos del marcador es muy pequeña. Por lo tanto, al comparar los tamaños y la cantidad de productos de PCR, se puede verificar la autenticidad de los objetos etiquetados, se pueden seleccionar y rechazar objetos no auténticos y luego se logra el propósito de la detección de falsificaciones.

El número de amplicones amplificados y las longitudes de los amplicones se pueden determinar después de cualquier peso molecular o separación basada en la dimensión física, como por ejemplo y sin limitación, electroforesis en gel en cualquier medio matriz adecuado, por ejemplo, en geles de agarosa, geles de poliacrilamida o mezcla los geles de agarosa-poliacrilamida y la separación electroforética pueden estar en cualquier formato adecuado, tal como, por ejemplo, en un gel de placa o mediante electroforesis capilar.

EJEMPLOS

Debe entenderse que los siguientes ejemplos expuestos pretenden ser solo ilustrativos y que las realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención no están limitadas a las condiciones o materiales enumerados en las mismas.

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones de la presente invención para marcar un artículo de inventario con un marcador de humo que incluye un ácido nucleico portador que incluye un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva.

Ejemplo 1

Detección de marcador de ADN en telas después de la exposición al humo del marcador

Se activaron cincuenta microlitros de ácido nucleico portador (40 mg/ml en agua desionizada) que contenía el marcador de ADN de 199 pares de bases de cadena doble a una concentración de 0,5 mg/l mediante mezcla con 50 μ L de solución de NaOH 0,6 M (EMD Millipore Chemicals, grado ACS) en un microtubo de tapa a presión desechable y se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla de ácido nucleico activada se transfirió luego a un tubo de ensayo de plástico cónico de 15 ml (BD Falcon Labware) y se añadieron 9,9 ml de poli-L-lisina (0,1% p/v, Sigma-Aldrich) y se mezclaron a fondo. Esta solución se añadió luego a 990 ml de fluido de humo SmokeCloak FL600V para proporcionar el fluido de humo marcador utilizado en los ejemplos que se describen a continuación. El fluido de humo marcador se transfirió al depósito de una máquina de niebla SmokeCloak (Val V10) obtenida de SmokeCloak, Odense, Dinamarca.

En una habitación vacía que mide ocho pies por diez pies y con un techo de nueve pies, varios pedazos de telas de prueba de algodón y lana y prendas de vestir fueron colocados en el piso, suspendidos del techo y unidos a la pared a diferentes alturas.

La máquina de niebla SmokeCloak cargada con el fluido de humo marcador se colocó en el piso adyacente a la puerta de entrada abierta y se encendió para descargar la niebla en la habitación. La puerta se cerró y se permitió que el humo se disipara durante aproximadamente 5 minutos, momento en el cual el humo del marcador se diluyó lo suficiente para que el operador pudiera ver la ubicación de los tejidos de prueba. Ningún cambio visible en las telas o la ropa después de la exposición al humo del marcador fue evidente. Estas telas y prendas de vestir fueron recogidas por el operador y llevadas al laboratorio para su análisis. Las muestras de tela recolectadas y las prendas de vestir recuperadas de diferentes lugares de la habitación fueron etiquetadas y almacenadas en bolsas de plástico selladas. Todas las muestras se enviaron al laboratorio y se autenticaron de manera forense.

El análisis de PCR de las muestras se realizó utilizando un par de cebadores complementario a la secuencia de identificación exclusiva del marcador de ADN oculto dentro del ácido nucleico portador presente en el humo marcador.

La figura 1 muestra escaneos representativos obtenidos por electroforesis capilar de Productos de PCR de muestras tomadas de una tela de algodón y una tela de lana recuperada de la habitación después de la exposición al humo del marcador.

Ejemplo 2

Detección de etiqueta de ADN en el operador inmediatamente después de la exposición

Las muestras del operador también fueron recolectadas. La cinta médica, la piel, el abrigo y los zapatos se quitaron uniéndolo y retirando la cinta médica y los trozos de cinta se enviaron al laboratorio para su análisis. El pelo y las fosas nasales del operador se limpiaron con hisopos de algodón genéricos y los hisopos se sometieron para análisis de PCR.

La figura 2 muestra exploraciones de electroforesis capilar de productos de PCR a partir de muestras tomadas del operador. Los paneles muestran los productos de PCR de la muestra del operador inmediatamente después de recuperar el tejido y los artículos de ropa como se describe en el Ejemplo 1. (A) hisopo nasal; (B) hisopo de la piel expuesta; (C) Cinta después de probar la chaqueta del operador; (D) Cinta después de probar los zapatos del operador.

Ejemplo 3

Detección de etiquetado de ADN en el operador 48 horas después de la exposición

Cuarenta y ocho horas más tarde, después de que el operador tomara al menos dos duchas, se tomaron muestras adicionales del operador. Todas las muestras se enviaron al laboratorio y se autenticaron forensemente mediante PCR y electroforesis capilar para determinar la presencia de un marcador de ADN como se describió anteriormente. Los paneles muestran los productos de PCR de la muestra del operador (A) Muestra de cabello; (B) hisopo nasal; (C) hisopo de la piel expuesta; (D) Cinta después de probar los zapatos del operador.

Ejemplo 4

Detección de marcador de ADN en el operador una semana después de la exposición

Seis y siete días después del experimento de humo del marcador y después de que el operador tomara duchas normales, se tomaron muestras adicionales del operador y se analizaron nuevamente para detectar la presencia del marcador de ADN. Se detectó un amplicón distintivo de ADN inconfundible en todas las muestras que incluyen piel y calzado, como se muestra en la FIG. 4, paneles (A) y (B) respectivamente.

Ejemplo 5

Autenticación de la chaqueta de lana después de la limpieza en seco

30 días después del experimento y después de la limpieza en seco de la chaqueta del operador, se tomó una muestra de la chaqueta y se analizó el ADN como se describió anteriormente. Nuevamente, se detectó un amplicón distintivo de ADN inequívoco, lo que demuestra que el marcador de ADN sobrevivió a la limpieza en seco y la semana de uso normal. Por lo tanto, el marcador de ADN aducido a estos diversos sustratos de forma robusta y elástica como se demostró mediante la detección del marcador de ADN incluso después de varios lavados y una semana de uso normal.

REIVINDICACIONES

1. Un método para marcar un artículo de inventario que comprende:

proporcionar un generador de humo activable,

proporcionar un depósito para contener un fluido de humo y adaptado para proporcionar el flujo de fluido de humo al generador; el depósito que contiene un fluido de humo que comprende un ácido nucleico portador que incluye un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva;

activar el generador de humo para producir el humo marcador que comprende el marcador de ADN para hacer que el humo del marcador fluya sobre el artículo del inventario y por lo tanto marque de manera detectable el artículo del inventario con el marcador de ADN, en el que el marcador de ADN tiene una secuencia identificable exclusiva que es menor que una parte por diez mil en peso del ácido nucleico portador.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la secuencia de identificación exclusiva del marcador de ADN es una secuencia de aproximadamente 25 bases a aproximadamente 10,000 bases de longitud.

3. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente identificar el marcador de ADN del artículo de inventario marcado en forma detectable y autenticar por lo tanto el artículo de inventario marcado en forma detectable.

4. El método de la reivindicación 3, en el que la identificación del marcador de ADN comprende una etapa de amplificación de PCR.

5. Un método para marcar una persona en la vecindad de un generador de humo, que comprende:

proporcionar un generador de humo activable,

proporcionar un depósito para contener un fluido de humo y adaptado para proporcionar el flujo de fluido de humo al generador; comprendiendo el depósito un fluido de humo que incluye un ácido nucleico portador y un marcador de ADN que tiene una secuencia de identificación exclusiva;

activar el generador de humo para producir el humo marcador que comprende el ácido nucleico portador y el marcador de ADN para hacer que el humo marcador fluya sobre una persona que tiene una superficie corporal expuesta y/o una o más prendas de vestir en las proximidades del generador de humo y, por lo tanto, para marcar de manera detectable la superficie expuesta del cuerpo y/o una o más prendas de vestir de la persona con marcador de ADN que tiene una secuencia identificable exclusiva, en el que el marcador de ADN tiene una secuencia identificable exclusiva que es menor que una parte por diez mil en peso del ácido nucleico portador.

6. El método de la reivindicación 5, en el que la superficie corporal expuesta detectablemente marcada con marcador de ADN es piel y/o cabello.

7. El método de la reivindicación 5, en el que la prenda de vestir expuesta detectablemente marcada comprende un material seleccionado del grupo que consiste en lana, algodón, lino, satén, rayón, viscosa, poliéster, nailon, acrílico, olefina, poliuretano, polilactida, plástico, cuero o un pelaje de animal.

8. El método de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente identificar la secuencia identificable del marcador de ADN de la piel y/o cabello marcados en forma detectable e identifican por lo tanto la persona como presente cuando se activa el generador de humo.

9. El método de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente identificar la secuencia identificable en forma exclusiva del marcador de ADN de artículo de vestir marcado en forma detectable e identificando por lo tanto el artículo de vestir como presente cuando se activa el generador de humo.

10. Un sistema de seguridad, que comprende:

un generador de humo activable,

un depósito para contener un fluido de humo y adaptado para proporcionar un flujo de fluido de humo al generador; un fluido de humo que comprende un ácido nucleico portador y un marcador de ADN que tiene una secuencia identificable exclusiva, en el que la etiqueta de ADN tiene una secuencia identificable exclusiva que es menos de una parte por diez mil en peso del ácido nucleico portador

11. El sistema de seguridad de la reivindicación 10, en el que el fluido de humo comprende adicionalmente un marcador ópticamente detectable.

12. El sistema de seguridad de la reivindicación 11, en el que el marcador ópticamente detectable se une químicamente al ácido nucleico portador y al marcador de ADN en el fluido de humo.
- 5 13. El sistema de seguridad de la reivindicación 11, que comprende además un marcador ópticamente detectable y en el que el marcador ópticamente detectable se selecciona del grupo que consiste en un fósforo de conversión ascendente (UCP), un fluoróforo UV, un marcador IR cerámico, un marcador UV rojo.
- 10 14. El sistema de seguridad de la reivindicación 10, en el que la activación del sistema hace que el fluido de humo fluya al generador y de ese modo produzca un humo de desorientación que comprende el ácido nucleico portador y el marcador de ADN.

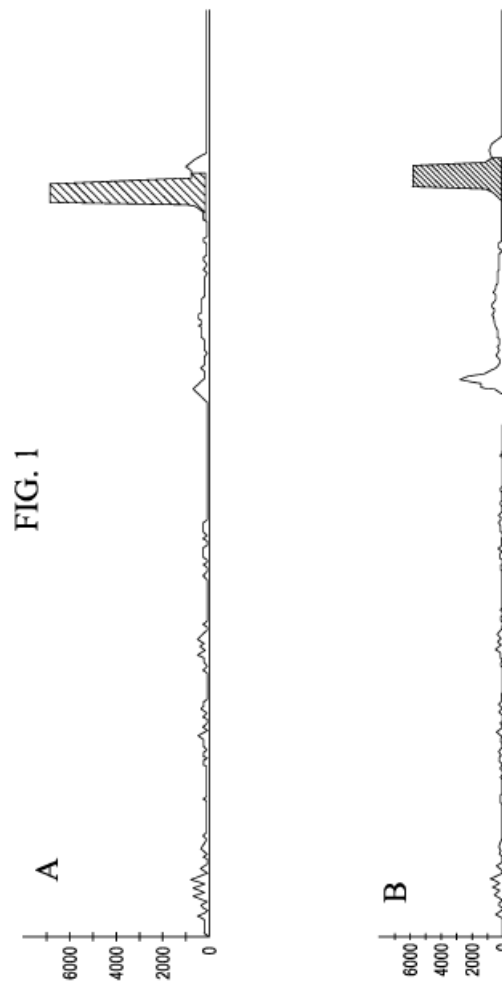


FIG. 2

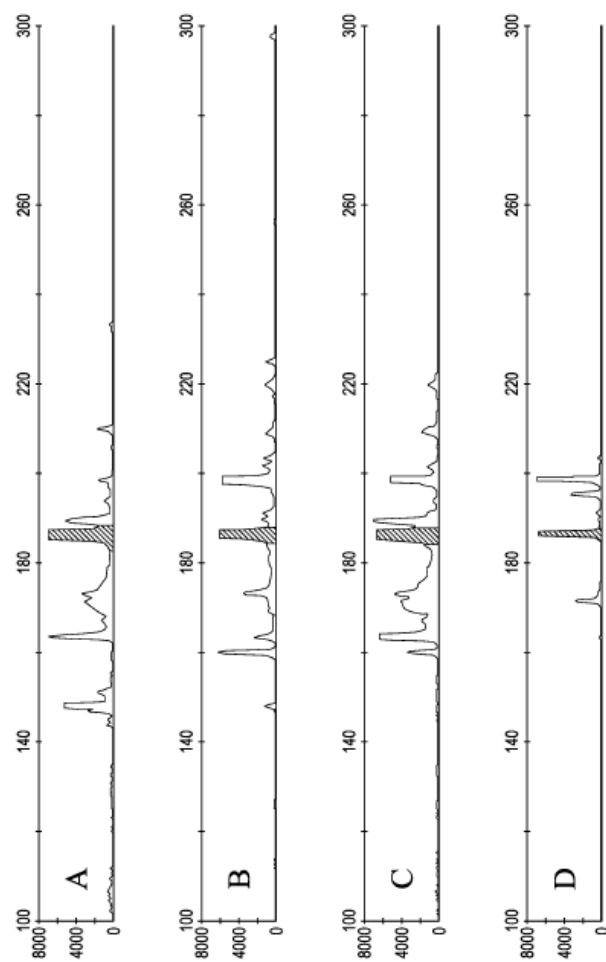


FIG. 3

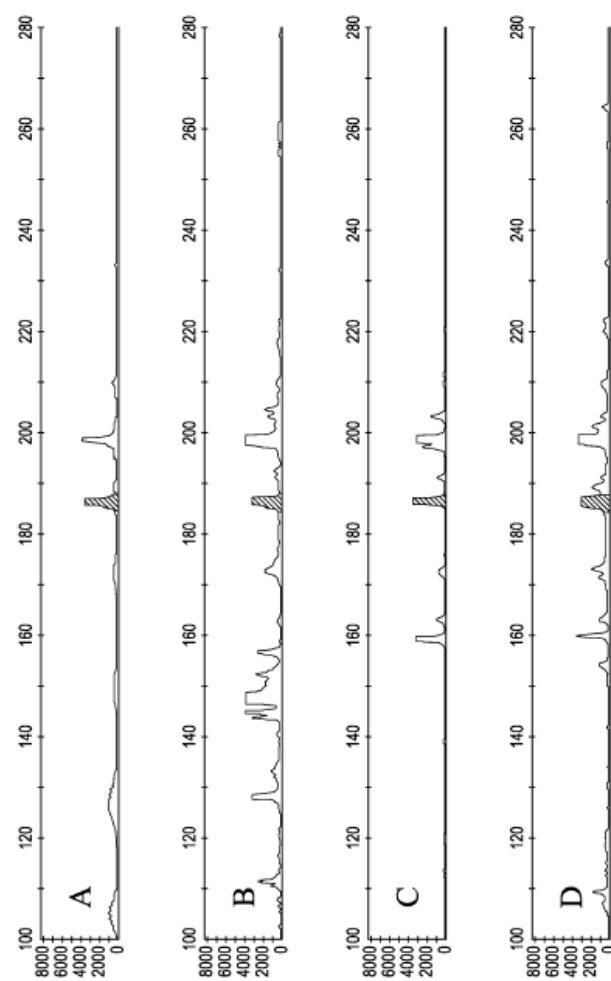


FIG. 4

