

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 712**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2016** E 16176066 (5)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019** EP 3109327

54 Título: **Kit de PCR para electroforesis capilar**

30 Prioridad:

23.06.2015 FR 1555745

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

11.12.2019

73 Titular/es:

**IDEMIA IDENTITY & SECURITY FRANCE (100.0%)
2, Place Samuel de Champlain
92400 Courbevoie, FR**

72 Inventor/es:

**RAGOT, MARCELIN;
TONSON, BENOÎT;
POUET, MARINA;
ALOS, RAFAEL y
FORTIN, NATHALIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 734 712 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

Kit de PCR para electroforesis capilar

La presente invención se refiere a un kit de PCR que permite mejorar la detección de los restos particulares de ácidos nucleicos y aumentar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

5 Más precisamente, la invención propone utilizar cebadores modificados con características particulares que permiten, durante un tratamiento de electroforesis, poner de manifiesto, en las muestras que contienen ácidos nucleicos, el equivalente de una codificación característica de los restos particulares de ácidos nucleicos, siendo esta codificación tal que permita detectar mejor la presencia de estos restos.

10 La invención propone también un procedimiento de detección de restos de ácidos nucleicos de interés (por ejemplo, STR, mini-STR o VNTR) que utiliza dichos cebadores.

Ventajosamente -pero no de forma limitativa- encuentra aplicación en el campo de la electroforesis capilar.

Campo técnico general y técnica anterior

La electroforesis capilar en gel se utiliza ampliamente en la actualidad para obtener perfiles de ADN que permiten detectar variaciones alélicas y, por lo tanto, diferenciar a los individuos (*Butler, J. M. (1995)*).

15 Según el NIST (http://www.cstl.nist.gov/strbase/str_fact.htm), el número de alelos detectables con un kit de PCR tradicional en los Estados Unidos (es decir, que contiene los marcadores genéticos obligatorios en los Estados Unidos) es de 425 alelos (sobre los loci: CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 y D21S11). Además, el número de alelos que se pueden detectar con un kit de PCR
20 tradicionalmente utilizado en Europa y que se puede utilizar en los Estados Unidos (es decir, que contiene los marcadores obligatorios europeos y estadounidenses) es de 552 alelos (sobre los loci citados anteriormente, a los que se añaden los marcadores europeos: D1S1656, D2S441, D2S1338, D10S1248, D12S391, D19S443, D22S1045 y SE33).

Más precisamente, los individuos se distinguen en la actualidad por el tamaño de secuencias cortas repetitivas denominadas "*short tandem repeats*" (STR), que se encuentran en las regiones no codantes de muchos loci. Existen
25 numerosos kits de PCR múltiple que tienen como objetivo estos STR (véase, por ejemplo, el siguiente enlace: <http://www.cstl.nist.gov/strbase/multiplx.htm>). Tradicionalmente, las muestras de ADN ensayadas se someten a una PCR y el producto de esta PCR (es decir, los amplicones generados) se analiza a continuación mediante electroforesis capilar. Cada uno de estos alelos contenidos en la muestra contiene un número preciso de STR, característico del individuo, que influye en el tamaño del amplicón generado por la PCR. Cada amplicón tiene un marcado y un tamaño
30 dado, detectable por un pico en el electroforegrama correspondiente. La combinación de estos picos da información sobre la identidad del individuo.

El electroforegrama es el resultado obtenido de la electroforesis capilar, que asocia un dato analógico leído en un sensor CCD con una cantidad de materia (que se hace detectable por amplificación y por marcado mediante uno o
35 varios fluorocromo(s)). Cuanto mayor es el valor medido por el sensor CCD (hasta el límite de saturación), mayor es la probabilidad de que la señal revele la presencia de un ácido nucleico de interés, y por lo tanto la información es más fiable.

Desafortunadamente, este electroforegrama está sujeto a diversas variaciones de calidad debido principalmente a:

- la presencia de artefactos que generan la aparición de falsos picos en la señal detectada, pudiendo ser debidos estos artefactos a:
 - 40 ○ malos funcionamientos de la polimerasa. Se conocen dos fenómenos:
 - una secuencia repetitiva en menos sobre un STR (conocida con el nombre de "*polymerase stuttering*");
 - la adición de un nucleótido A al final del copiado (conocido con el nombre de adición A o fenómeno de aparición de un hombro en los perfiles obtenidos,
 - 45 ○ el ruido de fondo numérico/analógico (ligado al sensor CCD, ruido del sensor, luz parásita, perturbaciones ópticas ligadas al calor, vibraciones, sensor poco eficiente, etc.), que genera una relación señal/ruido fluctuante, y
 - fenómenos de saturación (o "*pull-up*", debidos a una mala calibración del sensor CCD, a una mala separación de los canales de color, a un sensor poco eficiente),
 - 50 ○ los fluorocromos que quedan libres e inyectados en el capilar (conocido con el nombre de "*dye blob*"),

- las perturbaciones eléctricas que influyen en la electroforesis capilar (conocido con el nombre de “*spike*”),
- pérdida de resolución al final del electroforegrama (debida a la expansión de la materia en el capilar),
- ausencia de algunos picos debidos a un problema de amplificación (PCR) ligado a cebadores posicionados en una zona del ADN mutágeno (fenómeno conocido con el nombre de “*alelo drop-out*”).

5 Actualmente, la naturaleza analógica del dato medido por el sensor y los diferentes parámetros perturbadores que entran en juego durante la construcción de un electroforegrama no permiten dejar de depender de una relectura mediante una persona física experta en el campo técnico, que debe, gracias a sus conocimientos generales y a su experiencia en la materia, certificar la calidad de un perfil. En general, para validar la extracción de un perfil, el experto se basa en la amplitud de los datos y en la forma de éstos (una señal válida presenta una forma particular, conocida por el experto en la técnica, a causa del fenómeno de pérdida de resolución a lo largo del electroforegrama, acentuándose hacia el final). Así, el método actual de análisis de resultados no puede ser automatizado, ya que no reviste un carácter totalmente objetivo. Además, es imposible de calcular con qué probabilidad el dato seleccionado por el experto se aproxima a la realidad.

Presentación general de la invención

15 Un objetivo general de la invención es el de proponer un método más fiable y más objetivo para detectar la presencia de restos de ácidos nucleicos de interés en una muestra, a partir de una información leída en un electroforegrama. La invención se describe en las reivindicaciones adjuntas.

Más precisamente, la invención propone un método de lectura de un perfil de ácidos nucleicos muy robusto frente a los errores en la señal (eliminación de los fenómenos de *stutter*, aparición de hombros en los picos, *pull-up*,...), y menos sensible al ruido de fondo analógico, lo que asegura una elevada probabilidad objetiva de cada información leída en un electroforegrama. Este método deja de depender de una relectura por un experto y por lo tanto es automatizable.

Para ello, el método de la invención necesita utilizar grupos de cebadores específicos del resto buscado, denominados n-AMC en la parte siguiente de la presente memoria.

25 Estos grupos de cebadores n-AMC están ventajosamente integrados en un kit de PCR denominado “codante”, que también es un objetivo de la invención. Este kit de PCR permite “codificar” cada resto buscado en varias variables (tamaño de base, color), de forma muy específica (véanse los ejemplos más adelante). Este kit se utiliza principalmente para detectar *Short Tandem Repeat* (o STR) por ejemplo los STRs que tienen un tamaño comprendido entre 50 y 450 pares de bases (pb). Este kit se utiliza por lo tanto en particular en ciencias forenses.

30 La presente invención tiene también como objetivo un método de detección de restos de interés en una muestra, utilizando dichos cebadores o dicho kit.

La presente invención también tiene como objetivo un método de lectura de un electroforegrama producido por dicho kit.

Finalmente, la presente descripción proporciona recomendaciones para utilizar estos métodos, más particularmente en relación con la configuración de los cebadores de la invención.

Descripción de los grupos de cebadores de la invención (n-AMC)

En el sentido de la invención un “n-AMC” es un grupo de cebadores diferenciales que permiten amplificar específicamente un resto de interés para su detección en un ácido nucleico. La cifra “n” en “n-AMC” indica el número de parejas de cebadores específicos de dicho resto contenidos en dicho grupo. Así un “3-AMC” contiene tres parejas de cebadores que permiten amplificar específicamente un mismo resto, un “4-AMC” contiene cuatro parejas de cebadores que permiten amplificar específicamente un mismo resto, etc.

Por “ácido nucleico”, se entiende, en el sentido de la presente invención, una secuencia nucleica o de ácidos nucleicos, un polinucleótido, un oligonucleótido, una secuencia de polinucleótidos, o incluso una secuencia nucleotídica, términos que se emplearán aquí de forma indistinta. Por este término, se entiende la designación de un encadenamiento preciso de nucleótidos, que comprende (o no) nucleótidos no naturales, y que puede corresponder tanto a un ADN de cadena doble, un ADN de cadena simple o incluso a productos de transcripción de dichos ADNs. Preferentemente, se trata de un ADN de cadena simple o de cadena doble.

Tal como se ha indicado anteriormente, cada n-AMC contiene varias parejas de cebadores específicos de un mismo resto (denominado “resto A” en la parte siguiente de la presente memoria).

50 Por “resto de interés”, se entiende la designación de una región de un ácido nucleico que contiene un fragmento nucleotídico característico que se desea detectar y/o identificar. Dicho fragmento puede ser, por ejemplo, un encadenamiento característico de ciertas bases. Alternativamente, dicho fragmento puede ser una repetición de

secuencias características, también denominadas secuencias repetitivas, (tales como los “short tandem repeats” o “STR”, mini-STRs o VNTRs), cuyo número se desea medir. Finalmente, puede haber habido en dicho fragmento una inserción de nucleótidos o, por el contrario, una delección de nucleótidos, con relación a una población de control. Estos restos de interés son preferentemente los mismos que los detectados por los kits comerciales (PowerPlex, etc.). En el marco de la presente invención, dicho fragmento es preferentemente un STR alélico que, como se ha explicado anteriormente, permite diferenciar individuos en ciencias forenses.

Por “cebadores”, se entiende aquí un fragmento nucleotídico que comprende por ejemplo de 15 a 40 nucleótidos, principalmente de 18 a 30 nucleótidos, que posee una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para formar un complejo de hibridación con una secuencia de ácido nucleico diana situada, por ejemplo, en el extremo de un resto de interés tal como se ha definido anteriormente. Estos cebadores son preferentemente ADN de cadena simple. Para realizar una amplificación por PCR, es necesario utilizar estos cebadores por “pareja”, hibridándose uno de los cebadores de la pareja anteriormente a la región de interés que se va a amplificar, y el otro posteriormente.

Por “parejas de cebadores específicos de un resto A”, se entiende aquí una pareja de cebadores que “permite amplificar específicamente un resto A”. En la práctica, se trata de dos cebadores que se hibridan específicamente de un lado y otro del resto de interés, estando las dos regiones de hibridación distantes como máximo 2.000 pares de bases (Butler M. *et al.*, *Fundamentals of Forensic DNA typing*, 2009). Por “específicamente”, se entiende que la hibridación de dichos cebadores no tiene lugar sobre un ácido nucleico que tiene una secuencia que posee menos de 80% de homología con la región diana. Los parámetros que definen las condiciones de astringencia adecuados dependen de la temperatura a la que 50% de las cadenas apareadas se separan (T_m). Para las secuencias de longitud inferior a 30 bases, T_m se define mediante la relación: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. En condiciones de astringencia adecuadas (es decir, en las que las secuencias específicas no hibridan), la temperatura de hibridación es preferentemente 5 a 10°C por debajo de T_m , y los tampones de hibridación utilizados son preferentemente disoluciones de fuerza iónica elevada (tal como una disolución 6xSSC por ejemplo). El experto en la técnica es totalmente capaz de identificar cebadores específicos de un fragmento nucleotídico dado, una vez que se conoce la secuencia de éste. En las ciencias forenses, son bien conocidas por el experto en la técnica parejas de cebadores que permiten fijarse de una y otra parte de las regiones que contienen STR, permitiendo así generar amplicones distintos en función de los individuos (véase la lista propuesta en el enlace: <http://www.cstl.nist.gov/strbase/primer.htm>).

En el marco de la invención, es esencial que en cada n-AMC, al menos dos parejas de cebadores específicos de un mismo resto generen amplicones diferenciables.

Por “amplicón”, se entiende aquí un fragmento nucleotídico producido mediante una reacción de polimerización que tiene lugar en la muestra ensayada en presencia de cebadores oligonucleotídicos específicos del resto de interés, en las condiciones de polimerización apropiadas. Este amplicón tiene prácticamente la misma secuencia nucleotídica que el resto de interés (siempre que sus extremos estén formados por los cebadores utilizados para generarlo y por eventuales regiones contiguas que rodean la región de interés).

Por “diferenciable”, se entiende aquí que es posible diferenciar cada amplicón sobre la base de una característica objetiva de éste, detectable mediante las técnicas actuales de separación de ácidos nucleicos, por ejemplo por electroforesis (en gel de agarosa o de poliacrilamida, eventualmente capilar) o por cromatografía. Esta característica es su tamaño, su marcado, etc.

Así, cada n-AMC contiene, para cada resto de interés, al menos dos parejas de cebadores, de los que:

- una pareja de cebadores específicos del resto A, que produce un amplicón de tamaño T, detectable durante la electroforesis con un color C. Esta pareja de cebadores se definirá en adelante como la pareja de cebadores “de referencia” del n-AMC para el resto A. Se trata preferentemente de la pareja de cebadores tradicionalmente utilizada en los kits y métodos de la técnica anterior para detectar el resto A,
- al menos otra pareja de cebadores específicos del resto A, que genera un amplicón diferenciable del producido por la pareja de referencia. Esta otra pareja de cebadores se denominará en adelante pareja de “cebadores modificados”.

En un modo de realización preferido, los amplicones generados por estas dos parejas de cebadores se distinguen bien por su tamaño (al menos una base de diferencia), bien por su marcado o bien por su tamaño y su marcado.

En un modo de realización todavía más preferido, la pareja de cebadores modificados genera un amplicón que contiene una base de más o de menos con relación al generado por los cebadores de referencia, o genera un amplicón que es detectable mediante una señal diferente a la que lleva el amplicón generada por los cebadores de referencia (por ejemplo, un color C´ diferente a C).

Kit de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un kit de PCR que contiene además de los reactivos tradicionalmente utilizados en una PCR (dNTPs, Taq polimerasa, etc.), un n-AMC tal como se ha definido anteriormente, en el que n es superior o igual a 2.

5 Más precisamente, la presente invención tiene como objetivo un kit de PCR que contiene, para cada resto de interés que se quiere identificar en un ácido nucleico, al menos dos parejas de cebadores específicos de dicho resto, generando dichas parejas, para cada resto, al menos dos amplicones diferenciables.

De esta forma, durante la realización de la electroforesis capilar, se dispone de una redundancia en la información de detección del resto (en particular para $n = 2$). Trasladado al campo numérico, es equivalente a una codificación con redundancia y código corrector (principalmente para $n > 2$).

10 Según un modo de realización, un kit de PCR que contiene, para cada resto de interés que se va a identificar en un ácido nucleico, al menos dos parejas de cebadores específicos de dicho resto, estando dichas parejas adaptadas para generar, para cada resto, al menos dos amplicones diferenciables. En un modo de realización preferido, dicho kit contiene un 2-AMC, es decir dos parejas de cebadores específicos de cada resto que se va a detectar, generando dichas parejas, para cada resto que se va a detectar, dos amplicones diferenciables.

15 En un modo de realización preferido, dicho kit contiene un 3-AMC, es decir tres parejas de cebadores específicos de cada resto que se va a detectar, generando dichas parejas, para cada resto que se va a detectar, tres amplicones diferenciables.

Preferentemente, dichos amplicones son diferenciables, bien por su tamaño, bien por su marcado, o bien por una combinación de estas características.

20 De forma todavía más preferida, dichas parejas de cebadores generan amplicones cuyo tamaño difiere en al menos una base y/o generan amplicones marcados de forma diferente.

Es posible utilizar en particular parejas de cebadores modificados que generan amplicones cuyo tamaño difiere en un par de bases, dos pares de bases, tres pares de bases, incluso cuatro pares de bases, o en un número cualquiera de pares de bases.

25 Según un modo de realización, el kit de PCR contiene al menos dos parejas de cebadores específicos de un resto de interés para identificar en un ácido nucleico, estando adaptados dichos pares para generar, para dicho resto, al menos dos amplicones diferenciables por su tamaño y cuyo tamaño difiere en un par de bases, dos pares de bases, tres pares de bases, o cuatro pares de bases.

30 Además es posible utilizar parejas de cebadores modificados que generan amplicones marcados de forma diferente. Los "marcadores" que llevan los amplicones pueden ser isótopos radioactivos, enzimas (principalmente una peroxidasa o una fosfatasa alcalina), compuestos químicos cromóforos, compuestos cromógenos, fluorógenos o luminiscentes, análogos de base nucleotídica, o también ligandos tales como la biotina o cualquier otro medio equivalente. Entre los isótopos radioactivos utilizados se pueden citar el ^{32}P , el ^{33}P , el ^{35}S , el ^3H o el ^{125}I . Las entidades no radioactivas se seleccionan entre ligandos tales como la biotina, la avidina, la estreptavidina, la digoxigenina, los haptenos, los colorantes, los agentes luminiscentes tales como los agentes radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, fluorescentes, o fosforescentes. Preferentemente, los amplicones generados por la PCR llevan marcadores fluorescentes detectables por electroforesis capilar tales como la fluoresceína, carboxifluoresceína, el Texas-Red, Rhodamine-Red, carboxi-X rodamina (CXR), la cianina, los Alexa flúor, o cualquier otro citado en el sitio <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fluorochrome>. Principalmente se pueden utilizar los marcadores descritos en Butler M. *et al.*, *Fundamentals of Forensic DNA typing*, 2009, en particular el 5-FAM 5-carboxifluoresceína, la JOE 6-carboxi-2,7-dimetoxi-4 ,5-diclorofluoresceína, la ROX (CXR) 6-carboxi-X-rodamina, la fluoresceína TMR (TAMRA), la N,N,N,N-tetrametil-6-carboxi-rodamina, la TET 4,7,2,7-tetracloro-6-carboxifluoresceína, o también la HEX 4,7,2,4 ,5,7-hexacloro-6-carboxifluoresceína.

35 Dichos amplicones se pueden obtener utilizando cebadores particulares, por ejemplo, cebadores cuyo tamaño difiere o que lleva un marcador diferente.

40 En efecto, es posible controlar de forma muy precisa el tamaño de un amplicón obtenido por PCR modulando directamente el tamaño de los cebadores utilizados. Principalmente, es posible generar amplicones cuyo tamaño difiere en X par(es) de bases utilizando cebadores modificados que contienen X bases de más o de menos con relación a los cebadores de referencia. Más precisamente, es posible obtener dos amplicones que tienen X par(es) de bases de diferencia utilizando dos parejas de cebadores idénticos excepto en X base(s) (X base(s) de más o de menos en uno de los cebadores de la pareja de cebadores modificados con relación al cebador equivalente en la pareja de cebadores de referencia).

45 En un modo de realización preferido, el kit de la invención contiene cebadores modificados cuya secuencia nucleotídica es idéntica a la de los cebadores de referencia, excepto en X base(s). Preferentemente, X es un número entero comprendido entre 1 y 10.

También es posible generar amplicones de tamaño diferente utilizando cebadores cuya región de hibridación en el ácido nucleico de interés esté desplazada (en X bases) con relación a la de los cebadores de referencia. Preferentemente, X es un número entero comprendido entre 1 y 10.

5 Por otra parte, es posible controlar de forma muy precisa la naturaleza del marcador ligado a un amplicón utilizando cebadores también marcados. Más precisamente, es posible obtener dos amplicones diferenciables por el marcador que llevan utilizando dos parejas de cebadores que llevan un marcador diferente (por ejemplo, un fluorocromo diferente).

10 En otro modo de realización preferido, el kit de la invención contiene por lo tanto una pareja de cebadores modificados de los que al menos un cebador lleva un marcador diferente del o de los marcadores que llevan los cebadores de referencia.

15 Además del n-AMC, el kit de PCR de la invención puede contener cualquier reactivo utilizable para realizar una PCR, por ejemplo, una polimerasa Tag recombinante, un tampón para mantener el pH estable en el medio de reacción (generalmente Tris-HCl), dNTPs, MgCl₂, etc. Las condiciones de amplificación de un ácido nucleico y los reactivos que se van a utilizar para este fin son bien conocidos por el experto en la técnica. Es posible al respecto consultar los libros de biología molecular tales como Sambrook *et al.* (*Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; 3ª edición, 2001).

Según un modo de realización, el kit contiene un contenedor diferente para cada cebador de dicho kit. En este modo de realización, cada cebador se dispone en un contenedor diferente dentro del kit.

20 Según otro modo de realización, el kit contiene un contenedor diferente para cada pareja de cebadores de dicho kit. En este modo de realización, los cebadores de cada pareja de cebadores del kit están premezclados dos a dos en un contenedor diferente para cada pareja de cebadores.

Según otro modo de realización, el kit contiene un contenedor único para todas las parejas de cebadores de dicho kit. En este modo de realización, los cebadores de cada pareja de cebadores del kit están premezclados en un contenedor único.

25 Por "contenedor", se entiende aquí un recipiente, un tubo, una ampolla, una jeringa, un cartucho, una botella, un frasco, un matraz, una caja, una cápsula, una envoltura, un pozo, un alveolo, un saco, una bolsa o un parche. El contenedor puede ser hermético o no hermético, cerrado por ejemplo con un tapón, una cápsula, un opérculo, una película, o no cerrado.

Para n = 2, el kit de la invención contiene un 2-AMC.

30 En este modo de realización particular, el kit de la invención contiene una pareja de cebadores de referencia capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T (T pares de base), marcado con un marcador M (por ejemplo, un fluorocromo de color C), y:

- 35 - una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón con un tamaño T' diferente de T, estando marcado dicho amplicón con un marcador M (por ejemplo, un fluorocromo de color C), o
- una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón con un tamaño T, estando dicho amplicón marcado con un marcador M' diferente de M (por ejemplo, un fluorocromo de color C' diferente de C).

40 Preferentemente, el tamaño T' del amplicón difiere de T en uno, dos, tres, incluso cuatro pares de bases (de más o de menos).

En el caso más particular en que T' difiere de T en un par de bases, el kit de la invención contiene:

- una pareja de cebadores de referencia capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T (T pares de base), marcado con un marcador M (por ejemplo, un fluorocromo de color C), y
- 45 - una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T±1 pares de bases, marcado con un marcador M (por ejemplo, un fluorocromo de color C) o con un marcador M' diferente de M (por ejemplo, un fluorocromo de color C' diferente de C).

En este caso, es posible utilizar, por ejemplo, una pareja de cebadores modificados en el que uno de los cebadores contiene una base de más o de menos con relación al cebador equivalente de la pareja de referencia.

50 Aunque estos parámetros no cambian la fiabilidad del kit de la invención, hay que señalar que:

- preferentemente, hay que evitar el tamaño T-1 pb en el color C debido a la aparición de hombros en los picos,
- preferentemente, hay que evitar el tamaño T-4 pb en el color C debido al fenómeno de *stutter*,
- preferentemente, hay que evitar el tamaño T en el color diferente a C debido al fenómeno de *pull-up*.

5 Además de este 2-AMC, este kit de PCR puede contener cualquier reactivo utilizable para realizar una PCR, por ejemplo una polimerasa Taq recombinante, un tampón para mantener el pH estable en el medio de reacción (generalmente Tris-HCl), dNTPs, MgCl₂, etc.

Para n = 3, el kit de la invención contiene un 3-AMC.

En otro modo de realización particular, el kit de la invención contiene un 3-AMC. Esto permite maximizar el número de informaciones leídas en el electroforegrama a la vez que limita el número de errores de lectura.

10 En este caso, el kit de la invención contiene, para cada resto de interés que se va a identificar en un ácido nucleico, tres parejas de cebadores específicos de dicho resto, generando dichas parejas tres amplicones diferenciables por su tamaño y/o por su marcado.

15 En un modo de realización particular, el kit de la invención contiene una pareja de cebadores de referencia capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T (T pares de base), marcado con un marcador M (por ejemplo, un fluorocromo de color C), y al menos dos parejas de cebadores elegidas entre:

- una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón que tiene un tamaño T' diferente de T, estando marcado dicho amplicón con un marcador M (por ejemplo, un fluorocromo de color C),
- 20 - una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón que tiene un tamaño T, estando marcado dicho amplicón con un marcador M' diferente de M (por ejemplo, un fluorocromo de color C' diferente de C), y
- una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón que tiene un tamaño T' diferente de T, estando marcado dicho amplicón con un marcador M' diferente de M (por ejemplo, un fluorocromo de color C' diferente de C).

25 Preferentemente, el tamaño T' del amplicón difiere de T en uno, dos, tres, incluso cuatro pares de bases (de más o de menos).

30 En el caso más particular en el que T' difiere de T en un par de bases, el kit de la invención que contiene una pareja de cebadores de referencia capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T (T pares de base), marcado con un marcador M (por ejemplo, un fluorocromo de color C), y al menos dos parejas de cebadores elegidos entre:

- una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón que tiene un tamaño T±1 pares de bases, estando marcado dicho amplicón con un marcador M (por ejemplo, un fluorocromo de color C),
- 35 - una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón que tiene un tamaño T, estando marcado dicho amplicón con un marcador M' diferente de M (por ejemplo, un fluorocromo de color C' diferente de C), y
- una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón que tiene un tamaño T±1 pares de bases, estando marcado dicho amplicón con un marcador M' diferente de M (por ejemplo, un fluorocromo de color C' diferente de C).

40 En particular, el kit de la invención puede contener:

- una pareja de cebadores de referencia capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T, marcado con un marcador M (por ejemplo, un fluorocromo de color C),
- una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T, marcado con un marcador M' diferente de M (por ejemplo, un fluorocromo de color C' diferente de C), y
- 45 - una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T+1 pares de bases, marcado con un marcador M (por ejemplo, un fluorocromo de color C).

En otro modo de realización particular, el kit de la invención puede contener:

- una pareja de cebadores de referencia capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T, marcado con un marcador M (por ejemplo, un fluorocromo de color C),
- 5 - una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón T+1 pares de bases, marcado con un marcador M (por ejemplo, un fluorocromo de color C), y
- una pareja de cebadores modificados capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T±1 pares de bases, marcado con un marcador M' diferente de M (por ejemplo, un fluorocromo de color C' diferente de C).

10 Además de este 3-AMC, este kit de PCR puede contener cualquier reactivo utilizable para realizar una PCR, es decir, una polimerasa Taq recombinante, un tampón para mantener el pH estable en el medio de reacción (generalmente Tris-HCl), dNTPs, MgCl₂, etc.

Detección de un resto de interés mediante el kit de la invención

15 Un n-ALC, en el sentido de la presente invención, es el resultado visible de la detección de un n-AMC en un sistema de dos dimensiones. Más precisamente, en el caso de una electroforesis capilar, se trata por lo tanto de un grupo de n picos detectados en el electroforegrama, que aparecen de aproximadamente el tamaño T esperado para el amplicón. Cada n-ALC revela con alta probabilidad la presencia (o la ausencia) del resto de interés en la muestra de ácido nucleico. Este n-ALC permite caracterizar principalmente de forma objetiva qué alelo(s) lleva el individuo analizado.

20 En un segundo aspecto, la presente invención tiene como objetivo un método que permite detectar al menos un resto de ácido nucleico de interés en una muestra biológica, a partir de los n-ALC obtenidos utilizando el kit de la invención. Naturalmente, este método necesita utilizar tantos n-AMC como locus de interés.

Este método utiliza por lo tanto el kit de la invención tal como se ha descrito anteriormente, en el que el número de n-AMC se ajusta al número de restos que se va a detectar.

25 En un modo de realización, el método que permite detectar al menos un resto de ácido nucleico de interés en una muestra biológica se caracteriza por que utiliza el kit tal como se ha definido anteriormente y por que se detecta dicho resto de ácido nucleico de interés cuando se detecta, para dicho resto, al menos un amplicón por parejas de cebadores específicos de dicho resto utilizado.

Más precisamente, la presente invención comprende por lo tanto las siguientes etapas:

- a) obtener una muestra biológica que contiene ácidos nucleicos,
- 30 b) poner en contacto la muestra biológica con las parejas de cebadores de los n-AMC descritos anteriormente, y con los reactivos necesarios para la amplificación de dichos ácidos nucleicos,
- c) amplificar dichos ácidos nucleicos en las condiciones apropiadas,
- d) detectar los amplicones obtenidos por medio de su tamaño y/o su marcado o de un sistema de detección de dos dimensiones,
- e) generar un perfil genético en función de los amplicones detectados en la etapa d).

35 Por "muestra biológica", se entiende aquí cualquier muestra susceptible de contener ácidos nucleicos, principalmente una muestra que contiene células (animales, humanas, vegetales, microbianas, etc.). Preferentemente, en el marco de una aplicación en ciencias forenses, se trata de una muestra de sangre, y más particularmente, de una muestra de suero o de plasma extraída sin etapa invasiva a un individuo (humano o animal). También es posible utilizar una muestra de saliva, espermatozoides, cabello u orina. Finalmente, es posible utilizar trazas de contacto (células de piel, por ejemplo).

40 En casos particulares en los que la cantidad de ácidos nucleicos es demasiado baja en la muestra extraída o cuando dichos ácidos nucleicos están contenidos en las células, es posible añadir previamente a la etapa b) una etapa de extracción y/o de purificación y/o de concentración de dichos ácidos nucleicos. Para este fin, se puede utilizar cualquier técnica, conocida por el experto en la técnica (extracción Chelex, papel FTA, extracción en fase sólida basada en columnas de sílice o de bolas magnéticas). Dichas técnicas se describen por ejemplo en Sambrook *et al.* (*Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; 3rd edition, 2001). Por regla general, el método de la invención se puede realizar en una muestra que contiene una pequeña cantidad de ADN (por ejemplo 0,1-0,5 ng de ADN). Cuando se realizan dichas etapas de purificación o de concentración, la muestra biológica que sirve en la etapa b) es evidentemente la que ha sido purificada y/o concentrada.

A esta muestra biológica se añade, en el curso de una segunda etapa, un número adecuado de n-AMC (tantos n-AMC como restos para detectar), así como los reactivos indispensables para generar los amplicones esperados (una polimerasa Taq recombinante, Tris-HCl, dNTPs, MgCl₂, etc.).

5 El método de la invención tiene a continuación una etapa de amplificación c) en el curso de la cual se realiza una reacción de polimerización en cadena (PCR) en las condiciones habitualmente utilizadas por el experto en la técnica (Butler M. *et al.*, *Fundamentals of Forensic DNA typing*, 2009). También se pueden utilizar en esta etapa varias técnicas alternativas a la PCR tradicional. Esta técnicas son, por ejemplo, la SDA (*Strand Displacement Amplification*), la técnica TAS (*Transcription-based Amplification System*), la técnica 3SR (*Self-Sustained Sequence Replication*), la técnica NASBA (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*), la técnica TMA (*Transcription Mediated Amplification*), la técnica LCR (*Ligase Chain Reaction*), la técnica RCR (*Repair Chain Reaction*), la técnica CPR (*Cycling Probe Reaction*), o también la técnica de amplificación de la Q-beta-replicasa. De forma general, es posible utilizar en esta etapa cualquier técnica que finaliza con la amplificación del ácido nucleico diana. El experto en la técnica sabrá identificar qué reactivos se requieren en el medio de reacción, además de los n-AMCs de la invención, para generar los amplicones esperados.

15 A continuación de esta etapa de amplificación, los amplicones producidos se detectan por medio de un sistema de detección de dos dimensiones (por ejemplo, tamaño/color). Preferentemente, este sistema de detección es la electroforesis o la cromatografía. De forma todavía más preferida, el sistema de detección es la electroforesis capilar.

Finalmente, las señales correspondientes a los amplicones marcados se analizan para sacar una conclusión con relación a la presencia o ausencia de restos de interés en la muestra.

20 Esta etapa de análisis se hace preferentemente de forma automática, por ejemplo, mediante un programa informático capaz de reconocer las señales (o los grupos de n picos o los n-ALC) y atribuirles a un fenotipo (según uno de los dos métodos de análisis descritos a continuación).

La presente invención propone dos métodos diferentes para analizar las señales / grupos de n picos / n-ALC obtenidos mediante el método de la invención y en consecuencia sacar una conclusión sobre la presencia del resto de interés.

Primer método de análisis (denominado “de diccionario”):

25 Este primer método de análisis necesita la construcción o la obtención, previamente al análisis, de un “diccionario” o de un “catálogo” que reúna, para cada resto de interés, todos los n-ALC que en teoría son posibles de detectar por medio de los n-AMCs utilizados.

30 En otras palabras, conviene establecer –o adquirir– la lista de todas las combinaciones de señales esperadas para cada n-AMC elegido. Esta lista de n-ALC constituye el diccionario de alelos válidos. Se realiza, por ejemplo, a partir de las listas que se proporcionan tradicionalmente en los kits comerciales (PowerPlex, etc.). Estas combinaciones son fácilmente identificables, para cada resto de interés, una vez que se han elegido los cebadores de referencia y los cebadores modificados, ya que esta elección determina el tamaño del amplicón esperado en presencia del resto de interés frente a su ausencia, así como el marcado esperado para cada tipo de amplicón.

35 Por ejemplo, para detectar los 425 alelos posibles requeridos por la reglamentación estadounidense, dicho diccionario reunirá 425 n-ALCs. Además, para detectar los 552 alelos posibles requeridos por las reglamentaciones europea y estadounidense, dicho diccionario reunirá 552 n-ALCs.

Para obtener la lista de los restos realmente presentes en la muestra, se comparan a continuación todas las combinaciones de n picos detectados para cada n-ALC de la muestra con los n-ALC esperados para estos restos (es decir, los enumerados previamente en la lista). Esta lista de n-ALC constituye el diccionario de alelos válidos.

40 La probabilidad de obtener un n-ALC válido mediante este método es $1-X/C^n_R$, donde X es el número de restos que se van a detectar, R es el número de tamaños diferentes detectables (para todos los colores) y n es el número de parejas de cebadores utilizado para cada resto.

45 En la medida en que cada canal de color puede producir tantos picos como tamaños de cadena posibles (en bp), es posible calcular que, en un sistema tradicional que contiene cinco canales de colores (tal como los propuestos por Global Filer), el número de picos detectables en el electroforegrama es de 1.850.

50 Así, para dicho sistema, $R = 1.850$ y, por lo tanto, será posible generar $C^{1.850}$ n-ALCs. Teniendo todos una probabilidad idéntica de existir en el electroforegrama como señal analógica, la probabilidad de que un n-ALC sea válido/esperado es por lo tanto de $1-425/C^{1.850}$ (sistema estadounidense) o $1-552/C^{1.850}$ (sistemas estadounidense y europeo). En el caso en que se utilicen 3-AMCs, la probabilidad de que una combinación detectada sea un n-ALC válido es de $1-(425/C^{3 \cdot 1.850}) = 1-4,034 \times 10^{-7}$ es decir 99,99996% (sistema estadounidense) o de $1-(552/C^{3 \cdot 1.850})$ es decir 99,99995% (sistemas estadounidense y europeo).

Con este método basado en un “diccionario”, cada combinación válida identificada permite concluir con certitud que el resto de interés estaba presente en la muestra ensayada. Para resumir, se propone aquí un método en el que, para

detectar dicho resto nucleico de interés, se comparan todas las combinaciones de n picos detectados en la muestra para cada n-ALC, con n-ALC esperados contenidos en una lista previamente establecida.

5 En un modo de realización preferido, el kit de la invención contiene además de los elementos definidos anteriormente, un documento que describe el conjunto de los n-ALCs esperados en una muestra (el "catálogo" o el "diccionario" tal como se ha descrito anteriormente), que permitirá identificar a qué restos corresponden los n-ALC detectados.

Segundo método de análisis (denominado "de resto"):

10 El primer método de análisis, descrito anteriormente, permite detectar la presencia de un resto de interés cuya estructura es esperada (por ejemplo, un número de repeticiones dado en el seno de un STRs, que había sido enumerado en el "diccionario"). Sin embargo, en la medida en que el "diccionario" no puede ser exhaustivo en cuanto al conjunto de restos existentes en la naturaleza, puede haber situaciones en las que el resto que se detecta no corresponde a ninguno de los enumerados.

En particular, este primer método no permite identificar la existencia de restos que serían específicos de un individuo y, debido a ello, no enumerados en el "diccionario" (por ejemplo un microvariante raro).

15 La detección de estos restos raros es problemática con los métodos actualmente utilizados en ciencias forenses. En efecto, a veces es difícil saber si son verdaderas microvariantes o si la señal detectada corresponde de hecho a un pico que ha migrado mal.

Para mejorar este punto, la invención propone un segundo método que permite analizar los n-ALCs obtenidos mediante el método de la invención utilizando los n-AMCs, principalmente con el fin de detectar la presencia de los restos raros dentro de una muestra.

20 Este segundo método se basa en el hecho de que cada grupo de n picos forma un n-ALC específico. Cada n-ALC detectado válido corresponde por lo tanto al resto de interés buscado (por ejemplo, para un 3-AMC tal como se ha descrito anteriormente, un n-ALC puede ser: el tamaño T para el color C, el tamaño T+1 para el color C y el tamaño T-1 para el color C-1).

25 De forma general, la probabilidad de obtener un n-ALC válido con este método "de restos" es $1 - ((1/R) * (1/R-1) * \dots * (1/R - (n-1)))$, siendo R el número de tamaños diferentes detectables (para todos los colores) y siendo n el número de parejas de cebadores utilizado para cada resto.

Para un sistema que contiene 1.850 posibilidades de picos en el electroforegrama, la probabilidad de que una combinación detectada corresponda a un n-ALC válido es de $1 - (1 * (1/1.849) * (1/1.848)) = 99,99997\%$.

30 Así, con este segundo método, la presencia de un resto de interés se puede identificar con certeza. También es posible medir el tamaño del resto de interés.

Para resumir, se propone aquí un método en el que, para detectar dicho resto nucleico de interés, se realizan las siguientes etapas:

- a) detección de todos los n-ALC válidos en la muestra ensayada,
- b) atribución de cada n-ALC válido a un resto de interés buscado.

35 La utilización de uno u otro de estos dos métodos de análisis presenta la ventaja de que los picos ligados a artefactos no formarán n-ALC válidos, y por lo tanto no podrán ser confundidos con el resto de interés. Así, cada n-ALC válido detectado (es decir, cada combinación de señales generadas por un n-AMC) permite concluir que el resto de interés está presente en la muestra (método "del diccionario") o que una variante de este resto está presente en la muestra (método "de restos").

40 Hay que señalar que los dos métodos de análisis son acumulables y se pueden realizar de forma sucesiva o concomitante.

Además, se pueden realizar de forma automática.

Más generalmente, el método de la invención se caracteriza por que la etapa de detección y de generación de un perfil genético d) y e), y si es necesario las etapas de amplificación y de puesta en contacto, se realizan de forma automática.

45 En un modo de realización preferido, el kit de la invención contiene n-AMCs con $n > 2$. En efecto, en este caso, cada n-ALC dispone de una región de código que actúa como "código corrector de error", permitiendo la detección del resto de interés incluso si es poco diferenciable del ruido.

Cuando $n > 2$, es posible, en efecto, crear n-ALCs que contienen una combinación única de n-1 elementos ("n-1 ALCs"), que se puede encontrar en la lista de los n-ALC esperados.

Con el método de análisis “de diccionario”, basta con tener n-1 elementos de un n-ALC para identificar un n-ALC (y por lo tanto el resto de interés que le corresponde). La probabilidad de tener una información válida es de $1 - (X/C^{n-1})$, donde X es el número de restos de interés que se quiere detectar, R es el número de tamaños diferentes detectables (para todos los colores) y n es el número de parejas de cebadores utilizado para cada resto. Para un sistema que contiene 1.850 posibilidades de picos en el electroforegrama, la probabilidad de que una combinación corregida (por medio de un código corrector) sea válida es, para el sistema estadounidense, $1 - (425/C^{2 \cdot 1.850}) = 1 - 2,485 \times 10^{-4} = 99,9752\%$, y, para los sistemas estadounidenses y europeos, $1 - (552/C^{2 \cdot 1.850}) = 99,9677\%$.

Con el método de análisis “de restos”, la probabilidad de tener una información válida es de $1 - ((1/R) \cdot (1/R-1) \cdot \dots \cdot (1/R - (n-2)))$ donde R es el número de tamaños diferentes detectables (para todos los colores) y n es el número de parejas de cebadores utilizado para cada resto. Para un sistema que contiene 1.850 posibilidades de picos en el electroforegrama, la probabilidad de que una combinación corregida (por medio de un código corrector) sea válida es de $1 - (1 \cdot (1/1.849))$ es decir 99,946%.

Durante el análisis de las señales obtenidas mediante el método de la invención, la separación señal/ruido se realiza de forma tradicional mediante umbralización a 10σ y detección de la forma del pico. Sin embargo, estos métodos no permiten producir una probabilidad objetiva de la realidad de la información leída. La umbralización a 10σ la podría producir, pero la distribución del ruido no sigue una ley conocida (tipo ley normal) en un electroforegrama. Además, la detección de la forma del pico se basa en descripciones y observaciones empíricas de la forma que debe tener un pico.

En el marco de la presente invención, vista la baja probabilidad de obtener un falso n-ALC, es posible hacer una selección de las señales analizadas bastante por debajo de lo que se hace actualmente (umbralización a 10σ y detección de la forma del pico). En particular, una umbralización a 3σ es suficiente, en el marco de los métodos de la invención, para separar bien la señal del ruido produciendo a la vez más informaciones que los métodos actuales. En efecto, la umbralización a 3σ en lugar de 10σ aporta una aceptación del ruido no significativo con relación a la probabilidad de que un n-ALC sea válido.

Con relación a la umbralización a 3σ , es preferible que se utilice, antes de la lectura de los n-ALC, un filtro anulador de eco en la señal del electroforegrama. El eco buscado corresponde al *stutter* y la formación de hombros en los picos. Los métodos de anulación de eco son conocidos por el experto en la técnica con relación al tratamiento de la señal (telefonía, comunicaciones, redes...). Los métodos que se van a emplear son los más simples: los parámetros del eco son fijos: eco a -1 pb para la formación de hombros en los picos y eco a -4 pb para el *stutter*. También es posible buscar variaciones de frecuencia en los n-ALCs más bien que en los picos (el ruido tiene una frecuencia relativamente constante, que disminuye con la longitud de los ácidos nucleicos. Esto es particularmente preferido cuando los polinucleótidos detectados son de tamaño grande.

La búsqueda de picos y de variaciones de frecuencia son acumulables.

Durante el análisis de las señales obtenidas mediante el método de la invención, existen casos para los que las regiones de n-ALC están recubiertas (total o parcialmente) por otros n-ALC. Esto no es un problema, ya que el método de la invención requiere tomar en consideración todas las combinaciones/restos de n picos encontrados. Solamente los n-ALC válidos se conservarán con las probabilidades asociadas indicadas anteriormente.

Descripción de las figuras

La figura 1 ilustra un ejemplo de electroforegrama que se puede obtener con el kit de PCR de la invención utilizando un 3-AMC en el sentido de la invención (3 cebadores que permiten detectar cada alelo del locus de interés), utilizando 3 colores (C-1, C et C+1). Los trazos continuos representan los picos obtenidos de forma tradicional con los kits comerciales (véase también el electroforegrama obtenido con un “kit clásico”, último panel en la parte inferior de la figura). Los trazos continuos y punteados representan los picos obtenidos utilizando el kit de PCR de la invención (Tx = pico correspondiente a un amplicón de tamaño T para el alelo del locus X, Txb = pico correspondiente al amplicón del segundo alelo del locus X si el individuo es heterocigótico, Tx+1 = pico correspondiente al amplicón de tamaño T+1 pares de bases para el alelo del locus X, Tx-1 = pico correspondiente al amplicón de tamaño T-1 pares de bases para el alelo del locus X). x aquí es un número entero comprendido entre 1 y 6.

La figura 2 ilustra un ejemplo de realización del método de resto descrito en la presente solicitud, utilizando el kit de PCR de la invención con $n = 3$, siendo el resto buscado la combinación: T/C, T+1/C y T-1/C-1. Los dos gráficos representan los electroforegramas obtenidos para el color C-1 (arriba) y C (abajo). El trazo continuo representa el pico obtenido de forma tradicional con un kit comercial (correspondiente a un amplicón de tamaño T), los trazos punteados representan los obtenidos con los marcadores de la invención (que generan amplicones de tamaños T-1 y T+1, para los colores C-1 y C respectivamente).

La figura 3 ilustra un logigrama que representa la técnica de detección de un perfil genético según la presente invención. A partir de una muestra de un individuo que contiene ADN (1), el ADN se extrae con las técnicas tradicionales (2) y luego se pone en contacto con los componentes (dNTPs, cebadores, polimerasa, etc.) del kit de PCR de la invención (3). Se realiza una PCR (4) y luego la muestra que contiene los amplicones se analiza por

electroforesis capilar (5), generando un electroforegrama (6) en el que se reúnen los picos correspondientes a los amplicones marcados (7). El análisis de estos picos se puede realizar bien mediante el método a diccionario (8), o bien mediante el método de resto (9), incluso mediante los dos métodos acumulativamente, de forma que se detecte el perfil genético del individuo (10). Esta detección es más fiable que las técnicas actuales y se puede hacer de forma automática.

5

REIVINDICACIONES

1. Kit para PCR que comprende al menos n parejas de cebadores de PCR (n-AMC) específicos para un mismo resto de interés para identificar en un ácido nucleico, con n igual o superior a 2, hibridándose dichos cebadores en el seno de cada pareja de forma específica a un lado y a otro de dicho resto de interés,

5 caracterizado por que contiene:

- una pareja de cebadores de referencia específica de dicho resto de interés, que lleva un marcador M, y
- al menos una pareja de cebadores modificados específica de dicho resto de interés,

en el que:

- 10 i) al menos uno de los cebadores modificados contiene X base(s) de más o de menos con relación al cebador equivalente en la pareja de cebadores de referencia, siendo X un número entero comprendido entre 1 y 10, o
- ii) los cebadores modificados tienen una región de hibridación en el ácido nucleico de interés desplazada en X bases con relación a la de los cebadores de referencia, siendo X un número entero comprendido entre 1 y 10, y/o
- 15 iii) al menos uno de los cebadores modificados lleva un marcador diferente del o de los marcador(es) que llevan los cebadores de referencia,

de forma que se genere, para cada resto, al menos n amplicones de PCR diferenciables por su tamaño y/o por su marcado, generando así una redundancia de la información que permite codificar dicho resto de interés.

2. Kit para PCR según la reivindicación 1, caracterizado por que X es un número entero comprendido entre 1 y 4.

20 **3.** Kit según una de las reivindicaciones 1 a 2, que contiene:

- una pareja de cebadores de referencia adaptada para amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T (T pares de bases), marcado con marcador M, y
 - una pareja de cebadores modificados adaptada para amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T' diferente de T en uno, dos, tres o cuatro pares de bases de más o de menos, marcado con un marcador M' diferente de M.
- 25

4. Kit según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende al menos n parejas de cebadores n-AMC, siendo n estrictamente superior a 2.

5. Kit según una de las reivindicaciones precedentes, que contiene, para cada resto de interés a identificar en el ácido nucleico, tres parejas de cebadores específicos de dicho resto.

30 **6.** Kit según una de las reivindicaciones precedentes, que contiene una pareja de cebadores de referencia capaz de amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón de tamaño T (T pares de bases), marcado con un marcador M, y al menos otras dos parejas de cebadores elegidas entre:

- una pareja de cebadores modificados adaptada para amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón que tiene un tamaño T' diferente de T en uno, dos, tres o cuatro pares de bases de más o de menos, estando marcado dicho amplicón con un marcador M,
 - una pareja de cebadores modificados adaptada para amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón que tiene un tamaño T, estando marcado dicho amplicón con un marcador M' diferente de M, y
 - una pareja de cebadores modificados adaptada para amplificar específicamente el resto A, produciendo un amplicón que tiene un tamaño T' diferente de T en uno, dos, tres o cuatro pares de bases de más o de menos, estando marcado dicho amplicón con un marcador M' diferente de M.
- 35
- 40

7. Kit según una de las reivindicaciones precedentes, en el que todas las parejas de cebadores están premezcladas en un contenedor único.

45 **8.** Método que permite detectar al menos un resto de ácido nucleico de interés en una muestra biológica, caracterizado por que utiliza un kit según una de las reivindicaciones 1-7 y por que se detecta dicho resto de ácido nucleico de interés cuando se detecta, para dicho resto, al menos un amplicón por pareja de cebadores específicos de dicho resto utilizado.

9. Método según la reivindicación 8, que comprende las siguientes etapas:

- a) poner en contacto una muestra de sangre, saliva, esperma, cabello, orina, suero o plasma que contiene ácidos nucleicos con las parejas de cebadores descritas en las reivindicaciones 1-7 y reactivos necesarios para la amplificación de dichos ácidos nucleicos,
- b) amplificar dichos ácidos nucleicos en las condiciones apropiadas,
- 5 c) detectar los amplicones obtenidos por medio de su tamaño y/o de su marcado, preferentemente por electroforesis capilar,
- d) generar un perfil genético en función de los amplicones detectados en la etapa c).
- 10.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en el que dicho resto de interés es un STR.
- 11.** Método según la reivindicación 8, en el que, para detectar dicho resto nucleico de interés, se comparan todas las combinaciones de n picos detectados en la muestra para cada grupo de n picos obtenidos, con grupos de n picos esperados contenidos en una lista previamente establecida.
- 10 **12.** Método según la reivindicación 8 considerada sola o en combinación con la reivindicación 11, en el que, para detectar dicho resto nucleico de interés, se realizan las siguientes etapas:
- a) detectar todos los grupos de n picos válidos en la muestra ensayada,
- 15 b) atribuir cada grupo de n picos válido a un resto de interés buscado.
- 13.** Método según la reivindicación 9 considerada sola o en combinación con una de las reivindicaciones 10 a 12, caracterizado por que la etapa de detección y la de generación de un perfil genético c) y d) y, si es necesario las etapas de amplificación y de puesta en contacto, se realizan de forma automática.

FIG. 1

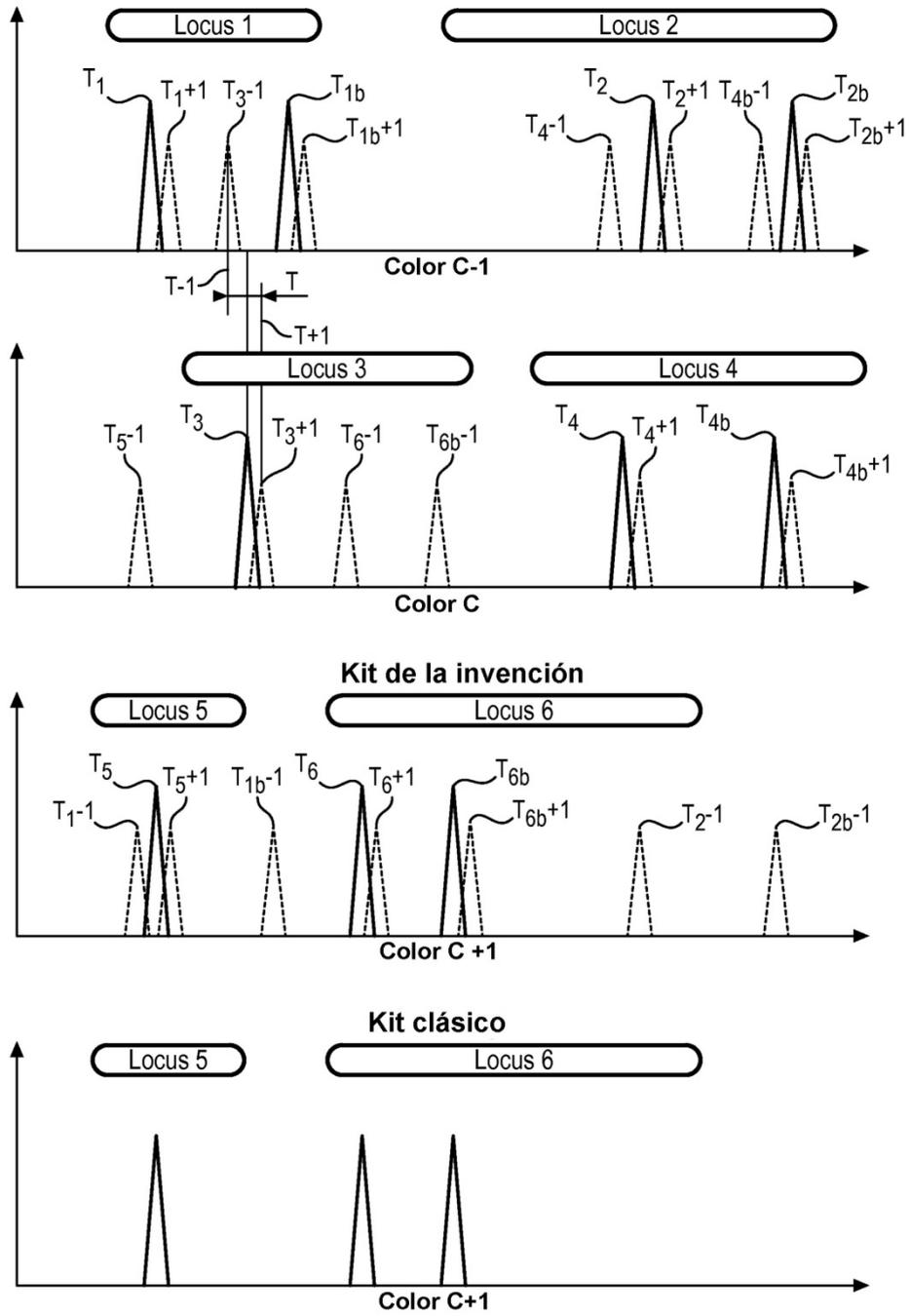


FIG. 2

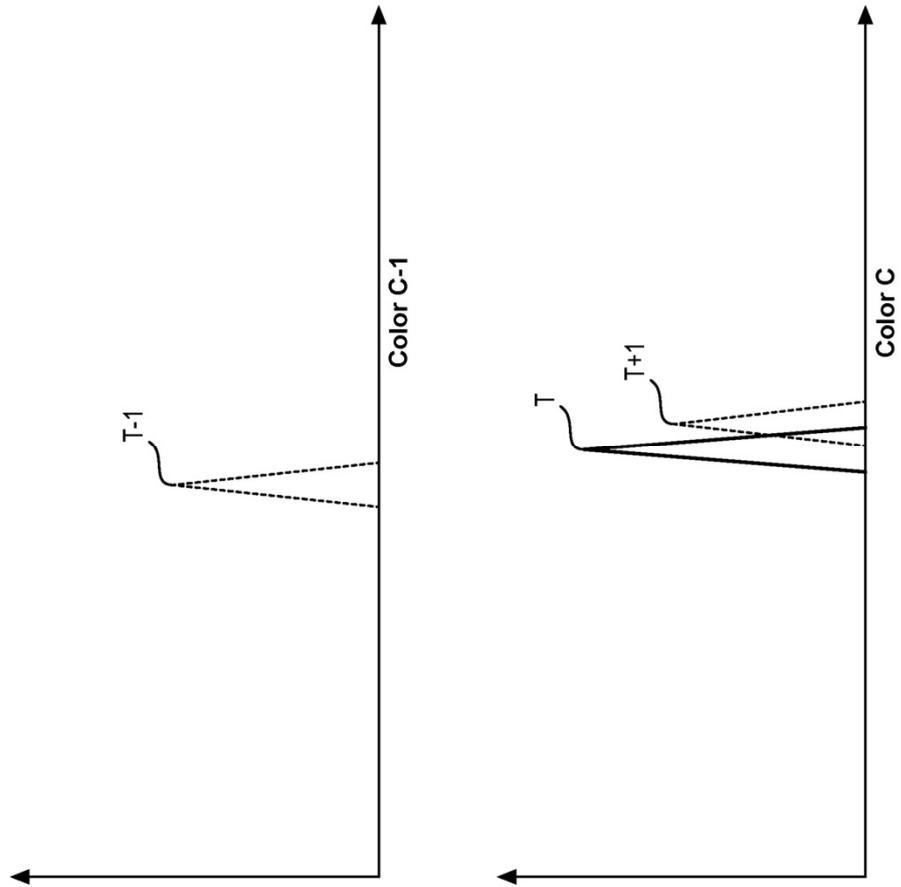


FIG. 3

