

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 782**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/686** (2008.01)

**C12Q 1/6881** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.01.2012 PCT/CN2012/070522**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2013 WO13107005**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2012 E 12865995 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2778235**

54 Título: **Procedimiento de detección por PCR múltiplex para tipos sanguíneos humanos poco comunes y kit**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.05.2020**

73 Titular/es:

**SHANGHAI BLOOD CENTRE (100.0%)  
No.1191 Hongqiao Road, Changning District  
Shanghai 200051, CN**

72 Inventor/es:

**YE, LUYI;  
ZHU, ZIYAN;  
GUO, ZHONGHUI;  
HE, YUNLEI;  
GAO, HUANHUAN;  
WANG, PAN;  
XIE, LI;  
ZHU, AOXUE;  
ZHANG, WEI;  
GAO, WENJIE y  
YANG, QIXIU**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 759 782 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**

Procedimiento de detección por PCR múltiplex para tipos sanguíneos humanos poco comunes y kit

**5 Antecedentes de la presente invención**

**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al campo de la biología molecular, específicamente a un procedimiento de detección de grupos sanguíneos humanos poco comunes, kit, procedimiento de cribado rápido y aplicación.

**Descripción de la técnica relacionada**

15 El antígeno de grupo sanguíneo poco común es un antígeno de grupo sanguíneo cuya frecuencia en el público es inferior a una milésima, y debido a su escasez, en la transfusión de sangre de pacientes de un grupo sanguíneo poco común, es difícil encontrar la fuente de sangre coincidente, lo que resulta en un retraso del tratamiento. Por lo tanto, la detección de grupos sanguíneos poco comunes, el cribado rápido y el establecimiento de un banco de grupos sanguíneos poco comunes son extremadamente importantes.

20 El procedimiento de detección de grupos sanguíneos poco comunes existente incluye principalmente:

1. Procedimientos serológicos

25 (1) El uso de sueros policlonales humanos, el aprovechamiento de la prueba de aglutinación salina o la prueba de antiglobulina indirecta para realizar la detección de grupos sanguíneos poco comunes mediante un procedimiento de tubo, un procedimiento de placa de microtitulación de 96 pocillos en forma de U o un procedimiento en gel.

30 (2) El uso de reactivos de anticuerpos monoclonales o policlonales de origen animal (principalmente murinos) de tipo IgM o tipo IgG, el aprovechamiento de la prueba de aglutinación salina o la prueba de antiglobulina indirecta para realizar la detección de grupos sanguíneos poco comunes por un procedimiento de tubo, un procedimiento de placa de microtitulación de 96 pocillos en forma de U o un procedimiento en gel.

35 (3) Para el fenotipo especial Jk(a-b-), se puede utilizar un procedimiento con urea. Los glóbulos rojos (RBC) de fenotipo Jk(a-b-) pueden mantener la integridad de la membrana durante 30 minutos en una solución de urea 2 M, y si el fenotipo Jk(a-b-) se juzga de acuerdo con si un RBC de un sujeto sufre hemólisis en la solución de urea 2 M después de 10 minutos.

2. Procedimientos de biología molecular: diseño con base en los SNP del antígeno de RBC

40 (1) Genotipado de rendimiento medio y bajo: incluyendo PCR-RFLP, PCR-SSP, PCR cuantitativa en tiempo real y técnicas de pirosecuenciación.

(2) Genotipado de alto rendimiento: incluyendo las técnicas comerciales o no comerciales Beadchip, BloodChip, GenomeLab SNPstream, Luminex xMAP y de hibridación en fase sólida.

45 3. Revisión: las muestras de grupos sanguíneos poco comunes obtenidos a través del cribado con los dos procedimientos anteriores generalmente deben revisarse a través de procedimientos serológicos tales como la prueba de aglutinación salina o la prueba de antiglobulina indirecta.

El procedimiento de detección de grupos sanguíneos poco comunes existente tiene los siguientes problemas:

50 1) Procedimientos serológicos: es difícil para la mayoría de los antígenos de los grupos sanguíneos poco comunes de RBC obtener anticuerpos humanos o reactivos de detección comercializados, o dado que el precio del reactivo es demasiado alto y el cribado es costoso, es difícil lograr un cribado de alto rendimiento a gran escala.

55 2) Procedimientos de biología molecular: los procedimientos de genotipado de medio y bajo rendimiento a menudo requieren mucho tiempo y, por lo tanto, es difícil lograr un cribado de alto rendimiento a gran escala. Los procedimientos de genotipado de alto rendimiento existentes son costosos. Y los procedimientos de genotipado existentes detectan una sola muestra, y los costos de detección indudablemente aumentarán.

60 Por lo tanto, encontrar un procedimiento de detección y cribado de grupos sanguíneos poco comunes rápido, económico y eficiente es de gran importancia práctica.

**Sumario de la presente invención**

65 La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, describe un procedimiento y un kit de cribado de detección de grupos sanguíneos humanos poco comunes, que aplica un diseño especial de cebadores con un procedimiento de PCR múltiplex, y logra un cribado eficaz de grupos sanguíneos humanos poco comunes.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento de detección por PCR múltiplex de grupos sanguíneos humanos poco comunes, tomando una plantilla de ADN extraída de muestras de sangre como muestra para analizar, usando pares múltiples de cebadores específicos para la amplificación de PCR múltiplex, y detectar resultados de amplificación a través de electroforesis; en el que los cebadores específicos son cebadores específicos para loci de SNP de antígeno de grupo sanguíneo poco común en genes que codifican antígeno de superficie de células sanguíneas; y un resultado de electroforesis del procedimiento de detección por PCR múltiplex es que se puede detectar positivo.

El procedimiento de detección por PCR múltiplex de acuerdo con la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas incluye pares múltiples de cebadores específicos, cada par de cebadores específicos se dirigen a un antígeno de superficie de un grupo sanguíneo poco común y fragmentos de genes de antígeno de superficie de células sanguíneas que contienen los loci de SNP de antígeno de grupo sanguíneo poco común se amplifican.

Preferiblemente, una secuencia de los pares múltiples de cebadores específicos es SEQ ID NO: 1-6, SEQ ID NO: 7-12 o SEQ ID NO: 13-16.

Ese positivo que es detectable en la presente invención significa: plantillas de ADN de muestras de sangre de grupos sanguíneos poco comunes, o plantillas de ADN de muestras de sangre de grupos sanguíneos heterocigotos no poco comunes que contienen loci de SNP de antígeno de grupos sanguíneos poco comunes podrían identificarse por especificidad de cebadores diseñados por la presente invención, y se amplifican a gran escala a través de un procedimiento de PCR, es positivo si la electroforesis muestra que emerge una banda en una ubicación correspondiente a un grupo sanguíneo poco común; mientras que las plantillas de ADN de las muestras de sangre homocigotas de grupos sanguíneos no comunes no pudieron ser identificadas por cebadores y amplificadas, y la electroforesis muestra que surge una banda de grupo sanguíneo no poco común. Es decir, es positivo en presencia de una banda.

Relativamente, ese negativo que es detectable significa: las plantillas de ADN de muestras de grupos sanguíneos homocigotas o heterocigotas no poco comunes (grupo sanguíneo común) podrían identificarse mediante cebadores específicos diseñados correspondientemente, y se amplifican a gran escala mediante un procedimiento de PCR, es negativo si la electroforesis muestra que una banda emerge en un lugar correspondiente a un grupo sanguíneo no poco común; mientras que las plantillas de ADN de muestras de sangre de grupos sanguíneos poco comunes no pudieron identificarse por cebadores y amplificarse (el genotipo de grupo sanguíneo poco común es homocigoto), y es positivo si la electroforesis muestra que no surge una banda de grupo sanguíneo poco común. Es decir, es negativo en presencia de una banda.

Preferiblemente, el procedimiento de detección por PCR múltiplex de grupos sanguíneos humanos poco comunes incluye específicamente:

1) preparar una muestra para analizar: recolectar muestras de sangre y extraer plantillas de ADN como muestra para analizar;

2) preparar un sistema de reacción de PCR múltiplex: el sistema de reacción de PCR múltiplex incluye pares múltiples de cebadores específicos, solución tampón de PCR, dNTP, enzima Taq y ddH<sub>2</sub>O, y las secuencias de los pares múltiples de cebadores específicos son las SEQ ID NOs: 1-6, SEQ ID NOs: 7-12 o SEQ ID NOs: 13-16;

3) agregar la muestra a analizar preparada en la etapa 1) al sistema de reacción de PCR múltiplex preparado en la etapa 2), para obtener una solución de reacción de PCR;

4) realizar la reacción de amplificación en la solución de reacción de PCR en la etapa 3) de acuerdo con un procedimiento de amplificación de PCR múltiplex;

5) realizar electroforesis en productos de amplificación obtenidos a partir de la reacción de amplificación en la etapa 4) en gel de agarosa, y observar los resultados a través de un formador de imágenes en gel; y

6) juzgar un resultado de detección: si la electroforesis muestra la aparición de una banda, el resultado de detección de un grupo sanguíneo poco común es positivo; y si la electroforesis no muestra banda, el resultado de detección del grupo sanguíneo poco común es negativo.

Preferiblemente, en el sistema de reacción de PCR múltiplex en la etapa 2), el sistema de reacción de PCR múltiplex con secuencias de cebador de las SEQ ID NOs: 1-6 es un sistema Yt-K-Kpc que se usa en la detección de tres grupos sanguíneos poco comunes: Yt(b+), K y Kp(c+); el sistema de reacción de PCR múltiplex con secuencias de cebadores de las SEQ ID NOs: 7-12 es un sistema Dia-OK-Cob que se utiliza en la detección de tres grupos sanguíneos poco comunes: Di(a+), OK(a-) y Co(b+); y el sistema de reacción de PCR múltiplex con las secuencias de cebadores de las SEQ ID NOs: 13-16 es un sistema Fyb-S que se usa en la detección de dos grupos sanguíneos poco comunes: Fy(b+) y S.

## ES 2 759 782 T3

Preferiblemente, el procedimiento de detección por PCR múltiplex de grupos sanguíneos humanos poco comunes incluye específicamente:

- 5 1) preparar una muestra para analizar: recolectar muestras de sangre y extraer plantillas de ADN como muestra para analizar;
- 10 2) preparar un sistema de reacción de PCR múltiplex: el sistema de reacción de PCR múltiplex incluye pares múltiples de cebadores específicos, solución tampón de PCR, dNTP, enzima Taq y ddH<sub>2</sub>O, y las secuencias de los pares múltiples de cebadores específicos son las SEQ ID NOs: 1-6, SEQ ID NOs: 7-12 o SEQ ID NOs: 13-16;
- 15 3) agregar la muestra a analizar preparada en la etapa 1) y un control positivo incorporado al sistema de reacción de PCR múltiplex separado preparado en la etapa 2), para obtener soluciones de reacción de PCR;
- 4) realizar una reacción de amplificación en las soluciones de reacción de PCR en la etapa 3) de acuerdo con un procedimiento de amplificación de PCR múltiplex;
- 20 5) realizar electroforesis en productos de amplificación obtenidos de la reacción de amplificación en la etapa 4) en gel de agarosa, y observar los resultados a través de un formador de imágenes en gel; y
- 6) juzgar un resultado de detección: si la electroforesis muestra que una banda emerge en una ubicación correspondiente a una banda de amplificación de control positivo, el resultado de detección de un grupo sanguíneo poco común es positivo; y si la electroforesis muestra que no surge una banda en la ubicación correspondiente a la banda de amplificación de control positivo, el resultado de detección del grupo sanguíneo poco común es negativo.
- 25 Más preferiblemente, el control positivo es un plásmido que contiene un fragmento de gen de loci de SNP del grupo sanguíneo poco común, y el control positivo puede ser amplificado por un par de cebadores específicos en los pares múltiples de cebadores específicos con una secuencia de las SEQ ID NOs: 1-16.

Preferiblemente, el sistema de reacción de PCR múltiplex en la etapa 2) incluye además cebadores de control interno; y juzgar un resultado de detección en la etapa 6) es: si la electroforesis muestra una banda de grupo sanguíneo poco común y emerge una banda de control interno, el resultado de detección de un grupo sanguíneo poco común es positivo; si la electroforesis muestra que solo emerge una banda de control interno, el resultado de detección del grupo sanguíneo poco común es negativo; y si la electroforesis no muestra banda, la detección falla.

35 La banda del grupo sanguíneo poco común es: la banda en una ubicación correspondiente al tamaño de la amplificación del grupo sanguíneo poco común produce fragmentos después de que la muestra del grupo sanguíneo poco común se amplifica mediante un cebador específico correspondiente. La banda de control interno es: la banda en una ubicación correspondiente al tamaño de los fragmentos del producto de amplificación de control interno después de que la muestra de sangre a analizar se amplifica mediante un cebador de control interno correspondiente.

45 Más preferiblemente, para el sistema de reacción de PCR múltiplex con las secuencias de cebador específicas de las SEQ ID NO: 1-6, las secuencias de los cebadores de control interno de las mismas son las SEQ ID NOs: 17-18; para el sistema de reacción de PCR múltiplex con la secuencia del cebador específico de las SEQ ID NOs: 7-12, las secuencias de los cebadores de control interno de los mismos son las SEQ ID NOs: 19-20; y para el sistema de reacción de PCR múltiplex con la secuencia de cebador específica de las SEQ ID NOs: 13-16, las secuencias de los cebadores de control interno de los mismos son las SEQ ID NOs: 21-22.

50 Más preferiblemente, las secuencias del cebador del sistema Yt-K-Kpc, el sistema Dia-OK-Cob y el sistema Fyb-S son las siguientes:

Sistema del grupo sanguíneo poco común	Nombre del cebador	Secuencia	Producto de amplificación (pb)	Loci de SNP
	Yt-sm4	TCATCAACGCGGGAGACTTAA (SEQ ID NO:1)	636	Yt <sup>b</sup>
Sistema del grupo Yt-K-Kpc	Yt-as	CACGGGGCACACGACATT (SEQ ID NO:2)		
	K-sm5	CTTCCTTAACTTTAACCGCAT (SEQ ID NO:3)	204	K
	K-as	CCCAACCTGCAACCTTCCTC (SEQ ID NO:4)		
	Kpc-sm2	TGTCAATCTCCATCACTTCAA (SEQ ID NO:5)	462	Kp <sup>c</sup>

ES 2 759 782 T3

(continuación)

Sistema del grupo sanguíneo poco común	Nombre del cebador	Secuencia	Producto de amplificación (pb)	Loci de SNP
	Kpc-as	TCCTCCACCAGTTGTGACAT (SEQ ID NO:6)		
	Bactina-s	TTCCCTCCTCAGATCATTGCT (SEQ ID NO:17)	320	Beta-actina (Referencia)
	Bactina-as	TCACCTTCACCGTTCCAGTTT (SEQ ID NO:18)		
	dia-sm4h	GTGGGTGGTGAAGTCCAATCT (SEQ ID NO:7)	645	D <sup>β</sup>
Sistema del grupo Dia-OK-Cob	dia-as	AGAGGGTCTGGCTGTCTTCAA (SEQ ID NO:8)		
	OK-sm8h	TACTCCTGCGTCTTCCCTCAAACA (SEQ ID NO:9)	292	OK 274A
	OK-as	CTCCCCCTCGTTGATGTGTTC (SEQ ID NO:10)		
	Co-smh	GGTGGGAACAACCAGAGCGT (SEQ ID NO:11)	395	Co <sup>b</sup>
	Co-ash	CCTCCAGCAACCTCTTGCCTCTC (SEQ ID NO:12)	ID	
	Beta-actina F	CGGCATCGTCACCAACTG (SEQ ID NO:19)	508	Beta-actina (Referencia)
	Beta-actina R	TGCAAAGAACACGGCTAAG (SEQ ID NO:20)		
	FYBS	CTTCCCAGATGGAGACTATCA (SEQ ID NO:13)	558	Fy <sup>b</sup>
Sistema del grupo Fyb-S	FYBAS	AACAAGACAAAGATGGCAAGA (SEQ ID NO: 14)		
	S-s	TGATAGCCGCATGACCCTTCT (SEQ ID NO:15)	442	S
	S-asm	ACGATGGACAAGTTGTCCGA (SEQ ID NO:16)		
	Bactina-S2	CTCTGCCTGACATGAGGGTTA (SEQ ID NO:21)	675	Beta-actina (Referencia)
	Bactina-AS	TCACCTTCACCGTTCCAGTTT (SEQ ID NO:22)		

Nota: Las partes subrayadas representan los loci de SNP específicos que se detectarán, y las cajas representan la base de discrepancia introducida en el diseño de los cebadores.

Preferiblemente, la cantidad de componentes del sistema Yt-K-Kpc, el sistema Dia-OK-Cob y el sistema Fyb-S pueden referirse al sistema de PCR múltiple convencional. Más preferiblemente, se usa la versión TaKaRa Taq<sup>MR</sup> Hot Start, Cat. # R007A/B (suministrada con el tampón 10× PCR (más Mg<sup>2+</sup>) y la mezcla de dNTP), que es específicamente como sigue:

5

(1) sistema Yt-K-Kpc

Nombre	Cantidad (µl/25 µl)
Plantilla de ADN	4
Tampón	2,5
dNTP	2
Yt-sm4	1,75
Yt-as	1,75
K-sm5	1
K-as	1

(continuación)

Nombre	Cantidad ( $\mu\text{l}/25 \mu\text{l}$ )
Kpc-sm2	1
Kpc-as	1
Bactina-s	0,2
Bactina-as	0,2
Tap-HS	0,125
H <sub>2</sub> O	8,475

(2) el sistema Dia-OK-Cob

Nombre	Cantidad ( $\mu\text{l}/25 \mu\text{l}$ )
Plantilla de ADN	4
Tampón	2,5
dNTP	2
dia-sm4h	1,75
dia-as	1,75
OK-sm8h	1
OK-as	1
Co-smh	1
Co-ash	1
Beta-actina F	0,2
Beta-actina R	0,2
Tap-HS	0,125
H <sub>2</sub> O	8,475

5

(3) el sistema Fyb-S

Nombre	Cantidad ( $\mu\text{l}/25 \mu\text{l}$ )
Plantilla de ADN	4
Tampón	2,5
dNTP	2
FYB-s	0,75
FYB-as	0,75
S-asm	1
S-s	1
Bactina-S2	0,2
Bactina-as	0,2
Tap-HS	0,125
H <sub>2</sub> O	12,475

10 Preferiblemente, el procedimiento de amplificación por PCR múltiple del sistema Yt-K-Kpc, el sistema Dia-OK-Cob y El sistema Fyb-S es el siguiente:

(1) sistema Yt-K-Kpc

Fase	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	5 min	1
Segunda fase	1	94	30 s	
	2	61	30 s	5
	3	72	45 s	
Tercera fase	1	94	30 s	
	2	58	30 s	30
	3	72	45 s	
Cuarta fase	1	72	7 min	1

## (2) Sistema Dia-OK-Cob

Fase	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	5 min	1
Segunda fase	1	94	30 s	
	2	60	30 s	35
	3	72	45 s	
Tercera fase	1	72	7 min	1

## 5 (3) Sistema Fyb-S

Fase	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	5 min	1
Segunda fase	1	94	30 s	
	2	58	30 s	35
	3	72	45 s	
Tercera fase	1	72	7 min	1

Preferiblemente, en la etapa 5), el porcentaje en peso de la agarosa utilizada en la electroforesis es un gel de agarosa al 2%.

10 Análisis de los resultados de la detección: los resultados se juzgan de acuerdo con la presencia o ausencia y el tamaño del producto de PCR, si el resultado de la imagen en el gel de la muestra, muestra que una banda emerge en una ubicación correspondiente al tamaño de un cierto producto de amplificación de PCR del grupo sanguíneo no común, o una ubicación correspondiente al producto de amplificación del control positivo, el resultado de detección del grupo sanguíneo poco común de la muestra es positivo, e indica que la muestra de sangre puede ser un grupo sanguíneo poco común o heterocigoto que tiene loci de SNP del grupo sanguíneo poco común, que se verifica además mediante procedimientos de biología molecular o procedimientos serológicos; si el resultado de la imagen en gel de la muestra, muestra que no surge una banda en una ubicación correspondiente al tamaño de un determinado producto de amplificación por PCR de un grupo sanguíneo poco común, o en una ubicación correspondiente al producto de amplificación de control positivo, indica que el resultado de detección del grupo sanguíneo poco común de la muestra es negativa, es decir, la muestra de sangre no pertenece a ninguno de los grupos sanguíneos Yt(b+), K, Kp(c+), Di(a+), Ok(a-), Co(b+), Fy(b+) y S.

25 Un segundo aspecto de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, describe un kit de detección por PCR múltiplex de sangre poco común, para usar en un procedimiento para cribar un grupo sanguíneo humano poco común como se describió anteriormente en el presente documento, en el que el kit incluye pares múltiples de cebadores específicos y las secuencias de los pares múltiples de cebadores específicos son las SEQ ID NOs: 1-6 y/o SEQ ID NOs: 7-12 y/o SEQ ID NOs: 13-16.

30 El kit de detección por PCR múltiplex de sangre poco común permite la detección de un sistema Yt-K-Kpc y/o un sistema Dia-OK-Cob y/o un sistema Fyb-S. Preferiblemente, el kit incluye además uno o más de una solución tampón de PCR, dNTP, enzima Taq y ddH<sub>2</sub>O.

5 Preferiblemente, el kit incluye además cebadores de control interno, y si las secuencias de los pares múltiplex de cebadores específicos son las SEQ ID NOs: 1-6, las secuencias de cebadores de control interno correspondientes de los mismos son las SEQ ID NOs: 17-18; si las secuencias de los pares múltiplex de cebadores específicos son las SEQ ID NOs: 7-12, las secuencias de cebadores de control interno correspondientes de los mismos son las SEQ ID NOs: 19-20; y si las secuencias de los pares múltiplex de cebadores específicos son las SEQ ID NOs: 13-16, las secuencias de cebadores de control interno correspondientes de los mismos son las SEQ ID NOs: 21-22.

10 Preferiblemente, el kit incluye además un control positivo. El control positivo es el plásmido que contiene un fragmento del gen del loci de SNP del grupo sanguíneo poco común, y el control positivo puede ser amplificado por un par de cebadores específicos en los pares múltiples de cebadores específicos con secuencias de las SEQ ID NOs: 1-16.

15 La presente divulgación proporciona un procedimiento de cribado rápido de grupos sanguíneos poco comunes, que detecta múltiples muestras de sangre en un solo tubo de PCR bajo un procedimiento de PCR sobre la base del procedimiento de detección por PCR múltiplex de la presente divulgación.

20 El cribado eficaz de grupos sanguíneos poco comunes se logra mediante una combinación de un procedimiento de PCR múltiplex y un esquema de detección por grupos.

25 El principio de diseño de que el procedimiento de cribado de grupos sanguíneos poco comunes de la presente invención combina el procedimiento de PCR múltiplex con el esquema de detección por grupos es el siguiente: el procedimiento de PCR múltiplex puede amplificar secuencias específicas de antígenos de grupos sanguíneos poco comunes a través de cebadores específicos de los mismos, para juzgar si se incluyen los loci de SNP de cierto grupo sanguíneo poco común observando si emerge una banda en la formación de imágenes en gel; el esquema de detección por grupos puede mezclar un cierto número de muestras de sangre para la detección, si el resultado de la detección por PCR múltiplex de muestras mixtas muestra que la detección del loci de SNP de antígeno de grupo sanguíneo poco común es positiva, resuelva el grupo, para realizar la detección por PCR múltiplex respectivamente, y luego continúa resolviendo el grupo cuyo resultado de detección es positivo, hasta que se haya determinado la muestra positiva original; finalmente, verifica las muestras detectadas que contienen loci de SNP de grupos sanguíneos poco comunes a través de PCR-SSP o procedimientos de secuenciación o serología.

Preferiblemente, el procedimiento de cribado de grupos sanguíneos poco comunes incluye específicamente:

35 A. preparar una muestra para analizar: construir un grupo con muestras de sangre múltiplex, extraer respectivamente las plantillas de ADN de las muestras de sangre que forman el grupo y mezclar las plantillas de ADN para obtener una muestra para analizar del grupo;

40 B. cribar el grupo positivo: utilizando las etapas 2) a 6) de dicho procedimiento de detección por PCR múltiplex de acuerdo con la presente invención, para realizar la detección por PCR múltiplex en la muestra a analizar del grupo obtenido en la etapa A, y cribar el grupo cuyo resultado de detección es positivo;

C. la detección y resolución del grupo positivo se selecciona de cualquiera de los siguientes:

45 a) si el número de muestras de sangre en el grupo cuyo resultado de detección es positivo es menor o igual a 5, tomar las plantillas de ADN de las muestras de sangre en el grupo como una muestra para analizar, respectivamente, utilizando las etapas 2) a 6) del procedimiento de detección por PCR múltiplex de acuerdo con la presente invención para realizar la detección por PCR múltiplex y cribar muestras de sangre cuyo resultado de detección es positivo;

50 b) si el número de muestras de sangre en el grupo cuyo resultado de detección es positivo es mayor que 5, se resuelven las muestras de sangre del grupo cribado en la etapa B cuyo resultado de detección es positivo, para formar dos nuevos grupos, mezclando respectivamente plantillas de ADN de las muestras de sangre de los dos grupos, para obtener muestras para analizar de los dos grupos, y usar la etapa 2) a la etapa 6) del procedimiento de detección por PCR múltiplex de acuerdo con la presente invención para realizar la detección por PCR múltiplex, para cribar el grupo cuyo resultado de detección es positivo; y

55 D. repetir la etapa C.

60 Preferiblemente, las muestras de sangre múltiplex de acuerdo con la presente invención significan que el número de muestras de sangre es 2-12. Más preferiblemente, las muestras de sangre múltiplex significan que el número de muestras de sangre es 5-12. Más preferiblemente, las muestras de sangre múltiplex significan que el número de muestras de sangre es 5.

65 El procedimiento de cribado realiza la detección después de hacer muestras de sangre múltiplex formando un grupo, y si el resultado de PCR múltiplex no es positivo, todas las muestras de sangre que forman el grupo no pertenecen al grupo sanguíneo poco común; si el resultado de la PCR múltiplex es positivo, al menos una muestra de sangre en las muestras que forman el grupo contiene loci de SNP del grupo sanguíneo poco común. Por lo tanto, la detección de grupos sanguíneos poco comunes se realiza continuamente en el grupo cuyo resultado de detección es positivo:

cuando el número de muestras de sangre del grupo positivo es mayor (mayor que 5), se resuelve el grupo y se realiza la detección respectivamente, hasta que el número de muestras de sangre del grupo positivo sea menor o igual a 5, se toman plantillas de ADN de las muestras de sangre que forman el grupo como muestras a analizar para realizar una reacción de PCR múltiplex, para cribar muestras de sangre cuya detección de sangre sea positiva; cuando el número de muestras de sangre del grupo positivo es menor (menor o igual a 5), las plantillas de ADN de las muestras de sangre en el grupo se pueden tomar como muestras para analizar, respectivamente, para realizar una reacción de PCR múltiplex, para cribar muestras de sangre cuya detección de sangre es positiva. Finalmente, se confirman las muestras de sangre que son positivas a través de procedimientos biológicos, procedimientos serológicos o secuenciación.

Los efectos beneficiosos de la presente invención tal como se definen en las reivindicaciones adjuntas son los siguientes: el grupo sanguíneo poco común es causado por el polimorfismo de los loci de SNP del antígeno de superficie de las células sanguíneas y, por lo tanto, como los cebadores utilizados en la detección de grupos sanguíneos poco comunes en la técnica anterior están diseñados con respecto a los loci de SNP de antígenos de alta frecuencia (antígenos de grupos sanguíneos comunes), los resultados negativos son detectables en la técnica anterior (las muestras de grupos sanguíneos no poco comunes tienen bandas en una ubicación correspondiente en el gel mediante amplificación por PCR y pruebas de imágenes en gel; mientras que el grupo sanguíneo poco común no tiene bandas); la presente invención aprovecha el diseño especial de cebadores que amplifican alelos que contienen loci de SNP de antígeno de baja frecuencia (antígeno de grupo sanguíneo poco común) o alelos que contienen loci de SNP de fenotipo de supresión de antígeno de alta frecuencia para que la detección del grupo sanguíneo poco común sea positiva y sea detectable, de modo que el procedimiento de PCR múltiplex se puede combinar con el esquema de detección de grupo: por un lado, la PCR múltiplex puede realizar la tipificación en genes de antígenos diana múltiplex en la misma reacción PCR al mismo tiempo a través de pares de cebadores múltiplex con respecto a diferentes loci de SNP de grupos sanguíneos poco comunes, se obtiene más información en una sola reacción, el procedimiento de PCR tiene buena repetición, alta sensibilidad y fuerte especificidad, que puede formar reactivos de detección comerciales, y es más rentable; por otro lado, el defecto de que el procedimiento de detección existente solo detecta una muestra de sangre a la vez, y es ineficiente y consume mucho tiempo se supera mediante el esquema de detección de mezclar múltiples muestras de sangre en un grupo de detección de grupo, que puede detectar múltiples muestras de sangre, y mejora la eficiencia de detección. Además, la presente invención supera el problema de que las muestras de sangre tienen demasiados fragmentos para analizar e interfieren con la PCR múltiplex mediante el diseño de cebadores no coincidentes y la optimización de diferentes cebadores en combinaciones, que pueden realizar un cribado de alta sensibilidad y fuerte especificidad en el grupo sanguíneo poco común. Por lo tanto, el procedimiento de detección de la presente invención combina las ventajas del procedimiento de PCR múltiplex y el esquema de detección de grupo, que tiene un efecto multiplicador, mejora en gran medida la eficiencia de detección del grupo sanguíneo poco común, mejora la sensibilidad y especificidad de detección, acorta el tiempo que se dedicará a la detección, reduce los costos de detección y tiene una gran importancia práctica.

#### Breve descripción de los dibujos

Fig. 1: ilustra los resultados de imágenes en gel de los productos de amplificación de un sistema Yt-K-Kpc.  
 Fig. 2: ilustra los resultados de imágenes en gel de los productos de amplificación de un sistema Dia-OK-Cob.  
 Fig. 3: ilustra los resultados de imágenes en gel de los productos de amplificación de un sistema Fyb-S.  
 Fig. 4: ilustra los resultados de imágenes en gel de un experimento de dilución del plásmido Yt.  
 Fig. 5: ilustra los resultados de imágenes en gel de un experimento de dilución del plásmido K.  
 Fig. 6: ilustra los resultados de imágenes en gel de un experimento de dilución del plásmido Kpc.  
 Fig. 7: ilustra los resultados de imágenes en gel de un experimento de dilución del plásmido Dia.  
 Fig. 8: ilustra los resultados de imágenes en gel de un experimento de dilución del plásmido OK.  
 Fig. 9: ilustra los resultados de imágenes en gel de un experimento de dilución de plásmido Cob.  
 Fig. 10: ilustra los resultados de imágenes en gel de un experimento de dilución del plásmido Fyb.  
 Fig. 11: ilustra los resultados de imágenes en gel de un experimento de dilución del plásmido S.

#### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Las siguientes son realizaciones específicas de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Realización 1: Construcción del cebador

Principio de diseño del cebador: se diseñan las bases terminales del cebador 3' de PCR-SSP para apuntar a un locus específico de alelo de antígeno de grupo sanguíneo poco común (un locus de amplificación en la literatura es un locus específico de alelo de antígeno normal), e introducir una pequeña cantidad de desajuste en cebadores específicos.

I. Las secuencias a las que se refiere el diseño del cebador son las siguientes:

Sistema Yt-K-Kpc:

- 5 acetilcolinesterasa de Homo sapiens (ACHE), RefSeqGene en el cromosoma 7 (Secuencia de referencia del NCBI: NG\_007474.1)  
 Grupo sanguíneo Kell de Homo sapiens, metaloendopeptidasa (KEL), RefSeqGene en el cromosoma 7 (Secuencia de referencia del NCBI: NG\_007492.1)

Sistema Dia-OK-Cob:

- 10 Familia 4 de portadores de solutos de Homo sapiens, intercambiador de aniones, miembro 1 (banda 3 de proteína de membrana de eritrocitos, grupo sanguíneo Diego) (SLC4A1), RefSeqGene en el cromosoma 17 (Secuencia de referencia del NCBI: NG\_007498.1)  
 Basigin de Homo sapiens (grupo sanguíneo OK) (BSG), RefSeqGene en el cromosoma 19 (Secuencia de referencia del NCBI: NG\_007468.1)  
 15 Acuaporina 1 de Homo sapiens (grupo sanguíneo Colton) (AQP1), RefSeqGene en el cromosoma 7 (Secuencia de referencia del NCBI: NG\_007475.1)

Sistema Fyb-S:

- 20 Grupo sanguíneo Duffy de Homo Sapiens, receptor de quimioquina (DARC), RefSeqGene en el cromosoma 1 (Secuencia de referencia del NCBI: NG\_011626.1)  
 Glicoforina B de Homo sapiens (grupo sanguíneo MNS) (GYPB), RefSeqGene en el cromosoma 4 (Secuencia de referencia del NCBI: NG\_007483.2)  
 25 Los cebadores se sintetizan con un procedimiento convencional.

II. Un sistema de reacción de PCR múltiplex Yt-K-Kpc es específicamente como sigue:  
 (1) secuencia de cebador de PCR

Nombre del cebador	Secuencia	Tamaño del producto de amplificación (pb)	Loci de SNP
Yt-sm4	TCATCAACGCGGGAGACTTAA (SEQ ID NO:1)	636	Yt <sup>b</sup>
Yt-as	CACGGGGCACACGACATT (SEQ ID NO:2)		
K-sm5	CTTCCTTAACTTTAACCGCAT (SEQ ID NO:3)	204	K
K-as	CCCAACCTGCAACCTTCCTC (SEQ ID NO:4)		
Kpc-sm2	TGTCAATCTCCATCACTCAA (SEQ ID NO:5)	462	Kp <sup>c</sup>
Kpc-as	TCCTCCACCAGTTGTGACAT (SEQ ID NO:6)		
Bactina-s	TTCCCTCCTCAGATCATTGCT (SEQ ID NO:17)	320	Beta-actina
Bactina-as	TCACCTTACCGTTCCAGTTT (SEQ ID NO:18)		(referencia)

- 30 (2) Composición del sistema  
 El sistema de PCR múltiplex en la presente invención usa la versión TaKaRa Taq<sup>MR</sup> Hot Start, Cat. # R007A/B (suministrada con tampón de PCR 10X (más Mg<sup>2+</sup>) y mezcla dNTP), el volumen total del sistema es 25 µl, y la  
 35 composición del sistema es específicamente como sigue:

Nombre	Volumen (µl)
Plantilla de ADN	4
Tampón	2,5
dNTP	2
Yt-sm4	1,75
Yt-as	1,75
K-sm5	1
K-as	1

(continuación)

Nombre	Volumen (µl)
Kpc-sm2	1
Kpc-as	1
Bactina-s	0,2
Bactina-as	0,2
Tap-HS	0,125
H <sub>2</sub> O	8,475

(3) Procedimiento de amplificación por PCR:

Fase	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	5 min	1
	2	94	30 s	
Segunda fase	2	61	30 s	5
	3	72	45 s	
	3	72	45 s	
Tercera fase	1	94	30 s	30
	2	58	30 s	
	3	72	45 s	
Cuarta fase	1	72	7 min	1

5 III. Un sistema de reacción de PCR múltiplex Dia-OK-Cob es específicamente como sigue:

(1) secuencia de cebador de PCR

Nombre del cebador	Secuencia	Tamaño del producto de amplificación (pb)	Loci de SNP
dia-sm4h	GTGGGTGGTGAAGTCCAATCT (SEQ ID NO:7)	645	D <sup>a</sup>
dia-as	AGAGGGTCTGGCTGTCTTGAA (SEQ ID NO:8)		
OK-sm8h	TACTCCTGCGTCTTCCTCAACA (SEQ ID NO:9)	292	OK 274A
OK-as	CTCCCCCTCGTTGATGTGTTC (SEQ ID NO:10)		
Co-smh	GGTGGGAACAACCAGAGCGT (SEQ ID NO:11)	395	Co <sup>b</sup>
Co-ash	CCTCCAGCAACCTCTTGTCTCTC (SEQ ID NO:12)		
Beta-actinaF	CGGCATCGTCACCAACTG (SEQ ID NO:19)	508	Beta-actina
Beta-actinaR	TGCAAAGAACACGGCTAAG (SEQ ID NO:20)		(referencia)

10 (2) Composición del sistema

El sistema de PCR múltiplex en la presente invención usa la versión TaKaRa Taq<sup>MR</sup> Hot Strat, Cat. # R007A/B (suministrada con tampón de PCR 10X (más Mg<sup>2+</sup>) y la mezcla de dNTP), el volumen total del sistema es 25 µl, y la composición del sistema es específicamente como sigue:

15

Nombre	Volumen (µl)
Plantilla de ADN	4
Tampón	2,5

(continuación)

Nombre	Volumen (µl)
dNTP	2
dia-sm4h	1,75
dia-as	1,75
OK-sm8h	1
OK-as	1
Co-smh	1
Co-ash	1
Beta-actina F	0,2
Beta-actina R	0,2
Tap-HS	0,125
H <sub>2</sub> O	8,475

(3) Procedimiento de amplificación por PCR:

Fase	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	5 min	1
Segunda fase	1	94	30 s	
	2	60	30 s	35
	3	72	45 s	
Tercera fase	1	72	7 min	1

5

IV. El sistema de reacción PCR múltiplex Fyb-S es específicamente como sigue:

(1) secuencia del cebador de PCR

Nombre del cebador	Secuencia	Tamaño del producto de amplificación (pb)	loci de SNP
FYBS	CTTCCCAGATGGAGACTATCA (SEQ ID NO:13)	558	Fy <sup>b</sup>
FYBAS	AACAAGACAAAGATGGCAAGA (SEQ ID NO:14)		
S-s	TGATAGCCGCATGACCCTTCT (SEQ ID NO:15)	442	S
S-asm	ACGATGGACAAGTTGTCCGA (SEQ ID NO:16)		
Bactina-S2	CTCTGCCTGACATGAGGGTTA (SEQ ID NO:21)	675	Beta-actina
Bactina-AS	TCACCTTCACCGTTCAGTTT (SEQ ID NO:22)		(referencia)

10 (2) Composición del sistema

El sistema de PCR múltiplex divulgado en la presente invención utiliza la versión TaKaRa Taq<sup>MR</sup> Hot Start, Cat. # R007A/B (suministrado con tampón de PCR 10X (más Mg<sup>2+</sup>) y mezcla de NTP), el volumen total del sistema es 25 µl, y la composición del sistema es específicamente como sigue:

Nombre	Volumen (µl)
Plantilla de ADN	4
Tampón	2,5
dNTP	2
FYB-s	0,75

15

(continuación)

Nombre	Volumen (µl)
FYB-as	0,75
S-asm	1
S-s	1
Bactina-S2	0,2
Bactina-as	0,2
Tap-HS	0,125
H <sub>2</sub> O	12,475

(3) Procedimiento de amplificación por PCR:

Fase	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	5 min	1
Segunda fase	1	94	30 s	35
	2	58	30 s	
	3	72	45 s	
Tercera fase	1	72	7 min	1

5

Realización 2: Construcción del control positivo.

Método I: se obtuvieron muestras de ADN de donantes de grupos sanguíneos poco comunes, luego se amplificaron mediante cebadores diseñados para amplificar los fragmentos que contienen loci de SNP a detectar. Los productos de amplificación se conectaron a un vector pGM-T, posteriormente se transformaron en células competentes DH5α. Las colonias monoclonales positivas fueron recogidas para ser identificadas por secuenciación. Por lo tanto, se construyeron los controles positivos Ytb, K, Dia y Cob.

10

1. Diseño de cebadores

Grupo sanguíneo	Nombre del cebador	Secuencia
Ytb	Ytb-F	TCCTCCTTGGACGTGTACGAT (SEQ ID NO:23)
	Ytb-R	CTCCTCTGCCGTGTAGTTTCG (SEQ ID NO:24)
K	K-F	TTATGCCAGAATCAGGTTAGA (SEQ ID NO:25)
	K-R	GAGAGAAGGAATGTACGGGAG (SEQ ID NO:26)
Dia	Dia-F	CAAGCCACCCAAGTATCACCC (SEQ ID NO:27)
	Dia-R	CATCCCGACCTTCTCCTCAT (SEQ ID NO:28)
Cob	Cob-F	AAAGCCTATTAGAGCAACGG (SEQ ID NO:29)
	Cob-R	CCTAGAGGTGGTTTATTTGGA (SEQ ID NO:30)
Fyb	Fyb-F	AGAGTCCCTTATCCCTATGCC (SEQ ID NO:31)
	Fyb-R	ACCTCACCAGGAAATCCAGTC (SEQ ID NO:32)
S	S-F	GCACAGGTGGAACAGTAAGG (SEQ ID NO:33)
	S-R	GGTTGTCAAGATGGTCCCTAA (SEQ ID NO:34)

15

2. sistema de amplificación

(1) Ytb, K, Dia, Cob

Nombre	Volumen (µl)
Plantilla de ADN	2,5
Tampón	5

(continuación)

Nombre	Volumen (µl)
dNTP	4
Cebador secuencia arriba	1,75
Cebador secuencia abajo	1,75
Tap-HS	0,25*
H <sub>2</sub> O	34,75

\* Versión TaKaRa Taq<sup>MR</sup> Hot Start, Cat. # R007A/B (suministrada con Tampón de PCR 10X (más Mg<sup>2+</sup>) y mezcla de dNTP)

(2) Fyb, S

Nombre	Volumen (µl)
Plantilla de ADN	2,5
Tampón	5
dNTP	4
Cebador secuencia arriba	2
Cebador secuencia abajo	2
Tap-HS	0,25*
H <sub>2</sub> O	34,75

\* Versión TaKaRa Taq<sup>MR</sup> Hot Start, Cat. # R007A/B (suministrada con Tampón de PCR 10X (más Mg<sup>2+</sup>) y mezcla de dNTP)

5

3. Procedimiento de amplificación por PCR

(1) Procedimiento de amplificación Ytb

Fase	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	5 min	1
	1	94	1 min	
Segunda fase	2	60	1 min	38
	3	72	1,5 min	
Tercera fase	1	72	7 min	1

10

(2) Procedimiento de amplificación K

Fase	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	5 min	1
	1	94	1 min	
Segunda fase	2	55	1 min	38
	3	72	1,5 min	
Tercera fase	1	72	7 min	1

(3) Procedimiento de amplificación Dia

Fase	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	5 min	1

15

(continuación)

Fase	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
	1	94	40 s	
Segunda fase	2	60	40 s	38
	3	72	1 min	
Tercera fase	1	72	7 min	1

(4) Procedimiento de amplificación Cob

Fase	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	5 min	1
	1	94	1 min	
Segunda fase	2	57	1 min	38
	3	72	1,5 min	
Tercera fase	1	72	7 min	1

5 (5) Procedimiento de amplificación Fyb

Fase	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	5 min	1
	1	94	1 min	
Segunda fase	2	57	1 min	35
	3	72	1 min 30 s	
Tercera fase	1	72	7 min	1

(6) Procedimiento de amplificación S

Fase	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	5 min	1
	1	94	1 min	
Segunda fase	2	58	1 min	35
	3	72	1 min 30 s	
Tercera fase	1	72	7 min	1

10 4. Los productos de amplificación se purificaron mediante un kit de extracción en gel y se conectaron a un vector pGM-T (adquirido a través de TIANGEN BIOTECH), se transformaron en células DH5 $\alpha$  competentes. Las colonias monoclonales positivas fueron recogidas para ser identificadas por secuenciación.

15 Método II: Procedimientos de mutagénesis dirigida al sitio para construir plásmidos de control positivo Kpc, Ok.

1. Construcción de plásmidos de control Kpc

20 1) De acuerdo con las secuencias del gen KEL (antígenos codificados kp<sup>c</sup> del sistema del grupo sanguíneo Kell, número de secuencia del GenBank NG07492) en la base de datos del GenBank, los cebadores se diseñan para que se amplifiquen con fragmentos de genes que contienen loci de SNP que se van a mutar. Las secuencias del cebador son las siguientes:

25 Kpb-F GGTAAGATGGCACATGGACAAAGGC (SEQ ID NO: 35)  
Kpb-R CTGCGGCGAACCTCTGCTTTAG (SEQ ID NO: 36)

El sistema de amplificación es el siguiente:

## ES 2 759 782 T3

Tampón de PCR 10X (que contiene MgCl <sub>2</sub> )	5,0 µl
dNTP 5 mM	2,0 µl
K <sub>pb</sub> -F 10 µM	2,0 µl
K <sub>pb</sub> -R 10 µM	2,0 µl
ADN	5,0 µl
Taq	0,25 µl
H <sub>2</sub> O	33,75 µl

El procedimiento de amplificación es el siguiente:

Fase	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	95	2 min	1
	1	94	30 s	
Segunda fase	2	58	30 s	35
	3	72	30 s	
Tercera fase	1	72	10 min	1

5 2) Los productos de amplificación se purificaron mediante un kit de extracción en gel y se conectaron a un vector pGEM-T easy durante la noche a 4 °C.

3) Los productos de ligación se transforman en células competentes DH5α de *E. coli*, se recubren en placas de LB sólido que contienen ampicilina y se incuban a 37 °C durante la noche. Para seleccionar los clones positivos para

10 plásmidos y se usan cebadores de secuenciación universal T7 para secuenciar y analizar los fragmentos insertados.

4) Se diseña un cebador mutagénico y otro cebador de flanqueo (los extremos 5' de dos cebadores son adyacentes entre sí), se toman plásmidos recombinantes que contengan secuencias normales de genes para mutar como plantillas para la amplificación de plásmidos de longitud completa y se introducen loci de mutación.

15 Las secuencias del cebador son las siguientes:

cebador mutagénico KPC MF: TCACAGCTGTTCCAGTTTCT (SEQ ID No: 37)

cebador de flanqueo KPC MR: AGTGATGGAGTTGACAAGG (SEQ ID NO: 38)

20

El sistema de amplificación es el siguiente:

Tampón de PCR 10X	5,0 µl
MgSO <sub>4</sub> 25 mM	2,0 µl
dNTP 2 mM	5,0 µl
OK-Mu 10 µM	2 µl
PGEMT-R 10 µM	2 µl
Plantilla de plásmido recombinante	5,0 µl
ADN polimerasa KOD de fidelidad Plus	1 µl
Agua desionizada hasta	50 µl

El procedimiento de amplificación es el siguiente:

25

Fase	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	2 min	1
	1	94	30 s	
Segunda fase	2	60	30 s	35

## ES 2 759 782 T3

(continuación)

Fase	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
	3	68	4 min	
Tercera fase	1	72	8 min	1

5) Obtención de los controles de detección de genes de antígeno del grupo sanguíneo que contengan loci de SNP mutante.

5 Después de la purificación mediante un kit de extracción en gel, se realiza la fosforilación del extremo 5' en los productos de PCR.

10 Sistema de fosforilación de 20 µl:

tampón de reacción A 10X	2 µl
ATP 10 mM	2 µl
Polinucleótido quinasa T4	1 µl
Producto recuperado por PCR	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	13 µl

Se realiza la autoligación después de la fosforilación, y el sistema de ligación de 10 µl es el siguiente:

Producto fosforilado	2 µl
tampón de ligación rápida 2X	5 µl
ADN Ligasa T4	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	2 µl

15 La ligación se realiza a 4 °C durante la noche. Se transforman los productos de ligación en las células competentes DH5α, se incuba a 37 °C durante la noche, y luego se extraen los plásmidos, y se usan los cebadores de secuenciación T7 para secuenciar y analizar los resultados de la mutación.

20 2. Construcción de plásmidos de control Ok

1) De acuerdo con las secuencias génicas BSG (antígenos codificados Ok<sup>a</sup> del sistema del grupo sanguíneo OKa, número de secuencia del GenBank NG07492) en la base de datos del GenBank, los cebadores se diseñan para que se amplifiquen con fragmentos de genes que contienen loci de SNP que se van a mutar.

25 Las secuencias del cebador son las siguientes:

OKa-F GACTGGGACAGTTTTGCTTTTTTAC (SEQ ID NO: 39)

OKa-R GTCTCCCCCTCGTTGATGTGTTCTG (SEQ ID NO: 40)

30 El sistema de amplificación es el siguiente:

Tampón de PCR 10X	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl
dNTP 5 mM	2,0 µl
OKa-F 10 µM	2,0 µl
OKa-R 10 µM	2,0 µl
ADN	5,0 µl
Taq	0,4 µl
H <sub>2</sub> O	50 µl

El procedimiento de amplificación es el siguiente:

Fase	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	95	10 min	1
	1	94	40 s	
Segunda fase	2	61	40 s	35
	3	72	1 min	
Tercera fase	1	72	5 min	1

2) Los productos de amplificación se purificaron mediante un kit de extracción en gel y se conectaron a un vector pGEM-T easy durante la noche a 4 °C.

5 3) Los productos de ligación se transforman en células competentes DH5α de *E. coli*, se recubren en placas de LB sólido que contienen ampicilina y se incuban a 37 °C durante la noche. Para seleccionar los clones positivos para

10 4) Se diseña un cebador mutagénico y otro cebador de flanqueo (los extremos 5' de dos cebadores son adyacentes entre sí), se toman plásmidos recombinantes que contengan secuencias normales de genes para mutar como plantillas para la amplificación de plásmidos de longitud completa y se introducen loci de mutación. Las secuencias del cebador son las siguientes:

15 Cebador mutagénico OKa-Mu CATGGGCTTGGGGAGGAAGAC (SEQ ID No: 41)

Cebador de flanqueo PGEMT-R GGCACGGCCAACATCCAGCTC (SEQ ID No: 42)

El sistema de amplificación es el siguiente:

Tampón de PCR 10X	5,0 µl
MgSO <sub>4</sub> 25 mM	2,0 µl
dNTP 2 mM	5,0 µl
OK-Mu 10 µM	2 µl
PGEMT-R 10 µM	2 µl
Plantilla de plásmido recombinante	5,0 µl
ADN polimerasa KOD de fidelidad Plus	1 µl
Agua desionizada hasta	50 µl

20

El procedimiento de amplificación es el siguiente:

Fase	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo de espera	Ciclos
Primera fase	1	94	10 min	1
	1	94	30 s	
Segunda fase	2	60	30 s	35
	3	68	4 min	
Tercera fase	1	72	5 min	1

25 5) Se obtienen los controles de detección de genes de antígeno del grupo sanguíneo que contienen loci de SNP mutante.

Después de la purificación mediante un kit de extracción en gel, se realiza una fosforilación del extremo 5' en los productos de PCR.

Sistema de fosforilación de 20 µl:

30

Tampón de reacción A 10X	2 µl
ATP 10 mM	2 µl

## ES 2 759 782 T3

Polinucleótido quinasa T4	1 µl
Producto recuperado por PCR	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	13 µl

Se realiza la autoligación después de la fosforilación, y el sistema de ligación de 10 µl es el siguiente:

Producto fosforilado	2 µl
Tampón de ligación rápido 2X	5 µl
ADN Ligasa T4	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	2 µl

- 5 La ligación se realiza a 4 °C durante la noche. Se transforman los productos de ligadura en células competentes DH5α, se incuban a 37 °C durante la noche, y luego se extraen los plásmidos, y se usan los cebadores de secuenciación T7 para secuenciar y analizar los resultados de la mutación.

Realización 3: Cribado de un grupo sanguíneo poco común

- 10 En los siguientes experimentos, las muestras de sangre de grupos sanguíneos no poco comunes, las muestras de sangre de grupos sanguíneos poco comunes y los plásmidos de control se verifican por secuenciación.

- 15 I. Detección de un conjunto de muestras de sangre que no contienen loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes

Se recogieron aleatoriamente 12 muestras de sangre, se extrajo respectivamente ADN genómico y se secuenció para verificar que no contenían loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes.

- 20 Detección de grupos sanguíneos poco comunes usando el procedimiento de cribado de grupos sanguíneos poco comunes en la presente invención: se mezclan las plantillas de ADN obtenidas, para formar una muestra a analizar que contiene 12 muestras de sangre; se añaden respectivamente las muestras a analizar en el sistema de reacción PCR múltiplex correspondiente en la realización 1, para obtener soluciones de reacción PCR del sistema Yt-K-Kpc, el sistema Dia-OK-Cob y el sistema Fyb-S, y se preparan soluciones de reacción PCR del control positivo al mismo tiempo; se realiza una reacción de amplificación en las soluciones de reacción PCR obtenidas en la etapa anterior de acuerdo con los procedimientos de amplificación de PCR correspondientes; se detectan los productos de amplificación obtenidos en el gel de agarosa por electroforesis y se observan los resultados a través de un formador de imágenes en gel.

- 30 El formador de imágenes en gel muestra que emerge una banda de control interno, pero no emerge ninguna banda en una ubicación correspondiente al tamaño del fragmento de amplificación del control positivo, y por lo tanto el resultado de detección del procedimiento de cribado de grupos sanguíneos poco comunes es que las 12 muestras de sangre no tienen muestras de sangre de grupos sanguíneos poco comunes, y el resultado de la detección es consistente con el resultado de secuenciación del ADN.

- 35 II Detección de un conjunto de muestras de sangre que contienen loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes

- 40 Se seleccionan 4 muestras de sangre que no contienen loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes, se extraen plantillas de ADN respectivamente, y se mezclan las plantillas, después de la mezcla, las plantillas mezcladas forman con el ADN genómico de la muestra de sangre que no contiene loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes, un ADN genómico de muestra de sangre Yt(b+), un ADN genómico de muestra de sangre K y plásmidos de control Kpc respectivamente para obtener cuatro grupos que contienen cada uno 5 muestras de ADN, se realiza la amplificación de acuerdo con el sistema Yt-K-Kpc en la realización 1 y la condición de reacción correspondiente, y los productos de amplificación se detectan mediante el formador de imágenes en gel después de la electroforesis en gel.

- 50 Por favor observar la Figura 1 de la memoria descriptiva para los resultados de la electroforesis. Carril 1: marcador, los fragmentos son de 100, 200, 300, 400, 500, 600 pb; Carril 2, 3, 4: cuatro mezclas de 3,2 µl de ADN genómico de muestras de sangre que no contienen loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes (concentración de 50-100 ng/µl) + 0,8 µl de ADN genómico de grupos sanguíneos poco comunes (concentración de 50-100 ng/µl) o plásmidos de control (concentración de 0,01 ng/µl); Carril 5: cinco ADN genómicos de muestras de sangre de 4 µl que no contienen loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes (concentración de 50-100 ng/µl).

El formador de imágenes en gel muestra que, los carriles 2, 3, 4 tienen bandas en las ubicaciones correspondientes a los tamaños de los fragmentos de amplificación de grupos sanguíneos poco comunes correspondientes, y los resultados de detección de los grupos que forman los carriles 2, 3, 4 son positivos; como el número de muestras de ADN de los grupos en los carriles 2, 3, 4 es igual a 5, los ADN de las muestras de sangre en los grupos de los carriles 2, 3, 4 se toman como plantillas para la reacción PCR múltiple y el resultado de detección de grupos sanguíneos poco comunes obtenido con el procedimiento de PCR múltiple es consistente con el resultado de secuenciación del ADN.

## 2. Sistema Dia-OK-Cob

Se seleccionan 4 ADN genómicos de muestras de sangre que no contienen loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes y se mezclan, después de la mezcla, los ADN mezclados forman con dos muestras de ADN genómico de muestras de sangre que no contienen loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes, un ADN genómico Di(a+b+), plásmidos de control OK, un ADN genómico de muestra sanguínea de Co(b+) respectivamente para obtener cinco grupos que contienen cada uno 5 muestras de ADN, realizar la amplificación de acuerdo con el sistema Dia-OK-Cob en la realización 1 y la condición de reacción correspondiente, y los productos de amplificación son detectados por el formador de imágenes en gel después de la electroforesis en gel.

Por favor observar la Figura 2 de la memoria descriptiva para los resultados de la electroforesis. Carriles 1, 5: cinco ADN genómicos de la muestra de sangre de 4 µl no contienen loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes (concentración de 50-100 ng/µl); carriles 2, 3, 4: cuatro mezclas de 3,2 µl de ADN genómico de la muestra de sangre no contienen loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes (concentración de 50-100 ng/µl) + 0,8 µl de ADN genómico de grupos sanguíneos poco comunes (concentración de 50-100 ng/µl) o plásmidos de control (concentración de 0,01 ng/µl); carril 6: marcador, los fragmentos son de 100, 200, 300, 400, 500, 600 pb.

El formador de imágenes en gel muestra que, los carriles 2, 3, 4 tienen bandas en ubicaciones correspondientes a los tamaños de los fragmentos de amplificación de grupos sanguíneos poco comunes correspondientes, y los resultados de detección de los grupos que forman los carriles 2, 3, 4 son positivos; como el número de muestras de ADN de los grupos en los carriles 2, 3, 4 es igual a 5, los ADN de las muestras de sangre en los grupos de los carriles 2, 3, 4 se toman como plantillas para la reacción PCR múltiple, y el resultado de detección de grupos sanguíneos poco comunes obtenido con el procedimiento de PCR múltiple es consistente con el resultado de secuenciación del ADN.

## 3. Sistema Fyb-S

A. Se seleccionan 4 ADN genómicos de muestras de sangre de loci de SNP específicas que no contienen grupos sanguíneos poco comunes y se mezclan, después de mezclar, los ADN mezclados forman con un ADN genómico de muestras de sangre que no contienen loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes, un ADN genómico de muestra de sangre Fy(a+b+) y un ADN genómico de muestra de sangre S+s- respectivamente, para obtener tres grupos que contiene cada uno 5 muestras de ADN.

B. Se seleccionan 3 ADN genómicos de muestras de sangre que no contienen loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes y se mezclan, y después de mezclar, se agregan los ADN mezclados a un ADN genómico de muestra de sangre Fy(a+b+) y un ADN genómico de muestra de sangre S+s-, para formar un grupo que contiene 5 muestras de ADN.

Se realiza la amplificación de acuerdo con el sistema Fyb-S en la realización 1 y la condición de reacción correspondiente, y los productos de amplificación se detectan mediante el formador de imágenes en gel después de la electroforesis en gel.

Por favor observar la Figura 3 de la memoria descriptiva para los resultados de la electroforesis. El formador de imágenes en gel muestra que, los carriles 2, 3 tienen bandas en ubicaciones correspondientes a los tamaños de los fragmentos de amplificación de grupos sanguíneos poco comunes correspondientes, y los resultados de detección de los grupos que forman los carriles 2, 3 son positivos; el carril 4 tiene bandas en ubicaciones correspondientes a Fyb y S, los resultados de detección del grupo del carril 4 que contiene grupos sanguíneos poco comunes de Fyb y S son positivos; los ADN de las muestras de sangre en los grupos de los carriles 2, 3, 4 se toman como plantillas para la reacción PCR múltiple, y el resultado de detección de grupos sanguíneos poco comunes obtenido con el procedimiento de PCR múltiple es consistente con el resultado de secuenciación de ADN.

## Realización 4: Cribado del kit del grupo sanguíneo poco común

En los siguientes experimentos, las muestras de sangre de grupos sanguíneos no poco comunes, las muestras de sangre de grupos sanguíneos poco comunes y los plásmidos de control se verifican todos mediante secuenciación.

## 1. Materiales experimentales

Se toman 11 muestras de sangre que no contienen loci de SNP específicos de grupos sanguíneos poco comunes, respectivamente se extraen plantillas de ADN y se mezclan las plantillas de ADN de las 11 muestras de sangre; se agrega un ADN genómico de muestra de sangre Fy(b+) a la mezcla de la plantilla de ADN, para preparar un grupo que contiene 12 muestras de ADN.

## 2. Procedimientos experimentales

Se toman 3 muestras para analizar del grupo, con referencia al sistema Yt-K-Kpc, el sistema Dia-OK-Cob y el sistema Fyb-S en la realización 1, y a través de los cebadores de PCR y otros reactivos en el kit, se preparan respectivamente soluciones de reacción PCR de los tres sistemas, y la solución de reacción PCR del control positivo. Se realiza la reacción de amplificación de acuerdo con los procedimientos de amplificación del sistema Yt-K-Kpc, el sistema Dia-OK-Cob y el sistema Fyb-S en la realización 1 respectivamente, se colocan los productos de amplificación en el gel de agarosa para electroforesis y se observan los resultados a través de un formador de imágenes en gel. La electroforesis muestra: amplificación del sistema Yt-K-Kpc y el sistema Dia-OK-Cob no tiene bandas, lo que indica que las muestras de sangre del grupo para detección no pertenecen a ninguno de Yt(b+), K, Kp(c+), Di(a+), Ok(a-) o Co(b+); la amplificación del sistema Fyb-S tiene una banda, y la banda emerge en una ubicación correspondiente a un grupo sanguíneo Fy(b+), y prueba que el conjunto de las 12 muestras de sangre puede tener un grupo sanguíneo Fy(b+).

Como el número de muestras de sangre en el grupo es de 12 (mayor que 5), el grupo se resuelve en dos nuevos grupos que contiene cada uno 6 muestras de sangre, y la detección por PCR múltiplex se realiza de acuerdo con las condiciones del sistema Fyb-S, para cribar grupos cuyo resultado de detección es positivo. Se continúa resolviendo los grupos cuyo resultado de detección es positivo, hasta que el número de muestras de sangre en los grupos cuyo resultado de detección sea positivo sea 3, y se realiza una detección por PCR múltiplex en 3 muestras de ADN respectivamente, para finalmente detectar las muestras de sangre cuyo resultado de detección sea positivo.

La secuenciación de ADN se realiza en las muestras de sangre cuyo resultado de PCR es positivo, y el resultado muestra que el resultado de secuenciación es consistente con el resultado del procedimiento de cribado por PCR múltiplex de grupos sanguíneos humanos poco comunes.

### Realización 5: Experimento de cribado de sensibilidad del grupo sanguíneo poco común

1. Procedimientos experimentales: se extraen plásmidos de control, se realiza la cuantificación con un espectrofotómetro ultravioleta, se realiza una dilución de acuerdo con 1 ng/μl, 0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl, 0,001 ng/μl,... se mezclan con ADN genómicos de grupos sanguíneos no poco comunes que tienen el mismo volumen, y luego se usa el procedimiento de cribado rápido de grupos sanguíneos humanos poco comunes de acuerdo con la presente invención para la detección por PCR múltiplex.

## 2. Etapas experimentales

(1) Se extraen seis plásmidos de control positivo diferentes respectivamente, se realiza la cuantificación con un espectrofotómetro ultravioleta y luego se realiza la dilución de acuerdo con las proporciones, para obtener plásmidos de control positivo que tengan diferentes concentraciones.

(2) Se seleccionan aleatoriamente 4 ADN genómicos de muestras de sangre de grupos sanguíneos no poco comunes (No. 1-4) para mezclarlos con volúmenes iguales para obtener ADN mezclados, y la concentración de los ADN mezclados es de 50-100 ng/μl; se toman seis de los ADN mezclados, el volumen de cada ADN mezclado es de 3,2 μl, y se agregan 0,8 μl de seis plásmidos de control positivo diferentes después de la dilución a los seis ADN mezclados, para formar seis grupos con un volumen total de 4 μl y el número de muestras es 5.

(3) Se amplifican los grupos que contienen los plásmidos de control correspondientes de acuerdo con el sistema Yt-K-Kpc, el sistema Dia-OK-Cob o el sistema Fyb-S y la condición de reacción correspondiente, y los productos de amplificación se detectan por medio del formador de imágenes en gel después de la electroforesis en gel.

## 3. Resultados experimentales

### (1) plásmidos Yt

Como se muestra en la Figura 4, carriles 1-6: se mezclan 3,2 μl de ADN genómico de muestra de sangre de grupo sanguíneo no poco común + 0,8 μl de plásmidos Yt, y las concentraciones de los plásmidos son 1 ng/μl, 0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl, 0,001 ng/μl, 0,0001 ng/μl, 0,00001 ng/μl respectivamente; carril 7: marcador, los fragmentos son de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 pb.

### (2) plásmidos K

Como se muestra en la Figura 5, carriles 1-5: se mezclan 3,2 μl de ADN genómico de muestra de sangre de grupo sanguíneo no poco común + 0,8 μl de plásmidos K, y las concentraciones de los plásmidos son 1 ng/μl, 0,1 ng/μl,

0,01 ng/μl , 0,001 ng/μl, 0,0001 ng/μl, 0,00001 ng/μl respectivamente; carril 6: marcador, los fragmentos son de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 pb.

(3) Plásmidos Kpc

5 Como se muestra en la Figura 6, carriles 1-7: se mezclan 3,2 μl de ADN genómico de muestra de sangre de grupo sanguíneo no poco común + 0,8 μl de plásmidos Kpc, y las concentraciones de los plásmidos son 1 ng/μl, 0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl , 0,001 ng/μl, 0,0001 ng/μl, 0,00001 ng/μl, 0,000001 ng/μl respectivamente; carril 8: marcador, los fragmentos son de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 pb.

10 (4) Plásmidos Dia

Como se muestra en la Figura 7, carriles 1-6: se mezclan 3,2 μl de ADN genómico de muestra de sangre de grupo sanguíneo no poco común + 0,8 μl de plásmidos Dia, y las concentraciones de los plásmidos son 1 ng/μl, 0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl , 0,001 ng/μl, 0,0001 ng/μl, 0,00001 ng/μl respectivamente; carril 7: marcador, los fragmentos son de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 pb.

15 (5) Plásmidos Ok

Como se muestra en la Figura 8, carriles 1-5: se mezclan 3,2 μl de ADN genómico de muestra de sangre de grupo sanguíneo no poco común + 0,8 μl de plásmidos Dia, y las concentraciones de los plásmidos son 1 ng/μl, 0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl , 0,001 ng/μl, 0,0001 ng/μl respectivamente; carril 6: marcador, los fragmentos son de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 pb.

20 (6) Plásmidos Cob

Como se muestra en la Figura 9, carriles 1-5: se mezclan 3,2 μl de ADN genómico de muestra de sangre de grupo sanguíneo no poco común + 0,8 μl de plásmidos Cob, y las concentraciones de los plásmidos son 1 ng/μl, 0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl , 0,001 ng/μl, 0,0001 ng/μl respectivamente; carril 6: marcador, los fragmentos son de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 pb.

25 (7) Plásmidos Fyb

Como se muestra en la Figura 10, carriles 1-7: se mezclan 3,2 μl de ADN genómico de muestra de sangre de grupo sanguíneo no poco común + 0,8 μl de plásmidos Fyb, y las concentraciones de los plásmidos son 1 ng/μl, 0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl , 0,001 ng/μl, 0,0001 ng/μl, 0,00001 ng/μl, 0,000001 ng/μl respectivamente; carril 8: marcador, los fragmentos son de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 pb.

30 (8) Plásmidos S

35 Como se muestra en la Figura 11, carriles 1-6: se mezclan 3,2 μl de ADN genómico de muestra de sangre de grupo sanguíneo no poco común + 0,8 μl de plásmidos S, y las concentraciones de los plásmidos son 1 ng/μl, 0,1 ng/μl, 0,01 ng/μl , 0,001 ng/μl, 0,0001 ng/μl, 0,00001 ng/μl respectivamente; carril 7: marcador, los fragmentos son de 100, 200, 300, 400, 500 y 600 pb.

40 Se puede observar a partir de los resultados experimentales anteriores, que el procedimiento de detección del conjunto de grupos sanguíneos poco comunes de la presente invención tiene una mayor sensibilidad, que todavía se puede detectar incluso si la concentración de plásmido es inferior a 0,0001 ng/μl incluso 0,00001 ng/μl .

45 Listado de secuencias

<110> Centro de sangre de Shanghai

<120> Procedimiento de detección por PCR múltiple para tipos sanguíneos humanos poco comunes y kit

50 <130> SHAB001PEP

<140> EP 12865995.0

<141> 2012-01-18

55 <150> PCT/CN2012/070522

<151> 2012-01-18

<160> 42

60 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

65 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 1  
 5 tcatcaacgc gggagactta a 21  
  
 <210> 2  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 2  
 15 cacggggcac acgacatt 18  
  
 <210> 3  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 3  
 25 cttccttaa cttaaccgc at 22  
  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 4  
 35 cccaacctgc aacctcctc 20  
  
 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 5  
 50 tgtcaatctc catcaactca aa 22  
  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 6  
 60 tcctccacca gttgtgacat 20  
  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 7  
 5 gtgggtggtg aagtccaatc t 21  
  
 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 8  
 15 agagggctcg gctgtctga a 21  
  
 <210> 9  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 9  
 25 tactcctgcg tcttctcaa ca 22  
  
 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 10  
 35 ctccccctcg ttgatgtgtt c 21  
  
 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 11  
 50 ggtggggaac aaccagagcg t 21  
  
 <210> 12  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 12  
 60 cctccagcaa cctctgtcc tctc 24  
  
 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

ES 2 759 782 T3

<220>  
 <223> Cebador  
  
 5 <400> 13  
 ctcccagat ggagactatc a 21  
  
 <210> 14  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 15 <400> 14  
 aacaagacaa agatggcaag a 21  
  
 <210> 15  
 <211> 21  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 25 <400> 15  
 tgatagccgc atgacccttc t 21  
  
 <210> 16  
 30 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 35 <223> Cebador  
  
 <400> 16  
 acgatggaca agttgtccga 20  
  
 40 <210> 17  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 17  
 50 ttcctcctc agatcattgc t 21  
  
 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 18  
 60 tcaccttcac cgtccagtt t 21  
  
 <210> 19  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 19  
 5 cggcacgctc accaactg 18  
  
 <210> 20  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 20  
 15 tgcaaagaac acggctaag 19  
  
 <210> 21  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 21  
 25 ctctgcctga catgagggtt a 21  
  
 <210> 22  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 22  
 35 tcaccttcac cgtccagtt t 21  
  
 <210> 23  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 23  
 45 tcctccttgg acgtgtacga t 21  
  
 <210> 24  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 24  
 55 ctctctgcc gtgtagttc g 21  
  
 <210> 25  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
  
 5 <400> 25  
 ttatgccaga atcaggtag a 21  
  
 <210> 26  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 15 <400> 26  
 gagagaagga atgtacggga g 21  
  
 <210> 27  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 25 <400> 27  
 caagccaccc aagtatcacc c 21  
  
 <210> 28  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 35 <400> 28  
 catcccgacc ttctctca t 21  
  
 <210> 29  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 29  
 50 aaagcctatt agagcaacgg 20  
  
 <210> 30  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 30  
 60 cctagaggtag gttatttgg a 21  
  
 <210> 31  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
  
 5 <400> 31  
 agagtcacct atccctatgc c 21  
  
 <210> 32  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 15 <400> 32  
 acctcaccag gaaatccagt c 21  
  
 <210> 33  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 25 <400> 33  
 gcacaggtgg aacagtaagg 20  
  
 <210> 34  
 <211> 21  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 35 <400> 34  
 ggtgtcaag atggtcccta a 21  
  
 <210> 35  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 35  
 50 ggtaagatgg cacatggaca aaggc 25  
  
 <210> 36  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 36  
 60 ctgcggcga cctctgcttt ag 22  
  
 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 37  
 5 tcacagctgt tccagtttct 20  
  
 <210> 38  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 10 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 38  
 15 agtgatggag attgacaagg 20  
  
 <210> 39  
 <211> 25  
 20 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 25  
 <400> 39  
 gactgggaca gtttgcttt tcac 25  
  
 <210> 40  
 <211> 25  
 30 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 35  
 <400> 40  
 gtctcccct cgtgatgtg ttctg 25  
  
 <210> 41  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
 45  
 <400> 41  
 50 catgggcttg gggaggaaga c 21  
  
 <210> 42  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55  
  
 <220>  
 <223> Cebador  
  
 <400> 42  
 60 ggcacggcca acatccagct c 21

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de cribado rápido por PCR múltiplex de grupos sanguíneos humanos poco comunes, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:

A. preparar una muestra para analizar: construir un grupo con múltiples muestras de sangre, extrayendo respectivamente plantillas de ADN de las muestras de sangre que forman el grupo y mezclar las plantillas de ADN para obtener una muestra para analizar del grupo;

B. cribar un grupo positivo: utilizando las etapas i)-v) para realizar la detección por PCR múltiplex en la muestra a analizar del grupo obtenido en la etapa A, y cribar el grupo cuyo resultado de detección es positivo:

i) preparar un sistema de reacción PCR múltiplex: el sistema de reacción PCR múltiplex comprende pares múltiples de cebadores específicos, solución tampón de PCR, dNTP, enzima Taq y ddH<sub>2</sub>O, y las secuencias de los pares múltiples de cebadores específicos son las SEQ ID NOs: 1-6, SEQ ID NOs: 7-12 o SEQ ID NOs: 13-16; los cebadores específicos son cebadores específicos para loci de SNP de antígeno de grupos sanguíneos poco comunes en genes que codifican antígeno de superficie de células sanguíneas;

ii) agregar la muestra a analizar preparada por el procedimiento de recolección de muestras de sangre y extracción de plantillas de ADN para el sistema de reacción PCR múltiplex preparado en la etapa i), para obtener una solución de reacción PCR;

iii) realizar una reacción de amplificación en la solución de reacción PCR en la etapa ii) de acuerdo con un procedimiento de amplificación por PCR múltiplex;

iv) realizar electroforesis en productos de amplificación obtenidos de la reacción de amplificación en la etapa iii) en gel de agarosa, y observar los resultados de electroforesis a través de un formador de imágenes en gel; y

v) si la electroforesis muestra la aparición de una banda, el resultado de detección de un grupo sanguíneo poco común es positivo; y si la electroforesis no muestra banda, el resultado de detección del grupo sanguíneo poco común es negativo;

C. la detección y resolución de grupo positivo se selecciona de cualquiera de los siguientes:

a) si el número de muestras de sangre en el grupo cuyo resultado de detección es positivo es menor o igual a 5, se toman las plantillas de ADN de las muestras de sangre en el grupo como una muestra para analizar, respectivamente, utilizando las etapas i)-v) para realizar la detección por PCR múltiplex y cribar las muestras de sangre cuyo resultado de detección es positivo;

b) si el número de muestras de sangre en el grupo cuyo resultado de detección es positivo es mayor que 5, se resuelven las muestras de sangre del grupo cribado en la etapa B cuyo resultado de detección es positivo para formar dos nuevos grupos, mezclando respectivamente plantillas de ADN de las muestras de sangre de los dos grupos, para obtener muestras que se analizan de los dos grupos, y utilizando las etapas i)-v) para realizar la detección por PCR múltiplex, para cribar el grupo cuyo resultado de detección es positivo; y

D. repetir la etapa C.

2. El procedimiento de detección por PCR múltiplex como en la reivindicación 1, en el que en el sistema de reacción de PCR múltiplex en la etapa i), el sistema de reacción PCR múltiplex con una secuencia de cebador de las SEQ ID NOs: 1-6 es un sistema Yt-K-Kpc, que se utiliza en la detección de tres grupos sanguíneos poco comunes: Yt(b+), K y Kp(c+); el sistema de reacción PCR múltiplex con una secuencia de cebador de las SEQ ID NOs: 7-12 es un sistema Dia-OK-Cob, que se utiliza en la detección de tres grupos sanguíneos poco comunes: Di(a+), OK(a-) y Co(b+); y el sistema de reacción PCR múltiplex con una secuencia de cebador de las SEQ ID NOs: 13-16 es un sistema Fyb-S, que se utiliza en la detección de dos grupos sanguíneos poco comunes: Fy(b+) y S.

3. El procedimiento de detección por PCR múltiplex como en la reivindicación 1, en el que la etapa ii) es: agregar la muestra a analizar preparada mediante el procedimiento de recolectar muestras de sangre y extraer plantillas de ADN y un control positivo incorporado al sistema de reacción PCR múltiplex preparado en la etapa i) respectivamente, para obtener una solución de reacción PCR; la forma de juzgar un resultado de detección en la etapa v) es: si la electroforesis muestra que una banda emerge en una ubicación correspondiente a una banda de amplificación de control positivo, un resultado de detección de un grupo sanguíneo poco común es positivo; y si la electroforesis muestra que no emerge una banda en la ubicación correspondiente a la banda de amplificación de control positivo, el resultado de detección del grupo sanguíneo poco común es negativo.

4. El procedimiento de detección por PCR múltiplex como en la reivindicación 3, en el que el control positivo es un plásmido que contiene un fragmento de gen que incluye loci de SNP de grupos sanguíneos poco comunes, y el control positivo puede ser amplificado por un par de cebadores específicos en los pares múltiples de cebadores específicos con una secuencia de las SEQ ID NOs: 1-16.

5. El procedimiento de detección por PCR múltiplex como en la reivindicación 1, en el que el sistema de reacción PCR múltiplex en la etapa i) adicionalmente comprende cebadores de control interno; y la forma de juzgar un resultado de detección en la etapa v) es: si la electroforesis muestra que emerge una banda de un grupo sanguíneo

poco común y una banda de control interno, el resultado de detección de un grupo sanguíneo poco común es positivo; si la electroforesis muestra que solo emerge una banda de control interno, el resultado de detección del grupo sanguíneo poco común es negativo; y si la electroforesis no muestra banda, la detección falla.

5 6. El procedimiento de detección por PCR múltiplex como en la reivindicación 5, en el que, para el sistema de  
 reacción PCR múltiplex con las secuencias de cebadores el específicos de las SEQ ID NOs: 1-6, las secuencias de  
 los cebadores de control interno de los mismos son las SEQ ID NOs: 17-18; para el sistema de reacción PCR  
 múltiplex con las secuencias de cebadores específicos de las SEQ ID NOs: 7-12, las secuencias de los cebadores  
 10 de control interno de los mismos son las SEQ ID NOs: 19-20; y para el sistema de reacción PCR múltiplex con las  
 secuencias de cebadores específicos de las SEQ ID NOs: 13-16, las secuencias de los cebadores de control interno  
 de las mismas son las SEQ ID NOs: 21-22.

15 7. El procedimiento de detección por PCR múltiplex como en la reivindicación 1, en el que el procedimiento de  
 amplificación por PCR múltiplex del sistema de reacción PCR múltiplex con las secuencias de cebadores específicos  
 de las SEQ ID NOs: 1-6 es: desnaturalización a 94 °C, 5min, 94 °C 30s, 61 °C 30s, 72 °C 45s, un total de 5 ciclos, y  
 94 °C 30s, 58 °C 30s, 72 °C 45s, un total de 30 ciclos; extensión a 72 °C 7min; el procedimiento de amplificación por  
 PCR múltiplex del sistema de reacción PCR múltiplex con las secuencias de cebadores específicos de las SEQ ID  
 NOs: 7-12 es: desnaturalización a 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s, un total de 35 ciclos; extensión a  
 20 72 °C 7 min; y el procedimiento de amplificación por PCR múltiplex del sistema de reacción PCR múltiplex con las  
 secuencias de cebadores específicos de las SEQ ID NOs: 13-16 es: desnaturalización a 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 58  
 °C 30 s, 72 °C 45 s, un total de 35 ciclos; extensión a 72 °C 7min.

25 8. El cribado de detección rápida por PCR múltiplex de grupos sanguíneos humanos poco comunes como en la  
 reivindicación 1, en el que múltiples muestras de sangre significa que el número de las muestras de sangre es 5-12.

30 9. Uso de un kit de detección por PCR múltiplex de grupos sanguíneos humanos poco comunes en un procedimiento  
 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el kit comprende pares múltiples de  
 cebadores específicos, en el que los cebadores específicos son cebadores específicos para loci de SNP de antígeno  
 de grupo sanguíneo poco común en genes de antígeno de superficie de células sanguíneas, y en el que las  
 35 secuencias de los pares múltiples de cebadores específicos son las SEQ ID NOs: 1-6 y/o las SEQ ID NOs: 7-12 y/o  
 las SEQ ID NOs: 13-16.

10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el kit comprende además uno o más de una solución tampón  
 de PCR, dNTP, enzima Taq y ddH<sub>2</sub>O.

35 11. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el kit comprende además cebadores de control interno, y si  
 las secuencias de los pares múltiples de cebadores específicos son las SEQ ID NOs: 1-6, las secuencias de los  
 cebadores de control interno correspondientes a los mismos son las SEQ ID NOs: 17-18; si las secuencias de los  
 pares múltiples de cebadores específicos son las SEQ ID NOs: 7-12, las secuencias de los cebadores de control  
 40 interno correspondientes a los mismos son las SEQ ID NOs: 19-20; y si las secuencias de los pares múltiples de  
 cebadores específicos son las SEQ ID NOs: 13-16, las secuencias de los cebadores de control interno  
 correspondientes a los mismos son las SEQ ID NOs: 21-22.

45 12. El uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el kit comprende además un control positivo.

13. El uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el control positivo es un plásmido que contiene un  
 fragmento de gen que incluye loci de SNP de grupos sanguíneos poco comunes, y el control positivo puede ser  
 amplificado por un par de cebadores específicos en los pares múltiples de cebadores específicos con secuencias de  
 las SEQ ID NO: 1-16.

50

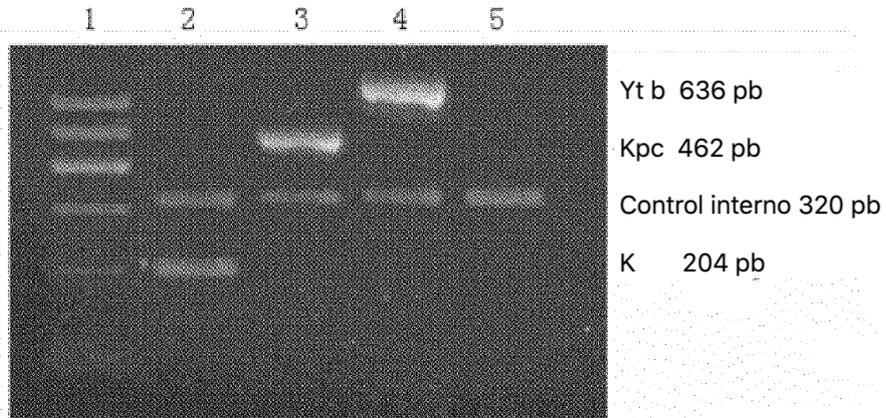


FIG. 1

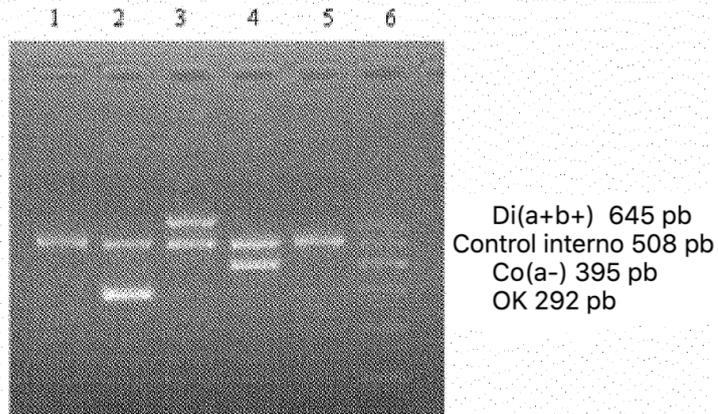


FIG. 2

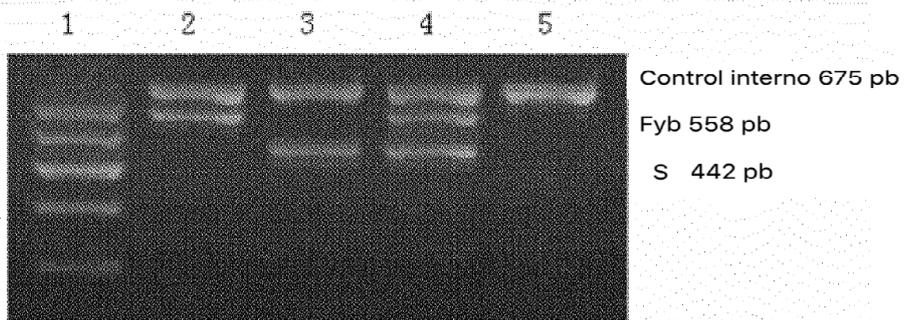


FIG. 3

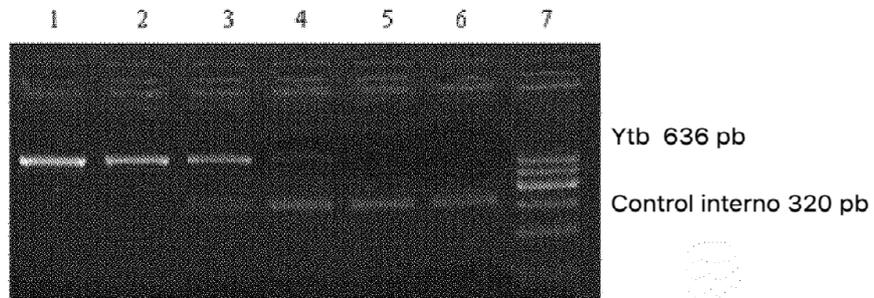


FIG. 4

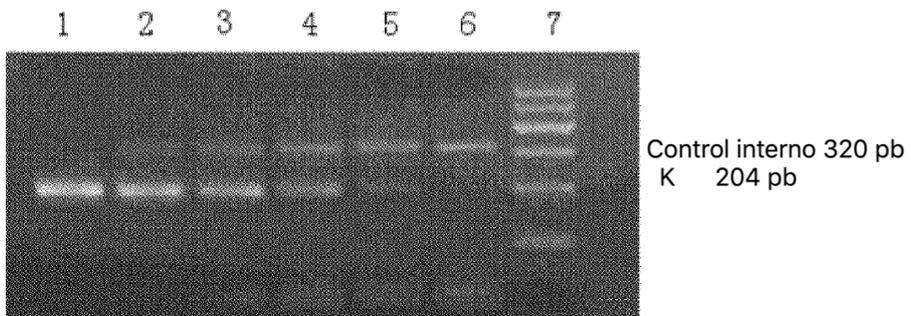


FIG. 5

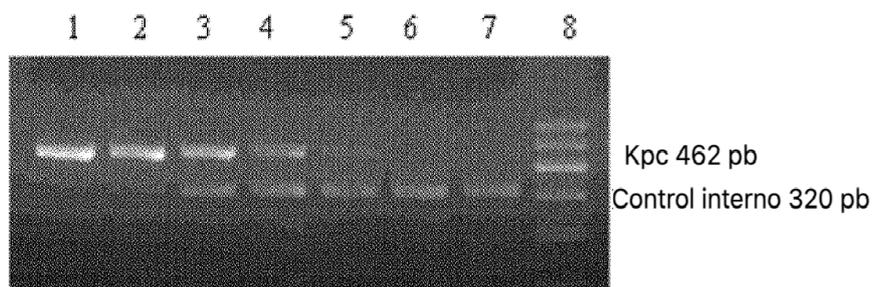


FIG. 6

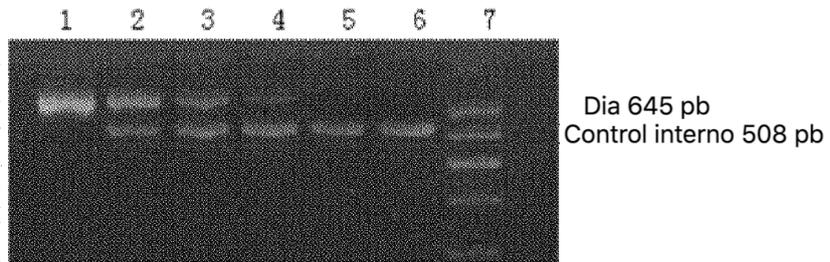


FIG. 7

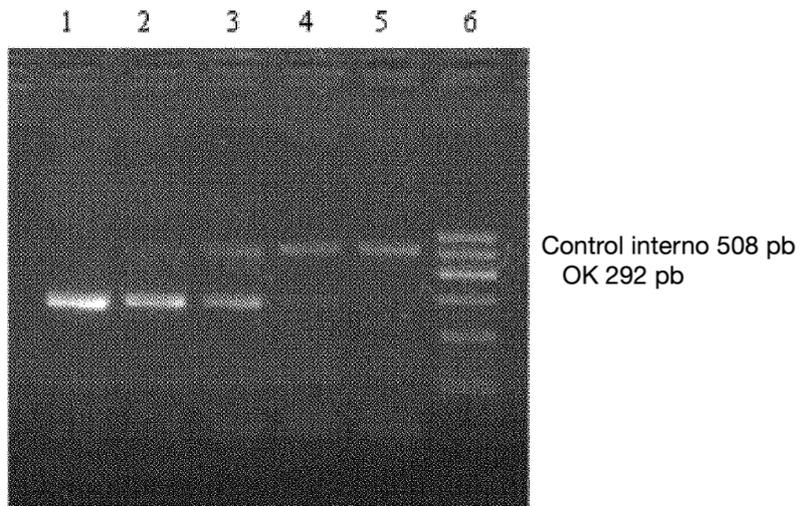


FIG. 8

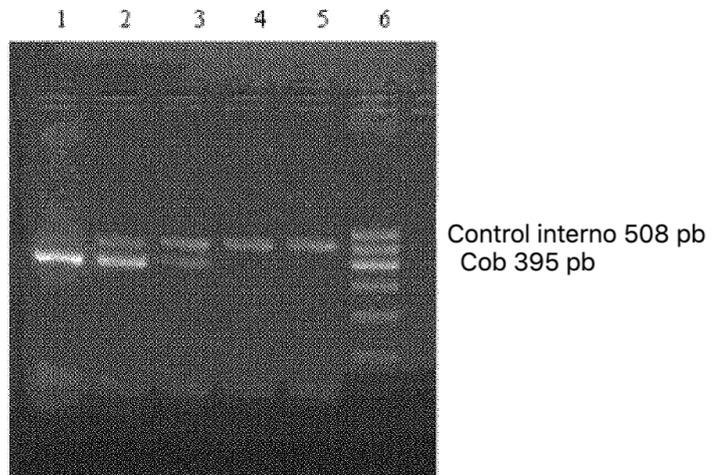


FIG. 9

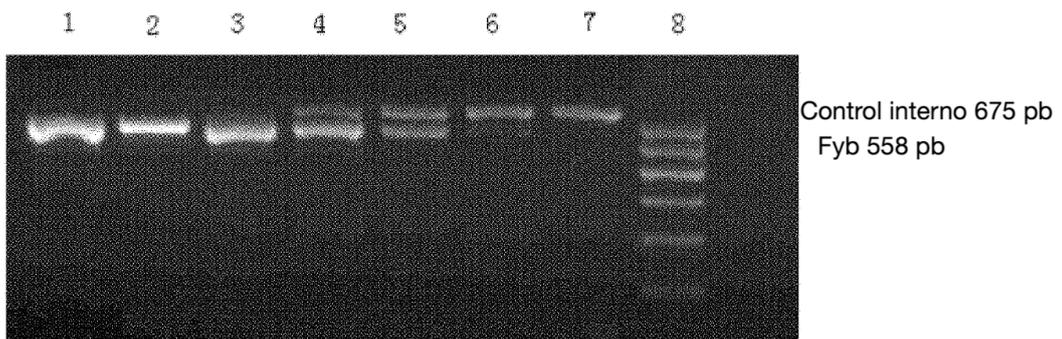


FIG. 10

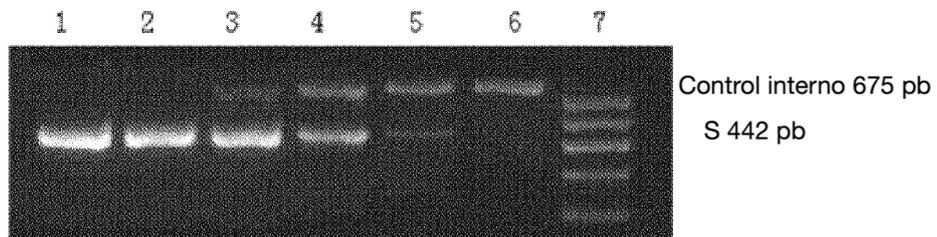


FIG. 11