

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 833**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2016 PCT/EP2016/076526**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17076957**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2016 E 16795257 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 3371322**

54 Título: **Método para la identificación del género en pollos domésticos**

30 Prioridad:

**03.11.2015 EP 15192841**

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

**08.07.2020**

73 Titular/es:

**DIREGG GMBH (100.0%)  
Am Kiel-Kanal 44  
24106 Kiel, DE**

72 Inventor/es:

**WEIGEL, MARTIN CHRISTIAN;  
HOFMANN-PEIKER, KARSTEN y  
KLEINE, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 772 833 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

Método para la identificación del género en pollos domésticos

5 La presente invención se refiere a un método para la detección de la presencia o ausencia de al menos una secuencia de ácidos nucleicos específica para el sexo del pollo usando la reacción en cadena de la polimerasa, un kit para llevar a cabo el método de la presente invención y un par de oligonucleótidos.

La cría de gallinas ponedoras requiere la determinación del sexo para separar la descendencia masculina. Los procedimientos convencionales prevén que los pollitos machos se clasifican y posteriormente se sacrifican después de la eclosión. La práctica común para matar los pollitos machos incluye, entre otros métodos, el tratamiento con dióxido de carbono. Estos métodos están actualmente en debate por cuestiones de carácter ético.

10 En la actualidad, la determinación del sexo—el sexado—se realiza mediante la técnica del sexado cloacal, muy utilizada. Sin embargo, la tasa de precisión de esta técnica es bastante baja debido a varios factores, como la variación morfológica de los órganos sexuales en diferentes especies o la experiencia individual de la persona que realiza el sexado cloacal.

15 Otro método permite la determinación de estradiol, sulfato de estrona y testosterona en el fluido alantoideo (Weissmann *et al.*, *Theriogenology*, agosto de 2013; 80 (3): 199-205). Este método permite la determinación del sexo *in ovo* a los 7 a 10 días de incubación. La determinación de las hormonas sexuales se realiza en forma de inmunoensayo enzimático. Sin embargo, la realización de este ensayo inmunológico proporciona solo una precisión y una especificidad bajas. Otra desventaja de este método es que la determinación del sexo solo es predecible no antes de los 7 días de incubación. Además, el ensayo solo permite la evaluación de diferentes concentraciones de hormonas que son características para la discriminación de género. Sin embargo, este inmunoensayo no representa un ensayo que proporcione un sistema de lectura definitivo que de la señal para un resultado positivo o negativo inequívoco. Además, es necesario extraer una cantidad relativamente grande de líquido del huevo. Sin embargo, esto puede tener una influencia negativa sobre el éxito de la nidada siguiente.

25 Ogawa *et al.*, *Chromosome Research* 1997, 5, 93-101 identificaron una región de ADN genómico del cromosoma W de pollo. Esta región de ADN permite que el sexo femenino se pueda determinar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en forma de una banda inequívoca específica de la hembra en el análisis resultante de los productos de la PCR.

30 Además, Aun y Kumaran, *Pertanika J. Trop. Agricola Sci.* 33 (2): 329-336, 2010 describen un protocolo de determinación del género basado en PCR que debería proporcionar una tasa de precisión más alta que los métodos de sexado convencionales. Sin embargo, este protocolo no es eficiente para ser adecuado para el análisis y la automatización de alta producción.

35 Rosenthal *et al.*, 2010 *Poultry Science* 89: 1451-1456 describen un protocolo de tipificación genética sexual de pollos por amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real de marcadores TaqMan en los cromosomas sexuales. Sin embargo, se ha demostrado que esta PCR no es lo suficientemente sensible. Por tanto, este ensayo tampoco es adecuado para el análisis y la automatización de alta producción.

El documento CN 101 130 816 A describe un método de PCR para sexar pollos basándose en la amplificación de una secuencia específica de la hembra en el cromosoma W. Los amplicones obtenidos en dicho documento oscilan entre 246 y 360 pb.

40 La industria de gallinas ponedoras está bajo presión financiera, por lo que no se desea criar la descendencia del pollo macho para evitar cualquier coste adicional por alimentos, agua o tratamiento médico, como la vacunación. Además, no se pretende mantener el pollo macho, ya que, por supuesto, no valen para la puesta de huevos y además no pueden utilizarse para la producción de carne. La producción de carne se realiza con pollos de variedades diferentes de las de pollo utilizadas para la puesta de huevos.

45 En vista de los inconvenientes y necesidades que se han mencionado anteriormente, la presente invención fundamenta el problema técnico para proporcionar un método mejorado con respecto a las demandas de fiabilidad, precisión, robustez, análisis de alto rendimiento y automatización para la determinación del sexo en pollos domésticos de criaderos.

50 La presente invención supera los inconvenientes de los métodos de la técnica anterior y proporciona como solución para el problema técnico subyacente un método mejorado para la determinación del sexo en pollos domésticos, método que se basa en la detección de secuencias nucleicas distintas específicas para el cromosoma W del pollo.

La solución técnica de la presente invención se define en particular en el objeto de las reivindicaciones.

La invención se ilustra adicionalmente en las siguientes figuras.

La Figura 1 muestra la secuencia de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 que representa un fragmento de cromosoma W del pollo. Se subraya con una línea negra el intervalo del nucleótido 46 al 446.

La Figura 2 muestra el resultado de una PCR en tiempo real. El ADN del pollo macho se representa en diferentes concentraciones.

La Figura 3 muestra el resultado de una PCR en tiempo real. El ADN del pollo hembra se representa en diferentes concentraciones.

- 5 La Figura 4 muestra los resultados de una PCR de punto final con detección por fluorescencia y proporciona un ejemplo para el análisis de alto rendimiento.

En el contexto de la presente invención, el término "PCR" se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa, que es un procedimiento de amplificación de una diana. El término "amplificación de la diana" se refiere a un procedimiento mediado por enzimas que es capaz de producir miles de millones de copias de secuencias diana de ácido nucleico. La PCR como método particular de amplificación de la diana es bien conocida por los expertos en la técnica. En general, la realización de la PCR prevé que una muestra de ADN se mezcle en una solución con al menos dos cebadores oligonucleotídicos que estén preparados para ser complementarios a cada cadena del dúplex de ADN. Las bases de nucleótidos—dNTPs—y una ADN polimerasa, como la polimerasa Taq, se utilizan para catalizar la formación de ADN a partir de los cebadores oligonucleotídicos y los dNTPs. Al menos uno de los cebadores es un llamado cebador directo que se une en dirección 5' a 3' al extremo 5' de la primera cadena del ADN; el llamado cebador inverso se une en dirección 3' a 5' al extremo 5' de la segunda cadena del ADN. El principio general del procedimiento de PCR prevé que la solución se calienta para desnaturalizar el ADN bicatenario a ADN monocatenario. Después de enfriar la solución a la llamada temperatura de recocido, los cebadores se pueden unir a las cadenas de ADN separadas y la ADN polimerasa cataliza la generación de una nueva cadena al unir los dNTPs a los cebadores. Este proceso se repite en varios ciclos dando como resultado una cantidad correspondiente de productos de PCR amplificados.

La expresión "PCR en tiempo real" se refiere a la detección de productos de PCR a través de señales de fluorescencia que se generan mediante la escisión de una sonda marcada doble durante la hibridación del producto de PCR. Una sonda doblemente marcada tiene un tinte de fluorescencia y un resto desactivador. Son ejemplos de sondas de uso común las sondas TAQMAN®.

- 25 El término "cebador" en el contexto de la presente invención se refiere a secuencias de oligonucleótidos de entre 10 y 30 nucleótidos de longitud. El término "cebador" se refiere también a un oligonucleótido que es capaz de proporcionar un punto de inicio para la síntesis de 5' a 3', siendo el resultado de esta síntesis—el producto de extensión del cebador—complementario a una cadena de ácido nucleico. El producto de extensión del cebador generalmente se sintetiza en presencia de nucleótidos apropiados y un agente para la polimerización tal como una ADN polimerasa en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. De acuerdo con la presente invención, las secuencias de oligonucleótidos de los cebadores tienen entre 10 y 30 nucleótidos, por ejemplo, cualquier intervalo entre 10 y 30 nucleótidos, como entre 10 y 25 nucleótidos, entre 15 y 30 nucleótidos, entre 18 y 25 nucleótidos, entre 18 y 30 nucleótidos, entre 10 y 20 nucleótidos, o entre 15 y 20 nucleótidos, etc.

- 35 El término "sonda" según la presente invención se refiere a un oligonucleótido que forma una estructura híbrida con una secuencia diana contenida en una molécula en una muestra que se somete a análisis, debido a la complementariedad de al menos una secuencia en la sonda con la secuencia diana. De acuerdo con la presente invención, las secuencias de oligonucleótidos de las sondas tienen entre 15 y 40 nucleótidos, por ejemplo, cualquier intervalo entre 15 y 40 nucleótidos, tal como entre 15 y 30 nucleótidos, entre 15 y 25 nucleótidos, entre 18 y 30 nucleótidos, entre 10 y 20 nucleótidos, o entre 15 y 20 nucleótidos, etc.

- 40 El término "cromosoma W" de acuerdo con la presente invención se refiere al cromosoma W o a fragmentos del cromosoma W. En el contexto de la presente invención, el término "cromosoma W" se refiere a un fragmento particular del cromosoma W como se describe en Ogawa *et al.*, Chromosome Research 1997, 5, 93-101. En particular, el término "cromosoma W" se refiere al cromosoma W de pollo. Además, el término "cromosoma W" también puede relacionarse con el cromosoma W de las aves Carinatae en general, incluido el grupo de todas las aves y sus parientes extintos que poseen una quilla, o "carena", en la parte inferior del esternón utilizada para anclar grandes músculos de vuelo. Así pues, las aves Carinatae pueden incluir, por ejemplo, pollo leghorn blanco, pavo doméstico o pato doméstico.

- 45 El término "HKG" en el contexto de la presente invención se refiere a un gen *haus keeping*, o gen constitutivo, de Gallus. Este gen se describe en Koppel *et al.*, Eur Food Res Technol (2010) 230: 367-374. La detección de HKG permite la determinación de una conducción positiva de la PCR en el contexto de la presente invención. En particular, la detección de HKG permite determinar la presencia de ADN de pollo macho.

- 50 Un primer tema de la presente invención se refiere a un método para la detección de la presencia o ausencia de al menos una secuencia de ácidos nucleicos específica para el sexo del pollo en una muestra biológica usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en donde el método comprende las siguientes etapas de: (a) proporcionar una secuencia de ácidos nucleicos de la muestra biológica, (b) amplificar y detectar al menos una secuencia diana específica para el sexo del pollo usando PCR, en donde se usa un cebador directo y un cebador inverso, el cebador directo y el cebador inverso comprenden cada uno de ellos un oligonucleótido de entre 10 y 30 nucleótidos de longitud y de al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos ubicada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1, en donde el cebador directo se selecciona entre en grupo consistente en SEQ ID NO: 2, 4, 6 y

8 y el cebador inverso se selecciona entre el grupo consistente en SEQ ID NO: 3, 5, 7 y 9, y en donde la secuencia diana tiene un tamaño en el intervalo de aproximadamente 60 pares de bases (pb) a 160 pb, y se usa una sonda que comprende un oligonucleótido entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos situada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1 y un colorante fluoróforo y/o un apagador o desactivador, en donde la secuencia de ácidos nucleicos específica para el sexo del pollo es una secuencia del cromosoma W del pollo, en donde el método se lleva a cabo en formato de alta producción y en donde la detección es posible con 1 a 3 copias génicas de la secuencia diana en la muestra biológica.

Los autores de la presente invención pudieron demostrar que se puede realizar una determinación fiable del cromosoma W de pollo hembra si se seleccionan los cebadores directo e inverso entre un margen de nucleótidos distinto del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1. La SEQ ID NO: 1 representa una secuencia específica de la hembra del cromosoma W como se describe en Ogawa *et al.*, Chromosome Research 1997, 5, 93-101. Los autores de la presente invención pudieron proporcionar un método fiable, preciso y robusto para la determinación del sexo en pollos sobre la base de la aplicación de una PCR que utiliza cebadores distintos que se encuentran en dicha región desde el nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1. El método de la presente invención tiene las ventajas de que ya solo 1 a 3 copias del genoma del material biológico de partida son suficientes para permitir la discriminación de género y predecir la presencia de pollitos. En consecuencia, es posible determinar ya en un punto muy temprano en el tiempo desde el día 3 en adelante o más tarde después de la incubación del huevo.

Una ventaja adicional del método de la presente invención es que el tamaño del producto de amplificación es relativamente pequeño, con 70 a 160 pb. Dicho tamaño de producto de amplificación permite también una mejora de productividad, sensibilidad y especificidad de la PCR. Una ventaja adicional de un producto de amplificación tan pequeño es el hecho de que se inhibe la generación de estructuras secundarias no deseadas y por tanto se puede lograr una alta sensibilidad. También es de señalar que, en contraste con el conjunto de cebadores como se describe en Ogawa *et al.*, 1997, el presente método de la invención prevé utilizar la secuencia diana exacta y no la provisión de un sistema degenerado.

De acuerdo con lo anterior, el tamaño del producto de amplificación, que significa la secuencia diana del método de la presente invención, es un factor crucial para un método de detección fiable en una aplicación de alto rendimiento. La relación entre la longitud del producto de amplificación, que significa el producto de la PCR o el tamaño del amplicón, y la sensibilidad, productividad y especificidad de la PCR, es un factor importante. Por un lado, un ensayo de PCR con un amplicón de tamaño demasiado corto (< 70 pb) tiende a ser inespecífico. Esto significa que, en condiciones de número bajo (< 3) de copias de la plantilla, se producen señales de positivo falso. Por otro lado, un agrandamiento del tamaño del amplicón (> 160 pb) reduce la productividad de la PCR, por lo que la probabilidad de detectar 1-3 copias de la secuencia diana disminuirá significativamente. Como consecuencia, solo un tamaño limitado y bien definido del amplicón de la PCR permite una determinación del género fiable, como líquido alantoideo en una etapa de desarrollo embrionario temprano.

Además, en el caso de la determinación de una secuencia diana sobre la base del material biológico obtenido del huevo para llevar a cabo la identificación del género, debe tenerse en cuenta que generalmente solo hay disponible una pequeña cantidad de material de ADN. La razón de esto es que solo se puede obtener una pequeña cantidad de material biológico y por tanto puede obtenerse del huevo una pequeña cantidad de ADN de origen en esta etapa temprana de desarrollo para evitar cualquier daño serio del embrión que luego puede conducir a un aborto del proceso de incubación posterior. Por tanto, la amplificación de una secuencia objetivo de mayor tamaño requeriría una mayor cantidad de ADN de origen, que sin embargo no es disponible debido a las razones mencionadas anteriormente.

Así pues, los inventores identificaron que un tamaño de la secuencia en el rango de aproximadamente 70 pb a 160 pb proporciona resultados muy específicos, sensibles y fiables en el método para la detección según la presente invención. Los resultados específicos, sensibles y fiables son importantes para la aplicación del método en formato a gran escala, como el formato de alto rendimiento. Ventajosamente, el método de acuerdo con la presente invención es capaz de proporcionar resultados fiables, específicos y sensibles incluso con una cantidad muy baja de material fuente, tal como solamente 1 a 3 copias génicas. En contraste con esto, los métodos descritos en la técnica anterior están dirigidos a tamaños de producto más grandes de los productos de amplificación, tales como productos de amplificación de un tamaño de más de 240 pb. Sin embargo, en vista de los requisitos para proporcionar un método que también sea adecuado para proporcionar resultados confiables y sensibles sobre la base de una baja cantidad de ADN de origen, estos métodos conocidos no cumplen con estas demandas.

En una realización preferida de la presente invención, la secuencia diana tiene un tamaño en el intervalo de aproximadamente 75 pb a 155 pb, preferiblemente de aproximadamente 75 pb a 140 pb, preferiblemente de aproximadamente 75 pb a 120 pb, más preferido de aproximadamente 75 pb a 100 pb, preferido en particular de aproximadamente 76 pb. De acuerdo con la presente invención, se prevé que cualquier rango intermedio del tamaño de la secuencia diana se prefiere dentro del intervalo de 70 pb a 160 pb. En una determinada realización preferida particular, la secuencia objetivo tiene un tamaño de 76 pb. Además, ciertas realizaciones preferidas comprenden un tamaño de la secuencia diana de 77 pb, 78 pb, 79 pb, 80 pb, 81 pb, 82 pb, 83 pb, 84 pb, 85 pb, 86 pb, 87 pb, 88 pb, 89 pb, 90 pb, 91 pb, 92 pb, 93 pb, 94 pb, 95 pb, 96 pb, 97 pb, 98 pb, 99 pb, 100 pb, 101 pb, 102 pb, 103 pb, 104 pb, 105 pb, 106 pb, 107 pb, 108 pb, 109 pb, 110 pb, 111 pb, 112 pb, 113 pb, 114 pb, 115 pb, 116 pb, 117 pb, 118 pb,

119 pb, 120 pb, o más, hasta un tamaño de la secuencia diana de 160 pb, o al menos cualquier tamaño intermedio de la secuencia diana entre uno de los tamaños citados específicamente, o dentro de cualquier intervalo de tamaños.

De acuerdo con la presente invención, se prevé que se prefieran las siguientes combinaciones de cebador directo e inverso: cebador directo de acuerdo con SEQ ID NO : 2 con cebador inverso de acuerdo con SEQ ID NO: 3; cebador directo de acuerdo con SEQ ID NO: 4 con cebador inverso de acuerdo con SEQ ID NO: 5; cebador directo de acuerdo con SEQ ID NO: 6 con cebador inverso de acuerdo con SEQ ID NO: 7.

En una realización particular preferida de la invención, la combinación es cebador directo de acuerdo con SEQ ID NO: 2 con cebador inverso de acuerdo con SEQ ID NO: 3.

En una realización preferida de la presente invención, se prevé que la PCR sea preferiblemente PCR en tiempo real, PCR de punto final; PCR de punto final con detección de fluorescencia, PCR cuantitativa, PCR digital, PCR de matriz abierta, PCR digital en gotas, PCR digital cuantitativa, PCR en tiempo real cuantitativa, PCR adecuada para alto rendimiento y micromatrices.

El método de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo en formato de alto rendimiento. Es una ventaja de la presente invención que la PCR se puede realizar con un enfoque mayor con numerosos ensayos individuales en paralelo. Por lo tanto, es posible realizar hasta 200000 reacciones por día en forma de un enfoque de alto rendimiento y la automatización respectiva con el método de la presente invención. En una realización preferida adicional de la presente invención, se usa una película como material para llevar a cabo el procedimiento de PCR. Ventajosamente, el uso de una película permite realizar el método de la presente invención en un pequeño volumen de reacción. Preferiblemente, la PCR se realiza con un volumen de reacción de 25 nL a 50 µL.

Por consiguiente, en el caso de llevar a cabo el método de acuerdo con la presente invención en un formato de alto rendimiento extremo, que puede comprender el análisis de aproximadamente 200.000 huevos en 24 h, es una aplicación de un sistema de lectura en tiempo real rápido y muy seguro. De todos modos, es un requisito previo esencial para obtener resultados acerca del sexo del pollo con un máximo de fiabilidad y certeza. La precisión requerida de la predicción debe superar el 95%. La mortalidad del embrión debido a la determinación invasiva debe ser inferior al 5%. Esto es necesario, en vista de las condiciones comerciales en el campo de la crianza, que incluyen una presión extrema de tiempo y costes. Por lo tanto, es obligatorio mantener la sensibilidad, productividad y especificidad máximas, y que los resultados obtenidos sean correctos a la primera vez, ya que difícilmente se puede repetir el método. Ventajosamente, el método de la presente invención es capaz de proporcionar resultados tan fiables y altamente correctos en un formato de alto rendimiento que se logra en particular mediante el uso de una secuencia diana que tiene un tamaño en el intervalo de preferiblemente 60 pb a 160 pb.

Preferiblemente, se prevé utilizar diferentes sistemas de detección de fluorescencia o dispositivos de lectura de fluorescencia para la detección de los productos de la PCR. En otra realización preferida de la invención, se realiza la PCR y se usan dispositivos de flujo lateral para la detección de los productos de la PCR. En una realización particularmente preferida de la presente invención, se prevé la detección visual de productos de PCR con nanopartículas de oro y un dispositivo de flujo lateral de ácido nucleico (NALF). En otra realización preferida, la PCR puede realizarse en un baño de agua.

En otra realización preferida del método de la invención, se prevé que además de los pasos de la reivindicación 1 se realice una PCR adicional, en donde dicha PCR adicional comprende los siguientes pasos de: (a') proporcionar una secuencia de ácidos nucleicos a partir de la muestra biológica, (b') amplificar y detectar al menos una secuencia diana específica para el gen HKG de Gallus, en donde se usa un cebador directo de acuerdo con la SEQ ID NO: 10 y un cebador inverso de acuerdo con la SEQ ID NO: 11.

El HKG adicional representa la determinación del gen constitutivo o *hauskeeping* para Gallus (HKG). Este ensayo permite la determinación del ADN de HKG respectivo en muestras de pollo macho y hembra. Por lo tanto, este ensayo permite determinar si la muestra es un pollo macho, o si la muestra no contiene suficiente ADN para una conducción exitosa de la PCR. En consecuencia, esta PCR del HKG representa también un control de la conducción de la PCR en combinación con la PCR del cromosoma W. Permite decidir si el huevo del que se tomó la muestra debe incubarse aún más, ya que generará un pollo hembra, o si este huevo puede descartarse si generase un pollo macho.

Preferiblemente, se prevé que la PCR específica para el gen HKG se realice junto con la PCR específica para el cromosoma W.

La amplificación y detección en la etapa (b) comprende usar una sonda que comprende un oligonucleótido de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos situada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1, en donde la sonda comprende un colorante fluoróforo y/o un desactivador o apagador.

El uso de una sonda se prefiere en particular en el caso de que el método de la presente invención se realice como PCR en tiempo real. En otra realización preferida de la invención, se lleva a cabo una PCR de punto final con detección de fluorescencia. El uso de una sonda también puede preferirse con otros métodos de PCR conocidos por los expertos en la técnica.

Preferiblemente, la sonda se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 13, 14 y 15.

En otra realización preferida de la presente invención, la etapa (b') también se lleva a cabo comprendiendo el uso de una sonda. Preferiblemente, la sonda es de acuerdo con la SEQ ID NO: 16. En otra realización preferida, la sonda que se usa en la etapa (b') comprende un colorante fluoróforo y/o un desactivador.

- 5 En otra realización preferida, se usa una sonda que comprende un aglutinante de surco menor, que representa una modificación química distinta de la sonda que permite la aglutinación de sondas de menor longitud, en combinación con un colorante fluoróforo y/o un desactivador.

10 En otra realización preferida de la invención, el colorante de fluorescencia y el inhibidor se seleccionan entre el grupo que consiste en 6-Fam, fluoresceína, Hex, joe, vic, TET, BHQ1, Tamra, OQA, Rojo Texas, Rox, Cy5, Cy5.5, Atto680, BHQ2, BHQ3, OQB, OQC, OQD, NED, CALFluorGold540, CALFluorOrange560, CALFluorRed590, Cy3, Cy3.5, Yakima Yellow, Quasar570, Quasar670, AlexaFluor350, ATTO425/532, ATTO425/532, ATTO550, ATTO620, ATTO680, ATTO647N, Dyonics681 y MGB.

En una realización preferida de la presente invención, se prefieren las siguientes combinaciones de fluorescencia 6-FAM con BHQ1, Rojo Texas con BHQ2.

- 15 De acuerdo con la presente invención, se prevé preferiblemente que la muestra biológica sea clara de huevo, preferiblemente de alantoides, plumas, líquido de huevo, células embrionarias de pollo, material embrionario de pollo, yema, cualquier material biológico del huevo y/o embrión de pollo en desarrollo.

En particular, se prevé que la muestra biológica de la presente invención puede ser material genético de pollo, como ADN o ARN.

- 20 En otra realización preferida de la presente invención, se prevé que el cebador directo y/o el cebador inverso tengan una modificación 5' o 3'. Una modificación particularmente preferida es una modificación del ácido nucleico intercalante retorcido (TINA: *Twisted Intercalating Nucleic Acid*). Esta modificación puede mejorar la estabilidad del cebador durante la PCR.

25 Preferiblemente, el método de la presente invención se realiza de acuerdo con lo siguiente: la amplificación en la etapa (b) se realiza de acuerdo con los siguientes parámetros: Etapa 1: 94-98°C durante 1-20 min; Etapa 2: 94-98°C durante 5-15 segundos; Etapa 3: 55-65°C durante 5-60 segundos, opcionalmente volver a la Etapa 2 durante 30-50 ciclos, luego detectar los resultados (como PCR de 2 etapas); si no se realiza la Etapa 2 entonces la Etapa 4: 68-76°C durante 5-60 segundos, vuelta a la Etapa 2 durante 30-50 ciclos y luego detectar los resultados (como PCR de 3 etapas).

30 El método de acuerdo con la presente invención tiene distintas ventajas en comparación con los métodos de la técnica anterior. El método se realiza como PCR en tiempo real, método que permite un sistema robusto, fiable y de lectura rápida para partes del método, como es la detección del cromosoma W—ensayo de cromosoma W-y preferiblemente también de un gen constitutivo (HKG) de *Gallus domesticus*—ensayo HKG. El método según la presente invención permite un análisis de alto rendimiento. Ambas reacciones de PCR pueden realizarse juntas en una sola reacción.

35 Preferiblemente, los colorantes de fluorescencia de acuerdo con el método de la presente invención son tales que los diferentes máximos de absorción de fluorescencia no interactúan entre sí. Por lo tanto, la señal de detección del cromosoma W y la señal del ensayo HKG no se influyen entre sí. Esto se logra en particular de manera tal que preferiblemente los colorantes de información y de desactivación se seleccionan para que sean compatibles entre sí y logren buenos resultados para el ensayo de cromosoma W y el ensayo HKG.

40 El método de la presente invención no requiere que se realice ningún análisis de fragmentos amplificados por PCR, tales como análisis de fragmentos de electroforesis en gel, electroforesis capilar o análisis de la curva de fusión.

Ambos ensayos, el ensayo del cromosoma W y el ensayo del gen constitutivo, provocan un curso de amplificación coherente con una desviación máxima de  $\pm 3,4$  ciclos.

45 Otra ventaja del método de la presente invención es que este método representa una diferenciación biológica molecular fiable del sexo en el pollo dentro también de contenidos de ADN de baja concentración de la muestra biológica que debe investigarse. Además, en caso de que el método de la presente invención se lleve a cabo como un ensayo en el que la detección del cromosoma W se combina con la detección del gen HKG, entonces es posible una diferenciación entre muestras que por una parte no contienen ADN suficiente o por otra parte ADN insuficiente y la presencia de un pollo macho.

50 Según el método de la presente invención, es posible lograr una tasa de 96,6% de pollos hembra correctamente determinada en las muestras biológicas analizadas. Ha de señalarse que no es posible lograr una tasa tan positiva con ninguno de los métodos de la técnica anterior.

El método de la presente invención permite una distinción fiable e inequívoca de pollitos hembras y machos no eclosionados basada en el fluido de huevo o la respectiva muestra biológica utilizada.

El método de la presente invención permite la detección de 1 a 2 copias de ADN W cromosómico de pollo y 1 a 2 copias de ADN de pollo en un ensayo de PCR dependiente de la concentración (ensayo W).

5 La sensibilidad del método de la presente invención es muy alta, lo que también es el resultado de una longitud de amplificación muy corta de los productos de PCR de solo 60 a 300 pb, del hecho de que no se usan bases degeneradas en las secuencias de cebadores y sondas, y del hecho de que no se produce una amplificación inespecífica hasta 50 ciclos de la PCR.

Por lo tanto, el método de la presente invención proporciona linealidad de la detección en el intervalo de 3 a 10000 copias de plantillas. La eficacia de la PCR según la presente invención es muy buena y se encuentra en el intervalo de aproximadamente el 100%.

10 Otro tema adicional de la presente invención se refiere a un kit para determinar la presencia o ausencia de al menos una secuencia de ácidos nucleicos específica para el sexo del pollo en una muestra biológica, comprendiendo el kit un cebador directo y un cebador inverso, cada uno de los cuales comprende un oligonucleótido de entre 10 y 30 nucleótidos de longitud y de al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos localizada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO:1, en donde el cebador directo y el cebador inverso son adecuados para amplificar y detectar al menos una secuencia diana específica para el sexo del pollo usando PCR, en donde el  
15 cebador directo se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8 y el cebador inverso se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 5, 7 y 9, y en donde la secuencia diana tiene un tamaño en el intervalo de 60 pb a 160 pb.

20 El kit comprende también una sonda que comprende un oligonucleótido de entre 15 y 40 oligonucleótidos de longitud y al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos situada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1.

De acuerdo con la presente invención, se prevé preferiblemente que el kit pueda comprender uno o más de los siguientes componentes: una placa de microtitulación, una mezcla de reacción PCR y tampones de amplificación.

25 Se prefiere además prever que la sonda sea útil en la detección del cromosoma W y/o en la detección de HKG. Preferiblemente, la sonda se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 13, 14 y 15 para el ensayo del cromosoma W, y preferiblemente SEQ ID NO: 16 para el ensayo de HKG.

30 Otro tema de las reivindicaciones está dirigido a un par de oligonucleótidos para la amplificación de al menos una secuencia de ácidos nucleicos específica para el sexo del pollo en una muestra biológica que comprende un primer oligonucleótido de entre 10 y 30 nucleótidos de longitud y de al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos localizada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1, y un segundo oligonucleótido de entre 10 y 30 nucleótidos de longitud y de al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos localizada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1.

El primer oligonucleótido se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8, y el segundo oligonucleótido se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 5, 7 y 9.

35 En una realización preferida de la presente invención, se prevé que el par de oligonucleótidos aislados sea la combinación preferida, en donde el primer oligonucleótido es SEQ ID NO: 4 y el segundo oligonucleótido es SEQ ID NO: 5, más preferido en donde el primer oligonucleótido es SEQ ID NO: 6 y el segundo oligonucleótido es SEQ ID NO: 7, en particular preferido en donde el primer oligonucleótido es SEQ ID NO: 2 y el segundo oligonucleótido es SEQ ID NO: 3.

40 La invención se describe con más detalle con los ejemplos que siguen. El contenido de estos ejemplos no debe entenderse como limitante, sino como realizaciones ilustrativas de la presente invención.

#### Ejemplo 1

##### Métodos de PCR de acuerdo con la técnica anterior

45 Se han realizado análisis comparativos de PCR en tiempo real con el subsiguiente HRMA posterior (análisis de curvas de fusión de alta resolución) para determinar los parámetros siguientes: sensibilidad, límite de detección, linealidad, reactividad cruzada, temperaturas de fusión, rendimiento en un ensayo dúplex, resultado de señales de falsos positivos y una coherencia de la amplificación entre HKG y la detección de cromosomas W. El ADN de pollo hembra y macho se ha utilizado como plantilla a una concentración de  $\leq 1,2$  pg a 5 ng.

50 Se ha encontrado que los ensayos que siguen, que usan cebadores específicos para el cromosoma W de pollo como se describe en la técnica anterior, son inaceptables en vista de los parámetros mencionados anteriormente.

Se ha llevado a cabo una PCR basada en los cebadores como se describe en Rosenthal *et al.*, 2010 Poultry Science 89: 1451-1456. Este ensayo ha sido realizado con la designación pmCHD1-Z-Sh para la determinación del cromosoma Z y con la designación pmCHD1-W-Sh para la determinación del cromosoma W. Sin embargo, pudo demostrarse que este ensayo no es adecuado para permitir una determinación fiable del sexo, ya que este ensayo mostró una

amplificación hasta cuatro veces más débil del ADN de pollo macho en comparación con el ADN del pollo hembra. Además, el ensayo pmCHD1-W-Sh no debe ser apropiado para la determinación en vista de los parámetros requeridos mencionados anteriormente. Este ensayo mostró que se produjo reactividad cruzada procedente del ADN del pollo macho y se han referido señales positivas falsas. Además, este ensayo no permitió realizar adicionalmente un ensayo de HKG.

Se ha realizado otra PCR de acuerdo con los cebadores descritos en Aun y Kumaran, *Pertanika J. Trop. Agricola Sci.* 33 (2): 329-336, 2010. Este ensayo se realizó con la designación pmP2P8-CHDWZ para la determinación del cromosoma W y Z. Este ensayo no permitió la realización adicional de un ensayo HKG. Por lo tanto, este ensayo no es adecuado para formar parte de un ensayo dúplex. Se realizó otro ensayo de PCR sobre la base de la publicación de Aun y Kumaran, 2010 con las designaciones pmJVG-GGW para la detección del cromosoma W y pmJVG-GGZ para la determinación del cromosoma Z. El ensayo pmJVG-GGW no permitió una detección fiable del cromosoma W. La tasa de amplificación de este ensayo es muy débil. Se ha observado una mayor reactividad cruzada procedente del ADN de pollo macho y se produjeron señales falsas positivas. Además, la detección del cromosoma W no ha sido posible en el caso de solamente 1 a 3 copias de ADN de pollo en la muestra biológica.

En resumen, ninguno de los cebadores descritos en la técnica anterior permitió establecer un ensayo de PCR confiable para proporcionar una determinación definitiva e inequívoca del cromosoma W en el ADN de pollo. Por lo tanto, no es posible una discriminación adecuada del sexo sobre la base de los cebadores descritos en la técnica anterior.

#### Ejemplo 2

Realización de PCR en tiempo real de acuerdo con el método de la invención.

Se realizó un ensayo dúplex para la detección del cromosoma W y HKG como ensayo de control. La designación de este ensayo ha sido pmGGW-76-TxRed. El objetivo de este ensayo dúplex es la determinación del cromosoma W (ensayo W) como una parte del ensayo dúplex y de un gen constitutivo de Gallus (ensayo HKG) como segunda parte del ensayo dúplex.

En una primera etapa, el ADN se extrajo del líquido del huevo en el día 3 de la cría de los huevos. La PCR se realizó con los siguientes parámetros:

Se ha generado una mezcla qPCR:

mezcla qPCR

2-5x mezcla maestra que comprende tampón, polimerasa, dNTP, Mg<sup>2+</sup>

Mg<sup>2+</sup>: 1-6 mM por reacción

dNTPs : 50-800 µM cada uno por reacción

oligonucleótidos: 50-500 nM por reacción

sondas: 50-500 nM por reacción

plantilla: 1 a 100000 copias

Las condiciones de la PCR proporcionan las siguientes características:

- Polimerasa de inicio en caliente con polimerización de 5' a 3' y actividad de exonucleasa, pero sin actividad de exonucleasa de 3' a 5' (lectura de prueba): para el sistema TaqMan; usar a temperatura ambiente
- Sin Rox como colorante de referencia en la mezcla enzimática: permite el análisis en el rango de emisión del colorante informador Rojo Texas.
- Uso de los siguientes dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Se da una mayor sensibilidad y eficiencia de reacción en vista de dUTP.
- Por tanto, no se usa uracilo ADN glucósido (UDG).
- Opcional: 0,5-3% DMSO o 0,5-3% formamida

Reacción de PCR

Etapas 1: 94-98°C durante 1-20 min

Etapas 2: 94-98°C durante 5-15 segundos

Etapas 3: 55-65°C durante 5-60 segundos, regresar a Etapas 2 durante 30-50 ciclos, luego leer los resultados



Obligatorio:

Etapa 4: 68-76°C durante 5-60 segundos, volver a Etapa 2 durante 30-50 ciclos, luego leer los resultados Opcional: leer los resultados en caso de que se realice una PCR de punto final.

Cebador

5 Contenido de GC: 40-80%

Temperatura de fusión Tm: 58-80°C

Longitud de los oligonucleótidos: 15-30 pb

No se utilizan bases degeneradas.

Opcional: modificación en el extremo 5': ácido nucleico intercalante retorcido: TINA (Eurofins)

10 Sondas

Se han utilizado sondas de doble etiqueta

Contenido de GC: 40-80%

Temperatura de fusión Tm: 59-75%

Longitud de las sondas: 15-40 pb

15 Modificación de la sonda 1 en el extremo 5': 6-Fam, Fluoresceína, Hex, Joe, Vic, TET

Modificación de la sonda 1 en el extremo 3': BHQ1, Tamra, OQA

Modificación de la sonda 2 en el extremo 5': Rojo Texas, Rox, Tamra, Cy5, Cy5.5, Atto680

Modificación de la sonda 2 en el extremo 3': BHQ2, BHQ3, OQB, OBC, OQD

Los resultados de la PCR en tiempo real se representan en las correspondientes figuras.

20 La Figura 1 muestra la SEQ ID NO: 1 que representa el fragmento de cromosoma W de pollo. Subrayado con una línea negra está el intervalo del nucleótido 46 al 446. En este rango se encuentran los cebadores y sondas preferidos que proporcionan la realización ventajosa del método de la presente invención.

25 La Figura 2 muestra el resultado de una PCR en tiempo real. Se representa el ADN de pollo macho en diferentes concentraciones. El ADN masculino se muestra en los canales representados con la línea de puntos y representa una señal positiva para HKG. No se pueden observar señales en el canal representado con la línea recta oscura que representa la señal para el cromosoma W.

La Figura 3 muestra el resultado de una PCR en tiempo real. El ADN de pollo hembra se representa en diferentes concentraciones. Las señales se muestran en el canal con la línea de puntos que representa las señales HKG. El canal con la línea oscura recta representa señales del cromosoma W.

30 En las Figuras 2 y 3 se muestra también que los controles negativos y los controles "ninguna plantilla" están en el nivel de fondo por debajo del umbral.

35 La Figura 4 muestra los resultados de una PCR de punto final con detección de fluorescencia. Los puntos con forma de estrella representan controles negativos y controles de "ninguna plantilla". Los puntos con fondo blanco representan el ADN del pollo macho en diferentes concentraciones. Los puntos negros representan el ADN femenino en diferentes concentraciones. En la esquina superior derecha de la figura 4, se representa una placa de microtitulación representativa que presenta el resultado de muestras individuales. En el medio y en la parte inferior del lado derecho de la Figura 4 se muestran las interpretaciones de los canales de fluorescencia.

Los cebadores y sondas preferidos utilizados en este ejemplo son:

Ensayo W

40 Cebador directo: de acuerdo con SEQ ID NO: 2

Cebador inverso: de acuerdo con SEQ ID NO: 3

Sonda: de acuerdo con la SEQ ID NO: 12

Ensayo HKG

## ES 2 772 833 T3

Cebador directo: de acuerdo con SEQ ID NO: 10

Cebador inverso: de acuerdo con la SEQ ID NO: 11

Sonda: de acuerdo con la SEQ ID NO: 16

5 Preferiblemente, la sonda del ensayo del cromosoma W se modifica con Rojo Texas, y la sonda del ensayo HKG se modifica con FAM en combinación con BHQ1.

El ensayo dúplex según la presente invención proporciona las siguientes ventajas. La determinación del cromosoma W no muestra ninguna reactividad cruzada en vista del ADN del pollo macho hasta 50 ciclos de PCR. HKG se amplifica con la misma eficacia del ADN de pollo macho y hembra. Ambas partes del ensayo poseen la misma eficiencia de la PCR, dependen de la concentración y son lineales con un límite analítico de detección de < 3 copias del genoma.

10 Se pudo demostrar que ambos ensayos no presentan señales falsas positivas hasta 50 ciclos de PCR. La detección de los productos de la PCR también se ha llevado a cabo utilizando una sonda correspondiente.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Planton GmbH
- <120> Método para la identificación del género en pollos domésticos
- 5 <130> PLA-017 PCT
- <160> 16
- 10 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1  
<211> 589  
<212> ADN
- 15 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Fragmento de cromosoma W del pollo
- 20 <400> 1  
gaattctata gataaatagt gtagtcacta tgaacttgag atagtgactt ccttctggca 60  
aagatcctaa ttcaaagga gtatctagca gttatgggcc tatgcctacc acattcctat 120  
ttgctagatg tctttgatga ctataatcaa aacaacatga aatactaagc ataagcaatc 180  
atgttaacat tagggtcact gaattttact taaaagtttc agtgcattta ttttactgtg 240  
tatttcctgt ttatccaccc tagattggtt aacctatttc attgacaatt tatctatctc 300  
caggggaaag ctgtatacaa gcaaggaact aatcagtgcc caacaacaac gataaatggt 360  
ttagaatcac ctaatgtgcg gaatgtcaat tttaactgaa atccacttca ggtcagatta 420  
tctctcagac tcaacctgaa cccattactt agaagatggg ctgaagtcca gctgaagcac 480  
ttaaaacaca aagtgaactg agagggtcct aaacaaaacg cattcaaagt agtagtagtt 540  
tggtttcctt tcccagaaag aatgctctga gtatgtcttc aaagaattc 589
- <210> 2  
<211> 20  
<212> ADN
- 25 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Cebador directo cromosoma W GP1GGW\_76bp
- 30 <400> 2  
ctaagtgcg gaatgtcaat 20
- <210> 3  
<211> 20  
<212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>  
<223> Cebador inverso cromosoma W GP2GGW\_76bp
- 40 <400> 3  
aatgggttca ggttgagtct 20
- <210> 4  
<211> 20  
<212> ADN
- 45 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador directo cromosoma W GP1GGW\_116bp

5 <400> 4  
 gcagttatgg tcctatgcct 20

<210> 5  
 <211> 22  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso cromosoma W GP2GGW\_116bp

15 <400> 5  
 ttcagtgacc ctaatgtaa ca 22

<210> 6  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador directo cromosoma W GP1GGW\_152bp

25 <400> 6  
 ctatctccag gggaaagctg 20

<210> 7  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso cromosoma W GP2GGW\_152bp

35 <400> 7  
 atgggttcag gttgagtctg 20

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

45 <220>  
 <223> Cebador directo cromosoma W GP1GGW\_66bp

50 <400> 8  
 gacttccttc tggcaaagat 20

<210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador inverso cromosoma W GP2GGW\_66bp

60 <400> 9  
 tggtaggcat aggaccataa 20

<210> 10  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

# ES 2 772 833 T3

<220>  
<223> Cebador directo gen HKG GP1Gallus1F

5 <400> 10  
cagctggcct gccgg 15

<210> 11  
<211> 21  
<212> ADN  
10 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador inverso gen HKG GP2Gallus1R

15 <400> 11  
cccagtggaatgtgtgtattc a 21

<210> 12  
<211> 21  
20 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sonda cromosoma W GS1GGW\_76bp

25 <400> 12  
actgaaatcc acttcaggtc a 21

<210> 13  
30 <211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Sonda cromosoma W GS1GGW\_116bp

35 <400> 13  
accacattcc tatttgctag atgt 24

40 <210> 14  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Sonda cromosoma W GS1GGW\_152bp

<400> 14  
50 tcagtgccaa caacaacgat 20

<210> 15  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Sonda cromosoma W GS1GGW\_66bp

<400> 15  
60 cctaattcaa agggagtatc tagca 25

<210> 16  
<211> 23  
<212> ADN  
65 <213> Secuencia artificial

# ES 2 772 833 T3

<220>

<223> Sonda gen HKG GS1Gallus1

<400> 16

5 tctgccactc ctctgcaccc agt 23

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la detección de la presencia o ausencia de al menos una secuencia de ácidos nucleicos específica para el sexo del pollo en una muestra biológica usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en donde el método comprende las siguientes etapas de:
  - 5 (a) proporcionar una secuencia de ácidos nucleicos de la muestra biológica,
  - (b) amplificar y detectar al menos una secuencia diana específica para el sexo del pollo usando PCR, en donde
 

se usa un cebador directo y un cebador inverso, el cebador directo y el cebador inverso comprenden cada uno de ellos un oligonucleótido de entre 10 y 30 nucleótidos de longitud y de al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos localizada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1, en donde el cebador directo se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8 y el cebador inverso se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 5, 7 y 9, y en donde la secuencia diana tiene un tamaño en el intervalo entre 60 y 160 pb; y

se usa una sonda que comprende un oligonucleótido entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos localizada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1, y un colorante fluoróforo y/o un desactivador,

en donde la secuencia de ácidos nucleicos específica para el sexo del pollo es una secuencia del cromosoma W del pollo, en donde el método se realiza en formato de alto rendimiento, y en donde la detección es posible con de 1 a 3 copias génicas de la secuencia diana en la muestra biológica.
- 20 2. El método según la reivindicación 1, en donde la secuencia diana tiene un tamaño en el intervalo de 70 pb a 160 pb, preferiblemente de 75 pb a 155 pb, preferiblemente de 75 pb a 140 pb, preferiblemente de 75 pb a 120 pb, preferido adicionalmente de 75 a 100 pb, preferido en particular de 76 pb.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la PCR se selecciona entre una PCR en tiempo real, PCR de punto final; PCR de punto final con detección de fluorescencia, PCR cuantitativa, PCR digital, PCR de matriz abierta, PCR digital en gotas, PCR digital cuantitativa, PCR en tiempo real cuantitativa, PCR adecuada para alto rendimiento, y micromatrices.
- 25 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde adicionalmente a las etapas de la reivindicación 1 se realiza una PCR adicional, en donde dicha PCR adicional comprende las siguientes etapas de:
  - 30 (a') proporcionar una secuencia de ácidos nucleicos de la muestra biológica,
  - (b') amplificar y detectar al menos una secuencia diana específica para el gen HKG de Gallus, en donde se usa un cebador directo según la SEQ ID NO: 10 y un cebador inverso de acuerdo con la SEQ ID NO: 11.
- 35 5. El método según la reivindicación 4, en donde la PCR específica para el gen HKG se realiza junto con la PCR específica para el cromosoma W.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la sonda se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, 13, 14 y 15.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el colorante de fluorescencia y el desactivador se seleccionan entre el grupo que consiste en 6-Fam, fluoresceína, Hex, joe, vic, TET, BHQ1, Tamra, OQA, rojo Texas, Rox, Cy5, Cy5.5, Atto680, BHQ2, BHQ3, OQB, OQC, OQD, NED, CALFluorGold540, CALFluorOrange560, CALFluorRed590, Cy3, Cy3.5, Yakima Yellow, Quasar570, Quasar670, AlexaFluor350, ATTO425/532, ATTO425/532, ATTO550, ATTO620, ATTO680, ATTO647N, Dyonics681 y MGB.
- 40 8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra biológica es clara de huevo, preferiblemente de alantoides, plumas, fluido de huevo, células embrionarias de pollo, material embrionario de pollo, yema, cualquier material biológico del huevo y/o embrión de pollo en desarrollo.
- 45 9. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cebador directo y/o el cebador inverso tienen una modificación 5' o 3', preferiblemente una modificación de ácido nucleico intercalante retorcido (TINA, *Twisted Intercalating Nucleic Acid*).
- 50 10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la amplificación en la etapa (b) se realiza según los siguientes parámetros:

## ES 2 772 833 T3

etapa 1: 94-98°C durante 1-20 min;

etapa 2: 94-98°C durante 5-15 segundos;

etapa 3: 55-65°C durante 5-60 segundos, opcionalmente vuelta a la etapa 2 durante 30-50 ciclos, luego detectar los resultados;

5 en caso de la etapa opcional en la etapa 3,

etapa 4: 68-74°C durante 5-60 segundos, vuelta a la etapa 2 durante 30-50 ciclos, luego detectar los resultados.

11. Un kit para determinar la presencia o ausencia de al menos una secuencia de ácidos nucleicos específica para el sexo del pollo en una muestra biológica, comprendiendo el kit:

10 (i) un cebador directo y un cebador inverso, cada uno de los cuales comprende un oligonucleótido de entre 10 y 30 nucleótidos de longitud y de al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos localizada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1, en donde el cebador directo y el cebador inverso son adecuados para amplificar y detectar al menos una secuencia diana específica para el sexo del pollo usando PCR, en donde el cebador directo se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8, y el cebador inverso se selecciona entre el grupo que  
15 consiste en SEQ ID NO: 3, 5, 7 y 9, y en donde la secuencia diana tiene un tamaño en el intervalo de 60 pb a 160 pb, y

(ii) una sonda que comprende un oligonucleótido de entre 15 y 40 oligonucleótidos de longitud y de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos localizada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1, en donde la muestra comprende un colorante fluoróforo y/o un desactivador.  
20

12. Un par de oligonucleótidos para la amplificación de al menos una secuencia de ácidos nucleicos específica para el sexo del pollo en una muestra biológica que comprende

25 un primer oligonucleótido de entre 10 y 30 nucleótidos de longitud y de al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos localizada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1, en donde el primer oligonucleótido se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6 y 8, y

un segundo oligonucleótido de entre 10 y 30 nucleótidos de longitud y de al menos 10 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos localizada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1, en donde el segundo oligonucleótido se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, 5, 7 y 9,  
30

en donde el primer oligonucleótido y el segundo nucleótido son adecuados para amplificar y detectar al menos una secuencia diana específica para el sexo del pollo usando PCR, y en donde la secuencia diana tiene un tamaño en el intervalo de 60 pb a 160 pb, y en donde el par de oligonucleótidos se combina con una sonda que comprende un oligonucleótido de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y de al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de nucleótidos localizada en el intervalo del nucleótido 46 al 446 de SEQ ID NO: 1, en donde la sonda comprende un colorante fluoróforo y/o un desactivador.  
35

13. El par de oligonucleótidos aislados según la reivindicación 12, en donde el primer oligonucleótido es SEQ ID NO: 4 y el segundo oligonucleótido es SEQ ID NO: 5, preferido además en donde el primer oligonucleótido es SEQ ID NO: 6 y el segundo oligonucleótido es SEQ ID NO: 7, preferido en particular en donde el primer oligonucleótido es SEQ ID NO: 2 y el segundo oligonucleótido es SEQ ID NO: 3.



1    gaattctata    gataaatagt    gtagtcacta    tgaacttgag    atagtgactt    ctttctggca  
 61    aagatcctaa    ttcaaagga    gtatctagca    gftatggcc    tatgcctacc    acattcctat  
 121    ttgctagatg    tctttgatga    ctataatcaa    aacaacatga    aatactaagc    ataagcaatc  
 181    atgtaacat    tagggtcact    gaatttact    taaaagtffc    agtgcaatta    ttttactgtg  
 241    tatttctgt    ttatccacce    tagattggtt    aacctatttc    attgacaatt    tatctatctc  
 301    caggggaaag    ctgtatacaa    gcaaggaact    aaatcagtgc    caacaacaac    gataaatgtt  
 361    ttagaatcac    ctaattgctg    gaatgtcaat    tttaactgaa    atccacttca    ggtcagatta  
 421    tcctcagac    tcaacctgaa    cccattactt    agaagatggt    ctgaagtcca    gctgaagcac  
 481    ttaaaacaca    aagtgaactg    agaggttcct    aaacaaaacg    cattcaaagt    agtagtagtt  
 541    tggtttcett    tcccagaaag    aatgctctga    gtatgtcttc    aaagaattc

**Fig. 1**

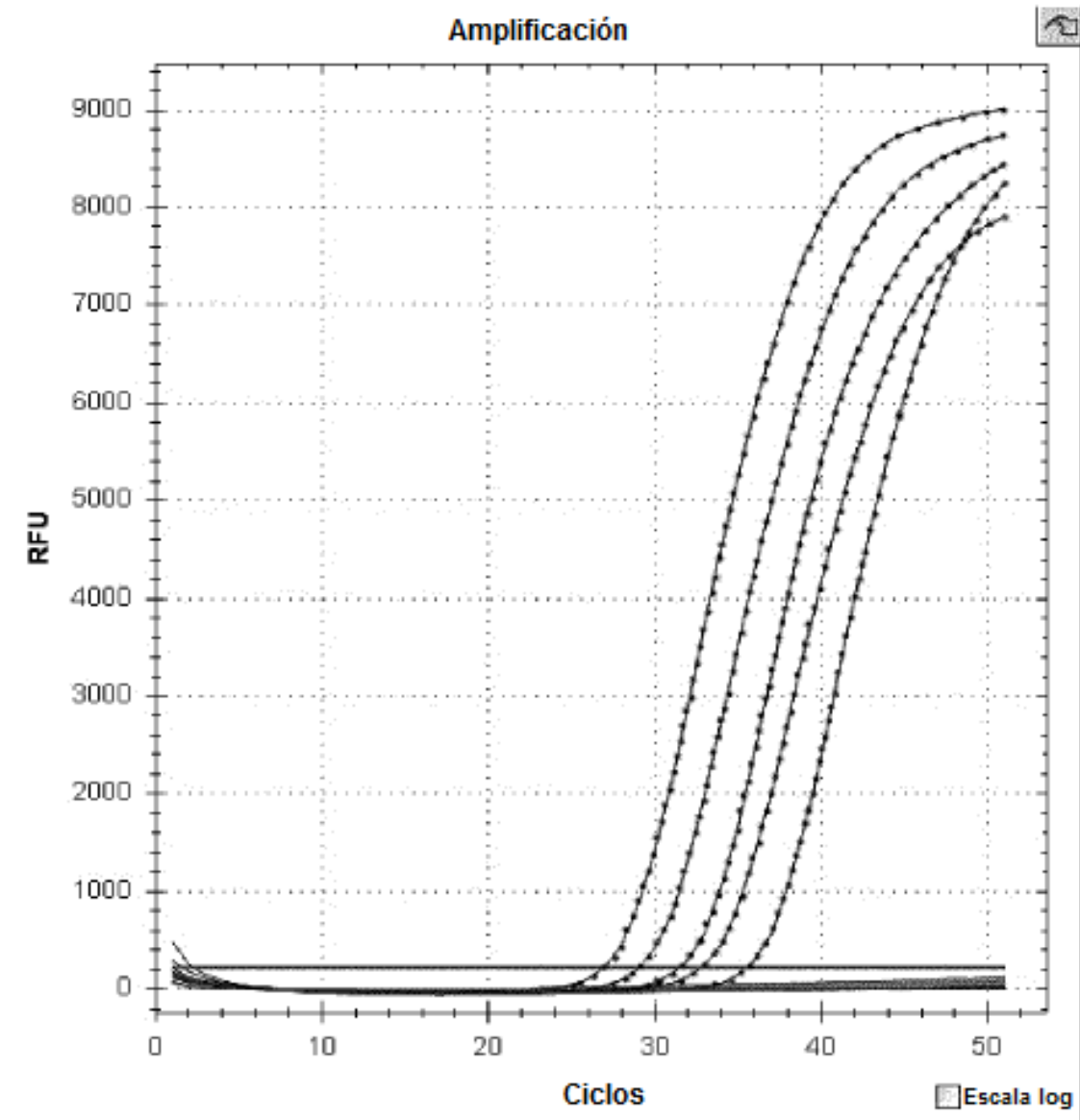


Fig. 2

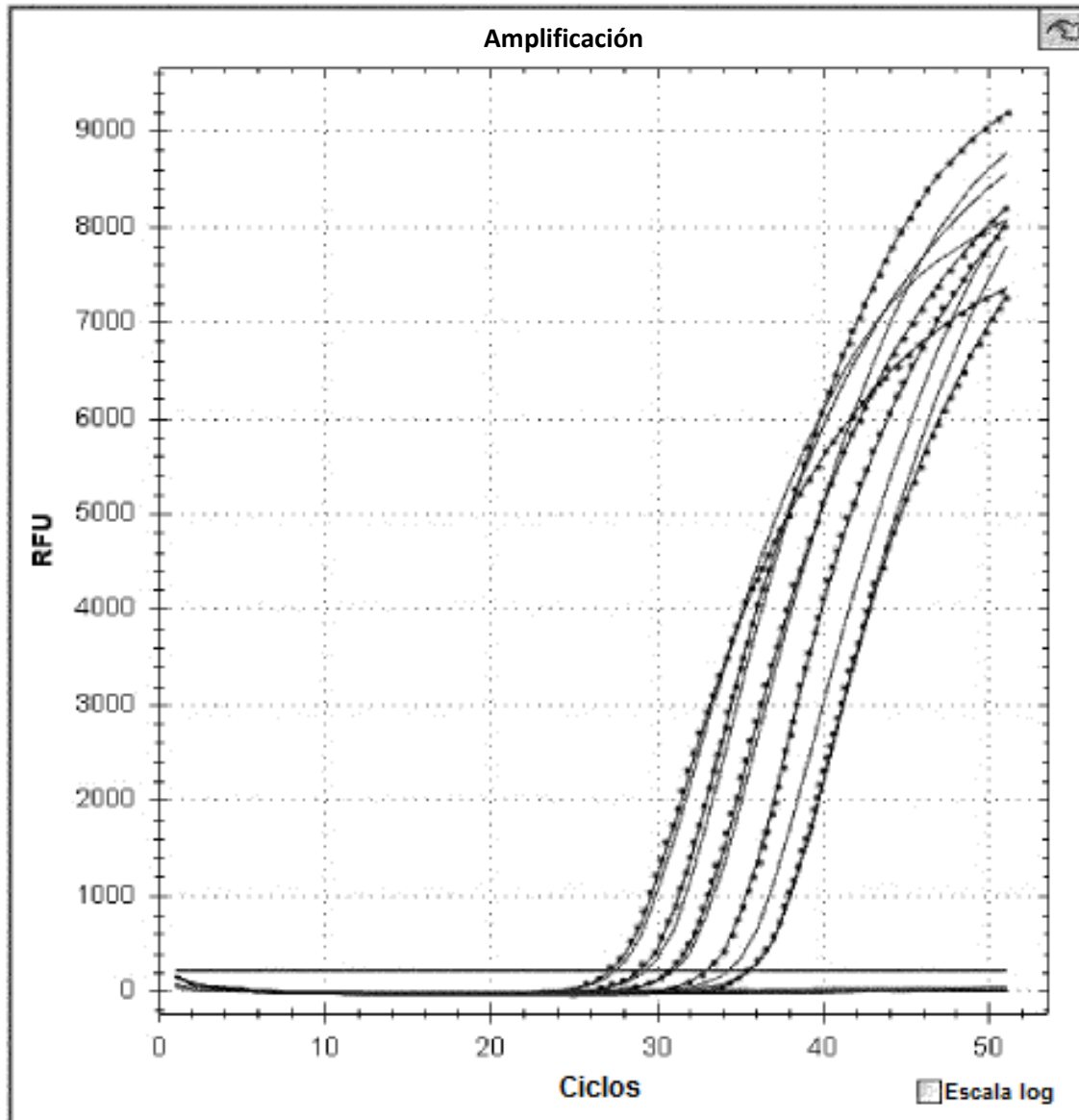


Fig. 3

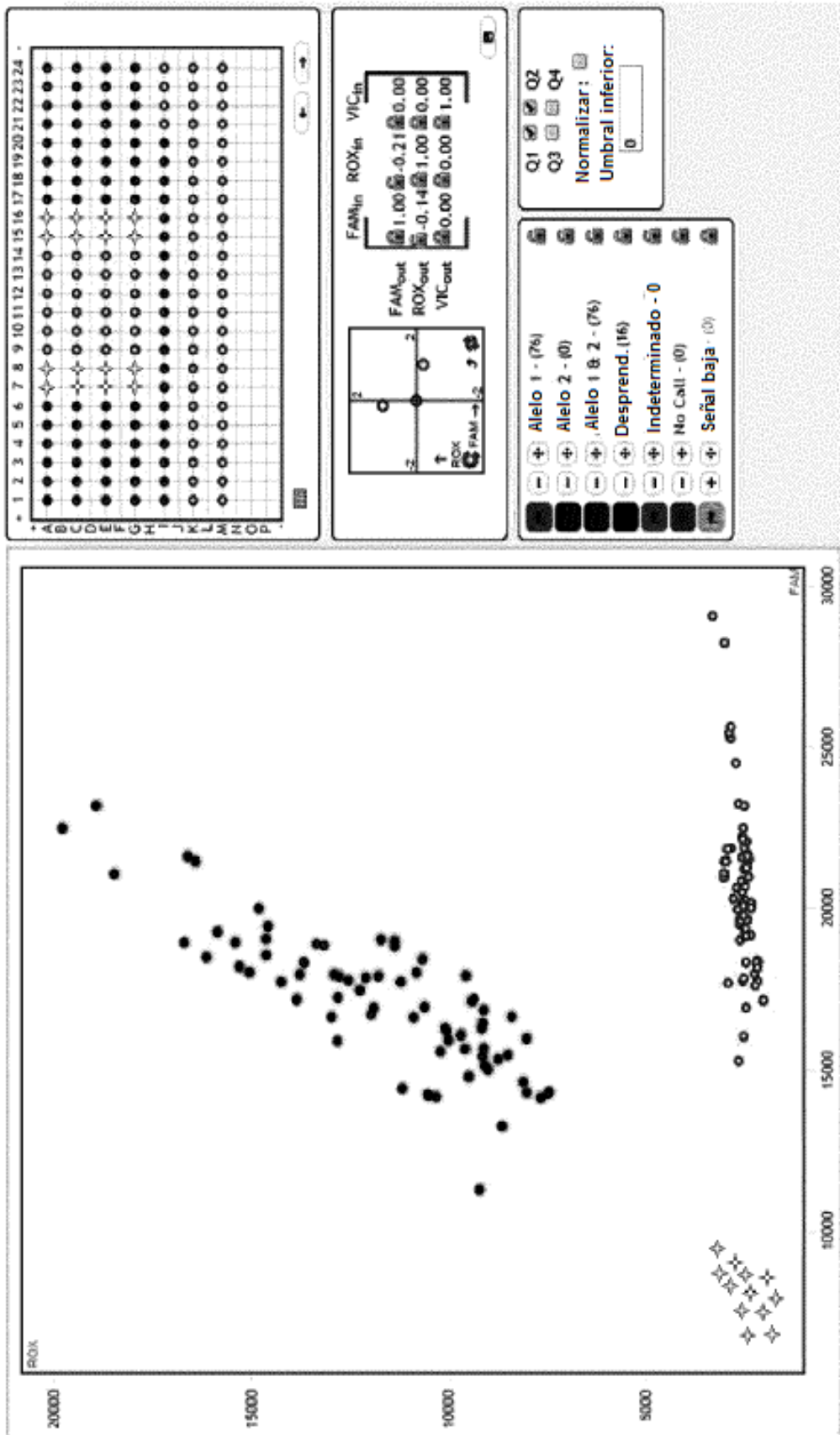


FIG.4