

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
7 de febrero de 2013 (07.02.2013)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/017702 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2011/070565

(22) Fecha de presentación internacional:

1 de agosto de 2011 (01.08.2011)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
2B BLACKBIO S.L. [ES/ES]; C/ Valle de Tobalina 52,
Nave 39, E-28021 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): CASTÁN GARCÍA, Pablo [ES/ES]; C/ Valle de Tobalina 52, Nave 39, E-28021 Madrid (ES). TONIC, Ivana [RS/ES]; C/ Valle de Tobalina 52, Nave 39, E-28021 Madrid (ES). RITCHIE, Alistair Edward [GB/ES]; C/ Valle de

Tobalina 52, Nave 39, E-28021 Madrid (ES). FRANCO DE SARABIA ROSADO, Pedro Manuel [ES/ES]; C/ Valle de Tobalina 52, Nave 39, E-28021 Madrid (ES).

(74) Mandatario: ARIZTI ACHA, Mónica; Hermosilla, 3, E-28001 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE GENOTYPE OF MULTIPLE SEQUENCES

(54) Título : MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO DE SECUENCIAS MÚLTIPLES

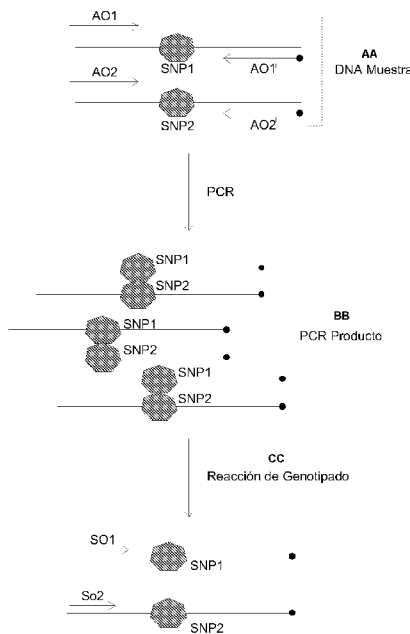


FIG. 2

AA Sample DNA
BB Product PCR
CC Genotyping reaction

(57) Abstract: Method for determining the genotype of multiple sequences. A method is disclosed for the determination of the genotype of multiple sequences of interest, in particular single nucleotide polymorphisms (SNPs). The method uses a single amplification reaction for the amplification of the target sequences that comprise multiple sequences of interest, in particular SNP sites, and a single genotyping reaction for the sequencing of multiple sequences of interest, in particular SNP sites, in a simultaneous manner. The method reduces the number of reactions needed to sequence small regions of interest in longer lengths of DNA of little interest. The method also reduces the cost of the tests that would otherwise require a high number of sequencing reactions, reduces the amount of starting template DNA required for sequencing multiple regions of interest, and yields a product that is technically less complex.

(57) Resumen: Método para la determinación del genotipo de secuencias múltiples. Se da a conocer un método para la determinación del genotipo de secuencias múltiples de interés, en particular de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). El método usa una única reacción de amplificación para la amplificación de las secuencias diana que comprenden secuencias múltiples de interés, en particular sitios de SNP y una única reacción de genotipado para la secuenciación de secuencias múltiples de interés, en particular sitios SNP de forma simultánea. El método reduce el número de reacciones necesarias para secuenciar pequeñas regiones de interés en extensiones

[Continúa en la página siguiente]

WO 2013/017702 A1



SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*
- *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

5 Tradicionalmente el genotipo de secuencias y en particular de SNPs se determina mediante reacciones de microsecuenciación. El método convencional incluye una reacción de PCR para amplificar una región de ADN que contiene la secuencia de interés y en particular el SNP de interés y para amplificar una secuencia de ADN que flanquea la secuencia/SNP de interés y que puede usarse como control de calidad
10 interno. A continuación se lleva a cabo la reacción de microsecuenciación con la cual se puede leer tanto la secuencia que flanquea la secuencia/SNP de interés como la propia secuencia de interés y en particular el SNP pudiendo resolverse su genotipo.

El genotipado de múltiples secuencias y en particular de múltiples SNPs se lleva a cabo haciendo una reacción de PCR y una reacción de secuenciación por cada secuencia
15 y/o SNP de interés. Por ejemplo ver Lin YS, Liu FG, Wang TY, Pan CT, Chang WT, Li WH (2010) "A simple method using Pyrosequencing™ to identify de novo SNPs in pooled DNA samples." *Nucleic Acids Res* 39(5): e28; Mashayekhi F, Ronaghi M. (2007) "Analysis of read length limiting factors in Pyrosequencing chemistry." *Anal Biochem* 363(2): 275-287. El método requiere de múltiples reacciones de secuenciación que
20 encarecen así como alargan el ensayo. Además con este método se precisan grandes cantidades de ADN molde de partida necesarias para secuenciar las múltiples regiones de interés, haciendo por tanto este proceso no factible para casos donde la cantidad de ADN molde de partida objeto de secuenciación es muy escasa.

Además, aunque los procesos de pirosecuenciación usados son relativamente simples,
25 los usuarios se enfrentan a retos debidos a la gran variedad de parámetros a considerar en el desarrollo de la PCR, así como los relativos al diseño de cebadores de secuenciación, y los que afectan tanto a la preparación de muestra como a la dispensación de nucleótidos. Estos retos son laboriosos y costosos. Por ejemplo ver Gharizadeh B, Akhras M, Nourizad N, Ghaderi M, Yasuda K, Nyrén P, Pourmand N.
30 (2006) "Methodological improvements of pyrosequencing technology." *J Biotechnol.* 124(3): 504-511.

Por tanto es clara la necesidad de contar con un método para la determinación del genotipo de secuencias múltiples y en particular de múltiples SNPs que resuelva las desventajas que presentan los métodos descritos hasta la fecha como estado del arte.

35 **RESUMEN DE LA INVENCION**

5 La presente invención tiene como propósito la determinación del genotipo de múltiples secuencias de interés, en particular, de múltiples polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) simultáneamente en una única reacción de secuenciación.

Es un objeto de la presente invención reducir el número de reacciones requeridas para la secuenciación de múltiples secuencias de interés, en particular de múltiples
10 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) mediante el uso de una única reacción múltiplex de genotipado.

Es otro objeto de la presente invención reducir el trabajo y coste que supone el genotipado de múltiples secuencias de interés, en particular de múltiples polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).

15 Sigue siendo otro objeto de la presente invención proporcionar un método para el genotipado de múltiples secuencias de interés, en particular SNPs, este método consta de la amplificación en una muestra de al menos una secuencia objetivo para producir un producto amplificado, en donde dicha secuencia objetivo consta de al menos uno o
20 mas sitios de una secuencia de interés, en particular, polimorfismos de un solo nucleótido (SNP); y del genotipado de dicho producto amplificado mediante el uso de una mezcla de oligonucleótidos de secuenciación, en donde dicha mezcla consta de al menos un oligonucleótido de secuenciación por cada una de las secuencias mencionadas, en particular, sitios de SNP

Sigue siendo otro objeto de la presente invención la determinación del genotipo de
25 múltiples secuencias de interés, en particular, SNPs que están localizados no mas de 1kB uno de otro mediante el uso de una reacción de amplificación simple y una reacción múltiplex de genotipado.

Sigue siendo otro objeto de la presente invención la determinación del genotipo de
30 múltiples secuencias de interés, en particular, SNPs que están localizados a una distancia superior a 1kb mediante el uso de una reacción múltiplex de amplificación y una reacción múltiplex de genotipado.

Sigue siendo otro objeto de la presente invención la determinación del genotipo de
35 múltiples secuencias de interés, en particular, SNPs mediante el uso de reactivos de amplificación gelificados para producir productos amplificados, los cuales posteriormente serán objeto de secuenciación múltiple.

- 5 Los objetos, las realizaciones, las características y las ventajas precedentes y otras de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción mas detallada y particular de la misma así como de las reivindicaciones que de ella se derivan.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- A continuación se describen ejemplos conjuntamente con figuras que tienen el propósito de ilustrar y no de limitar el alcance del concepto inventivo de la presente invención.

FIG. 1 muestra una reacción simple de PCR con una reacción múltiplex de genotipado.

FIG. 2 muestra una reacción múltiplex de PCR con una reacción múltiplex de genotipado.

- 15 FIG. 3 muestra la imagen del gel de agarosa que resulta de la PCR simple, según el ejemplo 1.

FIG. 4 muestra una visión de la calidad global de las reacciones de pirosecuenciación, según el ejemplo 1.

- FIG. 5 muestra la imagen de los pirogramas que se obtienen del genotipado simple y múltiplex de SNP, según el ejemplo 1.

FIG. 6 muestra los resultados del genotipo obtenido para el ADN molde, según el ejemplo 1.

FIG. 7 muestra la imagen del gel de agarosa que resulta de la PCR simple, según el ejemplo 2.

- 25 FIG. 8 muestra una visión de la calidad de las reacciones de pirosecuenciación, según el ejemplo 2.

FIG.9 muestra la imagen de los pirogramas del genotipado simple y múltiplex de SNP, según el ejemplo 2.

- FIG. 10 muestra los resultados del genotipo obtenidos para el ADN molde, según el ejemplo 2.

5 FIG. 11 muestra la imagen del gel de agarosa que resulta de la PCR simple, según el ejemplo 3.

FIG. 12 muestra la imagen del gel de agarosa que resulta de la PCR múltiplex, según el ejemplo 3.

10 FIG. 13 muestra una visión de la calidad global de las reacciones de pirosecuenciación, según el ejemplo 3.

FIG. 14 muestra los resultados del genotipo obtenidos para el ADN molde, según el ejemplo 3.

FIG. 15 muestra la imagen del gel de agarosa que resulta de la PCR gelificada, según el ejemplo 4.

15 FIG. 16 muestra una visión de la calidad global de las reacciones de pirosecuenciación, según el ejemplo 4.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La siguiente descripción de las realizaciones y ejemplos preferidos se proporciona a modo de explicación e ilustración. Como tal, no deben ser vistos como limitantes del
20 alcance de la invención según lo definido por las reivindicaciones. Además, cuando se proporcionan los ejemplos, se hace solamente a modo de ilustración y no con el objeto de ser restrictivos.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones de la presente invención, la siguiente terminología será usada de acuerdo a las explicaciones que se detallan abajo.

25 El término "secuencias de interés" incluye, pero no se limita a, áreas genéticas codificantes o no (es decir intrones/exones), repeticiones en tandem y satélites, regiones líder 5' UTR, puntos de alta intensidad mutacional... y, en general, cualquier fragmento de ADN cuya modificación conduce a cambios en el comportamiento de un organismo en particular en relación al desarrollo de anomalías. Estas modificaciones pueden
30 funcionar a cualquier nivel, genético, genómico o metagenómico, por tanto es necesario abarcar el análisis en paralelo de cada una de ellas

5 El término "diana" incluye, pero no se limita a, moléculas, genes, o genomas, que contienen una secuencia de ácido nucleico o segmento de una secuencia que interesa ser caracterizado mediante identificación, cuantificación o amplificación. Dianas contempladas bajo esta invención pueden ser derivadas de cualquier organismo, incluyendo animales mamíferos y no-mamíferos, bacterias, virus u hongos. Un
10 retrovirus es un ejemplo de una diana que puede ser identificada o cuantificada usando secuencias altamente conservadas para hacer mapeado genómico. Debe entenderse que en su caso, los términos "analito de ácido nucleico", "diana", y "analito diana de ácido nucleico" pueden ser usados alternativamente para identificar un ácido nucleico, una secuencia de ácido nucleico, o un segmento de una secuencia de un ácido nucleico
15 dentro de un organismo, bacteria, o virus, que es objeto de caracterización.

El término "gen" incluye, pero no se limita a, una secuencia particular de ácido nucleico dentro de una molécula de ADN que ocupa una posición precisa en un cromosoma y es capaz de autorreplicación codificando una cadena polipeptídica específica. El término "genoma" se refiere a un conjunto completo de genes en los cromosomas de cada
20 célula de un organismo específico.

Se entenderá, según se describe a continuación, que los términos "nucleótido" y "nucleósido" incluyen, pero no se limitan a, nucleósidos que contienen no solo las cuatro bases nucleotídicas del ADN natural, es decir, las bases de purina guanina (G) y adenina (A) y las bases de pirimidina citosina (C) y timina (T), sino también la base de
25 purina del RNA uracilo (U), las bases de nucleótidos no naturales iso-G e iso-C, bases universales, bases degeneradas, y otros nucleótidos y nucleósidos modificados.

Según se describe a continuación, el término "oligonucleótido" incluye, pero no se limita a, polidexosirribonucleótidos (que contienen 2-dexosi-D-ribosa), polirribonuceótidos (que contienen D-ribosa), y cualquier otro tipo de polinucleótido que es un N-glicósido
30 de una base de purina o de pirimidina, y otros polímeros que contienen caracteres no nucleotídicos (por ejemplo, cualquier tipo de cadena modificada de ADN o ARN de los que se utilizan en diferentes aplicaciones en biología molecular y medicina, donde pueden ser usados como una sonda para investigar enfermedades, infecciones virales, identificar genes, regiones diana específicas dentro de un cromosoma... etc. Estos
35 oligonucleótidos modificados pueden estar hechos de diferentes unidades de bases derivadas de nucleótidos, organizadas en diversas formas tales como ácidos nucleicos de proteínas y polímeros de ácidos nucleicos sintéticos con una secuencia específica

5 comercialmente disponible a través de Anti-Gene Development Group, Corvallis, Oreg.,
tales como polímeros NEUGENE™) o uniones no estándar, siempre que los polímeros
contengan núcleo-bases en una configuración que permita emparejamiento y
alineamiento de las bases, tal como se encuentran en el ADN y ARN. Por tanto,
“oligonucleótidos” aquí mencionados incluyen ADN de cadena doble y simple, así como
10 ARN de cadena doble y simple e híbridos ADN:ARN, y también incluye tipos conocidos
de oligonucleótidos modificados, tales como, por ejemplo, oligonucleótidos donde uno o
mas de los nucleótidos naturales se substituyen por un análogo; oligonucleótidos que
contienen modificaciones inter-nucleótido tales como, por ejemplo, aquellos con
uniones no aniónicas/no catiónicas (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriesteres,
15 fosforomidatos, carbamatos, etc), uniones aniónicas (por ejemplo, fosforotioatos,
fosforoditioatos, etc.), y uniones catiónicas (por ejemplo amino-alquil-fosforomidatos,
amino-alquil-fosfotriesteres), que contienen dominios de interacción tales como, por
ejemplo, proteínas (incluyendo nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-
L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.),
20 aquellos con queladores (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales
oxidativos, etc.), y aquellos con alquilators. No se pretende hacer distinción respecto los
términos “polinucleótido” y “oligonucleótido” que serán usados alternativamente. Estos
términos se refieren únicamente a la estructura primaria de la molécula. Según se
describe a continuación los símbolos para nucleótidos y polinucleótidos se
25 corresponden con los establecidos por la IUPAC-IUBMB comisión conjunta sobre
nomenclatura bioquímica.

El término “oligonucleótido de amplificación” incluye, pero no se limita a, un
oligonucleótido que es complementario a la molécula diana de cADN o ARN y
proporciona el extremo 3'-OH como substrato al cual cualquier ADN polimerasa puede
30 añadir los nucleósidos de una cadena creciente de ADN en la dirección 5'-3'.

El término “simple” incluye, pero no se limita a, un ensayo único que no se lleva a cabo
simultáneamente con ningún otro ensayo. Los ensayos *singleplex* incluyen ensayos
individuales que se llevan a cabo de forma secuencial.

El término “multiplex” incluye, pero no se limita a, ensayos múltiples que se llevan a
35 cabo simultáneamente, en los cuales los pasos de detección y de análisis son
generalmente llevados a cabo en paralelo. Dentro del contexto de la presente
invención, un ensayo multiplex incluirá el uso de cebadores y sondas, solas o en

5 combinación con otros cebadores y sondas adicionales para la identificación, por ejemplo, del virus de la gripe junto con uno o mas virus adicionales. Se entiende que dentro del contexto de la presente invención, los cebadores y sondas para controles internos y ensayos pueden incluir por ejemplo oligonucleótidos.

El término “reactivos de amplificación gelificados” incluye, pero no se limita a, reactivos
10 de amplificación estabilizados que preservan sus cualidades químicas y bioquímicas. Tales reactivos de amplificación incluyen pero no están limitados a, tampones de reacción, mejorantes de reacción, y enzimas que intervienen en una reacción enzimática, en este caso la amplificación de ácidos nucleicos y las reacciones asociadas a la secuenciación mediante síntesis, una vez incluidos todos estos
15 reactivos, tampones de reacción, potenciadores de reacción y enzimas en un mismo contenedor, en este caso tubos o placas multipocillo, de manera que se encuentran dosificados cada uno de ellos en las cantidades óptimas de reacción, y no interactúan ni reaccionan entre sí, inmovilizando la reacción bioquímica en la que intervienen, pudiéndose activar la reacción enzimática a voluntad del usuario, sin haberse producido
20 una disminución significativa de su actividad, habiendo transcurrido días, semanas, meses o incluso años después de su mezcla y estabilización.

La estabilización así entendida se consigue mediante la adición de una mezcla estabilizante a una solución que contiene la mezcla de reacción, y la posterior
25 eliminación de la totalidad o parte del agua presente en la solución resultante. Esta eliminación de la totalidad o parte del agua puede ser conseguida mediante procesos de liofilización, desecado en lecho fluido, desecado a temperatura ambiente y presión atmosférica, desecado a temperatura ambiente y baja presión, desecado a alta temperatura y presión atmosférica, y desecado a alta temperatura y baja presión.

En la presente invención, el procedimiento de estabilización preferentemente utilizado
30 es la estabilización mediante gelificación, descrito en la patente WO 02/072002, asignada a Biotools Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. La mezcla estabilizante de la mezcla de reacción preferentemente está compuesta por trehalosa, melezitosa, lisina o betaína y glucógeno o rafinosa, a diferentes concentraciones en dependencia de la reacción enzimática a estabilizar. Más preferentemente la mezcla de
35 gelificación está compuesta por trehalosa, melezitosa, glucógeno y lisina. El método de extracción del agua de la mezcla de reacción tras la adición de la mezcla de agentes

5 estabilizantes es en la presente invención preferentemente la desecación mediante vacío a temperatura comprendida entre los 30°C y los 40°C, dependiendo de la reacción enzimática a estabilizar. Concretamente, en la presente invención el contenido de humedad se mantiene entre un 10-30% de agua.

La definición o nomenclatura señalada solo tiene el propósito de ser ejemplar y no de
10 ser restrictiva. No debe ser entendida como una limitación del alcance de la invención según lo definido.

A continuación se describen algunas de las realizaciones y ejemplos preferidos de la invención reivindicada. Las realizaciones y modificaciones adicionales en la función, el propósito, o la estructura de las realizaciones expuestas tienen la intención de ser
15 cubiertas por las reivindicaciones de esta solicitud.

La presente invención da a conocer un método para la determinación de secuencias múltiples, en particular, polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) simultáneamente. El método comprende la amplificación de una o mas secuencias diana presentes en una muestra para producir un producto amplificado, y el genotipado del producto
20 amplificado con múltiples oligonucleótidos de secuenciación de forma simultanea. La muestra puede ser una muestra de ADN o una muestra de ARN y la secuencia diana es una secuencia en la muestra de ADN o en la muestra de ARN que comprende una o mas secuencias para ser identificadas, en particular, sitios SNP de interés y una secuencia adyacente la cual puede usarse como control de calidad interno.

25 La reacción de amplificación puede ser una reacción de amplificación simple o una reacción de amplificación multiplex dependiendo de la localización de la secuencia de interés, en particular de los sitios SNP en la muestra. La reacción de amplificación simple se usa cuando dos o mas secuencias de interés, en particular sitios SNP de interés están localizados a una distancia no superior a 1kbp uno de otro. En la reacción
30 de amplificación simple, una única reacción es diseñada con una pareja de oligonucleótidos de amplificación que cubre todas las secuencias relevantes, en particular sitios SNP en un único amplicon. La reacción de amplificación multiplex se usa cuando las secuencias de interés, en particular los sitios SNP de interés están localizados demasiado lejos unos de otros para ser incluidos en un único amplicon, o
35 debido a la presencia de una secuencia intermedia larga, o debido a que las secuencias de interés, en particular los sitios SNP están localizados en diferentes genes o

5 cromosomas. Las reacciones de amplificación multiplex están diseñadas con una mezcla de pares de oligonucleótidos de amplificación que comparten composiciones químicas similares, por lo que pueden ser usados bajo las mismas concentraciones de algunos reactivos, mismas temperaturas de alineamiento y mismos tiempos de extensión. Las composiciones químicas similares deben ser entendidas como unidades
10 de bases de nucleótidos que necesitan ser organizadas de tal forma que cada unidad tenga una base complementaria a la que se unirá. Esto dará como resultado una hebra que tiene un conjunto de bases opuesto al que se une, y es esta combinación de bases la que reporta la secuencia requerida en formato multiplex o simple. La mezcla de pares de oligonucleótidos de amplificación comprende al menos una pareja de
15 oligonucleótidos de amplificación correspondientes a cada una de las secuencias diana que será amplificada.

Los cebadores y oligonucleótidos de amplificación usados son complementarios a los extremos 3' (tres prima) de cada hebra paralela y anti-paralela de la hebra de la secuencia diana. Los oligonucleótidos se alinean primero a la muestra y luego tiene
20 lugar la reacción de amplificación. Uno de los oligonucleótidos de la pareja de oligonucleótidos de amplificación es biotinilado para que el producto amplificado obtenido esté biotinilado.

En una realización ejemplar, la reacción de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sin embargo, otras reacciones de amplificación tales como, aunque
25 no limitadas a, la reacción en cadena de la ligasa (LCR), sistemas de mutagénesis dirigida mediante síntesis (ARMS), PCR alelo específica (ASPCR), PCR degenerada pueden usarse para la amplificación de la secuencia diana sin alterar el alcance ni el espíritu de la presente invención.

En una realización ejemplar, la reacción de amplificación es estabilizada mediante el
30 proceso y reactivos de gelificación descritos en la patente WO 02/072002.

En una realización ejemplar, los oligos de secuenciación están estabilizados mediante el proceso y reactivos de gelificación descritos en la patente WO 02/072002.

El producto amplificado producido mediante una reacción de amplificación simple o una reacción de amplificación multiplex es un híbrido de al menos dos secuencias de
35 interés, en particular sitios SNPs y sus secuencias adyacentes. Este producto amplificado es luego genotipado con una mezcla de oligonucleótidos de secuenciación

5 simultáneamente en una única reacción multiplex de genotipado. La mezcla de oligonucleótidos de secuenciación comprende al menos un oligonucleótido de secuenciación por cada una de las secuencias de interés, en particular sitios SNP de interés. Los oligonucleótidos de secuenciación se unen unas pocas bases corriente arriba a la secuencia de interés, en particular al sitio SNP para iniciar el proceso de
10 secuenciación.

En una realización ejemplar, el genotipado del producto amplificado se hace mediante el método de la pirosecuenciación, sin embargo, otros métodos de genotipado tales como, pero no limitados a, secuenciación Sanger, sistemas de secuenciación masiva por apilamiento de fragmentos (MPSS), secuenciación polarizada, secuenciación
15 illumina, secuenciación SOLiD, secuenciación microfluídica SANGER, secuenciación por hibridación o similares pueden también usarse para el genotipado del producto amplificado sin alterar el alcance y el espíritu de la presente invención.

En una realización ejemplar, la reacción de genotipado se lleva a cabo como sigue: un oligonucleótido o cebador de secuenciación hibrida con un producto amplificado de una
20 sola hebra o amplicon amplificado o amplicon de PCR que sirve como molde, y es incubado con las enzimas, ADN polimerasa, ATP sulforilasa, luciferasa y apirasa así como con los substratos, adenosina 5' fosfosulfato (APS), y luciferina.

Después, el primer desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) se añade a la reacción. La ADN polimerasa cataliza la incorporación de los dNTPs a la hebra de ADN, si es
25 complementario a la base presente en la hebra molde. Cada vez que se produce una incorporación, esta se acompaña de la liberación de pirofosfato (PPi) en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado. La ATP sulforilasa convierte PPi en ATP en presencia de APS. Este ATP conduce la conversión, mediada por la luciferasa, de luciferina en oxiluciferina que produce luz visible en cantidades proporcionales a la
30 cantidad de ATP. La luz producida en la reacción catalizada por la luciferasa es detectada por una cámara o un fotomultiplicador y se observa como un pico en la información de los datos brutos obtenidos (Pirograma). La altura de cada pico corresponde a la señal de luz que es proporcional al número de nucleótidos incorporados durante la reacción de genotipado. Una enzima que degrada los
35 nucleótidos tal como la apirasa, degrada los nucleótidos que no han sido incorporados y el ATP. Cuando se completa la degradación, otro nucleótido es añadido. Este es un

5 proceso continuo durante la reacción de genotipado. La adición de dNTPs es secuencial.

En una realización ejemplar, durante la reacción de genotipado se usa dexosiadenosina alfa-tio-trifosfato (dATP.S) como un sustituto de la dexosiadenosina trifosfato natural (dATP) ya que es muy eficientemente usado por la ADN polimerasa., pero no es
10 reconocido por la luciferasa. Como el proceso continúa, la hebra complementaria de ADN es generada y la secuencia de nucleótidos es determinada a partir de los picos de señal que se trazan en el Pirograma.

En una realización ejemplar, el secuenciador tal como, pero no limitado a, microsecuenciador usado durante la reacción de genotipado es programado con una
15 secuencia diana que incluye las secuencias adyacentes a cada una de las secuencias múltiples de interés, en particular sitios SNPs. Esto permite al software de genotipado determinar si la secuencia de referencia correcta está presente.

FIG. 1 muestra una reacción de PCR simple con una reacción múltiplex de genotipado de acuerdo a una realización ejemplar de la presente invención. La muestra de ADN
20 contiene dos sitios SNP de interés (SNP1 y SNP2) que están localizados a menos de 1kb uno del otro. Una secuencia diana de la muestra de ADN conteniendo ambos sitios SNP (SNP1 y SNP2) es amplificada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para llevar a cabo la PCR, una pareja de oligonucleótidos de amplificación AO1 y AO1' son usados, de los cuales uno de ellos, AO1' está biotinilado. El producto
25 resultante de la PCR está biotinilado y contiene ambos sitios SNP SNP1 y SNP2. Después de producir ADN de cadena simple para servir de molde de la secuenciación, dos oligonucleótidos de secuenciación SO1 y SO2 son alineados al producto de PCR. Durante las reacciones de genotipado las secuencias adyacentes y las que incluyen ambos SNPs se superponen.

30 FIG.2 muestra una PCR multiplex con una reacción multiplex de genotipado de acuerdo a una realización ejemplar de la presente invención. La muestra de ADN contiene dos sitios SNP de interés (SNP1 y SNP2) que están localizados en dos genes diferentes. Dos secuencias diana de la muestra de ADN, cada una de ellas conteniendo uno de los sitios SNP de interés, son amplificadas mediante el uso de dos parejas de oligonucleótidos de amplificación, en donde la primera pareja de oligonucleótidos de
35 amplificación (AO1 y AO1') es para el primer sitio SNP de interés (SNP1) y la segunda

- 5 pareja de oligonucleótidos de amplificación (AO2 y AO2') es para el segundo sitio SNP de interés. Los oligonucleótidos de amplificación AO1' y AO2' están biotinilados. Los productos de PCR resultantes están biotinilados y contienen un sitio SNP. Después de la producción de ADN de cadena simple que sirve de molde de la secuenciación, dos oligonucleótidos de secuenciación SO1 y SO2 son alineados a los productos de PCR.
- 10 Durante las reacciones de genotipado las secuencias adyacentes y las que incluyen ambos SNPs se superponen

El método de acuerdo a una de las realizaciones ejemplares de la presente invención usa una única reacción de amplificación y una única reacción de genotipado reduciéndose el trabajo y costes relacionados con la preparación de la muestra,

15 numerosos ensayos, necesidad de contar con una gran cantidad de ADN de partida y gran número de reacciones de secuenciación. Además, el método es técnicamente menos complicado y también reduce el coste global.

Con el propósito de llevar a cabo el proceso de la presente invención, se describen kits que constan de:

- 20 i) todos los reactivos necesarios en las cantidades y concentraciones óptimas para la generación de una reacción de amplificación simple o multiplex de las dianas de interés (de forma precisa oligonucleótidos de amplificación, ADN polimerasa, dexosinucleótidos y tampón de reacción) todos ellos pre-mezclados y estabilizados por medio del proceso de
- 25 gelificación y,
- ii) oligonucleótidos de secuenciación para el genotipado multiplex de las secuencias de interés, los cuales están estabilizados por medio del proceso de gelificación.

Los siguientes ejemplos se proporcionan meramente como ilustrativos de los diversos

30 aspectos de la invención y no serán interpretados como una limitación de la invención en modo alguno. En los siguientes ejemplos, debe ser entendido que mientras que se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud de los parámetros experimentales (por ejemplo, cantidades, temperatura etc.), un cierto error experimental y desviación deben ser considerados cuando se reproduzcan los experimentos que se describen abajo.

35 EJEMPLOS

5 Ejemplo 1:

TEST CDKN2a PCR SIMPLE, GENOTIPADO MULTIPLEX

A. Materiales

El gen CDKN2a contiene dos SNPs, Rs10757283 y Rs10811661, que están asociados con un incremento del riesgo de sufrir diabetes mellitus tipo II. Estos SNPs están vinculados en equilibrio y están separados por 77 bases. Para generar un amplicon de 246pb, se diseñan los siguientes oligonucleótidos de amplificación: (i) un oligonucleótido forward no modificado de 23 bases y (ii) un oligonucleótido reverso-biotinilado de 20 bases. El oligonucleótido forward presenta una temperatura de alineamiento teórica de 60.8°C y el oligonucleótido reverso tiene una temperatura de alineamiento de 62.4°C. La temperatura óptima de alineamiento de la reacción se determinó experimentalmente en 55°C. Los dos SNPs son leídos por el oligonucleótido de secuenciación 1 de 17 bases, que hibrida 3 bases corriente arriba de Rs10811661 y tiene una temperatura de alineamiento de 50.0°C, y el oligonucleótido de secuenciación 2 de 19 bases, que hibrida adyacente a Rs10757283 y tiene una temperatura de alineamiento de 53.7°C.

Quando se usan individualmente, el oligonucleótido de secuenciación 1 lee la secuencia SEQ ID NO: 1 (TTCYCATGAC) con el orden de dispensación SEQ ID NO: 2 (GTCTCGATGA), y el oligonucleótido de secuenciación 2 lee la secuencia SEQ ID NO: 3 (YTGATATTCT) con el orden de dispensación SEQ ID NO: 4 (GCTCGATAT). En el modo múltiplex las secuencias son leídas con el orden de dispensación SEQ ID NO: 5 (GCTAGCTCGATGA).

B. Métodos**I. Reacción de Amplificación**

Se prepara una mezcla de reacción con los oligonucleótidos de amplificación de CDKN2a. A ésta mezcla de reacción se le añaden 3 µl de enzima ADN polimerasa, fabricada por Biotools Biotechnological & Medical Laboratories S.A., 5 µl de tampón de

- 5 reacción que se comercializa junto con la enzima, entre 0.1 µl y 0.3 µl de una solución 10mM que contiene los cuatro dextrirribonucleótidos que forman la cadena de ácido dextrirribonucleico (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) y entre 0.2 µl y 0.5 µl de una solución 10 µM de la pareja de oligonucleótidos de amplificación descritos en la sección de materiales para generar un amplicon de 246pb que contiene los dos SNPs de interés
 10 (Rs10757283 y Rs10811661).

Preparar 3 alícuotas de 47.0 µl cada una. Añadir además 3.0 µl de ADN molde a una concentración 10ng/µl o agua Milli-Q. Incubar a 95°C durante 3 minutos; a 95°C 20 segundos, a 55°C 20 segundos, a 72°C 30 segundos durante aproximadamente 45 ciclos. Incubar a 72°C durante 5 minutos. Enfriar la alícuota a 10°C.

- 15 Finalizada la amplificación, añadir a 10 µl de producto de PCR 2 µl de tampón de carga y hacer una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 0.5x, teñido con SYBRsafe 1x. Dejar correr el gel durante 30 minutos a 100V en tampón TBE 0.5x, y cargar en un pocillo lateral al lado del producto de PCR 2 µl de marcador de DNA de 100pb como estándar del tamaño de las bandas.

20 I. Reacción de Genotipado

Preparar una placa de 96 pocillos Q96 con 20 µl de tampón de hibridación, y con las siguientes combinaciones de oligos de secuenciación:

Pocillos	10µM CDKN2a S1	10µM CDKN2a S2
A1+A2	3.0µl	0.0µl
A3+A4	0.0µl	3.0µl
A5+A6	3.0µl	3.0µl

- Programar el orden de dispensación: (a) Pocillo A1+A2, SEQ ID NO: 6 (GTCTCATGA)
 25 (b) Pocillo A3+A4, SEQ ID NO: 7 (GCTGATAT) (c) Pocillo A5+A6, SEQ ID NO: 8 (GCTAGCTCGATGA). Añadir 40 µl de tampón de unión y 4 µl de sefarosa estreptavidina a cada producto de PCR. Agitarlo durante 5 minutos. En la estación de trabajo del Q96 se separan las cadenas de ADN y seguidamente se añade el molde de cadena simple a la placa del Q96. Incubar a 80°C durante 2 minutos y enfriar a
 30 temperatura ambiente. Ahora iniciar el programa de genotipado.

5 C. Resultados

I. Reacción de Amplificación

FIG. 3 muestra los resultados del gel de agarosa. Se cargaron en el gel de agarosa 30ng de ADN molde junto con un control sin ADN molde (NTC), dónde se mezclaron 10
10 μ l de producto de PCR con 2 μ l de buffer de carga y se corrió en un gel de agarosa al 2% en TBE 0.5x a 100V durante 30 minutos. El tamaño teórico del producto de PCR es de 246pb

II. Reacción de Genotipado

15

FIG. 4 muestra la calidad global de las reacciones de pirosecuenciación. (a) Pocillos A1 y A2 corresponden al producto de PCR de hebra simple con oligo de secuenciación 1. (b) Pocillos A3 y A4 corresponden al producto de PCR de hebra simple con oligo de secuenciación 2. (c) Pocillos A5 y A6 corresponden al producto de PCR de cadena
20 simple con oligos de secuenciación 1 y 2 a concentraciones equimolares. Los círculos azules representan la alta calidad de la secuencia obtenida.

FIG. 5 representa los pirogramas del genotipado simple y multiplex de SNP. El primer pirograma representa los picos resultantes cuando se añade el oligo de secuenciación 1
25 al ADN molde. El segundo pirograma representa los picos resultantes cuando se añade el oligo de secuenciación 2 al ADN molde. El tercer pirograma representa los picos resultantes cuando se añaden los oligos de secuenciación 1 y 2 a concentraciones equimolares. Los picos determinan la incorporación de cada nuevo dexosinucleótido adicional.

30

FIG. 6 muestra los resultados genotípicos obtenidos para el ADN molde. (a) Pocillos A1 y A2 corresponden al producto de PCR de hebra simple con el oligo de secuenciación 1. (b) Pocillos A3 y A4 corresponden al producto de PCR de hebra simple con el oligo de secuenciación 2. (c) Pocillos A5 y A6 corresponden al producto de PCR de hebra
35 simple con los oligos de secuenciación 1 y 2 a concentraciones equimolares. En consecuencia cualquier experto en la materia entiende, que en los pocillos de A1 a A4 donde solo un SNP fue genotipado y el resultado de un único genotipo es mostrado.

- 5 Las reacciones múltiplex mostradas en los pocillos A5 a A6 dan dos resultados, evidentemente.

D. Discusión

La imagen descrita en la FIG.3 muestra que la cantidad de producto de PCR producido es aproximadamente equivalente siempre que se añadan 30ng de ADN molde a la
10 reacción. Aparecen leves diferencias debido a errores en el pipeteo, durante el montaje de la PCR, o cuando se carga el gel. Además, el control sin ADN molde (NTCs) muestra algunas señales que se presentan como consecuencia de una señal residual del producto de PCR cargado en el pocillo adyacente en el gel o debido a la formación de aerosoles durante el montaje de la PCR. En todo caso la diferencia entre las
15 reacciones de PCR y los controles sin DNA molde es evidente. Ya que la cantidad de productos de PCR es muy similar, cualquier diferencia en los resultados de genotipado es debida a los métodos de genotipado simple *versus* múltiple. La calidad de los productos de PCR permanece similar en todos los casos y no es variable, lo cuál es evidente para un experto en la materia.

- 20 Los resultados ilustrados en la FIG.4 muestran datos de alta calidad en las reacciones de genotipado como era de esperar. Los círculos azules aparecen para confirmar la alta calidad obtenida. Un fallo en la reacción hubiera sido indicado mediante un círculo rojo y un resultado de baja calidad. La inconsistencia entre la secuencia de referencia y los resultados obtenidos o ratios señal/ruido pobres hubieran aparecido con color amarillo.
25 Es evidente para un experto en la materia, que todas las reacciones en este caso pasan el test de calidad independientemente del número de oligos de secuenciación añadidos.

La imagen ilustrada en la FIG.5 describe los pirogramas resultantes obtenidos. Aparecen picos bien definidos en las posiciones esperadas, coincidiendo con la secuencia de referencia. (a) el primer pirograma se obtuvo a partir de la reacción de
30 genotipado donde se usó sólo el oligo de secuenciación 1. (b) el segundo pirograma se obtuvo a partir de la reacción de genotipado donde se usó sólo el oligo de secuenciación 2. (c) el tercer pirograma se obtuvo a partir de la reacción de genotipado donde se usaron los oligos de secuenciación 1 y 2. El pirograma resultante del genotipado múltiplex corresponde a las secuencias obtenidas con el oligo de
35 secuenciación 1 superpuesta con la secuencia obtenida con el oligo de secuenciación

- 5 2. Las dos bases polimórficas presentan una gran aproximación con los resultados de las reacciones simples.

Los resultados ilustrados en la FIG.6 describen los genotipos obtenidos por secuenciación múltiple en concordancia con los genotipos obtenidos por secuenciación simple. El genotipo del SNP 1 se muestra en los pocillos A1, A2, A5 y A6 con posición
10 1, y es T/T en todos los casos. Mientras que el genotipo del SNP 2 se muestra en los pocillos A2 y A3 con posición 1 y en los pocillos A5 y A6 con posición 2. Por tanto, se muestra el resultado de los mismos genotipos tanto a partir del genotipado simple como del genotipado múltiple.

- 15 Por lo tanto, es evidente para cualquier experto en la materia que es posible obtener datos de genotipos relativos a múltiples SNPs usando oligos múltiples de secuenciación con el mismo ADN molde de cadena simple.

Ejemplo 2:

TCF7L2 PCR MULTIPLEX, GENOTIPADO MULTIPLEX

20 A. Material

El gen TCF7a contiene dos SNPs, Rs12255372 y Rs7903146, que están asociados con daños en el metabolismo de la sulfonilurea. Estos SNPs están vinculados en equilibrio y están separados por más de 50,000 bases de secuencia codificante y no codificante. Para generar un amplicon de 278pb y un amplicon de 246pb se diseñan los
25 oligonucleótidos de amplificación siguientes. El amplicon de 278pb usa (i) un oligonucleótido forward no modificado de 18 bases y (ii) un oligonucleótido reverso-biotinilado de 21 bases. El oligonucleótido forward presenta una temperatura de alineamiento teórica de 56.9°C y el oligonucleótido reverso tiene una temperatura de alineamiento de 57.9°C. La temperatura óptima de alineamiento de la reacción se
30 determinó experimentalmente en 55°C. El amplicon de 246pb usa (i) un oligonucleótido forward no modificado de 20 bases y (ii) un oligonucleótido reverso-biotinilado de 20 bases. El oligonucleótido forward presenta una temperatura de alineamiento teórica de 54.9°C y el oligonucleótido reverso tiene una temperatura de alineamiento de 54.9°C. La temperatura óptima de alineamiento de la reacción se determinó experimentalmente
35 en 55°C. Los dos SNPs son leídos por el oligonucleótido 1 de secuenciación de 16 bases, que hibrida a partir de la tercera base previa a Rs10811661 y tiene una

- 5 temperatura de alineamiento de 53.3°C, y el oligonucleótido 2 de secuenciación de 19 bases, que hibrida a partir de la primera base previa a Rs10757283 y tiene una temperatura de alineamiento de 48.1°C.

Cuando se usan individualmente, el oligonucleótido 1 de secuenciación lee la secuencia SEQ ID NO: 9 (AATKACCATA) con el orden de dispensación SEQ ID NO: 10 (GATGACAT), y el oligonucleótido 2 de secuenciación lee la secuencia SEQ ID NO: 11 (AYTATATAATTTAATTGCCGTATGAGG) con el orden de dispensación SEQ ID NO: 12 (GACTGATAT). En el modo múltiplex las secuencias son leídas con el orden de dispensación SEQ ID NO: 13 (GACTGCATACA).

B. Métodos

15 I. Reacción de Amplificación

Se prepara una mezcla de reacción con los oligonucleótidos de amplificación de TCF7L2. A ésta mezcla de reacción se le añaden 3 µl de enzima DNA polimerasa, fabricada por Biotools Biotechnological & Medical Laboratories S.A., 5 µl de buffer de reacción que se comercializa junto con la enzima, entre 0.1 µl y 0.3 µl de una solución 20 10mM que contiene los cuatro desoxirribonucleótidos que forman la cadena de ácido desoxirribonucleico (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) y entre 0.2 µl y 0.5 µl de una solución 10 µM de la pareja (cuatro en total) de oligonucleótidos de amplificación descritos en la sección de materiales para generar en una única reacción de amplificación multiplex un amplicon de 278pb y un amplicon de 246pb. Cada amplicon contiene el SNP 25 Rs12255372 y el SNP Rs7903146 respectivamente.

Preparar volumen para alícuotas por triplicado de 47.0 µl. Añadir además 3.0 µl de ADN molde 10ng/ µl o agua Milli-Q. Incubar a 95°C durante 3 minutos; a 95°C 20 segundos, a 55°C 20 segundos, a 72°C 30 segundos durante aproximadamente 45 ciclos. Incubar a 72°C durante 5 minutos. Enfriar la alícuota a 10°C.

- 30 Finalizada de amplificación, añadir a 10 µl de producto de PCR 2 µl de orange tampón de carga y hacer una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 0.5x, teñido con SYBRsafe 1x. Dejar correr el gel durante 30 minutos a 100V en tampón TBE 0.5x, y cargar en un pocillo lateral al lado del producto de PCR 2 µl de marcador de ADN de 100pb como estándar del tamaño de las bandas.

5 II. Reacción de Genotipado

Preparar una placa de 96 pocillos Q96 con 20 µl de tampón de hibridación, y con las siguientes combinaciones de oligos de secuenciación:

Pocillo	10µM TCF7L2a S1	10µM TCF7L2b S2
B1+2	3.0µl	0.0µl
B3+4	0.0µl	3.0µl
B5+6	3.0µl	3.0µl

Programar el orden de dispensación: (a) Pocillo B1+2, SEQ ID NO: 14 (GATGACAT) (b)
 10 Pocillo B3+A, SEQ ID NO: 15 (GACTGATAT) (c) Pocillo B5+6, SEQ ID NO: 16
 (GACTGCATACA). Añadir 40 µl de tampón de unión y 4 µl de sefarosa estreptavidina a
 cada producto de PCR. Agitarlo durante 5 minutos. En la estación de trabajo del Q96 se
 separan las cadenas de ADN y seguidamente se añade el molde de cadena simple a la
 placa del Q96. Se incuba la placa a 80°C durante 2 minutos y se deja enfriar a
 15 temperatura ambiente. Poner en funcionamiento el programa de genotipado.

C. Resultados

I. Reacción de Amplificación

FIG. 7 Muestra los resultados del gel de agarosa. Se cargaron en el gel de agarosa al
 2% 30ng de DNA molde junto con un control sin DNA molde (NTC). Cada réplica de
 20 PCR debería presentar cantidades aproximadamente equivalentes de los productos de
 PCR. Los tamaños teóricos de los productos de PCR son 278pb y 246pb.

I. Reacción de Genotipado

FIG. 8 Muestra la calidad global de las reacciones de pirosecuenciación. (a) Los pocillos
 B1 y B2 contienen dos productos de PCR de cadena simple sólo con el oligo 1 de
 25 secuenciación. (b) Los pocillos B3 y B4 contienen dos productos de PCR de cadena
 simple sólo con el oligo 2 de secuenciación. (c) Pocillos B5 y B6 contienen dos
 productos de PCR de cadena simple con oligo 1 y 2 de secuenciación a
 concentraciones equimolares. Los círculos azules representan la alta calidad de la
 secuencia obtenida.

5 FIG.9 representa los pirogramas del genotipado simple y multiplex de SNP. El primer pirograma representa los picos resultantes cuando se añade el oligo 1 de secuenciación al ADN molde. El segundo pirograma representa los picos resultantes cuando se añade el oligo 2 de secuenciación al ADN molde. El tercer pirograma representa los picos resultantes cuando se añaden los oligos 1 y 2 de secuenciación a concentraciones equimolares al ADN molde. Los picos determinan la incorporación de cada nuevo
10 dexosinucleótido adicional.

FIG.10 muestra los resultados genotípicos obtenidos para el ADN molde. (a) Los pocillos B1 y B2 contienen dos productos de PCR de cadena simple sólo con el oligo 1 de secuenciación. (b) Los pocillos B3 y B4 contienen dos productos de PCR de cadena simple sólo con el oligo 2 de secuenciación. (c) Pocillos B5 y B6 contienen dos
15 productos de PCR de cadena simple con oligo 1 y 2 de secuenciación a concentraciones equimolares. En consecuencia cualquier experto en la materia entiende, que en los pocillos B1 a B4 un único SNP fue genotipado ya que solo un genotipo es mostrado. Las reacciones de secuenciación multiplex mostradas en los pocillos B5 y B6 rinden de forma evidente dos resultados.
20

D. Discusión

La imagen descrita en la FIG.7 muestra que la cantidad de producto de PCR producida es aproximadamente equivalente siempre que se añadan 30ng de ADN molde a la reacción. Aparecen leves diferencias debido a errores en el pipeteo, durante el montaje
25 de la PCR, o cuando se carga el gel. Además, el control sin ADN molde puede dar señal arrastrada desde el producto de PCR cargado en el pocillo adyacente en el gel o por la formación de aerosoles durante el montaje de la PCR. La intensidad de señal del producto de PCR puede ser tal que dificulte distinguir entre el producto de PCR de 278pb y el producto de PCR de 246pb, sin embargo ésta parece ser uniforme para ambas reacciones en todos los pocillos. En todo caso la diferencia entre la reacción de
30 PCR y el control sin ADN molde es evidente. Ya que la cantidad de productos de PCR es muy similar, cualquier diferencia en los resultados de genotipado es debida a los métodos de genotipado simple *versus* múltiple. La calidad de los productos de PCR permanece similar en todos los casos y no es variable, lo cuál es evidente para un
35 experto en la materia.

5 Los resultados ilustrados en la FIG.8 muestran datos de alta calidad en las reacciones de genotipado como era de esperar. Los círculos azules aparecen para confirmar la alta calidad. Un fallo en la reacción es indicado por un círculo rojo y significa una calidad baja. La inconsistencia entre la secuencia de referencia y los resultados obtenidos o un ratio de señal pobre aparece de color amarillo. Todas las reacciones en este caso
10 pasan el test de calidad independientemente del número de oligos de secuenciación que se añadieron.

La imagen ilustrada en la FIG.9 describe los pirogramas obtenidos. Aparecen picos bien definidos en las posiciones esperadas, coincidiendo con la secuencia de referencia. (a) el primer pirograma se obtuvo desde la reacción de genotipado usando sólo el oligo 1
15 de secuenciación. (b) el segundo pirograma se obtuvo desde la reacción de genotipado usando sólo el oligo 2 de secuenciación. (c) el tercer pirograma se obtuvo desde la reacción de genotipado usando los oligos 1 y 2 de secuenciación. El pirograma resultante del genotipado múltiple corresponde a las secuencias obtenidas con el oligo 1 de secuenciación superpuesta con la secuencia obtenida con el oligo 2 de
20 secuenciación. Las dos bases polimórficas presentan una gran aproximación con los resultados de las reacciones simples.

Los resultados ilustrados en la FIG.10 describen los genotipos obtenidos por secuenciación múltiple de acuerdo con los genotipos obtenidos por secuenciación simple. El genotipo del SNP 1 se muestra en los pocillos B1, B2, B5 y B6 con posición
25 1, y es G/G en todos los casos. Mientras que el genotipo del SNP 2 se muestra en los pocillos B2 y B3 con posición 1 y en los pocillos B5 y B6 con posición 2, y es T/C en cada caso.

Esto, ilustra que tanto con el genotipado simple como con el genotipado múltiple los resultados de los genotipos obtenidos son iguales.

30 Entonces, a partir de los resultados de arriba, un experto en la materia sería capaz de obtener información del genotipo de varios SNPs usando múltiples oligos de secuenciación con el mismo ADN molde de cadena simple.

Ejemplo 3:

TCF7L2: PCR MULTIPLEX GELIFICADA, GENOTIPADO MULTIPLE CON
35 OLIGONUCLEOTIDOS DE SECUENCIACIÓN GELIFICADOS

5 Introducción:

Este ejemplo reproduce el ejemplo 2 usando el proceso de gelificación aplicado a las reacciones multiplex de PCR y a los oligos de secuenciación usados para el genotipado múltiple.

A. Materiales

10 Ver sección A. Materiales (Ejemplo 2).

B. Métodos

I. Reacción de Amplificación

Se prepara una mezcla de reacción con los oligonucleótidos de amplificación de TCF7L2. Esta mezcla de reacción está compuesta por enzima ADN polimerasa a una
15 concentración final de 6 U, fabricada por Biotools Biotechnological & Medical Laboratories S.A., tampón de reacción que se comercializa junto con la enzima a una concentración final 1X, los cuatro desoxirribonucleótidos que forman la cadena de ácido desoxirribonucleico (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) a una concentración final entre 200 μ M y 250 μ M cada uno y una solución a una concentración final entre 75 nM y 150
20 nM cada uno de: i) las dos parejas (cuatro oligos en total) de oligos de amplificación descritos en la sección de materiales para generar al mismo tiempo en una reacción de amplificación multiplex un amplicon de 278bp y un amplicon de 246bp. Cada amplicon contiene el SNP Rs12255372 y el SNP Rs7903146 respectivamente, ii) la pareja de oligonucleótidos de amplificación de forma individual para las reacciones simples de
25 PCR correspondiente a la amplificación del SNP Rs12255372 y del SNP Rs7903146 de forma independiente. Las mezclas de reacción (tanto la simple como la multiplex) están estabilizadas mediante el proceso de gelificación. En particular una mezcla de gelificación compuesta de trehalosa, melezitosa, glucógeno y lisina es añadida a las mezclas de reacción anteriormente descritas las cuales contienen todos los reactivos
30 necesarios para llevar a cabo las reacciones de PCR. El proceso de gelificación se completa después de la desecación en condiciones de vacío y a una temperatura inferior de 40°C, dando como resultado una mezcla de reacción estabilizada que contiene entre un 10% y un 30% de agua.

- 5 47µl de agua Milli-Q y 3 µl de TaqMan Human Control DNA a una concentración de 10ng/µl son dispensados en cada uno de los tubos gelificados. Incubar a 95°C durante 5 minutos. Después incubar a 95°C durante 20 segundos, a 55°C durante 20 segundos y a 72°C durante 40 segundos durante aproximadamente 45 ciclos. Adicionalmente incubar a 72°C durante 5 minutos. Enfriar la alícuota a 10°C.
- 10 Finalizada la amplificación, añadir a 10 µl de producto de PCR 2µl de tampón de carga y hacer una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 0.5X, teñido con SYBRsafe 1x. Dejar correr el gel durante 30 minutos a 100V en tampón TBE 0.5x, y cargar en un pocillo lateral al lado del producto de PCR 2 µl de marcador de ADN de 100pb como estándar del tamaño de las bandas.

15 II. Reacción de Genotipado

Los dos oligos de secuenciación fueron estabilizados mediante el proceso de gelificación siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente para la mezcla de reacción de PCR.

Los oligos gelificados son re-hidratados con 85 µl de agua Milli-Q.

- 20 Preparar una placa de 96 Q96 con 20 µl de tampón de hibridación, y con las siguientes combinaciones de oligos de secuenciación:

Pocillo	10µM TCF7L2a S1	10µM TCF7L2b S2
C1+2+3	3.0µl	0.0µl
C4+5+6	0.0µl	3.0µl
C7+8+9	3.0µl	3.0µl

- Programar el orden de dispensación: (a) Pocillo C1+2+3, SEQ ID NO: 14 (GATGACAT)
- (b) Pocillo C4+5+6, SEQ ID NO: 15 (GACTGATAT) (c) Pocillo C7+8+9, SEQ ID NO: 16
- 25 (GACTGCATACA). Añadir 40µl de tampón de unión y 4µl de sefarosa estreptavidina a cada producto de PCR. Agitarlo durante 5 minutos. En la estación de trabajo del Q96 se separan las cadenas de ADN y seguidamente se añade el molde de cadena simple a la placa del Q96. Incubar a 80°C durante 2 minutos y enfriar a temperatura ambiente. Ahora iniciar el programa de genotipado.

30 C. Resultados

5 I. Reacción de Amplificación

FIG. 11 muestra los resultados del gel de agarosa. Se cargaron en el gel de agarosa al 2% 10 µl de los productos de la PCR simple. Cada réplica de la reacción de PCR debe contener cantidades aproximadamente equivalentes de producto de PCR. Los tamaños esperados de los productos son 278bp y 246bp.

FIG. 12 muestra los resultados del gel de agarosa. Se cargaron en el gel de agarosa al 2% 10 µl de los productos de la reacción multiplex de PCR. Cada réplica de la reacción de PCR debe contener cantidades aproximadamente equivalentes de producto de PCR. Lo tamaños de los productos esperados son 278bp y 246bp, aunque con un gel de agarosa al 2% no es posible distinguir entre estas dos bandas de forma individual.

II. Reacción de Genotipado

FIG. 13 muestra la calidad global de las reacciones de pirosecuenciación. (a) Pocillos C1, C2 y C3 corresponden a los dos productos de PCR de hebra simple obtenidos únicamente con el oligo de secuenciación 1. (b) Pocillos C4, C5 y C6 corresponden a los dos productos de PCR de hebra simple obtenidos únicamente con el oligo de secuenciación 2. (c) Pocillos C7, C8 y C9 corresponden a los dos productos de PCR de hebra simple obtenidos con una mezcla a concentración equimolar de los oligos de secuenciación 1 y 2. Los círculos azules representan la alta calidad de la secuencia obtenida.

FIG. 14 muestra los resultados genotípicos obtenidos para el ADN molde. (a) Pocillos C1, C2 y C3 corresponden a los dos productos de PCR de hebra simple obtenidos con solo el oligo de secuenciación 1. (b) Pocillos C4, C5 y C6 corresponden a los dos productos de PCR de hebra simple obtenidos con solo el oligo de secuenciación 2. (c) Pocillos C7, C8 y C9 corresponden a los dos productos de PCR de hebra simple obtenidos con una mezcla a concentraciones equimolares de los oligos de secuenciación 1 y 2. En consecuencia cualquier experto en la materia entiende, que en los pocillos de C1 a C6 donde solo un SNP fue genotipado, se muestra el resultado de un único genotipo. Las reacciones de genotipado múltiple mostradas en los pocillos C7, C8 y C9 dan dos resultados, evidentemente.

D. Discusión

5 La imagen descrita en la FIG.11 y FIG.12 muestra que la cantidad de producto de PCR producido es aproximadamente equivalente siempre que se añadan 30 ng de ADN molde a la reacción simple gelificada (FIG.11) y a la reacción multiplex gelificada (FIG.12). Aparecen leves diferencias debido a errores en el pipeteo, durante el montaje de la PCR, o cuando se carga el gel. La intensidad de la señal de los productos de PCR es tal que es difícil distinguir entre la banda del producto de PCR de 278bp y la banda del producto de PCR de 246bp sin embargo se mantiene una uniformidad entre los productos obtenidos en la reacción simple y en la multiplex en todos los pocillos. Puesto que la cantidad de los productos de PCR permanece muy similar, cualquier diferencia en los resultados de genotipado es debido a los métodos de genotipado simple *versus* múltiple. La calidad de los productos de PCR permanece similar en todos los casos y no es variable, lo cual es evidente para un experto en la materia.

Los resultados obtenidos en la FIG. 13 muestran datos de alta calidad en las reacciones de genotipado como era de esperar. Los círculos azules aparecen para confirmar la alta calidad obtenida. Un fallo en la reacción hubiera sido indicado mediante un círculo rojo y un resultado de baja calidad La inconsistencia entre la secuencia de referencia y los resultados obtenidos o ratios señal/ruido pobres hubieran aparecido con color amarillo. Es evidente para un experto en la materia, que todas las reacciones en este caso pasan el test de calidad independientemente del número de oligos de secuenciación gelificados añadidos.

25 Los resultados ilustrados en la FIG. 14 describen los genotipos obtenidos mediante secuenciación múltiple en concordancia con los genotipos obtenidos por secuenciación simple. El genotipo del SNP 1 se muestra en los pocillos C1, C2, C3, C7, C8 y C9 con posición 1, y es GG/ en todos los casos. Mientras que el genotipo del SNP 2 se muestra en los pocillos C4, C5 y C6 con posición 1 y pocillos C7, C8 y C9 con posición 2 y es T/C en todos los casos.

Luego, es evidente que los resultados del genotipado simple y múltiple son los mismos.

Por lo tanto, es evidente para cualquier experto en la materia que es posible obtener datos de genotipos relativos a múltiples SNPs usando múltiples oligonucleótidos de secuenciación gelificados con el mismo ADN molde de cadena simple.

35 Ejemplo 4

5 EmbB: PCR, GENOTIPADO MÚLTIPLE DE SECUENCIAS

A. Introducción

Mutaciones en el gene *EmbB* pueden dar como resultado cepas de *Mycobacterium* etambutol-resistentes. Hay dos regiones en el gen *EmbB* que parecen ser dianas críticas para la actividad del etambutol. Estas dos regiones del gen *EmbB* están separadas por aproximadamente 300 bases de ADN. Estas dos regiones pueden ser amplificadas mediante una reacción de PCR simple generando un producto de más de 300bp. Ambas regiones son pequeñas, abarcando como máximo 3 bases, y son susceptibles de ser secuenciadas mediante técnicas de microsecuenciación. La microsecuenciación normalmente rinde información sobre secuencias de 40 bases con buena calidad, por lo que ambas regiones relacionadas con la resistencia a etambutol dentro del gen *EmbB* deberían ser secuenciadas con dos oligos de secuenciación de forma individual. El método convencional para secuenciar las dos regiones del gen *EmbB* mencionadas implicaría llevar a cabo una misma reacción de PCR dos veces para cada muestra, y secuenciar los dos productos con diferentes oligos de secuenciación de modo independiente. Con el método convencional es claro que se necesitan dos reacciones de PCR y dos reacciones de secuenciación. Con el objetivo de reducir el coste por muestra, tanto en términos económicos como en términos relativos al volumen de muestra necesario, sería preferible hacer una única reacción de PCR y una única reacción de secuenciación para leer ambas secuencias a la vez. Este método reduciría los costes del ensayo y reduciría la carga de trabajo necesaria para completar dicho ensayo, así como permitiría que un mayor número de muestras fueran secuenciadas al mismo tiempo.

La diferencia fundamental entre el protocolo convencional simple y el protocolo de secuenciación múltiple es que en este último caso solo una única reacción de PCR para cubrir ambas regiones y una única reacción de secuenciación sería llevada a cabo para resolver ambas secuencias de modo simultáneo. Una cobertura total de las dos regiones relacionadas con la resistencia a etambutol se obtiene mediante el uso de dos oligonucleótidos de secuenciación en una única reacción de secuenciación. La secuencia resultante es un solapamiento de las secuencias leídas por cada uno de los oligonucleótidos de secuenciación. Esta secuencia solapada puede ser predicha mediante el conocimiento de todas las posibles combinaciones de las mutaciones

- 5 buscadas y el orden en el cual los dexosinucleótidos son dispensados durante la reacción de secuenciación.

Para demostrar que el genotipado múltiple de secuencias es posible, ADN procedente de una cepa salvaje de referencia de *Mycobacterium fortuitum* fue amplificada usando reactivos gelificados. Después de dos rondas de amplificación por PCR la muestra es
10 secuenciada de forma individual con los oligos de secuenciación TB2a y TB2b gelificados y también es secuenciada en una única reacción con una mezcla de los dos oligos TB2a y TB2b gelificados. La misma información se genera tanto con las reacciones de secuenciación múltiple que contienen los oligos de secuenciación gelificados como con las dos reacciones de secuenciación simples que contienen cada
15 una de ellas uno de los oligos de secuenciación gelificados.

B. Métodos

ADN aislado de una cepa salvaje de referencia de *Mycobacterium fortuitum* se prepara a una concentración de 10 ng/μl. Este ADN se caracteriza previamente y se confirma la secuencia del gen *EmbB* en la cepa salvaje. Las colonias a partir de las cuales se
20 obtiene este ADN crecieron bajo condiciones estándar de cultivo de *Mycobacterium* y su crecimiento fue inhibido mediante la presencia de etambutol. La inhibición de crecimiento en presencia de etambutol así como la secuenciación del ADN confirma sin duda que este ADN no contiene mutaciones en ninguna de las dos regiones del gen *EmbB* estudiadas en este experimento. El ADN se almacena a 4°C a alta concentración
25 y se diluye a una concentración de 10ng/μl justo antes de su uso.

I. Reacción de Pre-amplificación

En este experimento en particular se hizo una reacción de pre-amplificación para enriquecer los moldes de PCR usados para amplificar las regiones relacionadas con la resistencia a etambutol. Aunque esto no es imprescindible ya que en este experimento
30 se conoce la concentración del ADN aislado, se considera que debe ser un paso estándar en el protocolo cuando se trabaja con muestras desconocidas, en las cuales normalmente se desconoce la calidad y cantidad de ADN en las mismas. Este paso en este experimento se hace para demostrar que la fase de pre-amplificación no interfiere con la reacción de secuenciación ni en su modo simple ni en su modo múltiple.

5 La mezcla de la reacción de pre-amplificación está compuesta por 5U de enzima ADN polimerasa ultrapura, fabricada por Biotools Biotechnological & Medical Laboratories S.A., tampón de reacción a una concentración final 1x que se comercializa junto con la enzima, entre 200µM y 250µM concentración final de cada uno de los cuatro dextrirribonucleótidos que forman la cadena de ácido dextrirribonucleico (dATP, 10 dTTP, dGTP, dCTP), y entre 50nM y 75nM concentración final de cada uno de los oligonucleótidos de amplificación diseñados para la pre-amplificación del gen diana *EmbB*. Estos oligonucleótidos de amplificación incluidos en la reacción de pre-amplificación no están biotinilados y no se pueden usar para secuenciación. Ellos se usan solo para mejorar la cantidad de ADN molde disponible para la reacción posterior 15 de amplificación. La mezcla de reacción de pre-amplificación incluyendo todos los reactivos descritos arriba es estabilizada mediante el proceso de gelificación. En particular una mezcla de gelificación compuesta de trehalosa, melezitosa, glucógeno y lisina es añadida a la mezcla de reacción anteriormente descrita la cual contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción PCR de pre-amplificación. El 20 proceso de gelificación se completa después de la desecación en condiciones de vacío y a una temperatura inferior a 40°C, dando como resultado una mezcla de reacción estabilizada que contiene entre un 10% y un 30% de agua.

42µl de agua Milli-Q y 3 µl de ADN de *Mycobacterium fortuitum* a una concentración de 10ng/µl son dispensados en cada uno de los tubos gelificados. Incubar a 95°C durante 25 5 minutos. Después incubar a 95°C durante 20 segundos, a 58°C durante 20 segundos y a 72°C durante 40 segundos durante 10 ciclos. Adicionalmente incubar a 72°C durante 5 minutos. Enfriar la alícuota a 10°C.

II. Reacción de Amplificación

A continuación de la reacción de pre-amplificación, se prepara una reacción de PCR 30 gelificada para amplificar las dos regiones del gen *EmbB* relacionadas con la resistencia a etambutol. Esta reacción incluye todos los reactivos necesarios para amplificar una región de 409bp del gen *EmbB* que incorpora los dos puntos de mutación relacionados con la resistencia a etambutol. El oligonucleótido reverso de amplificación TB2 está biotinilado para permitir la separación de las hebras del producto de PCR obtenido y 35 contar así con una ADN molde de hebra simple para secuenciación. La reacción de PCR se lleva a cabo 9 veces para que el producto de PCR obtenido pueda ser secuenciado tres veces con el oligo de secuenciación gelificado TB2a, tres veces con el

5 oligo de secuenciación gelificado TB2b y tres veces con la mezcla de ambos oligos de
secuenciación TB2a y Tb2b gelificados en una formato multiplex. La composición de la
mastermix está compuesta por 5U de enzima ADN polimerasa ultrapura, fabricada por
Biotools Biotechnological & Medical Laboratories S.A., tampón de reacción a una
10 concentración final 1x que se comercializa junto con la enzima, entre 200µM y 250µM
concentración final de cada uno de los cuatro dextrirribonucleótidos que forman la
cadena de ácido dextrirribonucleico (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), y entre 100nM y
200nM concentración final de cada uno de los oligonucleótidos de amplificación
diseñados para la amplificación del gen diana *EmbB*. La mezcla de reacción de
15 amplificación incluyendo todos los reactivos descritos arriba es estabilizada mediante el
proceso de gelificación. En particular una mezcla de gelificación compuesta de
trehalosa, melezitosa, glucógeno y lisina es añadida a la mezcla de reacción
anteriormente descrita la cual contiene todos los reactivos necesarios para llevar a cabo
la reacción PCR de amplificación. El proceso de gelificación se completa después de la
deseccación en condiciones de vacío y a una temperatura inferior a 40°C, dando como
20 resultado una mezcla de reacción estabilizada que contiene entre un 10% y un 30% de
agua.

42µl de agua Milli-Q y 3 µl de producto resultante de la amplificación son dispensados
en cada uno de los 9 tubos TB2 gelificados. Incubar a 95°C durante 5 minutos. Después
incubar a 95°C durante 20 segundos, a 58°C durante 20 segundos y a 72°C durante 40
25 segundos durante 35 ciclos. Adicionalmente incubar a 72°C durante 5 minutos. Enfriar
la alícuota a 10°C.

Finalizada la amplificación, se mezcla 10 µl de producto de PCR con 2µl de tampón de
carga y se hace una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en tampón TBE 0.5X,
teñido con SYBRsafe 1x. Dejar correr el gel durante 30 minutos a 100V en tampón TBE
30 0.5x, y cargar en un pocillo lateral al lado del producto de PCR 2 µl de marcador de
ADN de 100pb como estándar del tamaño de las bandas.

III. Genotipado

Se usan dos oligos de secuenciación para cubrir las dos regiones del gen *EmbB* de
Mycobacterium relacionadas con la resistencia a etambutol, estos oligos son TB2a y
35 TB2b. El oligo de secuenciación TB2a cubre las mutaciones de resistencia Met306Val,
Met306Leu, y dos mutaciones Met306Ile (una es la substitución de G por T y la otra es

5 la substitución de G por A) y lee la SEQ ID NO: 17
 (CATGGCCCGAGTCGCCGACCCACGCC). El oligo de secuenciación TB2b cubre las
 mutaciones de resistencia Arg406Cys, Arg406Ser, Arg406Ala, y Arg406Asp y lee la
 SEQ ID NO: 18 (CCGGAGGGCCATCATCGCGCTCGGCTC). La mezcla de ambos oligos
 de secuenciación TB2a y TB2b en el modo de genotipado múltiple de secuencias lee la
 10 SEQ ID NO: 19
 (CCCATGGGGGCCAGGGGCAATGCATTCCGGCCCGGCATCCCAGGCCTGCC) .

El producto que queda de la reacción de PCR se usa para preparar ADN de hebra
 simple para la pirosecuenciación. Se añaden 44µl de una mezcla 10:1 de tampón de
 unión y sefarosa estreptavidina a los productos de PCR y se mezclan durante 5
 15 minutos. A continuación, la mezcla es aspirada sobre los filtros de la estación de trabajo
 de vacío del Q96 y sumergidos en etanol al 70%, tampón de desnaturalización y
 solución de lavado todo ello bajo condiciones de vacío. La hebra simple de ADN
 resultante se dispensa en una placa multipocillo Q96 que contiene 20µl de tampón de
 hibridación y 3µl de oligonucleótidos de secuenciación a concentración 10µM (una vez
 20 que han sido re-hidratados añadiendo 100µl de agua Milli-Q a su forma gelificada) en el
 caso de las reacciones simples, o 3µl de la mezcla de oligos de secuenciación a una
 concentración 10µM (una vez que han sido re-hidratados añadiendo 100µl de agua
 Milli-Q a su forma gelificada) en el caso de las reacciones múltiples.

La placa multipocillo Q96 que ya contiene ADN de hebra simple, tampón de hibridación
 25 y oligonucleótidos de secuenciación es entonces incubada a 80°C durante 2 minutos y
 después se enfría a temperatura ambiente. Mientras las muestras se enfrían se procede
 a la programación del pirosecuenciador Q96ID incluyendo los nombres de las muestras,
 la elección del cartucho así como el orden de dispensación, que en este caso son 10
 dispensaciones de TGCA. Desoxynucleótidos, mezcla de enzimas y mezcla de
 30 substratos se añaden entonces al cartucho en los volúmenes indicados por el programa
 y se inicia así la secuenciación.

C. Resultados

I. Reacción de Amplificación

35 FIG. 15 muestra los resultados del gel de agarosa. 10 µl del producto de PCR se
 corrieron en un gel de agarosa al 2%. Cada réplica de la reacción de PCR debe

5 contener aproximadamente cantidades equivalentes del producto de PCR. El tamaño teórico del producto de PCR es de 409pb

II. Reacción de Genotipado

10 FIG. 16 muestra la calidad global de las reacciones de pirosecuenciación. Los círculos azules representan la alta calidad de la secuencia obtenida.

Tabla 1 muestra los datos de secuencia obtenidos mediante el uso de los oligos de secuenciación del gen *EmbB* en su modo simple. La secuencia de referencia para esta región del gen *EmbB* de *Mycobacterium fortuitum* se muestra en negro, con los sitios relativos a la mutación responsable de la resistencia a etambutol subrayados. El texto
15 abajo muestra la alta calidad de los datos de secuencia obtenidos en las tres réplicas de secuenciación llevadas a cabo con los oligos TB2a y TB2b de forma separada.

Datos de Secuencia – Simple EmbB

SEQ ID: NO 20 CATGGCCCGAGTCGCCGACCACGCC

20 SEQ ID: NO 20 Simple 1 CATGGCCCGAGTCGCCGACCACGCC

SEQ ID: NO 20 Simple 2 CATGGCCCGAGTCGCCGACCACGCC

SEQ ID: NO 20 Simple 3 CATGGCCCGAGTCGCCGACCACGCC

SEQ ID: NO 21 CCGGAGGGCATCATCGCGCTCGGCTC

25 SEQ ID: NO 21 Simple 1 CCGGAGGGGCATCATCGCGCTCGGCTC

SEQ ID: NO 21 Simple 2 CCGGAGGGGCATCATCGCGCTCGGCTC

SEQ ID: NO 21 Simple 3 CCGGAGGGGCATCATCGCGCTCGGCTC

Tabla 2 muestra los datos de secuencia obtenidos, por triplicado, usando los oligos de secuenciación de *EmbB* en su modo múltiple. Las líneas superiores del texto muestran la secuencia múltiple prevista, en color rojo se muestra la secuencia obtenida con el
30 oligo de secuenciación TB2a y en azul se muestra la secuencia obtenida con el oligo de secuenciación TB2b. Las bases subrayadas muestran las posiciones donde se localizan

- 5 los sitios relativos a la mutación relacionada con la resistencia a etambutol. Debajo de la secuencia prevista se muestran los datos de secuencia obtenidos para las tres réplicas de las reacciones de secuenciación múltiple. El código de color para indicar la calidad de la secuencia es, azul para secuencias de alta calidad, naranja si la calidad de la secuencia es aceptable y rojo si la secuencia es de baja calidad.

10 *Datos de Secuencia- EmbB Múltiple*

SEQ ID: NO 22

CCCATGGGGCCCAGGGGCAATGCATTCCGGCCCGGCATCCCAGGCCTGCCC

SEQ ID: NO 22 múltiple 1

CCCATGGGGCCCAGGGGCAATGCATTCCGGCCCGGCATCCCAGGCCTGCCC

- 15 SEQ ID: NO 22 múltiple 2

CCCATGGGGCCCAGGGGCAATGCATTCCGGCCCGGCATCCCAGGCCTGCCC

SEQ ID: NO 22 múltiple 3

CCCATGGGGCCCAGGGGCAATGCATTCCGGCCCGGCATCCCAGGCCTGCCC

D. Discusión

- 20 La imagen representada en la FIG. 15 muestra que la cantidad de producto de PCR producido cuando 10µl de producto de PCR se añade a las reacciones es equivalente en todas las reacciones de PCR. Aparecen ligeras diferencias debido a errores en el pipeteo, durante el montaje de la PCR, o cuando se carga el gel. El tamaño previsto de la banda, 409 bp se consigue en todas las reacciones. En ningún caso la diferencia
- 25 entre las reacciones de PCR es aparente. La calidad de los productos de PCR permanece similar en todos los casos y no es variable, lo cuál es evidente para un experto en la materia.

- Los resultados ilustrados en la FIG.16 muestran datos de alta calidad en las reacciones de genotipado de secuencias como era de esperar. Los círculos azules aparecen para
- 30 confirmar la alta calidad obtenida. Un fallo en la reacción hubiera sido indicado mediante un círculo rojo y un resultado de baja calidad. La inconsistencia entre la secuencia de referencia y los resultados obtenidos o ratios señal/ruido pobres hubieran aparecido con color amarillo. Es evidente para un experto en la materia, que todas las

- 5 reacciones en este caso pasan el test de calidad independientemente del número de oligos de secuenciación añadidos.

Los resultados obtenidos en la Tabla 1 muestran que las dos reacciones de secuenciación simple rinden las secuencias de referencia esperadas con alta calidad.

- 10 Los resultados ilustrados en la Tabla 2 muestran que el modo de secuenciación múltiple es posible mediante el uso de una única reacción de secuenciación y que la información que habitualmente solo se puede obtener con dos reacciones de microsecuenciación se consigue con el genotipado de secuencias en modo múltiple. La secuencia obtenida mediante el modo múltiple puede ser prevista de antemano y generar resultados consistentes.

- 15 Luego, es evidente que las mismas secuencias genotípicas se obtienen como resultado tanto de la secuenciación en su modo simple como múltiple.

Por lo tanto, es evidente para cualquier experto en la materia que es posible obtener datos de genotipos relativos a secuencias múltiples usando múltiples oligonucleótidos de secuenciación gelificados con el mismo ADN molde de cadena simple.

- 20 Mientras que la presente invención se ha mostrado y descrito de forma particular con referencia a las realizaciones ejemplares relatadas, será comprendido por cualquier experto en la materia que varios cambios en la forma y en detalles pueden ser hechos sin que esto implique una modificación ni del espíritu ni del alcance de la presente invención como es definido a través de las siguientes reivindicaciones:

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para la determinación del genotipo de secuencias múltiples de interés, en donde dicho método comprende los siguientes pasos:
 - a) amplificación de al menos una o mas secuencias diana de una muestra para producir un producto amplificado, en donde dicha secuencia diana comprende al menos uno o mas sitios de la secuencia de interés; y
 - b) genotipado de dicho producto amplificado con una mezcla de oligonucleótidos de secuenciación de forma simultánea, en donde dicha mezcla comprende al menos un oligonucleótido de secuenciación por cada una de dichas secuencias de interés.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho paso de amplificación amplifica secuencias múltiples de interés sobre una sola secuencia diana en donde dichas secuencias de interés están localizadas a una distancia inferior o igual a 1kb una de la otra en dicha muestra. .
3. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho paso de amplificación amplifica secuencias múltiples de interés sobre múltiples secuencias diana en donde dichas secuencias de interés están localizadas a una distancia superior a 1kb una de la otra.
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha amplificación es llevada a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha reacción en cadena de la polimerasa es una reacción en cadena de la polimerasa simple cuando dichas secuencias múltiples de interés están localizadas máximo 1kb una de la otra.
6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha reacción en cadena de la polimerasa es una reacción en cadena de la polimerasa multiplex cuando dichas secuencias múltiples de interés están localizadas a una distancia superior a 1kb una de la otra.

- 5 7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en
donde dicha reacción en cadena de la polimerasa multiplex utiliza
oligonucleótidos de amplificación que son usados bajo las mismas
concentraciones de reactivos, temperaturas de alineamiento y tiempos de
extensión, en donde dichos oligonucleótidos de amplificación son conjuntos de
10 oligonucleótidos que son completamente o parcialmente específicos al extremo
o límites exteriores de la secuencia diana sin compartir en absoluto homología
con la región de alineamiento.
- 15 8. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en
donde dicho paso de amplificación usa al menos una pareja de oligonucleótidos
de amplificación correspondiente a cada una de las secuencias dianas que se
amplificarán.
- 20 9. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en
donde al menos un oligonucleótido de amplificación de los que constituyen la
pareja de oligonucleótidos de amplificación está biotinilado.
- 25 10. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en
donde dicha reacción de amplificación se caracteriza por el uso de reactivos de
amplificación gelificados para producir productos amplificados.
- 30 11. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en
donde dicha secuencia diana comprende al menos una secuencia de interés y
una secuencia de ADN adyacente.
- 35 12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en
donde dicho producto amplificado está biotinilado.
13. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en
donde dicho producto amplificado comprende secuencias múltiples de interés.

- 5 14. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicho genotipado es llevado a cabo mediante el uso del método de la pirosecuenciación.
- 15 15. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde durante dicho paso de genotipado, la secuencia adyacente a dichas secuencias múltiples de interés y la secuencia que incluye dichas secuencias múltiples se solapan.
- 10 16. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el paso de amplificación a) es llevado a cabo en una reacción de amplificación simple y el paso de genotipado b) es llevado a cabo en una reacción única de genotipado multiplex.
- 15 17. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la reacción de genotipado es llevada a cabo simultáneamente a la reacción de amplificación.
- 20 18. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde las secuencias de interés son sitios de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).
- 25 19. Kit que comprende: i) todos los reactivos necesarios dosificados a las concentraciones óptimas para la generación de una reacción de amplificación simple o multiplex de las dianas de interés pre-mezclados y estabilizados mediante el proceso de gelificación y ii) oligonucleótidos de secuenciación para el genotipado multiplex de las secuencias de interés los cuales son estabilizados por medio del proceso de gelificación, para uso en el método de las reivindicaciones de la 1 a la 18.
- 30

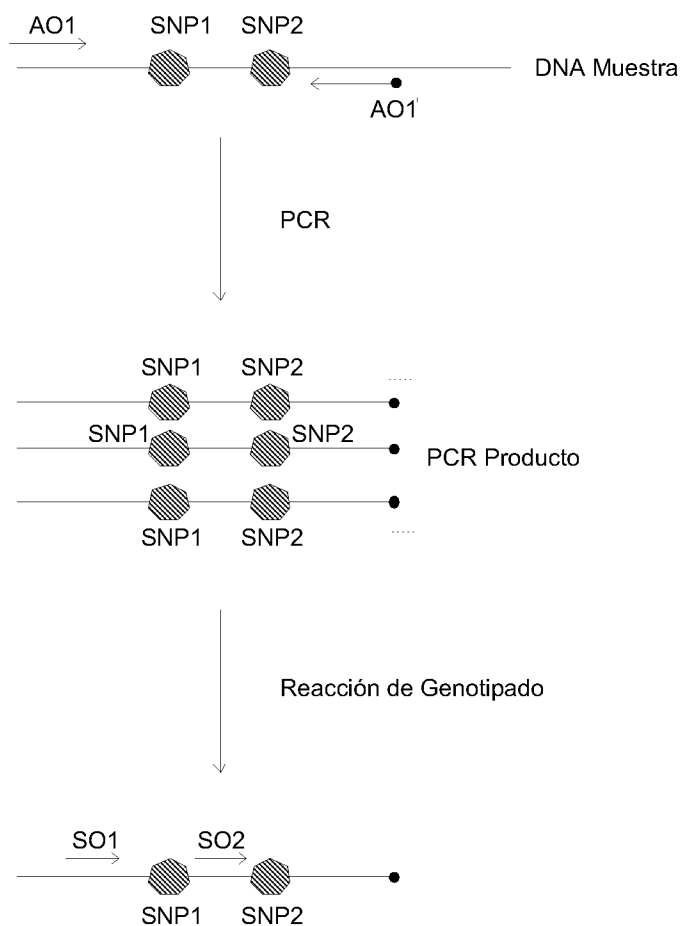


FIG. 1

2/14

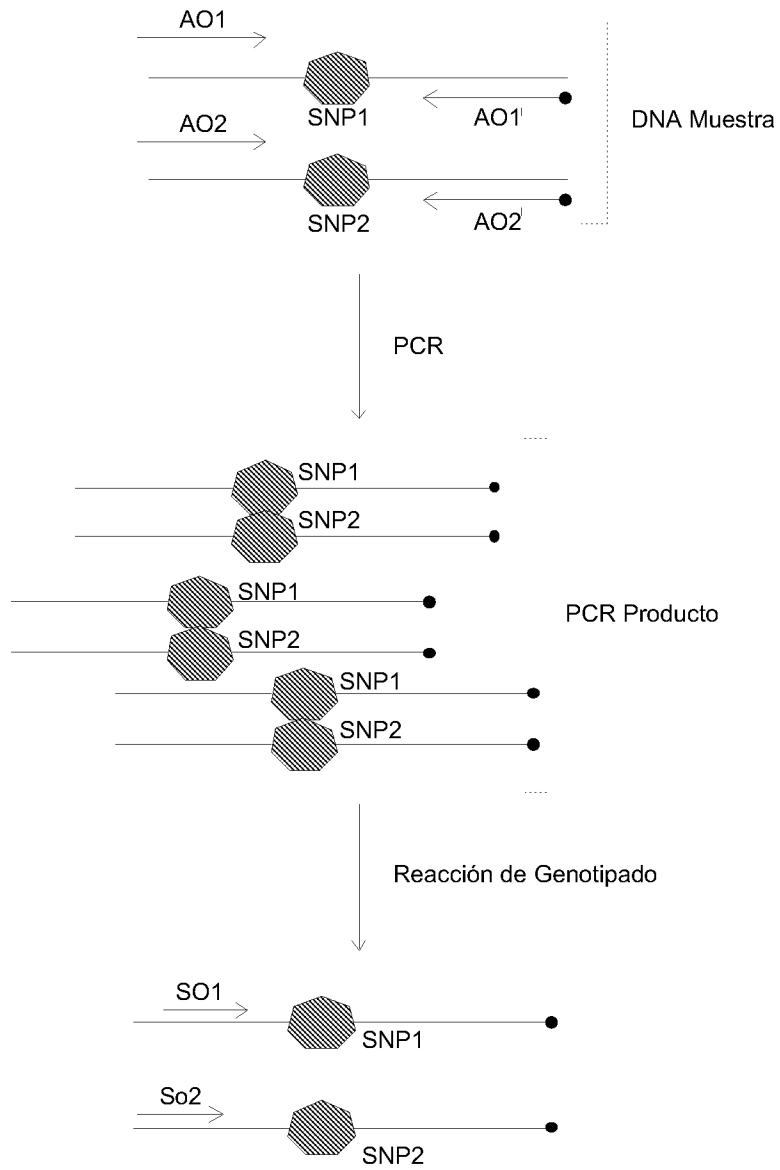


FIG. 2

3/14



FIG. 3

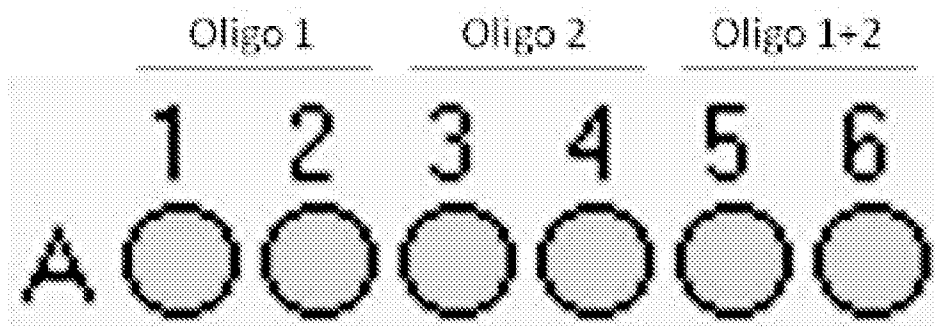


FIG. 4

5/14

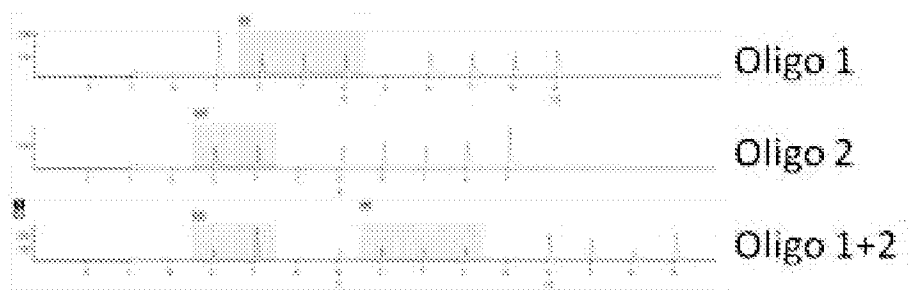


FIG. 5

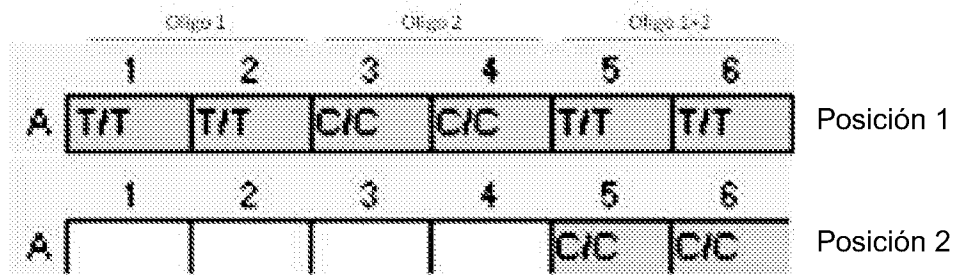


FIG. 6

7/14

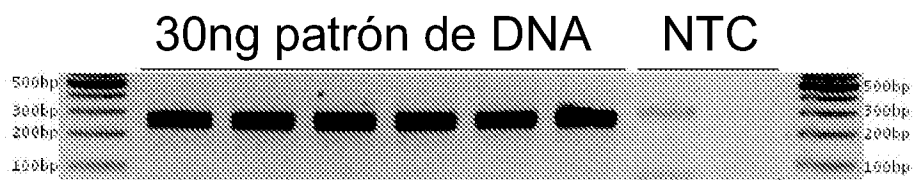


FIG. 7

8/14

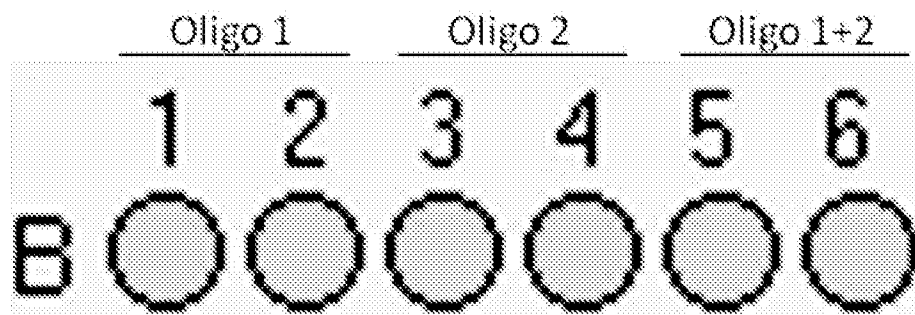


FIG. 8

9/14

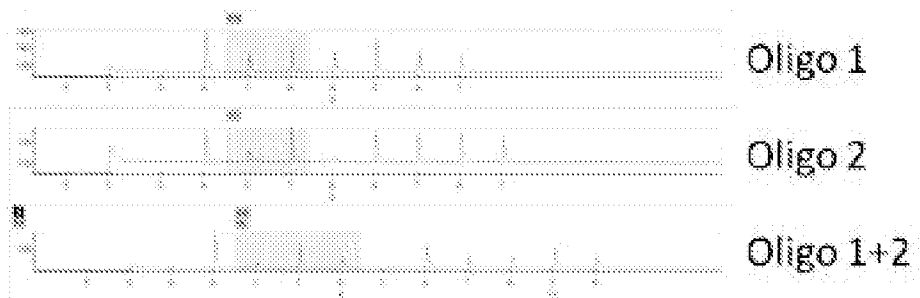


FIG. 9

10/14

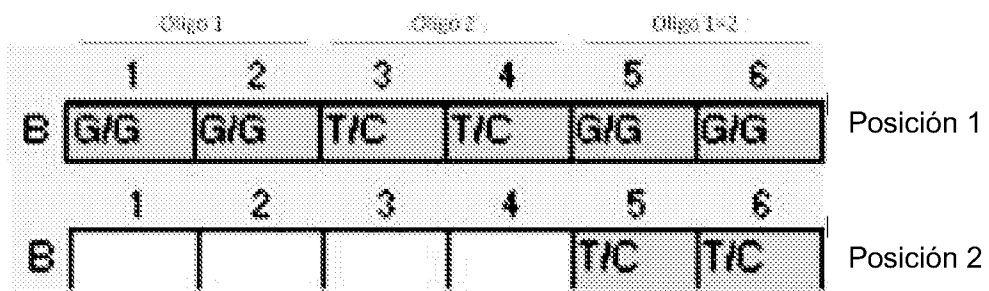


FIG. 10

11/14

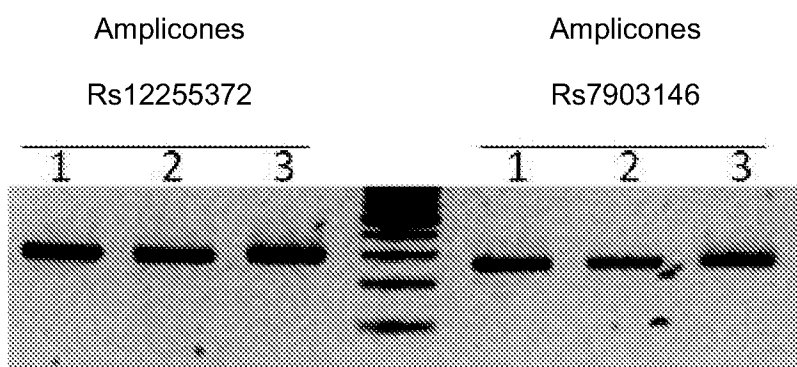


FIG. 11

12/14

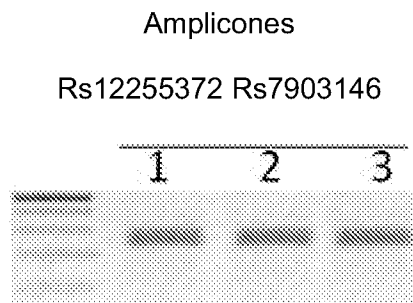


FIG. 12

13/14

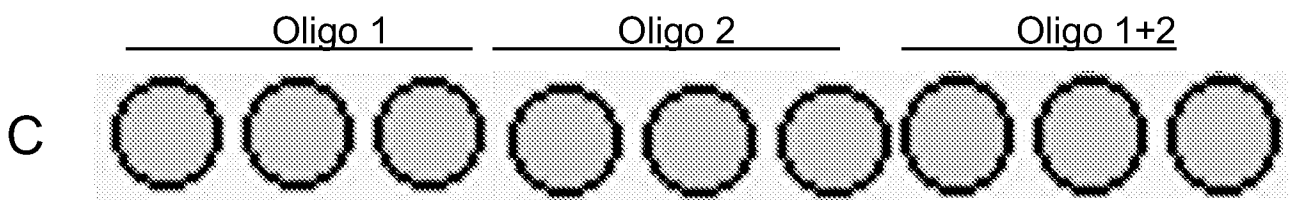


FIG. 13

14/14

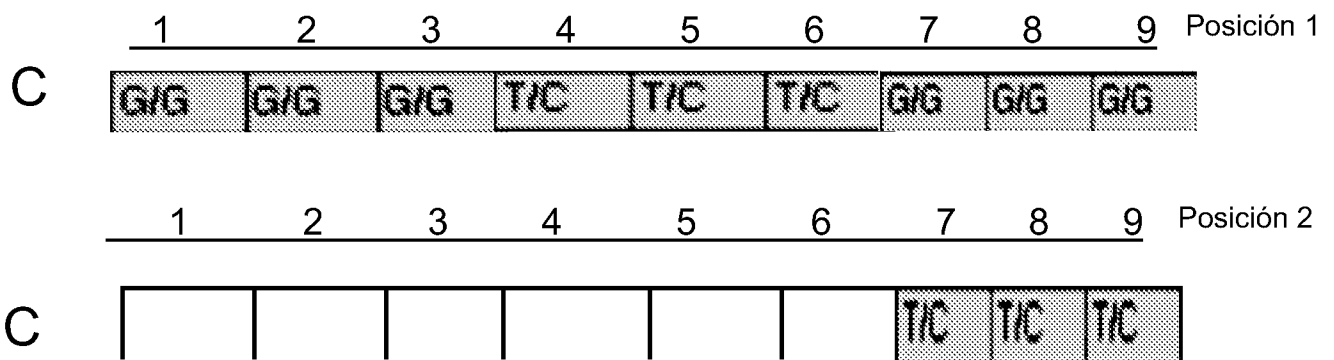


FIG. 14

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2011/070565

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. C12Q1/68

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) **EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE**

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	US 2005/084851 A1 (RONAGHI MOSTAFA [US] ET AL) 21 April 2005 (2005-04-21) 21 de abril 2005 (2005-04-21)	1-9, 11-16,18
Y	párrafo [0016] - párrafo [0020]; figura 1 párrafo [0041] - párrafo [0044] párrafo [0216] ejemplos 1-6 -----	10,19
X	WO 2011/091046 A1 (VERINATA HEALTH INC [US]; RAVA RICHARD P [US]) 25 de Julio 2011 (2011-07-28)	1-9, 11-16,18
Y	párrafo [0006] párrafo [0230; ejemplo 5 párrafo [0227] - párrafo [0228] ejemplo 4 ----- -/--	10,19

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	“T” documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
“A” documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	“X” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
“E” solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	“Y” documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
“L” documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	“&” documento que forma parte de la misma familia de patentes.
“O” documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
“P” documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional 19 July 2012	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 25/07/2012
---	--

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado Werner, Andreas
N° de fax	N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2011/070565

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	<p>BENDER ET AL: "A multiplex SNP typing approach for the DNA pyrosequencing technology", INTERNATIONAL CONGRESS SERIES, EXCERPTA MEDICA, AMSTERDAM, NL, vol. 1288. 1 de Abril 2006 (2006-04-01) , paginas 73-75 XP005393388, ISSN: 0531-5131, DOI: 10.1016/J.ICS.2005.12.031</p>	1-9, 11-16,18
Y	<p>Resumen pagina 74, párrafo 2 - pagina75, párrafo 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	10,19
X	<p>POURMAND N ET AL: "Multiplex Pyrosequencing", NUCLEIC ACIDS RESEARCH SPECIAL PUBLICATION, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 30. no. 7. 01 de Enero 2002 (2002-01-01), paginas E31/1-E31/5, XP002329580, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/30.7.E31</p>	1-9, 11-16,18
Y	<p>resumen pagina 1 colum. 2, párrafo 1 -pagina 2, colum 1, párrafo 3; figura 1 pagina 3, colum. 1 párrafo 2; figura 4</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	10,19
X	<p>PETER M. VALLONE ET AL: "A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome", INTERNATIONAL JOURNAL OF LEGAL MEDICINE, vol. 118, no. 01 de Junio 2004 (2004-06-01) , paginas 147-157 , XP55032759, ISSN: 0937-9827, DOI: 10.1007/s00414-004-0428-5</p>	1-9, 11-16,18
Y	<p>resumen; tablas 1, 2, 3 pagina 149, colum. 2, párrafo 1 - pagina 150, colum. 1, párrafo 2 - pagina 150, colum. 2 párrafo 2 pagina 151, colum .2 párrafo 3</p>	10,19
X	<p style="text-align: center;">-----</p> <p>PASTINEN T ET AL: "MINISEQUENCING: A SPECIFIC TOOL FOR DNA ANALYSIS AND DIAGNOSTICS ONOLIGONUCLEOTIDE ARRAYS", GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, WOODBURY, NY, US, vol. 7, no. 6, 01 de Junio 20997 (1997-06-01) pagina 606-614 XP000699761, ISSN: 1088-9051</p>	1-9, 11-16,18
Y	<p>resumen; figura 1 pagina 610; colum. 2 párrafo 3 - pagina 613 , colum. 1 párrafo 1; table 2</p>	10,19

-/--

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2011/070565

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	<p>FORTINA P ET AL: "SIMPLE TWO-COLOR ARRAY-BASED APPROCH FOR MUTATION DETECTION", EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, KARGER, BASEL, CH, vol. 8, no. 11, 01 de Noviembre 2000 (2000-11-01) paginas 884-894 XP009012254, ISSN: 1018-4813, DOI: 10.1038/SJ.EJHG.5200558</p>	1-9, 11-16,18
Y	<p>resúmen Pagina 886, colum. 1 párrafo 4 - pagina 887, colum. 1 párrafo 2; figura 1; Tabla1 -----</p>	10,19
Y	<p>US 7 919 294 B2 (FRANCO DE SARABIA ROSADO PEDRO [ES] ET AL FRANCO DE SARABIA ROSADO PED) 05 de Abril 2011 (2011-04-05) resumen Colum. 8, línea 30; línea 35; colum. 10, línea 6, línea 10 colum. 8, línea 49, línea 53; reivindicación 8 -----</p>	10,19
A	<p>Y.-S. LIN ET AL: "A simple method using Pyrosequencing™ to identify de novo SNPs in pooled DNA samples", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 39, no. 5, 01 de Marzo 2011 (2011-03-01), paginas E28- E28 XP55032687, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkq1249 citado en la aplicación pagina 5, colum. 2 párrafo 4 -pagina6, coul.1 párrafo 2 -----</p>	1-19
A	<p>LANGAEE T ET AL: "Genetic variation analyses by Pyrosequencing", MUTATION RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 573, no. 1-2, 03 de Junio 2005 (2005-06-03), paginas 95-102, XP027632670, ISSN: 0027-5107 [retrieved on 2005-06-03] Todo el documento -----</p>	1-19
A	<p>SOBRINO B ET AL: "SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHERS IRELAND LTD, IE, vol. 154, no. 2-3, 25 de Noviembre 2005 (2005-06-03), paginas181-194 XP027757784, ISSN: 0379-0738 [retrieved on 2005-11-25] Todo el documento -----</p>	1-19

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2011/070565

US 2005084851	A1	21-04-2005	AT	415490	T	15-12-2008
			AU	8430801	A	22-03-2002
			CA	2421857	A1	14-03-2002
			EP	1322782	A2	02-07-2003
			ES	2317928	T3	01-05-2009
			JP	2004508055	A	18-03-2004
			US	2005084851	A1	21-04-2005
			WO	0220837	A2	14-03-2002

WO 2011091046	A1	28-07-2011	US	2011230358	A1	22-09-2011
			WO	2011091046	A1	28-07-2011

US 7919294	B2	05-04-2011	BR	0204479	A	17-02-2004
			CA	2408857	A1	19-09-2002
			EP	1374827	A2	02-01-2004
			ES	2180416	A1	01-02-2003
			IL	152757	A	11-02-2009
			JP	4448280	B2	07-04-2010
			JP	2004519242	A	02-07-2004
			US	2003119042	A1	26-06-2003
			WO	02072002	A2	19-09-2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2011/070565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2005/084851 A1 (RONAGHI MOSTAFA [US] ET AL) 21 April 2005 (2005-04-21) paragraph [0016] - paragraph [0020]; figure 1 paragraph [0041] - paragraph [0044] paragraph [0216] examples 1-6	X 1-9, 11-16,18 10,19 Y
X Y	----- WO 2011/091046 A1 (VERINATA HEALTH INC [US]; RAVA RICHARD P [US]) 28 July 2011 (2011-07-28) paragraph [0006] paragraph [0230]; example 5 paragraph [0227] - paragraph [0228]; example 4 ----- -/--	X 1-9, 11-16,18 10,19 Y

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 19 July 2012	Date of mailing of the international search report 25/07/2012
---	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Werner, Andreas
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2011/070565

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BENDER ET AL: "A multiplex SNP typing approach for the DNA pyrosequencing technology", INTERNATIONAL CONGRESS SERIES, EXCERPTA MEDICA, AMSTERDAM, NL, vol. 1288, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 73-75, XP005393388, ISSN: 0531-5131, DOI: 10.1016/J.ICS.2005.12.031	1-9, 11-16,18
Y	abstract page 74, paragraph 2 - page 75, paragraph 2	10,19
X	----- POURMAND N ET AL: "Multiplex Pyrosequencing", NUCLEIC ACIDS RESEARCH SPECIAL PUBLICATION, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 30, no. 7, 1 January 2002 (2002-01-01), pages E31/1-E31/5, XP002329580, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/NAR/30.7.E31	1-9, 11-16,18
Y	abstract page 1, column 2, paragraph 1 - page 2, column 1, paragraph 3; figure 1 page 3, column 1, paragraph 2; figure 4	10,19
X	----- PETER M. VALLONE ET AL: "A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome", INTERNATIONAL JOURNAL OF LEGAL MEDICINE, vol. 118, no. 3, 1 June 2004 (2004-06-01), pages 147-157, XP55032759, ISSN: 0937-9827, DOI: 10.1007/s00414-004-0428-5	1-9, 11-16,18
Y	abstract; tables 1, 2, 3 page 149, column 2, paragraph 1 - page 150, column 1, paragraph 2 page 150, column 2, paragraph 2 - page 151, column 2, paragraph 3	10,19
X	----- PASTINEN T ET AL: "MINISEQUENCING: A SPECIFIC TOOL FOR DNA ANALYSIS AND DIAGNOSTICS ON OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS", GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, WOODBURY, NY, US, vol. 7, no. 6, 1 June 1997 (1997-06-01), pages 606-614, XP000699761, ISSN: 1088-9051	1-9, 11-16,18
Y	abstract; figure 1 page 610, column 2, paragraph 3 - page 613, column 1, paragraph 1; table 2	10,19
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2011/070565

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FORTINA P ET AL: "SIMPLE TWO-COLOR ARRAY-BASED APPROCH FOR MUTATION DETECTION", EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, KARGER, BASEL, CH, vol. 8, no. 11, 1 November 2000 (2000-11-01), pages 884-894, XP009012254, ISSN: 1018-4813, DOI: 10.1038/SJ.EJHG.5200558	1-9, 11-16,18
Y	abstract page 886, column 1, paragraph 4 - page 887, column 1, paragraph 2; figure 1; table 1	10,19
Y	----- US 7 919 294 B2 (FRANCO DE SARABIA ROSADO PEDRO [ES] ET AL FRANCO DE SARABIA ROSADO PED) 5 April 2011 (2011-04-05) abstract column 8, line 30 - line 35 column 10, line 6 - line 10 column 8, line 49 - line 53; claim 8	10,19
A	----- Y.-S. LIN ET AL: "A simple method using Pyrosequencing TM to identify de novo SNPs in pooled DNA samples", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 39, no. 5, 1 March 2011 (2011-03-01), pages E28-E28, XP55032687, ISSN: 0305-1048, DOI: 10.1093/nar/gkq1249 cited in the application page 5, column 2, paragraph 4 - page 6, column 1, paragraph 2	1-19
A	----- LANGAEE T ET AL: "Genetic variation analyses by Pyrosequencing", MUTATION RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 573, no. 1-2, 3 June 2005 (2005-06-03), pages 96-102, XP027632670, ISSN: 0027-5107 [retrieved on 2005-06-03] the whole document	1-19
A	----- SOBRINO B ET AL: "SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies", FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHERS IRELAND LTD, IE, vol. 154, no. 2-3, 25 November 2005 (2005-11-25), pages 181-194, XP027757784, ISSN: 0379-0738 [retrieved on 2005-11-25] the whole document -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070565

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)
 - on paper
 - in electronic form
 - b. (time)
 - in the international application as filed
 - together with the international application in electronic form
 - subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2011/070565

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005084851	A1	21-04-2005	AT 415490 T 15-12-2008
			AU 8430801 A 22-03-2002
			CA 2421857 A1 14-03-2002
			EP 1322782 A2 02-07-2003
			ES 2317928 T3 01-05-2009
			JP 2004508055 A 18-03-2004
			US 2005084851 A1 21-04-2005
			WO 0220837 A2 14-03-2002

WO 2011091046	A1	28-07-2011	US 2011230358 A1 22-09-2011
			WO 2011091046 A1 28-07-2011

US 7919294	B2	05-04-2011	BR 0204479 A 17-02-2004
			CA 2408857 A1 19-09-2002
			EP 1374827 A2 02-01-2004
			ES 2180416 A1 01-02-2003
			IL 152757 A 11-02-2009
			JP 4448280 B2 07-04-2010
			JP 2004519242 A 02-07-2004
			US 2003119042 A1 26-06-2003
			WO 02072002 A2 19-09-2002
